

**Mechanismus der
ER-Zytosol-Retrotranslokation
des K28-Toxins
in Hefe- und Säugerzellen**

Dissertation

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

von
Diplom-Biologin
Nina Christine Müller
Saarbrücken

2014

Tag des Kolloquiums: 21.11.2014
Dekan: Prof. Dr.-Ing. Dirk Bähre
Prüfungsausschuss:
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred J. Schmitt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Richard Zimmermann
Vorsitzender: Prof. Dr. Uli Müller
Akad. Mitarbeiter: Dr. Frank Hannemann

„Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür, dass dem forschenden Menschegeist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden: Die Begeisterung und die Ehrfurcht“.

Max Planck

„Am Ende wird alles gut. Und wenn es noch nicht gut ist, ist es noch nicht das Ende“.

Oscar Wilde

Für meine stolze Familie

1	Einleitung	13
	Allgemeine Aspekte zum Killerphänomen bei Hefen	13
1.1	Transport und Wirkungsweise von A/B-Toxinen	18
1.2	Degradationspathways mit alternativer Funktion in der Retrotranslokation	22
1.2.1	ER-assoziierte Degradation (ERAD)	22
1.3	Zielsetzung der Arbeit	28
2	Material und Methoden	29
2.1	Organismen	29
2.1.1	Bakterien-Stämme	29
2.1.2	Hefe-Stämme	30
2.2	Plasmide	36
2.3	Oligonukleotide	41
2.4	Kultivierungsbedingungen	42
2.4.1	Bakterien	42
2.4.2	Hefen	43
2.4.3	Dauerkulturen	44
2.5	Zellzahlbestimmung	44
2.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	44
2.6.1	Standard-PCR	44
2.6.2	SOE-PCR	45
2.7	TA-Cloning	46
2.7.1	Acceptor-Cloning	46
2.7.2	pYES-Cloning	47
2.8	Sequenzierung	48
2.9	DNA-Isolierung aus Bakterien	48
2.9.1	Alkalische Lyse	48
2.9.2	Mini-Prep	49
2.9.3	Midi-Prep	49
2.10	Restriktionsanalyse	49
2.11	Agarosegelelektrophorese	50
2.12	Reisolierung aus Agarosegelen	51
2.13	Ligation	52
2.14	Transformationsmethoden	52
2.14.1	Transformation von <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	52
2.14.2	Transformation von Hefe-Zellen mittels Lithiumacetat	53

2.15	Serieller Verdünnungstest	54
2.16	Wachstumstest	54
2.17	Herstellung von Toxinkonzentrat	55
2.18	Agardiffusionstest	57
2.19	Sphäroplastierung	58
2.20	Inkubation von Hefezellen mit K28	58
2.21	Zellaufschluss	59
2.21.1	Glasperlen	59
2.21.2	Dounce Homogenisierung	60
2.22	FACS-Analyse von Hefe-Zellen	61
2.23	UPR-Assay	62
2.23.1	Untersuchungen zur Induktion der UPR nach Toxininkubation mittels	62
2.23.2	Untersuchungen zur Induktion der UPR nach Toxinexpression mittels <i>lacZ</i> - Reportersystem	62
2.23.3	Untersuchungen zur Induktion der UPR nach Toxininkubation und mittels <i>HAC1</i> -Assay	63
2.24	Split-Ubiquitin-System	65
2.25	Co-Immunpräzipitation mittels Protein A Sepharose	66
2.26	Proteinbiochemische Methoden	67
2.26.1	SDS-Gelelektrophorese	67
2.26.2	Western-Analyse	69
2.27	Säugerzellspezifische Methoden	71
2.27.1	Kultivierung	71
2.27.2	Zellzahlbestimmung	71
2.27.3	Transfektion von Säugerzellen	71
2.27.4	Applikation von K28	72
2.27.5	Toxizitätstest an HeLa Zellen (XTT-Test)	72
2.27.6	Zellaufschluss von Säugerzellen	73
2.27.7	Indirekte Immunfluoreszenz	73
2.27.8	FACS-Analyse von HeLa-Zellen	74
2.27.9	Annexin V	75
2.27.10	Protein-Import in Mikrosomen	75
3	Ergebnisse	79
3.1	Intrazelluläre Expression der K28 α -Untereinheit unter Kontrolle des GALS-Promotors	80

3.2	Beteiligung von ERAD-Komponenten an der Retrotranslokation von K28 in Hefe	84
3.2.1	Beteiligung ER-luminaler Chaperone an der Retrotranslokation von K28	95
3.2.2	Rolle der Proteindisulfid-Isomerase Pdi1p am Retrotranslokationsprozess von K28	99
3.3	Funktion des Translokons Sec61p während der Dislokation von K28.....	103
3.3.1	„knock-down“ von Sec61p	104
3.3.2	Funktion der Cysteinreste des Translokons	105
3.3.3	Interaktion von K28 mit Sec61p.....	108
3.4	Zusammenhang der „unfolded protein response“ (UPR) mit der Retrotranslokation von K28.....	114
3.5	Beteiligung der Hrd1p-unabhängigen Proteolyse (HiP) an der Dislokation des Killertoxins	121
3.6	Rolle der Autophagozytose beim ER-Export von K28	140
3.7	Beteiligung von „lipid droplets“ an der Retrotranslokation von K28	145
3.8	Wirkung von K28 auf höhere Eukaryonten	147
3.8.1	Verwendung verschiedener Signalsequenzen zur intrazellulären Expression von K28 α	148
3.8.2	Vitalitätsbestimmung von HeLa-Zellen nach Transfektion mit K28 α -Varianten	150
3.8.3	Expressionsnachweis von K28 α mit V5-„tag“	151
3.8.4	Bestimmung des toxischen Effekts nach Toxinexpression	154
3.8.5	Rolle des proteasomalen Abbaus in HeLa-Zellen	158
3.8.6	Bestimmung des toxischen Effekts nach Applikation des reifen Heterodimers.....	160
4	Diskussion	163
	Intrazelluläre Expression von K28 α in Hefe	164
	Terminaler Phänotyp nach intrazellulärer Expression von K28 α	165
	ERAD-Komponenten und Retrotranslokation von K28 α	167
	ER-luminale Chaperone und ER-Export von K28	180
	Rolle der Pdi1p am Dislokationsprozess des Killertoxins.....	184
	Rolle von Sec61p in der Retrotranslokation von K28	190
	„knock-down“ von Sec61p	191
	Funktion der Cysteinreste des (Retro)translokons	192
	<i>sec61</i> Mutanten mit Defekten in der Retrotranslokation.....	193
	Toxinwirkung und „unfolded protein response“ (UPR)	198

Hrd1p-unabhängige Proteolyse (HiP) im ER-Export von K28	200
Autophagozytose und K28-Retrotranslokation	213
„Lipid droplets“ und Toxin-Retrotranslokation	216
Alternative Mechanismen der Retrotranslokation	221
Modell zur ER-Zytosol-Retrotranslokation von K28 und K28 α	224
Wirkung von K28 bzw. K28 α auf höhere Eukaryonten	228
Rolle des proteasomalen Abbaus von K28 α in HeLa-Zellen	233
Wirkung des reifen Toxins auf höhere Eukaryonten	234
5 Ausblick	237
6 Zusammenfassung	241
7 Literatur	243
8 Danksagung	266

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillin-Resistenz
APC	"anaphase promoting complex"
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BiFC	„bimolecular fluorescence complementation“
Bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	"complementary DNA"
COP	„coat protein complex“
CP	„core“ Partikel
CPY	Carboxypeptidase der Hefe
CPY*	mutierte Variante der Carboxypeptidase
CT	Cholera Toxin
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins
Cub	C-Terminus von Ubiquitin
Cvt	„cytosol to vacuole targeting“
d/o	"drop out"
Da	Dalton
DAmP	“decreased abundance by mRNA perturbation”
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DT	Diphtherie Toxin
DTT	Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinierungsenzym
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-2	Elongationsfaktor 2
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
FACS	„fluorescence activated cell sorting“
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FOA	Fluororotsäure
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	"guanine nucleotide exchange factor"
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GLB	„gel loading buffer“
GTE	Glukose-Tris-EDTA
GTP	Guanosintriphosphat
HiP	Hrd1p-unabhängige Proteolyse
HSP	Hitzeschockprotein
IIF	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
KanR	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	„lysogeny broth“
LD	„lipid droplet“
LiAc	Lithiumacetat
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MBA	Methylenblau-Agar
MCS	„multiple cloning site“
MF	α -„mating“ Faktor
mRFP	monomeres rot fluoreszierendes Protein
mRNA	"messenger RNA"
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
Nub	N-Terminus von Ubiquitin
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“
Ori	Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PaT	<i>Pichia acaciae</i> Toxin
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“
PEG	Polyethylenglykol
PGK	Phosphoglycerat-Kinase pH "potentia hydrogenii"
PI	Propidiumiodid
PMKT	<i>Pichia membranifaciens</i> Killertoxin
pptox	Präprotoxin
PVC	prävakuläres Kompartiment
PVDF	Polyvinylidenfluorid
pαF	Pro--Faktor
rFE	relative Fluoreszenzeinheit
RIP	Ribosomen-inaktivierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAPII	RNA-Polymerase II
RNase	Ribonuklease
ROS	"reactive oxygen species"
RP	regulatorischer Partikel
rpm	„revolutions per minute“
RT	Raumtemperatur
RTA	Ricin Toxin A
SBF	"SCB binding factor"
SC	„synthetic complete“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Sterylester
SNARE	soluble <i>N</i> -ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SOC	"super optimal broth with catabolicrepressor"
SOE	"splicing by overlapping extensions"
SS	Signalsequenz
SUS	„Split-Ubiquitin System“
SV40	Simian-Virus 40
TAF	"TBP-associated factor"
TAG	Triacylglycerol
TAP	"tandem affinity purification"
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borsäure/EDTA

TBS	„tris buffered saline“
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TGN	„trans-golgi-network“
TM	Tunikamycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
ü. N.	über Nacht
UE	Untereinheit
UPR	„unfolded protein response“
UPS	Ubiquitin-Proteasom System
UTR	"untranslated region"
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	"volume per volume"
VLP	"virus like particle"
w/o	„without“
w/v	„weight per volume“
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -Dgalactopyranosid
YNB	„yeast nitrogen base“
YPD	„yeast peptone dextrose“

Abstract

Das Killertoxin K28 ist ein viral codiertes A/B-Toxin der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, das nach endozytotischer Aufnahme und retrogradem Transport zum ER gelangt. Nach Retrotranslokation äußert sich der letale Effekt in Abhängigkeit zur applizierten Konzentration entweder in einem G1/S-Zellzyklusarrest oder der Apoptose. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die ER-Zytosol-Dislokation des Dimers durch das Chaperon BiP sowie die Isomerase-Aktivität der Protein-Disulfidisomerase und eine ausgeglichene Ca^{2+} -Konzentration katalysiert wird. Die Überwindung der ER-Membran wird vermutlich durch Sec61p vermittelt und findet unabhängig von ERAD-Komponenten, UPR sowie Autophagozytose oder der Synthese von „lipid droplets“ (LD) statt. Die Expression der α -Untereinheit führt ebenfalls zu einem G1/S-Arrest der Zielzelle. Auch hier werden Kar2p sowie eine intakte Ca^{2+} -Homöostase zur effizienten Retrotranslokation in das Zytosol benötigt. Sec61p sowie Der1p des ERAD-L-Pathways bilden wahrscheinlich die potentielle Dislokationspore, wobei der ER-Export auch mit der LD-Synthese in Zusammenhang gebracht werden kann. Die gängigen zellulären Degradations-Prozesse wie ERAD, HiP und Autophagie tragen jedoch ausschließlich zum Abbau des Toxins bei. Die Wirkung der K28 α -Untereinheit auf höhere Eukaryonten resultiert in der Induktion der Apoptose. UPS scheint im Säuger den ER-Export von K28 α zu unterstützen, da die Substitution interner Lysinreste mit einer Reduktion der Toxizität einhergeht.

The killer toxin K28 is a viral encoded A/B toxin of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* which is taken up by endocytosis and is transported retrogradely to the ER. After retrotranslocation the lethal effect culminates either in a G1/S cell cycle arrest or in apoptosis depending on the toxin concentration. In this work it was shown that ER-cytosol dislocation of the α/β dimer is catalyzed by the chaperone BiP and the isomerase activity of protein disulfide isomerase Pdi1p and requires balanced intracellular Ca^{2+} levels. Passing the ER-membrane is assumed to be mediated by Sec61p and is independent of ERAD components, UPR, autophagy or the synthesis of "lipid droplets" (LDs). The expression of the plasmid-driven K28 α -subunit also leads to a G1/S-arrest of the target cell. Kar2p and an intact Ca^{2+} homeostasis are also required for efficient retrotranslocation into the cytosol. As part of the ERAD-L pathway, Sec61p and Der1p are likely to form the potential dislocation pore whereupon ER export of K28 α can also be associated with LD-synthesis. However, all major cellular degradation processes such as ERAD, HiP and autophagy contribute exclusively to the degradation of the toxin. The effect of K28 α expression in higher eukaryotes results in the induction of apoptosis. In this case, the UPS seems to support ER export of K28 α since the substitution of internal lysine residues is accompanied by a reduction of toxicity.

1 Einleitung

Allgemeine Aspekte zum Killerphänomen bei Hefen

Die Fähigkeit von Hefen Proteintoxine zu sezernieren, ging mit der Entdeckung sogenannter „Killerstämme“ der Gattung *Saccharomyces cerevisiae* einher (BEVAN UND MAKOWER, 1963), die sich in ihrem natürlichen Lebensraum aufgrund dieser Eigenschaft, in der Konkurrenz um ein limitiertes Nährstoffangebot, einen Wachstumsvorteil gegenüber sensitiven Hefestämmen verschaffen. Weitere Killerhefen wurden über die Gattung *Saccharomyces* hinaus unter anderem bei *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Williopsis* und *Zygosaccharomyces* beobachtet, die ohne direkten Zell-Zell-Kontakt einen letalen Effekt auf sensitive Stämme verschiedener Spezies und Genera ausüben und somit anti-mykotisches Potential besitzen (BUSSEY UND SKIPPER, 1975; GUNGE ET AL., 1981; HAYMAN UND BOLEN, 1991; HODGSON ET AL., 1994; KOLTIN UND DAY, 1975; PARK ET AL., 1994; RADLER ET AL., 1993; YOKOMORI ET AL., 1988). In der Medizin bietet dies Vorteile gegenüber klassisch eingesetzten Antimykotika, da sich die Toxinaufnahme aufgrund der spezifischen Oberflächenbeschaffenheit humanpathogener Pilze, wie *Candida albicans* oder *Pneumocystis carinii*, auf den spezifischen Krankheitserreger beschränkt (MAGLIANI ET AL., 2001; SCHMITT UND BREINIG, 2002; SEGUY ET AL., 1998). Des Weiteren werden Killerhefen im Fermentationsprozess als Starterkulturen genutzt, um Kontaminationen mit sensitiven Stämmen vorzubeugen und finden Verwendung als Konservierungsmittel in der Nahrungsmittelindustrie (BOONE ET AL., 1990; LOWES ET AL., 2000; MAGLIANI ET AL., 1997; PEREZ ET AL., 2001; PETERING ET AL., 1991; VAGNOLI ET AL., 1993). In der Biotechnologie konnten Killertoxine zum Verständnis zellulärer Prozesse wie Proteinsekretion und –prozessierung sowie dem retrograden Transport beitragen und der Einsatz des Killertoxins KP4 der Hefe *Ustilago maydis* ermöglichte es bereits, Mais- und Tabakpflanzen vor Kontamination mit pathogenen Hefen zu schützen (ALLEN ET AL., 2011; PARK ET AL., 1996).

Die Ausbildung des Killer-Phänotyps kann zytoplasmatisch durch dsRNA Viren, lineare dsDNA Plasmide oder chromosomal codiert sein, wobei die dsRNA-haltigen-Mykoviren zur Familie der *Totiviridae* zählen. Killerstämme sind immun gegenüber ihrem eigenen Toxin, zeigen jedoch weiterhin Sensitivität bezüglich anderer Toxine (YOUNG UND YAGIU, 1978). Die drei Haupt-Vertreter K1, K2 und K28 aus *S. cerevisiae* wurden anhand ihres Aktivitätsprofils klassifiziert. K1 und K2 wirken als Ionophore, während K28 die DNA-Synthese hemmt und den Zellzyklus am Übergang der G1 zur S-Phase arretiert (NOVOTNA ET AL., 2004; SCHMITT ET AL., 1996).

Voraussetzung zur K28-Toxinproduktion ist die Infektion zweier dsRNA-Virus-Typen. Jedes dieser Viren liegt encapsidiert in „virus-like particles“ (VLP) vor, persistiert im Zytoplasma der Zelle und wird ausschließlich vertikal über Zellteilung weitergegeben (CHEN *ET AL.*, 1994; WICKNER, 1989). Das L-A Helfervirus („Large“) codiert für die Leserahmen neuer Capsidproteine (Gag) sowie für eine RNA-abhängige RNA-Polymerase (Gag-Pol), die zur Synthese neuer viraler Strukturen benötigt wird. Das M-Virus („Medium“) bildet die genetische Grundlage zur Synthese des Präprotoxins (pptox), das auf dem sekretorischen Weg als Toxinvorläufer translatiert wird und darüber hinaus die Immunität gegenüber dem internalisierten Toxin vermittelt (SCHMITT UND TIPPER, 1995).

TOXIN-PROZESSIERUNG

Das Präprotoxin (38 kDa) besteht aus einem hydrophoben Sekretionssignal, einer Pro-Region, deren Bedeutung noch nicht vollständig charakterisiert ist sowie den beiden Untereinheiten α (10,5 kDa) und β (11 kDa), die durch die γ -Sequenz voneinander getrennt werden. Nach seinem post-translationalen Import in den sekretorischen Weg wird im ER die Signalsequenz abgespalten und der Toxinvorläufer gelangt nach N-Glykosylierung der γ -Untereinheit sowie der Bildung einer Disulfidbrücke zwischen α -Cys56 und β -Cys340 zum Golgi-Apparat. Dort entfernt die Endoprotease Kex2p die pro-Region und γ -Untereinheit, bevor die Carboxypeptidase Kex1p die C-Termini der α - und β -Untereinheit prozessiert und somit das HDEL-Signal der β -Untereinheit exponiert (SCHMITT UND TIPPER, 1990). Dieses ER-Retentionssignal ist essentiell für die spätere Intoxikation und würde ohne den maskierenden Argininrest das Dimer in der produzierenden Zelle zurückhalten. Nach diesem Reifungsprozess kommt es zur Sekretion des heterodimeren A/B-Toxins, das nach Interaktion mit Komponenten der Zellwand sowie eines Plasmamembranrezeptors von sensitiven Hefen internalisiert werden kann (ABBILDUNG 1).

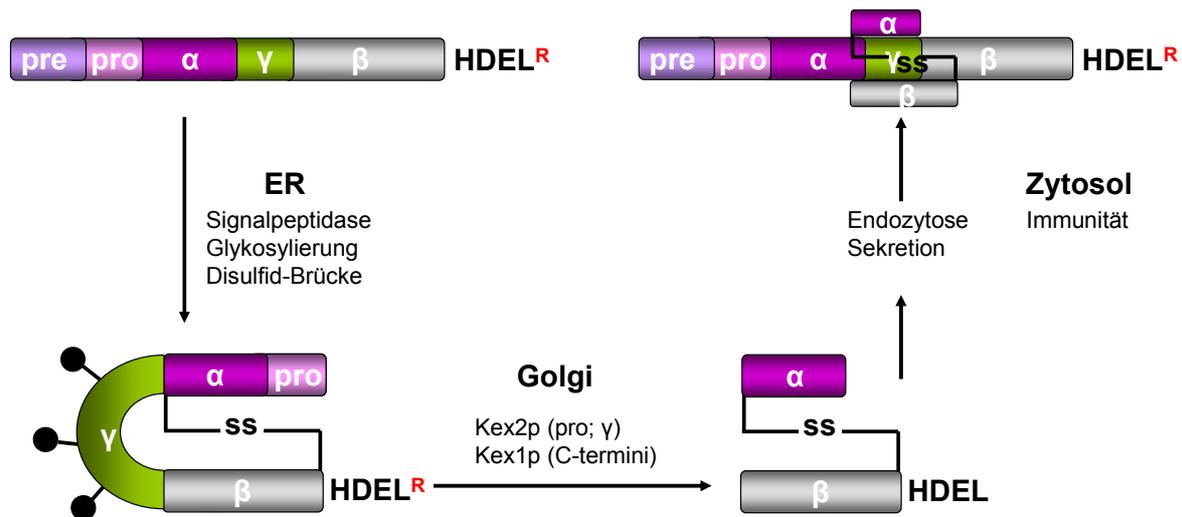


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Prozessierung des Vorläufertoxins (pptox) zum reifen Toxin und Bildung eines schützenden pptox/K28-Immunitätskomplexes im Zytosol toxinproduzierender Hefezellen. Nach post-translationalem ER-Import wird zunächst die Signalsequenz abgespalten, die γ -Untereinheit glykosyliert sowie eine Disulfidbrücke zwischen α und β geknüpft. Die endgültige Modulation zum aktiven Toxin vermitteln die Proteasen Kex1p und Kex2p im Golgi, die die pro-Region entfernen und durch Prozessierung der C-Termini beider Untereinheiten das HDEL-Motiv an K28 β demaskieren. Dadurch wird nach Sekretion die Internalisierung durch eine Zielzelle ermöglicht. Diese ist in der Lage, sofern sie das gleiche Killertoxin selbst produziert, das endozytierte Dimer im Zytosol zu komplexieren und auf diese Weise eine Expressions-vermittelte Immunität auszubilden.

AUFNAHME UND RETROGRADER TOXINTRANSPORT

K28 tötet sensitive Hefen in einem zweistufigen rezeptorvermittelten Prozess. Der initialen Energie-unabhängigen Bindung an α -1,3-Mannoproteine der Zellwand schließt sich ein Energie-abhängiger Schritt an, in dem K28 vermutlich über sein HDEL-Signal mit dem Rezeptor Erd2p auf Ebene der Plasmamembran interagiert (GIEßELMANN, 2011; SCHMITT UND RADLER, 1987). Die Ubiquitinligase Rsp5p sowie das konjugierende Enzym Ubc4p vermitteln im bisherigen Modell durch Ubiquitinierung die Regulation der Endozytose und sind somit an der Internalisierung des Heterodimers beteiligt. Ein Teil des Toxins gelangt auf seinem retrograden Weg zur Vakuole, die restlichen Moleküle erreichen über das endosomale System und den Golgi-Apparat das Endoplasmatische Retikulum. Aufgrund des neutralen pH-Wertes trennen sich in diesem Kompartiment Toxin und Rezeptor und das Holo-Toxin transloziert ins Zytosol. Die β -Untereinheit wird ubiquitiniert und proteasomal abgebaut, wohingegen K28 α im Kern seinen letalen Effekt vermittelt (SCHMITT *ET AL.*, 1996). In Toxinproduzierenden Hefen kann das Dimer vor der Dissoziation in seine Untereinheiten mit dem Toxinvorläufer (pptox) wechselwirken und nach Ubiquitinierung ebenfalls mit Hilfe des Proteasoms degradiert werden, was sich in einer Immunität gegenüber dem internalisierten reifen Heterodimer äußert.

RETROTRANSLOKATION DES REIFEN TOXINS

Da das Translokon bisher als Haupt-Exportkanal in Hefe und höheren Eukaryonten beschrieben wird, wurde angenommen, dass K28 ebenfalls mit Hilfe von Sec61p aus dem ER in das Zytosol gelangt (SCHMITT UND BREINIG, 2006). Darüber hinaus vermittelt es auch die Retrotranslokation weiterer A/B-Toxine wie Ricin, Cholera Toxin und *Pseudomonas* Exotoxin A. Im Gegensatz zur Mehrheit der Vertreter dieser Toxin-Klasse wurde für K28 bislang keine Beteiligung der ER-assoziierten Degradation (ERAD) nachgewiesen, die üblicherweise an Dislokation und Abbau fehlgefalteter Proteine beteiligt ist. Mutanten der klassischen ERAD-Komponenten Hrd1p, Der1p, Cue1p, Ubc6p und Ubc7p zeigen keine veränderte Sensitivität gegenüber K28, wohingegen eine *sec61* Mutante (*sec61-3*) einen vermindert sensitiven Phänotyp ausbildet. Die ER-luminalen Chaperone Kar2p, Pdi1p, Jem1p und Scj1p sind ebenfalls für die Retrotranslokation des Dimers verantwortlich und zeigen bei Deletion bzw. Mutation eine Toxinresistenz (HEILIGENSTEIN, 2008). Die erhaltenen Ergebnisse zur Beteiligung der essentiellen Proteine Kar2p und Sec61p wurden durch Untersuchungen temperatursensitiver Mutanten erhalten, deren Defekte sich ebenfalls auf den Proteinimport auswirken; auch die genaue Funktion der Pdi1p am ER-Export von K28 konnte bisher noch nicht eingegrenzt werden. Somit ist nach wie vor offen, welche zentralen Komponenten am ER-Export beteiligt sind, welcher zelluläre Mechanismus die Grundlage für diesen Verlauf bildet und welcher Prozess die treibende Kraft für diesen retrograden Schritt bereitstellt.

INTRAZELLULÄRE EXPRESSION DER K28 α -UNTEREINHEIT

Im artifiziellen System der plasmidgetriebenen Expression von K28 α bilden sensitive Hefen einen Selbstkillerphänotyp aus. Ein „Screening“ verschiedener Deletionsmutanten ergab Hinweise auf den intrazellulären Transportweg des Toxins, wobei postuliert wurde, dass K28 α nach seiner Translation zunächst obligat in den sekretorischen Weg und nach Prozessierung der Pro-Region im Golgi zurück zum ER gelangen muss, um einen letalen Effekt zu vermitteln. Im Endoplasmatischen Retikulum nutzt es, im Gegensatz zum reifen Heterodimer, klassische ERAD-Komponenten wie Hrd1p, Ubc1p, Ubc7p, Cue1p, Der1p, Yos1p und Cne1p sowie den Mechanismus der Ubiquitinierung zur Retrotranslokation (KELKEL, 2009). Diese Schlussfolgerung wurde anhand von Wachstumstests gezogen, deren Phänotyp jedoch in vielen Fällen nicht eindeutig vom WT zu differenzieren war. Daher bestand die Notwendigkeit einer genaueren Untersuchung anhand einer optimierten Toxinexpression sowie eines angepassten Testsystems.

WIRKUNGSWEISE

Nach Reduktion des Dimers im Zytosol inhibiert K28 α im Kern die DNA-Synthese und arretiert die Zellen am Übergang von der G1- zur S-Phase. Die Zelle bildet eine mittelgroße Knospe aus, besitzt einen Zellkern in der Mutterzelle sowie einen nicht-replizierten DNA-Gehalt (1n). Da die α -Untereinheit mit 10,5 kDa nur ein niedriges Molekulargewicht besitzt, ist es möglich, dass sie durch passive Diffusion in den Kern gelangt, ohne einen aktiven Transportmechanismus zum Kernimport zu nutzen (SCHMITT *ET AL.*, 1996). Es wurden bereits elf nukleäre Proteine identifiziert, die mit K28 α interagieren. Dazu zählen unter anderem Ctr9p, Zds1p sowie das TATA-Bindeprotein Spt15p, das an der transkriptionellen Regulation der G1/S-Zyklusexpression (Cln1p und Cln2p) beteiligt ist und somit vermutlich deren Synthese inhibiert. Darüber hinaus ist die α -Untereinheit vermutlich in der Lage, den Abbau der M-Phase-Cycline durch Wechselwirkung mit Apc2p, einer Untereinheit des Anaphase-Promoting-Komplexes (APC), der das Fortschreiten des Zellzyklus durch die M-Phase sichert, zu hemmen (REITER, 2004). Ein direkter Beweis der Kernlokalisierung des Toxins konnte bisher nicht erbracht werden; jedoch spricht der Zusammenhang zwischen Größe des Kernporenkomplexes und dem ausgebildeten Phänotyp nach Expression von K28 α für eine solche Theorie. Auch die gesteigerte Toxizität nach Fusion von K28 α mit dem Kernlokalisierungssignal NLS untermauerte diese Hypothese (HOFFMANN, 2013; REITER, 2004). Die beiden Killertoxine Zymocin aus *Kluyveromyces lactis* sowie PaT aus *Pichia acaciae* arretieren ebenfalls in sensitiven Hefezellen den Zellzyklus (Zymocin: späte G1-Phase; PaT: frühe S-Phase), wobei dies vermutlich einen sekundären Effekt ihrer tRNA-Nukleaseaktivität darstellt und aufgrund der vermittelten Hemmung der Proteinsynthese ausgelöst wird (KLASSEN *ET AL.*, 2008; LU *ET AL.*, 2005). Analog zu den beschriebenen A/B-Toxinen induziert auch PMKT2 aus *Pichia membranifaciens* den Zellzyklus in der frühen S-Phase, bildet eine unreife Knospe aus und ist wie Zymocin und PaT in der Lage, bei niedriger Dosierung Apoptose zu induzieren. Auch die Applikation einer geringen K28-Konzentration äußert sich auf diese Weise, was sich in der Ausbildung typischer Apoptosemarker wie DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation, Translokation von Phosphatidylserin sowie der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies widerspiegelt (REITER *ET AL.*, 2005). Da der K28-Gehalt im natürlichen Lebensraum toxinproduzierender Zellen ebenfalls dieser geringen Konzentration entspricht, scheint der programmierte Zelltod ein wichtiger Aspekt zur Vermittlung des letalen Effekts zu sein.

1.1 Transport und Wirkungsweise von A/B-Toxinen

ALLGEMEINE ASPEKTE DES RETROGRADEN TRANSPORTS

Als Mitglied der A/B-Toxinfamilie zeigt K28 Ähnlichkeiten zu klinisch relevanten pflanzlichen bzw. bakteriellen Vertretern. Diese Toxine bestehen in der Regel aus einer enzymatisch aktiven α -Untereinheit, die Einfluss auf die Physiologie der Zielzelle ausübt und einer oder mehreren β -Untereinheit(n), die für die Zell-Bindung sowie den Transport innerhalb der Zelle verantwortlich sind (ABBILDUNG 2).

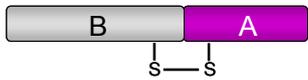
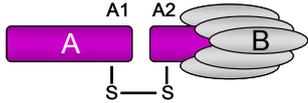
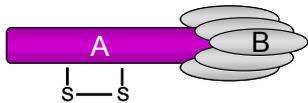
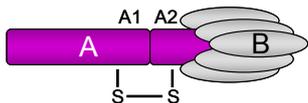
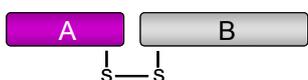
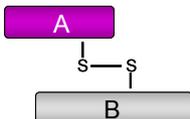
Toxin	Struktur	Aktivität/„target“
<i>Pseudomonas</i> Exotoxin A		ADP-Ribosyltransferase/EF-2
Cholera Toxin		ADP-Ribosyltransferase/ heterotrimeres G-Protein
Pertussis Toxin		ADP-Ribosyltransferase/ heterotrimeres G-Protein
Shiga Toxin		N-Glykosidase/28S rRNA
Ricin		N-Glykosidase/28S rRNA
K28		Nicht bekannt

Abbildung 2: Übersicht zur Struktur, enzymatischen Aktivität sowie den intrazellulären „targets“ medizinisch relevanter A/B-Toxine. Der charakteristische Aufbau beinhaltet eine oder mehrere B-Kette(n), die sich in einigen Fällen aus mehreren Subkomplexen zusammensetzen sowie einer A-Kette, die den toxischen Effekt in der Zielzelle vermittelt (VERÄNDERT NACH SANDVIG UND VAN DEURS, 2002).

Sie werden zunächst in inaktiver Form synthetisiert und unterliegen der proteolytischen Aktivierung in Produzenten oder der Zielzelle, wobei spezifische Rezeptoren bzw. Kohlenhydratstrukturen der Zelloberfläche die Internalisierung vermitteln. Eine Konformationsänderung, ausgelöst durch den aziden pH-Wert der Endosomen, ermöglicht es dem Diphtherie- und Anthrax-Toxin direkt aus diesem Kompartiment in das Zytosol zu translozieren. Dabei lagern sich hydrophobe Bereiche in die Membran und vermitteln so den Export der toxischen A-Untereinheit (FALNES UND SANDVIG, 2000). Äquivalent zu Cholera Toxin, Ricin und Shiga Toxin wird K28 nach endozytotischer Aufnahme stattdessen retrograd über das ER ins Zytosol transportiert, um schließlich sein „target“ zu erreichen. Frühere Untersuchungen humanpathogener Toxine konnten bereits komplexe Mechanismen der Endozytose und parallele Wege des Endosom-Golgi-„targetings“ sowie des retrograden Transports aufklären. Ihre Wege zu kennen, ermöglicht ihre Anwendung in der Medizin, mit dem Schwerpunkt des „drug-delivery“ sowie der Therapie von Intoxikationen (FRANKEL *ET AL.*, 2000). Die Untersuchung dieser Pathways in genetisch manipulierbaren Organismen wie Hefe könnte neue Erkenntnisse über Gemeinsamkeiten von A/B-Toxinen und ihren Zielproteinen in Säugerzellen ermöglichen. Zur endozytotischen Aufnahme können neben Clathrin-abhängigen auch -unabhängige Wege zum Transport über Endosomen zum Golgi genutzt werden. KDEL-Rezeptoren sowie die COPI-Vesikel-Maschinerie, die normalerweise für den Rücktransport ER-residenter Proteine verantwortlich sind, unterstützen meist die weitere Translokation der Toxine mit KDEL-ähnlichem C-terminalem Erkennungsmotiv (SANDVIG UND VAN DEURS, 2002). Ohne KDEL- bzw. RDEL-Sequenz kommt es zu einem starken Aktivitätsverlust des Cholera Toxins bzw. des *Pseudomonas* Exotoxin A. Da der letale Effekt allerdings nicht vollständig zum Erliegen kommt, ist davon auszugehen, dass ein alternativer COPI-unabhängiger ER-Transport existiert.

Humanpathogene A/B-Toxine bilden aufgrund ihrer Eigenschaften ein vielversprechendes Werkzeug für medizinische Zwecke. Nach Applikation des Diphtherie-Toxins gelang es beispielsweise bereits gezielt Tumorzellen abzutöten und die B-Untereinheit zur Diagnostik und Therapie als Carrier für Peptide und Proteine zu nutzen (TURTURRO, 2007). Des Weiteren können A/B-Toxine als System zur genaueren Erforschung zellulärer Prozesse wie Endozytose oder retrogradem Transport eingesetzt werden und repräsentieren somit ein unverzichtbares „tool“ der Grundlagenforschung. Da das Killerphänomen auf ein homologes System zurückzuführen ist, gilt die Übertragung dieses Modells auf höhere Eukaryonten als wegweisende Herausforderung.

CHOLERA TOXIN UND PERTUSSIS TOXIN

Das Cholera Toxin (CT) aus dem Bakterium *Vibrio cholerae* befällt humane Darmepithelzellen, nachdem das Holotoxin sezerniert und durch eine Serin-ähnliche Protease, die ebenfalls vom Bakterium freigesetzt wird, an Position R192 geschnitten wurde (MEKALANOS *ET AL.*, 1979). Über eine homopentamere B-Untereinheit, die den C-Terminus der A-Untereinheit umgibt, bindet CT zunächst an den Gangliosid-Rezeptor GM1 und gelangt nach endozytotischer Aufnahme COPI-abhängig zum ER (SPANGLER, 1992; ZHANG *ET AL.*, 1995). Die Fragmente A1 und A2 der katalytischen Einheit sind über eine Disulfidbrücke verbunden, wobei die aktivierte A1-Untereinheit im ER vom Rest des Toxins getrennt und mit Hilfe von Sec61 und Hrd1 in das Zytosol transloziert (BERNARDI *ET AL.*, 2010; SCHMITZ *ET AL.*, 2000). Dort katalysiert A1 die ADP-Ribosylierung des G α -Proteins, wodurch die Öffnung von Chlorid-Kanälen initiiert und damit verbunden eine massive Salz und Wassersekretion bedingt (SEARS UND KAPER, 1996).

Von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese des Keuchhustens ist das Pertussis Toxin (PT), das durch Infektion des respiratorischen Trakts mit dem Gram-negativen Coccobacillus *Bordetella pertussis* ausgelöst wird (TUOMANEN UND HENDLEY, 1983). Das Exotoxin besitzt ebenfalls eine AB₅-Form, deren B-Oligomer aus einem pentameren Ring besteht und an einen bisher noch nicht identifizierten Rezeptor bindet. Wie bei den meisten A/B-Toxinen besitzt die A-Kette eine enzymatische Aktivität, die heterotrimere G-Proteine der Zelle modifiziert und somit durch ADP-Ribosyltransferase-Aktivität den Gi-Proteingekoppelten Signalweg inhibiert (KATADA *ET AL.*, 1983; WITVLIET *ET AL.*, 1989).

SHIGA TOXIN UND RICIN

Das Shiga Toxin aus *Shigella dysenteriae* sowie das Shiga Toxin 1 aus *E. coli* unterscheiden sich lediglich in einer Aminosäure der A-Untereinheit. Nach Infektion kommt es anfänglich zu Diarrhoe, später zu renalen oder nervösen Komplikationen. Die hämorrhagische Colitis bzw. das Hämorrhagisch-Urämische Syndrom (HUS) können zum Tod führen (LINGWOOD, 1996; TARR *ET AL.*, 2005). Der Aufbau des Shiga Toxins entspricht analog zu CT und PT einer AB₅-Struktur, deren B-Kette (StxB) für die Bindung an den Glycosphingolipid Globotriaosylceramid-Rezeptor (Gb₃) verantwortlich ist. Die enzymatisch aktive A-Untereinheit (StxA) repräsentiert eine N-Glykosidase, die einen Adenin-Rest im α -Sarcin-Loop der 28S rRNA eukaryotischer Ribosomen spaltet und somit die Protein-Translation inhibiert (HALE UND FORMAL, 1980). Im Golgi erfolgt die Spaltung von StxA in ein katalytisches A1-Fragment sowie ein StxB-assoziiertes A2-Fragment, die jedoch über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben (O'BRIEN UND HOLMES, 1987).

Die anschließende Reduktion dieser Verknüpfung durch PDI erfolgt nach einem COPI-unabhängigen Transport zum ER mit der Konsequenz der Sec61-vermittelten Dislokation des A1-Fragments in das Zytosol (JOHANNES UND ROMER, 2010; TARRAGO-TRANI UND STORRIE, 2007; YU UND HASLAM, 2005). Die Interaktion von StxA1 mit der ERAD-Maschinerie setzt zwar nicht die Erkennung einer bestimmten Sequenz voraus, erfordert jedoch vermutlich die Exposition eines degenerierten strukturellen Elements wie der hydrophoben C-terminalen Region (LAPOINTE ET AL., 2005). Die eigentliche Dislokation des intrazellulär exprimierten Toxins steht in Abhängigkeit zur Ligaseaktivität von Hrd1p, was den Schluss zulässt, dass das Shiga Toxin als ubiquitiniertes Protein extrahiert wird (LI ET AL., 2012). Aufgrund seiner wenigen Lysinreste bzw. seiner Fähigkeit, sich im Zytosol umgehend zurückzufalten, entgeht es größtenteils dem proteasomalen Abbau (HAZES UND READ, 1997). Dennoch kann die Toxizität durch die Gabe eines proteasomalen Inhibitors um 50 % gesteigert werden, was ebenfalls der Eigenschaft von Ricin und Cholera Toxin entspricht (DEEKS ET AL., 2002; WESCHE ET AL., 1999).

Der Wunderbaum *Ricinus communis* produziert in seinen Samen das stärkste Toxin biologischer Herkunft, das somit das Potential zum Einsatz als biologische Waffe aufweist (AUDI ET AL., 2005). Das Pflanzengift Ricin besitzt eine heterodimere Struktur, deren α - und β -Untereinheit äquivalent zu K28 über eine Disulfid-Brücke verbunden sind. Die A-Kette entfernt mit Hilfe ihrer N-Glykosidase-Aktivität einen spezifischen Adenin-Rest der ribosomalen 28S rRNA, so dass die Bindung der essentiellen Elongationsfaktoren EF-2 und EF-1 irreversibel blockiert wird. Ricin hemmt jedoch nicht nur die Proteinsynthese, sondern inhibiert auch die „unfolded protein response“ (UPR), was zur Induktion der Apoptose führt (HUGHES ET AL., 1996). Nach Toxin-Exposition kommt es zu Übelkeit, Erbrechen, Krämpfen und meist zum Tod durch Lähmung des Atemzentrums. Die Toxinaufnahme erfolgt durch Interaktion mit komplexen Kohlenhydrat-Strukturen von Glykoproteinen bzw. -lipiden der Plasmamembran, die einen terminalen N-Acetylglukosamin- bzw. β -1,4-Galaktoserest besitzen. Lediglich 5 % des Toxins erreichen ohne die Unterstützung eines Retentionssignals über alternative Routen den Weg zum Golgi und ER. Die Retrotranslokation kann nach Spaltung des Dimers in RTA und RTB durch die Proteindisulfid-Isomerase (PDI), sowohl mit Sec61 als auch weiteren ERAD-Komponenten in Verbindung gebracht werden. Nach Deletion von Hrd1p, Der1p und Hrd3p in Hefe, war neben einem Verlust der Toxizität ein verringerter Abbau durch das Proteasom erkennbar (SIMPSON ET AL., 1999). Höhere Eukaryonten dislozieren das Toxin vermutlich über einen Mechanismus, der Derlin-1, Derlin-2 und Derlin-3 beinhaltet und sichern mit Hilfe zytosolischer Chaperone im Anschluss die Rückfaltung der A-Kette zu ihrer aktiven Konformation (SANDVIG ET AL., 2002).

1.2 Degradationspathways mit alternativer Funktion in der Retrotranslokation

Der Zelle stehen unterschiedliche Möglichkeiten zur Verfügung, um endogene Prozesse zum Export zu nutzen. Oft werden Degradationspathways genutzt, um am Zielort der eigentlichen Degradation zu entgehen.

1.2.1 ER-assoziierte Degradation (ERAD)

ALLGEMEINE ASPEKTE UND SCHLÜSSELKOMPONENTEN

In eukaryotischen Zellen ist eine stringente Qualitätskontrolle während der Proteinsynthese von äußerster Wichtigkeit. Sekretorische Proteine werden aufgrund ihrer N-terminalen Signalsequenz zunächst über Sec61p in das ER importiert. Im ER angekommen, durchlaufen sie verschiedene Reifungsprozesse, zu denen neben der Ausbildung einer sekundären bzw. tertiären Struktur, die N-Glykosylierung sowie die Bildung von Disulfidbrücken oder die Oligomerisierung in übergeordnete Komplexe zählen. Im Anschluss werden die Proteine in Vesikel verpackt und zu ihrem Zielkompartiment transportiert. Treten Fehler im Faltungsprozess auf, werden die betreffenden Proteine im ER zurückgehalten oder wieder dorthin zurücktransportiert. Mitte der 1990er Jahre wurde entdeckt, dass defekte sekretorische Proteine durch das Proteasom abgebaut werden, nachdem sie selektiv aus dem ER in das Zytosol exportiert wurden. Dieser Prozess wird unter dem Begriff ER-assoziierte Degradation (ERAD) zusammengefasst und ist in der Lage, ein breites Spektrum veränderter Proteine zu erkennen, das von großen transmembranen Glykoproteinen wie CFTR („cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) bis hin zu kleinen löslichen nicht-glykosylierten Proteinen wie dem mutierten α -Faktor (α F) reicht (KISER *ET AL.*, 2001; PILON *ET AL.*, 1997).

Der ERAD-Pathway richtet sich nach der Lokalisation der Fehlfaltung. Lösliche Proteine und Membranproteine mit Defekten in ihrer luminalen Domäne werden von ERAD-L erkannt, Membranproteine mit Mutationen in ihrer zytoplasmatischen Domäne nutzen Komponenten des ERAD-C-Pathways. Das Prinzip beider Wege beinhaltet die Erkennung des Substrats, seine Extraktion aus der ER-Membran sowie die Markierung mit Ubiquitin mittels konjugierender Enzyme und E3-Ubiquitinligasen. Dem schließt sich die Translokation durch den Cdc48-Komplex sowie die proteasomale Degradation an. Einige ERAD-L-Substrate nutzen darüber hinaus einen alternativen Weg, der den Transport zum Golgi und wieder zurück zum ER beinhaltet und in einer Hrd1p-unabhängigen Proteolyse (HiP) resultiert. Die obligate Ubiquitinierung, als Voraussetzung zum proteasomalen Abbau, erfolgt mit Hilfe von Rsp5p sowie Ubc4p (VASHIST *ET AL.*, 2001).

Um differenzieren zu können, ob es sich bei einem ER-luminalen Intermediat um ein Protein handelt, das sich noch im Faltungsprozess befindet oder bereits als terminal fehlgefaltetes Substrat fungiert, ist die Interaktion mit Chaperonen unverzichtbar. Je nach Eigenschaft des Substrats verändert sich der Anspruch an das Hsp70-Chaperon Kar2p (BiP). Während die Degradation löslicher Substrate wie α -Faktor oder CPY* mit Hilfe dieses Chaperons sowie Komponenten des ER/Golgi- bzw. Golgi/ER-Vesikeltransport abläuft, werden Transmembranproteine unabhängig von diesen Untereinheiten dem ERAD-Pathway zugeführt (BRODSKY, 1996; PLEMPER *ET AL.*, 1997). Die Aktivität von Kar2p wird durch Jem1p und Scj1p unterstützt, die aufgrund ihrer J-Domäne dessen ATPase-Aktivität verstärken (NISHIKAWA UND ENDO, 1997; SCHLENSTEDT *ET AL.*, 1995). Nach der Erkennung durch Hsp70 erfolgt die Interaktion mit der Protein-Disulfidisomerase (Pdi1p), die auch die Voraussetzung für den Export von Proteinen ohne Disulfidbrücke darstellt. Die Faltung zu einer korrekten Konformation ist ein energieabhängiger Prozess, der durch oxidierende Bedingungen die Bildung intra- und intermolekularer Disulfidbrücken ermöglicht (ZHANG UND KAUFMAN, 2008). Der Elektronentransfer während dieses Prozesses beinhaltet einen Kreislauf, in den neben der Pdi1p das ER-Oxidoreduktin (Ero1p) involviert ist. Nimmt Pdi1p Elektronen auf (Reduktion), führt dies zur Oxidation von Cysteinresten im „target“ und somit zur Ausbildung einer Disulfidbrücke. In einer Flavin-abhängigen Reaktion, kann Ero1p wiederum Elektronen von Pdi1p auf molekularen Sauerstoff übertragen, wodurch die Protein-Disulfidisomerase oxidiert wird. Durch die Wahl des terminalen Elektronen-Akzeptors kommt es jedoch zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die zur Initiation einer Stress-Antwort führen können. Zur Umlagerung fehlerhaft gebildeter Disulfide besitzt Pdi1p eine Isomeraseaktivität, die es ihr nach Formierung einer gemischten Disulfidbrücke mit dem Substrat erlaubt, eine Verknüpfung alternativer Cysteinreste auszubilden. Glutathion (GSH) kann die Reduktion von Zielproteinen unterstützen, wobei es selbst oxidiert und von seiner monomeren Form (GSH) in einen dimeren Zustand (GSSG) übergeht (ABBILDUNG 3).

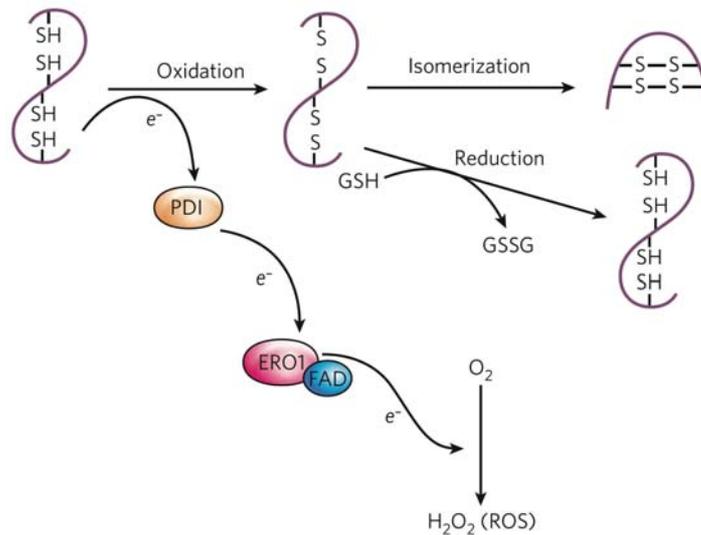


Abbildung 3: Neben der Neuordnung fehlgebildeter Disulfidbrücken (Isomerisierung) wird im ER die Bildung von Disulfid-Brücken mit Hilfe von Pdi1p und Ero1p vermittelt. Nimmt Pdi1p Elektronen eines Faltungs-Intermediats auf, werden dessen Cysteinreste oxidiert und ein Disulfid gebildet. Ero1p überträgt die Elektronen weiter auf molekularen Sauerstoff (O₂), was zur Bildung von ROS in Form von H₂O₂ führt. Glutathion (GSH) unterstützt die Reduktion von Zielproteinen, was durch Oxidation in der Bildung der dimeren Form GSSG resultiert (ZHANG UND KAUFMAN, 2008).

Die eigentliche Dislokation sowie Degradation vermitteln zwei Ubiquitin-Ligase-Komplexe der ER-Membran, die zwischen verschiedenen Substrat-Formen unterscheiden. Der ERAD-C-Weg wird durch den Doa10-Komplex definiert, der neben der Ubiquitinligase Doa10p das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc7p enthält, das durch Cue1p in der ER-Membran verankert ist. Des Weiteren umfasst dieser Pathway den Cdc48-Komplex mit den Co-Faktoren Ufd1p und Npl4p, deren Interaktion mit dem „target“ durch Assoziation mit Ubx2p stabilisiert wird (SCHUBERTH UND BUCHBERGER, 2005). Die Ligase selektiert ihre Substrate vermutlich selbst, da bisher keine rekrutierenden Faktoren identifiziert werden konnten (ABBILDUNG 4, RECHTS). ERAD-L ist im Vergleich dazu komplexer strukturiert. Die Substraterkennung erfolgt über Yos9p, das sowohl glykosylierte als auch nicht-glykosylierte Substrate erkennen kann und Hrd3p, das einen Komplex mit der Ubiquitinligase Hrd1p bildet. Der1p erweitert den Hrd1-Komplex, indem es ebenfalls mit dem ERAD-Substrat interagiert, vermutlich dessen Insertion in die Translokationspore unterstützt oder möglicherweise ebenfalls eine Untereinheit dieses Kanals bildet. Die Konjugation mit Ubiquitin erfolgt auch hier über Ubc7p bzw. Ubc1p (ABBILDUNG 4, LINKS). Proteine mit fehlgefalteter Transmembrandomäne werden über ERAD-M degradiert, wozu lediglich die Komponenten Hrd1p und Hrd3p benötigt werden. Untereinheiten, die der Substrat-Erkennung dienen, wurden bisher nicht identifiziert.

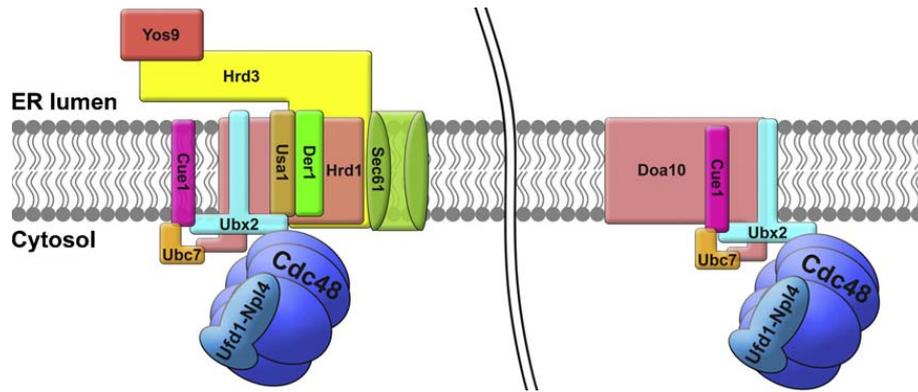


Abbildung 4: Schematische Darstellung des ERAD-L-Weges (links) sowie des ERAD-C-Pathways (rechts). **Links:** Die ER-luminalen Komponenten Yos9p sowie Hrd3p tragen zur Erkennung eines fehlgefalteten löslichen Proteins sowie eines entsprechenden Membransubstrates mit Defekten in der luminalen Domäne bei. Die Rekrutierung sowie Insertion in die bisher unbekannte Dislokationspore wird vermutlich durch Der1p vermittelt, dem sich nach Erreichen des Zytosols die Ubiquitinierung mit Hilfe von Ubc7p und Hrd1p anschließt. Der Cdc48-Komplex vermittelt den Transport zum Proteasom, das die terminale Proteolyse katalysiert. **Rechts:** Die Erkennung fehlgefalteter zytosolischer Proteine sowie von Membransubstraten mit fehlgefalteter zytosolischer Domäne wurde bisher nicht charakterisiert. Nach Retrotranslokation ins Zytosol sind Ubc7p und Doa10p verantwortlich für den Ubiquitinierungsprozess, dem sich äquivalent zu ERAD-L der Transport zum Proteasom anschließt (XIE UND NG, 2010).

Verläuft der Export analog zum ER-Import, wäre eine vollständige Entfaltung des Substrats unumgänglich, was durch eine unveränderte Exportkinetik eines Modell-Proteins nach Verknüpfung mit DHFR (Dihydrofolatreduktase) widerlegt werden konnte; die Applikation des Substrathomologs Trimetaxat induzierte die Faltung des Fusionsproteins, verzögerte jedoch nicht dessen Dislokation (TIROSH *ET AL.*, 2003). Die Identität des Exportkanals ist ebenfalls nicht zweifelsfrei bewiesen. WIERTZ *ET AL.* publizierten 1996 die Interaktion zweier ERAD-Substrate mit Sec61p, was durch die Beobachtung einer Wechselwirkung mit dem Proteasom sowie den Komponenten der ER-assoziierten Degradation ergänzt wurde (NG *ET AL.*, 2007; SCHAFFER UND WOLF, 2009; WIERTZ *ET AL.*, 1996B). Darüber hinaus führten Mutationen im Translokons zu Degradationsdefekten zahlreicher ERAD-Substrate sowie einer verlängerten Assoziation mit diesem Komplex. Auch fehlerhafte Membranproteine zeigten nach Mutation des Sec61-Komplexes eine veränderte Degradationskinetik, wodurch postuliert wurde, dass der potentielle Export-Kanal sowohl an der Retrotranslokation löslicher Substrate als auch an Veränderungen der Substratorientierung integraler Membranproteine beteiligt sein kann (RUBENSTEIN *ET AL.*, 2012; SCOTT UND SCHEKMAN, 2008). Zahlreiche Untersuchungen unterstützten diese Hypothese (PLEMPER *ET AL.*, 1997; WILLER *ET AL.*, 2008), während in anderen Assays die Funktion des Translokons in diesem Prozess nicht verifiziert werden konnte (GARZA *ET AL.*, 2009; WAHLMAN *ET AL.*, 2007). Somit besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass der Export verschiedener Substratklassen unterschiedlich abläuft. Da es durch Mutation des Translokons zu pleiotropen Effekten der ER-Funktion sowie der Zusammensetzung des luminalen Proteingehalts kommen kann, ist die Auswertung eines ausschließlichen Export-Defekts fehlerhafter Proteine weiterhin kritisch.

Alternativ wurde die Rolle der ERAD-L-Komponente Der1p im zentralen Dislokationsschritt diskutiert, die eventuell durch Interaktion mit weiteren ERAD-Komponenten eine entsprechende Funktion erfüllt (HAMPTON UND SOMMER, 2012). Die starke Hydrophobizität der Ubiquitinligase Hrd1p erweitert darüber hinaus ihr Potential zur Bildung einer Pore, weshalb sie ebenfalls als Kandidat des ER-Export-Kanals bzw. als assoziierte Untereinheit benannt wurde (SATO *ET AL.*, 2009). Da bisher keine ERAD-Komponente identifiziert wurde, die einen Defekt in der Retrotranslokation verschiedenartiger Substrate ausbildet, kann nicht ausgeschlossen werden, dass prinzipiell redundante Dislokationswege existieren.

Nach dem ER-Export werden die meisten Substrate mit Hilfe des Hrd1p- bzw. Doa10-Komplexes ubiquitiniert, woraufhin Cdc48p mit Hilfe seiner Co-Faktoren die treibende Kraft für die Extraktion des Substrats aus der ER-Membran bereitstellen kann. Die Ubiquitinrezeptoren Rad23p und Dsk2p binden das Substrat und transportieren es zum Proteasom, wo sie mit den proteasomalen Untereinheiten Rpn1p und Rpn10p des 19S regulatorischen Partikels (19S RP) interagieren. Bei nicht-ubiquitinierten Substraten wird häufig bereits der Translokationsschritt ausschließlich von 19S RP vermittelt, da das Proteasom ebenfalls mit Sec61p interagieren kann. Eine Wechselwirkung mit Rpt5p führt zur Deubiquitinierung sowie dem Transport zum proteolytischen „core“ (CP) des Proteasoms (VERMA *ET AL.*, 2004).

PROTEASOMALER ABBAU

Das Proteasom ist eine etwa 2,5 MDa große zytosolische sowie nukleäre Protease aus zahlreichen Untereinheiten, die sich aus einem 20S proteolytischen „core“-Partikel (CP) und zwei 19S regulatorischen Partikeln (RP) zusammensetzt. CP besitzt eine Faß-ähnliche Form, die von vier Ring-Strukturen gebildet wird (GROLL *ET AL.*, 1997). Die beiden äußeren α -Ringe umgeben die inneren β -Ringe, die eine Trypsin-, Caspase- oder Chymotrypsin-ähnliche proteolytische Aktivität beinhalten und entweder basische, saure oder hydrophobe Aminosäurereste bevorzugen (GROLL *ET AL.*, 2005).

Die 19S regulatorischen Partikel kontrollieren das Öffnen des Kanals, fungieren als erste Substrat-Erkennungsstelle und unterstützen die De-Ubiquitinierung, Entfaltung sowie Translokation der Substrate. Das 19S RP kann weiter in „lid“ und „base“ unterteilt werden. Der „lid“ setzt sich dabei aus den nicht-katalytischen Untereinheiten Rpn3p, Rpn5-9p und Rpn12p sowie der Metalloprotease Rpn11p zusammen, die das Recycling der Ubiquitinmoleküle katalysiert (LANDER *ET AL.*, 2012). Die „base“ enthält neben dem Ubiquitinrezeptor Rpn13p die Untereinheiten Rpn1p und Rpn2p (CHEN *ET AL.*, 2010; HE *ET AL.*, 2012) und besteht aus einem heterohexameren Ring aus sechs verschiedenen AAA-ATPase-Untereinheiten (Rpt1p-Rpt6p).

Sie katalysieren die Entfaltung der Substrate sowie die Translokation in das proteolytische „core“-Partikel. Nur in ihrer ATP-gebundenen Form können Rpt2p, Rpt3p und Rpt5p den 20S α -Ring binden und somit den Kanal öffnen (SMITH *ET AL.*, 2007), wohingegen Rpt5p vermutlich auch ATP-abhängig Polyubiquitinketten erkennt (LAM *ET AL.*, 2002).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die ER-Zytosol Retrotranslokation des Killertoxins K28 in Hefe und Säugerzellen aufzuklären, wobei sowohl der Export-Mechanismus des reifen Toxins sowie die plasmidgetriebene intrazelluläre Expression der α -Untereinheit untersucht werden sollten. Neben dem klassischen und alternativen ERAD-Pathway galt es, beschriebene Degradationswege wie Autophagozytose und die Bildung von „lipid droplets“ zu analysieren, die bisher im Zusammenhang mit der Dislokation fehlgefalteter Proteine charakterisiert wurden. Zur Reduktion der Toxin-Konzentration in der Zelle, sollte ein alternativer Promotor verwendet werden, um den Effekt von K28 α auf das Wachstum zahlreicher Deletions- und „knock-down“-Stämme im optimierten System darzustellen. Darüber hinaus bestand der Anspruch, den terminalen Phänotyp des artifiziellen Systems zu definieren und der Wirkung des Heterodimers gegenüberzustellen. Mittelpunkt der Analyse zur Retrotranslokation bildete die Identifizierung des Kanals, der zur Überwindung der ER-Membran genutzt wird. Daher stellten ein Interaktionsnachweis des Killertoxins mit Sec61p sowie die Auswirkungen verschiedener Mutationen dieses Transmembranproteins auf den toxischen Effekt einen Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Ein besonderes Interesse galt des Weiteren der Proteindisulfid-Isomerase, deren Unterstützung im Dislokationsprozess bereits konstatiert wurde, jedoch nicht auf eine spezifische Aktivität zurückzuführen war. Da Abbauprozesse der ER-Qualitätskontrolle meist eng mit der „unfolded protein response“ verknüpft sind, beinhaltete eine weitere Studie die Intension, den Einfluss dieser Stress-Antwort auf den Export beider Toxine nachzuvollziehen.

K28 ähnelt in Struktur und Transport medizinisch relevanten bakteriellen und pflanzlichen Toxinen, weshalb die Behandlung von Säugerzellen einen weiteren Fokus der angestellten Untersuchungen bildete. Dabei sollte aufbauend auf vorherigen Arbeiten der Effekt nach intrazellulärer Expression von K28 nachgewiesen und der terminale Phänotyp bestimmt werden. Voraussetzung war die Etablierung sowie der Vergleich unterschiedlicher Expressionsformen, die sich im Mechanismus des ER-Imports unterschieden und die die Rolle der proteasomalen Degradation bezüglich Wirkung und Dislokation charakterisieren sollten. Dieser Ansatz wurde um die Zielsetzung ergänzt, den Nachweis einer toxinvermittelten Wirkung nach Applikation des reifen Toxins zu erbringen, der in vorherigen Arbeiten, aufgrund inkompartibler Parameter, nur unzureichend darzustellen war.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

2.1.1 Bakterien-Stämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme (TABELLE 1) wurden der Stammsammlung des Lehrstuhls für Molekular- und Zellbiologie der Universität des Saarlandes entnommen.

Tabelle 1: Verwendete *E. coli* Stämme mit Genotyp und Herkunft

Stamm	Genotyp	Herkunft
TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 nupG</i> <i>recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1</i> λ ⁻	Invitrogen
TOP10F'	F'[<i>lacI^q Tn10(tet^R)</i>] <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-</i> <i>hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR nupG recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK rpsL(Str^R) endA1</i> λ ⁻	Invitrogen
NovaBlue Singles	<i>endA1 hsdR17</i> (rK12 ⁻ mK12 ⁺) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1</i> <i>lac F'[proA⁺B⁺ lacI^qZΔM15::Tn10]</i> (Tet ^R)	Novagen
DH5α	F- <i>recA1 endA3 gyrA96 thi1,</i> <i>hsdR17 supE44 relA1 deoR</i> Δ(<i>argF lacZYA</i>) U196 ϕ80/ <i>lacZ</i> ΔM15	HANAHAN, 1983

2.1.2 Hefe-Stämme

In dieser Arbeit verwendete Hefestämme (TABELLE 2) wurden der Stammsammlung des Lehrstuhls für Molekular- und Zellbiologie der Universität des Saarlandes entnommen.

Tabelle 2: Verwendete Stämme der Hefe *S. cerevisiae* mit Genotyp und Herkunft

Stamm	Genotyp	Herkunft
BY4742	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0</i>	Open Biosystems
BY4741	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0</i>	Open Biosystems
S86c	<i>MATa ura3-2 leu2 his3 pra1 prb2 prc1 cps1</i>	SCHMITT UND TIPPER, 1990
192.2d	<i>MATa ura3Δ0 leu2Δ0</i>	SCHMITT ET AL., 1996
yPC2329	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 HIS-Galp-6His-Hrd1p</i>	CARVALHO ET AL., 2010
yPC2339	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 HIS-Galp-6His-Hrd1p hrd3::KANR</i>	CARVALHO ET AL., 2010
yPC2382	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 HIS-Galp-6His-Hrd1p usa1::HYGB</i>	CARVALHO ET AL., 2010
yPC2383	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 HIS-Galp-6His-Hrd1p der1::HYGB</i>	CARVALHO ET AL., 2010
yPC2476	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 HIS-Galp-6His-Hrd1p ubc7::KANR</i>	CARVALHO ET AL., 2010
yPC2438	<i>MATa ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 HIS-Galp-6His-Hrd1p hrd3::KANR usa1::NAT der1::HYGB</i>	CARVALHO ET AL., 2010

Stamm	Genotyp	Herkunft
yPC2412	<i>Mata HIS-Galp-Der1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 his3Δ1</i>	CARVALHO ET AL., 2010
yPC2416	<i>Mata HIS-Galp-Der1 Hrd1p::HYGB leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 his3Δ1</i>	CARVALHO ET AL., 2010
yPC2417	<i>Mata HIS-Galp-Der1 hrd3::HYGB leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 his3Δ1</i>	CARVALHO ET AL., 2010
yPC2418	<i>Mata HIS-Galp-Der1 usa1::HYGB leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 his3Δ1</i>	CARVALHO ET AL., 2010
MS10	<i>Mata, ura3-52, leu2-3, 112, ade2-101</i>	KABANI ET AL., 2003
MS1111	<i>Mata, ura3-52, leu2-3, 112, ade2-101 kar2-1</i>	KABANI ET AL., 2003
MS193	<i>Mata, ura3-52, leu2-3, 112, ade2-101 kar2-133</i>	KABANI ET AL., 2003
M4130	<i>W303-1Ba; Δpdi1::HIS3/pCT37; ade2-1; can1-100; ura3-1; trp1-1; his3-11; his3-15 [pBH1800] pCT37: pRS316-PDI</i>	HOLST ET AL., 1997
M4492	<i>W303-1Ba; Δpdi1::HIS3/pCT37; Δprc1; Δeng1; Δmpd1; Δmpd2::G418; ade2-1; can1-100; ura3-1; trp1-1; his3-11; his3-15 [pBH1800]</i>	GILLECE ET AL., 1999; NORGAARD ET AL., 2001
RSY3281	<i>MATα can1-100 leu2-3, 112 his3-11, 15 trp1-1 ade2-1 sec61::HIS pRS315[sec61-his3]</i>	SCOTT UND SCHEKMAN, 2008
RSY3284	<i>MATα can1-100 leu2-3, 112 his3-11, 15 trp1-1 ade2-1 sec61::HIS pRS315[sec61-C373]</i>	SCOTT UND SCHEKMAN, 2008
RSY3282	<i>MATα can1-100 leu2-3, 112 his3-11, 15 trp1-1 ade2-1 sec61::HIS pRS315[sec61-C121G]</i>	SCOTT UND SCHEKMAN, 2008

Stamm	Genotyp	Herkunft
RSY3283	<i>MATα can1-100 leu2-3, 112 his3-11, 15 trp1-1 ade2-1 sec61::HIS pRS315[sec61-C150V]</i>	SCOTT UND SCHEKMAN, 2008
RSY2022	<i>Mata SEC61::HIS ade2-1 Can100 his3-11, 15 leu2-3 trp1-Δ1 ura3-3 [pSEC61(CEN/LEU)] pMZ11 (UPRE-lacZ CEN/TRP)</i>	ZHOU UND SCHEKMAN, 1999
RSY2024	<i>Mata SEC61::HIS ade2-1 Can100 his3-11, 15 leu2-3 trp1-Δ1 ura3-3 [psec61-R1(CEN/LEU)] pMZ11(UPRE-lacZ CEN/TRP)</i>	ZHOU UND SCHEKMAN, 1999
RSY2025	<i>Mata SEC61::HIS ade2-1 Can100 his3-11, 15 leu2-3 trp1-Δ1 ura3-3 [psec61-R2(CEN/LEU)] pMZ11(UPRE-lacZ CEN/TRP)</i>	ZHOU UND SCHEKMAN, 1999
RSY2026	<i>Mata SEC61::HIS ade2-1 Can100 his3-11, 15 leu2-3 trp1-Δ1 ura3-3 [psec61-R3(CEN/LEU)] pMZ11(UPRE-lacZ CEN/TRP)</i>	ZHOU UND SCHEKMAN, 1999
RSY2027	<i>Mata SEC61::HIS ade2-1 Can100 his3-11, 15 leu2-3 trp1-Δ1 ura3-3 [psec61-R4(CEN/LEU)] pMZ11(UPRE-lacZ CEN/TRP)</i>	ZHOU UND SCHEKMAN, 1999
FY251	<i>MATα ura3-52 leu2Δ1 trpΔ63 his3Δ200</i>	CARVALHO ET AL., 2010
yPC3098	<i>MATα ura3-52 leu2Δ1 trpΔ63 his3Δ200 Hrd1p-13myc-KANR</i>	CARVALHO ET AL., 2010
KRY511	<i>trp1 leu2 his3 LYS2::lexA-HIS3 URA3::lexA-lacZ</i>	HARTY UND ROMISCH, 2013
KRY518	<i>trp1 leu2 his3 LYS2::lexA-HIS3 URA3::lexA-lacZ LEU2::SEC61-CPLV</i>	HARTY UND ROMISCH, 2013
LGY273	<i>MATα ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 Iro1Δ::HIS3 dga1Δ::kanMX</i>	GASPAR ET AL., 2008
LGY296	<i>MATα ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 Iro1Δ::HIS3 dga1Δ::kanMX are2Δ::LEU2</i>	GASPAR ET AL., 2008

Tabelle 3 gibt einen Überblick über verwendete Deletionsmutanten.

Tabelle 3: Verwendete Deletionsmutanten der Hefe *S. cerevisiae* BY4742 (Open Biosystems)

ORF	Deletiertes Gen	ORF	Deletiertes Gen
ERAD			
YHR204W	<i>HTM1</i>	YAR002C-A	<i>ERP1</i>
YDR057W	<i>YOS9</i>	YHR181W	<i>ERV26</i>
YLR207W	<i>HRD3</i>	YGL054C	<i>ERV14</i>
YBR201W	<i>DER1</i>	YDR517W	<i>GRH1</i>
YMR022W	<i>UBC7</i>	YKL179C	<i>COY1</i>
YDR177W	<i>UBC1</i>	YLR268W	<i>SEC22</i>
YMR022W	<i>UBC7</i>	Glykosylierung	
YOL013C	<i>HRD1</i>	YDL095W	<i>PMT1</i>
YML029W	<i>USA1</i>	YOR321W	<i>PMT3</i>
YIL030C	<i>DOA10</i>	YDL093W	<i>PMT5</i>
YDL190C	<i>UFD2</i>	YGR199W	<i>PMT6</i>
YML013W	<i>UBX2</i>	COPI	
YGR184C	<i>UBR1</i>	YIL076W	<i>SEC28</i>
YBR170C	<i>NPL4</i>	YDL137W	<i>ARF2</i>
YEL037C	<i>RAD23</i>	YJR031C	<i>GEA1</i>
YMR276W	<i>DSK2</i>	YDL226C	<i>GCS1</i>
YFR010W	<i>UBP6</i>	YER122C	<i>GLO3</i>
YFL007W	<i>BLM10</i>	Wege zur Vakuole	
Chaperone		YBL017C	<i>VPS10</i>
YKL073W	<i>LHS1</i>	YKR001C	<i>VPS1</i>
YOL031C	<i>SIL1</i>	YLR240W	<i>VPS34</i>
YMR214W	<i>SCJ1</i>	YBR097W	<i>VPS15</i>
YJL073W	<i>JEM1</i>	YOR036W	<i>VPS6</i>
YGL167C	<i>PMR1</i>	YOR089C	<i>VPS21</i>
HiP		YGL095C	<i>VPS45</i>
YGR284C	<i>ERV29</i>	YDR323C	<i>VPS19</i>
YFL025C	<i>BST1</i>	YJL154C	<i>VPS35</i>
YDR059C	<i>UBC5</i>	YDR080W	<i>VPS41</i>
COPII		YPL195W	<i>APL5</i>
YDL204W	<i>RTN2</i>	YGR261C	<i>APL6</i>
YPR028W	<i>YOP1</i>	YOR106W	<i>VAM3</i>
YGL200C	<i>EMP24</i>	YPL045W	<i>VPS16</i>
		YLR396C	<i>VPS33</i>

ORF	Deletiertes Gen
Autophagie	
YGL180W	<i>ATG1</i>
YBL078C	<i>ATG8</i>
YPR049C	<i>ATG11</i>
YOL082W	<i>ATG19</i>
YDL185W	<i>VMA1</i>
YBR127C	<i>VMA2</i>
YKL080W	<i>VMA5</i>
YLR447C	<i>VMA8</i>
YOR332W	<i>VMA4</i>
YGR020C	<i>VMA7</i>

ORF	Deletiertes Gen
YHR039C-A	<i>VMA10</i>
YPR036W	<i>VMA13</i>
YOR270C	<i>VPH1</i>
YLR447C	<i>VMA6</i>
YEL027W	<i>VMA3</i>
YPL234C	<i>VMA11</i>
YHR026W	<i>VMA16</i>
„lipid droplets“	
YKR089C	<i>TGL4</i>

2.1.2.1 „knock-down“-Stämme der „Yeast-DAmP-Collection“

Bisher war es nur möglich, die Bedeutung nicht-essentieller Gene bezüglich der Wirkung von K28 durch induzierbare Inaktivierung oder Proteinstabilisierung unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden Stämme der „Open Biosystems Yeast DamP Collection“ (Thermo Scientific) getestet, in denen die mRNA-Menge essentieller Gene des Wildtyp-Stammes BY4741 durch Zerstörung der 3'UTR (untranslated region) mittels Integration einer Kanamycin-Resistenzkassette reduziert werden konnte (DamP: Decreased Abundance by mRNA Perturbation). Die Destabilisierung des entsprechenden Transkripts führt somit zu einer Reduktion des mRNA-Levels um das 4-10 fache. Offen bleibt die Auswirkung auf den endgültigen Proteingehalt.

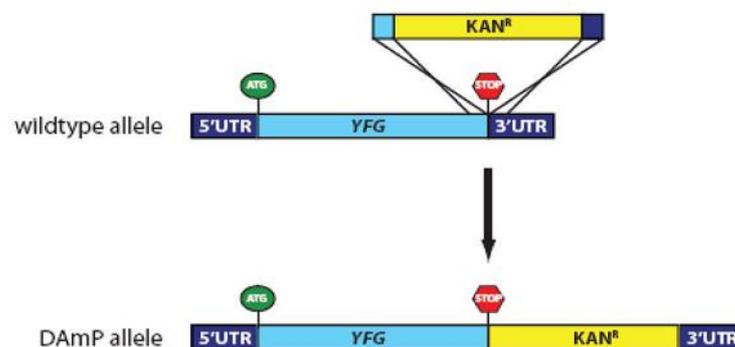


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Strategie zur Erstellung der Damp-Allele. Die Kanamycin-Resistenz-Kassette (KAN^R) wurde in die jeweilige 3'UTR-Region des betreffenden Gens kloniert (Thermo Scientific).

Tabelle 4 gibt einen Überblick über die verwendeten „knock-down“-Stämme.

Tabelle 4: Verwendete „knock-down“ Stämme (DAmP-Mutanten) der Hefe *S. cerevisiae* BY4741 (Open Biosystems)

ORF	Reguliertes Gen
ERAD	
YDL126C	<i>CDC48</i>
YLR378C	<i>SEC61</i>
YKL145W	<i>RPT1</i>
YDL007W	<i>RPT2</i>
YDR394W	<i>RPT3</i>
YOR117W	<i>RPT5</i>
Chaperone	
YJL034W	<i>KAR2</i>
YCL043C	<i>PDI</i>
HiP	
YER125W	<i>RSP5</i>
COPII	
YPL218W	<i>SAR1</i>
YDL195W	<i>SEC31</i>
YPL085W	<i>SEC16</i>
YFL038C	<i>YPT1</i>
YDL058W	<i>USO1</i>
YKR068C	<i>BET3</i>
YML077W	<i>BET5</i>
YBR254C	<i>TRS20</i>
YDR472W	<i>TRS31</i>
YOR115C	<i>TRS33</i>
YLR026C	<i>SED5</i>
YLR078C	<i>BOS1</i>
YDR189W	<i>SLY1</i>
YBL050W	<i>SEC17</i>
YBR080C	<i>SEC18</i>

ORF	Reguliertes Gen
COPI	
YDL145C	<i>COPI</i>
YDR238C	<i>SEC26</i>
YGL137W	<i>SEC27</i>
YNL287W	<i>SEC21</i>
YFR051C	<i>RET2</i>
YNL258C	<i>DSL1</i>
YLR440C	<i>DSL3</i>
YGL145W	<i>TIP20</i>
YGL098W	<i>USE1</i>
YGL145W	<i>TIP20</i>

2.2 Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide zur Zwischenklonierung und Expression sind in Tabelle 5 dargestellt. Sie wurden entweder im Rahmen der Arbeit erstellt oder der Stammsammlung des Lehrstuhls für Molekular- und Zellbiologie der Universität des Saarlandes entnommen.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten sowie erstellten Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
Allgemein		
pSTBlue-1	Multiple cloning region, <i>lacZ</i> α -Gen zur Blau-weiß-Selektion, pUC origin, Kan ^R -Gen, Ampicillin-Resistenz-Gen	Novagen
pYES2.1/V5-His-TOPO	TOPO-Cloning-site, P _{GAL1} , pUC origin, 2 μ origin, f1 origin, Amp ^R -Gen, URA3-Marker	Invitrogen
pYES-ppa Δ lys	pYES2.1/V5-His-TOPO mit präproK28 α , die drei Lysinreste der α -Untereinheit wurden durch Alanin ersetzt	SENDZIK, 2006
pPGK-M28I	pDT-PGK mit K28-ORF über <i>XhoI</i> und <i>BglII</i>	SCHMITT UND TIPPER, 1995
pRS316.PT	<i>CEN6</i> , <i>ARSH4</i> , URA3-Marker, ori, f1 origin, <i>lacZ</i> , Amp ^R -Gen mit Promotor P _{GAL1} und <i>CYC1</i> -Terminator	GIEßELMANN, 2007
pRS315.PT	<i>CEN6</i> , <i>ARSH4</i> , LEU2-Marker, ori, f1 origin, <i>lacZ</i> , Amp ^R -Gen mit Promotor P _{GAL1} und <i>CYC1</i> -Terminator	SEVRIEVA, 2009
p413-GALS	<i>CEN</i> -Vektor mit <i>HIS3</i> -Marker, f1-origin, P _{GALS} -Promoter, T7 und T3-Promoter	Addgene
pGEM-JC	„Cloning“-Vektor; Amp ^R -Gen; T7- und SP6-Promotor	J.C. Cook, University of Warwick, UK
pRS305	Integrativer Hefevektor, Amp ^R , LEU2-Marker	SIKORSKI & HIETER 1989
YEp352	P _{Lac} , pUC origin, 2 μ origin, Amp ^R -Gen, URA3-Marker	ATCC
K28α		
pRS316.PT-ppa	pRS316 mit P _{GAL1} , <i>CYC1</i> -Terminator und präproK28 α über <i>EcoRI</i> und <i>SalI</i>	KELKEL 2009

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pRS316.PT-pα	pRS316 mit P _{GAL1} , CYC1-Terminator und proK28α über <i>EcoRI</i> und <i>Sall</i>	Diese Arbeit
p413-ppα	p413 mit P _{GALS} , CYC1-Terminator und präproK28α über <i>EcoRI</i> und <i>Sall</i>	Diese Arbeit
pRS316-GALS-ppα	pRS316-ppα mit P _{GALS} über <i>NotI</i> und <i>XhoI</i>	Diese Arbeit
pRS316-GALS-ppαCys/Ser	pRS316-GALS-ppα, der Cystein-Rest der α-Untereinheit wurde durch Serin ersetzt	Diese Arbeit
pRS315.PT-ppα	pRS315 mit P _{GAL1} , CYC1-Terminator und präproK28α über <i>EcoRI</i> und <i>Sall</i>	Diese Arbeit
<i>In vitro</i> Translation		
pGEM-pα	pGEM-JC mit proK28α über <i>EcoRI</i> und <i>BglII</i>	Diese Arbeit
pGEM-ppα	pGEM-JC mit präproK28α über <i>EcoRI</i> und <i>BglII</i>	KELKEL 2009
pGEM-α	pGEM-JC mit K28α über <i>EcoRI</i> und <i>BglII</i>	KELKEL 2009
pGEM-ssIpa	pGEM-α mit Lactin-Signalsequenz über <i>BglII</i> und <i>EcoRI</i>	Diese Arbeit
Split-Ubiquitin-System		
KRB242 pOST1-NubG	pAS P _{CUP1} TRP1 OST1 N-terminal vor NubG (AS 1-37 von Ubiquitin, Ile13Gly)	HARTY UND ROMISCH, 2013
KRB243 pWBP1-CPLV	pRS305 WBP1-CPLV (AS 35-76 von Ubiquitin, MHRSAACGRMAG linker, AS 151-275 von Protein A aus <i>S. aureus</i> , ASGR linker, AS1-202 von Lex A, EFGIWI linker, AS 402-479 von VP16) LEU	HARTY UND ROMISCH, 2013
pPGK-pptox-Nub	pDT-PGK mit K28-ORF-NubG über <i>XhoI</i> und <i>BglII</i>	Diese Arbeit
pYES-ppαR149ANub	pYES2.1/V5-His-TOPO mit präproK28α und NubG (AS 1-37 von Ubiquitin, Ile13Gly) über <i>EcoRI</i> und <i>BglII</i> , der Arginin-Rest der α-Untereinheit an Position 149 wurde durchh Alanin ersetzt	Diese Arbeit
pYES-ppNubGa	pYES2.1/V5-His-TOPO mit präproK28α und NubG (AS 1-37 von Ubiquitin, Ile13Gly) über <i>EcoRI</i> und <i>BglII</i>	Diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
UPR-Assay		
pPM47-UPRE-mCherry	<i>CEN</i> -Vektor <i>CEN/ARS URA3</i> -Marker mit Minimal <i>CYC1</i> -Promotor sowie 4 UPR-Elementen	LAJOIE <i>ET AL.</i> , 2012
pCJ-UPRE- <i>lacZ</i>	YEp352 mit <i>lacZ</i> sowie 4 UPR-Elementen	PARIKH <i>ET AL.</i> , 2008
Säugerspezifische Konstrukte		
pmCherry-N1	Expressionsvektor, Kan ^R , enthält mCherry-ORF, konstitutiver <i>CMV</i> -Promotor und <i>SV40</i> -Terminator	Clontech
pmCherry-ppa	pmCherry mit präproK28α über <i>EcoRI</i> und <i>BglII/BamHI</i>	Diese Arbeit
pmCherry-ssPIpα	pmCherry-ppα mit Lactin-Signalsequenz über <i>XhoI</i> und <i>EcoRI</i>	Diese Arbeit
pmCherry-pα	pmCherry mit proK28α über <i>EcoRI</i> und <i>BglII/BamHI</i>	Diese Arbeit
pmCherry-ppV5α	pmCherry mit präproK28α über <i>EcoRI</i> und <i>BglII/BamHI</i> und V5-“tag”	Diese Arbeit
pmCherry-ssPIpV5α	pmCherry-ppα mit Lactin-Signalsequenz über <i>XhoI</i> und <i>EcoRI</i> und V5-“tag”	Diese Arbeit
pmCherry-pV5α	pmCherry mit proK28α über <i>EcoRI</i> und <i>BglII/BamHI</i> und V5-“tag”	Diese Arbeit
pmCherry-ppαΔlys	pmCherry mit präproK28α über <i>EcoRI</i> und <i>BglII/BamHI</i> , die drei Lysinreste der α-Untereinheit wurden durch Alanin ersetzt	Diese Arbeit
pmCherry-ssPIpαΔlys	pmCherry-ppα mit Lactin-Signalsequenz über <i>XhoI</i> und <i>EcoRI</i> , die drei Lysinreste der α-Untereinheit wurden durch Alanin ersetzt	Diese Arbeit
pmCherry-pαΔlys	pmCherry mit proK28α über <i>EcoRI</i> und <i>BglII/BamHI</i> , die drei Lysinreste der α-Untereinheit wurden durch Alanin ersetzt	Diese Arbeit

ABBILDUNG 6, 7 UND 8 zeigen die Vektorkarten der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten bzw. erstellten Plasmide.

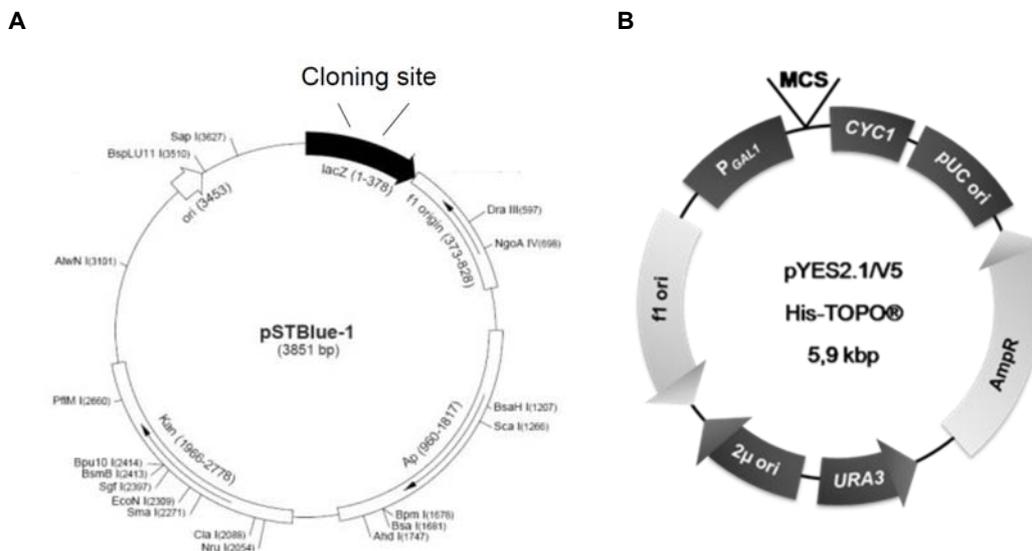


Abbildung 6: Die Plasmide pSTBlue1 (A) und pYES2.1 (B) liegen linearisiert vor und ermöglichen aufgrund ihrer 3' dU- bzw. dT-Überhänge die direkte Klonierung von PCR-Produkten mit 3' dA-Überhängen. Der multi-copy-Vektor pYES2.1 ermöglicht darüber hinaus die Genexpression in Hefe.

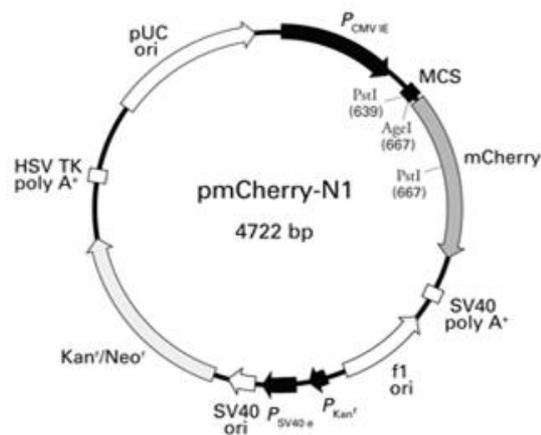


Abbildung 7: Der Expressionsvektor pmCherry wurde zur Toxin-Expression in höheren Eukaryonten eingesetzt. Die Synthese erfolgte dabei unter Kontrolle des CMV-Promotors.

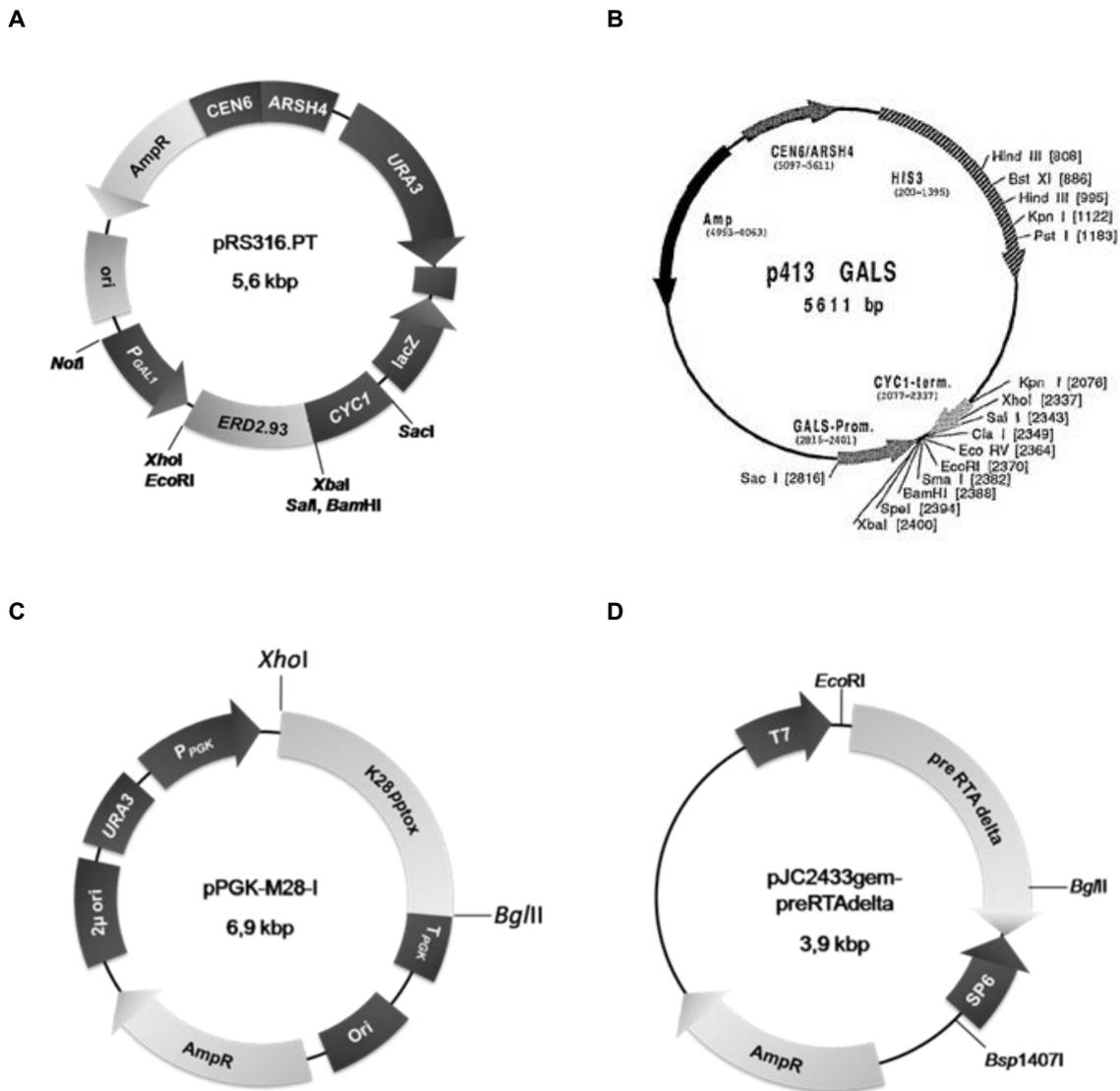


Abbildung 8: Die Zentromervektoren pRS316.PT (A) sowie p413GALS (B) wurden zur heterologen Genexpression in Hefe eingesetzt. Sie unterscheiden sich in der Expressionskontrolle durch die Promotoren *GAL1* (pRS316.PT) bzw. *GALS* (p413GALS). Der Vektor pPGK-M28-I (C) diente als Template zur Generierung der Toxin-Derivate und pJC2433 (D) mit T7- sowie SP6-Promotor der *in vitro* Transkription von K28 α .

2.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide dienten als Primer in der PCR und wurden von der Firma „Sigma-Aldrich“ bezogen.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide zur Verwendung in der PCR. Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen, Stopp- und Startcodons fettgedruckt. Die Sequenz ist in 5'-3'-Orientierung angegeben.

Name	Sequenz (5' → 3')	Amplifikat
5' ^P _{GALS} <i>KpnI/ApaI/NotI</i>	<u>GGTACC GGGCCC GCGGCCGC</u> TCCTC CGTGCGTCCTCGTCTTC	P _{GALS}
3' ^P _{GALS} <i>EcoRI/XhoI</i>	GAATTC <u>CTCGAG</u> GGTTTTTTCTCCTTG ACGTTAAAGTATAGAGGTATATTAACAAT	P _{GALS}
5'PräproLactin (ssPI) <i>NheI/BglII/XhoI/Kozak</i>	<u>GCTAGC AGATCT CTCGAG GCCACC</u> ATG GACAGCAAAGGTTTCGTCGCAG	ssPIp(V5)α(Δlys)
3'PräproLactin (ssPI) <i>EcoRI/HindIII</i>	<u>GAATTC AAGCTT</u> GGAGACCACACCCT GGCACAAGAG	ssPIp(V5)α(Δlys)
5' ^{pptox} <i>XhoI/EcoRI</i>	<u>CTCGAG GAATTC</u> ATG GAGAGCGTTTC CTCATTATTTAACATTTTT	K28, K28-NubG, ppαR149ANubG, ppNubGα ppαCys/Ser
3' ^{pptox} Stop <i>BglII/SalI/HindIII</i>	AGATCT GTCGAC AAGCTT TTA ACGCG ATTGTATATTCTCTGCGTTTTTCAGTC	K28, K28-NubG
5'SOE ^{pptox} -NubG	CAAGGTGCCACGATGAGCTACGCATGC AGATTTTCGTCAAGACTTTGACCG	K28-NubG
3'SOE ^{pptox} -NubG	CGGTCAAAGTCTTGACGAAAATCTGCAT GCGTAGCTCATCGTGGCACCTTG	K28-NubG
3'NubG Stop <i>HindIII/BglII</i>	<u>AGATCT AAGCTT</u> TTA AGGGATACCTTC CTTGTCTTGAATTT	K28-NubG
5'SOE K28αR149ANubG	GACTGAAAACGCAGAGAATATAACAATCG CGTATGCAGATTTTCGTCAAGACTTTGA CCGG	ppαR149ANubG
3'SOE K28αR149ANubG	CCGGTCAAAGTCTTGACGAAAATCTGCA TCGCCGATTGTATATTCTCTGCGTTTTTC AGTC	ppαR149ANubG
5'SOE Nubα	GTCGAAAATTCAAGACAAGGAAGGTATC CCTGACTTCAGTGCTGCTACTTGCG	ppNubGα
3'SOE Nubα	CGCAAGTAGCAGCACTGAAGTCAGGGA TACCTTCCTTGTCTTGAATTTTCGAC	ppNubGα

Name	Sequenz (5'→3')	Amplifikat
5'SOE K28αCys/Ser	AGTGCTGCTACTTCCGTACTGATGGGC	ppαCys/Ser
3'SOE K28αCys/Ser	GCCCATCAGTACGGAAGTAGCAGCACT	ppαCys/Ser

2.4 Kultivierungsbedingungen

Die beschriebenen Nährmedien wurden, soweit nicht anders beschrieben, in H₂O_{dest.} gelöst und bei RT gelagert.

2.4.1 Bakterien

Die Flüssig-Kulturen wurden in 5 ml LB-Medium bei 37°C und 220 rpm über Nacht inkubiert, die Kultivierung der LB-Agar-Platten erfolgte in einem Brutschrank ebenfalls bei 37°C über Nacht. Je nach Selektionsbedingungen wurden Ampicillin bzw. Kanamycin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml bzw. 25 µg/ml zugegeben. Das Blau-Weiß-Screening erfolgte durch Zugabe von 40 µl X-Gal-Stammlösung (40 mg/ml) und 40 µl IPTG-Stammlösung (100 mM).

LB-Medium (lysogeny broth medium)

Pepton	1,0 %
Hefeextrakt	0,5 %
Natriumchlorid	0,5 %
[Agar	1,5 %]

Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	50 mg/ml
------------	----------

Kanamycin-Stammlösung

Kanamycin	25 mg/ml
-----------	----------

IPTG-Stammlösung

IPTG	100 mM
------	--------

X-Gal-Stammlösung

X-Gal	20 mg/ml
-------	----------

2.4.2 Hefen

Die Kultivierung der Hefen erfolgte in 5 ml Medium bei 30°C und 220 rpm. Die Agar-Platten wurden bei gleicher Temperatur in einem Brutschrank inkubiert.

YPD-Medium

Glukose	2,0 %
Pepton	2,0 %
Hefeextrakt	1,0 %
[Agar	1,5 %]

Die Glukose wurde getrennt autoklaviert.

Synthetisches Medium

Lösung A

Ammoniumsulfat	5,0 g/l
Aminosäure-Mix	0,8 g/l

Lösung B

Glukose bzw. Raffinose	20 g/l
oder Galaktose	30 g/l
Agar	12 g/l

Lösung C

Yeast nitrogen base	1,7 g/l
---------------------	---------

Die Lösungen A und C wurden getrennt autoklaviert, Lösung B sterilfiltriert. Zur Herstellung von 5-FOA-Agar wurde das Medium in doppelter Konzentration hergestellt und mit sterilfiltrierter 0,2 %iger 5-Fluororotsäure-Stammlösung im Verhältnis 1:1 gemischt, so dass eine 5-FOA-Endkonzentration von 0,1 % erreicht wurde.

Aminosäure-Mix (10x)

Adenin	2,8 %	Phenylalanin	7,0 %
Arginin	2,8 %	Threonin	28,0 %
Histidin	2,8 %	Tryptophan	2,8 %
		Tyrosin	4,2 %
Isoleucin	4,2 %	Uracil	2,8 %
Leucin	14,0 %	Valin	21,0 %
Lysin	4,2 %		
Methionin	2,8 %		

2.4.3 Dauerkulturen

Um die hergestellten Konstrukte in ihren Wirtszellen über Jahre zu konservieren, wurde 1 ml der entsprechenden Übernacht-Kultur mit dem gleichen Volumen an 99 %igem Glycerin in einem Kryoröhrchen (Nalgene Cryoware) vermischt und bei -80°C aufbewahrt.

2.5 Zellzahlbestimmung

Um die optische Dichte (OD) der Kulturen zu bestimmen, wurde die Absorbtion der Suspension bei 600 nm gemessen (Ultrospec 2100 pro UV-visible Spectrophotometer; Pharmacia Biochrom). Als Referenz diente dabei 1 ml unbeimpftes Medium.

2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)**2.6.1 Standard-PCR**

Die Polymerase-Kettenreaktion („polymerase-chain-reaction“, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung geringer DNA-Mengen. Dabei wird die doppelsträngige Helix bei 95°C denaturiert, so dass die beiden DNA-Einzelstränge für die gegenläufigen Primer zugänglich werden. Diese Oligonukleotide dienen als Initiationssequenz für die Synthese eines neuen DNA-Stranges durch die Polymerase (SAIKI *ET AL.*, 1988) und werden bei einer Temperatur angelagert, die 3-4°C unter ihrer Schmelztemperatur liegt.

Die DNA-Polymerase des „FastStart High Fidelity PCR System“ (Roche) mit „Proof-Reading“-Funktion“ fügt komplementäre Desoxynukleotide (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) an das ssDNA-Template an. Eine weitere Eigenschaft dieses Enzyms ist das Anfügen eines freien dA-Restes an die abgelesene Sequenz, welche das Einklonieren in Vektoren mit einem dU-Überhang erleichtert. Durch die zyklische Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Elongation kommt es zu einer exponentiellen Verfielfältigung der DNA. Der PCR-Ansatz wurde nach folgendem Schema zusammengestellt:

10x <i>Taq</i> DNA-Polymerase-Puffer	2,0 µl
DNA	2,0 µl
dNTP's (25 mM)	0,2 µl
3' Primer (100 pmol/µl)	0,2 µl
5' Primer (100 pmol/µl)	0,2 µl
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,2 µl
H ₂ O	ad 20,0 µl

Die Amplifikation erfolgte nach dem aufgeführten Programm im Thermocycler „Mastercycler epgradients“ (Eppendorf).

Initiale Denaturierung	94°C, 10 min	} 26 Zyklen
Denaturierung	95°C, 30 s	
Annealing	60°C, 30 s	
Elongation	72°C, 30-60 s	
Terminale Elongation	72°C, 3 min	

2.6.2 SOE-PCR

Die SOE-PCR ist eine Methode zur Herstellung von Fusionsproteinen auf DNA-Ebene (HORTON *ET AL.*, 1989). Dabei werden Primer verwendet, die an ihrem 5'- bzw. 3' Ende überlappende Sequenzen des zu fusionierenden Gens tragen. Beide Allele werden in der ersten PCR getrennt amplifiziert und erhalten auf diese Weise einzelsträngige komplementäre Bereiche zu dem zu fusionierenden Gen.

Nach elektrophoretischer Trennung und Reisolation werden in einer zweiten PCR beide Templates eingesetzt. Die komplementären Bereiche lagern sich zusammen und werden mit Hilfe der beiden äußeren Primer zu einem Fusionsprodukt amplifiziert. Für diese modifizierte Form der PCR wurde das gleiche Programm wie für die Standard-PCR verwendet.

2.7 TA-Cloning

2.7.1 AccepTor-Cloning

Zur Sequenzierung wurden die amplifizierten DNA-Fragmente zunächst zwischenkloniert, wobei die an die neu synthetisierten DNA-Stränge angefügten dA-Überhänge genutzt werden konnten. Der zur „Acceptor-Klonierung“ verwendete lineare Vektor pSTBlue-1 des „AccepTor Vector Giga Kit“ (Novagen) besitzt komplementäre dU-Überhänge, wodurch die PCR-Produkte leicht in das Plasmid eingebracht werden können. Nach Transformation der „NovaBlue GigaSingles™ Competent Cells“ (Novagen) entstehen nach Replikation in der Wirtszelle aus den ursprünglichen dU-Überhängen dT-Bausteine. Die Selektion der erfolgreich transformierten Bakterienzellen ist neben der Ampicillin- und Kanamycinresistenz über eine Blau-Weiß-Selektion möglich. Der verwendete Vektor pSTBlue-1 trägt ein *lacZ*-Gen, das für die β -Galaktosidase codiert und dessen Promotor durch IPTG induziert wird. Die eigentliche Funktion dieses Enzyms ist die Umsetzung von Laktose zu Galaktose und Glukose. Im Zuge der „Acceptor-Klonierung“ wird statt des natürlichen Substrats ein Laktose-Analog (X-Gal) eingesetzt, das ebenfalls von der β -Galaktosidase umgesetzt werden kann. X-Gal wird dabei zu Galaktose und 5-Brom-4-Chlor-3-Hydroxyindol hydrolysiert. Letzteres oxidiert zu einem tiefblauen Farbstoff. Die MCS des Vektors befindet sich innerhalb des *lacZ*-Gens, welches durch Integration eines Fremdgens inaktiviert wird. Auf diese Weise können *E. coli* Zellen, die ein rekombinantes Plasmid aufgenommen haben und damit weiße Kolonien ausbilden, von den übrigen unterschieden werden, die blaue Klone hervorbringen.

Die DNA-Templates wurden wie in 2.6 beschrieben amplifiziert und nach der in 2.12 beschriebenen Methode aus dem Agarosegel zurückgewonnen. Dieses Reisolat konnte in folgendem Ansatz für die Ligation mit pSTBlue-1 eingesetzt werden:

pSTBlue-1	0,5 µl
Reisolat	2,0 µl
2x Ligations-Premix	2,5 µl

Nach einstündiger Inkubation bei 16°C wurde der Ligationsansatz mit chemisch kompetenten *E. coli* Zellen (Nova Blue Singles) vermischt, 5 min auf Eis belassen und anschließend 30 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Um die erfolgreich transformierten Zellen von den übrigen unterscheiden zu können, wurden sie nach 30 min im 37°C-Schüttler auf 20 µl IPTG, 20 µl Kanamycin, 40 µl X-Gal sowie 120 µl H₂O ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.7.2 pYES-Cloning

Die TA-Klonierung in pYES2.1/V5-His-TOPO Vektor (Invitrogen) beruht ebenfalls auf der unspezifischen Ligation des PCR-Produkts über 5'dT-Überhänge des Plasmids. Der Vektor ist an Topoisomerase I gebunden, die durch Integration des PCR-Produkts verloren geht. Nach Transformation von *E. coli* TOP10F' ist in diesem System keine Blau-Weiß-Selektion möglich. Eine Besonderheit ist die Eigenschaft eines multi-copy Shuttle-Vektors, der in *S. cerevisiae* die Expression durch den Galaktose-induzierbaren Promotor *GAL1* kontrolliert. Der Ligationsansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

pYES2.1/V5-His-TOPO	0,5 µl
Reisolat	2,0 µl
Salt-Solution	0,5 µl

Der Ansatz wurde 15 min bei RT inkubiert und anschließend wurden 2 µl zu chemisch kompetenten *E. coli* TOP10F' gegeben. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 40 s wurden die Zellen in 250 µl SOC-Medium aufgenommen, 1 h bei 37°C geschüttelt und schließlich auf LB_{Amp} selektiert.

2.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung der hergestellten Konstrukte des Acceptor- bzw. pYES-Clonings wurde kommerziell durch die Firma „GATC Biotech“ durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software „Lasergene SeqMan“ (DNASStar).

2.9 DNA-Isolierung aus Bakterien

2.9.1 Alkalische Lyse

GTE

Glukose	50 mM
Tris	25 mM
EDTA	10 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8 eingestellt.

NaOH/SDS

Natriumhydroxid	200 mM
SDS	1 % (w/v)

5M Kaliumacetat-Lösung

Essigsäure 99,5%	29,5 %
------------------	--------

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 4,8 eingestellt.

Die alkalische Lyse nach (BIRNBOIM, 1983) ist eine Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien, bei der die Trennung von genomischer DNA und Proteinen durch De- und Renaturierung aufgrund eines veränderten pH-Werts herbeigeführt wird.

In einem einminütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm wurden zunächst die Zellen aus jeweils 1,5 ml Bakterienkultur geerntet und zur Destabilisierung der Zellmembran in 100 µl GTE resuspendiert. Die Zugabe von 200 µl NaOH/SDS erhöhte den pH-Wert, so dass sowohl chromosomale als auch Plasmid-DNA und Proteine denaturieren. Die anschließende Applikation von 150 µl KAc erniedrigt den pH-Wert, was der Plasmid-DNA die Renaturierung ermöglicht. Die chromosomale DNA ist für diesen reversiblen Schritt jedoch zu groß und fällt daher gemeinsam mit den Proteinen aus. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Überstand in 800 µl Ethanol überführt, um die Nukleinsäuren bei RT über einen Zeitraum von 5 min zu fällen.

Das Ethanol wurde nach einer weiteren Minute bei 13.000 rpm abgenommen und das getrocknete Pellet in 20 µl Aqua dest. aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.9.2 Mini-Prep

Die Plasmid-Isolierung mittels „innuPREP Plasmid Mini Kit“ (Analytik Jena Bio Solutions) folgt dem gleichen Prinzip wie die Gewinnung der DNA mit Hilfe der alkalischen Lyse. Durch die Bindung der DNA an eine Silikamatrix liegen die Nukleinsäuren am Ende jedoch in einer reineren Form vor. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.9.3 Midi-Prep

Um DNA in größerem Maßstab aus einer 50 ml Kultur gewinnen zu können, wurde das „GenElute™ HP Plasmid Midiprep Kit“ (Sigma) verwendet. Auch hier erfolgte die Durchführung nach Angaben des Herstellers. Die DNA-Konzentration wurde im Anschluss mit dem „Nanodrop 2000c“ (Pheqlab) bestimmt.

2.10 Restriktionsanalyse

Restriktionsendonukleasen des Typs II sind Enzyme, die eine spezifische DNA-Sequenz, meist Palindrome, erkennen und durch Hydrolyse das Zucker-Phosphatrückgrad spalten. Dabei entstehen im DNA-Strang, je nach Enzym, glatte Enden („blunt-ends“) bzw. einzelsträngige Enden („sticky-ends“).

Zur Kontrolle der Acceptor-Klonierung und Herstellung der Vektor-Expressionssysteme wurde ein Reaktionsansatz nach Angaben des Herstellers (Fermentas) zusammengestellt und 2 h bei 37°C inkubiert. Im Folgenden ist die übliche Zusammensetzung eines Ansatzes aufgeführt, dessen Enzyme und Puffer von der Firma Fermentas bezogen wurden:

Puffer	2,0	µl
RNase A	0,5	µl
Restriktionsenzym I	0,4	µl
Restriktionsenzym II	0,4	µl
DNA	1,0	µl
H ₂ O	ad 20,0	µl

Die entstandenen Fragmente konnten anschließend gelelektrophoretisch getrennt und je nach Verwendung aus der Agarosematrix reisoliert werden.

2.11 Agarosegelelektrophorese

TBE (10x)

Tris	890	mM
Borsäure	890	mM
EDTA	20	mM

GLB

Glycerin	50,00	% (v/v)
EDTA	1,00	% (w/v)
SDS	125,00	mM
Bromphenolblau	0,05	% (w/v)
Xylencyanol	0,05	% (w/v)

Die Methode der Agarosegelelektrophorese (SAMBROOK, 1989) wird angewandt, um DNA-Fragmente ihrer Größe nach zu trennen. Das Wandern der Probe im Gel wird durch Anlegen eines elektrischen Feldes erreicht, da DNA im alkalischen pH-Bereich aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode wandert. Agarose ist ein Polysaccharid, das aus Algen gewonnen wird und während seiner Polymerisation Poren ausbildet, die kleinere DNA-Fragmente schneller überwinden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben mit 1/5 Volumen Gelladepuffer versetzt und anschließend auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 10 V/cm in 1x TBE-Puffer. Um die entstandenen Banden sichtbar zu machen, wurde das Polymer in einem Ethidiumbromid-Bad (0,0004 %) für 10 min angefärbt. Dabei interkaliert der Farbstoff in der kleinen Furche der Doppelhelix und macht diese nach Bestrahlung mit UV-Licht aufgrund seiner roten Fluoreszenz sichtbar. Diese Dokumentation erfolgte im „ChemiDoc XRS system“ [BioRad]. Um die Fragmente anhand ihrer Größe identifizieren zu können, musste bei jedem Versuch ein Längenstandard mitgeführt werden, der eine Aussage über die Anzahl der Basenpaare der Probe erlaubt. Der dafür eingesetzte DNA-Marker „Smart Ladder“ wurde von der Firma Eurogentec bezogen (ABBILDUNG 9).

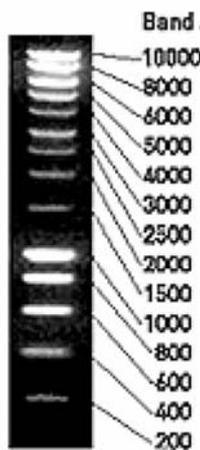


Abbildung 9: Eingesetzter DNA-Marker „Smart Ladder“ [Eurogentec] bei der Agarosegelelektrophorese. Die Bandenhöhe ist in Basenpaaren angegeben und dient dem Vergleich mit Fragmenten unbekannter Größe.

2.12 Reisolierung aus Agarosegelen

Damit die amplifizierten bzw. restringierten DNA-Fragmente zur Ligation eingesetzt werden konnten, mussten sie mit Hilfe des „innuPREP Gel Extraction Kit“ (Analytik Jena] aus dem Agarosegel isoliert werden. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.13 Ligation

Bei der Ligation werden zwei DNA-Fragmente nach vorheriger Behandlung mit identischen bzw. kompatiblen Restriktionsendonukleasen mithilfe einer Ligase kovalent verknüpft. Diese Methode bietet die Möglichkeit, Plasmide um zusätzliche Gene zu erweitern und auf diese Weise rekombinante Vektorsysteme zu konstruieren. Die in dieser Arbeit verwendete DNA-Ligase des T4-Phagen (Applichem) katalysiert nach vorübergehender Anlagerung der entsprechenden „sticky-ends“ oder „blunt-ends“ die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-OH-Ende eines Fragments mit dem 5'-Phosphatende des anderen. Für die Verknüpfung von Vektor und Insert wurde folgender Ansatz zusammengestellt und über Nacht bei 16°C inkubiert:

Vektor-DNA	5,0	µl
Insert-DNA	12,0	µl
10x Ligationspuffer	2,0	µl
T4-DNA-Ligase	1,0	µl

2.14 Transformationsmethoden

2.14.1 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

SOC-Medium

Hefeextrakt	0,5	%
Pepton	2,0	%
Natriumchlorid	10,0	mM
Glukose	20,0	mM
Kaliumchlorid	10,0	mM
Magnesiumchlorid	10,0	mM
Magnesiumsulfat	2,5	mM

Bevor die rekombinanten Konstrukte zur Vermehrung in *E. coli* transformiert werden konnten, mussten die Bakterien auf die Aufnahme der Fremd-DNA vorbereitet werden. Zur Herstellung der elektrokompenten Bakterien wurden 200 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur des Stammes TOP10 1 %ig beimpft und bei 37°C und 220 rpm kultiviert bis eine optische Dichte von 1,0-1,5 erreicht war. Nach einem Zentrifugationsschritt für 5 min bei 10.000 rpm und 4°C, wurde das Pellet dreimal in 100 ml 10 %igem Glycerin gewaschen und in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert, um die Salze zu entfernen. Es folgte das Aliquotieren der Zellen in 1,5 ml Eppendorfgefäße und eine erneute Zentrifugation für 5 min bei 8.000 rpm. Das Pellet wurde im gleichen abgeschätzten Volumen 10 %igem Glycerin gelöst, zu je 40 µl aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Die Elektroporation (CALVIN UND HANAWALT, 1988) ermöglicht es kompetenten Zellen freie DNA aufzunehmen, indem mit Hilfe eines elektrischen Feldes kleine Poren in der Zellmembran ausgebildet werden. Diese Ruption verleihen der Zelle eine erhöhte Permeabilität, die es dem zu transformierenden Plasmid ermöglicht, in den Wirt einzudringen. Die überschüssigen Ionen des Ligationsansatzes wurden durch Dialyse auf Nitrocellulose-Plättchen (Millipore; Porendurchmesser 0,025 µm) für 40 min gegen 10 %iges Glycerin entfernt, im Anschluss mit kompetenten *E. coli* Zellen vermischt und einem elektrischen Puls von 2,5 kV, 25 mF und 200 Ω (Gene Pulser II; BioRad) ausgesetzt. Die Zugabe von 1 ml SOC-Medium unmittelbar nach der Elektroporation sowie die anschließende Inkubation bei 37°C und 220 rpm für 45 min sollten die Zellen wieder stabilisieren, bevor sie auf LB_{Amp}-Agar ausplattiert wurden.

2.14.2 Transformation von Hefe-Zellen mittels Lithiumacetat

Lithiumacetat (10x)

Lithiumacetat	10 M
---------------	------

TE-Puffer (10x)

Tris	100 mM
------	--------

Na ₂ EDTA	10 mM
----------------------	-------

Lithiumacetat-TE

Lithiumacetat (10x)	10 %
---------------------	------

TE (10x)	10 %
----------	------

H ₂ O	80 %
------------------	------

PEG-Stammlösung

Polyethylenglykol 4000	50 % (w/v)
------------------------	------------

PEG-Lösung

PEG-Stammlösung	80 %
TE (10x)	10 %
Lithiumacetat (10x)	10 %

Zur Transformation von Hefezellen mit Plasmid-DNA wurde 1 ml einer Übernachtskultur zentrifugiert (8.000 rpm, 5 min), mit H₂O gewaschen und in 200 µl LiAc/TE aufgenommen. Zur Steigerung der Transformationseffizienz wurden 20 µl einer hitzedenaturierten Carrier-DNA aus Heringssperma zugegeben, und durch 2 µl Plasmid-DNA, die durch alkalische Lyse gewonnen wurde und 1,2 ml PEG-Lösung ergänzt. Der Ansatz wurde 30 min bei 30°C geschüttelt, für 15 min einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen, mit 500 µl 1xTE gewaschen und auf entsprechenden d/o-Agarplatten selektiert.

2.15 Serieller Verdünnungstest

Für den seriellen Verdünnungstest wurde zunächst die Zellzahl einer Raffinose-haltigen Übernachtskultur mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt; 1×10^7 Zellen wurden geerntet und in 50 µl H₂O_{dest} aufgenommen. Ausgehend von dieser Zellzahl wurden Verdünnungen hergestellt, so dass 1×10^6 bis 1×10^1 Zellen in einem Volumen von 5 µl auf eine Agarplatte mit Glukose (reprimierende Bedingungen) bzw. Galaktose (induzierende Bedingungen) als Kohlenstoffquelle aufgetropft werden konnten. Die Platten wurden, wenn nicht anders beschrieben, 5 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Zahl an Zellen ermittelt, die unter induzierenden Bedingungen noch eine Kolonie ausbildeten.

2.16 Wachstumstest

Für den Wachstumstest wurden die entsprechenden Deletions- bzw. „knock-down-Stämme“, die entweder das Letalkonstrukt oder den korrespondierenden Leervektor enthielten, über Nacht in raffinosehaltigem Medium kultiviert und 5×10^6 Zellen/ml geerntet. Das Pellet wurde in 1 ml Selektionsmedium mit Galaktose induziert und die Änderung der optischen Dichte von 1×10^6 Zellen in einer 96er-Wellplatte über einen Zeitraum von 24 h im „Paradigm Detection Platform“ (Molecular Devices) untersucht.

Für jeden Stamm wurde nach Dreifachbestimmung ein Mittelwert gebildet. Die maximale Differenz der relativen optischen Dichte zwischen Letalkonstrukt und Leervektor wurde als toxischer Effekt definiert und für den Wildtyp auf 100 % gesetzt.

2.17 Herstellung von Toxinkonzentrat

B-Medium

Glukose	30 g/l
oder Galaktose	20 g/l
Malat	20 g/l
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	2,05 g/l
Ammoniumsulfat	1,50 g/l
Kaliumdihydrogenphosphat	1 g/l
Calciumchlorid	0,50 g/l
Trinatriumcitrat	0,50 g/l
Inosit	0,04 g/l
Aminosäure-Mix	0,80 g/l
100x Vitaminstammlösung	10 %
100x Spurenelement-Stammlösung	10 %

100x Vitamin-Stammlösung

4-Aminobenzoessäure	20 mg/l
Biotin	20 mg/l
Folsäure	20 mg/l
Nikotinsäure	100 mg/l
Riboflavin	50 mg/l
Thiaminiumchlorid	50 mg/l
Calcium-D-Panthenat	100 mg/l

100x Spurenelement-Stammlösung

Borsäure	0,2 g/l
Eisen-III-chlorid-Hexahydrat	0,2 g/l
Zinksulfat-Heptahydrat	0,2 g/l
Aluminiumchlorid	0,2 g/l
Kupfersulfat-Pentahydrat	0,1 g/l
Natriummolybdat-Dihydrat	0,1 g/l
Lithiumsulfat-Monohydrat	0,1 g/l
Kaliumiodid	0,1 g/l
Kalium-Hydrogentartrat	2,0 g/l

Mc Ilvaine-Puffer

Lösung A

Citrat	0,1 M
--------	-------

Lösung B

Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	0,2 M
-------------------------------------	-------

Die beiden Komponenten wurden so vermischt, dass ein pH-Wert von 4,7 entstand (520 ml Lösung A und 480 ml Lösung B).

Von dem Stamm MS300c, in dem das Killertoxin K28 viral codiert vorliegt, wurde aus einer 200 ml Vorkultur (B-Medium) eine 10 l Hauptkultur beimpft und vier Tage bei 20°C kultiviert. Danach wurde der toxinhaltige Überstand geerntet (8.000 rpm, 10 min, 4°C) und mit Hilfe einer „Watson Marlow 6035“-Pumpe bei 4°C und 1 bar über das Tangentialflusssystem 17521-001 mit einer Ausschlussgrenze von 8 kDa (Sartorius) auf 500 ml eingengt. Nach erneuter Zentrifugation (8.000 rpm, 10 min, 4°C) wurde der Überstand mit Hilfe einer Ultrafiltrationszelle (Amicon) über eine Membran mit einer Ausschlussgrenze von 10 kDa (Millipore) geleitet und unter 3 bar N₂-Atmosphärendruck auf 100 ml aufkonzentriert. Zum Entsalzen wurde das erhaltene Konzentrat mit der fünf bis zehnfachen Puffermenge (McIlvaine-Puffer pH 4,7, 1:10 verdünnt) aufgefüllt und erneut konzentriert. Zur Aktivitätsbestimmung des 100-fachen Toxinkonzentrats wurde ein MBA-Test mit Hilfe eines sensitiven *S. cerevisiae* Stammes durchgeführt.

2.18 Agardiffusionstest

MBA (Methylenblau-Agar)

Lösung A

Ammoniumsulfat	5,0 g/l
Zitronensäure	18,0 g/l
Aminosäure-Mix	0,8 g/l
Methylenblau	0,003 %

Der pH-Wert wurde mit 2 M K_2HPO_4 auf 4,7 eingestellt.

Lösung B

Glukose	20 g/l
oder Galaktose	30 g/l
Agar	14 g/l

Lösung C

Yeast nitrogen base	1,7 g/l
---------------------	---------

Lösung A und B wurden getrennt autoklaviert, Lösung C wurde sterilfiltriert. Nach Mischen aller Komponenten wurde das Medium zu 15 ml auf Reagenzgläser verteilt.

Der Methylenblau-Agardiffusionstest dient der Sensitivitätsbestimmung verschiedener Hefestämme gegenüber dem K28-Heterodimer. Dazu wurden 1×10^6 Zellen einer ü.N-Kultur mit verflüssigten Methylenblau-Agar (55°C) vermischt und auf diese Weise nach Ausgießen in eine Petrischale in das Medium eingebettet. Nach Erstarren des Agars wurde mit einem Korkbohrer in die Mitte der Platte ein Loch gestanzt (\varnothing 0,9 cm), in das 100 μ l des Toxinkonzentrats appliziert wurde. Durch Diffusion erreicht das Toxin die sensitiven Zellen, wobei die Konzentration zur Peripherie logarithmisch abnimmt. Abgetötete Zellen nehmen das Methylenblau im Agar auf und beschreiben eine dunkelblaue Grenze des Hemmhofs. Nach drei Tagen bei 20°C wurde der gebildete Hemmhofdurchmesser ermittelt.

2.19 Sphäroplastierung

Sphäroplastierungspuffer

Sorbitol	800,0	mM
Tris	10,0	mM
Calciumchlorid	10,0	mM
Zymolyase 20T	0,2	mg/ml
DTT	2,0	mM

Zymolyase und DTT (1 M Stammlösung) wurden erst vor Gebrauch zugegeben.

Um die Toxinaufnahme sensitiver Hefezellen zu steigern, wurde je nach Versuchsansatz zuvor die Zellwand verdaut. Dazu wurden 100 ml einer Übernachtskultur (1×10^7 Zellen/ml) zentrifugiert, in 50 ml Sphäroplastierungspuffer aufgenommen und 90 min bei 30°C und 80 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde die Sphäroplastierung mikroskopisch kontrolliert (Platzen nach Zugabe von H₂O), die Zellen geerntet (2.000 rpm, 10 min, 4°C) und zur Toxininkubation eingesetzt.

2.20 Inkubation von Hefezellen mit K28

Inkubationspuffer

Sorbitol	800	mM
Glukose	10	mM
Calciumchlorid	10	mM
Mcllvaine-Puffer pH 4,7	10	%

Sphäroplasten oder intakte Hefezellen wurde zunächst in Inkubationspuffer gewaschen und anschließend darin resuspendiert. Nach Applikation von Toxinkonzentrat (stabilisiert mit 0,8 M Sorbitol für Sphäroplasten) in einer Endkonzentration von 10%, wurde der Ansatz für einen variablen Zeitraum bei 20°C und 70 rpm inkubiert. Die spezifischen Parameter je Versuchsansatz werden jeweils an entsprechender Stelle aufgeführt.

2.21 Zellaufschluss

2.21.1 Glasperlen

SUMEB-Puffer

SDS	1	% (w/v)
Harnstoff	8	M
MOPS pH 6,8	10	mM
EDTA	10	% (v/v)
Bromphenolblau	0,01	mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,30	M

Protease-Inhibitor

Eine „Complete Protease-Inhibitor Cocktail“-Tablette (Roche) wurde in 2 ml H₂O dest. gelöst und bei -20°C gelagert.

Hefezellen wurde mechanisch durch Verwendung von Glasperlen und Detergenzien aufgeschlossen, wenn keine weitere Unterteilung der Zellkompartimente vorgenommen werden sollte. Die Zellen wurden nach Toxininkubation zentrifugiert (8.000 rpm, 5 min), in 50 µl SUMEB-Puffer aufgenommen, nach Zugabe von sechs Glasperlen (ø 1-1,5 mm) und 5 µl Protease-Inhibitor zweimal für 1 min im „Bead Beater“ (Biospec Products) bei 4°C aufgeschlossen, danach für 10 min bei 70°C inkubiert und nach Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min) zur SDS-PAGE eingesetzt.

2.21.2 Dounce Homogenisierung

Lysepuffer

Sorbitol	200	mM
Hepes	20	mM
Kaliumacetat	50	mM
EDTA	2	mM

Protease-Inhibitor

Eine „Complete Protease-Inhibitor Cocktail“-Tablette (Roche) wurde in 2 ml H₂O dest. gelöst und bei -20°C gelagert.

Die Homogenisierung stellt eine mechanische sowie schonende Aufschlussmethode dar und bietet den Vorteil, membranumschlossene Zellkompartimente weitgehend zu erhalten. Hierdurch kann nach anschließender Zellfraktionierung die Lokalisation eines bestimmten Proteins in der Zelle untersucht und beispielsweise das Zytosol vom übrigen Membranteil der Zelle separiert und sogar zwischen einzelnen Kompartimenten unterschieden werden. Für diese sanfte Art der Homogenisierung muss zunächst die Zellwand entfernt werden, um destabilisierte, osmotisch instabile Sphäroplasten zu erhalten. Der eigentliche Aufschluss erfolgt in einem hypotonen Puffer, um neben den mechanischen Kräften einen osmotischen Druck auf die Zellen auszuüben und somit die Lyse zu unterstützen.

In der vorliegenden Arbeit wurden 100 ml einer Hefekultur in der logarithmischen Phase sphäroplastiert (2.19), anschließend in 1 ml Lysepuffer sowie 40 µl Protease-Inhibitor resuspendiert und mit 25 Hüben im Dounce-Homogenisator aufgeschlossen. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 300 g und 4°C wurden Zelltrümmer und unaufgeschlossene Zellen gewonnen. Nach weiteren 15 min bei 13.000 g die Membranfraktion, die nach weiteren 60 min bei 100.000 g weiter in Plasmamembran, Golgi- und ER-Membranen separiert werden kann, so dass im Überstand die zytosolische Fraktion erhalten wird. Für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war allerdings nur die Auftrennung der Membran- und zytosolischen Fraktion von Bedeutung, so dass auf den letzten Zentrifugationsschritt verzichtet werden konnte. Um die gelösten Proteine zu konzentrieren, wurde das Zytosol über Nacht in 10 % TCA bei 4°C gefällt und am nächsten Tag 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden in etwa 30 µl H₂O gelöst, mit der gleichen Menge SDS-Probenpuffer versetzt und zur SDS-Gelelektrophorese eingesetzt.

2.22 FACS-Analyse von Hefe-Zellen

Das „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS) ist eine Möglichkeit, Zellen aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften sowie Größe voneinander zu trennen. Der Einsatz von DNA-Farbstoffen ermöglicht dabei Untersuchungen der Zellzyklus-Progression und Apoptose. Das Prinzip beruht auf der Emission von Photonen nach Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes durch einen monochromatischen Laser. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird von Photozellen detektiert und verhält sich proportional zur gebundenen Menge des Fluoreszenzproteins pro Zelle.

Um den DNA-Gehalt Toxin-behandelter Zellen zu untersuchen, wurde eine 50 ml Übernachtkultur der Hefetransformanden BY4742 p413-ppα bzw. BY4742 p413-Leer in His d/o-Raffinose geerntet, zu gleichen Teilen in 50 ml His d/o-Glukose bzw. His d/o-Galaktose resuspendiert und für 4 h bei 30°C und 220 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze geerntet, über Nacht in 10 ml EtOH 70% bei 4°C belassen, nach erneuter Zentrifugation sowie einem Waschschrift mit 5 ml Na-Citratpuffer in 1 ml Puffer aufgenommen und die optische Dichte bestimmt. Je 8×10^6 Zellen wurden in 1 ml Na-Citratpuffer resuspendiert und mit 25 µl RNase A (10 mg/ml Stammlösung) für eine Stunde bei 50°C behandelt. Dem folgte die Applikation von 50 µl Proteinase K (20 mg/ml Stammlösung) sowie ein weiterer Inkubationsschritt für 1 h bei 50°C. Zur Färbung der DNA wurde dem Ansatz 1 ml Na-Citratpuffer mit 16 µg Propidiumiodid zugegeben. Nach 12 h bei 4°C wurde der DNA-Gehalt der Zellen im „BD FACS Canto“ mittels „BD FACS Diva“ bestimmt.

2.23 UPR-Assay

2.23.1 Untersuchungen zur Induktion der UPR nach Toxininkubation mittels mCherry-Reportersystem

Um festzustellen, ob K28 in sensitiven Hefezellen die „unfolded protein response“ induziert, wurden verschiedene Testsysteme angewandt. Das mCherry-Reportersystem besteht dabei aus dem plasmid-codierten Fluoreszenzprotein mCherry, dem vier UPR-Elemente (UPRE) in der Promotorregion vorgeschaltet sind. Kommt es nach Toxininkubation zur Induktion der UPR und somit zur Bildung des Transkriptionsfaktors Hac1p, kann dieser an UPRE binden und somit die Expression von mCherry induzieren.

Dazu wurde der mit dem Reporterkonstrukt pPM47-UPRE-mCherry transformierte Hefestamm über Nacht bis zu einer maximalen Dichte von 0,5 kultiviert. Anschließend wurden je $1,5 \times 10^7$ Zellen in einer 96er-Wellplatte ausgesät, mit 75 μ l Toxinkonzentrat (Endvolumen 200 μ l) versetzt und die Fluoreszenz des Reporterproteins mCherry über 24 h im „Paradigm Detection Platform“ (Molecular Devices) bestimmt. Als Positivkontrolle wurden Tunikamycin-behandelte Zellen (20 μ g/ml) mitgeführt, wohingegen die Applikation von DMSO bzw. McIlvaine Puffer als Negativkontrolle diente. In einem alternativen Versuchsansatz wurde eine 200 ml Kultur der Zellen bereits vor der Messung ü. N. mit 2 ml Toxin in 10 ml Inkubationspuffer versetzt.

2.23.2 Untersuchungen zur Induktion der UPR nach Toxinexpression mittels *lacZ*-Reportersystem

Eine weitere Möglichkeit, die Induktion der UPR durch K28 zu untersuchen, war die Induktion der β -Galaktosidase, die durch *lacZ* codiert wird. Dieses alternative Reportersystem beruht auf dem gleichen Prinzip wie es bereits für das mCherry-System beschrieben wurde (2.23.1). Die Auswertung erfolgte in diesem Fall anhand der Blaufärbung des Versuchsansatzes, die auf die Umsetzung von X-Gal durch β -Galaktosidase zurückzuführen ist.

Der Stamm BY4742 pJC-UPRE-*lacZ* wurde mit dem Letalkonstrukt pRS315-ppa bzw. mit dem Leervektor transformiert und für den Versuch über Nacht in Raffinose-haltigem Selektionsmedium bis zu einer maximalen optischen Dichte von 0,5 kultiviert. Je 3 ml wurden entweder durch 3% Galaktose für 3 h induziert bzw. mit 10 µg/ml Tunikamycin oder DMSO über den gleichen Zeitraum bei 20°C und 70 rpm behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet (8.000 rpm, 5 min, 4°C) mittels Glasperlen aufgeschlossen (2.21.1) und bei 13.000 rpm 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 60 µg/ml X-Gal versetzt und bei 30°C auf einem Drehrad bis zur Blaufärbung der Positivkontrolle inkubiert.

2.23.3 Untersuchungen zur Induktion der UPR nach Toxininkubation und mittels *HAC1*-Assay

Da der Expression von „target“-Genen als Antwort auf die UPR das Spleißen der *HAC1*-mRNA und somit die Bildung des verantwortlichen Transkriptionsfaktors vorausgeht, bietet dieser Schritt die Möglichkeit, die Induktion der UPR auf DNA-Ebene zu verfolgen. Nach Toxinbehandlung (2.20) von intakten Zellen oder Sphäroplasten (2.19) des Stammes BY4742 nach dreistündiger Expression des Letalkonstruktes (1×10^7 Zellen) wurde zunächst die mRNA der Zelle isoliert, die entsprechende cDNA synthetisiert und mittels PCR das *HAC1*-Produkt ermittelt.

2.23.3.1 RNA-Isolierung

DEPC	25 µl
H ₂ O	ad 1 l

Die RNA-Isolierung erfolgte durch Extraktion mit Phenol und Chloroform (CHOMCZYNSKI UND SACCHI, 1987). Es wurden 1×10^7 intakte Zellen oder Sphäroplasten mit Toxin, 20 µg/ml Tunikamycin (Positivkontrolle), Mcllvaine Puffer (Negativkontrolle) oder DMSO (Negativkontrolle) für 6 h oder über Nacht inkubiert, geerntet, mit Inkubationspuffer gewaschen und schließlich in 50 ml Inkubationspuffer aufgenommen. Für die Isolierung der RNA wurden 10 ml zentrifugiert, das Pellet in 400 µl TES-Puffer und 400 µl saurem Phenol aufgenommen und 40 min bei 65°C inkubiert. Dabei entfernt das saure Phenol Proteine, um eine bessere Trennung von DNA und RNA zu ermöglichen.

Danach wurde der Ansatz 5 min auf Eis belassen und im Anschluss bei 14.000 g, 10 min, 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Phenol/Chlorform/Isoamylalkohol versetzt und wiederum bei 14.000 g, 10 min, 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in einem RNA-freien Reaktionsgefäß mit 1 ml eiskaltem Ethanol 1 h oder über Nacht gefällt, zentrifugiert (14.000 g, 10 min, 4°C), das Pellet in 70%igem Ethanol in H₂O_{DEPC} aufgenommen und erneut zentrifugiert. Das Pellet enthielt die gefällte RNA, die in 50 µl H₂O_{DEPC} gelöst und bei -20°C gelagert wurde.

2.23.3.2 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription dient einzelsträngige RNA als Matrize für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges (cDNA). Dabei lagern sich Oligo-dT-Primer an die Poly(A)-Sequenz der mRNA an, wodurch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase) die Sequenz in cDNA übersetzt. Die Zugabe von RNAsin sollte die Degradation der RNA durch RNasen während der Reaktion verhindern, die sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte:

RT-Puffer (5x)	4,0 µl
dNTP-Mix (0,5 mM)	1,0 µl
RNAsin (20 U)	0,5 µl
Oligo-dT-Primer (100 pmol)	0,4 µl
Isolierte RNA	0,1 µg
Reverse Transkriptase (200 U)	1,0 µl
H ₂ O _{DEPC}	ad 20,0 µl

Der Ansatz wurde zunächst für 30 min bei 50°C, dann zur Inaktivierung der reversen Transkriptase für 5 min bei 85°C inkubiert und abschließend bei -80°C gelagert. Für die Amplifikation von *HAC1* (2.6.1) wurden 1,5 µg DNA eingesetzt. Der Nachweis von β-Aktin diente als Ladekontrolle.

2.24 Split-Ubiquitin-System

Das Split-Ubiquitin-System wurde eingesetzt, um eine Interaktion von K28 mit seinem potentiellen Retrotranslokationskanal Sec61p zu untersuchen (JOHNSON UND VARSHAVSKY, 1994). Dabei werden Fänger- und Beuteprotein mit dem C-terminalen (Cub) bzw. N-terminalen Teil von Ubiquitin (NubG) fusioniert. Im Falle einer Interaktion der Testproteine, können auch die beiden Ubiquitin-Termini wieder ein intaktes Ubiquitinmolekül ausbilden. Eine spezifische Protease kann dadurch einen Transkriptionsfaktor (PLV) abspalten, der ebenfalls mit Cub verbunden ist und im Kern die Expression von *lacZ* induziert. Somit kann auch eine transiente Protein/Protein-Wechselwirkung detektiert werden. In NubG wurde an Position 13 Isoleucin durch Glycin ersetzt, um eine unspezifische spontane Zusammenlagerung des Ubiquitinmoleküls zu verhindern.

Zur Untersuchung einer Wechselwirkung zwischen K28 und Sec61p wurde ein diploider Hefestamm verwendet, der sowohl eine wildtypische Kopie des Translokons Sec61p exprimiert sowie eine Fusion mit dem C-Terminus von Ubiquitin und dem Transkriptionsfaktor PLV (Sec61p/Sec61p-CPLV) (HARTY UND ROMISCH, 2013). Eine 5 ml über Nacht Kultur (1×10^7 Zellen/ml) wurde bei 8.000 rpm 5 min geerntet und in einem Volumen von 1 ml Inkubationspuffer mit 200 µl Toxinkonzentrat (K28-NubG) bzw. McIlvaine Puffer für 8 h bei 20°C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert, im Rückfluss resuspendiert, auf eine X-Gal-haltige Agarplatte (0,008 %) mit Selektionsmedium aufgetropft und nach fünf Tagen bei 20°C die Blaufärbung untersucht.

Als Positivkontrolle diente die Interaktion von Sec61p mit Ost1p, einer Untereinheit des OST-Komplexes (Sec61p/Sec61p-CPLV pOST-NubG) sowie der Interaktion von Ost1p mit Wbp1p, einem weiteren natürlichen Interaktionspartner des gleichen Komplexes (Wbp1-pOST-NubG).

2.25 Co-Immunpräzipitation mittels Protein A Sepharose

10xPBS

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	100,00	mM
KCl	27,00	mM
NaCl	1,37	mM
KH ₂ PO ₄	17,60	mM

CoIP-Puffer 1

NaCl	0,15	M
NP-40	0,1	ml
1xPBS	ad 50,0	% (v/v)

CoIP-Puffer 2

NaCl	0,5	M
NP-40	0,1	% (v/v)
1xPBS	ad 50,0	ml

Die Co-Immunpräzipitation ist eine der gängigsten Methoden, um Protein/Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen. Dabei werden spezifische Antikörper, die gegen einen der Interaktionspartner gerichtet sind, an eine Matrix wie Protein A Sepharose, gebunden und mit Zelllysat versetzt. Das Fängerprotein wird von seinen Antikörpern gebunden und somit ebenfalls an der Matrix immobilisiert. Nach Elution können anschließend in immunologischen Untersuchungen die jeweiligen Bindungspartner identifiziert werden.

Eine 100 ml Übernachtskultur des Hefestammes Sec61p-13-c-myc wurde sphäroplastiert (2.19), mit Toxin inkubiert (2.20) und mittels Dounce-Homogenisator aufgeschlossen (2.21.2). Das Zelllysat wurde mit 40 mg/ml Digitonin versetzt, zu 100 µl Protein A Sepharosebeads mit 5 µl anti-c-myc-Antikörper gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Zur Elution wurde der Ansatz 30 s bei 13.000 rpm zentrifugiert, zweimal mit 1 ml CoIP-Puffer 1 und zweimal mit CoIP-Puffer 2 gewaschen, nach Zugabe von 60 µl SDS-Probenpuffer bei 60°C erhitzt und zur Western-Analyse eingesetzt. In einem alternativen Ansatz wurde der trimere Sec61-Komplex zunächst wie beschrieben durch Behandlung mit Digitonin aus der Membran herausgelöst und der Überstand gemeinsam mit 100 µl des Toxinkonzentrats mit „beads“ und Antikörper inkubiert.

2.26 Proteinbiochemische Methoden

2.26.1 SDS-Gelelektrophorese

Tris-HCl/SDS pH 8,45

Tris	3,0	M
SDS	0,3	% (w/v)

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,45 eingestellt

Kathodenpuffer (5x)

Tris	0,5	M
Tricin	0,5	M
SDS	0,5	% (w/v)

Anodenpuffer (5x)

Tris	1	M
------	---	---

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,9 eingestellt

SDS-Probenpuffer (2x)

Tris-HCl pH 8,45	900	mM
Glyzerin	24	%
SDS	4	%
Coomassie	0,003	%
Phenol-Rot	0,003	%
[β -Mercaptoethanol	10	%]

In der SDS-PAGE werden Proteingemische unter denaturierenden Bedingungen ihrer Größe nach aufgetrennt (SHAPIRO *ET AL.*, 1967). Dabei zerstört das anionische Detergenz SDS nicht-kovalente Wechselwirkungen und bildet einen SDS-Proteinkomplex mit einem konstanten Masse/Ladungs-Verhältnis, wodurch eine Auftrennung nahezu ausschließlich nach Molekulargewicht erreicht wird. Die Porengröße des Gels wird durch die Konzentration an Acrylamid und dem quervernetzenden Methylenbisacrylamid festgelegt, das durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED) polymerisiert.

In dieser Arbeit wurden 12 %ige Tris/Tricin-Gele in einem Tricin-Puffersystem verwendet (SCHAGGER *ET AL.*, 1988), die sich aus einem Trenn- und Sammelgel zusammensetzen. Herstellung von zwei Trenn- und Sammelgelen:

Trenngel

Rotiphoresegel 30	5,88 ml
Tris-HCl/SDS	5,00 ml
Glyzerin 79& (v/v)	2,00 ml
H ₂ O dest.	2,42 ml
TEMED	25 µl
10% APS (w/v); frisch	80 µl

Sammelgel

Rotiphoresegel 30	1,62 ml
Tris-HCl/SDS	3,10 ml
H ₂ O dest.	7,78 ml
TEMED	25 µl
10% APS (w/v); frisch	80 µl

Zur Auftrennung wurden die Proben mit gleichem Volumen SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 100°C gekocht und 15 µl aufgetragen. Die vertikale Elektrophorese wurde im „Mini-Protean II“ bei einer Spannung von 80 V gestartet und nach Erreichen des Trenngels auf 120 V erhöht. Zur Größenbestimmung wurden 7 µl eines Längenstandards „PAGERuler™ Prestained Protein Ladder“ (Fermentas) mitgeführt (ABBILDUNG 10).

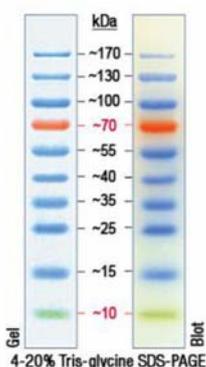


Abbildung 10: PageRuler™ „Prestained Protein Ladder“ (Fermentas) zur Größenbestimmung der Proteine der SDS-PAGE.

Im Anschluss wurden die aufgetrennten Proteinbanden durch einen immunologischen Nachweis sichtbar gemacht.

2.26.2 Western-Analyse

„SEMI DRY BLOTTING“

Transferpuffer

Tris	3,03	g/l
Glyzerin	14,4	g/l
SDS	0,1	% (w/v)
Methanol	20,0	% (v/v)

In der Western-Analyse werden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Roche) übertragen und schließlich in einem immunologischen Nachweis detektiert. Dazu wurden das SDS-Gel sowie das verwendete Blottingpapier für 15 min in Transferpuffer getränkt und anschließend in folgender Reihenfolge auf der Anode des „Trans-Blot SD Electrophoretic Transfer Cell“ (Biorad) aufgebaut: Blottingpapier, PVDF-Membran (zuvor in 100% Methanol äquilibriert), SDS-Gel, Blottingpapier. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte für 90 min bei 50 mA pro Gel.

IMMUNDETEKTION

TBS (10x)

Tris	1	M
Natriumchlorid	1	M

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt.

Blocking-Puffer

TBS (10x)	10,00	% (v/v)
Tween 20	0,05	%
Magermilchpulver	5,00	%

Waschpuffer

TBS (10x)	10,00	% (v/v)
Tween 20	0,05	%

Um die unspezifischen Bindestellen der PVDF-Membran zu blocken, wurde die Membran entweder für 1 h bei RT oder ü. N. bei 4°C belassen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit spezifischen primären und sekundären Antikörpern verdünnt in 5 % Magermilch für jeweils eine Stunde bei 20°C (TABELLE 7). Nach jedem Hybridisierungsschritt wurde die Membran jeweils dreimal mit Waschpuffer gewaschen und zur Detektion mit „ChemiDoc XRS System“ (Biorad) mit 400 µl des Substrates „Western Lightning Plus-ECL“ (Perkin Elmer) beschichtet.

Tabelle 7: Verwendete Antikörper der Western-Analyse und Immunpräzipitation

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Anti-K28α (Kaninchen)	1:1.000	Diese Arbeit; C-terminales Epitop KVISKTENAENIQS
Anti-V5 (Maus)	1:1.000	ABD Serotec
Anti-β-Aktin (Maus)	1:1.000	Abcam
Anti-Sbh1 (Kaninchen)	1:5.000	AG Römisch
Anti-c-myc (Maus)	IP 1:5 in 100 µl Protein A Sepharose	Roche
Anti-Kaninchen Meerrettich-Peroxidase- gekoppelt (Ziege)	1:10.000	Sigma
Anti-Maus Meerrettich-Peroxidase- gekoppelt (Ziege)	1:13.333	Thermo Scientific

2.27 Säugerzellspezifische Methoden

2.27.1 Kultivierung

Die Kultivierung von HeLa-Zellen erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen im CO₂-Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ und DMEM-Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 10 % fetalem Kälberserum. Das Passagieren der Zellen erfolgte durch Waschen mit 10 ml PBS („phosphate buffered saline“) und anschließender Trypsinierung (2 ml 0,5% Trypsin/EDTA; 2 min bei 37°C) sowie dem Stoppen der Reaktion mit 8 ml Medium. Ein Teil der Zellen wurde in eine neue Kulturflasche überführt und mit frischem Medium versetzt. Je nach Versuchsansatz konnten die geernteten Zellen gezählt und in multi-Well-Platten ausgesät werden.

2.27.2 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der geernteten Zellen in eine Neubauer Zählkammer gefüllt (0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm²) und vier Quadrate ausgezählt. Der Mittelwert wurde mit 10⁴ multipliziert und ergab somit die Zellzahl pro Milliliter.

2.27.3 Transfektion von Säugerzellen

Zur Transfektion wurden 1x10⁵ HeLa-Zellen in einer 24er Well Platte ausgesät, nach 24 h mit 1 µg DNA in einem Endvolumen von 500 µl mittels „Lipofectamine LTX & Plus Reagent“ (Invitrogen) transfiziert, nach 8 h das Medium erneuert und nach 24 h bzw. 48 h die Vitalität der Zellen mittels XTT-Test (2.27.5) bestimmt. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.27.4 Applikation von K28

Um den Einfluss des K28-Dimers auf die Vitalität von höheren Eukaryonten zu untersuchen, wurden je 1×10^5 Zellen in einem 24er Well in einem Endvolumen von 500 μl ausgesät, nach 24 h das Medium erneuert (300 μl) und 200 μl Toxinkonzentrat mit pH 4,7 appliziert, so dass ein pH-Wert von 5,9 entstand. Nach 48 h wurde mittels XTT-Test (2.27.5) die Vitalität der Zellen bestimmt und mit der Lebensfähigkeit nach Applikation von hitzeinaktiviertem Toxin (65°C) sowie einer Pufferkontrolle (Mcllvaine) verglichen.

2.27.5 Toxizitätstest an HeLa Zellen (XTT-Test)

Die Vitalität der toxinbehandelten Zellen wurde anhand des XTT-Tests mittels „*In vitro* Toxicology Assay Kit“ (Sigma-Aldrich) bestimmt. Dieser Test stellt eine photometrische Methode dar, um die Zahl vitaler Zellen anhand ihrer mitochondrialen Aktivität abschätzen zu können. Dabei wird der Tetrazoliumring des leicht gelblichen XTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxyanilid) durch mitochondriale Dehydrogenasen vitaler Zellen gespalten, wodurch ein rotes Formazan-Derivat entsteht. Die Absorption dieses Produkts kann spektralphotometrisch bei 450 nm bestimmt werden. Zur Bestimmung der Vitalität nach Toxinbehandlung wurden HeLa-Zellen nach Transfektion (2.27.3) bzw. Applikation von K28 (2.27.4) mit 500 μl PBS gewaschen und anschließend mit 500 μl Medium (DMEM ohne Phenolrot) und XTT-Stammlösung (20 % des Endvolumens) versetzt.

Nach dreistündiger Inkubation bei 37°C und 4 % CO₂, wurde die 24-Well Platte bei 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert, die Absorption des Mediums bei 450 nm im „Paradigm Detection Platform“ (Molecular Devices) bestimmt und der erhaltene Wert nach Transfektion mit dem Leervektor bzw. nach Applikation der Pufferkontrolle auf 100% gesetzt.

2.27.6 Zellaufschluss von Säugerzellen

RIPA-Puffer

Tris	50,0	mM
Natriumchlorid	150,0	%
EDTA	1,0	mM
IGEPAL	1,0	%
Natriumdesoxycholat	1,0	%
SDS	0,1	mM

Protease-Inhibitor

Eine „Complete Protease-Inhibitor Cocktail“-Tablette (Roche) wurde in 2 ml H₂O dest. gelöst und bei -20 °C gelagert.

Um die Expression der Toxinvarianten nach Transfektion (2.26.2) zu überprüfen, wurden die Zellen nach Transfektion durch Trypsinierung (2.26.1) geerntet, zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, in doppeltem Rückflussvolumen RIPA-Puffer aufgenommen, mit 40 µl Protease-Inhibitor versetzt und 30 min auf Eis belassen. Nach Zentrifugation für 1 h bei 13.000 rpm und 4°C wurde der Überstand 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt, 10 min bei 95°C inkubiert und bei -20°C gelagert.

2.27.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Bei der Fluoreszenzmikroskopie passieren die ausgesandten Wellenlängen einer Lichtquelle zunächst einen Anregungsfilter, der nur eine bestimmte Wellenlänge hindurch lässt. Der dichromatische Spiegel lenkt das Licht durch die Objektiv zur Probe, die nach Anregung der ankommenden Strahlen Licht im höheren Wellenlängenbereich emittiert. Auf dem Rückweg passiert dieses Licht ebenfalls die Objektivlinsen und den dichromatischen Spiegel, um abschließend von einem Sperrfilter absorbiert zu werden.

Sollten HeLa-Zellen zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden, wurden runde Deckgläser (Ø 1 cm) in Multiwell-Platten gelegt und die Zellsuspension mit definierter Zellzahl zugegeben. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 500 µl eiskaltem Methanol (100%) für 30 min bei -20°C fixiert und im Anschluss mit 500 µl eiskaltem Aceton für eine Minute permeabilisiert. Nach drei Waschschritten mit PBS folgte die Färbung mit dem primären Antikörper (1:100 in PBS) in einem Endvolumen von 20 µl für eine Stunde bei RT.

Es wurde wiederholt dreimal mit PBS gewaschen und der sekundäre fluoreszenzmarkierte Antikörper (1:500 in PBS) in einem Endvolumen von 20 µl appliziert und für eine weitere Stunde ohne Lichteinfluss bei RT belassen. Nach vier Waschsritten mit PBS konnten die Deckgläschen auf Objektträger mit 3 µl Mounting-Medium mit DAPI (Vectashield) aufgebracht und zur Mikroskopie mittels „Biozero BZ-8000“ [Keyence, Objektiv PlanApo, 20x, NA: 0.75 (Nikon)] eingesetzt werden. TABELLE 8 gibt Aufschluss über die verwendeten Filtersysteme

Tabelle 8: Filtersets zur Fluoreszenzmikroskopie (Biozero BZ-8000, Keyence)

Filter Anregung [nm]	Filter Emission [nm]	Dichroitischer Spiegel [nm]	Fluorophor
360/40	460/50	400	DAPI
480/30	510-	505	FITC
560/40	630/60	595	PI

2.27.8 FACS-Analyse von HeLa-Zellen

Die Hintergründe des „Fluorescence activated cell sorting“ wurden bereits unter Punkt 2.22 erläutert.

Um den Effekt der Toxinvarianten auf HeLa-Zellen zu spezifizieren, wurden die Zellen 24 h bzw. 48 h nach Transfektion durch Trypsinierung geerntet, vier 24-Well-Platten gepoolt und mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 200 µl 0,9%igem NaCl aufgenommen und durch eine Nadel (Stärke 23) in 1,8 ml kaltes Methanol überführt. Die Zellen wurden 1 h bei -80°C fixiert, 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert, mit 500 µl PBS gewaschen, in 250 µl RNase (10 mg/ Stammlösung 1:400 in PBS verdünnt) aufgenommen und schließlich in FACS-Röhrchen überführt. Die Färbung der DNA mit 250 µl Propidium-Iodid (1:100 in PBS) erfolgte 1 h bei RT ohne Lichteinfluss. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte im „BD FACS Canto“ mittels „BD FACS Diva“.

2.27.9 Annexin V

Eine weitere Methode, den toxischen Effekt von K28 α auf HeLa-Zellen zu spezifizieren, war die Darstellung von Phosphatidylserin (PS) auf der extrazellulären Oberfläche der Zellmembran. Bei dieser Translokation auf die extrazytoplasmatische Seite der Plasmamembran, handelt es sich um ein Ereignis der frühen Apoptose. Annexin V ist ein calciumabhängiges Phospholipid-Bindeprotein mit einer hohen Affinität zu PS, wodurch mit fluoreszenzmarkiertem Annexin V exponiertes PS auf der Zelloberfläche und somit eine einsetzende Apoptose nachgewiesen werden kann. Propidium-Iodid (PI) dient dabei als Kontrolle der Integrität der Plasmamembran, so dass ausgeschlossen werden kann, dass Annexin V Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen Seite bindet. Apoptotische Zellen erscheinen somit Annexin V positiv und PI negativ.

Zur Analyse wurden zunächst 1×10^5 Zellen im 24er-Well auf Deckgläschen ausgesät, nach 24 h transfiziert, nach weiteren 24 bzw. 48 h bei 1.200 rpm für 5min zentrifugiert und mit 500 μ l PBS gewaschen. Für die Reaktion wurden zu den Zellen 200 μ l Bindepuffer des „FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II“ (BD Biosciences) gegeben, mit jeweils 5 μ l FITC-Annexin V und PI ergänzt und 15 min bei RT ohne Lichteinfluss belassen. Die Well-Platte wurde bei 1.200 rpm für 5 min zentrifugiert, mit 300 μ l PBS gewaschen und die Deckgläschen auf Objektträger mit Mounting-Medium mit DAPI übertragen. Alternativ wurden die Zellen vor der Färbung mit nicht-gelabeltem Annexin V behandelt, um die spezifischen Bindestellen zu Blocken und somit die Aussage bezüglich der Apoptose-Induktion zu unterstützen. Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte mittels „Biozero BZ-8000“ (Keyence) und dem Objektiv „PlanApo, 20x, NA: 0.75“ (Nikon) mit dem Filtersystemen für GFP (Bindung von FITC-Annexin V) bzw. dsRed (Internalisierung von PI).

2.27.10 Protein-Import in Mikrosomen

Über den *in vitro* Import in Mikrosomen sollte die Fähigkeit der Toxinvarianten untersucht werden, in den sekretorischen Weg höherer Eukaryonten eintreten zu können. Dabei wurde die toxineigene Signalsequenz (post-translational) mit der co-translationalen Importsequenz von Präprolactin verglichen. Zur Synthese des jeweiligen Testproteins wurde zunächst *in vitro* transkribiert und anschließend während bzw. nach der Translationsreaktion mit Mikrosomen inkubiert, um somit den ER-Import im natürlichen System nachzuempfinden.

2.27.10.1 *In vitro* Transkription und Translation

Zur *in vitro* Transkription wurden die Toxinvarianten in den Vektor pGEM kloniert, an dessen 5'-Ende sich ein T7-Promotor befindet und der nach Linearisierung mit *Bsp1407I* für die Reaktion eingesetzt wurde. Die Restriktion war notwendig, um während der Reaktion eine effiziente Termination der Transkription zu erreichen, deren Reaktion sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte:

Prämix A	30,0	µl
Plasmid-DNA (1 µg/µl)	1,0	µl
m ⁷ GpppG-Lösung	2,5	µl
RNasin (40 U/µl)	1,5	µl
RNA-Polymerase (20 U/µl)	1,0	µl
H ₂ O	ad 50,0	µl

Der Ansatz wurde bei 40°C für 3 h inkubiert und anschließend bei -80°C gelagert.

Für die anschließende *in vitro* Translation wurde Retikulozytenlysat des „Rabbit Reticulocyte Lysate System“ (Promega) aus Kaninchen verwendet, in dem Komponenten der Translation, wie Ribosomen, tRNA sowie Faktoren zur Initiation, Elongation und Termination enthalten sind und das durch die Zugabe von Nukleotiden und Co-Faktoren ergänzt wurde. Durch die Zugabe von [³⁵S]-Methionin (1.000 Ci/mmol) konnten die Proteine während ihrer Synthese radioaktiv markiert werden. Je nach Form des Imports wurden Hundepankreasmikrosomen (RM) während oder nach der Reaktion zugegeben. Der Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen und wurde für den co-translationalen Import mit RM (6 % v/v) ergänzt und für 60 min bei 30°C inkubiert:

Retikulozytenlysat	12,5	µl
AS-Mix ohne Methionin	0,5	µl
RNasin (40 U/µl)	0,5	µl
mRNA	1,0	µl
[³⁵ S]-Methionin (1.000 Ci/mmol)	1,0	µl
H ₂ O	ad 25,0	µl

Der posttranslationale Import wurde bereits nach 15 min gestoppt und mit 80 ng/ μ l RNase A sowie 0,1 μ g/ μ l Cycloheximid die restliche mRNA verdaut bzw. die Translationsreaktion inhibiert. Nach weiteren 5 min bei 30°C wurden RMs (6% v/v) zugegeben und weitere 30 min bei 30°C inkubiert.

2.27.10.2 Sequestrierung

Lösung I

Sucrose	162,5 mM
---------	----------

Lösung II

Sucrose	162,5 mM
Proteinase K	170,0 μ g/ml

Lösung III

Sucrose	162,5 mM
Proteinase K	170,0 μ g/ml
Triton X-100	0,2 %

PMSF

PMSF	100 mM
------	--------

In Ethanol. Die Lösung wurde immer frisch angesetzt.

Entfärber 1

Methanol	50 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)

Neutralisationslösung

Methanol	50 % (v/v)
Glycerin	1 % (v/v)

Der ER-Import wird durch eine Signalsequenz am N-Terminus des Vorläuferproteins vermittelt, welche durch die membranständige Signalpeptidase abgespalten wird, wodurch sich das Molekulargewicht des luminalen Proteins verringert. Eine Möglichkeit, den Transport in Mikrosomen und somit in das Endoplasmatische Retikulum zu untersuchen, ist die Sequestrierung. Sie gibt Hinweis darauf, ob das sekretorische Protein nach der Importreaktion geschützt durch die mikrosomale Membran vorliegt oder durch Proteinase K proteolytisch degradiert werden kann. Dieser Schutz sollte durch die Solubilisierung der Membran mit Triton X-100 wieder aufgehoben werden können.

Zur Durchführung wurde der Ansatz zur *in vitro* Translation (2.27.10.1) in drei gleiche Volumina aufgeteilt und je im Verhältnis 1:2 mit Lösung I, II bzw. III versetzt. Einer 60 minütigen Inkubation auf Eis folgte die Applikation von PMSF (20 %) sowie eine weitere 5 minütige Inkubation auf Eis. Abschließend wurden die Ansätze mit SDS-Probenpuffer versetzt sowie für 5 min auf 95°C erhitzt und nach elektrophoretischer Trennung mittels „phosphorimaging“ detektiert. Das „phosphorimaging“ repräsentiert eine Variante der Autoradiographie, deren Exponierplatten jedoch eine erhöhte Sensitivität im Vergleich zu Röntgenfilmen aufweisen (KANEKAL ET AL., 1995). Das enthaltene bivalente Europium (Eu^{2+}) wird durch Emission der Probe zu trivalentem Europium (Eu^{3+}) oxidiert. Die Anregung durch einen Laser (630 nm) führt wiederum zur Reduktion zu Eu^{2+} , wobei die freiwerdende Energie (390 nm) in ein digitales Signal umgewandelt werden kann. Dazu wurden die SDS-Gele zunächst 15 min in Entfärber 1 fixiert. Nach anschließender 30 minütiger Inkubation in Neutralisationslösung, wurden die Gele unter Vakuum 1 h auf Filterpapier getrocknet, ü.N. auf eine Exponierplatte („storage phosphor screen“, Molecular Dynamics) gelegt und mittels „Typhoon Trio TM Scanner“ ausgewertet.

3 Ergebnisse

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Identifizierung des Mechanismus zur ER-Zytosol Retrotranslokation des Killertoxins K28. Nach Applikation wird das reife Toxin über Endozytose aufgenommen und retrograd über Endosomen und Golgi-Apparat bis zum ER transportiert. Im Anschluss an die Dislokation in das Zytosol werden α und β -Untereinheit getrennt, wonach K28 β proteasomal degradiert und K28 α im Kern den Zellzyklus arretiert. Im artifiziellen Testsystem wird K28 α nach plasmidtriebener Expression mit Hilfe des toxineigenen Sekretionssignals in das ER importiert und gelangt nach Transport über den Golgi-Apparat wieder zurück zum ER und induziert äquivalent zum reifen Dimer nach Erreichen des Nukleus einen G1/S-Arrest (ABBILDUNG 11)

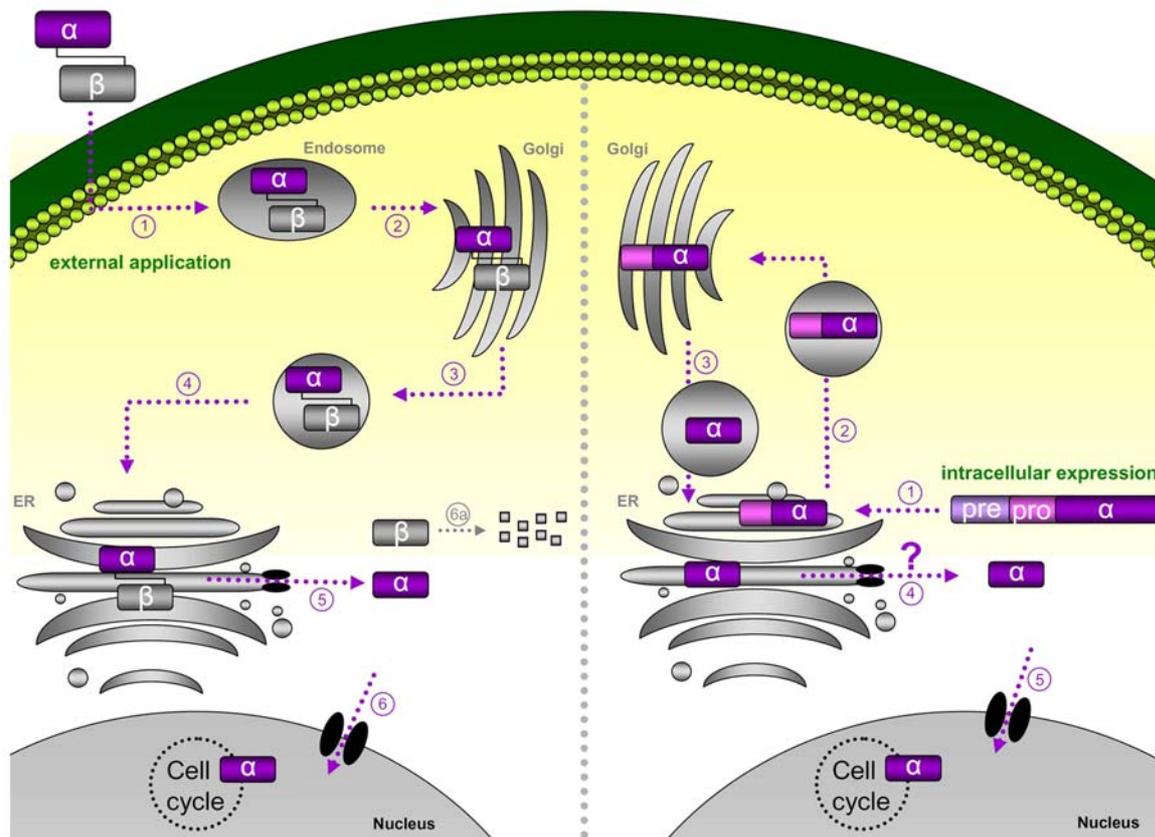


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Transportwege von K28 nach externer Applikation (links) sowie intrazellulärer Expression der α -Untereinheit (rechts). **Links:** Das Heterodimer gelangt nach Rezeptor-vermittelter Endozytose und retrogradem Transport über Endosomen und Golgi zum ER. Ausgehend von diesem Kompartiment wird das Killertoxin in das Zytosol retrotransloziert, wo es in seine beiden Untereinheiten dissoziiert. K28 β unterliegt der proteasomalen Degradation, während K28 α den Zellkern erreicht und den Zellzyklus arretiert. **Rechts:** Nach intrazellulärer Expression der toxischen α -Untereinheit, erreicht präpro α zunächst das ER und wird nach Abspaltung der Signalsequenz (prä) zum Golgi transportiert. Dem schließt sich nach Entfernen der pro-Region die Rückführung zum ER sowie die Dislokation in das Zytosol an. Äquivalent zur Applikation des reifen Toxins, vermittelt K28 α den letalen Effekt vermutlich nach Diffusion in den Nukleus.

In vergleichenden Toxizitätstests von Deletions- und „knock-down“ bzw. DAmP-Mutanten sollte bestimmt werden, ob das reife Toxin die gleichen Komponenten für den ER-Export nutzt wie K28 α . Wie bei allen A/B Toxinen genügen wenige Moleküle, um in sensitiven Zellen einen toxischen Effekt hervorzurufen. Dieser Umstand macht es fast unmöglich, das Toxin nach Expression immunologisch zu detektieren oder Unterschiede im Transport zu erkennen, solange ein Toxinüberschuss in der Zelle vorliegt und somit auch im Falle einer beeinträchtigten Retrotranslokation weiterhin ein sensitiver Phänotyp ausgebildet wird. Die plasmidgetriebene Expression des Letalkonstruktes wurde bereits unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors eingesetzt, erwies sich allerdings in nachfolgenden Experimenten als nicht geeignet, um kleinere Unterschiede im ER-Exportverhalten identifizieren zu können. Ziel der Arbeit war es, ein besser geeignetes Testsystem zu etablieren, das auf der Reduktion der Toxinmenge innerhalb der Zelle beruht. Mit Hilfe dieser optimierten Expression sollte der Einfluss verschiedener Degradations-Pathways, deren alternative Rolle am ER-Export bereits beschrieben wurde, beurteilt werden. Es galt darüber hinaus die Interaktion mit einem potentiellen Retrotranslokationskanal sowie eine Beteiligung der „unfolded protein response“ (UPR) zu untersuchen.

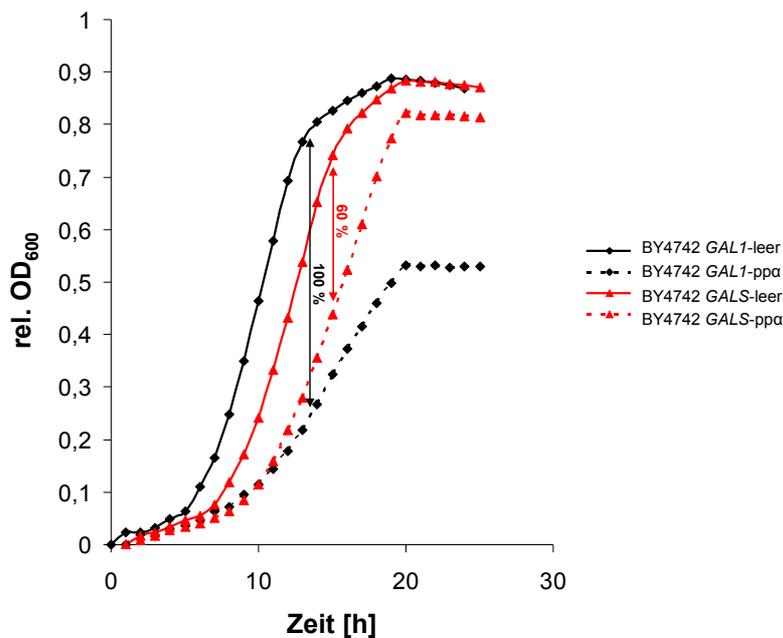
3.1 Intrazelluläre Expression der K28 α -Untereinheit unter Kontrolle des *GALS*-Promotors

OPTIMIERUNG DES TESTSYSTEMS

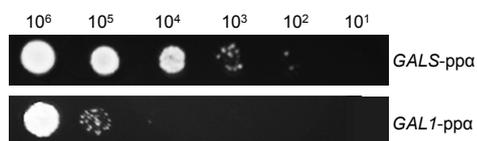
In vorangegangenen Arbeiten wurde die toxische K28 α Untereinheit bereits über einen Zentromervektor unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors exprimiert. Der Promotor *GAL1* der Galaktokinase wird durch Glukose reprimiert und durch Galaktose stark induziert (JOHNSTON UND DAVIS, 1984). Der dadurch erhaltene Toxinüberschuss ließ allerdings nur unzureichende Veränderungen der Sensitivität zahlreicher Deletionsmutanten erkennen, die den Toxintransport in Abhängigkeit potentieller Pathways rekonstruieren sollten. Die K28 α -Konzentration sollte daher durch die Verwendung des *GALS*-Promotors, eine um eineinhalb UAS-Elemente verkürzte Version des *GAL1*-Promotors, reduziert werden (WEST ET AL., 1984). In einem „low copy“-Vektor konnte die Enzymaktivität der β -Galaktosidase um das 14-fache reduziert werden. *GALS* zeigt eine niedrige aber vollständig reprimierbare Aktivität, die ideal für die konditionale Expression von Genen ist, die zu einem toxischen Effekt führen (MUMBERG ET AL., 1994).

Um den toxischen Effekt von K28 α unter Kontrolle des *GALS* Promotors bestimmen zu können, wurde der Wildtyp-Stamm BY4742 sowohl mit dem entsprechenden Letalkonstrukt *GALS*-pp α als auch mit dem Leervektor transformiert und über 24 h das Wachstumsverhalten unter induzierenden Bedingungen im Vergleich zur Expression über *GAL1* beobachtet. Aus der maximalen Differenz der relativen optischen Dichte von Leervektor und Letalkonstrukt wurde der toxische Effekt abgeleitet.

Verglichen mit einem toxischen Effekt von 100 % nach *GAL1*-Expression ergab sich für die Expression unter Kontrolle von *GALS* eine verminderte Sensitivität von 60 %. Im seriellen Verdünnungstest wuchsen die Zellen nach Expression von *GALS*-pp α noch bis zu einer Zellzahl von 10^4 , während Zellen, die das Toxin unter *GAL1*-Kontrolle exprimierten, lediglich in einer Verdünnungsstufe von 10^6 Zellen überlebten (ABBILDUNG 12).



A



B

Abbildung 12: A: Änderung der relativen optischen Dichte der Hefe *S. cerevisiae* BY4742 nach Expression von K28 α unter Kontrolle des *GAL1*- bzw. *GALS*-Promotors im Vergleich zum Leervektor. Es wurden 1×10^6 Zellen in einer 96-Wellplatte ausgesät und die optische Dichte der Kultur unter induzierenden Bedingungen über einen Zeitraum von 24 h bestimmt. **B:** Der Stamm BY4742 wurde nach Expression von K28 α unter Kontrolle des *GAL1*- bzw. *GALS*-Promotors in den angegebenen Zellzahlen auf Selektionsmedium aufgetropft und die toxische Wirkung anhand des Wachstums der Kolonien abgeleitet.

Die Toxinexpression unter Kontrolle des *GALS*-Promotors schien somit der bisherigen Problematik eines zu hohen Toxingehalts in der Zelle entgegenwirken zu können.

BESTIMMUNG DES TERMINALEN PHÄNOTYPS NACH INTRAZELLULÄRER EXPRESSION VON K28 α
Zellen, die mit K28 behandelt werden, arretieren in einem knospenden Stadium des Zellzyklus. Sechs Stunden nach Toxinapplikation war nach durchflusszytometrischer Analyse nur noch ein Signal für einen DNA-Gehalt von 1 n (G1-Phase) zu erkennen, woraus geschlossen werden kann, dass die Applikation zur Akkumulation von Zellen mit nicht-replizierter DNA führt. Die Morphologie stimmt allerdings nicht mit einer einfachen Inhibierung der DNA-Synthese überein, da bei einem G1-Arrest üblicherweise keine Knospe ausgebildet wird. Daher ist anzunehmen, dass K28 einen pleiotropen Effekt auf die Zelle ausübt. Darüber hinaus ist der Effekt des Toxins auf die Lebensfähigkeit der Zelle dosisabhängig und führt in niedrigen Konzentrationen zur Apoptose (REITER *ET AL.*, 2005).

Um den toxischen Effekt, der unter Verwendung des schwächeren *GALS*-Promotors hervorgerufen wird, zu charakterisieren, wurde ebenfalls eine FACS-Analyse durchgeführt. Dabei wurde der Stamm BY4742 *GALS*-pp α über Nacht bis zur exponentiellen Phase unter nicht-induzierenden Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 4 h durch Zugabe von Galaktose induziert und zur DNA-Färbung mit Propidiumiodid (PI) eingesetzt. Die Fluoreszenzintensität gab Aufschluss über den DNA-Gehalt bzw. Fragmentierungsgrad und somit über die Zellzyklusphase oder Apoptoserate. Nach Kultivierung in Raffinose-haltigem Medium lässt sich in ABBILDUNG 13A erkennen, dass sich die meisten Zellen in der G2-Phase befanden (P3). Nach dem Shift in Galaktose-haltiges Medium verschob sich der Peak 4 h nach Expression von K28 α verstärkt zur G1-Phase (P2). Die Apoptose (P1), die sich durch Fragmentierung der DNA äußert, änderte sich hingegen nicht (ABBILDUNG 13B). ABBILDUNG 13C fasst die Veränderungen der Zellzyklusphasen nach Toxinexpression zusammen. Daraus geht hervor, dass sich 4 h nach Toxinwirkung 16 % der Zellen verstärkt in der G1-Phase befinden und es somit nach intrazellulärer Expression von K28 α zu einem ähnlichen Effekt kommt wie nach Applikation einer hohen Konzentration des K28-Dimers.

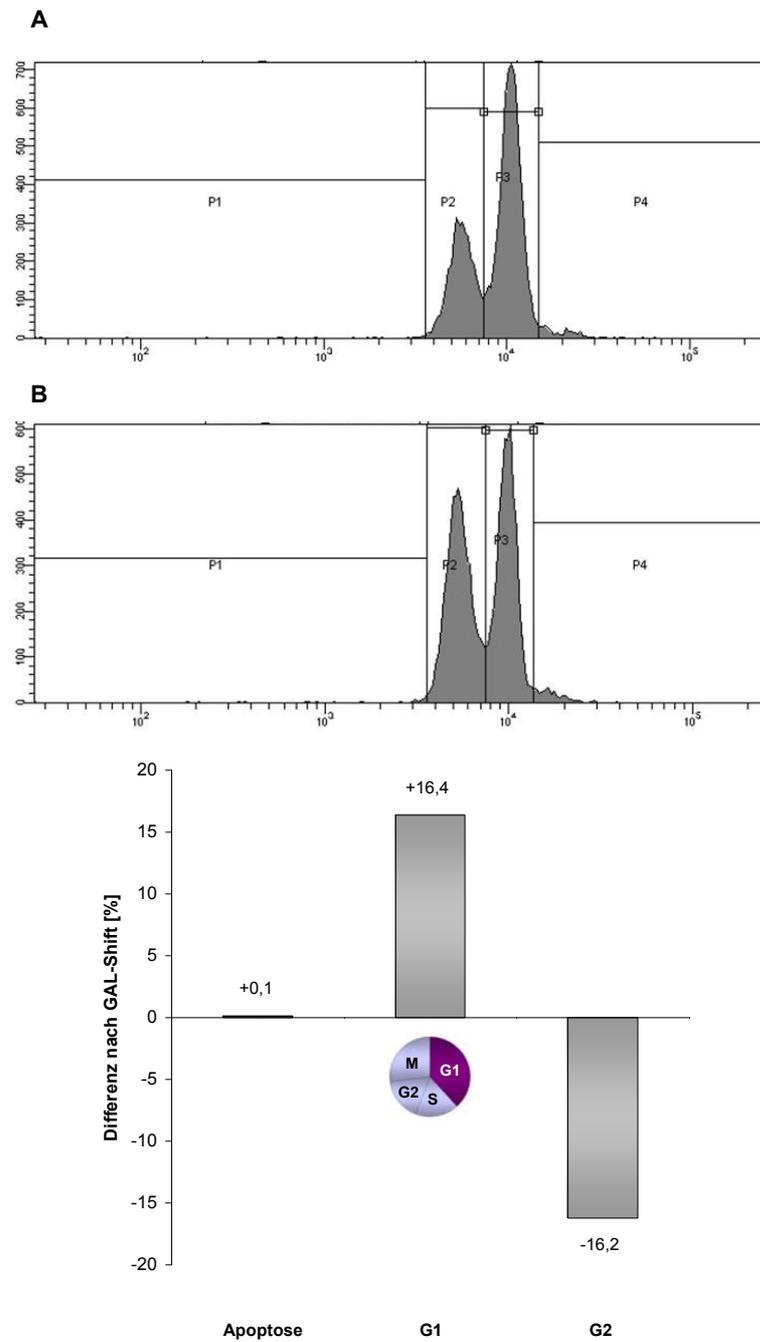


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse des DNA-Gehaltes nach Kultivierung des Hefestammes BY4742 *GALS-ppa* unter **A** nicht-induzierenden Bedingungen (Raffinose) sowie **B** induzierenden Bedingungen (Galaktose). Nach vierstündiger Expression von *K28α* befanden sich mehr Zellen in der G1-Phase (P2). **C:** Prozentuale Auswertung der Veränderung der Zellzyklusphasen des in der FACS-Analyse ermittelten DNA-Gehaltes nach Induktion der *K28α*-Expression.

3.2 Beteiligung von ERAD-Komponenten an der Retrotranslokation von K28 in Hefe

Die ER-assoziierte Degradation (ERAD) dient der Qualitätskontrolle im ER und stellt sicher, dass fehlgefaltete Proteine abgebaut werden, so dass keine toxischen Aggregate akkumulieren. Fehler bei der Faltung oder Modifikation führen dazu, dass die betreffenden Proteine im ER zurückgehalten bzw. aus anderen Kompartimenten wieder dorthin zurückgeführt werden, um umgehend degradiert zu werden (TROMBETTA UND PARODI, 2003). Dieser selektive Prozess der ER-assoziierten Degradation beinhaltet sowohl die Erkennung und das „targeting“ zum Export-Kanal, als auch die Markierung mit Ubiquitin sowie die Degradation durch das Proteasom (MCCRACKEN UND BRODSKY, 1996).

Um den Einfluss dieses Pathways auf den ER-Export von K28 zu analysieren, wurden Deletions- bzw. „knock-down“-Mutanten dieser Teilschritte untersucht. Überprüft wurde deren Sensitivität nach Applikation des reifen A/B-Toxins im MBA bzw. nach Transformation mit dem Letalkonstrukt in einem Verdünnungstest sowie Wachstumstest. Der toxische Effekt des Wildtyp-Stammes wurde dabei auf 100 % gesetzt.

ERKENNUNG UND UBIQUITINIERUNG

Die Schlüsselereignisse der Erkennung eines fehlgefalteten Proteins sind die Wechselwirkung von ER-luminalen Chaperonen mit exponierten hydrophoben Bereichen des Substrats sowie die Generierung eines spezifischen Glykansignals. Vom übertragenen „core“-Oligosaccharid $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ der N-Glykosylierung entfernt Mns1p nach Abspaltung der Glukosereste einen Mannoserest. Entfernt Htm1p einen weiteren Rest, weist dies auf eine Fehlfaltung hin. Die beiden Mannosidasen Mns1p und Htm1p fungieren daher als „timer“, um unterscheiden zu können, ob sich ein Protein im Faltungsprozess befindet oder aufgrund eines Defekts degradiert werden muss (JAKOB *ET AL.*, 1998). Wird das Substrat dem ERAD-Pathway zugeführt, bindet Yos9p spezifisch die durch Mns1p und Htm1p generierten α -1,6 Mannose-Motive und initiiert den weiteren Transportprozess (QUAN *ET AL.*, 2008). Im Zusammenhang mit K28 α zeigten sowohl eine $\Delta htm1$ - als auch eine $\Delta yos9$ -Deletionsmutante eine gesteigerte Sensitivität von 132 % bzw. 167 % (TABELLE 9), obwohl K28 α keine Konsensussequenz für eine N-Glykosylierung besitzt.

Die Substratbindung wird zusätzlich von Hrd3p vermittelt, das neben Hrd1p, Hrd3p, Ubc7p, Cue1p, Der1p, Usa1p, Yos9p und Ubx2p eine weitere Untereinheit des Hrd1-Komplexes (ERAD-L) bildet (1.2.1). Unter den Komponenten des Hrd1-Komplexes sind Der1p und Hrd1p vielversprechende Kandidaten für die Bildung eines Retrotranslokationskanals (LILLEY UND PLOEGH, 2004; YE *ET AL.*, 2004), wohingegen in einigen Publikationen eine Rolle von Sec61p diskutiert wird (PILON *ET AL.*, 1997; ZHOU UND SCHEKMAN, 1999). Für keine dieser Optionen existiert jedoch ein direkter Beweis, noch ist belegt, dass ein Kanal existiert. Auf der zytosolischen Seite der ER-Membran wird das Substrat meist ubiquitiniert, um es für den proteasomalen Abbau zu markieren. Ubc7p übernimmt im ERAD-L-Pathway die Rolle des E2-Enzyms, die zentrale Komponente Hrd1p die der Ubiquitinligase.

Sowohl eine $\Delta ubc7$ - als auch $\Delta hrd1$ -Deletionsmutante zeichneten sich durch eine Hypersensitivität von 213 % bzw. 160 % gegenüber K28 α aus (TABELLE 9). Die übrigen Komponenten unterstützen die Funktion der Ubiquitinligase oder regulieren deren Aktivität. Der1p nimmt dabei vermutlich die Rolle eines Gerüstproteins ein, das an der Rekrutierung des Substrates zum Hrd1-Komplex beteiligt ist. Usa1p vermittelt die Wechselwirkung von Hrd1p mit Der1p sowie die Dimerisierung der Ligase. Fehlt eines dieser Gerüstproteine, steigerte sich die Sensitivität gegenüber dem Letalkonstrukt auf 154 % ($\Delta der1$) bzw. 147 % ($\Delta usa1$) (TABELLE 9).

Die Substraterkennung im ERAD-C-Pathway ist bisher nicht charakterisiert, erfüllt jedoch im weiteren Verlauf eine äquivalente Funktion im Abbau fehlgefalteter Proteine. Die zentrale Komponente repräsentiert die Ubiquitinligase Doa10p, die ebenfalls mit Hilfe von Ubc7p die Ubiquitinierung defekter Polypeptide katalysiert. Die Untereinheiten Yos9p, Hrd3p, Usa1p und Der1p fehlen in diesem Komplex.

Obwohl über diesen Pathway Substrate mit zytosolischen Defekten degradiert werden, kam es auch nach Deletion von *DOA10* zu einer gesteigerten Sensitivität von 160 % gegenüber K28 α (TABELLE 9). Wie bereits gezeigt, hatten Deletionen der ERAD-Komponenten keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber dem K28-Dimer (HEILIGENSTEIN *ET AL.*, 2006).

Entgegen der bisherigen Annahme, dass Komponenten des Hrd1-Komplexes eine verminderte Sensitivität gegenüber K28 α zeigen, konnte auch nach Reduktion der Toxinmenge durch Verwendung des *GALS*-Promotors in den entsprechenden Mutanten kein Einfluss dieses Pathways an der Retrotranslokation bestätigt werden. ERAD spielt demnach im artifizialen Testsystem vermutlich eine Rolle beim Abbau des Toxins. Darauf aufbauend sollte untersucht werden, ob sich die beiden Funktionen der Degradation und Retrotranslokation überlagern und das Toxin den Pathway somit ebenfalls zum Export nutzt.

Tabelle 9: Übersicht zur Sensitivität von Deletions(Δ)-Mutanten des ERAD-Pathways gegenüber K28. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4742 (WT)	22	100						
<i>$\Delta htm1$</i>	22	132						
<i>$\Delta yos9$</i>	21	167						
<i>$\Delta hrd3$</i>	21	147						
<i>$\Delta der1$</i>	21	154						
<i>$\Delta ubc7$</i>	23	213						
<i>$\Delta hrd1$</i>	21	160						
<i>$\Delta usa1$</i>	21	147						
<i>$\Delta doa10$</i>	21	160						

Um diese Option genauer zu verifizieren, wurde eine lysinfreie K28 α -Variante in den entsprechenden ERAD-Mutanten untersucht, da die Ubiquitinierung üblicherweise an dieser Aminosäure erfolgt. Die Lysinreste in K28 α scheinen zumindest teilweise für den Abbau des Toxins verantwortlich zu sein, da es nach deren Substitution zu einer Hypersensitivität von 149 % verglichen mit der lysinhaltigen K28 α -Variante im WT kam (TABELLE 10). Dies stimmt mit der gesteigerten Sensitivität der lysinhaltigen Variante in den untersuchten ERAD-Deletionsmutanten überein und legt den Schluss nahe, dass diese Komponenten nicht wie bei anderen A/B Toxinen zur Retrotranslokation genutzt werden, sondern dass es sich bei der ER-Qualitätskontrolle im Falle von K28 α ausschließlich um einen Abbaumechanismus handelt.

Fehlt eine der Ubiquitinligasen, lässt sich ein stärkerer Einfluss auf den toxischen Effekt von K28 α Δ lys feststellen. Ohne Hrd1p kam es zu einer Steigerung der Sensitivität auf 219 % (TABELLE 10). Dies deutet darauf hin, dass der Abbau des Toxins durch den Verlust von Hrd1p weiter reduziert wird als durch Substitution der Lysinreste allein. Daraus kann geschlossen werden, dass eventuell mit Hilfe der gleichen Ubiquitinligase alternative Aminosäuren mit Ubiquitin für den Abbau markiert werden. Dagegen ist Doa10p vermutlich nicht an der Degradation der lysinfreien Form beteiligt (TABELLE 10).

Tabelle 10: Übersicht zur Sensitivität von Deletions(Δ)-Mutanten des ERAD-Pathways gegenüber K28 α lys. Die Sensitivität wurde nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach ppa Δ lys-Expression [%]	Phänotyp nach ppa Δ lys-Expression					
		10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4742 (WT)	149						
Δ hrd1	219						
Δ doa10	86						

Üblicherweise führt die Deletion einer der beiden beschriebenen Ubiquitinligasen nicht zu einem vollständigen Verlust der Degradation des jeweiligen Testsubstrates, was zu der Annahme führte, dass das verbleibende E3-Enzym das Fehlen der anderen kompensieren kann. Aufgrund der Tatsache, dass der Abbau fehlgefalteter Proteine auch in Doppelmutanten nicht vollständig zum Erliegen kam, wurde im Verlauf weiterer Untersuchungen ein zusätzlicher Mechanismus identifiziert, der an Stelle von Lysinresten den N-Terminus des Zielproteins mit Ubiquitin markiert. Dieser Schritt wird von der Ubiquitinligase Ubr1p katalysiert (HUYER *ET AL.*, 2004). Da es in einer Δ ubr1-Deletionsmutante zu keiner Veränderung der Sensitivität gegenüber K28 bzw. K28 α kam, kann eine Beteiligung von Ubr1p am Abbau oder der Retrotranslokation beider Toxinvarianten ausgeschlossen werden (TABELLE 11).

Tabelle 11: Sensitivität nach Deletion der Ubiquitinligase *UBR1* gegenüber K28. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4742 (WT)	22	100						
Δ ubr1	22	101						

ÜBEREXPRESSION ZENTRALER ERAD-KOMPONENTEN

CARVALHO, STANLEY UND RAPOPORT publizierten 2008 ein Modell, in dem die Ubiquitinligase Hrd1p die Schlüsselfunktion des Transports fehlgefalteter Proteine über die ER-Membran einnimmt. Eine Überexpression von Hrd1p überbrückte die Notwendigkeit ihrer Interaktionspartner Hrd3p, Usa1p sowie Der1p bezüglich einer effizienten Degradation fehlgefalteter Proteine, während die zytosolischen Komponenten weiterhin benötigt wurden. In diesen Untersuchungen war der endogene *HRD1*-Promotor durch den Galaktose-induzierbaren *GAL1*-Promotor ersetzt worden, was zu einem beschleunigten Abbau von CPY* in diesen Zellen führte. Der Effekt wurde jedoch nach zusätzlicher Deletion von *UBC7* wieder vermindert und durch Inhibition der Ligaseaktivität von Hrd1p vollständig aufgehoben.

Eine Überexpression von Hrd1p führte nach Applikation des K28-Dimers zu einer stark verminderten Sensitivität. Ein um 4 mm verkleinerter Hemmhof wies darauf hin, dass es aufgrund des erhöhten E3-Gehaltes vermutlich zu einem gesteigerten Abbau des Toxins kam, der durch Deletion des dazugehörigen E2-Enzyms Ubc7p und somit einer Blockade der Ubiquitinierungsreaktion wieder aufgehoben werden konnte. Das Fehlen übriger ERAD-Komponenten zur Substraterkennung (Hrd3p), Oligomerisierung (Usa1p) bzw. Rekrutierung des Substrats (Der1p) veränderte den Effekt dagegen nicht (TABELLE 12).

Nach Expression des Letalkonstruktes kam es im Stamm *GAL1-HRD1* ebenfalls zu einer stark verminderten Sensitivität um 50 %, wobei auch hier eine zusätzliche Deletion von Hrd3p oder Usa1p keinen weiteren Einfluss auf diesen Effekt hatte. Die Deletion von *UBC7* verursachte im Wachstumstest über 24 h einen zu starken Wachstumsdefekt, zeigte aber im Verdünnungstest wildtypische Sensitivität. Fehlte Der1p im gleichen Stammhintergrund, stieg die Sensitivität wieder um 39 %, woraus geschlossen werden kann, dass Der1p als Zulieferer der Substrate eventuell eine essentiellere Rolle im Funktionserhalt von Hrd1p spielt als Hrd3p oder Usa1p und somit ein Verlust den Effekt einer Überexpression von Hrd1p herabsetzt (TABELLE 12).

Darauf aufbauend postulierten MEHNERT *ET. AL* (2013) anhand von *in vitro* Versuchen mit dem mutierten α -Faktor, dass Der1p vermutlich mit dem Exportkanal assoziiert ist, jedoch nicht den Haupt-Kanal bildet. Eine Überexpression von Der1p führte im Gegensatz zu Hrd1p nicht zu einem beschleunigten Substratabbau von CPY* und konnte auch nicht das Fehlen anderer Komponenten kompensieren. Gegenüber K28 α zeigte der Stamm allerdings eine gesteigerte Sensitivität von 184 %, verhielt sich nach Applikation des Heterodimers hingegen wie der Wildtyp (TABELLE 12).

Der1p könnte demzufolge nicht nur am Toxinabbau von K28 α beteiligt sein, was durch die Hypersensitivität der Deletionsmutante gestützt wurde, sondern ebenfalls eine Rolle im Translokationsprozess spielen. Fehlte zusätzlich die Ubiquitinligase Hrd1p, kam es vermutlich durch Reduktion der Degradation zu keiner weiteren Sensitivitätssteigerung, was durch das Vorhandensein verschiedener Ubiquitinligasen mit redundantem Effekt zu erklären wäre. Andere ERAD-Komponenten wie Hrd3p oder Usa1p scheinen für diese alternative Funktion von Der1p keine Rolle zu spielen.

Tabelle 12: Übersicht zur K28-Sensitivität nach Überexpression der Ubiquitinligase Hrd1p bzw. der ERAD-Komponente Der1p. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4741 (WT)	23	100						
<i>GAL1-HRD1</i>	19	50						
<i>GAL1-HRD1 Δder1</i>	19	79						
<i>GAL1-HRD1 Δhrd3</i>	18	55						
<i>GAL1-HRD1 Δusa1</i>	19	57						
<i>GAL1-HRD1 Δubc7</i>	24	na						
<i>GAL1-DER1</i>	23	184						
<i>GAL1-DER1 Δhrd1</i>	22	183						
<i>GAL1-DER1 Δhrd3</i>	22	182						
<i>GAL1-DER1 Δusa1</i>	22	171						

TARGETING ZUM PROTEASOM

Ubx2p verbindet den Hrd1-Ligase-Komplex mit dem zytosolischen Cdc48/Npl4/Ufd1-Komplex, der im Anschluss zur Retrotranslokation gemeinsam mit seinen Interaktionspartnern Rad23p und Dsk2p sowie den Untereinheiten Rpn10p und Rpt5p des Proteasoms Ubiquitinkonjugate bindet und zum proteolytischen „core“ des Proteasoms transportieren kann (MEDICHERLA *ET AL.*, 2004; SCHUBERTH UND BUCHBERGER, 2005). Darüber hinaus besitzen auch die sechs nicht äquivalenten AAA-ATPasen des 19S regulatorischen Partikels des Proteasoms diese Aktivität. Für das nicht-ubiquitinierte ERAD Substrat p α -Faktor ist der regulatorische Partikel aufgrund seiner Fähigkeit, mit dem potentiellen Retrotranslokationskanal Sec61p zu interagieren, der einzige zytosolische Faktor, der für den ER-Export benötigt wird (ENENKEL *ET AL.*, 1998; KALIES *ET AL.*, 2005; LEE *ET AL.*, 2004B).

Keine der beschriebenen Komponenten der Eskortmaschinerie vom ER zum Proteasom zeigte jedoch eine stark veränderte Sensitivität gegenüber K28. Nach Applikation des Dimers wich der Hemmhof maximal 2 mm vom WT ab und im artifiziiellen System betrug die maximale Steigerung der Sensitivität bezüglich K28 α 36 % in einer $\Delta rad23$ -Deletionsmutante. Die Stämme $\Delta npl4$ sowie $\Delta dsk2$ zeigten lediglich eine geringfügige Abweichung von 25 % bzw. 27 % (TABELLE 13).

Tabelle 13: Übersicht zur K28-Sensitivität von Deletions(Δ)- bzw. „knock-down“ (DAmP)-Mutanten des ERAD-Pathways. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach p $\alpha\alpha$ -Expression [%]	Phänotyp nach p $\alpha\alpha$ -Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4741 (WT)	25	100						
<i>cdc48</i> DAmP	23	109						
BY4742 (WT)	22	100						
$\Delta ubx2$	23	107						
$\Delta npl4$	22	125						
$\Delta rad23$	23	136						
$\Delta dsk2$	22	127						

Somit wurde die Theorie bestätigt, dass das K28-Dimer unabhängig von ERAD-Komponenten transportiert wird (HEILIGENSTEIN, 2008). Im artifiziellen System hatten Mutationen des Erkennungs- und Ubiquitinierungsprozesses nach Expression des Letalkonstrukts jedoch zu einer erhöhten Sensitivität geführt und wiesen somit auf eine Beteiligung am Degradationsprozess hin. Der Transport von K28 α zum Degradationsort scheint hingegen vom klassischen ERAD-L-Pathway abzuweichen.

PROTEASOMALE DEGRADATION

Das Proteasom ist mit 33 Untereinheiten die Protease mit größter bekannter Komplexität und für den Abbau von Ubiquitin-Protein-Konjugaten verantwortlich (FINLEY, 2009). Es kann in den 19S regulatorischen Partikel (RP), der sich aus „lid“ und „base“ zusammensetzt sowie den 20S „core“-Partikel (CP) unterteilt werden (ABBILDUNG 14). Dabei dient RP der Erkennung der Substrate, die im Anschluss durch die proteolytische Aktivität des CPs degradiert werden.

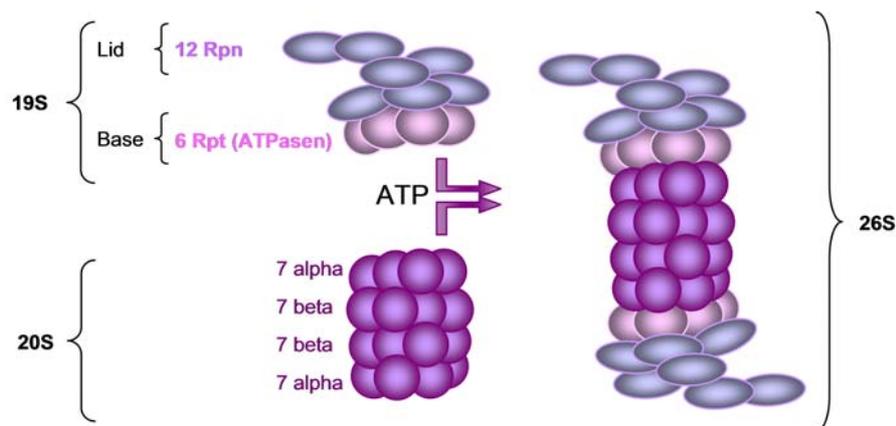


Abbildung 14: Schematische Darstellung des 26S-Proteasoms bestehend aus dem 20S „core“-Partikel (CP) sowie zwei 19S regulatorischen Partikeln (RP), die sich aus „lid“ und „base“ zusammensetzen. Der 19S regulatorische Partikel dient der Erkennung proteasomaler Substrate, die mittels proteolytischen Aktivität des CPs degradiert werden. Die ATPasen der „base“ unterstützen die obligate Entfaltung der Substrate.

Der Kanal, den Substrate beim Transport von RP zu CP passieren, kann sowohl in einem geöffneten als auch geschlossenen Zustand vorliegen. Globuläre Proteine müssen zunächst entfaltet werden, bevor sie diesen Kanal passieren können. Dieser aktive Prozess wird durch sechs AAA-ATPasen (Rpt1-6) des RPs vermittelt, die einen heteromeren Ringkomplex bilden (FINLEY *ET AL.*, 2012). Rpt2p, Rpt3p und Rpt5p sind darüber hinaus wichtig beim „gating“ des CPs und haben im Gegensatz zu Rpt6p und Rpt4p nur einen geringen Effekt auf die Assemblierung des Proteasoms (KUSMIERCZYK UND HOCHSTRASSER, 2008; SMITH *ET AL.*, 2007).

Rpt5p erfüllt zusätzlich eine Aufgabe während der Deubiquitinierung der Substrate sowie deren Transport zum CP (VERMA ET AL., 2004). Der Stamm *rpt2* DAmP zeigte im MBA-Test eine leicht verminderte Sensitivität (-3 mm), was eher auf eine Rolle in der Retrotranslokation als auf eine Bedeutung im Degradationsprozess hindeutet. Eine leichte Hypersensitivität nach Applikation des Dimers war nur in *rpt5* DAmP zu erkennen, wo sich ein um 3 mm vergrößerter Hemmhof ausbildete (TABELLE 14). Diese Hypersensitivität stellte sich nicht nach Applikation des K1-Toxins ein und scheint daher nicht auf eine generell reduzierte Vitalität des Stammes zurückzuführen zu sein (nicht dargestellt). Auch nach intrazellulärer Expression von K28 α war die Sensitivität um 48 % gesteigert. Einen deutlicheren Effekt zeigte nur *rpt3* DAmP, deren Sensitivität von 211 % verglichen mit dem WT mehr als doppelt so hoch war (TABELLE 14).

Daraus kann geschlossen werden, dass die Untereinheiten Rpt3p und Rpt5p des regulatorischen Partikels, wie beschrieben, auch im Fall von K28 und K28 α eine Rolle bei der Substraterkennung und/oder bei der Entfaltung vor dem Transport in den CP und bei dessen anschließender Aktivierung spielen. Generell können Veränderungen der Rpt's auch den Export verschiedener ERAD-Substrate und somit auch die Retrotranslokation von K28 beeinträchtigen. Somit konnte der genaue Punkt, an dem die Untereinheiten des Proteasoms einen Einfluss auf die Toxizität bzw. den Abbau von K28 nehmen, nicht mit Bestimmtheit erkannt werden.

Tabelle 14: Übersicht zur K28-Sensitivität von „knock-down“ (DAmP)-Mutanten proteasomaler Untereinheiten. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4741 (WT)	25	100						
<i>rpt1</i> DAmP	25	99						
<i>rpt2</i> DAmP	22	100						
<i>rpt3</i> DAmP	25	211						
<i>rpt5</i> DAmP	28	148						

Die Schlüsselfunktion des „lid“ ist die Deubiquitinierung der Substrate im Zuge ihrer Degradation, für die die Untereinheiten Rpn11p sowie Ubp6p verantwortlich sind (VERMA *ET AL.*, 2002; LEGGETT *ET AL.*, 2002). Während die Aktivität von Rpn11p vermutlich an die ATP-Hydrolyse der Rpt-Proteine der „base“ gekoppelt ist, arbeitet Ubp6p ATP-unabhängig. Auf diese Weise werden die Ubiquitinketten verkürzt noch bevor das Substrat vom Proteasom umgesetzt werden kann. Dieser Prozess beeinflusst außerdem das „gating“ des Substratkanals zum „core“-Partikel und verstärkt durch die erhöhte Proteasomaktivität den Abbau in der Proteinqualitätskontrolle (PETH *ET AL.*, 2009).

Die Deletionsmutante zeigte eine stark verminderte Sensitivität gegenüber K28 α , jedoch keinerlei Veränderung nach Applikation des Dimers, was auf eine Rolle der proteasomalen Untereinheit an der Degradation von K28 α hinweist (TABELLE 15).

Tabelle 15: Übersicht zur Sensitivität einer $\Delta ubp6$ -Deletionsmutante gegenüber K28. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach p α -Expression [%]	Phänotyp nach p α -Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4742 (WT)	22	100						
$\Delta ubp6$	21	42						

Durch den Verlust der Lysinreste konnte der Abbau von K28 α reduziert werden, was sich in einem verminderten Abbau und somit in einer erhöhten Sensitivität äußerte. Dieser Effekt konnte noch weiter auf 276 % gesteigert werden, wenn Rpt3p als essentielle Komponente der Degradation fehlte (TABELLE 16), was neben der Hypersensitivität von $\Delta hrd1$ nach Expression von K28 $\alpha\Delta lys$ impliziert, dass ein proteasomaler Abbau des Toxins stattfindet.

Tabelle 16: Übersicht zur Sensitivität einer *rpt3*-„knock-down“ (DAmP)-Mutante gegenüber K28 $\alpha\Delta lys$. Die Sensitivität wurde nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach p $\alpha\Delta lys$ -Expression [%]	Phänotyp nach p $\alpha\Delta lys$ -Expression					
		10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4741 (WT)	151						
<i>rpt3</i> DAmP	276						

Nicht alle Substrate des Proteasoms sind mit Ubiquitin modifiziert. In diesem Fall ersetzen andere Faktoren den regulatorischen Partikel am Zylinderende des CPs, öffnen den CP-Kanal und vermitteln die Degradation (FINLEY, 2009). Der am stärksten konservierte „CP-Aktivator“ ist Blm10p, da etwa 20% dieser Protease in Hefe als Hybridkomplex aus RP-CP-Blm10p vorliegen (SCHMIDT *ET AL.*, 2005). Solche Proteasom-Aktivatoren können meist kein Ubiquitin erkennen oder ATP hydrolysieren und stellen die Proteindegradation ausschließlich durch das Öffnen des CP-Kanals sicher. Sie katalysieren meist den Abbau von Proteinen, die nicht unbedingt in einem ATP abhängigen Schritt entfaltet werden müssen, weil sie sich entweder spontan entfalten oder bereits entfaltet sind (DANGE *ET AL.*, 2011). Da eine *BLM10*-Deletionsmutante ebenfalls einen hypersensitiven Phänotyp von 159 % zeigte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben dem regulatorischen Partikel auch der alternative CP-Aktivator Blm10p am Abbau des Toxins beteiligt ist. Im MBA-Test war dagegen keine Abweichung des Hemmhofdurchmessers zu erkennen (TABELLE 17).

Tabelle 17: Übersicht zur Sensitivität einer $\Delta blm10$ -Deletionsmutante gegenüber K28. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach p α -Expression [%]	Phänotyp nach p α -Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4742 (WT)	22	100						
$\Delta blm10$	21	159						

3.2.1 Beteiligung ER-luminaler Chaperone an der Retrotranslokation von K28

Chaperone im ER unterstützen entweder den Faltungsprozess einer naszierenden Polypeptidkette oder ihren proteasomalen Abbau (HAYES UND DICE, 1996; HÖHFELD *ET AL.*, 2001). Kar2p (BiP) wird neben seiner Funktion als treibende Kraft beim ER-Import (MATLACK *ET AL.*, 1999) eine Rolle in der ER-assoziierten-Degradation in Säugerzellen und Hefe zugeordnet, wo es mit exponierten hydrophoben Regionen von ERAD-Substraten wechselwirkt (SCHMITZ *ET AL.*, 1995) und sie auf diese Weise während der Retrotranslokation in einem gelösten Zustand halten kann (PLEMPER *ET AL.*, 1997; TSAI *ET AL.*, 2002). ERAD-Substrate der Hefe unterscheiden sich in der Notwendigkeit des ER-luminalen Hsp70-Chaperons BiP im Degradationsprozess. Lösliche Substrate wie CPY* und der mutierte α -Faktor werden abhängig von BiP abgebaut und sind in *kar2*-Mutanten stabilisiert (BRODSKY UND MCCRACKEN, 1999; PLEMPER *ET AL.*, 1997), wohingegen Transmembranproteine die Unterstützung dieses Chaperons nicht benötigen (MCCRACKEN UND BRODSKY, 1996). Der molekulare Mechanismus, an dem Kar2p bei der ER-assoziierten-Degradation beteiligt ist, ist allerdings noch unbekannt.

Ein „knock-down“ dieses Chaperons zeigte keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber dem Letalkonstrukt K28 α , was bedeutet, dass das Toxin weiterhin in ausreichender Effizienz sowohl in den sekretorischen Weg als auch in das Zytosol gelangt. Auch der ER-Export des Heterodimers war nicht beeinträchtigt (TABELLE 18). Daher scheint der restliche Kar2p-Gehalt des Stammes auszureichen, um den ER-Import zu unterstützen, so dass vermutlich auch die Funktion der ER-Dislokation durch den „knock-down“ nicht vermindert wird.

Generell hydrolysieren Hsp70-Chaperone ATP, wenn sie ein ungefaltetes Polypeptid binden. Dabei bleiben sie mit dem Peptid verbunden, bis DnaJ-ähnliche Proteine diesen Schritt katalysieren und Nukleotidaustauschfaktoren die Entlassung von ADP stimulieren (HARTL, 1996). Zu den DnaJ-ähnlichen stimulierenden Faktoren von Kar2p gehören Sec63p, Scj1p und Jem1p, während Sil1p und die ATPase Lhs1p als Nukleotidaustauschfaktoren fungieren (HALE *ET AL.*, 2010; NISHIKAWA UND ENDO, 1997; SCHLENSTEDT *ET AL.*, 1995). Vermutlich existieren zusätzliche Faktoren, die die Aktivität von Kar2p mit anderen spezifischen ER-Prozessen verbinden, da die Chaperonaktivität von Kar2p eng mit Pdi1p, Calnexin und der Prozessierung der Glykanketten verknüpft ist (NISHIKAWA *ET AL.*, 2001). Neben Kar2p spielt in Hefe auch das Hsp70-Protein Lhs1p eine wichtige Rolle bei der Faltung im ER (BRODSKY *ET AL.*, 1999), wodurch der ER-Import mancher Präpro-Proteine bei Deletion dieses Chaperons beeinträchtigt ist (SARIS *ET AL.*, 1997). Es ist allerdings nicht geklärt, ob es eine Rolle im ERAD-Prozess besitzt.

Eine Deletion von *SCJ1* bzw. *JEM1* führte zu einer leichten Hypersensitivität von 130 % ($\Delta scj1$) bzw. 148 % ($\Delta jem1$), was auf eine Beteiligung dieser DnaJ-ähnlichen Proteine am Degradationsprozess von K28 α hinweist. Im MBA-Test gegen das α/β -Heterodimer zeichnete sich dagegen keine Veränderung ab. Der Nukleotidaustauschfaktor Lhs1p zeigte eine stark verminderte Sensitivität gegenüber K28 α von 31 %. Hierbei war jedoch nicht zu unterscheiden, ob dieser Effekt auf einen beeinträchtigten Eintritt in den sekretorischen Weg oder einen reduzierten ER-Export zurückzuführen ist. Ein sekundärer Effekt durch den reduzierten Gehalt luminaler Proteine kann ausgeschlossen werden, da die Sensitivität gegenüber dem Heterodimer dem Wildtyp entsprach (TABELLE 18).

Da die Proteinsortierung und -prozessierung einen calciumabhängigen Mechanismus repräsentiert, führt die Deletion der Calciumpumpe Pmr1p zu einer Stabilisierung von CPY* (DURR ET AL., 1998). Obwohl der zelluläre Calciumgehalt durch das Fehlen der Pumpe erhöht ist und sich auf zahlreiche ER-Chaperone auswirkt, führt eine $\Delta pmr1$ Deletion nicht zu einer generellen Beeinträchtigung des ERAD-Pathways (CRONIN ET AL., 2000; DURR ET AL., 1998).

In $\Delta pmr1$ scheint es dennoch zu einer ineffizienten Retrotranslokation von K28 α zu kommen, da sich dieser Stamm mit einer Sensitivität von 13 % nahezu resistent gegenüber dem Letalkonstrukt verhält (TABELLE 18). Daher wirkt sich eine Veränderung der Calciumkonzentration vermutlich eher auf die Dislokation als auf die Degradation aus. Dies stimmt mit der Beobachtung früherer Arbeiten überein, in denen es zur Akkumulation des K28-Dimers im ER und somit zur Resistenz einer $\Delta pmr1$ -Deletionsmutante kam (HEILIGENSTEIN ET AL., 2006).

Tabelle 18: Übersicht zur K28-Sensitivität von Deletions(Δ)- bzw. „knock-down“ (DAmP)-Mutanten ER-luminaler Chaperone. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4742 (WT)	21	100						
Δ <i>lhs1</i>	22	31						
Δ <i>scj1</i>	20	130						
Δ <i>jem1</i>	21	148						
Δ <i>pmr1</i>	0	13						
BY4741 (WT)	25	100						
<i>kar2</i> DAmP	25	90						

Einige temperatursensitive *kar2*-Stämme sind profizient für den ER-Import, zeigen jedoch Defekte im ERAD-Prozess, was vermutlich auf eine unterschiedliche Rolle des Chaperons beim ER-Import und -Export zurückzuführen ist (BRODSKY UND MCCRACKEN, 1999). Die temperatursensitiven Mutanten *kar2-1* und *kar2-133* beeinträchtigen aufgrund ihrer Mutation in der Peptidbindedomäne (P515L bzw. T473F) auch die Chaperonfunktion von BiP (BRODSKY ET AL., 1999; SIMONS ET AL., 1995). Der ER-Import des ERAD-Modellsubstrats ppa-Faktor war in diesen Stämmen nicht verändert, wohingegen der Abbau sowohl bei permissiver (23°C) als auch restriktiver Temperatur (37°C) verzögert verlief. Vermutlich sind beide Kar2p-Varianten nicht mehr in der Lage, das fehlerhafte Protein zu entlassen und somit dessen effiziente Retrotranslokation zu gewährleisten oder sie beeinträchtigen das „gating“ des potentiellen Export-Kanals Sec61p (BRODSKY ET AL., 1999).

Bei semi-restriktiver Temperatur von 34°C verhielten sich beide Mutanten fast resistent gegenüber K28 α (*kar2-1* 34 %; *kar2-133* 31 %) und bildeten eine vollständige Resistenz gegenüber dem Dimer aus (TABELLE 19). Da im MBA-Test nur der direkte Einfluss von Kar2p auf die Retrotranslokation bzw. Degradation zum Tragen kommt, scheint die Resistenz der Mutanten entweder auf einen gesteigerten Abbau oder einen ineffektiven ER-Export zurückzuführen zu sein.

Die Funktion von BiP ist durch die beiden Punktmutationen jedoch bereits bei einer permissiven Temperatur von 25°C eingeschränkt, da die Sensitivität beider Stämme sowohl für K28 und K28 α reduziert war. *kar2-133* zeigte mit einem um 5 mm verkleinerten Hemmhof und einer um 36 % reduzierten Sensitivität gegenüber K28 α einen etwas stärkeren Effekt als *kar2-1*, dessen Hemmhofdurchmesser dem Wildtyp entsprach und eine Sensitivität von 64 % nach Expression von K28 α zur Folge hatte (TABELLE 19).

Tabelle 19: Übersicht zur Sensitivität zweier temperatursensitiver *kar2* Mutanten gegenüber K28. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bei permissiver (25°C) und semi-restriktiver Temperatur (34°C) bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach p α -Expression [%]	Phänotyp nach p α -Expression
25°C			10 ⁶ 10 ⁵ 10 ⁴ 10 ³ 10 ² 10 ¹
WT	23	100	
<i>kar2-1</i>	22	80	
<i>kar2-133</i>	18	64	
34°C			
WT	22	100	
<i>kar2-1</i>	0	34	
<i>kar2-133</i>	0	31	

3.2.2 Rolle der Proteindisulfid-Isomerase Pdi1p am Retrotranslokationsprozess von K28

Cystein-Reste einer in das ER translozierenden Polypeptidkette unterliegen Veränderungen des Redox-Milieus. Die Proteindisulfid-Isomerase Pdi1p ist dabei an zwei Reaktionen während der oxidativen Faltung beteiligt: Der Neusynthese von Disulfiden sowie der Reorganisation bestehender, fehlerhafter Disulfidbrücken, die sich höchstwahrscheinlich während des Faltungsprozesses ausbilden (NORGAARD *ET AL.*, 2001). Die Proteindisulfid-Isomerase ist darüber hinaus an der ER-Qualitätskontrolle sowie der Degradation fehlgefalteter Proteine beteiligt (NORGAARD *ET AL.*, 2001).

Die aktiven Zentren der Pdi1p (CGHC) sind in den beiden Thioredoxin-Domänen a und a' lokalisiert, werden von den beiden Strukturdomänen b und b' getrennt und sind alleine in der Lage, eine Disulfidbildung zu katalysieren (ABBILDUNG 15). Für die Isomeraseaktivität wird allerdings die Multidomänenstruktur benötigt (DARBY UND CREIGHTON, 1995). Die beiden Cysteine der aktiven Zentren können in reduziertem bzw. oxidiertem Zustand vorliegen, wobei sie in ihrer oxidierten Form eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden (NORGAARD *ET AL.*, 2001).

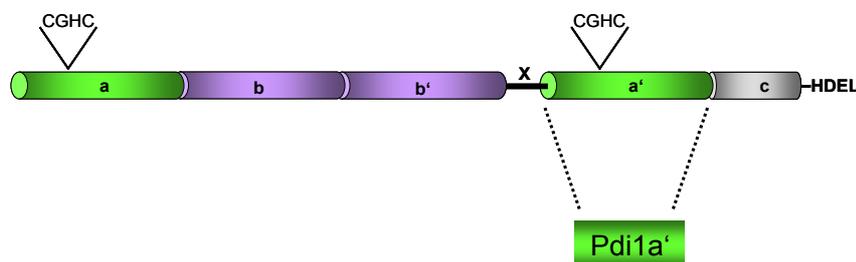


Abbildung 15: Schematische Struktur der Proteindisulfid-Isomerase Pdi1p. Die beiden katalytischen Untereinheiten a und a' enthalten jeweils ein aktives Zentrum mit zwei Cysteinresten (CGHC) und werden durch die strukturellen Domänen b und b' voneinander getrennt.

Somit kann die Pdi1p im Zuge der Oxidation eine intrazelluläre Disulfidbrücke auf zwei Sulfhydrylgruppen im Substrat übertragen bzw. während der Isomerisierungs-Reaktion eine gemischte Disulfidbrücke über den N-terminalen nukleophilen Cysteinrest ihres aktiven Zentrums mit dem Substrat ausbilden (DARBY UND CREIGHTON, 1995; HOLST *ET AL.*, 1997). Auf diese Weise destabilisiert der C-terminale Cysteinrest des aktiven Zentrums, reoxidiert durch Disulfidbildung und entlässt dabei das reduzierte Substrat, das im Anschluss durch Formierung einer alternativen Disulfidbrücke die Isomerisierungs-Reaktion abschließt (NOIVA, 1999). Daneben besitzt Pdi1p eine Chaperonaktivität, für welche die aktiven Zentren der a- und a'-Domäne jedoch keine essentielle Bedeutung besitzen (KOIVUNEN *ET AL.*, 1999).

Bisher konnte gezeigt werden, dass Pdi1p mit K28 interagiert und sich ein $\Delta pdi1$ Deletionsstamm (M4492) resistent gegenüber dem applizierten K28-Dimer verhält, wobei das Toxin im ER akkumuliert (HEILIGENSTEIN, 2008). Die Resistenz dieses Stammes konnte in der vorliegenden Arbeit reproduziert, jedoch nicht auf das artifizielle System übertragen werden, da die Mutante einen zu starken Wachstumsdefekt zeigte. Im Vergleich dazu konnte nach „knock-down“ von Pdi1p kein Einfluss auf die Sensitivität gegenüber K28 bzw. K28 α festgestellt werden. Daher ist anzunehmen, dass der restliche Pdi1p-Gehalt des Stammes ausreicht, um eine Retrotranslokation zu gewährleisten (TABELLE 20).

Tabelle 20: Übersicht zur Sensitivität einer Deletions(Δ)- bzw. „knock-down“ (DAmP)-Mutante der Proteindisulfid-Isomerase Pdi1p gegenüber K28. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt (n.a.= nicht auswertbar).

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach p α -Expression [%]	Phänotyp nach p α -Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
WT	20	100						
Δpdi M4492	0	na	n.a.					
BY4741 (WT)	25	100						
<i>pdi1</i> DAmP	25	122						

In vorherigen Untersuchungen wurde zudem postuliert, dass die Oxidaseaktivität der Pdi1p für den effizienten ER-Export von K28 nicht benötigt wird, da die Komplementation einer $\Delta pdi1$ Deletionsmutante mit PDI-CS-SS sowie PDI-SS-CS, die keine Oxidase sondern lediglich eine Isomeraseaktivität besitzen, zur Ausbildung einer wildtypischen Sensitivität führte (HEILIGENSTEIN, 2008). Cystein (C) und Serin (S) beschreiben hierbei die Cysteinreste der aktiven Zentren a und a'.

Darauf aufbauend sollte im Rahmen dieser Arbeit genauer eingegrenzt werden, welche Funktionen der Pdi1p für die Dislokation von K28 verantwortlich sind, um somit den Mechanismus dieses Schrittes besser nachzuvollziehen. Dazu wurde ein Stamm verwendet, der lediglich die PD1a'-Domäne exprimiert, die ausreicht, um das Überleben einer $\Delta pdi1$ Deletionsmutante zu gewährleisten (SOLOVYOV ET AL., 2004). Der Stamm PD11a' wurde durch Transformation der Mutante M4130 mit pESC-PD1a' sowie 5'FOA-Selektion erhalten.

Dieser besitzt eine unveränderte Oxidaseaktivität, weist jedoch lediglich 5 % der Isomeraseaktivität auf (XIAO ET AL., 2001), wodurch der ER-Export von Proteinen, die diese Funktion benötigen, um das Zweifache reduziert ist (XIAO ET AL., 2004). Durch zusätzliche Expression verschiedener *PDI*-Varianten sollte verfolgt werden, welche Funktionen des Proteins für die Dislokation von K28 verantwortlich sind. Da eine effiziente Oxidation durch Pdi1p, wie beschrieben, nur möglich ist, wenn beide Cysteine des aktiven Zentrums vorhanden sind, ist der CS-Typ nicht mehr in der Lage, das Substrat zu oxidieren, kann jedoch weiterhin Isomerisierungs-Reaktionen katalysieren.

Die Aktivität der α - bzw. α' -Domäne scheint zur Toxizität von K28 beizutragen, da sowohl nach Komplementation mit *PDI* CC-SS sowie *PDI* SS-CC die WT-Sensitivität wieder hergestellt werden konnte. Verglichen wurde die Sensitivität nach Expression der wildtypischen Form *PDI* CC-CC, in der alle Cystein-Reste der beiden aktiven Zentren intakt sind mit der Sensitivität nach Expression von *PDI* CS-CS, die ebenfalls die Isomeraseaktivität beider Domänen sicherstellte. Wird anhand des Hemmhofdurchmessers auf die K28-Sensitivität geschlossen und diese nach Expression der endogenen Variante *PDI* CC-CC auf 100 % gesetzt, so ergab sich für die Stämme *PDI* CC-SS eine Sensitivität von 84 % und für *PDI* SS-CC von 96 % (ABBILDUNG 16). Verbleibt nur der N-terminale Cysteinrest des jeweiligen aktiven Zentrums, der die Isomerisierung vermittelt, so zeigte sich, dass der Aktivitätsverlust der α -Domäne im Stamm *PDI* CS-SS zur Resistenz gegen K28 führte, wohingegen im Stamm *PDI* SS-CS eine fast wildtypische Sensitivität von 86 % erreicht werden konnte. Die Pdi1p-Variante SS-SS war nicht in der Lage, die Resistenz des Stammes *PDI* α' wiederherzustellen, wonach ausgeschlossen wurde, dass K28 lediglich die Chaperonaktivität des luminalen Proteins für die Retrotranslokation benötigt (ABBILDUNG 16). Die Sensitivität korrelierte eindeutig mit der Entlassung der α -Untereinheit aus dem Dimer und war in den resistenten Stämmen nicht mehr nachzuweisen. Dazu wurden Zellen der entsprechenden Stämme sphäroplastiert, für 2 h mit 1 ml Toxinkonzentrat inkubiert, homogenisiert und die lösliche Fraktion ü.N in 10 % TCA gefällt. Anhand des immunologischen Nachweises mittels anti-K28 α ist anzunehmen, dass die Isomerase-Funktion der Pdi1p einen wichtigen Schritt in der Retrotranslokation des K28-Dimers katalysiert, der dazu führt, dass das Toxin das ER verlassen kann. Da sich die jeweiligen Stämme je nach Expression der Pdi1p Variante sehr stark in ihrem Wachstum unterschieden, stellten sie kein geeignetes Testsystem dar, um die Toxinwirkung von K28 α nach intrazellulärer Expression zu untersuchen.

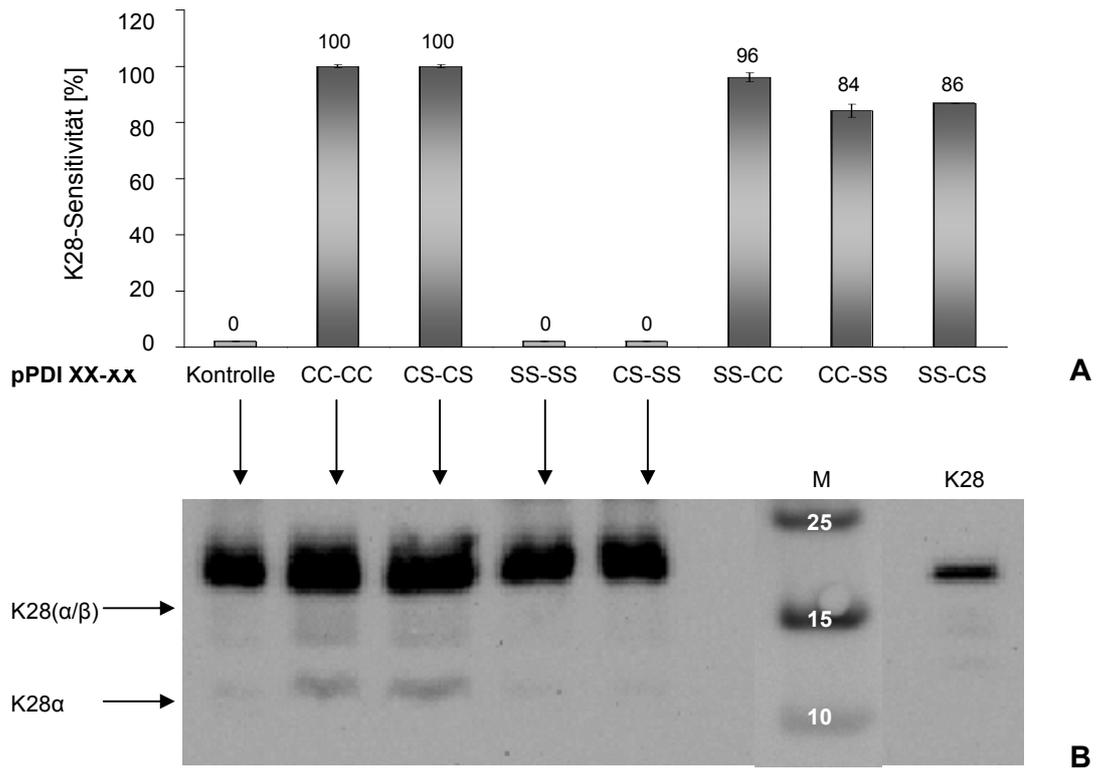


Abbildung 16: **A:** Sensitivität des Stammes PD1a' nach Komplementation mit den angegebenen Pdi1p-Varianten. Der Hemmhof im MBA-Test s nach Applikation des K28-Dimers wurde mit der Sensitivität nach Komplementation mit PDI CC-CC (100 %) verglichen. **B:** 1×10^9 Zellen der jeweiligen Stämme wurden sphäroplastiert, für 2 h mit 1 ml Toxinkonzentrat inkubiert und homogenisiert. Anschließend wurde die lösliche Fraktion gefällt und die Dissoziation des Toxins immunologisch mittels anti-K28α nachgewiesen.

3.3 Funktion des Translokons Sec61p während der Dislokation von K28

Der Sec61-Komplex setzt sich aus den drei Untereinheiten Sec61p, Sss1p und Sbh1p zusammen. Während des ER-Imports sekretorischer Proteine formt dieser Komplex das Translokon mit dynamischer Struktur, wobei der gebildete Porendurchmesser von 9-60 Å variieren kann. Durch Variation der jeweils assoziierten Proteine, wird die Permeabilität von Sec61p beispielsweise durch das luminal Chaperon BiP und das zu transportierende Substrat selbst reguliert. Für den post-translationalen Import wird außerdem der Sec63-Komplex (Sec63p, Sec62p, Sec71p, Sec72p) benötigt.

Einige Studien weisen darauf hin, dass der Sec61-Komplex ebenfalls am ER-Export von fehlgefalteten Proteinen beteiligt ist, da die Variabilität des Porendurchmessers die Translokation von gefalteten und glykosylierten Proteinen zulassen könnte (TIROSH *ET AL.*, 2003). Da bereits verschiedene Mutationen dieses essentiellen Proteins generiert werden konnten, war es möglich, allgemeine Interaktionseigenschaften zu beeinflussen sowie den Sec61p-Gehalt zu reduzieren oder Defekte in der Retrotranslokation von Membranproteinen bis hin zu einem generellen Defizit im ER-Export zu erzielen. Die Auswertung fällt allerdings schwer, da Mutationen in *SEC61* pleiotrope Auswirkungen auf die Proteinzusammensetzung im ER und dessen Funktion haben können (PLEMPER *ET AL.*, 1997). Die Effekte verschiedener *sec61* Mutanten auf ERAD variieren und reichen von einem leichten Defekt bis zu einer fast vollständig blockierten Retrotranslokation (PILON *ET AL.*, 1997). In der Regel korrelieren dabei Defekte im Im- und Export (WILKINSON *ET AL.*, 2000), wobei der Abbau vieler Transmembransubstrate weniger abhängig von Sec61p zu sein scheint (HUYER *ET AL.*, 2004). Sec61p ist ein integrales Membranprotein, das die ER-Membran zehn Mal durchspannt. ABBILDUNG 17 gibt Aufschluss über die Lokalisation der Punktmutationen des Translokons, die im Hinblick auf eine veränderte Retrotranslokation von K28 untersucht wurden.

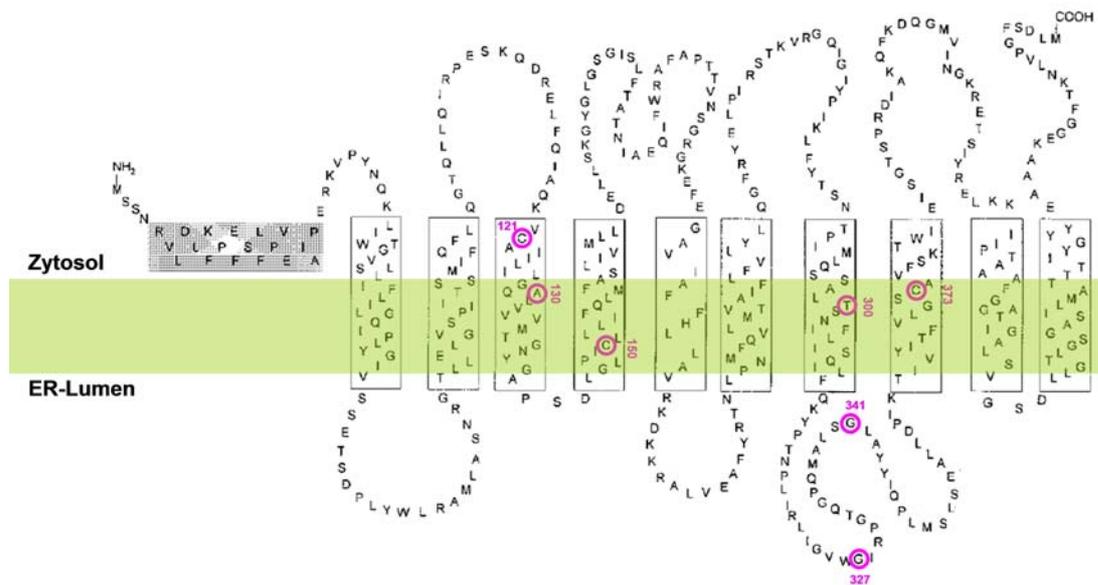


Abbildung 17: Topologie des Translokons Sec61p. Die Lokalisation der Mutationen, die im Hinblick auf die Sensitivität gegenüber K28 untersucht wurden, ist farblich hervorgehoben (VERÄNDERT NACH WILKINSON *ET AL.*, 1997).

3.3.1 „knock-down“ von Sec61p

Ein „knock-down“ des potentiellen ER-Export-Kanals Sec61p sollte bei Beteiligung an der Toxin-Retrotranslokation zu einer verringerten Sensitivität gegen K28 führen, da das Toxin somit nicht mehr in der Lage ist, mit der gleichen Effizienz sein „target“ zu erreichen. Nach intrazellulärer Expression von K28 α ist bei einem reduzierten Sec61p-Gehalt der Zelle auch der ER-Import beeinträchtigt, wodurch keine eindeutige Aussage über eine alternative Rolle des Translokons am ER-Export-Komplex möglich ist.

Der Stamm *sec61-DAmP* zeigte nur einen leichten Sensitivitätsverlust von 12 % gegenüber K28 α , was zwar auf einen weitgehend unbeeinträchtigten sekretorischen Weg nach „knock-down“ des Kanals hinweist, jedoch keine Aussage über die Beteiligung von Sec61p an der Retrotranslokation von K28 α zulässt. Auch die Sekretion des Toxinvorläufers (ppto α) war in einer *sec61-DAmP* Mutante vergleichbar mit dem WT, da das Wachstum eines eingebetteten sensitiven Hefestamms im MBA-Test mit gleicher Effizienz inhibiert werden konnte (nicht dargestellt).

Nach Applikation des K28-Dimers kam es zu einer deutlichen Reduktion der Sensitivität, die sich in einem um 5 mm verringerten Hemmhof im Vergleich zum WT äußerte (TABELLE 21). Die Wirkung des ionophoren Killertoxins K1 auf *sec61*-DAmP war verglichen mit dem Wildtyp unverändert, was ausschließt, dass es durch eine veränderte Sekretionsrate verschiedener Zelloberflächenproteine zu einer verminderten Aufnahme von K28 kam (nicht dargestellt). Um genauer einschätzen zu können, welche Eigenschaft von Sec61p für den ER-Export von K28 benötigt wird, sollte die verantwortliche Funktion des potentiellen Retrotranslokationskanals weiter eingegrenzt werden.

Tabelle 21: Übersicht zur K28-Sensitivität einer „knock-down“ (DAmP)-Mutante des Translokons und potentiellen ER-Exportkanals Sec61p. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4741 (WT)	25	100						
<i>sec61</i> DAmP	20	88						

3.3.2 Funktion der Cysteinreste des Translokons

Da die Isomeraseaktivität der Pdi1p eine wichtige Voraussetzung für die Toxizität von K28 darstellt (3.2.2), kann davon ausgegangen werden, dass eine Umlagerung der Disulfidbrücke einen essentiellen Schritt im ER-Export vermittelt. Ein Grund hierfür besteht in der Option, dass der Cysteinrest des Toxins, der vor Umlagerung an der Bildung der Disulfidbrücke beteiligt ist, für den Retrotranslokationsprozess benötigt wird, um möglicherweise mit Sec61p zu interagieren. Es wurde gezeigt, dass die zytoplasmatische Domäne eines kurzlebigen ERAD-M-Substrats während seiner Degradation zur Glykosylierung im ER-Lumen exponiert und anschließend abgebaut wird (SCOTT UND SCHEKMAN, 2008). Die Verknüpfung mit Glykanen am N-Terminus des Substrates wird durch die Mutation eines spezifischen Cysteinrestes von Sec61p und des Substrats verhindert. Demnach formt das Substrat einen Disulfid-Komplex mit Sec61p, um die Exposition des N-Terminus im ER-Lumen zu stabilisieren. In der Mutante *sec61 C373I* erfolgte der Abbau fast doppelt so schnell wie im WT.

Die Punktmutationen C121G sowie C150V hatten dagegen keinen Einfluss auf die Degradationskinetik des Membransubstrates. Darauf aufbauend wurde auch der Umsatz von CPY*, einem löslichen ERAD-Substrat in den drei Cysteinmutanten untersucht und festgestellt, dass es nur in *sec61 C373I* zu einer geringen Stabilisierung des Substrats kam. Um die neu generierten Mutanten weiter zu charakterisieren, wurde ihre Translokationskompetenz untersucht, wobei alle Cystein-Mutanten ein normales ER-Importverhalten zeigten.

In *sec61 C373I* kam es jedoch zu keiner erkennbaren Veränderung der Sensitivität gegenüber K28 bzw. K28 α . Auch der Hemmhofdurchmesser des Stammes *sec61 C121G* wich nach Applikation des Dimers nicht vom Wildtyp ab. Jedoch war der Wachstumsdefekt dieser Mutante zu groß, um bereits über einen Zeitraum von 24 h eine Aussage über einen veränderten Effekt gegenüber K28 α treffen zu können, was sich auch im seriellen Verdünnungstest widerspiegelte. Lediglich in der *sec61 C150V* Mutante kam es nach Expression des Letalkonstrukts zu einer verminderten Sensitivität von 67 % (TABELLE 22). Dieser Effekt kann entgegen der beschriebenen ER-Import-Kompetenz dennoch auf eine beeinträchtigte Translokation in das ER zurückzuführen sein oder auf einem ineffektiven ER-Export oder einer verstärkten Degradation durch ERAD beruhen.

Tabelle 22: Übersicht zur Sensitivität verschiedener Mutanten des Translokons sowie des potentiellen ER-Exportkanals Sec61p gegenüber K28. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt (n.a.= nicht auswertbar).

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach pp α -Expression [%]	Phänotyp nach pp α -Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
WT	22	100						
<i>sec61 C373I</i>	23	101						
<i>sec61 C150V</i>	23	67						
<i>sec61 C121G</i>	22	n.a.	n.a.					

3.3.2.1 K28-Phänotyp von *sec61* Mutanten mit Defekten in der Retrotranslokation

In einem Screen konnten Mutanten in *SEC61* identifiziert werden (*sec61-R1* bis *sec61-R4*), die durch Substitution einer Aminosäure nur eine Richtung des Transports beeinflussen und somit neben einer normalen Importkinetik einen Defekt in der Retrotranslokation eines fehlgefalteten Transmembranproteins aufweisen (ZHOU UND SCHEKMAN, 1999). Untersucht wurden Eigenschaften der Stämme anhand der Akkumulation klassischer ERAD-Substrate wie des mutierten α -Faktors. Dieser war in „Pulse-Chase“-Experimenten in allen vier Mutanten stabilisiert. Voraussetzung für den Transport über Sec61p ist neben dem Öffnen des Kanals, die Dissoziation von BiP, die eindeutig für Translokation bzw. Dislokation signalisiert werden muss. *sec61-R1* sowie *sec61-R2* könnten dieses luminaire „triggering“ beeinflussen. *Sec61-R3* zeigt einen leichten Importdefekt und infolgedessen auch einen verminderten Sec61p-Gehalt. Solche Mutationen, die beide Transportrichtungen beeinflussen, sind vermutlich Teil der Verankerungsstelle von BiP oder wirken sich auf generelle Eigenschaften der Kanalfunktion bzw. -stabilität aus. *sec61-R4* trägt eine Mutation in der dritten Transmembrandomäne, die als Verankerungsstelle für andere Komponenten der Retrotranslokation dient oder eine Stelle definiert, die für die Sortierung von zu exportierenden Proteinen benötigt wird.

Die beiden Mutanten *sec61-R1* und *sec61-R2* hatten keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber dem K28-Dimer. Im artifiziellen System zeichnete sich dagegen ein sehr starker Effekt ab, der im Stamm *sec61-R1* zu einer fast vollständigen Resistenz gegenüber K28 α führte und im Falle von *sec61-R2* nur noch ein Drittel der Sensitivität zeigte. Da beschrieben ist, dass beide Mutanten keinen ER-Import-Defekt aufweisen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass *sec61-R1* und *sec61-R2* Auswirkungen auf die Effizienz des ER-Exports von K28 α , jedoch keinen Einfluss auf die Retrotranslokation des reifen Toxins haben. *Sec61-R3* verhielt sich bereits in vorangegangenen Untersuchungen vermindert sensitiv (HEILIGENSTEIN, 2008). Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden und wurde auch im Stamm *sec61-R4* beobachtet, wobei die Stämme bei einer 1:20 Verdünnung des Toxins vollständig resistent waren (nicht dargestellt). Die starke Hypersensitivität von 474 % gegenüber K28 α kann ebenfalls auf einem verminderten Gehalt an luminalen Proteinen beruhen, die normalerweise für den Abbau der α -Untereinheit verantwortlich sind. Darüberhinaus könnte, genau wie im Stamm *sec61 R4* (357 %), die Interaktion des Translokons mit weiteren Komponenten des Degradationspathways beeinträchtigt sein, wobei die Hypersensitivität auf einem ineffektiven Abbau der α -Untereinheit beruhen würde (TABELLE 23).

Tabelle 23: Übersicht zur K28-Sensitivität verschiedener Mutanten des Translokons und potentiellen ER-Exportkanals Sec61p. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt. Eckige Klammern weisen auf leichtes Wachstum im gebildeten Hemmhof hin.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
WT	18	100						
<i>sec61-R1</i> (T300I)	17	6						
<i>sec61-R2</i> (G327D)	19	33						
<i>sec61-R3</i> (G341E)	[16]	474						
<i>sec61-R4</i> (A130V)	[17]	357						

3.3.3 Interaktion von K28 mit Sec61p

3.3.3.1 Co-Immünpräzipitation von Sec61p-13 c-myc nach Toxininkubation

Da die Mutanten *sec61-R3*, *sec61-R4* sowie *sec61* DAmP erste Hinweise auf eine Beteiligung von Sec61p an der Retrotranslokation des K28-Dimers zeigten, sollte auch ein biochemischer Nachweis für eine Interaktion zwischen Toxin und Translokon erbracht werden. Für die Co-Immünpräzipitation wurde ein Stamm verwendet, der ein Fusionsprotein bestehend aus Sec61p mit 13 c-myc-„tags“ exprimiert (CARVALHO ET AL., 2010). In einem MBA-Test wurde zunächst sichergestellt, dass dieser Stamm bezüglich seiner Sensitivität gegenüber K28 nicht vom WT abwich (nicht dargestellt). Zum Interaktionsnachweis wurde eine 100 ml Kultur sphäroplastiert, mit 2 ml Toxin in einem Endvolumen von 10 ml Inkubationspuffer für 3 h inkubiert und anschließend homogenisiert. Dem Lysat wurde Digitonin zugesetzt, um den gesamten Sec61-Komplex aus der ER-Membran herauszulösen. Nach Trennung der Membranfraktion wurde Sec61p-13 c-myc aus der löslichen Fraktion über spezifische Antikörper an Protein A-Sepharose-„beads“ gebunden und mittels Western-Analyse eine Interaktion des Translokons mit K28 untersucht. Wie ABBILDUNG 18 zeigt, konnte Sec61p-13 c-myc präzipitiert werden und auch weiterhin mit seinem natürlichen Bindungspartner Sbh1p interagieren. Es wurde jedoch kein Signal für K28 detektiert, wodurch eine Interaktion des Translokons mit K28 auf diesem Wege nicht gezeigt werden konnte.

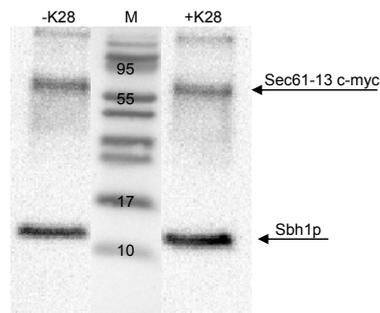


Abbildung 18: Co-Immünpräzipitation von Sec61-13 c-myc mit K28. 1×10^9 Zellen des entsprechenden Hefestammes wurden sphäroplastiert, mit Toxinkonzentrat inkubiert, homogenisiert und mit Digitonin behandelt. Die lösliche Fraktion wurde mit Hilfe von anti-c-myc präzipitiert und zum Nachweis des Sec61-Komplex mit anti-Sbh1 behandelt. K28 wurde mittels anti-K28 α immunologisch nachgewiesen.

Es ist möglich, dass der Sec61p-Gehalt, der das Toxin zum Zeitpunkt der Zellyse transportiert, zu gering ist, um immunologisch nachgewiesen werden zu können. Daher wurden in einem weiteren Ansatz Zellen vor der Inkubation mit K28 aufgeschlossen und erst im weiteren Verlauf mit Toxinkonzentrat ü.N inkubiert. Auch hier konnte der Sec61-Komplex präzipitiert und die Interaktion der Untereinheiten aufrechterhalten werden. Allerdings zeigten sich auch in diesem *in vitro* Versuch nach Elution keine Signale, die auf eine Interaktion von Sec61p und dem K28-Dimer schließen ließen (ABBILDUNG 19).

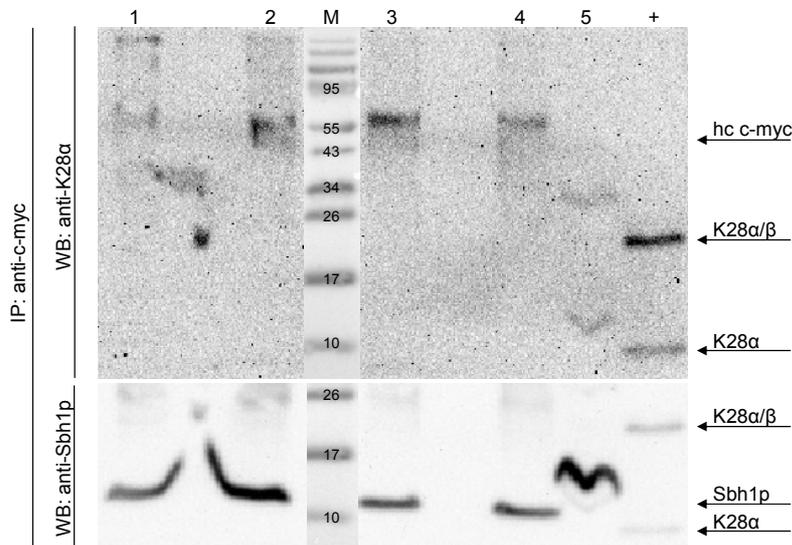


Abbildung 19: *In vitro* Untersuchungen zur Bindung von K28 an Sec61p. Dazu wurde homogenisiertes und digitonisiertes Zellysat aus 1×10^9 Zellen des Stammes Sec61-13 c-myc mit Toxinkonzentrat versetzt, mittels anti-c-myc präzipitiert und mit anti-K28 α sowie anti-Sbh1 immunologisch untersucht. Alternativ wurde der Sec61-Komplex zunächst über anti-c-myc präzipitiert und anschließend mit Toxinkonzentrat inkubiert. Der immunologische Nachweis verlief analog.

- 1= Zellysat nach Behandlung mit Digitonin und Toxinkonzentrat
- 2= Zellysat nach Behandlung mit Digitonin
- 3= IP des unbehandelten Zellysats und anschließender Inkubation mit 100 μ l Toxinkonzentrat und 900 μ l McIlvaine-Puffer
- 4= IP des unbehandelten Zellysats und anschließender Inkubation mit 1000 μ l McIlvaine-Puffer
- 5= Toxinkonzentrat mit Digitonin (Inkubation über Nacht bei 4°C)
- + = Toxinkonzentrat

3.3.3.2 Interaktionsnachweis von Sec61p und K28 mittels Split-Ubiquitin-System (SUS)

Das Split-Ubiquitin System (SUS) ist eine etablierte Methode, um Protein-Protein-Wechselwirkungen in Hefe *in vivo* zu untersuchen. Fänger und Beuteprotein werden hierbei mit dem N-Terminus (Nub; AS 1-37) bzw. C-Terminus (Cub; AS 35-76) von Ubiquitin verbunden, wobei Cub durch den Transkriptionsfaktor PLV ergänzt wird (CUB-PLV, kurz CPLV). Interagieren die Testproteine, gelangen auch die Ubiquitin-Fragmente in räumliche Nähe und bilden ein intaktes Molekül, das durch Spaltung einer spezifischen Protease den fusionierten Transkriptionsfaktor entlässt und somit die Voraussetzung zur Initiation der Transkription des Reportergens *lacZ* schafft. Zusätzlich verhindert eine Punktmutation in (NubG) die spontane Assoziation der Ubiquitinmoleküle im Zytosol (STAGLJAR *ET AL.*, 1998).

Um eine Interaktion von K28 mit dem potentiellen Retrotranslokationskanal Sec61p zu untersuchen, wurde ein diploider Hefestamm verwendet, der sowohl eine wildtypische Kopie von Sec61p exprimiert als auch eine Variante mit CPLV-„tag“ (Sec61p/Sec61p-CPLV). Nach Applikation von K28-NubG sollte die Hefe auf Blaufärbung und damit auf Expression des *lacZ* Reporters untersucht werden (ABBILDUNG 20).

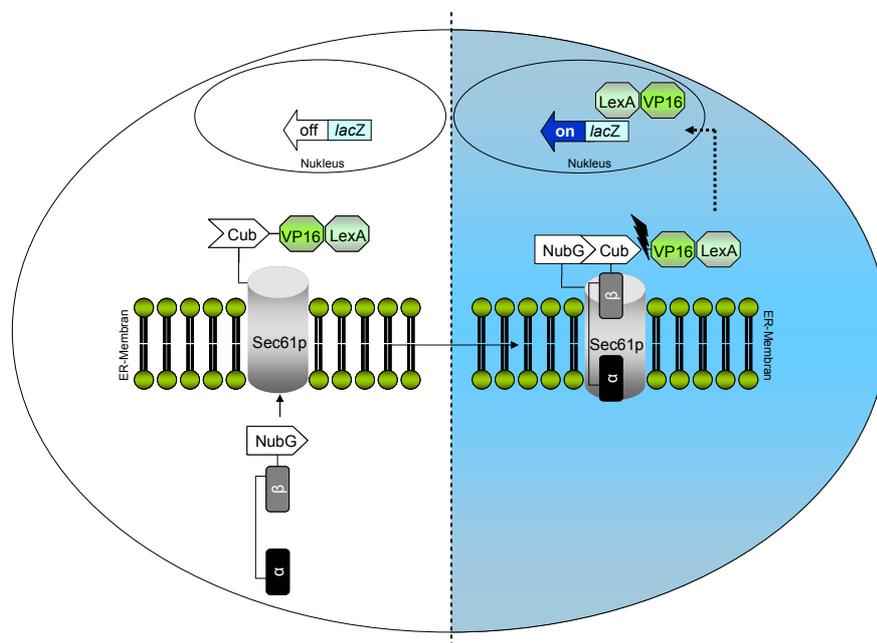


Abbildung 20: Schematische Darstellung des Interaktionsnachweises von K28 mit Sec61p mittels Split-Ubiquitin-System. Sec61p wurde mit dem C-Terminus von Ubiquitin (Cub) sowie dem Transkriptionsfaktor PLV fusioniert, K28 wurde mit dem N-Terminus von Ubiquitin (NubG) verbunden (links). Kommt es zu einer Interaktion zwischen K28 und Sec61p, kann durch die räumliche Nähe ein intaktes Ubiquitinmolekül ausgebildet werden, das von einer spezifischen Protease abgespalten wird. Auf diese Weise diffundiert der entlassene Transkriptionsfaktor PLV in den Nukleus und induziert die Expression des *lacZ*-Gens, woraufhin sich die entsprechenden Zellen auf X-Gal-haltigem Agar blau färben.

Obwohl Sec61p-CPLV weiterhin mit einigen seiner natürlichen Interaktionspartner wie Sss1p und Sbh1p interagieren kann und ein wildtypisches Importverhalten zeigt, war mit anderen Komponenten wie Sec62p und Sec63p über SUS keine Wechselwirkung mehr nachzuweisen. Daher galt es zunächst zu untersuchen, ob sich Sec61p-CPLV weiterhin in der Membranfraktion der Zelle befindet oder ob der Funktionsverlust der „getaggt“ Variante eventuell auf eine Fehllokalisierung des Kanals zurückzuführen ist. Daher wurde der diploide Stamm Sec61p/Sec61p-CPLV sphäroplastierte, homogenisiert und durch differenzielle Zentrifugation wurden Zelltrümmer, Membranfraktion sowie lösliche Fraktion voneinander getrennt. Aus dem immunologischen Nachweis mittels anti-CPLV in ABBILDUNG 21 geht hervor, dass das Translokon weiterhin in die Membran inseriert bzw. mit ihr assoziiert vorliegt und somit zum Interaktionsnachweis mit K28 herangezogen werden konnte.

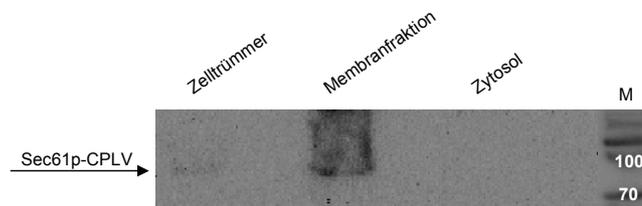


Abbildung 21: Immunologischer Nachweis der Lokalisation von Sec61p-CPLV. Der diploide Stamm Sec61p/Sec61p-CPLV (1×10^9 Zellen) wurde sphäroplastierte, homogenisiert und durch differenzielle Zentrifugation wurden die dargestellten Fraktionen (Zelltrümmer, Membranfraktion und Zytosol) voneinander getrennt und mit anti-CPLV entwickelt.

Im weiteren Verlauf musste sichergestellt werden, dass K28 α nach Fusion mit NubG weiterhin seine biologische Aktivität behält. TABELLE 24 zeigt, dass es sowohl nach N-terminaler als auch C-terminaler Fusion der K28 α -Untereinheit zu einem vollständigen Toxizitätsverlust kam. Zur Fusion von NubG mit dem C-Terminus von K28 α wurde der Argininrest durch Alanin ersetzt, um die Kex2p-Erkennungsstelle des Toxins zu modifizieren und somit ein Abspalten des „tags“ auf dem Sekretionsweg zu verhindern.

Tabelle 24: Serieller Verdünnungstest des Stammes BY4742 nach Transformation mit pYES-ppaR149A-NubG bzw. pYES-ppNubG- α unter induzierenden Bedingungen

Stamm	Phänotyp nach ppaR149A-NubG Expression						Phänotyp nach ppNubG- α Expression					
	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1
BY4742												

Die Ligation des K28-Dimers mit dem N-Terminus von Ubiquitin erzielte hingegen in BY4742 (WT) als auch in der diploiden Sec61p/Sec61p-CPLV Mutante den gleichen toxischen Effekt wie das Wildtyp-Toxin und konnte somit auf eine Interaktion mit Sec61p im Zuge der Retrotranslokation getestet werden (TABELLE 25).

Tabelle 25: MBA-Test des Stammes BY4742 zum Aktivitätsnachweis des „getaggten“ Toxins K28-NubG sowie zur Bestimmung der Sensitivität des Stammes Sec61p/Sec61p-CPLV gegenüber K28.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach K28-NubG Applikation [mm]
BY4742 (WT)	22	22
Sec61p/Sec61p-CPLV	21	22

Als Positivkontrolle diente die Interaktion von Sec61p mit Ost1p, einer Untereinheit des Oligosaccharyl-Transferase (Ost)-Komplexes, der während des ER-Imports an der Glykosylierung von Polypeptiden beteiligt ist (Sec61p/Sec61p-CPLV pOST1-NubG). In einer zusätzlichen Kontrolle sollte die Interaktion von Ost1p mit Wbp1p, einer weiteren Komponente des Ost-Komplexes (Wbp1p-CPLV pOST1-NubG) sichergestellt werden (ABBILDUNG 22).

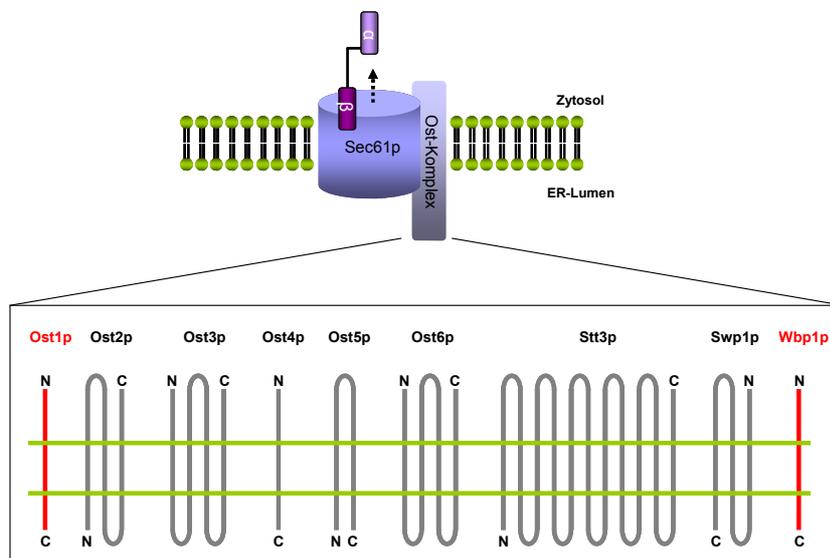


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Untereinheiten des Ost-Komplexes, die zur Positivkontrolle des Split-Ubiquitinsystems eingesetzt wurden. Untersucht wurde die Interaktion von Sec61p mit Ost1p sowie der Untereinheiten Ost1p und Wbp1p.

Die jeweiligen Teststämme wurden je nach Versuchsansatz mit dem „getaggt“ Toxin für 4 h inkubiert und auf X-Gal-haltigen Agar aufgetropft. ABBILDUNG 23 zeigt eine Blaufärbung des Stammes Wbp1p-CPLV nach Expression von Ost1p-NubG. Dieser colorimetrische Nachweis der Interaktion zweier Untereinheiten des OST-Komplexes mittels SUS stellte sicher, dass Ost1p nach Fusion mit NubG weiterhin in der Lage ist, mit seinen natürlichen Partnerproteinen zu interagieren. Da Ost1p ebenfalls mit Sec61p interagiert, wurde der diploide Teststamm Sec61p/Sec61p-CPLV mit pOST1p-NubG transformiert, was auf X-Gal haltigem Agar jedoch nicht zu einer Blaufärbung der Kolonie führte. Obwohl davon ausgegangen werden muss, dass Sec61p-CPLV nicht mehr mit allen natürlichen Interaktionspartnern interagieren kann, wurde der Stamm mit K28-NubG inkubiert und auf X-Gal-Agar aufgetropft, wobei sich ebenfalls keine Färbung einstellte (ABBILDUNG 23). Eine Interaktion von K28 mit seinem potentiellen Retrotranslokationskanal Sec61p konnte somit mittels Split-Ubiquitin System nicht nachgewiesen werden.

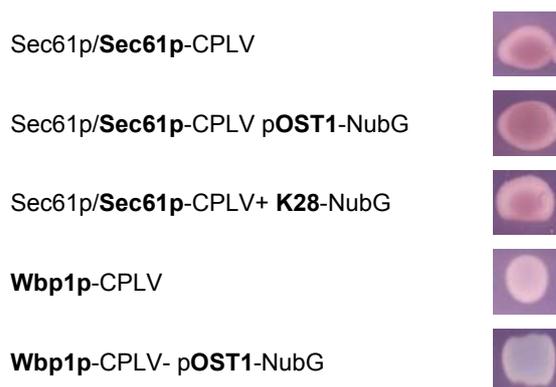


Abbildung 23: Interaktionsnachweis von K28 mit Sec61p mittels Split-Ubiquitin-System. Sec61p wurde mit dem C-Terminus von Ubiquitin (Cub) sowie dem Transkriptionsfaktor PLV fusioniert, K28 wurde mit dem N-Terminus von Ubiquitin (NubG) verbunden. Eine Blaufärbung der Zellen auf X-Gal-haltigem Selektionsagar weist auf eine Interaktion der getesteten Komponenten hin. Als Positivkontrolle diente die Interaktion von Sec61p mit Ost1p (Sec61p/Sec61p-CPLV pOST1-NubG) sowie der Untereinheiten des OST-Komplexes Wbp1p und Ost1p (Wbp1p-CPLV-pOST1-NubG). Die Zellen (5×10^7) wurden mit 200 μ l Toxinkonzentrat für 4 h bei 20°C inkubiert, 1×10^6 Zellen wurden auf X-Gal-haltigen Agar aufgetropft und für 3d bei 20°C belassen.

3.4 Zusammenhang der „unfolded protein response“ (UPR) mit der Retrotranslokation von K28

Es wurde bereits gezeigt, dass K28 α vermutlich analog zu fehlgefalteten Proteinen von ERAD-Komponenten erkannt wird (3.2). Auch das K28-Dimer wurde nach Überexpression von Hrd1p verstärkt umgesetzt. Aufgrund des mechanistischen Zusammenhangs von ER-Export, ERAD und ER-Stress sollte der Einfluss des Toxins auf die Stresskontrolle in Hefe untersucht werden. Die Faltungs- und Synthesemaschinerie im ER wird allgemein durch die „unfolded protein response“, einem Programm zur Transkriptionskontrolle, kontrolliert (ABBILDUNG 24). Unter physiologischen Bedingungen interagiert die luminaire Domäne von Ire1p, einem ER Transmembranprotein mit zytosolischer Kinase/Ribonuklease Domäne, mit Kar2p. Akkumulieren fehlgefaltete Proteine im ER, bindet Kar2p verstärkt an diese Polypeptide, wodurch Ire1p oligomerisiert und als Kinase/Ribonuklease aktiv wird. Mit Hilfe der Ribonukleaseaktivität wird ein Intron aus der *HAC1*-mRNA entfernt, wodurch der Transkriptionsfaktor Hac1p translatiert und in den Kern transportiert werden kann. Dort bindet er an UPR-Elemente der Promotorregion von UPR-„target“-Genen (*COX* UND WALTER, 1996). Zu diesen „target“-Genen gehören unter anderem *JEM1*, *LHS1*, *SCJ1*, *ERO1*, *PDI1* sowie viele weitere Gene, die an Translokation, Glykosylierung, ERAD, Lipidsynthese oder Vesikeltransport zwischen ER und Golgi beteiligt sind. Die UPR reguliert somit die ER-Homöostase durch das Ausbalancieren der Lipid- und Proteinsynthese (WALTER UND RON, 2011).

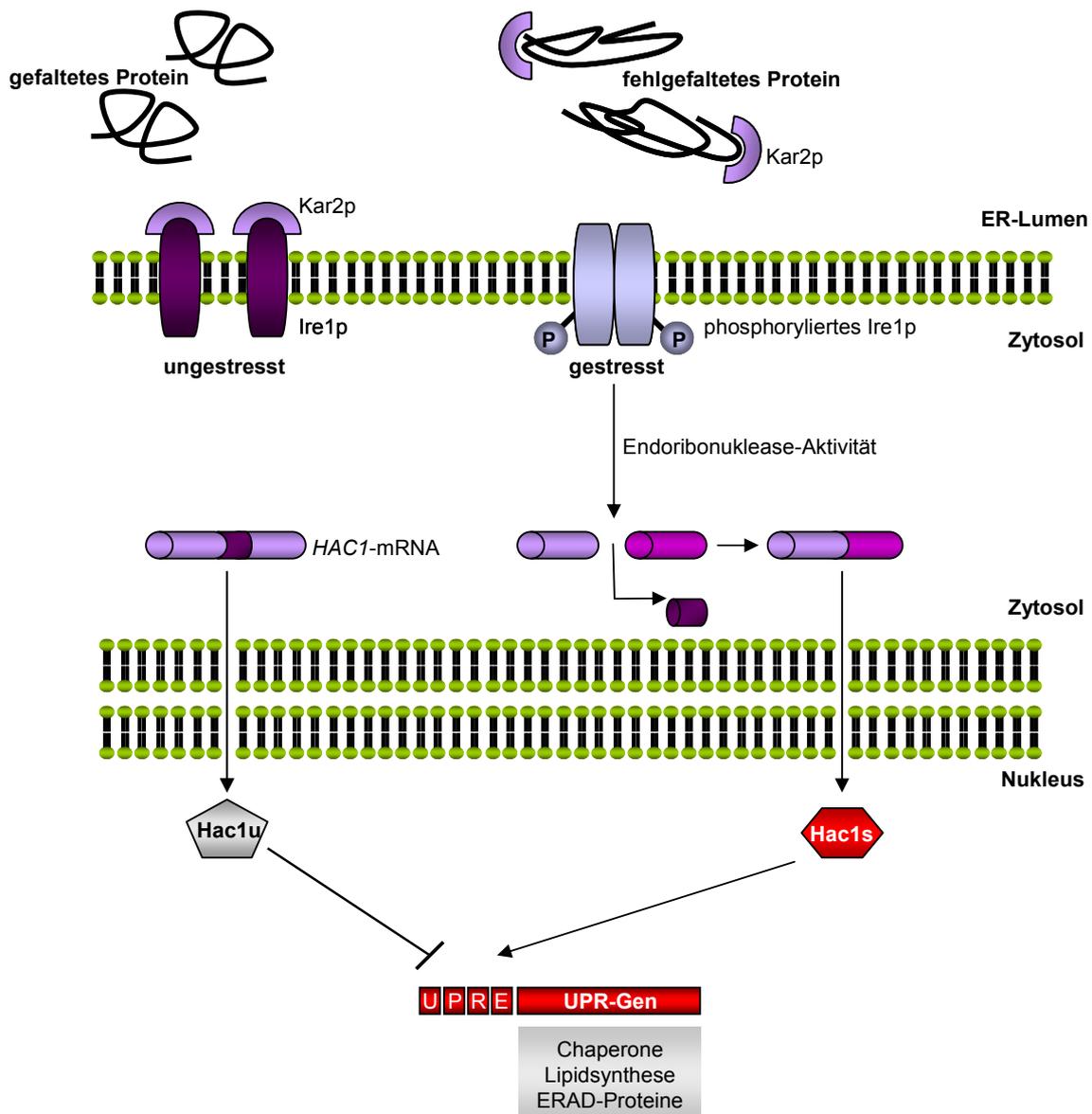
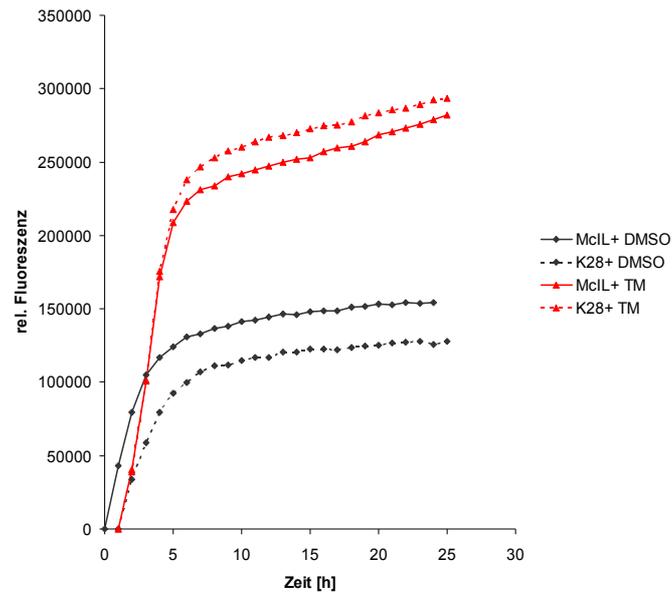


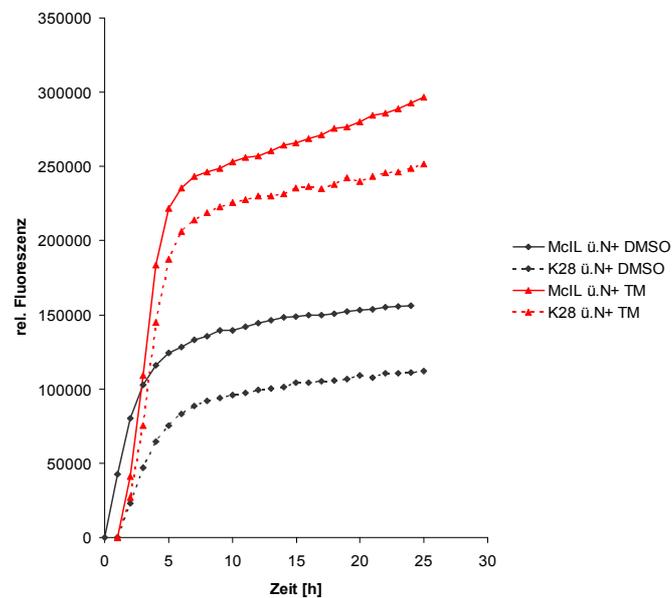
Abbildung 24: Schematische Darstellung der „unfolded protein response“ (UPR). Der Sensor Ire1p liegt unter physiologischen Bedingungen gebunden an BiP (Kar2p) vor. Akkumulieren fehlgefaltete Proteine im ER, dissoziiert BiP zum Substrat, sodass Ire1p oligomerisiert. Durch Autophosphorylierung wird dessen Ribonuklease-Aktivität aktiviert, woraufhin es zum Spleißen der *HAC1*-mRNA kommt und auf diese Weise der Transkriptionsfaktor Hac1p translatiert wird. Dieser aktiviert im Nukleus Zielgene mit UPR-Elementen in der Promotor-Region, die dem Zellstress entgegen wirken.

Um den Zusammenhang der Toxinwirkung von K28 mit der UPR zu untersuchen, wurde ein Reportersystem eingesetzt, in dem das Fluoreszenzprotein mCherry durch einen Promotor mit vier UPR-Elementen gesteuert wird und somit durch Binden des Transkriptionsfaktors Hac1p aktiviert werden kann. Dadurch kommt es nach Induktion der UPR zur Expression von mCherry, woraufhin die Fluoreszenzintensität mit der Stress-Induktion korreliert (LAJOIE ET AL., 2012). Hierfür wurde der Stamm BY4741 pPM47-UPRE-mCherry bei einer OD_{600} von 1 geerntet. Die Messung erfolgte über 24 h in einer 96-Well-Platte, mit jeweils $1,5 \times 10^7$ Zellen in einem Endvolumen von 125 μ l pro Well.

Je nach Ansatz wurden den Zellen entweder 75 µl McIlvaine Puffer pH 4,7 oder Toxinkonzentrat appliziert. Die Behandlung mit 10 µg/ml Tunikamycin diente als Positivkontrolle zur Induktion der UPR. Da Tunikamycin gelöst in DMSO vorlag, wurde eine entsprechende Kontrolle mitgeführt. Aus ABBILDUNG 25A geht hervor, dass mit den gewählten Parametern eine Induktion der UPR möglich war, da es, verglichen mit der DMSO-Kontrolle (McIL+DMSO), nach Applikation von Tunikamycin (McIL+TM) zu einer deutlichen Steigerung der Fluoreszenz um etwa 130.000 relative Fluoreszenzeinheiten (rFE) kam. Durch die Behandlung mit K28 (K28+DMSO) konnte diese Duplikation nicht erreicht werden, sondern lag mit etwa 120.000 rFE im Bereich der Pufferkontrolle. Dies lässt den Schluss zu, dass K28 nicht in der Lage ist, wie Tunikamycin die mCherry-Expression und somit die UPR zu induzieren. Die Behandlung mit K28 konnte auch der Wirkung von Tunikamycin nicht entgegen wirken (ABBILDUNG 25A), da nach gleichzeitiger Applikation (K28+TM) mit 280.000 rFE eine vergleichbare Fluoreszenzintensität erzielt wurde wie in der Pufferkontrolle (McIL+TM). Um sicherzustellen, dass die Applikation von K28 keinen limitierenden Faktor darstellt, wurden in einem weiteren Ansatz Zellen eingesetzt, die bereits über Nacht mit dem Toxin bzw. McIlvaine-Puffer inkubiert worden waren. Auch hier konnte in der Kontrolle die UPR durch Tunikamycin induziert werden, was sich in einer Steigerung der rFE von etwa 150.000 auf rund 300.000 widerspiegelte (McIL ü.N+DMSO vgl. McIL ü.N+TM). Eine vorherige Applikation von K28 ü.N führte zu einer Fluoreszenzintensität von 250.000 rFE, was die Aussage, dass K28 die UPR weder induzieren noch inhibieren kann, stützt (ABBILDUNG 25A).



A



B

Abbildung 25: mCherry-Expression unter Kontrolle von UPR-Elementen in der Promotorregion. Untersucht wurde die relative Änderung der Fluoreszenzintensität über einen Zeitraum von 24 h nach Applikation von K28 bzw. Tunikamycin (TM) als Maß der UPR-Induktion. Die Behandlung mit McIlvaine-Puffer bzw. DMSO dienten als Negativkontrolle. **A:** Das Toxin wurde den Zellen zum Start der Messung appliziert. **B:** Die Zellen wurden vor der Messung über Nacht mit K28 inkubiert.

Da sich das mCherry-Reportersystem für K28 α als ungeeignet erwies (nicht dargestellt), sollte die UPR mit Hilfe eines alternativen Reporterkonstrukts über die Expression von *lacZ* ermittelt werden. Dabei stand analog zur Induktion der Fluoreszenz von mCherry, *lacZ* unter Kontrolle eines UPR-Elements des *KAR2*-Promotors. Die β -Galaktosidase wird dabei durch Spleißen und Binden des Transkriptionsfaktors Hac1p an die beschriebene Promotorregion exprimiert, was eine Blaufärbung der Zellen in Gegenwart von X-Gal hervorruft (PARIKH *ET AL.*, 2008). Getestet wurde der Stamm BY4742 UPR-*lacZ* nach Transformation mit dem Letalkonstrukt pRS315-pp α bzw. mit dem Leervektor. Die Zellen wurden über Nacht in Raffinose-haltigem Medium bis zu einer optischen Dichte von 0,5 kultiviert und anschließend die Expression der toxischen K28 α -Untereinheit von 10 ml Zellsuspension mit 3 % Galaktose über einen Zeitraum von 3 h induziert bzw. mit 2 % Glukose reprimiert. Als Positivkontrolle diente auch hier die Behandlung mit 10 μ g/ml Tunikamycin über den gleichen Zeitraum. Die Proben wurden mittels Glasperlen aufgeschlossen, zentrifugiert und der Überstand mit 62 μ g/ml X-Gal versetzt. Bei einer Inkubation bei 30°C setzte unter ständigem Drehen der Probe nach etwa 5 h eine Blaufärbung ein.

ABBILDUNG 26 zeigt, dass es in den Zellen mit Leervektor sowohl unter reprimierenden (Glc+TM) als auch induzierenden Bedingungen (Gal+TM) durch die Behandlung mit Tunikamycin zur Induktion der UPR und somit zu einer Blaufärbung des Zelllysats kam. Die Negativkontrollen mit DMSO (Glc+DMSO; Gal+DMSO) bzw. ohne Zusatz weiterer Reagenzien (Glc; Gal) blieben farblos. Somit kam es nach Expression von K28 α weder unter reprimierenden noch unter induzierenden Bedingungen zur Induktion der UPR. Im Unterschied hierzu kam es nach Gabe von Tunikamycin (Glc+TM) zur UPR-Induktion, die nach gleichzeitiger Expression von K28 α (Gal+TM) nicht inhibiert wurde (ABBILDUNG 26).

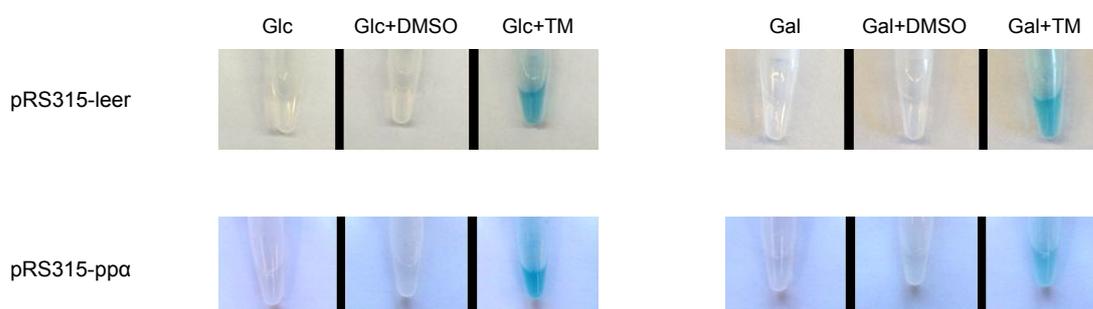


Abbildung 26: Untersuchungen zur K28-abhängigen UPR-Induktion anhand der Synthese von *lacZ* unter Kontrolle eines UPR-Elements. Die lösliche Fraktion des Zelllysats des Stammes BY4742 UPR-*lacZ* wurde nach Expression von K28 α (pp α) bzw. des Leervektors unter reprimierenden (Glc) sowie induzierenden Bedingungen (Gal) mit X-Gal versetzt und über mehrere Stunden inkubiert. Als Positivkontrolle diente die Behandlung mit Tunikamycin (TM).

Um eine Induktion der UPR durch K28 bzw. K28 α an einem früheren Punkt nachzuweisen, sollte untersucht werden, ob es durch Toxinbehandlung zum Spleißen der *HAC1*-mRNA kommt. Da Zellen nach dem Verdau der Zellwand das Toxin effizienter internalisieren, wurden zunächst Sphäroplasten für den UPR-Test eingesetzt. Dazu wurden jeweils 10 ml Sphäroplasten mit K28 bzw. mit McIlvaine-Puffer 2 h bei 20°C inkubiert, anschließend die Gesamt-RNA isoliert, eine cDNA durch reverse Transkription hergestellt und schließlich mittels PCR der Transkriptionsfaktor *HAC1* amplifiziert. β -Aktin diene dabei als Ladekontrolle. In der Positivkontrolle wurden Zellen mit 20 μ g/ml Tunikamycin behandelt, das die N-Glykosylierung im ER inhibiert und somit die UPR induziert. Wie in ABBILDUNG 27A anhand der beiden Kontrollen McIL und DMSO zu erkennen ist, führte bereits die Sphäroplastierung zur Induktion der UPR. In allen Ansätzen war neben der ungespleißten *HAC1*-Form von 720 bp und der Ladekontrolle β -Aktin mit 1.200 bp auch das *HAC1*-Spleißprodukt (*sHAC1*) von 470 bp zu erkennen. Daher wurde der Versuch noch einmal mit intakten Zellen wiederholt.

Wie aus ABBILDUNG 27B hervorgeht, kam es bei intakten Zellen lediglich in der Positivkontrolle mit Tunikamycin zur Induktion der UPR und somit zur Bildung des Spleißproduktes *sHAC1*. Nach Inkubation mit K28 bzw. in den beiden Negativkontrollen McIlvaine und DMSO konnte lediglich die ungespleißte Form des Transkriptionsfaktors mit einer Länge von 720 bp sowie β -Aktin mit 1.200 bp nachgewiesen werden. Daraus kann abgeleitet werden, dass K28 die UPR nicht induziert. Um festzustellen, ob K28 im Gegenzug analog zu Ricin die UPR hemmen kann, indem es das Spleißen des Transkriptionsfaktors verhindert, wurden die mit Tunikamycin behandelten Zellen gleichzeitig mit Toxin bzw. McIlvaine-Puffer behandelt. Wie ABBILDUNG 27C zeigt, kommt es dennoch in Gegenwart von Tunikamycin zur Bildung des Spleißproduktes, wodurch gezeigt werden konnte, dass K28 weder die UPR zur Steigerung seiner eigenen Retrotranslokation induziert, noch mit der Wirkung von Ricin zu vergleichen ist, das die UPR und somit seine eigene partielle Degradation inhibiert.

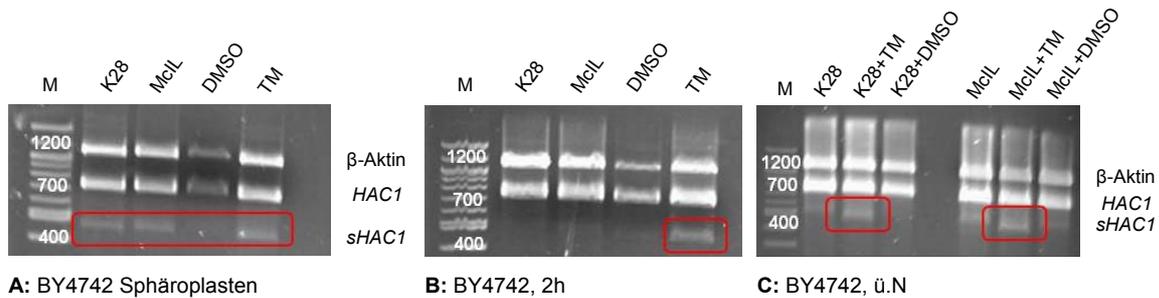


Abbildung 27: Untersuchungen zur K28-abhängigen UPR-Induktion anhand des *HAC*-Assays. Sphäroplasten (**A**) und intakte Zellen wurden über 2 h (**B**) bzw. über Nacht (**C**) mit K28, McIlvaine-Puffer oder Tunikamycin behandelt. Im Anschluss wurde die RNA isoliert, revers transkribiert und mittels PCR die Spleißprodukte der *HAC*-mRNA nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde gleichzeitig β -Aktin amplifiziert.

Um festzustellen, ob sich das artifizielle System nach intrazellulärer Expression der toxischen α -Untereinheit anders hinsichtlich seiner Wirkung auf die „unfolded protein response“ verhält, wurden Zellen vor und nach Induktion der K28 α -Expression im UPR-Assay untersucht. Als Kontrolle diente ein K28 α -Konstrukt ohne Signalsequenz (pa), das keinen Selbstkillerphänotyp hervorruft.

Die beiden Stämme BY4742 pRS316-pp α bzw. BY4742 pRS316-p α wurden zunächst über Nacht in Raffinose-haltigem Medium bis zu einer Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml kultiviert und anschließend 3 h mittels 3 % Galaktose induziert bzw. in 2 % Raffinose belassen. Auch hier wurde nach Isolierung der RNA, cDNA-Synthese und PCR die Induktion der UPR mit Tunikamycin bzw. DMSO verglichen. ABBILDUNG 28A zeigt, dass weder K28 α mit Signalsequenz, noch die Variante ohne ER-Importsignal unter induzierenden Bedingungen die UPR einleiten. Es konnten lediglich die ungespleißte *HAC1*-Form und β -Aktin amplifiziert werden. ABBILDUNG 28B belegt, dass in den beiden Stämmen prinzipiell die Induktion der UPR möglich ist, da die Behandlung mit Tunikamycin sowohl nach Expression der toxischen K28 α -Variante (pp α) als auch der nicht-toxischen Form (p α) zum Spleißen des Transkriptionsfaktors führte (*sHAC1*). Genau wie nach Applikation des K28-Dimers, kann auch K28 α dem Spleißen von *HAC1* und somit der Induktion der UPR nicht entgegenwirken, da es nach Behandlung mit Tunikamycin trotz Induktion von pp α zur Bildung von *sHAC1* kam (ABBILDUNG 28C).

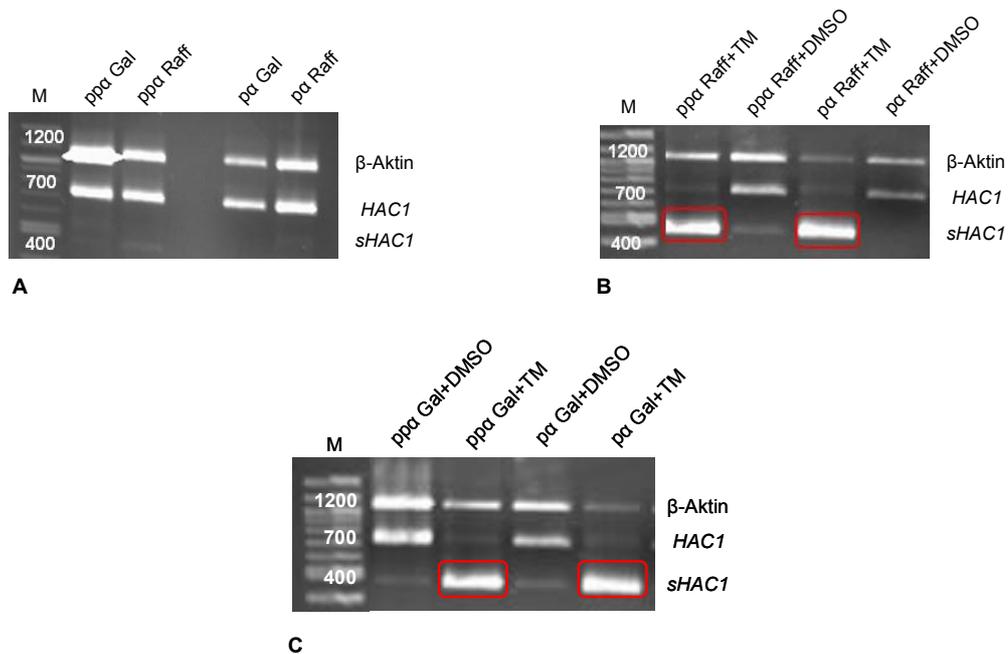


Abbildung 28: Untersuchungen zur K28-abhängigen UPR-Induktion über Messung des *HAC*-Spleißens. Das Letalkonstrukt ppa bzw. die nicht toxische Variante pa, wurden über 3 h unter nicht-induzierenden (Raff) bzw. induzierenden Bedingungen (Gal) kultiviert, im Anschluss die RNA isoliert, revers transkribiert und mittels PCR die Spleißprodukte der *HAC*-mRNA nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde gleichzeitig β -Aktin amplifiziert. **A:** Die Expression von K28 α führte nicht zum Spleißen der *HAC*-mRNA. **B:** Unter nicht-induzierenden Bedingungen (Raff) induzierte die Behandlung der Stämme mit Tunikamycin die UPR und somit auch das Spleißen der *HAC*-mRNA. **C:** Unter induzierenden Bedingungen (Gal) konnte die Induktion der UPR mit beiden Toxinvarianten nicht inhibiert werden.

3.5 Beteiligung der Hrd1p-unabhängigen Proteolyse (HiP) an der Dislokation des Killertoxins

HAYNES *ET AL.* (2002) postulierten einen Hrd1p-unabhängigen Weg der ER-Qualitätskontrolle (Hrd1p-independent proteolysis; HiP), bei dem fehlerhafte Proteine zum Golgi und wieder zurück zum ER transportiert werden. Dieser HiP-Pathway bietet der Zelle die Möglichkeit, fehlgefaltete Polypeptide von jenen zu trennen, die sich noch im Faltungsprozess befinden. Sie unterliegen gegebenenfalls verschiedenen Modifikationen, um die Interaktion mit klassischen ERAD-Komponenten und somit ihren proteasomalen Abbau zu steigern (HAYNES *ET AL.*, 2002; VASHIST *ET AL.*, 2001).

Aufgrund des Transportweges spielt der HiP-Pathway vermutlich eher eine Rolle für das artifizielle System der intrazellulären Expression von K28 α . Da das K28-Heterodimer nach Applikation den retrograden Sekretionsweg nutzt, um zu seinem Zielort zu gelangen, besteht keine Notwendigkeit, diesen alternativen Pathway zu nutzen, da es den Golgi Apparat bereits vor Erreichen des ER passiert. Die entsprechenden Mutanten mit Defekten in zellulären Komponenten der Substratselektion und COPII-Maschinerie wurden dennoch im MBA-Test untersucht, um einen möglichen Sekundäreffekt zu erkennen. Der Transport vom Golgi zum ER ist jedoch auch für das Heterodimer von Bedeutung.

ERKENNUNG UND ABBAU

Der beschriebene HiP-Weg impliziert einen aktiven Mechanismus für die Erkennung und den Transport ausgewählter Polypeptide. Ohne Bst1p werden ERAD-Substrate wie KHN sowie CPY* im ER zurückgehalten und stabilisiert. Bst1p ist nicht essentiell für den Transport der meisten gefalteten Proteine, sondern erfüllt vermutlich eher eine Rolle bei der Cargo-Sortierung (VASHIST *ET AL.*, 2001). Erv29p fungiert als Lade- und Transportrezeptor, der lösliche Proteine wie CPY* über COPII-beschichtete Vesikel vom ER zum Golgi transportiert (BELDEN UND BARLOWE, 2001B). Die Hrd1p-unabhängige Proteolyse verläuft unabhängig von vakuolären Proteasen und findet nach vorheriger Ubiquitinierung ausschließlich über die proteasomale Degradation statt (HAYNES *ET AL.*, 2002). Diese Rsp5p-abhängige Modifikation beinhaltet darüber hinaus die beiden konjugierenden Enzyme Ubc4p und Ubc5p (GITAN UND EIDE, 2000). Neben seiner Rolle im Rahmen der ERQC, ist Rsp5p unter anderem an der Proteinsortierung beteiligt, wobei die Ubiquitinierung von Plasmamembranproteinen durch Rsp5p deren Internalisierung und anschließenden retrograden Transport einleitet (HICKE UND RIEZMAN, 1996). ABBILDUNG 29 gibt einen Überblick über den Hrd1p-unabhängigen Pathway.

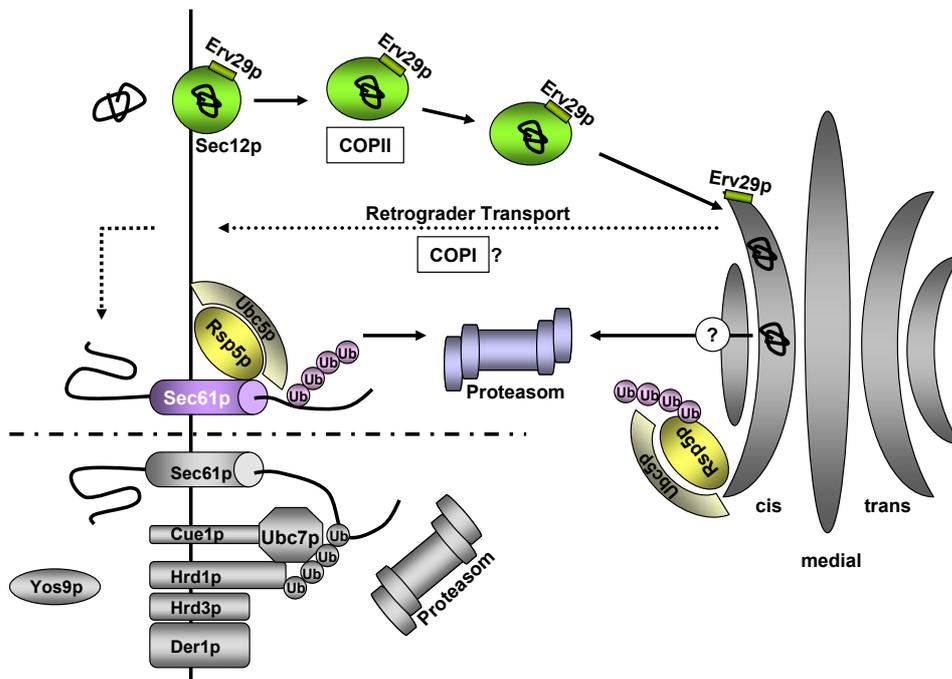
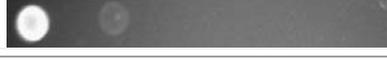


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Hrd1p-unabhängigen Proteolyse (HiP) im Vergleich zum klassischen ERAD-Pathway. Der HiP-Mechanismus benötigt zum Abbau fehlerhafter Proteine den vesikulären ER/Golgi-Transport, der die Aktivität von Sec12p sowie den „cargo“-Rezeptor Erv29p benötigt. Im Golgi sind Modifikationen der Glykosylierung möglich, welche die Ubiquitinierung durch Rsp5p sowie die Degradation durch das Proteasom unterstützt. Aus welchem Kompartiment das Substrat ins Zytosol gelangt, ist nicht vollständig geklärt. Es könnte ein bisher unbekannter Export-Mechanismus aus dem Golgi existieren, wohingegen das „cargo“ in einem regulären Prozess zurück zum ER und über das Translokon in das Zytosol transportiert wird (HAYNES *ET AL.*, 2002).

Nach Expression von K28 α wurde bereits beobachtet, dass das Toxin nach post-translationalem ER-Import und Transport zum Golgi wieder zurück zum ER gelangt. Eine $\Delta erv29$ Deletionsmutante zeigte eine um 50 % gesteigerte Sensitivität gegenüber K28 α und auch die Reduktion des Rsp5p-Gehaltes führte zu einer um 70 % gesteigerten Sensitivität, wohingegen die Deletion von *BST1* in einem leichten Rückgang der Sensitivität um 19 % resultierte (TABELLE 26). Wie bereits für andere ERAD-Substrate beschrieben, scheint im Falle von K28 α auch ein Teil des Toxins über diesen alternativen ERAD-Mechanismus abgebaut zu werden. Fehlen Cargo-Rezeptor bzw. Ubiquitinligase, kommt es vermutlich zu einer verminderten Degradation über HiP, was sich in einer Hypersensitivität der entsprechenden Teststämme äußerte. Im Falle des K28-Dimers war die Sensitivität nach Deletion des Cargo-Rezeptors Erv29p nicht beeinflusst, was eine generelle Hypersensitivität des Stammes gegenüber K28 ausschließt. Da es sich im Falle von Bst1p um eine Inositol-Deacylase handelt, die an der Reifung von GPI-verankerten Proteinen beteiligt ist (TANAKA *ET AL.*, 2004), könnte die Toxin-Resistenz des Deletionsstammes auf eine veränderte Zelloberfläche zurückzuführen sein, aufgrund derer das Toxin nicht mehr endozytiert werden kann.

Ein Effekt nach „knock-down“ der Ubiquitinligase Rsp5p führte dagegen zu einem leichten Rückgang der Sensitivität (Verringerung des Hemmhofdurchmessers um 2 mm), da Rsp5p gemeinsam mit Ubc5p durch Ubiquitinierung des Sekundärrezeptors Erd2p an der Internalisierung von K28 beteiligt ist und somit eine Verminderung des Rsp5p-Gehaltes auch in einer reduzierten Toxinaufnahme resultiert. Ubc5p könnte jedoch ebenso an der Degradation des Toxins auf Ebene des ER-Exports beteiligt sein und so für den um 3 mm vergrößerten Hemmhof der $\Delta ubc5$ Mutante verantwortlich sein (TABELLE 26).

Tabelle 26: Übersicht zur Toxin-Sensitivität von Deletions(Δ)- bzw. „knock-down“ (DAmp)-Mutanten in Komponenten des HIP-Pathways. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach pp α -Expression [%]	Phänotyp nach pp α -Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4742 (WT)	21	100						
$\Delta erv29$	20	150						
$\Delta bst1$	0	81						
$\Delta ubc5$	24	163						
BY4741 (WT)	25	100						
<i>rsp5</i> DAmp	23	170						

COPII-VESIKELTRANSPORT

Zum Abbau faltungsdefekter löslicher Proteine werden Komponenten der COPII-Hülle benötigt, um den Transport zum Golgi zu bewerkstelligen (CALDWELL *ET AL.*, 2001). **ABBILDUNG 30** fasst die Vorgänge der Knospung sowie der Fusion mit der Zielmembran zusammen.

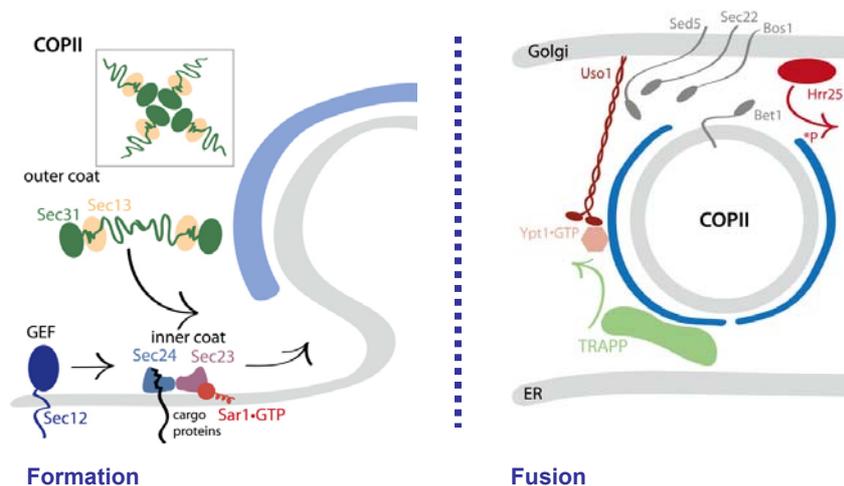


Abbildung 30: Überblick zur Bildung sowie Fusion von COPII-Vesikeln. Die Assemblierung wird durch die GTPase Sar1p angetrieben, die durch Sec12p aktiviert wird. Sar1p rekrutiert das Sec23p/Sec24p-Dimer, das den inneren "coat" bildet und die Cargo-Bildung vermittelt. Im Anschluss wird das Sec13p/Sec31p-Hetero-Tetramer rekrutiert, das die äußere Hülle bildet. Die Kinase Hrr25p unterstützt die Dissamblierung der COPII-Hülle, wodurch die SNARE-Proteine zur Wechselwirkung mit Sed5p, Sec22p und Bos1p exponiert werden (VERÄNDERT NACH (BARLOWE UND MILLER, 2013).

COPII-Vesikel knospen an Stellen des ER, an denen eine lokale Krümmung mit Hilfe der Membranproteine Rtn1p, Rtn2p sowie Yop1p induziert wird (OKAMOTO *ET AL.*, 2012). Sec16p und Sec14p scheinen bei der Regulation dieses Mechanismus eine Rolle zu spielen (CONNERLY *ET AL.*, 2005). Nach Deletion von *RTN2* kam es im Vergleich zum Wildtyp zu einer Steigerung des toxischen Effektes von K28 α um 48 %, jedoch nur um 28 % in einer $\Delta yop1$ Mutante. Dies führte zu ersten Hinweisen auf eine direkte Beteiligung von COPII-Vesikeln am Transport des Letalkonstrukts. Die Applikation des Heterodimers blieb in den Mutanten hingegen ohne Auswirkungen auf dessen K28-Sensitivität (TABELLE 27).

Tabelle 27: Übersicht zur K28-Sensitivität von Deletions(Δ)-Mutanten mit Defekten in zellulären Komponenten der Knospung von COPII-Vesikeln. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4742 (WT)	22	100						
Δ <i>rtn2</i>	21	148						
Δ <i>yop1</i>	22	128						

An der COPII-Vesikelformation, dem „cargo-loading“ und der Membranfusion sind Proteine der Erv-Familie beteiligt (Erv14p, Erv25p, Erv41p und Erv46p), deren Deletion unterschiedliche Auswirkungen auf den Proteintransport zum Golgi besitzt (BELDEN UND BARLOWE, 1996; OTTE *ET AL.*, 2001; POWERS UND BARLOWE, 1998). Darüber hinaus sind mit COPI- und COPII-Vesikeln verschiedene Transmembranproteine assoziiert, die zur p24-Familie gehören (Emp24p, Erv25p und Erp1-6) und eine regulatorische Funktion im vesikulären Transport übernehmen (SPRINGER *ET AL.*, 2000). Die Substratselektion wird ausgehend von verschiedenen Signalen vermittelt, die von sauren Peptiden bis hin zu gefalteten Epitopen reichen (MALKUS *ET AL.*, 2002; MANCIAS UND GOLDBERG, 2007) und entweder direkt durch Interaktion mit der COPII-Hülle oder indirekt über einen Adapter erreicht wird. Rezeptoren der p24-Familie wie Emp24p, Erv25p, Erp1p und Erp2p werden für den effizienten Export von GPI-Proteinen benötigt, die aufgrund ihrer luminalen Orientierung nicht mit den COPII-„coat“ interagieren können (BELDEN UND BARLOWE, 2001A). Erv26p und Erv14p sind hingegen essentiell für den Export von Membranproteinen, die kein Exportsignal tragen (HERZIG *ET AL.*, 2012). Auch eine Deletion von *EMP24* führt genau wie in Δ *erv29* zu einer signifikanten Verzögerung des ER-Exportes (SCHIMMOLLER *ET AL.*, 1995).

Die Adapterproteine bzw. Rezeptoren Erp1p, Erv26p sowie Erv14p scheinen auch an der Selektion von K28 α beteiligt zu sein, da es im Falle einer Deletion zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber dem Toxin kam. Den stärksten Effekt mit einer Sensitivität von 288 % zeigte Δ *erp1* gefolgt von Δ *erv26* mit 202 % und Δ *erv14* mit 159 %. Dabei handelt es sich vermutlich nicht um eine generelle Hypersensitivität der Mutanten, da sie keine Veränderungen bezüglich des K28-Heterodimers zeigten (TABELLE 28). Somit ist davon auszugehen, dass K28 α nicht direkt mit der COPII-Maschinerie interagiert, sondern Adapterproteine zur Verpackung in entsprechende Vesikel nutzt.

Tabelle 28: Übersicht zur Toxin-Sensitivität von Deletions(Δ)-Mutanten in Komponenten der COPII-Formation. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4742 (WT)	22	100						
$\Delta emp24$	23	99						
$\Delta erp1$	22	288						
$\Delta erv26$	20	202						
$\Delta erv14$	21	159						

Die minimale COPII-Maschinerie setzt sich aus den fünf Untereinheiten Sar1p, Sec23p, Sec14p, Sec13p sowie Sec31p zusammen. Die Vesikelformation wird durch die Aktivierung des G-Proteins Sar1p initiiert (BARLOWE *ET AL.*, 1993), die über den Austausch von GDP gegen GTP mit Hilfe des Nukleotidaustauschfaktors (NEF) Sec12p an der ER-Membran erfolgt (D'ENFERT *ET AL.*, 1991). Anschließend wird der heterodimere Komplex aus Sec23p und Sec24p rekrutiert, wobei Sec23p als GTPase-aktivierendes Enzym für Sar1p fungiert und Sec24p die Cargo-Bindung unterstützt (MILLER *ET AL.*, 2002; YOSHIHISA *ET AL.*, 1993). Dieser „prebudding“ Komplex aus Sar1p/Sec23p/Sec24p bildet die innere Membran der COPII-Hülle; sie ist mit Lipiden assoziiert, trägt zur Substratbindung bei und rekrutiert den heterotetrameren Komplex aus Sec13p und Sec31, der die äußere Membran des Vesikels bildet, wobei Sec31p die GAP-Aktivität von Sec23p unterstützt (BI *ET AL.*, 2007; MATSUOKA *ET AL.*, 1998). Sec16p moduliert die Aktivität der COPII-Hülle, indem es mit den Hüllproteinen interagiert und die GAP-Aktivität von Sec31p reduziert (KUNG *ET AL.*, 2012; YORIMITSU UND SATO, 2012). Auf diese Weise kann die Hülle lange genug assembliert bleiben, um ein Vesikel auszubilden, bevor sie nach GTP-Hydrolyse wieder dissoziiert (ANTONNY *ET AL.*, 2001).

Wie erwartet, zeigten die Schlüsselkomponenten zur COPII-Vesikelknospung keinen Einfluss auf die Sensitivität gegen das K28-Dimer. Nach intrazellulärer Expression von K28 α war jedoch nach einem „knock-down“ von Sec16p, welches die Aktivität von Sar1p inhibiert, eine um mehr als 100 % gesteigerte Sensitivität zu beobachten (TABELLE 29). Ohne diesen Regulator scheint es aufgrund eines beschleunigten COPII-Transports zu einem reduzierten Abbau des Toxins zu kommen. Eine Reduktion von Sar1p bzw. Sec31p, beides Komponenten der äußeren COPII-Hülle, führte mit 96 % und 122 % zu keiner signifikant veränderten Sensitivität, da der restliche Proteingehalt der DAmP-Mutanten vermutlich ausreicht, um die Vesikelbildung sicherzustellen (TABELLE 29).

Tabelle 29: Übersicht zur K28-Sensitivität von „knock-down“ (DAmP)-Mutanten in Komponenten der COPII-Hülle. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach p α -Expression [%]	Phänotyp nach p α -Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4741 (WT)	22	100						
<i>sar1</i> DAmP	23	96						
<i>sec31</i> DAmP	23	122						
<i>sec16</i> DAmP	20	209						

Am Vesikeltransport zum Golgi sind neben Ypt1p und Uso1p auch Komponenten des TRAPPI Komplexes bestehend aus Bet3p, Bet5p, Trs20p, Trs23p, Trs31p und Trs33p beteiligt (BAKER *ET AL.*, 1990; SACHER *ET AL.*, 1998). Bet3p bindet dabei Sec23p und vermittelt dessen gerichteten Transport zur Zielmembran (CAI *ET AL.*, 2007). TRAPPI fungiert als GEF und somit als Aktivator für Ypt1p (WANG *ET AL.*, 2000). Durch seine präzise Lokalisation an Golgi- und Vesikelmembranen bildet er den Koordinationspunkt für die Vesikelfusion durch SNARE-Proteine. Auch Golgi-Proteine wie Grh1p, Bug1p und Coy1p sind am COPII-Vesikeltransport beteiligt (BEHNIA *ET AL.*, 2007; GILLINGHAM *ET AL.*, 2004).

Eine erfolgreiche Vesikelfusion mit dem Golgi scheint auch wichtig für den Transport von K28 α zu sein, da Bet3p und Trs31p nach „knock-down“ sowie Grh1p und Coy1p nach Deletion eine Hypersensitivität von 146 % (Bet3p), 291 % (Trs31p), 142 % (Grh1p) und 241 % (Coy1p) hervorrufen. In den betreffenden Mutanten kommt es vermutlich zu einem reduzierten Abbau des Toxins und somit zu einem erhöhten toxischen Effekt. Auch in diesem Fall kann ein Sekundäreffekt weitgehend ausgeschlossen werden, da sich die Sensitivität der Mutanten im MBA-Test im Vergleich zum Wildtyp nicht veränderte (TABELLE 30).

Tabelle 30: Übersicht zur K28-Sensitivität von Deletions(Δ)- bzw. „knock-down“ (DAmP)-Mutanten in Komponenten der COPII-Vesikelfusion. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4741 (WT)	21	100						
<i>ypt1</i> DAmP	21	122						
<i>uso1</i> DAmP	21	106						
<i>bet3</i> DAmP	22	146						
<i>bet5</i> DAmP	21	105						
<i>trs20</i> DAmP	21	94						
<i>trs31</i> DAmP	22	291						
<i>trs33</i> DAmP	21	102						
BY4742 (WT)	22	100						
Δ <i>grh1p</i>	22	142						
Δ <i>coy1</i>	22	241						

Die Fusion der COPII-Vesikel mit der Golgi-Membran wird durch die SNARE-Proteine Sed5p, Bos1p, Bet1p und Sec22p vermittelt (CAO UND BARLOWE, 2000). Aber auch regulatorische Faktoren wie Sly1p spielen eine Rolle, indem sie Sed5p binden und somit die Präzision der Assemblierung des SNARE-Komplexes erhöhen (PENG UND GALLWITZ, 2002).

Sec24p erkennt über mehrere Bindestellen verschiedene Substrate und interagiert mit den SNARE-Proteinen Sed5p und Sec22p an der Golgi-Membran (MOSSESSOVA *ET AL.*, 2003). Für das Recycling des SNARE-Komplexes werden die Faktoren Sec17p und Sec18p benötigt, die für das Disassemblieren verantwortlich sind. Dabei dirigiert Sec17p vermutlich Sec18p zum SNARE-Komplex, den es daraufhin durch ATP-Hydrolyse separiert (BONIFACINO UND GLICK, 2004).

Von den drei SNARE-Proteinen Sed5p, Bos1p und Sec22p scheint lediglich Bos1p einen signifikanten Einfluss auf die Toxizität bzw. den Abbau von K28 α zu haben, da die COPII-Vesikel nicht mehr effizient mit der Golgi-Membran fusionieren können. Somit kam es nach „knock-down“ von Bos1p zu einer starken Hypersensitivität von fast 350 % verglichen mit 155 % nach Deletion von *SEC22*. Ein direkter „knock-down“ von Sed5p zeigte keine Auswirkung (98 %), sondern lediglich ein Eingriff in dessen Regulation durch einen reduzierten Sly1p-Gehalt (151 %). Auch die regulatorischen Komponenten Sec17p und Sec18p sind vermutlich beteiligt, da ihr reduzierter Gehalt ebenfalls zu einer leichten Hypersensitivität von im Schnitt 50 % führte (TABELLE 31). Ohne das Recycling des SNARE-Komplexes können zudem weniger COPII-Vesikel mit der Ziellmembran fusionieren, wodurch der Abbau des Toxins über den alternativen ERAD-Pathway nicht mehr mit gleicher Intensität ablaufen kann.

Tabelle 31: Übersicht zur K28-Sensitivität von Deletions(Δ)- bzw. „knock-down“ (DAmP)-Mutanten in Komponenten des COPII-SNARE-Komplexes. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach p α -Expression [%]	Phänotyp nach p α -Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4741 (WT)	21	100						
<i>sed5</i> DAmP	21	98						
<i>bos1</i> DAmP	22	347						
<i>sly1</i> DAmP	22	151						
<i>sec17</i> DAmP	21	163						
<i>sec18</i> DAmP	21	140						
BY4742 (WT)	22	100						
Δ <i>sec22</i>	22	155						

MODIFIKATION IM GOLGI

Die Notwendigkeit für den Transport mancher ERAD-Substrate zum Golgi beruht auf der Bedeutung posttranslationaler Proteinmodifikationen zur Interaktion mit der ERAD-Maschinerie. Da K28 keine Erkennungssequenz zur N-Glykosylierung besitzt, besteht lediglich die Möglichkeit einer O-Glykosylierung im Zuge der ER-Qualitätskontrolle (HARTY *ET AL.*, 2001).

Die Destination dieser Proteine ist kontrovers, da manche Substrate aufgrund einer Modifikation eher vor der Degradation geschützt werden, während andere über einen bisher unbekanntem Mechanismus proteasomal abgebaut werden (HIRAYAMA *ET AL.*, 2008). Die O-Glykosylierung wird durch kovalente Verknüpfung von Mannoseresten mit Ser/Thr-Resten mittels Protein-O-Mannosyltransferasen (*PMT*) vermittelt, denen Dolicholphosphatmannose als Mannosyldonor dient. Die O-verknüpften Mannosereste sowie das Core-Oligosaccharid der N-Glykosylierung werden im ER angefügt und im Golgi weiter modifiziert (LUSSIER *ET AL.*, 1997). Die O-Glykosylierung sekretorischer Proteine ist in Hefe essentiell und wird für die Integrität der Zellwand sowie eine normale Morphogenese benötigt (LUSSIER *ET AL.*, 1997). Mutationen in *PMT*-Genen haben darüber hinaus Einfluss auf die Umsetzung fehlgefalteter Proteine, wobei ihre genaue Rolle in der ER-Qualitätskontrolle bisher noch unbekannt ist (GODER UND MELERO, 2011; TRAVERS *ET AL.*, 2000). Der Pmt1p/Pmt2p-Komplex interagiert mit ERAD-Komponenten und kann Einfluss auf den Umsatz bzw. Export von Substraten der ER-assoziierten Degradation sowie deren „targeting“ zu Hrd1p nehmen (MUNIZ *ET AL.*, 2000).

Eine Deletion von *PMT1* hatte allerdings mit einer Sensitivität von 91 % genau wie $\Delta pmt3$ (123 %) und $\Delta pmt6$ (89 %) keinen starken Einfluss auf die Sensitivität gegenüber K28 α , wohingegen eine $\Delta pmt5$ -Mutante eine deutlich ausgeprägte Hypersensitivität von 228 % aufwies. Im MBA-Test zeigte dieser Stamm eine Resistenz nach Applikation des Heterodimers (TABELLE 32).

Tabelle 32: Übersicht zur K28-Sensitivität von Deletions(Δ)-Mutanten in Komponenten der O-Glykosylierung. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach pp α -Expression [%]	Phänotyp nach pp α -Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4742 (WT)	22	100						
$\Delta pmt1$	20	91						
$\Delta pmt3$	23	123						
$\Delta pmt5$	0	228						
$\Delta pmt6$	23	89						

COPI-VESIKELTRANSPORT

COPI-Vesikel vermitteln den retrograden Transport vom Golgi zum ER. Darüber hinaus wird ihnen eine Rolle in Transportschritten oberhalb des Golgi zugeschrieben. Beispielsweise akkumulieren manche endozytierte Proteine in COPI-Mutanten in den Endosomen (GABRIELY *ET AL.*, 2007), wodurch v-SNAREs, die für den Transport von den Endosomen zum Golgi wichtig sind, nicht „recyclet“ werden können (ROBINSON *ET AL.*, 2006). **ABBILDUNG 31** fasst den Ablauf der Vesikelbildung und- fusion zusammen.

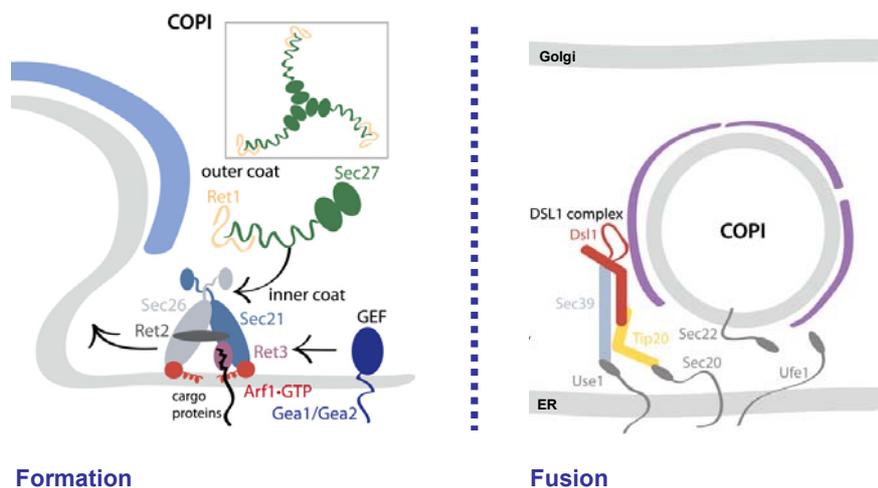


Abbildung 31: Überblick zur Bildung (links) sowie Fusion (rechts) von COPI-Vesikeln. Die COPI-Hülle wird nach Aktivierung von Arf1p gebildet, die durch die redundanten GEF's Gea1p oder Gea2p vermittelt wird. Arf1p rekrutiert den Sec21/Sec26/Ret2/Ret3-Komplex, der die innere Hülle bildet. Die äußere Hülle wird von Sec27/Ret1/Sec28 gebildet, die sich mit Hilfe von Sec27p zusammenlagert. Die Bindung/Fusion an/mit der Zielmembran wird durch den Dsl1-Komplex sichergestellt, der sich aus Dsl1/Sec39/Tip20 zusammensetzt und neben der Erkennung und Koordination die Entlassung der COPI-Hülle sowie die Paarung der SNARE-Proteine mit Use1p, Sec20p sowie Ufe1p vermittelt (VERÄNDERT NACH BARLOWE UND MILLER, 2013).

COPI-Komponenten interagieren mit Cargo-Proteinen über Signalsequenzen und leiten diese so zu den Transportvesikeln (SATO *ET AL.*, 2001). Lösliche Proteine wie beispielsweise Kar2p können nicht direkt mit der COPI-Hülle interagieren und nutzen daher Rezeptoren für die Verpackung in diese Vesikel (LEE *ET AL.*, 2004A). Die COPI-Hülle besteht aus den sieben Untereinheiten Cop1p, Sec26p, Sec27p, Sec21p, Ret2p, Sec28p sowie Ret3p, wobei die innere Schicht analog zu COPII-Vesikeln zur Substratbindung benötigt wird (BARLOWE UND MILLER, 2013).

Die stärksten Effekte bezüglich einer Sensitivitätssteigerung gegenüber K28 α zeigte ein „knock-down“ der Hüllproteine *sec27* DAmP (152 %), *sec21* DAmP (368 %) sowie *ret2* DAmP (173 %). In einer *sec21* sowie *ret2* Mutante sind Cargo-Proteine noch in der Lage mit der COPI-Hülle zu interagieren, während diese Fähigkeit in einer *sec27* Mutante verloren geht (COSSON *ET AL.*, 1996). Da unabhängig von dieser Eigenschaft nach Expression des Letalkonstrukts K28 α der gleiche Phänotyp ausgebildet wurden, kann angenommen werden, dass die Interaktion des Toxins mit Komponenten der COPI-Hülle vermutlich über Rezeptoren erfolgt (TABELLE 33).

COPI-Mutanten zeichnen sich oft durch Defekte im anterograden Transport aus, die sich wiederum indirekt auf den retrograden Transport auswirken können (TAXIS *ET AL.*, 2002). Auch die Verteilung von BiP und PDI wird dadurch verändert (NISHIKAWA *ET AL.*, 1994). Eventuell ist hierauf die enorme Sensitivitätssteigerung der *sec21* Mutante gegenüber K28 α zurückzuführen, da auch die erhöhte Sensitivität nach Applikation des K28-Dimers auf einen solchen sekundären Effekt hinweist. Anhand des MBA-Tests konnten jedoch keine Komponenten identifiziert werden, die am retrograden Transport des reifen Toxins beteiligt sind und im Zuge dessen nach Deletion bzw. „knock-down“ eine reduzierte Sensitivität ausbilden.

Tabelle 33: Übersicht zur K28-Sensitivität von Deletions(Δ)- bzw. „knock-down“ (DAmP)-Mutanten in Komponenten der COPI-Hülle. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4741 (WT)	24	100						
<i>cop1</i> DAmP	23	104						
<i>sec26</i> DAmP	24	141						
<i>sec27</i> DAmP	25	152						
<i>sec21</i> DAmP	27	368						
<i>ret2</i> DAmP	25	173						
BY4742 (WT)	23	100						
Δ <i>sec28</i>	25	85						

Die Assemblierung der COPI-Hülle wird durch die GTPase Arf1p bzw. ihr Paralog Arf2p initiiert, das von zwei redundanten GEF's Gea1p und Gea2p rekrutiert wird (ANTONNY *ET AL.*, 1997; SPANG *ET AL.*, 2001). Die GAP-Aktivität der Hülle ist nicht wie im Falle von COPII Teil des „coats“, sondern wird durch die beiden Proteine Gcs1p und Glo3p mit überlappender Funktion vermittelt, die vermutlich auch eine Rolle in der Cargo-Selektion spielen (POON *ET AL.*, 1999; SCHINDLER *ET AL.*, 2009). ER-residente Proteine, die über COPI-Vesikel transportiert werden, tragen meist ein H/KDEL-Motiv (lösliche Proteine) bzw. ein K(X)KXX-Motiv (Membranproteine). Lösliche Proteine können auf diese Weise mit dem H/KDEL-Rezeptor (Erd2p in Hefe) interagieren, der das Substrat mit der COPI-Hülle verbindet und so dessen retrograden Transport sicherstellt. Diese Bindung variiert je nach pH-Wert des jeweiligen Kompartiments (SEMENZA *ET AL.*, 1990; WILSON *ET AL.*, 1993).

Die Initiation der COPI-Vesikelbildung scheint für den Transport von K28 α zur Degradation eine wichtige Rolle zu spielen, da die Deletion der GTPase Arf2p sowie deren Aktivator Gcs1p zu einer Hypersensitivität von 245 % bzw. 130 % führte. Auch für diese Komponenten war kein nennenswerter Einfluss auf die Sensitivität gegenüber dem Heterodimer zu beobachten (TABELLE 34).

Tabelle 34: Übersicht zur K28-Sensitivität von Deletions(Δ)-Mutanten in Komponenten der COPI-Assemblierung. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4742 (WT)	22	100						
Δ <i>arf2</i>	21	245						
Δ <i>gea1</i>	23	85						
Δ <i>gcs1</i>	23	130						
Δ <i>glo3</i>	24	87						

Im Anschluss an den retrograden Transport erkennt der Dsl1-Komplex des ER (Dsl1p, Dsl3p, Tip20p) COPI-Vesikel anhand ihrer Oberfläche, koordiniert die Interaktion der SNARE-Proteine und hat eine Rolle beim „uncoating“, da nach Dsl1p-Depletion Vesikel akkumulieren (ZINK *ET AL.*, 2009). In *tip20* Mutanten kommt es demzufolge zu Defekten in der COPI-Vesikelfusion (KAMENA UND SPANG, 2004). Wie aus TABELLE 35 hervorgeht, führte ein „knock-down“ von Dsl1p sowie Use1p nach Expression des Letalkonstrukts zu einer drastischen Steigerung der Sensitivität (*dsl1* DAmP 227 %; *use1* DAmP 205 %). Somit konnte auch auf Ebene der Vesikelfusion beim Golgi/ER-Transport die Notwendigkeit des Transports von K28 α über den Golgi zurück zum ER im Zuge seiner Degradation gezeigt werden.

Tabelle 35: Übersicht zur K28-Sensitivität von „knock-down“ (DAmP)-Mutanten in Komponenten der COPI-Fusion. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4741 (WT)	24	100						
<i>dsl1</i> DAmP	26	227						
<i>dsl3</i> DAmP	25	92						
<i>tip20</i> DAmP	23	99						
<i>use1</i> DAmP	24	205						

TRANSPORT ZUR VAKUOLE

Proteine, die nicht retrograd vom Golgi zum ER transportiert werden können, gelangen zum Abbau zur Vakuole (TAXIS *ET AL.*, 2002). In *S. cerevisiae* existieren mehrere Wege, die zu diesem Kompartiment führen, wobei die Sortierung vakuolärer Proteine beispielsweise über einen bisher unbekanntem Identifizierungsmechanismus anhand einer Art Signalsequenz erfolgt, bei der es sich allerdings nicht um ein einheitliches Erkennungsmotiv handelt (BRYANT UND STEVENS, 1998). ABBILDUNG 32 fasst die verschiedenen Transportwege sowie die dafür benötigten Proteine zusammen.

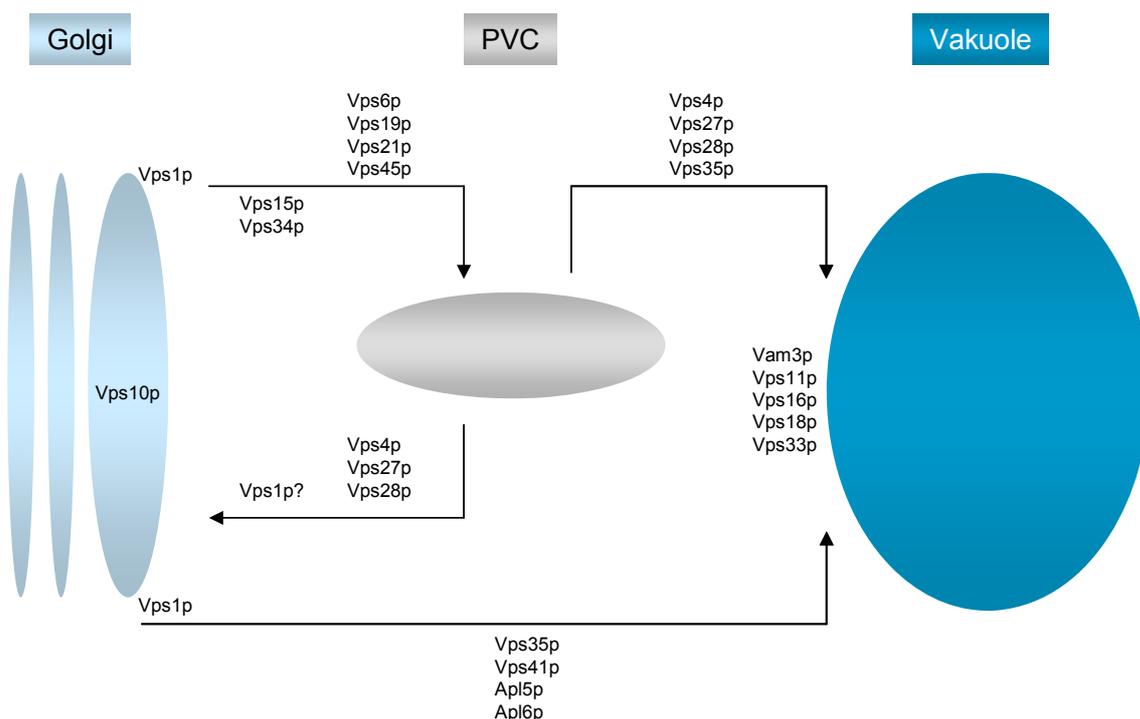


Abbildung 32: Überblick über mögliche Transportwege zur Vakuole sowie der daran beteiligten Proteine. Substrate können im Golgi den Membranrezeptor Vps10p binden, gelangen zum prä-vakuolären Kompartiment (PVC) und schließlich zur Vakuole. Darüber hinaus existiert ein alternativer Weg, der PVC umgeht und das Cargo direkt zur Vakuole transportiert (BRYANT UND STEVENS, 1998).

Die vakuoläre Carboxypeptidase Y (CPY) wird beispielsweise als inaktiver Vorläufer synthetisiert und nach dem ER-Import weiter zum Golgi transportiert. Dort interagiert CPY mit dem Rezeptor Vps10p, der die Sortierung zur Vakuole sicherstellt (HONG *ET AL.*, 1996). Da eine Deletion von *VPS10* zu keiner veränderten Sensitivität gegenüber K28 bzw. K28 α führte, ist davon auszugehen, dass Vps10p nicht an der Selektion des Toxins beteiligt ist (nicht dargestellt).

Proteine können ausgehend vom Golgi entweder zur Plasmamembran, zurück zum frühen Golgi oder zur Vakuole transportiert werden (COWLES *ET AL.*, 1997B; HARRIS UND WATERS, 1996; HARSAY UND BRETSCHER, 1995). VPS („vacuolar protein sorting“)-Gene sind für die Bildung von Vesikeln mit vakuolärem Cargo und somit für deren Abgrenzung vom anterograden Sekretionsweg verantwortlich. Auch Clathrin ist an diesem Schritt beteiligt (SEEGER UND PAYNE, 1992A). Vps15p und Vps34p stellen dabei einen regulatorischen Komplex dar, dessen Kinaseaktivität nach Rekrutierung zur Membran induziert wird und zur Vesikelbildung führt. Daher kommt es in einer $\Delta vps15$ Mutante zur Akkumulation von CPY im Golgi (BRYANT UND STEVENS, 1998; STACK *ET AL.*, 1995).

Der Transport zur Vakuole scheint auch für die Toxizität von K28 α relevant zu sein, da Vps15p als Komponente des regulatorischen Komplexes nach Deletion eine Tendenz zur Hypersensitivität (149 %) zeigte. Auch das K28-Dimer nutzt diesen Weg vermutlich für den Transport zur Vakuole, da es sowohl in $\Delta vps34$ als auch in $\Delta vps15$ zu einer deutlichen Steigerung der Sensitivität kam (TABELLE 36). Ein sekundärer Effekt wäre demnach nur im Falle von $\Delta vps34$ eine alternative Interpretation.

Tabelle 36: Übersicht zur K28-Sensitivität von Deletions(Δ)-Mutanten in Komponenten des VPS-Pathways. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4742 (WT)	22	100						
$\Delta vps34$	28	93						
$\Delta vps15$	27	149						

Am Transport über das prä-vakuoläre Kompartiment (PVC) zur Vakuole ist zusätzlich ein SNARE-Komplex bestehend aus den Komponenten Vps45p, Vps6p, Vps21, Sec18p sowie Vps19 beteiligt (BURD *ET AL.*, 1997; PIPER *ET AL.*, 1995). Auch dieser Transportschritt beeinträchtigt die Sensitivität gegenüber beiden Toxinformen. Kann die Vesikelfusion mit PVC nicht mehr sichergestellt werden, so besteht die Möglichkeit, dass aufgrund dieses Verlustes das weitere „targeting“ zur Vakuole blockiert und eine reduzierte vakuoläre Degradation eine stärkere Toxinwirkung hervorruft.

In Folge dessen zeigten die entsprechenden Deletionsmutanten sowohl eine Hypersensitivität nach Expression des Letalkonstrukts ($\Delta vps6$ 144 %, $\Delta vps21$ 254 %, $\Delta vps45$ 167 % und $\Delta vps19$ 150 %) als auch nach Applikation des Heterodimers ($\Delta vps6$ +4 mm; $\Delta vps21$ +3 mm; $\Delta vps45$ +5 mm und $\Delta vps19$ +5 mm) (TABELLE 37).

Tabelle 37: Übersicht zur K28-Sensitivität von Deletions(Δ)-Mutanten in SNARE-Komplex Komponenten des VPS-Pathways. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach p α -Expression [%]	Phänotyp nach p α -Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4742 (WT)	22	100						
$\Delta vps6$	26	144						
$\Delta vps21$	25	254						
$\Delta vps45$	27	167						
$\Delta vps19$	27	150						

Im Unterschied zu den meisten vakuolären Proteinen, die vom Golgi zur Vakuole gelangen, wird ALP (PHO8) nicht über das PVC transportiert. An beiden Wegen ist Vps1p, das Homolog zu Dynamin in Säugerzellen, beteiligt (COWLES *ET AL.*, 1997B; SEEGER UND PAYNE, 1992B). Dieser alternative Weg wird durch den N-Terminus von ALP vermittelt, wobei das verantwortliche Signal bisher noch nicht charakterisiert werden konnte (COWLES *ET AL.*, 1997B). Der Transport erfolgt darüber hinaus in Abhängigkeit von Vps41p sowie mit Hilfe des Adapterkomplexes AP3 bestehend aus Apl5p und Apl6p (COWLES *ET AL.*, 1997B; SCHIMMOLLER *ET AL.*, 1995). Die Adaptern stellen dabei entweder Membranbindestellen für „coat“-Komponenten der Vesikel dar oder dienen der direkten Rekrutierung von Frachtproteinen (COWLES *ET AL.*, 1997A; ROBINSON, 1997).

Vps35p, Vps1p und Vps41 zeigten mit 126 %, 136 % und 132 % nach Deletion nur einen moderaten Effekt auf die Sensitivität gegenüber K28 α und scheinen somit auch keine tragende Rolle im Toxintransport zur Vakuole zu spielen. Hingegen beeinträchtigte das Fehlen des Adapterkomplexes aus Apl5p und Apl6p die Wirkung der K28 α -Untereinheit deutlich stärker und äußerte sich in Sensitivitäten von 166 % bzw. 151 %. Auch das Heterodimer scheint diesen alternativen Weg zur Vakuole zu nutzen und verursachte in den entsprechenden Deletionsmutanten einen um 6 mm ($\Delta vps45$ und $\Delta vps1$), 5 mm ($\Delta apl5$) und 4 mm ($\Delta apl6$) vergrößerten Hemmhof (TABELLE 38).

Tabelle 38: Übersicht zur K28-Sensitivität von Deletions(Δ)-Mutanten in Komponenten des alternativen VPS-Pathways. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression						
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	
BY4742 (WT)	22	100							
$\Delta vps35$	24	126							
$\Delta vps41$	28	132							
$\Delta apl5$	27	166							
$\Delta apl6$	26	151							
$\Delta vps1$	28	136							

Ein weiteres essentielles Protein für den Transport zur Vakuole ist das t-SNARE Vam3p, welches auch mit den vakuolären Membranproteinen Vps11p, Vps16p, Vps18p und Vps33p interagiert. Mutationen in Vam3p blockieren nicht nur den alternativen Weg, sondern auch den VPS-abhängigen Weg zur Vakuole (PIPER *ET AL.*, 1997).

Eine Deletion dieses SNAREs hatte sowohl Auswirkungen auf die Sensitivität von K28 α (198 %) als auch von K28 (+5 mm). Die Hypersensitivität kann in diesem Fall in gleicher Weise durch eine verminderte Degradation erklärt werden. Eine Deletion entsprechender vakuolärer Membranproteine, die ebenfalls für die erfolgreiche Fusion von Golgi- und PVC-Vesikeln benötigt werden, hatten vermutlich aufgrund redundanter Funktionen keine Auswirkungen auf die Sensitivität gegen beide Toxinvarianten (TABELLE 39).

Tabelle 39: Übersicht zur K28-Sensitivität von Deletions(Δ)-Mutanten mit Defekten in vakuolären Membranproteinen. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression						
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	
BY4742 (WT)	22	100							
$\Delta vam3$	27	198							
$\Delta vps16$	21	83							
$\Delta vps33$	23	107							

3.6 Rolle der Autophagozytose beim ER-Export von K28

Der vakuoläre Abbau im Rahmen der Autophagozytose stellt eine alternative zelluläre Route dar, um fehlgefaltete Proteine zu degradieren, wenn die Kapazität des ERAD-Weges erschöpft ist. Damit ist sie ebenfalls Teil der ER-Qualitätskontrolle. Das Prinzip der Autophagie beruht auf der Expansion einer prä-autophagosomalen Struktur (PAS), deren Doppelmembran-Charakter ihren Ursprung vermutlich am ER hat. Der „bilayer“ weitet sich aus, um zu degradierende Komponenten wie Proteine und Organellen abzugrenzen und verschließt die Membran zum Autophagosom. Dieses fusioniert im Anschluss mit der Vakuole bzw. dem Lysosom und entlässt das Cargo. Es werden grob zwei Formen unterschieden, in denen entweder unspezifisch Teile des Zytosols verpackt und degradiert werden (Makroautophagie) bzw. einen selektiven Prozess, in dem spezifische Proteine über Rezeptoren mit der PAS interagieren, wie beispielsweise im „cytosol to vacuole targeting“ (Cvt). Beide Prozesse werden jeweils von verschiedenen „autophagy related genes“ (ATG) reguliert. In diesem Zusammenhang wurde bereits die Interaktion des ERAD-M Substrates Hmg2p mit Komponenten des Cvt-Weges an der ER-Membran nachgewiesen (MAZON ET AL., 2007). Die Cargo-Adaptoren Atg19p und Atg8p vermitteln die Rekrutierung der Zielproteine in Cvt-Vesikel (ABBILDUNG 33). Sie binden das zentrale Gerüstprotein Atg11p, wodurch der Transport des Cvt-Komplexes zur PAS vereinfacht wird (YORIMITSU UND KLIONSKY, 2005).

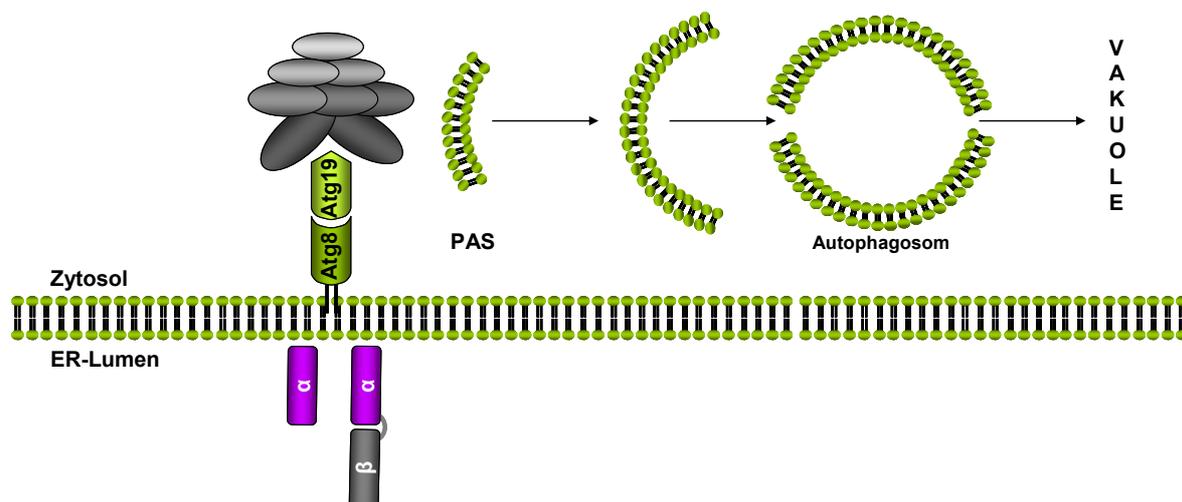


Abbildung 33: Modell einer möglichen Retrotranslokation von K28 im Rahmen der selektiven Autophagozytose. Das Substrat interagiert mit Atg8p, das über Interaktion mit dem Adapter Atg19p mit dem Gerüstprotein Atg11p wechselwirkt. Die Wechselwirkung führt zur Rekrutierung der weiteren ATG-Maschinerie und somit zur Extraktion von K28 als hypothetischem Substrat aus dem ER.

Eine Gendelektion der zentralen Komponente Atg11p führte nach Expression von K28 α nur zu einer leicht reduzierten Sensitivität von 78 % und zeigte nach Applikation des K28-Dimers WT-Sensitivität. Auch nach Deletion der übrigen Untereinheiten *ATG19* sowie *ATG8* konnte kein abweichender Hemmhofdurchmesser im MBA-Test beobachtet werden. Nach Expression des Letalkonstrukts kam es allerdings in einer $\Delta atg19$ -Mutante zu einer Hypersensitivität von 207 % sowie zu einem um 48 % gesteigerten Effekt nach Deletion von *ATG8* (TABELLE 40). Analog zur ER-assoziierten Degradation scheint somit auch die Autophagie eher am Abbau der K28 α -Untereinheit beteiligt zu sein und keine zentrale Rolle in der Retrotranslokation zu spielen.

Tabelle 40: Übersicht zur K28-Sensitivität von Deletions(Δ)-Mutanten in Komponenten der Autophagozytose. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach p α -Expression [%]	Phänotyp nach p α -Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4742 (WT)	22	100						
$\Delta atg19$	21	207						
$\Delta atg8$	23	148						
$\Delta atg11$	23	78						

Die Degradation im Zuge der Autophagozytose findet größtenteils in der Vakuole statt. Ihr niedriger pH-Wert wird durch die V-ATPase aufrechterhalten und ist Voraussetzung für die Aktivität degradierender Enzyme dieses Kompartiments. Die V-ATPase selbst ist ein Komplex aus mehreren Untereinheiten, der sich aus zwei Domänen zusammensetzt (ABBILDUNG 34). V1 bildet einen peripheren Komplex aus acht Untereinheiten, der für die ATP-Hydrolyse verantwortlich ist. Die V0-Domäne formt dagegen einen integralen Komplex, der aus fünf Untereinheiten besteht und die Protonentranslokation katalysiert (PARRA *ET AL.*, 2000). Die Deletion einer einzelnen Komponente der V-ATPase führt zu einem vollständigen Verlust ihrer Assemblierung im ER. Die Zusammenlagerung von V0 hängt darüber hinaus von verschiedenen Assemblierungsfaktoren wie Vma12p, Vma21p und Vma22p ab (GRAHAM *ET AL.*, 1998; STEVENS UND FORGAC, 1997).

Vph1p und Stv1p vermitteln im Anschluss das intrazelluläre „targeting“ der V-ATPase, wobei Vph1p für den Transport zur Vakuole verantwortlich ist und Stv1p den Komplex zum späten Golgi dirigiert (KAWASAKI-NISHI *ET AL.*, 2001). Die V1-Domäne zeichnet sich des Weiteren durch die assoziierten Proteine Rav1p und Rav2p aus, die eine effiziente Zusammenlagerung von V1 und V0 vermitteln (NISHI UND FORGAC, 2002).

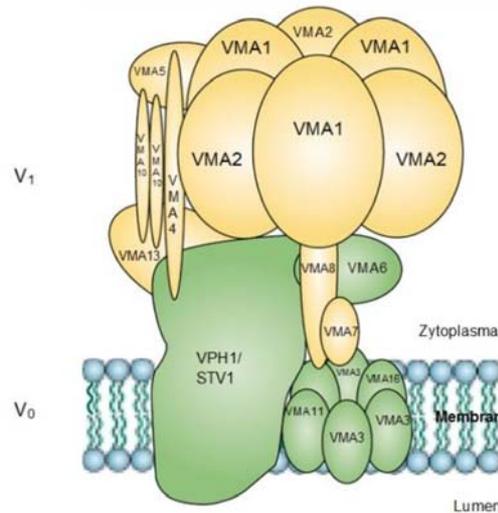
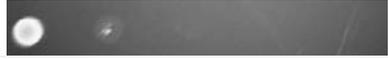
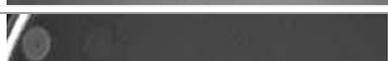
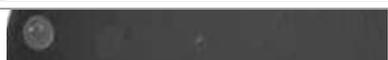


Abbildung 34: Schematische Darstellung der V-ATPase. Die periphere V1-Domäne sichert durch ATP-Hydrolyse den Protonentransport durch den integralen V0-Komplex in das vakuoläre Lumen (NISHI UND FORGAC, 2002).

Kommt es durch Deletion verschiedener Komponenten der V-ATPase zur Beeinträchtigung des vakuolären Abbaus, hat dies auch Auswirkungen auf den toxischen Effekt von K28. Bisher wurde bereits beschrieben, dass ein Teil des K28-Dimers nach seiner endozytotischen Aufnahme auf verschiedenen Wegen zur Vakuole transportiert und dort degradiert wird (HEILIGENSTEIN, 2008). Demzufolge bewirkte auch das Fehlen einzelner Untereinheiten der V-ATPase eine Hypersensitivität nach Applikation des Heterodimers. Zu erwähnen sind in diesem Zusammenhang die Phänotypen von Deletionsmutanten in den Komponenten Vma2p, Vma5p, Vma10p sowie Vma13p der V1-Domäne, deren Hemmhof zwischen 3-8 mm über dem des WT lag. Auch Deletionsmutanten von *VPH1*, *VOA1* bzw. *PKR1*, die Untereinheiten der V0-Domäne betreffen, zeigten eine erhöhte Sensitivität (+3-6 mm) und auch ein Fehlen der assoziierten Proteine Vph2p, Vma8p und Vma21p führte zu einem hypersensitiven Phänotyp (TABELLE 41).

Ein ähnlicher Zusammenhang ergab sich auch nach Expression des Letalkonstrukts, obwohl die Ausprägung der Hypersensitivität nicht in allen Fällen mit der des K28-Dimers übereinstimmte. So ergab sich der stärkste Effekt bei Deletion der Gene *VMA5* (160 %) und *VMA10* (200 %) der V1-Domäne sowie alle Untereinheiten der V0-Domäne, wobei die Deletion von *PKR1* mit einer Sensitivität von 156 % den geringsten Effekt und die Deletion von *VOA1* mit einer Sensitivität von 355 % den stärksten Effekt ausbildete. Auch die assoziierten Proteine verstärkten bis auf Rav2p den toxischen Effekt von K28 α um 74 % ($\Delta vph2$), 54 % ($\Delta vma8$), 89 % ($\Delta vma21$), 154 % ($\Delta vma22$) bzw. 155 % ($\Delta rav1$) (TABELLE 41). Die Auswirkung von Mutationen der V-ATPase auf die Toxinwirkung scheint sich hinsichtlich der beiden Toxinvarianten zu unterscheiden, jedoch in der Bedeutung von *VMA5* und *VMA10* (V1-Domäne) sowie *VOA1*, *VPH1* und *PKR1* (V0-Domäne) bzw. *VPH2*, *VMA8* und *VMA21* (assoziierte Proteine) übereinzustimmen.

Tabelle 41: Vergleichende K28-Sensitivität von Deletions(Δ)-Mutanten in Komponenten der V-ATPase. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach pp α -Expression [%]	Phänotyp nach pp α -Expression
V1-Domäne			
			10 ⁶ 10 ⁵ 10 ⁴ 10 ³ 10 ² 10 ¹
BY4742 (WT)	22	100	
$\Delta vma2$	23	127	
$\Delta vma4$	25	69	
$\Delta vma5$	30	160	
$\Delta vma7$	20	87	
$\Delta vma10$	28	200	
$\Delta vma13$	28	67	
V0-Domäne			
$\Delta voa1$	25	355	
$\Delta vph1$	27	172	
$\Delta stv1$	23	274	
$\Delta pkr1$	28	156	
Assoziierte Proteine			
$\Delta vph2$	35	174	
$\Delta vma8$	25	154	
$\Delta vma21$	31	189	
$\Delta vma22$	23	254	
$\Delta rav1$	23	255	
$\Delta rav2$	23	73	

3.7 Beteiligung von „lipid droplets“ an der Retrotranslokation von K28

Wie zuvor bereits beschrieben bleibt die Identität des Exportkanals für fehlgefaltete Proteine ungewiss, da bisher noch kein Proteinkomplex identifiziert werden konnte, der eine Beteiligung an allen Schritten der Retrotranslokation überzeugend belegen konnte (SCHEKMAN, 2004; YE *ET AL.*, 2004). Viren, wie das SV40-Virus, können beispielsweise als intakte Partikel aus dem ER entkommen und nutzen in diesem Zusammenhang auch Proteine, die zur ER-Extraktion fehlgefalteter Proteine nötig sind (LILLEY *ET AL.*, 2006). Da mit dem bisherigen Modell eines von Proteinen gebildeten Kanals einige Beobachtungen nicht in Einklang gebracht werden konnten, stellte PLOEGH 2007 eine Hypothese auf, die Lipiden die Schlüsselrolle am ER-Export von Viren und fehlgefalteten Proteinen zuschreibt. Der zugrunde liegende Mechanismus bildet hier die Synthese von „lipid droplets“ (LD). Während ihrer Biogenese kommt es zunächst durch Insertion neutraler Lipide (Triacylglycerol: TAG; Sterylester: SE) zu einer lokalen Delamierung des ER; d. h. zu einer Trennung des Bilayers. Nach der Knospung dieses Fetttröpfchens vom ER ist der ursprüngliche Kern aus neutralen Lipiden von einer Phospholipidschicht umgeben, die auch spezifische Proteine enthält (MARTIN UND PARTON, 2006). Fehlgefaltete sekretorische Proteine könnten daher „huckepack“ mit Chaperonen zum Abbau in das Zytosol gelangen.

Dieses ER-Export-Modell war bisher noch nicht in Bezug auf die Retrotranslokation von K28 untersucht worden. Hefen, denen die zur Bildung von TAG und SE notwendigen Acyltransferasen Dga1p, Lro1p, Are1p oder Are2p fehlen, enthalten keine zytoplasmatischen LDs (SORGER *ET AL.*, 2004). Dadurch wird auch die zelluläre UPR induziert, was mit einer potentiellen Beteiligung der LD-Bildung am ERAD-Pathway übereinstimmt (JONIKAS *ET AL.*, 2009). Da bisher jedoch kein eindeutiger Beweis auf die Beteiligung eines Proteinkomplexes an der Retrotranslokation von K28 erbracht werden konnte, sollte im folgenden untersucht werden, ob die Bildung von „lipid droplets“ K28 den Export aus dem ER ermöglicht.

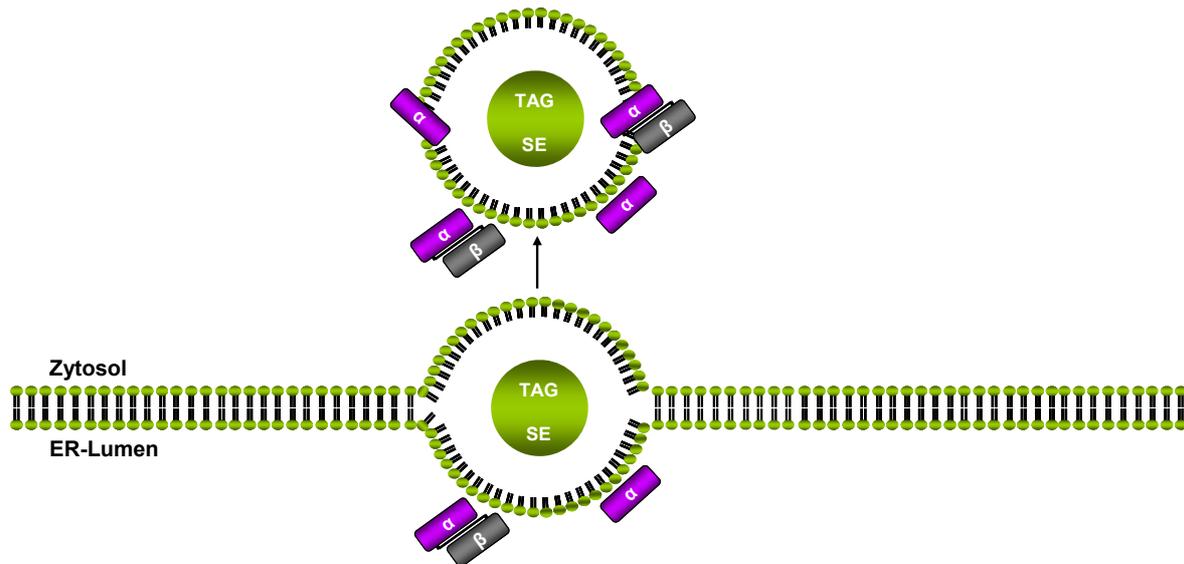


Abbildung 35: Modell zur Retrotranslokation von K28 in Verbindung mit der Bildung von „lipid droplets“. Während der Knospung eines Fett-Tröpfchens könnte K28 bzw. K28 α mit dem Phospholipid-Monolayer bzw. mit assoziierten Proteinen interagieren und auf diese Weise aus dem ER in das Zytosol exportiert werden.

Kann K28 über „lipid droplets“ aus dem ER exportiert werden, sollte im Falle einer reduzierten Biogenese dieser Organellen auch die Retrotranslokation des Toxins verzögert werden, was sich in einer verminderten Sensitivität gegenüber K28 bzw. K28 α äußern sollte. Ein Stamm, in dem keine TAG-Synthese mehr stattfinden kann ($\Delta lro1\Delta dga1$), zeigte jedoch keine veränderte Sensitivität gegenüber dem K28-Dimer. Allerdings kam es nach Expression des Letalkonstrukts zu einer stark verminderten Sensitivität um 68 %. Dieser Rückgang konnte nach zusätzlicher Deletion von *ARE2* und der damit einhergehenden Reduktion der SE-Synthese auf 95 % erhöht werden, so dass deutlich wurde, dass die Synthese neutraler Lipide einen starken Einfluss auf die Wirkung von K28 α hat (TABELLE 42).

Tabelle 42: Vergleichende K28-Sensitivität von Deletions(Δ)-Mutanten mit Deletionen in der Bildung von „lipid droplets“. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach pp α -Expression [%]	Phänotyp nach pp α -Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4742 (WT)	22	100						
$\Delta lro1\Delta dga1$	23	32						
$\Delta lro1\Delta dga1\Delta are2$	23	5						

Um die Lipidhomöostase aufrecht zu erhalten, müssen Synthese und Abbau gleichzeitig ablaufen können (ZANGHELLINI *ET AL.*, 2008). Für den LD-Abbau sind TAG-Lipasen und SE-Hydrolasen verantwortlich, wobei Tgl3p und Tgl4p die Hauptenzyme zur TAG-Hydrolyse darstellen. Ihre Deletion führt demnach zu einem starken Anstieg der Größe und Anzahl der „droplets“ (CZABANY *ET AL.*, 2007).

Nachdem ein verringerter LD-Gehalt mit einer reduzierten Sensitivität gegenüber K28 α in Verbindung gebracht werden konnte, korrelierte eine erhöhte Anzahl der „droplets“ durch Deletion im Gen der Lipase *TGL4* nicht sehr stark mit der Toxinwirkung. Die $\Delta tgl4$ -Deletionsmutante zeigte lediglich eine leicht verminderte Sensitivität gegenüber K28 α (71 %), was auf die Redundanz der übrigen Lipasen Tgl3p und Tgl5p zurückzuführen sein könnte. Im MBA-Test kam es hingegen zu keiner Veränderung im Vergleich zum Wildtyp (TABELLE 43).

Tabelle 43: K28-Phänotyp einer $\Delta tgl4$ Deletion. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test sowie nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts K28 α im Wachstums- und seriellen Verdünnungstest bestimmt.

Stamm	Sensitivität nach α/β -Applikation [mm]	Sensitivität nach ppa-Expression [%]	Phänotyp nach ppa-Expression					
			10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹
BY4742 (WT)	22	100						
$\Delta tgl4$	21	71						

3.8 Wirkung von K28 auf höhere Eukaryonten

Die beiden A/B-Toxine *Pseudomonas* Exotoxin A (PE) und Ricin nutzen zelluläre Prozesse, um Membranen zu überwinden und die Proteinsynthese zu inhibieren. Diesen Prozess zu verstehen, bietet die Möglichkeit, durch Veränderung von Wirtsproteinen die Zelle vor der Wirkung von Toxinen zu schützen, indem der Transport zu ihrem Zielort unterbrochen wird (SAENZ *ET AL.*, 2007). Anhand der Identifikation notwendiger Transportfaktoren können darüber hinaus Cargo-Substrate bezüglich ihrer intrazellulären Transportwege klassifiziert werden, wobei bisherige Daten noch kein zufriedenstellendes Ergebnis lieferten. Dabei steht nicht allein die Regulation des retrograden Proteintransports im Fokus, sondern daran angelehnt auch die Vision, neue Strategien zu entwickeln, um infektiöse Krankheiten oder Krebs gezielter zu therapieren (JOHANNES UND POPOFF, 2008).

In der vorliegenden Arbeit galt es zu untersuchen, ob sich K28 hinsichtlich Transport und Wirkung von anderen A/B-Toxinen höherer Eukaryonten abgrenzt. Es besteht die Möglichkeit, dass sich der Transport eines Hefetoxins signifikant von bakteriellen Toxinen in humanen Wirtszellen unterscheidet und somit Pathways offengelegt werden, die effektiver durch Präferenzen des Hefetoxins genutzt werden können. Eine Option, auch eine fehlende Internalisierung durch höhere Eukaryonten in der Medizin zu nutzen, besteht darin, gezielt oberflächliche Mykosen zu behandeln, ohne das umliegende Gewebe durch Applikation des Killertoxins zu schädigen. Erfolge wurden dabei bereits mit einem Killertoxin erzielt, das durch seinen spezifischen Rezeptor der Hefezellwand die Möglichkeit eröffnet, das Auftreten von Antimykotika-Resistenzen zu minimieren (POLONELLI *ET AL.*, 1986; SCHMITT UND BREINIG, 2002)

3.8.1 Verwendung verschiedener Signalsequenzen zur intrazellulären Expression von K28 α

Eine gängige Methode, um die Retrotranslokation von A/B-Toxinen zu untersuchen, ist die intrazelluläre Expression der toxischen A-Untereinheit. Um den retrograden Transport von K28 α zu untersuchen, musste sichergestellt werden, dass das Toxin nach plasmidtriebener Synthese aufgrund der toxineigenen und post-translational aktiven Signalsequenz in das ER importiert werden kann, da dies in Hefe die Voraussetzung für die Vermittlung des toxischen Effekts von K28 α darstellt. Aufgrund der Spezifität dieser Importsequenz für die Expression in Hefe, wurde im Vergleich eine säugerspezifische Signalsequenz von Präprolactin (ssPI) für den co-translationalen Import untersucht. Der ER-Import kann *in vitro* mit Hilfe kleiner Vesikel aus Fragmenten des Endoplasmatischen Retikulums, die als Mikrosomen bezeichnet werden, nachempfunden werden (ABBILDUNG 36). Dazu wurden K28 α -Varianten *in vitro* transkribiert und unter Verwendung radioaktiv markierter Aminosäuren ($[^{35}\text{S}]$ -Methionin) *in vitro* translatiert. Abhängig vom post- (pp α) oder co-translationalen Import (ssPIp) wurden die Mikrosomen während oder nach der Translationsreaktion zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz auf drei Reaktionen verteilt, wobei Reaktion A in Sucrose dem Nachweis einer erfolgreichen Translationsreaktion unabhängig vom Membrantransport diente. Reaktion B enthielt Proteinase K, die zugängliche Proteine außerhalb der Membran abbaut, wobei translozierte Polypeptide vor der Proteolyse geschützt bleiben.

Reaktion C, die sich zusätzlich aus dem Detergenz Triton-X zusammensetzt, sollte den Nachweis erbringen, nach Solubilisierung der Membranen die darin enthaltenen Proteine durch Proteinase K abzubauen.

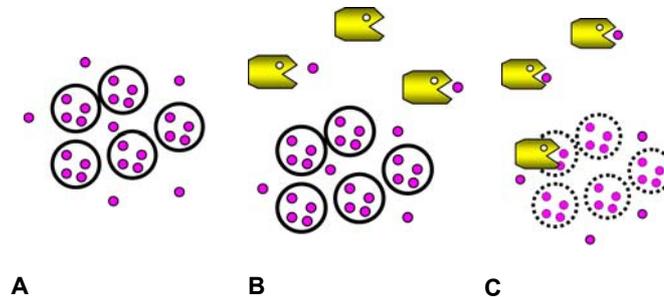


Abbildung 36: Schematische Darstellung der Sequestrierung nach *in vitro*-Transkription und Translation. Polypeptide sind in lila, Proteinase K in gelb und Mikrosomen als schwarze Kreise dargestellt. Die gestrichelte Linie veranschaulicht die Solubilisierung der Membran. **A:** Inkubation der Mikrosomen in Sucrose. **B:** Inkubation der Mikrosomen mit Proteinase K. **C:** Inkubation der Mikrosomen mit Proteinase K und Triton-X. Proteinase K degradiert in Reaktion B und C Polypeptide, die nicht von der mikrosomalen Membran geschützt werden.

Während der Translokation in Mikrosomen kommt es zur Abspaltung der Signalsequenz. Somit kann anhand des Molekulargewichtes des Vorläuferproteins nach gelelektrophoretischer Trennung und „phosphorimaging“ eine Aussage über die Fähigkeit der Signalsequenz getroffen werden, das sekretorische Protein über die ER-Membran zu transportieren. ABBILDUNG 37 zeigt, dass sich ssPlp α sowie pp α in Reaktion B unempfindlich gegenüber der proteolytischen Degradation verhielten und dieser Teil dem Molekulargewicht von p α in Reaktion A entsprach. Das bedeutet, dass sowohl die co- als auch die toxineigene post-translationale Signalsequenz prinzipiell in der Lage waren, die toxische K28 α -Untereinheit in das ER höherer Eukaryonten zu importieren und während der Translokation abgespalten zu werden.

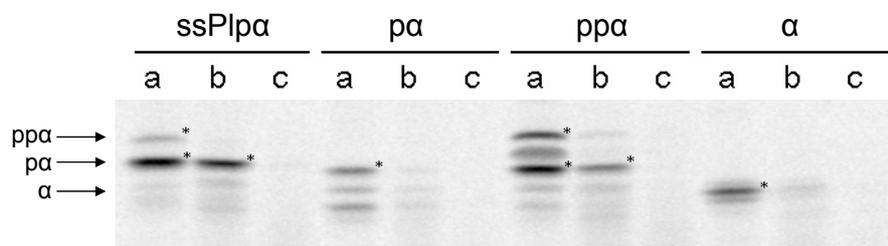


Abbildung 37: Autoradiogramm nach *in vitro* Transkription und Translation verschiedener K28 α -Varianten in Gegenwart von Mikrosomen und anschließender Sequestrierung. **a:** Inkubation der Mikrosomen in Sucrose. **b:** Inkubation der Mikrosomen mit Proteinase K. **c:** Inkubation der Mikrosomen mit Proteinase K und Triton-X.

3.8.2 Vitalitätsbestimmung von HeLa-Zellen nach Transfektion mit K28 α -Varianten

In früheren Untersuchungen wurde die Toxizität der α -Untereinheit in einem Kolonie-Bildungstest überprüft, in dem nach Transfektion der humanen Kolon-Karzinomzelllinie HCT116 mit verschiedenen K28 α -Varianten eine maximale Wachstumsinhibierung von 50% zu beobachten war (SPINDLER, 2004). Etwas genauer kann der toxische Effekt anhand der Stoffwechselaktivität der Zellen bestimmt werden. Nachdem sichergestellt worden war, dass K28 α sowohl co- als auch post-translational in das ER höherer Eukaryonten importiert werden kann, wurden HeLa-Zellen mit unterschiedlichen Toxin-Varianten transfiziert und der Effekt der Expression mittels XTT-Test bestimmt. Das Prinzip beruht auf der Umsetzung des farblosen XTT zum orangefarbenen Formazan, dessen Absorption bei 450 nm die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen reflektiert (2.27.5).

Wie aus ABBILDUNG 38 hervorgeht, stellte sich bereits nach 24 h ein deutlicher Effekt aller Toxin-Derivate ein, der durch Steigerung der Inkubationszeit auf 48 h noch weiter erhöht werden konnte. Wird die Vitalität der Zellen, die den Leervektor pmCherry exprimieren, auf 100 % gesetzt, so kommt es nach Expression von K28 α sowohl mit co- als auch mit post-translationalem ER-Import zu einer Reduktion der Vitalität um 34 % (ssPIp α) bzw. 53 % (pp α). Darüber hinaus wurde deutlich, dass die α -Untereinheit in höheren Eukaryonten, im Unterschied zu Hefe, unabhängig von ihrem Eintritt in den sekretorischen Weg toxisch wirken kann, was eine um 41 % reduzierte Vitalität widerspiegelt. Nach 48 h konnte die Vitalität der Zellen, die ssPIp α exprimierten, um weitere 26 % gesenkt werden. Die Expression von pp α führte zu einer Reduktion um weitere 18 %, die von p α um 12 %.

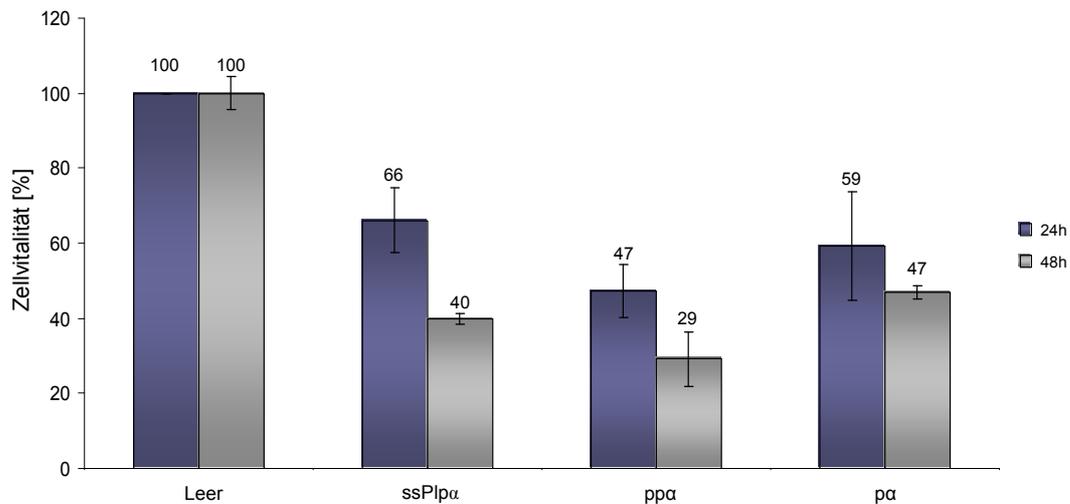


Abbildung 38: Vitalität von HeLa-Zellen nach Expression unterschiedlicher K28α-Varianten. Gemessen wurde die Vitalität von 2×10^5 Zellen in einer 24er Wellplatte nach Transfektion mit den angegebenen K28α-Varianten durch Bestimmung der Absorption bei 450 nm (XTT-Test). Die erhaltenen Werte wurden in Relation zum Leervektor gesetzt (Leervektor entspricht 100 %).

3.8.3 Expressionsnachweis von K28α mit V5-„tag“

Um die Expression und Lokalisation von K28α in der Zelle zu bestätigen, sollte ein immunologischer Nachweis erbracht werden. Bisher war es auch nach Applikation des Proteasominhibitors MG132 nicht möglich, in COS-Zellen 48 h nach Transfektion die intrazelluläre Expression von K28α darzustellen, obwohl ein Transkriptionsnachweis gelang (SPINDLER, 2004).

Da auch in der vorliegenden Arbeit das Toxin mit Hilfe von Anti-K28α-Antikörpern im Western-Blot nicht nachgewiesen werden konnte (NICHT DARGESTELLT), wurden V5-getaggte Toxin-Varianten untersucht. Dazu sollte zunächst sichergestellt werden, dass die α-Untereinheit durch Anfügen des V5-„tags“ nicht ihre Aktivität verliert. Sowohl für die sekretorischen Formen als auch die zytosolisch exprimierte Variante konnte, verglichen mit K28α ohne V5-„tag“, die gleiche Tendenz bezüglich der Toxizität beobachtet werden. Verglichen mit dem Leervektor ergab sich somit nach Expression von ssPlpV5α eine Vitalität von 64 %, für ppV5α von 49 % und für pV5α von 65 %. Durch Anfügen des V5-„tags“ kam es somit lediglich zu einem leichten Verlust der Toxizität (ssPlpV5α -24 %, ppV5α -20 % und pV5α -18 %), sodass diese Varianten für die nötigen immunologischen Untersuchungen herangezogen werden konnten.

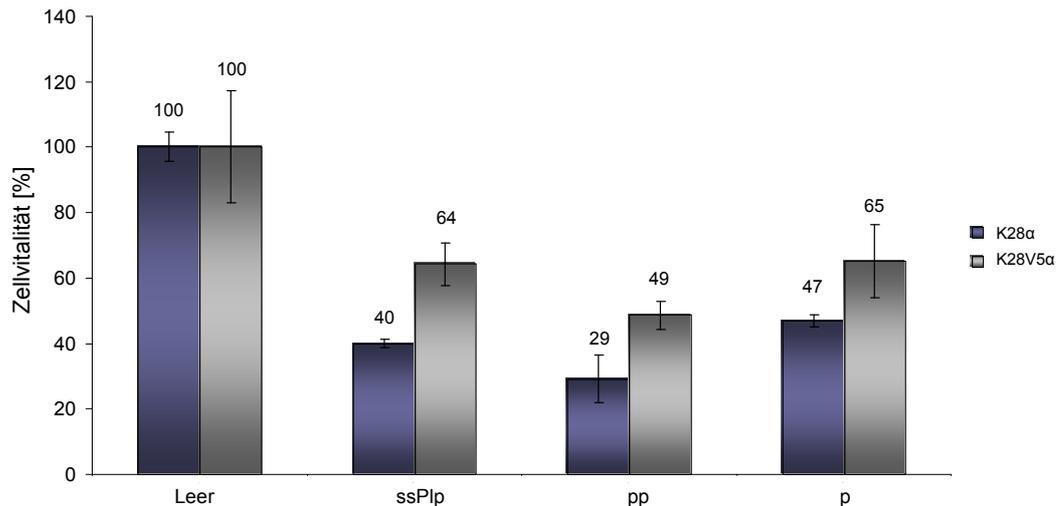


Abbildung 39: Vitalität von HeLa-Zellen nach Expression unterschiedlicher K28 α -Varianten. Gemessen wurde die Vitalität von 2×10^5 Zellen in einer 24er Wellplatte nach Transfektion mit den angegebenen K28 α -Varianten durch Bestimmung der Absorption bei 450 nm (XTT-Test). Die erhaltenen Werte wurden in Relation zum Leervektor gesetzt (Leervektor entspricht 100 %).

Zunächst wurden HeLa Zellen in einer 24-Well-Platte ausgesät, mit den V5-„getaggten“ Toxinstrukturen transfiziert und nach 8 h der Proteasominhibitor MG132 (8 μ M) appliziert. Nach 24 h wurden die Zellen mittels RIPA-Puffer aufgeschlossen. Nach Präzipitation in 10 % TCA konnte K28 α in allen Ansätzen im Western-Blot nachgewiesen werden. Da im Falle des co-translationalen ER-Imports die Translokation mit Abspaltung der Signalsequenz einhergeht, war es für ssPlpV5 α nur möglich die bereits prozessierte Proteinform zu detektieren, die pV5 α entsprach. Über Expression mittels toxineigener post-translationaler Importsequenz konnte neben der gereiften Form auch ein Signal des Vorläuferproteins nachgewiesen werden (ABBILDUNG 40). Ein Unterschied zur Expression in Hefe liegt in der fehlenden Prozessierung der Pro-Region während des Toxin-Transports. Dies spricht entweder dafür, dass K28 α in höheren Eukaryonten nicht über den Golgi transportiert wird, um dort prozessiert zu werden, oder dass die Spaltsequenz der Furin-ähnlichen Kex2p Endopeptidase in humanen Zellen nicht erkannt wird. Da die zytosolisch exprimierte Toxinvariante ebenfalls einen stark toxischen Effekt zeigte, der sich von ssPlp(V5) α nicht wesentlich unterschied, kann zudem davon ausgegangen werden, dass ein potentieller Transport über den Golgi-Apparat sowie eine Abspaltung der Pro-Region in Säugerzellen nicht zur Vermittlung der Toxizität beiträgt.

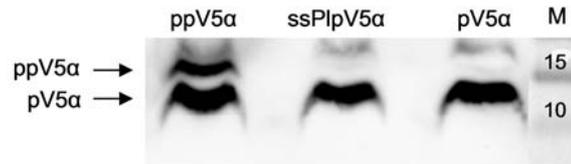
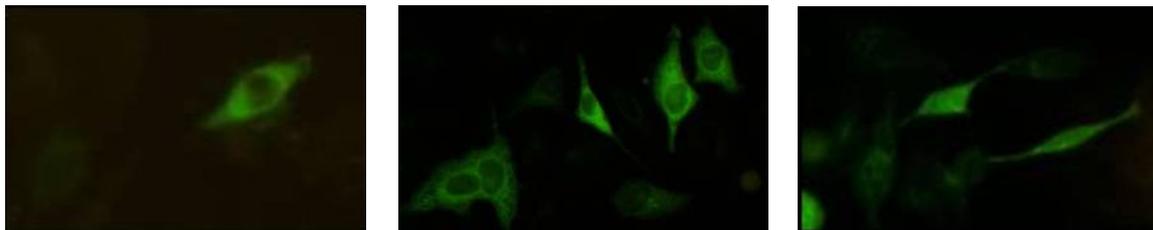


Abbildung 40: Western-Analyse eines Zellextraktes von HeLa-Zellen 24 h nach Transfektion mit verschiedenen K28 α -Varianten. Jeweils 6×10^5 Zellen der mit den angegebenen K28 α -Konstrukten transfizierten und mit MG132 (8 μ M) behandelten Zellen wurden zum Zellaufschluss und anschließender SDS-PAGE und Western-Analyse eingesetzt. Der Proteinnachweis erfolgte mit anti-V5.

In einem weiteren Ansatz wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und analog zur Western-Analyse behandelt. Statt die Zellen zu ernten, wurden sie nach 24 h mit Methanol fixiert und anschließend mit einem primären anti-V5-Antikörper und einem sekundären FITC-gekoppelten anti-Maus-Antikörper behandelt. ABBILDUNG 41 zeigt nach Expression von ssPlpV5 α und ppV5 α eine Verteilung der Fluoreszenzsignale im Sekretionsweg, wobei die netzartige Struktur des ER dominierte. Die Expression von pV5 α zeigte dagegen eine gleichmäßig grüne Färbung der Zelle, die auf eine zytosolische Lokalisation der Toxin-Variante schließen lässt.



A: ssPlpV5 α

B: ppV5 α

C: pV5

Abbildung 41: Indirekte Immunfluoreszenz von HeLa-Zellen nach 24-stündiger Transfektion mit K28V5 α -Derivaten. Die Zellen wurden für 1 h mit dem primären anti-V5-Antikörper (1:100) und im Anschluss für 1 h mit FITC-anti-Maus-Antikörper (1:500) behandelt. Die Detektion erfolgte im Biozero BZ-8000 (Keyence).

3.8.4 Bestimmung des toxischen Effekts nach Toxinexpression

Da zuvor gezeigt werden konnte, dass K28 α einen toxischen Effekt auf Säugerzellen ausübt, sollte im folgenden untersucht werden, ob auch hier ein Zellzyklus-Arrest auftritt oder analog zu anderen A/B-Toxinen, wie beispielsweise dem Diphtherie-Toxin oder Ricin, Apoptose induziert wird (JETZT *ET AL.*, 2012; WEINRAUCH UND ZYCHLINSKY, 1999).

Apoptose kann aufgrund einer anhaltenden Präsenz fehlgefalteter Proteine induziert werden. Um die Auswirkungen von K28 α auf humane Zellen genauer zu bestimmen, wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen K28 α -Varianten transfiziert, nach 24 h geerntet, mit Methanol fixiert und die DNA mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. Mittels Durchflusszytometrie wurde der DNA-Gehalt der behandelten Zellen bestimmt, um anhand von Fluoreszenz und Größe Rückschlüsse auf einen Zellzyklus-Arrest oder eine einsetzende Apoptose zu ziehen. P1 umfasst kleine DNA-Stücke, was auf eine Fragmentierung der Nukleinsäuren und somit auf Apoptose hinweist. P2 repräsentiert einen einfachen DNA-Gehalt und somit die G1-Phase, der sich mit P3 die G2-Phase mit einem vollständig replizierten Chromosomensatz anschließt. ABBILDUNG 42 zeigt die erhaltene Ergebnisse der FACS-Analyse, die in ABBILDUNG 42E zusammengefasst wurde. Dargestellt ist die Abweichung der verschiedenen Zellzyklusphasen von der mit dem Leervektor pmCherry transfizierten Negativkontrolle. Nach Expression der Toxin-Variante befanden sich signifikant weniger Zellen in den beiden Zellzyklusphasen G1 und G2. Zellen in der G1-Phase wurden um 1-8 %, in der G2-Phase um 7-12 % reduziert. Der Gehalt an apoptotischen Zellen stieg jeweils um die Summe der Reduktion der G1- und G2-Phase an. Während es nach Expression von ssPIp α lediglich zu einer verstärkten Apoptose um 10 % und nach Expression von p α um 8 % kam, befanden sich nach Transfektion mit pp α 20 % mehr Zellen in der Apoptose als nach Behandlung mit dem Leervektor. Dabei wird deutlich, dass es, entgegen der Wirkung von K28 α auf Hefen, nicht zu einem G1-Arrest und somit zu einem Effekt auf den Zellzyklus kommt, sondern Apoptose induziert wird, was einer allgemeinen Wirkung von A/B-Toxinen auf höhere Eukaryonten gleichkommt.

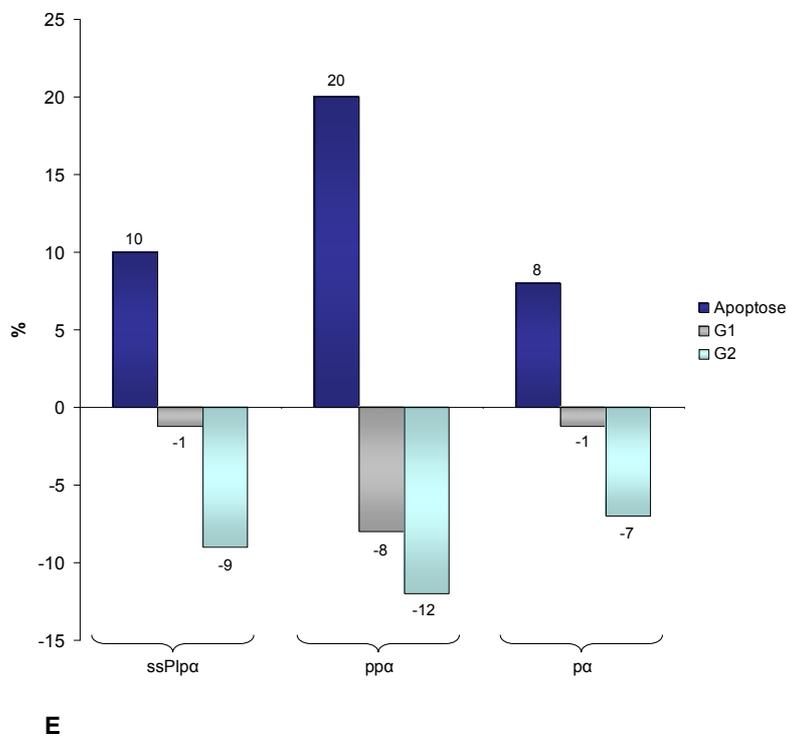
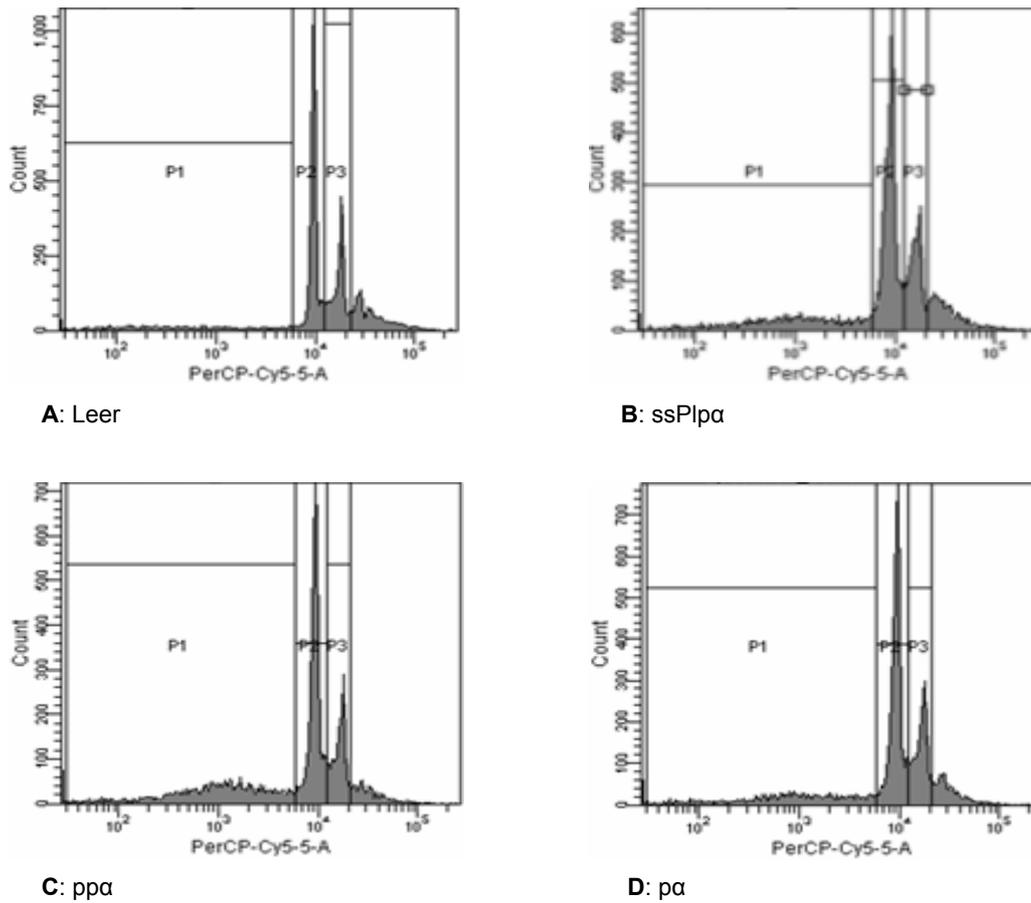


Abbildung 42: Durchflusszytometrische Analyse des relativen DNA-Gehaltes von HeLa-Zellen 24h nach Transfektion mit verschiedenen K28 α -Varianten. **A—D:** P1= apoptotische Zellen, P2= Zellen in der G1-Phase; P3= Zellen in der G2-Phase. **E:** Änderung des DNA-Gehalts nach Expression von K28 α im Vergleich zur Kontrolle nach Transfektion mit dem Leervektor.

Ein frühes Ereignis der Apoptose ist die Translokation von Phosphatidylserin (PS) von der inneren zur extrazellulären Seite der Plasmamembran. Um die Aussage, dass K28 α in HeLa-Zellen Apoptose induziert weiter zu untermauern, sollte untersucht werden, ob dieser Apoptose-Marker nachgewiesen werden kann. Annexin V zeichnet sich durch eine starke Affinität zu PS aus und kann aufgrund dieser Eigenschaft zum apoptotischen Nachweis einer PS-Translokation eingesetzt werden (MARTIN *ET AL.*, 1995).

Dazu wurden HeLa-Zellen transfiziert und nach 48 h sowohl mit FITC-gekoppeltem Annexin V sowie mit Propidiumiodid (PI) behandelt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die Färbung mit PI dient der Kontrolle, dass Annexin V das Phosphatidylserin nur auf der extrazellulären Seite gebunden hat und nicht aufgrund von Läsionen der Plasmamembran in die Zelle eindringen konnte (ABBILDUNG 43, LINKE SPALTE). In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen vor der Behandlung mit FITC-Annexin V mit nicht-markiertem Annexin V geblockt, um die Spezifität der Bindung zu bestätigen. Wie erwartet kam es nach Expression aller K28 α -Varianten zu einer Bindung von FITC-Annexin V an die Zelloberfläche. Eine Internalisierung konnte aufgrund des ausgebliebenen PI-Signals ausgeschlossen werden. Wurde das exponierte PS zuvor mit nicht-markiertem Annexin V geblockt, war keine Fluoreszenz mehr erkennbar (ABBILDUNG 43, RECHTE SPALTE).

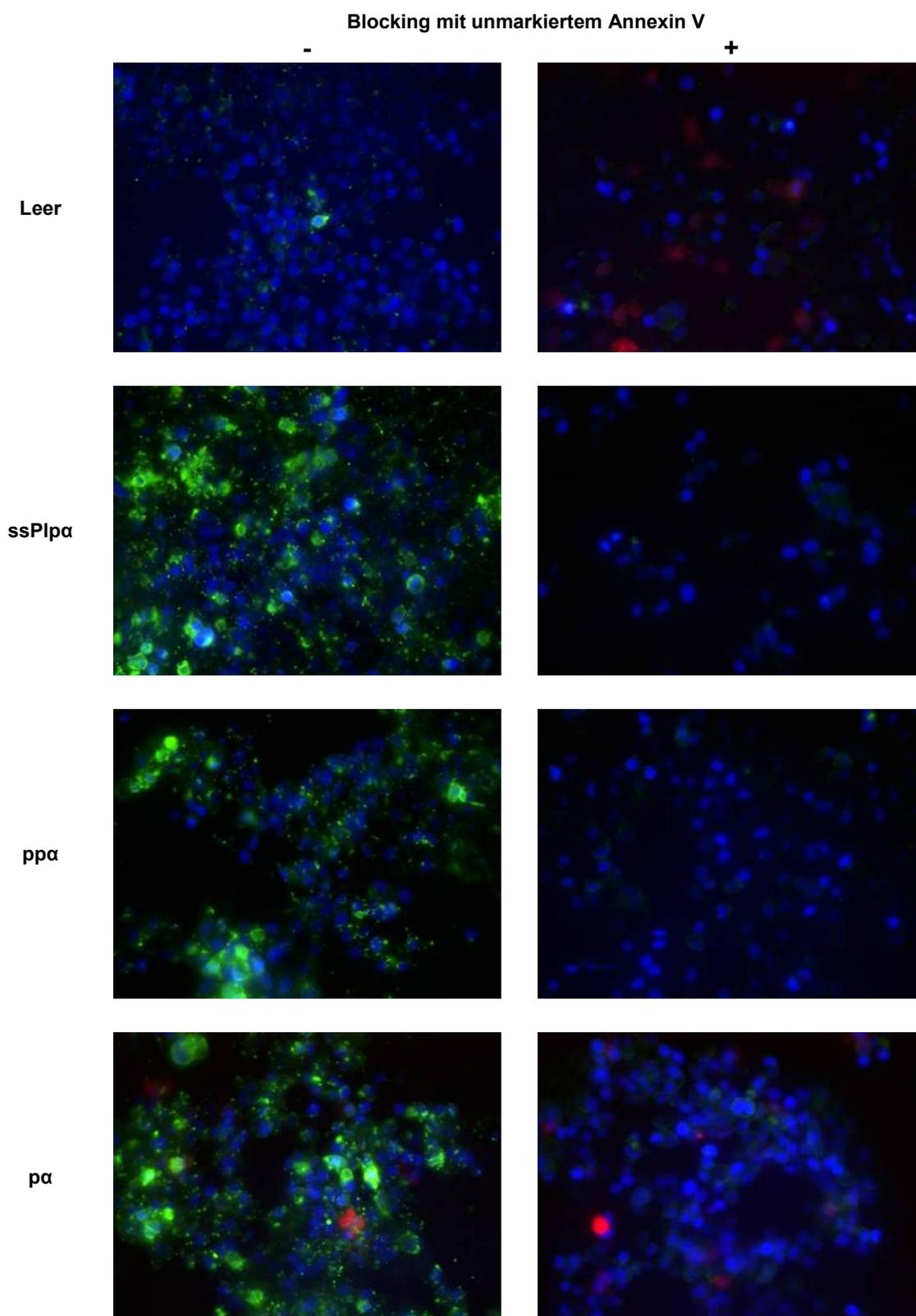


Abbildung 43: Annexin V/Propidium-Iodid Färbung von HeLa-Zellen zum Nachweis einer PS-Translokation nach K28 α -Expression. Es wurden 1×10^5 Zellen pro 24er Well auf Deckgläschen ausgesät, nach 24 h mit verschiedenen K28 α -Varianten transfiziert sowie nach 48 h mit Annexin V-FITC und PI behandelt. Die Deckgläschen wurden mit Mounting-Medium (DAPI) bedeckt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Apoptotische Zellen erscheinen grün und gleichzeitig PI-negativ. Die Detektion erfolgte im Biozero BZ-8000 (Keyence).

3.8.5 Rolle des proteasomalen Abbaus in HeLa-Zellen

Die meisten A/B-Toxine werden nach Endozytose und retrogradem Transport zum ER mit Hilfe von ERAD-Komponenten in das Zytosol exportiert. Aufgrund eines niedrigen Lysingehalts und einer schnellen Rückfaltung entgehen die Toxine weitgehend einem proteasomalen Abbau, der üblicherweise am Ende der ER-Qualitätskontrolle steht. Beispielsweise für Cholera Toxin und Ricin konnte ein Zusammenhang von Lysingehalt, proteasomalem Abbau und Toxizität hergestellt werden (DEEKS *ET AL.*, 2002; RODIGHIERO *ET AL.*, 2002). Spielt die Erkennung über ERAD auch für K28 α eine Rolle, so wird vermutlich auch ein Teil des Toxins durch das Proteasom abgebaut oder es benötigt die Markierung dieser Aminosäure mit Ubiquitin als treibende Kraft für die anschließende Retrotranslokation. Um biochemisch den Toxin-Gehalt mit der proteasomalen Aktivität in Zusammenhang zu bringen, wurde nach Zellaufschluss die Signalstärke von ssPlpV5 α nach 24-stündiger Expression in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen des proteasomalen Inhibitors MG132 ermittelt. ABBILDUNG 44 zeigt eine Zunahme der Signalstärke für ssPlpV5 α mit steigender MG132-Konzentration von 4-40 μ M.

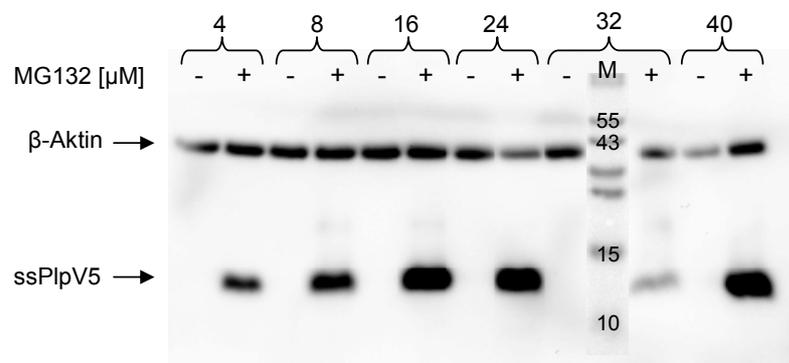


Abbildung 44: Western-Analyse von 6×10^5 HeLa-Zellen 24h nach Transfektion mit ssPlp α in Gegenwart bzw. Abwesenheit des Proteasominhibitors MG132. Der Proteinnachweis erfolgte mit anti-V5 sowie anti- β -Aktin.

Da dieses Ergebnis noch keinen Rückschluss auf die genaue Rolle des proteasomalen Abbaus zuließ, sollte untersucht werden, ob das Proteasom K28 α im Zuge der ER-Qualitätskontrolle abbaut oder ob ein Teil des Toxins der Degradation unterliegt, nachdem es Komponenten der ER-assoziierten Degradation zu seiner Dislokation genutzt hat. Um feststellen zu können, ob K28 α in Säugerzellen ebenfalls von ERAD-Komponenten erkannt werden kann, wurde eine lysinfreie Toxinvariante auf ihre *in vivo* Toxizität untersucht

In Hefe führt die Substitution der drei Lysinreste durch Alanin zu einer Steigerung der Sensitivität um rund 50 %. Dadurch wurde gezeigt, dass ein Teil des intrazellulär exprimierten Toxins dem proteasomalen Abbau unterliegt.

Die lysinfreien Toxinvarianten führten in HeLa-Zellen nach 48-stündiger Expression zu einer reduzierten Vitalität im Vergleich zur Negativkontrolle (ssPlpα -60%; ppa -71%, pa -53%), wobei der Effekt trotz gleichbleibender Tendenz der verschiedenen K28α-Varianten im Vergleich zu den lysinhaltigen Formen weniger stark ausgeprägt war (ABBILDUNG 45). Die Differenz betrug nach Expression von ssPlpα +36 %, von ppa +27 % und von pa +20 %. Im Unterschied zur Situation in Hefe benötigt K28α in höheren Eukaryonten die internen Lysinreste, um seine volle Toxizität zu entfalten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass K28α in höheren Eukaryonten, analog zu anderen A/B-Toxinen, ERAD-Komponenten für den ER-Export nutzt.

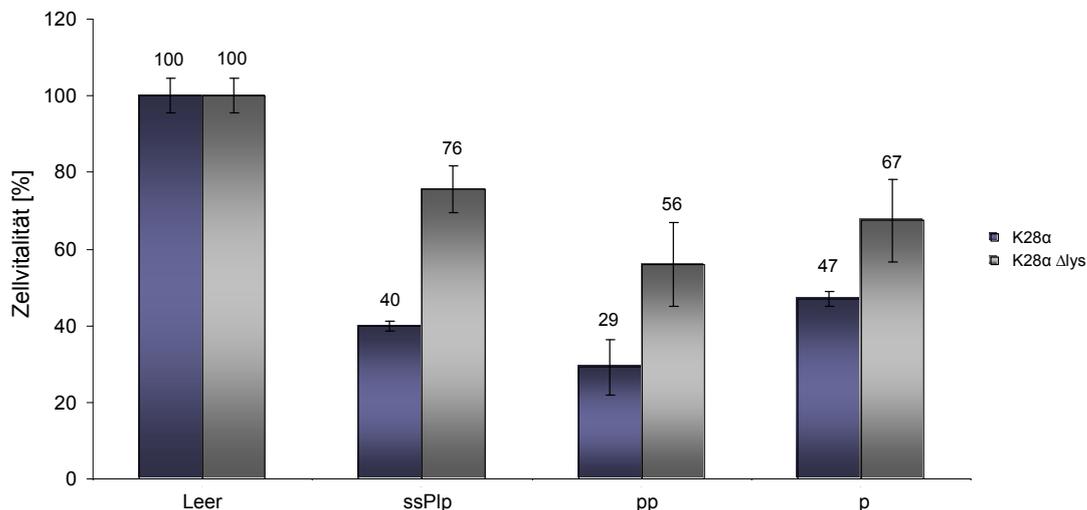


Abbildung 45: Vitalität von HeLa-Zellen nach Expression unterschiedlicher K28α-Varianten. Gemessen wurde die Vitalität von 2×10^5 Zellen in einer 24er Wellplatte nach Transfektion mit den angegebenen K28α-Varianten durch Bestimmung der Absorption bei 450 nm (XTT-Test). Die erhaltenen Werte wurden in Relation zum Leervektor gesetzt (Leervektor entspricht 100 %).

3.8.6 Bestimmung des toxischen Effekts nach Applikation des reifen Heterodimers

Die bakteriellen Toxine Cholera Toxin und *Pseudomonas* Exotoxin A sowie das Pflanzentoxin Ricin interagieren nach endozytotischer Aufnahme im Golgi mit KDEL-Rezeptoren und werden anschließend in COPI-Vesikeln zum ER transportiert. Unter sauren pH-Bedingungen bindet der KDEL-Rezeptor seinen Liganden sehr effizient. Bei neutralem bzw. basischem pH wird diese Bindung signifikant schwächer, wodurch die Assoziation von KDEL-Proteinen mit dem Rezeptor im Golgi und ihre Entlassung im ER mit dem unterschiedlichen pH-Wert in diesem Kompartimenten korreliert (WU *ET AL.*, 2001). Mittlerweile konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass KDEL-Rezeptoren nicht nur in ER und Golgi lokalisiert sind, sondern auch in geringen Mengen in der Plasmamembran vorkommen (BECKER *ET AL.*; MANUSKRIPT IN VORBEREITUNG). In Hefe wird auf diese Weise das Killertoxin K28 durch Interaktion mit dem HDEL-Rezeptor Erd2p endozytiert. Auch in humanen Zellen identifizierten PELHAM UND LEWIS KDEL-Rezeptoren mit einer 50 %igen Identität zu Erd2p in *S. cerevisiae* (LEWIS UND PELHAM, 1990). Vor diesem Hintergrund sollte eine Applikation des Toxins, ebenfalls eine Wirkung auf höhere Eukaryonten besitzen. Eine Schwierigkeit dieses Versuchsansatzes bestand in der Diskrepanz des pH- und Temperaturoptimums von Toxin und Testorganismus. Während K28 seine optimale Aktivität bei einem pH-Wert von 4,7 und einer Temperatur von 20°C entfaltet, liegt das pH-Optimum von Säugerzellen sowie säuger-spezifischen A/B-Toxinen in der Regel bei 7,3 und einer Temperatur von 37°C. Diese Ansprüche sollten einander angenähert werden. In bisherigen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass K28 bei einem pH-Wert von 5,8 nur eine leicht verringerte Aktivität besitzt, die jedoch bei pH 7 völlig zum Erliegen kommt, da unter diesen Bedingungen ein Großteil des Toxins vermutlich zur Vakuole transportiert wird. Alternativ könnte es aufgrund einer Konformationsänderung zu einer veränderten Aufnahme oder einem modifizierten Toxintransport kommen (SPINDLER, 2004). Durch Zellaufschluss konnte bereits gezeigt werden, dass K28 internalisiert wird und dass die Toxinaufnahme durch Hemmung der Endozytose inhibiert werden kann. Aufgrund einer unzureichenden Negativkontrolle konnte jedoch anhand des XTT-Tests (KLEIN, 2009) und der DNA-Neusynthese (KELKEL, 2009) keine Aussage über die Toxinwirkung getroffen bzw. in FACS-Analysen keine Auswirkung auf Zellzyklus oder Apoptoserate beobachtet werden (SPINDLER, 2004). Eine Mikroinjektion des Toxins führte zum Ablösen der Zellen, allerdings wurden über diese morphologische Bestimmung hinaus keine weiteren Untersuchungen zur Toxinwirkung an Säugerzellen angeschlossen (KELKEL, 2009).

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden 2×10^5 HeLa-Zellen mit Toxinkonzentrat pH 4,7 aus *S. cerevisiae* (Endkonzentration 40 %) versetzt, so dass im Reaktionsansatz ein pH-Wert von 5,9 vorlag. Darüber hinaus wurden die Inkubationszeit früherer Untersuchungen von 2 h auf 24 h bzw. 48 h erhöht und als Kontrolle McIlvaine Puffer sowie hitzeinaktiviertes Toxinkonzentrat (60°C, 15 min) verwendet.

Wie aus ABBILDUNG 46 hervorgeht, führte die Applikation von K28 in HeLa-Zellen zu keinem toxischen Effekt. Nach 24 h zeigten die toxinbehandelten Zellen eine Vitalität von 103 % im Vergleich zur Pufferkontrolle, die nach 48 h lediglich auf 96 % zurückging. Die Behandlung mit hitzeinaktiviertem K28 ergab mit einer Vitalität von 106 % nach 24 h und 97 % nach 48 h einen ähnlichen Effekt.

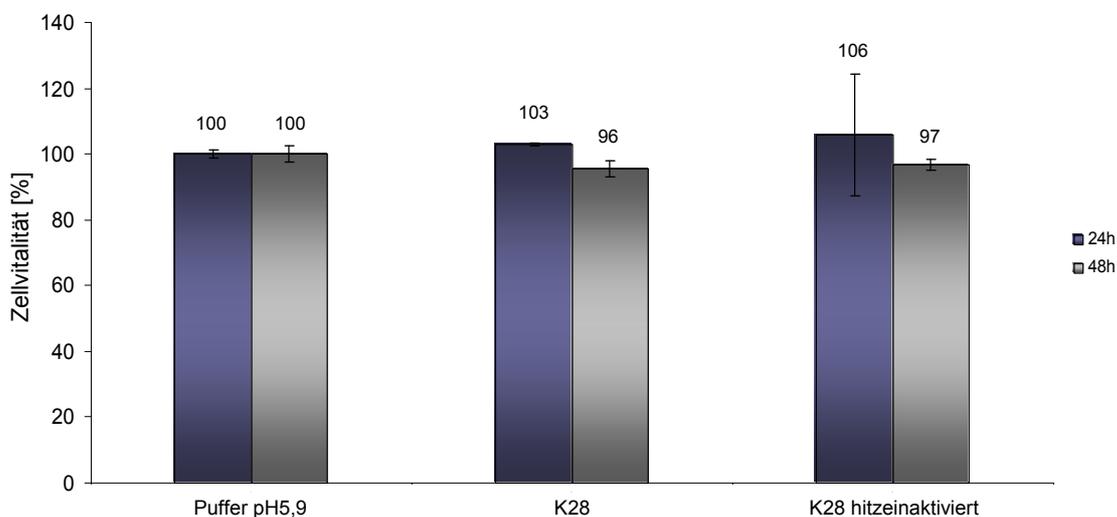


Abbildung 46: Vitalität von HeLa-Zellen nach Expression unterschiedlicher K28 α -Varianten. Gemessen wurde die Vitalität von 2×10^5 Zellen in einer 24er Wellplatte nach Transfektion mit den angegebenen K28 α -Varianten durch Bestimmung der Absorption bei 450 nm (XTT-Test). Die erhaltenen Werte wurden in Relation zum Leervektor gesetzt (Leervektor entspricht 100 %).

Um genauer einzugrenzen, ob die Resistenz der humanen Zellen auf Temperatur oder pH-Wert bzw. auf eine fehlende Interaktion von Hefe-Toxin und humanen KDEL-Rezeptoren zurückzuführen ist, wurden die entsprechenden Versuchsbedingungen auf das etablierte Hefe-System übertragen, und im MBA-Test entsprechend angeglichen.

Eine Δerd2 -Deletionsmutante (YA12) ist aufgrund einer Überexpression von Sec12p weiterhin lebensfähig und verhält sich resistent gegen K28. Dieser Effekt kann bei pH 4,7 und einer Inkubationstemperatur von 20°C durch die Expression der humanen KDEL-Rezeptoren Erd2.2 bzw. Erd2.3 vollständig komplementiert werden. Bei einem erhöhten pH-Wert von 5,9 kam es jedoch bereits im Wildtyp (*ERD2*) zu einer starken Reduktion der Toxinsensitivität, wobei sich der Durchmesser des Hemmhofes um mehr als die Hälfte reduzierte. Unter diesen Bedingungen konnte die Expression der K/HDEL-Rezeptoren Erd2.2 und Erd2.3 den Funktionsverlust von Erd2p nicht mehr kompensieren. Bei einer Temperatur von 37°C war unabhängig vom pH-Wert keine Toxizität mehr erkennbar.

Tabelle 44: K28-Phänotyp der Δerd2 -Deletionsmutante YA12 nach Komplementation mit den humanen KDEL-Rezeptoren ERD2,2 und ERD2,3. Die Sensitivität wurde nach Applikation des K28-Dimers im MBA-Test bestimmt.

Stamm	øHemmhof pH4,7 [mm]		øHemmhof pH5,9 [mm]	
	20°C	37°C	20°C	37°C
Δerd2 (pERD2)	26	0	[12]	0
Δerd2 (pERD2.2)	26	0	0	kein Wachstum
Δerd2 (pERD2.3)	26	0	0	kein Wachstum

Es zeigte sich, dass es aufgrund der pH-Änderung vermutlich zu einer Störung der Internalisierung von K28 kam, da die Sensitivität bereits im Wildtyp (*ERD2*) erheblich eingeschränkt war. Im Testsystem für Hefe scheint sich dieser Effekt für die Säugerhomologe noch etwas stärker zu manifestieren, da die Bindung des Toxins vermutlich für den hefespezifischen Rezeptor optimiert ist.

4 Diskussion

Ungeachtet der Ähnlichkeiten bezüglich ihrer Synthese unterscheiden sich die Killertoxine K1, K2 und K28 der Bäckerhefe in ihren biochemischen Eigenschaften sowie ihrer Wirkungsweise. Das Killertoxin K1 zerstört den elektrochemischen Ionengradienten der Plasmamembran, was zu einem unkontrollierten Ausstrom von K^+ -Ionen und kleinen Molekülen führt. Im Gegensatz dazu, ist die Aktivität von K28 abhängig vom Transport über den retrograden sekretorischen Weg und resultiert in der irreversiblen Hemmung der DNA-Synthese sowie eines G1/S-Arrestes des Zellzyklus bzw. der Apoptose (DE LA PENA ET AL., 1981; EISFELD ET AL., 2000). Auch die Toxine aus *Pichia acaciae* und *Kluyveromyces lactis* arretieren den Zellzyklus in der S-Phase bzw. G1-Phase. Ungeachtet dessen, erscheint die Aktivität vieler Killertoxine komplex, da sie abhängig von der Toxin-Konzentration auf verschiedene Mechanismen zurückzuführen ist (BUTLER ET AL., 1991).

K28 wird in zwei Schritten endozytotisch von der Zielzelle aufgenommen und retrograd über Endosomen und den Golgi bis zum ER transportiert. Über einen bisher unbekanntem Mechanismus wird das Toxin in das Zytosol exportiert und dissoziiert in seine beiden Untereinheiten (α bzw. β), wonach $K28\alpha$ zu seinem „target“ in den Nukleus gelangt. Wird die toxische Untereinheit über ein Plasmid intrazellulär exprimiert sichert eine Signalsequenz zunächst den Import in das ER. Dem weiteren Weg über den Golgi-Apparat wieder zurück zum ER schließt sich analog zum reifen Toxin die Retrotranslokation in das Zytosol sowie der Transport in den Kern an (SCHMITT UND BREINIG, 2006).

Auch bakterielle Vertreter von A/B-Toxinen nutzen verschiedene Schritte des Membrantransports, um in das Zytosol der Wirtszelle zu gelangen und schließlich ihr molekulares „target“ zu erreichen. Sie besitzen unterschiedliche intrazelluläre „targets“ und entfalten heterogene enzymatische Aktivität, wie die ADP-Ribosylierung von Proteinen oder die Spaltung eines Adeninrestes der 28S rRNA. Um in das Zytosol zu gelangen, nutzen sie den Pathway der ER-assoziierten Degradation (ERAD), entgehen jedoch größtenteils der damit verbundenen Proteolyse (LORD ET AL., 2003).

Für das K28-Dimer wurde ein analoger Mechanismus bisher ausgeschlossen. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass luminale Chaperone, die in einigen Fällen auch eine Rolle im ERAD-Pathway spielen, an der Dislokation beteiligt sind und temperatursensitiven *sec61* Mutanten eine verminderte Toxinsensitivität besitzen (HEILIGENSTEIN, 2008). Für das artifizielle System der Expression von K28 α war es bisher nicht möglich, ein geeignetes Testsystem zu etablieren, um geringfügige Sensitivitätsunterschiede in Mutanten des intrazellulären Transports nachweisen zu können. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit das Expressionssystem der K28 α -Untereinheit optimiert, beteiligte Pathways zugeordnet und mit der Wirkung auf höhere Eukaryonten verglichen werden.

Intrazelluläre Expression von K28 α in Hefe

In früheren Untersuchungen wurde bereits festgestellt, dass K28 α nach intrazellulärer Expression einen Selbstkillerphänotyp ausbildet und es gelang anhand der resultierenden Sensitivität im Vergleich zu zahlreichen Deletionsmutanten erste Vorstellungen über den Transportweg des Toxins zu erhalten (KELKEL, 2009). Da vermutlich wenige Toxinmoleküle ausreichen, um eine Zelle abzutöten, war es aufgrund einer zu hohen Toxinkonzentration bislang jedoch nicht möglich, die für den intrazellulären Toxintransport verantwortlichen, meist parallelen Pathways, eindeutig zu identifizieren. Eine Veränderung einzelner Transportschritte durch den Einsatz entsprechender Deletionsmutanten beeinflusste das „targeting“ des Toxins nicht in dem Maße, dass hieraus eine signifikante Änderung der Sensitivität resultierte. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des *GALS*-Promotors ein optimiertes Testsystem etabliert, das auf einer reduzierten Toxinexpression beruht, um so Unterschiede in der Transporteffizienz gezielter darstellen zu können. Darüber hinaus diente es dazu, genauere Unterschiede in der Toxinsensitivität im zeitlichen Verlauf zu betrachten, statt wie bisher lediglich den terminalen Phänotyp im seriellen Verdünnungstest zu bestimmen. Der *GALS*-Promotor, der im Vergleich zu *GAL1* um eineinhalb UAS-Elemente verkürzt ist, wurde ursprünglich zur Expression von Genen generiert, die für Hefe essentiell, jedoch nach Überexpression toxisch sind. Wie *GAL1*, wird auch *GALS* durch Glukose vollständig reprimiert und durch Galaktose induziert.

Anhand des β -Galaktosidase-Assays war es somit möglich, nach Induktion von *GAL1-lacZ* bzw. *GALS-lacZ* die Umsetzung von X-Gal zu bestimmen und somit die resultierende Enzymaktivität als Konsequenz einer reduzierten Genexpression nachzuweisen, die jedoch nicht immer einer linearen Korrelation zur Expressionsstärke folgt. Die Aktivität von 181 U lag bei Expression unter Kontrolle von *GALS* nur noch bei 12,9 U, was einer Reduktion um das 14-fache gleich kommt.

Abhängig von *GALS* führte die Expression von K28 α verglichen mit *GAL1* zu einer um 40 % reduzierten Toxizität. Der toxische Effekt wurde dabei anhand der optischen Dichte nach Expression des Leervektors (Negativkontrolle) bzw. des Toxins über einen Zeitraum von 24 h bestimmt und über die maximale Differenz der OD₆₀₀ beider Ansätze definiert. Entspricht die Toxinwirkung nach K28-Expression über *GAL1* 100 %, so ergab sich nach Substitution durch *GALS* nur noch eine Aktivität von 60 %. Im seriellen Verdünnungstest bildete der Teststamm noch bis zu einer aufgetropften Zellzahl von 10⁴ eine Kolonie aus, während nach Toxinexpression unter Kontrolle von *GAL1* nur eine Verdünnung von 10⁶ Zellen die letale Wirkung von K28 α überlebte. Ein immunologischer Nachweis der Expression von K28 α konnte nicht erbracht werden, da auch nach Variation von Zellzahl und Expressionsdauer keine Signale in der Western-Analyse erhalten werden konnten. Für weitere Untersuchungen wurden zahlreiche Deletions- und „knock-down“-Mutanten auf gleiche Weise untersucht und mit dem toxischen Effekt des Wildtyps in Relation gesetzt, wobei dieser 100 % entsprach. Eine veränderte Sensitivität sollte Aufschluss über die Beteiligung verschiedener Pathways am Toxintransport geben.

Terminaler Phänotyp nach intrazellulärer Expression von K28 α

Nachdem das Testsystem zur intrazellulären Expression von K28 α optimiert werden konnte, sollte festgestellt werden, ob die Auswirkungen der α -Untereinheit auf die Zelle mit der Applikation des K28-Dimers gleichzusetzen ist. Verglichen mit ionophoren Killertoxinen wie K1 oder Zygocin, die Poren in der Plasmamembran ausbilden, besitzt K28 einen komplexeren Wirkmechanismus. Nach endozytotischer Aufnahme und retrogradem Transport zum ER wird K28 in das Zytosol exportiert. Während die β -Untereinheit proteasomal abgebaut wird, gelangt die α -Untereinheit in den Zellkern, wo sie den Zellzyklus am Übergang der G1- zur S-Phase arretiert und die DNA-Synthese hemmt (SCHMITT *ET AL.*, 1989).

K28 ist ebenfalls analog zu K1 sowie den Zellzyklus-arretierenden Toxinen PMKT und PaT in der Lage, in Abhängigkeit der Toxinkonzentration Apoptose zu induzieren (IVANOVSKA UND HARDWICK, 2005; SANTOS UND MARQUINA, 2011). Nach zehnstündiger Applikation von K1, Zygozin oder K28 konnten entsprechende Charakteristika der Apoptose wie DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation und Translokation von Phosphatidylserin auf die extrazelluläre Seite der Plasmamembran beobachtet werden, obwohl sich die primäre Zytotoxizität bei hohen Toxinkonzentrationen signifikant unterscheidet (SCHMITT UND BREINIG, 2006). Vermutlich handelt es sich bei der Induktion der Apoptose im Vergleich zur ionophoren bzw. zellzyklusarretierenden Wirkung um eine Wirkung, die der vergleichsweise geringe Toxinkonzentration im natürlichen Habitat von Killerhefen entspricht (BUTTNER *ET AL.*, 2006; REITER *ET AL.*, 2005). Auch nach intrazellulärer Expression von K28 α unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors wurden äquivalente Apoptose-Marker beobachtet (REITER, 2004). In der vorliegenden Arbeit konnten nach Expression der α -Untereinheit über *GALS* anhand einer durchflusszytometrischen Analyse jedoch keine Anhaltspunkte auf Induktion von programmiertem Zelltod erhalten werden. Das Resultat entsprach eher dem Effekt nach Applikation hoher Konzentrationen des Heterodimers, die einen G1/S-Arrest zur Folge hat. Die G1-Phase stellt einen Kontrollpunkt dar, an dem entschieden wird, ob ein Zyklus eingeleitet werden kann. Nach Replikation der DNA in der S-Phase, folgt die G2-Phase, in der die Zellteilung vorbereitet und ein weiteres Mal geprüft wird, ob die Zellteilung durchgeführt werden kann. In der anschließenden Mitose erfolgt die Trennung der homologen Chromosomen sowie die Zytokinese. Sind die Umgebungsbedingungen ungünstig, kann die Zelle in eine Ruhephase, die sogenannte G0-Phase übergehen. Nach Toxin-Applikation bildet die Hefezelle eine mittelgroße Knospe aus, besitzt einen einfachen DNA-Gehalt (1n) und arretiert am G1/S-Übergang nach dem „Start“-Punkt. Dieser Phänotyp repräsentiert einen untypischen G1-Arrest, da hierbei unter regulären Bedingungen keine Tochterzelle ausgebildet wird. Dieser Phänotyp deutet eher auf einen S-Phase-Arrest hin, was den Schluss zulässt, dass K28 einen pleiotropen Effekt auslöst und mehrere „targets“ besitzt. Diese Annahme entspricht auch bisherigen Beobachtungen, in denen die Behandlung mit K28 α Einfluss auf die RNA-PolIII-abhängige Transkriptionsmaschinerie und somit auf die globale Transkription ausübt. Auch „target“-Gene der Transkriptionsfaktoren SBF und MBF sind betroffen, die die Passage aus der G1 zur S-Phase steuern.

Hemmt K28 die Transkription, die durch SBF und MBF kontrolliert wird, kann dieser Übergang nicht stattfinden und es kommt zu einem G1/S-Arrest (HOFFMANN, 2013). K28 interagiert darüber hinaus mit Untereinheiten des APC, der das Fortschreiten der M-Phase reguliert (REITER, 2004) sowie Regulatoren der G1/S-Zykline (KOCH *ET AL.*, 1999; WALKER *ET AL.*, 1997; YU *ET AL.*, 1996). Der beobachtete G1-Arrest des artifiziellen Systems von *GALS-K28 α* zeigte sich bereits nach vierstündiger Toxinexpression und wäre eventuell über einen längeren Zeitraum noch deutlicher ausgeprägt. Somit widerspricht der hier beobachtete Phänotyp den bisherigen Ergebnissen früherer Studien, wobei diesbezüglich keine Angaben über den Expressionszeitraum gemacht wurden. Des Weiteren ist unbekannt, wie viele Toxinmoleküle über die intrazelluläre Expression hergestellt und welche Menge zur Induktion des letalen Effekts benötigt werden. Daher bleibt der Zusammenhang von Toxinmenge und Wirkungsweise in Bezug auf *K28 α* wagen. Ob *K28 α* noch weitere Mechanismen beeinflusst, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

ERAD-Komponenten und Retrotranslokation von *K28 α*

Zu Beginn wird ein neusynthetisiertes Polypeptid anhand einer hydrophoben N-terminalen Signalsequenz zum ER geleitet und über den heterotrimeren Sec61-Komplex (Sec61p, Sbh1p und Sss1p) in das Lumen transloziert. Chaperone assistieren bei der Faltung, es entstehen Disulfid-Brücken, Proteine werden mit Glykanen verknüpft oder oligomerisieren zu höheren Komplexen, bevor sie im Anschluss an den Reifungsprozess in Transportvesikel verpackt und zum nächsten Kompartiment gelangen (JOHNSON UND VAN WAES, 1999). Etwa 30 % der neu synthetisierten Proteine werden fehlgefaltet (SCHUBERT *ET AL.*, 2000). Daher ist eine effiziente Beseitigung dieser defekten Proteine essentiell, da sie zum einen mit ihren funktionalen Varianten um Substratbindung bzw. Einbau in einen Proteinkomplex konkurrieren und zum anderen Aggregate ausbilden, die für die Zelle toxisch sein können (GOLDBERG, 2003). Daher ist eine strenge Qualitätskontrolle von Proteinen unverzichtbar, die bereits am Ort ihrer Synthese, dem Endoplasmatischen Retikulum, beginnt (TROMBETTA UND PARODI, 2003).

Damit verbunden ist zunächst die Erkennung des fehlerhaften Proteins sowie dessen Rekrutierung zur ER-Membran, wo sie über einen bisher lückenhaft beschriebenen Prozess den „bilayer“ überwinden und im Anschluss meist mit Ubiquitin markiert werden. Die Modifikation dient im klassischen System der ER-assoziierten Degradation (ERAD) der Kennzeichnung zur Proteolyse durch das Proteasom.

DELETION SOWIE ÜBEREXPRESSION KLASSISCHER ERAD-KOMPONENTEN

Fehlgefaltete Glykoproteine werden meist am Status ihrer Zuckerkomponenten von reifen Polypeptiden unterschieden. Im Zuge der N-Glykosylierung wird ein Oligosaccharid auf den Asparaginrest der Konsensussequenz Asn-X-Ser/Thr übertragen. Die Rolle dieser Modifikation sekretorischer Proteine ist noch nicht ganz verstanden, ist jedoch Teil eines Systems, das an der Faltung und Qualitätskontrolle von Proteinen im ER beteiligt ist (SCHWARZ UND AEBI, 2011). Das N-verknüpfte „core“-Oligosaccharid $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ wird weiter prozessiert, indem zunächst die drei terminalen Glukosereste abgespalten werden. Ist die Reifung nicht abgeschlossen, wird einer der Glukosereste wieder angefügt und ein weiterer Faltungszyklus eingeleitet (HELENIUS UND AEBI, 2004). Im Anschluss spaltet die Mannosidase Mns1p den terminalen Mannoserest, so dass das gereifte Glykoprotein aus dem ER exportiert werden kann (JAKOB *ET AL.*, 1998). Ist das Polypeptid fehlerhaft oder befindet sich zu lange im Faltungszyklus, entfernt Htm1p einen weiteren Mannoserest. Diese Form des Glykoproteins kann nun von Yos9p bzw. Hrd3p erkannt und einer ER-Degradation zugeführt werden (JAKOB *ET AL.*, 2001).

Die ER-assoziierte Degradation wird nicht ausschließlich von fehlgefalteten Proteinen durchlaufen, sondern kann auch A/B-Toxinen, die sich als ERAD-Substrat tarnen, die Retrotranslokation aus dem ER ermöglichen. Somit sind Toxine native und biologisch aktive Substrate des ER-Exports, deren Toxizität gegenüber eukaryotischen Zellen genutzt werden kann, um ERAD-Komponenten der Retrotranslokation zu identifizieren. Hefestämme mit Defekten im ER-Export stabilisieren beispielsweise die A-Kette (RTA) des Pflanzentoxins Ricin im ER-Lumen und verhalten sich toxinresistent. Auf diese Weise wurde anhand von Deletionsmutanten der Transport von RTA untersucht und beobachtet, dass ein signifikanter Teil nach dem ER-Export mit Hilfe von ERAD-Komponenten degradiert wird (LI *ET AL.*, 2010). Das übrige Toxin wird zu einer aktiven Konformation gefaltet, interagiert mit dem Ribosom, inhibiert die Proteinsynthese und hemmt somit das Zellwachstum (ENDO *ET AL.*, 1987).

Auch nach Expression der K28 α -Untereinheit konnte ein Zusammenhang zwischen Toxintransport und Nutzung klassischer ERAD-Komponenten nachgewiesen werden. Zunächst war es nicht möglich, eine verringerte Toxizität nach Expression des Letalkonstruktes in einer $\Delta htm1$ - bzw. $\Delta yos9$ -Deletionsmutante zu bestätigen. Vielmehr war im Wachstumstest eine Hypersensitivität zu beobachten (ABBILDUNG 47). Eine gesteigerte Sensitivität stellte sich ebenfalls nach Deletion von *HRD3* ein, was in früheren Studien nicht beobachtet wurde (KELKEL, 2009). In der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) wurde bereits eine Interaktion von K28 α mit Yos9p nachgewiesen, das sowohl glykosylierte als auch nicht-glykosylierte Proteine erkennen kann (KELKEL, 2009). Darüber hinaus wird ebenfalls eine alternative Rolle von Htm1p in der Erkennung nicht-glykosylierter Substrate diskutiert, die auch für die verstärkte Toxinwirkung verantwortlich sein könnte, was im Kontext der vorliegenden Arbeit auf eine Rolle im Degradationsprozess hinweist (CHRISTIANSON *ET AL.*, 2008).

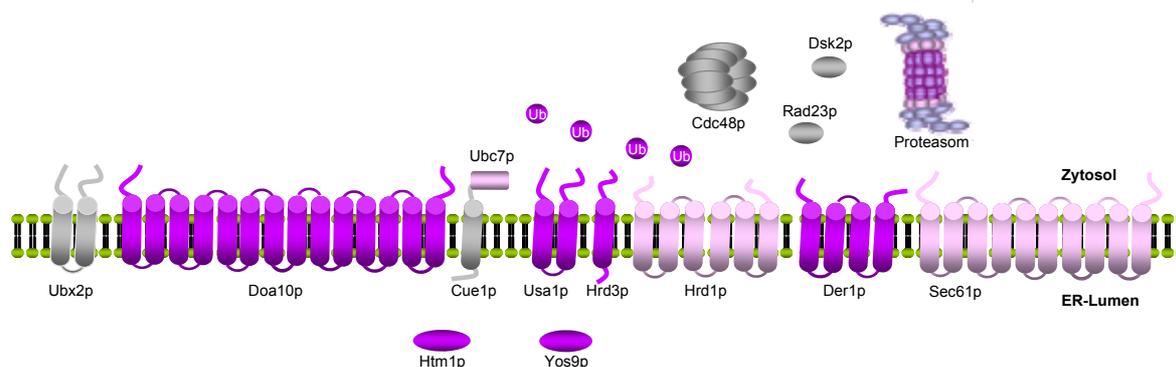


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Komponenten des ERAD-Pathways, die entweder am Degradations- oder Retrotranslokationsprozess des Killertoxins K28 beteiligt sind. Untereinheiten, die in Zusammenhang mit dem Abbau der intrazellulär exprimierten K28 α -Untereinheit stehen, sind lila hervorgehoben, wobei Der1p eventuell ebenfalls eine Rolle im ER-Export zukommt. Rosa markiert sind Komponenten, die sowohl das reife Toxin als auch die α -Untereinheit erkennen und im Anschluss bei Degradation bzw. Translokation assistieren. Proteine, die keinen Effekt auf Abbau bzw. Export beider Toxinformen haben, sind grau hinterlegt.

Die anschließende Markierung des Proteintargets mit Ubiquitin (Ub) verläuft in drei Schritten. Nach der Aktivierung von Ubiquitin durch E1 wird das Molekül von einem konjugierenden Enzym E2 auf das Substrat übertragen, das mit einer Ubiquitinligase E3 verbunden ist. Im Zuge der ER-assoziierten Degradation wird diese Modifikation durch Hrd1p bzw. Doa10p, zwei Ubiquitinligasen mit RING-Motiv, vermittelt (HAMPTON, 2002). Hrd1p bildet einen Komplex mit Hrd3p sowie Usa1p, der Hrd1p stabilisiert und zu dessen Oligomerisierung beiträgt. Gemeinsam mit dem konjugierenden Enzym Ubc7p, das über Cue1p in der ER-Membran verankert ist, katalysiert die Ligase die Ubiquitinierung von ERAD-Substraten mit luminalen Defekten (BIEDERER *ET AL.*, 1996).

Der1p stellt vermutlich eine Art Gerüst dar, über welches das Substrat zum Ligase-Komplex transferiert wird. Doa10p, die zentrale Komponente des ERAD-C-Pathways ubiquitiniert gemeinsam mit Ubc7p bzw. Ubc6p in erster Linie fehlerhafte Transmembranproteine mit Defekten in der zytoplasmatischen Domäne oder nicht assemblierte Untereinheiten oligomerer Komplexe (HAMPTON, 2002). Deletionsmutanten in den Genen *UBC7*, *HRD1*, *DER1* sowie *USA1* zeigten nach Applikation des K28-Dimers keine phänotypischen Veränderungen, verhielten sich jedoch nach Expression der K28 α -Untereinheit hypersensitiv, was eher auf eine Beteiligung am Degradationsprozess als an der Retrotranslokation hindeutet. Neben dem Hrd1-Komplex existiert ein weiterer Ubiquitin-Ligasekomplex in der ER-Membran, dessen zentrale Komponente von Doa10p (E3) gebildet wird, die sowohl fehlgefaltete zytosolische Proteine als auch Membranproteine mit defekter zytoplasmatischer Domäne erkennt (SWANSON *ET AL.*, 2001; WANG UND CHANG, 2003). Da eine Δ *doa10*-Deletionsmutante nach Expression des Letalkonstruktes eine Hypersensitivität zeigte, scheint Doa10p analog zu Hrd1p eher am Abbau als an der Retrotranslokation von K28 α beteiligt zu sein, wobei es aufgrund seiner Erkennungseigenschaften an der Degradation des bereits exportierten Toxins im Zytosol assistieren könnte (ABBILDUNG 47).

Ebenso möglich wäre eine Überlagerung beider Funktionen. Der Mechanismus der Toxindislokation entspricht vermutlich nicht in allen Punkten dem klassischen Abbau fehlerhafter Proteine, da beispielsweise RTA Δ als ERAD-Substrat im Vergleich zur wildtypischen RTA-Variante zwar die gleichen luminalen Proteine benötigt, sich jedoch bezüglich der Abhängigkeit zytosolischer Proteine unterscheidet. Beide RTA-Varianten benötigen den Hrd1/Hrd3/Der1-Komplex, wobei Hrd1p eher eine strukturelle Rolle einnimmt, da die Toxizität auch mit einem katalytisch inaktiven Hrd1p verloren geht (LI *ET AL.*, 2010). Natives sowie fehlgefaltetes RTA zeigen demnach sowohl Ähnlichkeiten als auch Unterschiede, woraus hervor geht, dass das ERAD-System der Hefe zwischen Substratformen unterscheidet (LI *ET AL.*, 2010).

Ein Kandidat mit alternativer Funktion in ERAD-L ist Der1p, das nach der Substraterkennung den Transport zur ER-Membran vermittelt. Der1p setzt sich aus vier Transmembrandomänen zusammen und ist an der Umsetzung nicht membranständiger, löslicher Proteine beteiligt (HITT UND WOLF, 2004; TAXIS *ET AL.*, 2003). Dabei fungiert Der1p vermutlich als eine Art Substratrezeptor, der durch Insertion der Polypeptide in die ER-Membran einen funktionellen „link“ zwischen Substrat-Selektion im ER und ihrer Ubiquitinierung im Zytosol herstellt (MEHNERT *ET AL.*, 2013).

Derlin1 wird darüber hinaus in höheren Eukaryonten als potentieller Retrotranslokationskanal diskutiert (ODA ET AL., 2006), der für diese Aufgabe verschiedene strukturelle Eigenschaften besitzt, die sich in Hefe und Säugerzellen teilweise unterscheiden. Im Unterschied zu RTA ist die Retrotranslokation von Cholera Toxin (CTA1) in Säugerzellen abhängig von Der1 als ERAD-Komponente während *der1* Mutanten der Hefe nach *GALS* induzierter Expression von K28 α eine erhöhte Sensitivität zeigen.

Im Vergleich dazu führte eine verstärkte Der1p-Synthese unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors sowie die zusätzliche Deletion von *HRD1*, *HRD3* bzw. *USA1* zu einer Hypersensitivität nach Expression des Letalkonstruktes, hatte allerdings keinen Effekt bezüglich der Applikation des K28-Heterodimers. Der Umstand, dass sowohl eine Deletion als auch eine Überexpression von *DER1* eine erhöhte Sensitivität gegenüber K28 α zur Folge hat, lässt vermuten, dass diese Komponente im Rahmen der ER-assoziierten Degradation am Abbau von K28 α beteiligt ist, jedoch gleichzeitig als Teil des Exportkanals eine alternative Funktion in der Retrotranslokation der K28 α -Untereinheit besitzt (ABBILDUNG 47). Die Interaktion des Toxins mit dieser Komponente des ERAD-L-Weges konnte bereits mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) nachgewiesen werden (KELKEL, 2009). In einem Modell von MEHNERT werden ERAD-Substrate von Hrd3p und Yos9p selektiert und im Anschluss auf Der1p übertragen, das im Anschluss die Insertion des Substrats in die ER-Membran initiiert. Die Assemblierung mehrerer Der1p-Untereinheiten führt zur Bildung einer flexiblen Öffnung, wodurch das Substrat zur Ubiquitinierung in die Nähe von Hrd1p gelangt. Die Bewegung über die Membran benötigt wahrscheinlich einen Kanal, der verschiedenen Untersuchungen zufolge die Komponenten Hrd1p und Der1p enthält (MEHNERT ET AL., 2013). Nach Substitution konservierter Aminosäuren der Transmembrandomänen war daher der ER-Export von Modellsubstraten verzögert und auch in einem rekonstituierten Testsystem war die Entlassung eines Modellsubstrates nach Inkubation mit Mikrosomen nach Zugabe von Derlin1-Antikörpern stark inhibiert (LILLEY UND PLOEGH, 2004; WAHLMAN ET AL., 2007). Darüber hinaus wurde auch der zentralen Komponente Hrd1p in einigen Fällen eine zentrale Funktion im ER-Export zugeordnet. Anhand des hypersensitiven Phänotyps von $\Delta hrd1$ gegenüber K28 α konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Bedeutung der Ligase bezüglich Abbau und Retrotranslokation überlagern.

Daher wurden für weiterführende Experimente Stämme verwendet, die Hrd1p unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors überexprimierten und denen gleichzeitig weitere Komponenten und Regulatoren der ER-Qualitätskontrolle wie Hrd3p, Usa1p oder Der1p fehlten. Hrd3p sowie Der1p unterstützen das Substrat-„delivery“, wohingegen Usa1p für die Rekrutierung von Der1p benötigt wird und die Hrd1p-Oligomerisierung induziert (HORN *ET AL.*, 2009). Die Assemblierung der Hrd1p-Moleküle wird in einem Modell von CARVALHO *et al.* (2010) durch Substratbindung wieder destabilisiert, wodurch die Ligase mehrere Zyklen der Oligomerisierung und Dissoziation durchläuft. Das ERAD-Substrat scheint somit entlang der Hrd1p-Transmembransegmente durch den potentiellen Kanal, der transiente Bindestellen für das Substrat bereitstellt, geschoben zu werden (CARVALHO *ET AL.*, 2010). Im Falle einer Überexpression von Hrd1p wird keine der regulatorischen Komponenten Hrd3p, Usa1p oder Der1p benötigt, was bedeutet, dass Hrd1p unter diesen Umständen vermutlich spontan oligomerisieren und das Substrat binden kann. Die Auswahl geeigneter Substrate ist unter diesen Bedingungen allerdings weniger spezifisch (DENIC *ET AL.*, 2006). Wird neben der Überexpression noch gleichzeitig *UBC7* deletiert, wird der Abbau wieder verlangsamt, da die Ubiquitinierung auf Ebene der Konjugation unterbrochen wird.

Die Überexpression von Hrd1p sowie eine simultane Deletion von *HRD3* bzw. *USA1* führten sowohl nach Applikation des K28-Dimers als auch nach intrazellulärer Expression des Letalkonstrukts zu einer stark verminderten Sensitivität. Somit konnte eine Funktion der Ubiquitin-Ligase als Kanal im Zuge der Retrotranslokation ausgeschlossen werden, da eine verstärkte Expression zu einer gesteigerten Degradation und damit zu einer Reduktion des toxischen Effektes führen würde, statt durch eine erhöhte Exportrate eine Hypersensitivität hervorzurufen. Rückschlüsse auf eine Beteiligung von Hrd1p am Abbau, die anhand der Hypersensitivität der Deletionsmutante gegenüber K28 α gezogen wurden, konnten somit auch nach Überexpression der Ubiquitinligase bestätigt werden. Anhand dieser Stämme wurde erstmalig beobachtet, dass ERAD-Komponenten eventuell auch am Abbau des K28-Dimers beteiligt sein könnten, was bisher anhand des Phänotyps einzelner Deletionsmutanten ausgeschlossen worden war (HEILIGENSTEIN, 2008). Bei gleichzeitiger Deletion von *DER1* kam es nach Expression von K28 α wiederum zu einer leichten Steigerung des toxischen Effekts, was neben der Überexpression von Der1p einen weiteren Hinweis darauf zuließ, dass diese ERAD-Komponente eine duale Rolle für Degradation und Retrotranslokation einnehmen könnte.

Der ER-Export von RTA verläuft hingegen Hrd1p-abhängig, jedoch unabhängig von dessen Ligaseaktivität oder den konjugierenden Enzymen Ubc7p und Ubc6p (LI *ET AL.*, 2010; LI *ET AL.*, 2012). RTA kann sich aus dem ERAD-Pathway lösen, indem es Ubiquitin-unabhängig transloziert und einer Interaktion mit dem proteasomalen Zulieferer Cdc48p und somit dem Abbau entgeht (LI *ET AL.*, 2010). Auch CTA1 benötigt das E3-Enzym für seine Retrotranslokation (BERNARDI *ET AL.*, 2010), wobei jedoch die Ligaseaktivität des Proteins für den Transport und die Entlassung des Toxins nötig zu sein scheint. Der luminaire Teil erfasst das Substrat, während der transmembrane Abschnitt beim Transfer in das Zytosol assistiert und die zytosolische Domäne das Substrat bzw. einen Faktor ubiquitiniert, der das Toxin von der ER-Membran entlässt (BERNARDI *ET AL.*, 2010). Analog dazu nutzt auch SLTxA1 die Ubiquitinligase-Aktivität von Hrd1p, was darauf hinweist, dass das Toxin als ubiquitiniertes Protein extrahiert wird. In diesem Falle müssen die Ubiquitinmoleküle zunächst entfernt werden, um eine Rückfaltung und somit eine Aktivität zu erlauben (LI *ET AL.*, 2012).

PHÄNOTYP EINER LYSINFREIEN TOXINVARIANTE

Im Zuge der Ubiquitinierungs-Reaktion, das erste Ubiquitinmolekül wird auf die ϵ -NH₂-Gruppe eines internen Lysinrestes des Substrats übertragen, wobei eine kovalente Isopeptidbindung entsteht. Nacheinander werden weitere aktivierte Ubiquitinmoleküle mit dem Lysinrest Lys48 des jeweils vorangegangenen Ubiquitinmoleküls verknüpft, so dass eine Polyubiquitinkette generiert wird, die das Degradationssignal zur Erkennung durch das 26S Proteasom darstellt. A/B-Toxine, die über ERAD in das Zytosol gelangen, entziehen sich aufgrund ihres niedrigen Lysingehalts dem proteasomalen Abbau weitgehend (HAZES UND READ, 1997). RTA und CTA enthalten genau wie K28 α nur wenige Lysinreste und unterscheiden sich damit von anderen A/B Toxinen wie dem Diphtherie Toxin, die bereits aus Endosomen ins Zytosol gelangen und sich mit 16 Lysinresten durch einen relativ hohen Lysingehalt auszeichnen (DEEKS *ET AL.*, 2002).

Das Ersetzen der drei Lysinreste in K28 α durch Arginin (K28 α Δ lys) führte im Wildtyp zu einer deutlichen Hypersensitivität und zeigte somit einen konträren Phänotyp zu früheren Arbeiten (KELKEL, 2009). Aufgrund einer reduzierten Ubiquitinierung kommt es vermutlich zu einer verminderten Degradation des Toxins, was die Beobachtung einer Beteiligung von ERAD-Komponenten am Abbau von K28 α unterstützt (ABBILDUNG 47). Dies wurde durch den additiven Effekt der lysinfreien Toxinvariante in einer Δ hrd1 Deletionsmutante untermauert.

Die Degradation von K28 α Δ lys wird in Abwesenheit einer Ubiquitinligase vermutlich noch weiter gesenkt, woraus geschlossen werden kann, dass Hrd1p weiterhin eine Bedeutung für die Umsetzung der lysinfreien Toxinvariante hat und K28 α eventuell an alternativen Aminosäuren ubiquitiniert werden kann. Eine Δ doa10 Deletionsmutante zeigte nach Expression des lysinfreien Toxins keine Veränderung der Sensitivität. Es ist möglich, dass K28 α aufgrund der Modifikation kein „target“ der Ubiquitinligase mehr darstellt, da Doa10p K28 α eventuell nur an Lysinresten mit Ubiquitinmolekülen verknüpfen kann, was nach Substitution durch Arginin entfällt.

Für Cholera Toxin, Ricin und PT S1 wurde bereits dokumentiert, dass die Insertion zusätzlicher Lysinreste deren Abbau verstärkt und somit zu einer reduzierten Toxizität führt (DEEKS *ET AL.*, 2002; LENCER UND SASLOWSKY, 2005). Dabei zeigte sich für PT S1, dass nicht nur die Anzahl der Lysine, sondern auch deren Lokalisation eine wichtige Rolle spielen. Während des ER-Exports nimmt PT S1 eine teilweise gefaltete Konformation ein, wodurch Bereiche geschützt werden, die ansonsten exponiert und für die Ubiquitinierung zugänglich wären (WORTHINGTON UND CARBONETTI, 2007). Werden im umgekehrten Fall die beiden Lysinreste von CTA1 mutiert sowie der N-Terminus blockiert, ist dessen Toxizität nicht beeinträchtigt. Die Ubiquitinierung stellt daher für dieses A/B-Toxin keine treibende Kraft für die Dislokation aus dem ER dar. Auch die Inhibierung des Proteasoms beeinträchtigt den toxischen Effekt nicht (RODIGHERO *ET AL.*, 2002).

Im Gegensatz zu CT und PT S1 kann die Aktivität von Ricin jedoch durch einen proteasomalen Inhibitor gesteigert werden (DEEKS *ET AL.*, 2002; RODIGHIERO *ET AL.*, 2002), was eventuell darauf zurückzuführen ist, dass sich Ricin nach dem ER-Export im Zytosol langsamer faltet und somit ein größerer Teil zum Proteasom transportiert werden kann. Durch Reduktion der proteolytischen Aktivität mittels „knock-down“ der proteasomalen Untereinheit Rpt3p wurde die Hypersensitivität nach Expression von K28 α Δ lys im Vergleich zur lysinhaltigen α -Variante gesteigert, was darauf hindeutet, dass das Proteasom auch am Abbau der lysinfreien Form beteiligt ist. Somit wird eine ubiquitinunabhängige Erkennung durch Hrd1p mit anschließender proteasomaler Degradation (analog zu CT und PT) oder eine Ubiquitinierung alternativer Aminosäuren wahrscheinlich. Der Verlust der Lysinreste im K28-Dimer hatte hingegen nur einen geringen Einfluss auf die Toxizität (HEILIGENSTEIN *ET AL.*, 2006). Auch hierdurch wird deutlich, dass ERAD keine essentielle Bedeutung für den Transport bzw. die Degradation des reifen Toxins besitzt.

ROLLE DER ALTERNATIVEN UBIQUITINIERUNG

Am Beispiel des Zellzyklusregulators p21 konnte gezeigt werden, dass neben der klassischen Ubiquitinierung an Lysinresten auch der N-Terminus eines Proteins auf diese Weise modifiziert werden kann (BLOOM *ET AL.*, 2003). Die Substitution interner Lysinreste des Transkriptionsfaktors MyoD beeinflusste dessen Stabilität, führte jedoch erst nach Blockierung des N-Terminus zu einer fast vollständigen Inhibition der Degradation (BREITSCHOPF *ET AL.*, 1998). Dieser Prozess wurde erstmals in Hefe entdeckt und ist auf die Aktivität der zytosolischen Ubiquitinligase Ubr1p zurückzuführen. Ursprünglich wurde dieses E3-Enzym gemeinsam mit den konjugierenden Enzymen Ubc2p und Ubc4p für die Qualitätskontrolle von Substraten der „N-end rule“ beschrieben, bei denen es sich entweder um fehlgefaltete zytosolische Proteinen handelt oder um Substrate, die aufgrund ihrer N-terminalen Aminosäure einem schnellen Abbau unterliegen (HECK *ET AL.*, 2010; VARSHAVSKY, 2011). Die Wirkung von K28 war jedoch nicht mit Ubr1p in Verbindung zu bringen und schloß somit die Ubiquitinierung beider Toxinvarianten am N-Terminus weitestgehend aus.

Ubiquitinierungsreaktionen sind oft redundant und können daher im Falle eines Verlustes eines einzelnen E3-Enzyms von alternativen Ubiquitinligasen katalysiert werden. In Folge dessen kommt es oft erst nach Mehrfach-Mutationen zu einer Inhibierung der Ubiquitinierung und somit der Degradation des Substrats, wobei sich die Deletion verschiedener Ligasen nicht auf jedes Substrat gleich auswirkt. CFTR unterliegt beispielsweise dem Abbau durch Ubr1p, wohingegen andere „targets“ wie Ste6* nur unter Stressbedingungen erkannt werden. Dieser Zusammenhang kann eventuell dadurch erklärt werden, dass CFTR massiv fehlgefaltete Domänen besitzt, während Ste6* nur ein Teil seines C-Terminus fehlt (STOLZ *ET AL.*, 2013). Daher werden nicht alle ERAD-Substrate zum „target“ von Ubr1p, wenn gängige Ubiquitinligasen wie Hrd1p und Doa10p fehlen. Auch die Degradation des ERAD-Substrats CPY* bleibt in einer $\Deltaubr1$ -Deletionsmutante unbeeinflusst. Dies lässt die Frage aufkommen, ob weitere zytosolische Ligasen am Abbau von ERAD-Substraten beteiligt sind oder stattdessen eventuell zur Vakuole dirigiert werden können (STOLZ *ET AL.*, 2013). Allerdings ermöglicht nicht nur die Präsenz einer zusätzlichen Ligase eine alternative Ubiquitinierung. Manche E3s können die Sulfhydrylgruppe des Cysteins bzw. die Hydroxylgruppe von Serin- und Threoninresten markieren (CADWELL UND COSCOY, 2005; WANG *ET AL.*, 2007), wie es bereits für das ERAD-Substrat NS-1 beobachtet wurde (SHIMIZU *ET AL.*, 2010).

ERAD-Substrate, die von Hrd1p erkannt werden, weisen einen unterschiedlichen Grad der Ser/Thr-Ubiquitinierung auf, wobei die Modifikation über Nicht-Isopeptidbindungen das Substrat eventuell resistent gegenüber deubiquitinierenden Enzymen (DUB) im Zytosol macht (SHIMIZU *ET AL.*, 2010). Durch Mutation entsprechender Aminosäurereste in K28 und K28 α sowie des damit verbundenen Effekts auf Deletionsmutanten der Ubiquitinierungsmaschinerie, könnte festgestellt werden, ob das Toxin analog zu zahlreichen Hrd1p-Substraten ebenfalls einer alternativen Ubiquitinierung unterliegt.

TRANSPORT ZUM PROTEASOM

Auf dem klassischen Weg der ER-assoziierten Degradation wird das ubiquitinierte Substrat mit Hilfe des Cdc48-Komplexes zum Proteasom dirigiert, wobei Cdc48p K48-verknüpftes Polyubiquitin über seinen N-Terminus bindet (DAI UND LI, 2001). Der Cdc48p/Ufd1p/Npl4p Komplex fungiert einerseits als Segregase, die das Substrat an der ER-Membran erkennt und andererseits als Dislokase, welche die treibende Kraft für die Proteinextraktion zur Verfügung stellt (BRAUN *ET AL.*, 2002; YE *ET AL.*, 2001). Ohne Cdc48p oder seine Co-Faktoren Ufd1p oder Npl4p, ist die proteasomale Degradation einiger ERAD-Substrate blockiert und Proteine akkumulieren in ihrer polyubiquitinierten Form in der ER-Membran (HUYER *ET AL.*, 2004; JAROSCH *ET AL.*, 2002). Auch A/B-Toxine können diesen Eskort-Komplex zur Retrotranslokation aus dem ER nutzen.

Wie in vorherigen Untersuchungen konnte auch in der vorliegenden Arbeit keine stark veränderte Sensitivität der Deletionsmutanten $\Delta npl4$ und $\Delta dsk2$ nach Expression des Letalkonstrukts beobachtet werden. Eine $\Delta rad23$ Mutante zeigte hingegen den stärksten Effekt im Gegensatz zu der bisher beschriebenen verminderten Sensitivität (KELKEL, 2009). In früheren Experimenten war es jedoch nicht möglich, den Einfluss der zentralen Komponente Cdc48p auf die Toxizität von K28 α zu untersuchen, da temperatursensitive Mutanten einen zu starken Wachstumsdefekt im seriellen Verdünnungstest zeigten. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es eine *cdc48*-„knock-down“-Mutante zu untersuchen, die sich im Wachstumstest bzw. seriellen Verdünnungstest nicht vom WT unterschied. Die K28 α -Untereinheit scheint somit keine Komponenten des Cdc48-Komplexes zur Retrotranslokation zu nutzen, obwohl an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden kann, dass der restliche Gehalt an Cdc48p der untersuchten DAmP-Mutante ausreicht, um seine Funktion auszuüben, wodurch es zu keiner phänotypischen Veränderung kommt. Die Retrotranslokation des K28-Dimers hingegen hängt weder von Cdc48p und dessen Co-Faktoren, noch von den Zulieferproteinen Dsk2p und Rad23p für den weiteren Transport zum Proteasom ab (HEILIGENSTEIN, 2008) (ABBILDUNG 47).

Im Vergleich zu K28 steht die Zytotoxizität von CT, Ricin und *Pseudomonas* Exotoxin A im Zusammenhang mit p97, das dem CDC48-Homolog in Säugern entspricht (ABUJAROUR *ET AL.*, 2005). Obwohl p97 genau wie Cdc48p an der Translokation von ERAD-Proteinen beteiligt ist, bildet die Ubiquitinierung keine essentielle Voraussetzung für die Interaktion mit p97 (YE *ET AL.*, 2003). Dieser Umstand scheint bedeutend für den ER-Export von A/B-Toxinen, die aufgrund ihres niedrigen Lysingehalts ineffektiv ubiquitiniert werden.

ROLLE DES PROTEASOMALEN ABBAUS

Das Proteasom setzt sich aus einem 20S proteolytischen „core“-Partikel (CP) und zwei 19S regulatorischen Partikeln (RP) zusammen und dient der Degradation fehlgefalteter Proteine. 19S RPs, die wiederum in „lid“ und „base“ unterteilt werden, sitzen als „cap“ auf beiden Öffnungen des 20S-Komplexes, regulieren den Zugang zum proteolytischen „core“ und sind an der Erkennung sowie Entfaltung des Substrats beteiligt. Das 19S RP kann alternativ zu Cdc48p auch die treibende Kraft für die Retrotranslokation von ERAD-Substraten darstellen. Im zellfreien System vermittelt das Proteasom zusammen mit ATP sowohl den Export als auch den Abbau fehlgefalteter Proteine, wobei beide Prozesse voneinander getrennt werden können. Der Export wird dabei durch eine Interaktion von RP mit Sec61p vermittelt (MAYER *ET AL.*, 1998).

Die 19S regulatorische Untereinheit setzt sich aus 17 Proteinen zusammen, zu denen neben deubiquitinierenden Enzymen wie Ubp6p, sechs AAA-ATPasen (Rpt1-6) der „base“ zählen. Rpt1-6 sind homolog, jedoch nicht funktionell äquivalent, formen einen heterohexameren Ring und hydrolysieren ATP, so dass sie die für den Export und Abbau nötige Energie bereitstellen (FINLEY, 2009; PATHARE *ET AL.*, 2012). Das 19S RP kann Ubiquitinkonjugate über die UBL-UBA Proteine Rad23p und Dsk2p erkennen, die als Shuttle-Rezeptoren fungieren (RAO UND SASTRY, 2002). Die UBA-Domäne dieser Shuttle-Rezeptoren interagiert mit der Ubiquitinkette, die UBL-Domäne bildet die Andockstelle für das Proteasom. Da gezeigt wurde, dass der Cdc48-Komplex nicht für den Transport von K28 benötigt wird, bildet eventuell das 19S RP eine essentielle Eskort-Komponente der Retrotranslokation. In Hefe erfüllt die Untereinheit Rpt4p diesbezüglich eine essentielle Funktion (LIPSON *ET AL.*, 2008). Hintergrund für diese Beobachtung war, dass etliche Proteine in einem ERAD-abhängigen Schritt dislozieren, jedoch nicht vom Proteasom degradiert, sondern im Zytosol in ihre aktive Konformation zurückgefaltet werden (AFSHAR *ET AL.*, 2005). In einer *rpt4* Mutante akkumulierte das ERAD-Substrat CPY* in Mikrosomen, in einer *rpt2* Mutante im Zytosol (LIPSON *ET AL.*, 2008; RUBIN *ET AL.*, 1998).

Demnach sind entweder beide ATPasen parallel an der Extraktion aus der ER-Membran beteiligt oder Rpt4p transportiert das Substrat nach Extraktion durch Cdc48p zum Proteasom, wo das Polypeptid schließlich mit Hilfe von Rpt2p abgebaut wird (LIPSON *ET AL.*, 2008). In einer *rpt2* „knock-down“-Mutante scheint es nach Expression des Letalkonstrukts K28 α hingegen zu keiner signifikanten Stabilisierung im Zytosol zu kommen, da sich die Sensitivität dieses Stammes im Vergleich zum Wildtyp nicht veränderte. RTA Δ nutzt für seinen Abbau sowohl den Cdc48-Komplex als auch die 19S RP-Untereinheit Rpt2p, wobei Rpt2p nur den Eintritt in die katalytische Kammer des Proteasoms katalysiert (KIM *ET AL.*, 2006). Rpt4p ist dagegen nicht an der Dislokation des fehlgefalteten Proteins RTA Δ beteiligt, sondern assistiert nur bei der Extraktion der wildtypischen RTA-Variante (LI *ET AL.*, 2010). Somit können die ATPase-Untereinheiten des Proteasoms vermutlich zwischen verschiedenen Substratformen unterscheiden (LI *ET AL.*, 2010). Daraus kann geschlossen werden, dass der Transport des Toxins (K28 α) in die proteolytische Kammer des Proteasoms vermutlich nicht beeinträchtigt ist. Daher verhält sich K28 α entweder nicht wie die klassischen ERAD-Substrate CPY* und RTA Δ oder der restliche Rpt2p-Gehalt der „knock-down“-Mutante genügt, um die α -Untereinheit von K28 weiterhin effizient zu degradieren. Im MBA-Test kam es dagegen zu einer leicht reduzierten Sensitivität, was eher auf eine verzögerte Dislokation des K28-Dimers hindeutet. Die Bedeutung einer *rpt4* Mutante für den ER-Export des A/B-Toxins konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Da die Dislokation von K28 unabhängig von Cdc48p verläuft, ist nicht auszuschließen, dass Rpt4p als Untereinheit des 19S RP an der Extraktion von K28 beteiligt ist und analog zu RTA eine Funktion in der Extraktion erfüllt. In einer „knock-down“ Mutante könnte es somit analog zu CPY* zur Akkumulation im ER (bzw. Mikrosomen) kommen. Rpt5p scheint eher am Abbau von K28 α beteiligt zu sein als an der Rückfaltung im Zytosol, da sich eine entsprechende „knock-down“ Mutante hypersensitiv verhielt. Gleiches wurde im MBA-Test beobachtet. Damit wurde mit Rpt5p die einzige proteasomale Untereinheit identifiziert, die sowohl das K28-Dimer als auch die α -Untereinheit erkennt. Neben der Überexpression von Hrd1p konnte somit ein weiterer Hinweis dafür erbracht werden, dass auch ein Teil des reifen Toxins vermutlich einer Degradation durch das Ubiquitin-Proteasom-System unterliegt (ABBILDUNG 47).

Die AAA-ATPase Rpt5 spielt zwar keine Rolle bei der Dislokation von nicht-ubiquitiniertem RTA bzw. der ubiquitinierten Form von CPY* (LI *ET AL.*, 2010; LIPSON *ET AL.*, 2008) besitzt allerdings aufgrund ihrer Chaperon-Aktivität eine essentielle Funktion in der Wiederherstellung der katalytisch aktiven Konformation des Substrats im Zytosol. Ein Fehlen dieser proteasomalen Untereinheit führt daher zu einer reduzierten Toxizität von RTA. Die Interaktion mit Rpt5p kann das Schicksal diverser Substrate jedoch in unterschiedlicher Weise beeinflussen. Während RTA durch Rpt5p gefaltet und somit aktiviert wird, unterliegt Casein dem proteasomalen Abbau. Rpt5p kann daher unabhängig vom Ubiquitinierungsstatus des Proteins dessen Degradation oder Entlassung in das Zytosol katalysieren (PIETRONI *ET AL.*, 2013). Den stärksten Einfluss auf die Substraterkennung bzw. Entfaltung der K28-Untereinheit zeigte Rpt3p, da die entsprechende „knock-down“ Mutante eine ausgeprägte Hypersensitivität aufwies. Allerdings konnte diese Bedeutung nicht auf das K28-Dimer übertragen werden, da die Sensitivität in einer *rpt3* DAmP-Mutante im MBA-Test nicht verändert war.

Nach Substraterkennung durch die proteasomalen Untereinheiten wird die Ubiquitinkette durch Deubiquitinasen vom Substrat entfernt, um den Abbau der Polypeptidkette zu erleichtern und die Degradation von Ubiquitin zu minimieren. In *S. cerevisiae* wurden in diesem Zusammenhang die beiden Enzyme Rpn11p sowie Ubp6p beschrieben (GUTERMAN UND GLICKMAN, 2004). Rpn11p ist eine Komponente des „lid“, Ubp6p ist mit der „base“ des Proteasoms assoziiert (LEGGETT *ET AL.*, 2002). Die Aktivität von Rpn11p ist mit der Degradation gekoppelt und unterstützt diese (VERMA *ET AL.*, 2002), während Ubp6p die gegenteilige Funktion erfüllt und den weiteren Abbau inhibiert. Diese inhibitorische Aktivität verhindert die „en bloc“ Deubiquitinierung durch Rpn11p, wodurch sowohl Abbau als auch Deubiquitinierung des gleichen Substrats verhindert werden. In einer $\Delta ubp6$ Deletionsmutante kommt es somit vermutlich zu einem unkontrollierten proteasomalen Abbau, was nach Expression des Letalkonstrukts K28 α , nicht jedoch nach Applikation des Dimers, in einer Resistenz resultiert. Da ausgeschlossen werden konnte, dass Ubp6p eine Rolle im Substrat-„targeting“, dem „gate-opening“ oder der Modulation der aktiven Zentren des CPs hat und auch nicht generell die proteasomale ATPase-Aktivität hemmt, ist dieser Phänotyp vermutlich darauf zurückzuführen, dass keine Entscheidung mehr in Bezug auf den Substratabbau getroffen werden kann (HANNA *ET AL.*, 2006). Ubp6p könnte in diesem Zusammenhang die Degradation verlangsamen, um die Selektivität zu erhöhen, da Schnelligkeit und Genauigkeit dieses Schrittes nicht gleichzeitig reguliert werden können (HANNA *ET AL.*, 2006).

ER-luminale Chaperone und ER-Export von K28

Die Retrotranslokation ist genau wie der ER-Import ein Chaperon-abhängiger Prozess, der nicht vollständig erforscht ist. Chaperone binden exponierte hydrophobe Regionen fehlgefalteter Proteine über eine nicht kovalente Bindung und verhindern dadurch deren Aggregation (SAIBIL, 2000). Eine besondere Familie bilden die Hitzeschockproteine mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa (Hsp70), welche die Hauptkomponenten für Faltung, Transport und Abbau darstellen (MAYER UND BUKAU, 2005). Hsp70 Proteine bestehen aus einer N-terminal konservierten ATPase Domäne, einer weniger konservierten Substratbindedomäne (SBD) sowie einem C-terminalen variablen „lid“. Der „lid“ ist flexibel und hilft die Substratbindung durch die SBD zu begrenzen. Ihr ATP-Hydrolyse-Zyklus korreliert mit der Substratbindung und -entlassung, was darauf zurückzuführen ist, dass die ADP-Form der Hsp70 Chaperone eine stärkere Substrataffinität besitzt.

Die ATPase BiP (Kar2p) ist ein wichtiger ER-Regulator, der vorübergehend an neu synthetisierte Proteine bindet, die in das ER translozieren, über längere Zeit mit fehlgefalteten Proteinen assoziiert bleibt und an deren „targeting“ zum ERAD-Pathway beteiligt ist. Darüber hinaus spielt BiP eine Rolle im „sensing“ von ER-Stressbedingungen, was zur Induktion der UPR und somit zur Wiederherstellung der ER-Homöostase führt (HENDERSHOT, 2004). Kar2p wird für den Abbau löslicher Substrate benötigt, jedoch nicht zur Degradation von Transmembranproteinen (BRODSKY UND MCCRACKEN, 1999). In Hefe spielt Kar2p beispielweise eine essentielle Rolle in der Vermittlung der maximalen Toxizität von Ricin (LI *ET AL.*, 2010), das im ER mit Sec61p interagiert und somit analog zu anderen Proteintoxinen den ERAD-Pathway zur Retrotranslokation in das Zytosol nutzt (SLOMINSKA-WOJEWODZKA *ET AL.*, 2006; WESCHE *ET AL.*, 1999).

Der reduzierte Kar2p-Gehalt einer DAmP-Mutante führte jedoch nach Expression von K28 α bzw. nach Applikation des reifen Toxins zu keinem veränderten Phänotyp. In diesem Zusammenhang kann nicht ausgeschlossen werden, dass Kar2p als essentielles Protein trotz „knock-down“ in ausreichender Menge vorliegt, um seine Funktion im Rahmen von ER-Import und Dislokation auszuüben. Dies würde mit Beobachtungen in höheren Eukaryonten korrelieren, wo ein „silencing“ von BiP um 70 % keinen Einfluss auf die Proteinsynthese zeigte (SCHAUBLE *ET AL.*, 2012).

Der Transport des Cholera Toxins aus Mikrosomen ist ebenfalls abhängig von BiP und PDI (TSAI UND RAPOPORT, 2002; WINKELER *ET AL.*, 2003). Dabei inhibiert BiP vermutlich die Toxin-Aggregation im ER und erhält nach Reduktion dessen Export-Kompetenz. Auch andere Vertreter dieser Toxin-Klasse nutzen BiP zum ER-Export (Shiga Toxin) oder katalysieren die Inaktivierung dieses Chaperons (Subtilase-Zytotoxin) (FALGUIERES UND JOHANNES, 2006; PATON *ET AL.*, 2006; WINKELER *ET AL.*, 2003).

Um die Rolle des Chaperons in den Retrotranslokationsprozess des Killertoxins K28 einordnen zu können, wurden zusätzliche Teststämme zur Sensitivitäts-Bestimmung herangezogen. Eine *kar2* Mutante mit einem Defekt in der Peptid-Bindedomäne kann zwar weiterhin als Antrieb der Translokation fungieren, benötigt für diesen Schritt jedoch zusätzliche Moleküle. Die beiden temperatursensitiven Mutanten *kar2-1* und *kar2-133* tragen Mutationen in „loop 6“ bzw. „loop 3“, wodurch es zur Veränderung zweier verbindender β -Faltblätter kommt, was die Substratbindedomäne des Chaperons verändert (KABANI *ET AL.*, 2003). Aufgrund der reduzierten Peptidbindung wird zusätzlich die Interaktion mit Co-Chaperonen und somit auch die ATPase-Aktivität beeinflusst (KABANI *ET AL.*, 2003). Dies führt dazu, dass sich Moleküle schnell wieder vom Substrat lösen, was die ERAD-Effizienz, nicht jedoch die Proteintranslokation in das ER beeinträchtigt (MATLACK *ET AL.*, 1999). In beiden Mutanten kommt es daher zu einer Akkumulation des mutierten α -Faktors, der sich vermutlich vor seiner Retrotranslokation zu früh von Kar2p löst (KABANI *ET AL.*, 2003). Wird zusätzlich die wildtypische Kar2p-Variante exprimiert, wird das ERAD-Substrat zwar wieder resolubilisiert, die ERAD-Effizienz bleibt jedoch weiterhin reduziert. Dies verdeutlicht, dass Kar2p für die Prävention einer Akkumulation fehlgefalteter Substrate ausreicht, für das Entlassen der Polypeptidkette jedoch eine effiziente Interaktion mit Co-Chaperonen sichergestellt werden muss (KABANI *ET AL.*, 2003).

Im MBA-Test kam es in den beschriebenen Mutanten bei semi-restriktiver Temperatur (34°C) nach Applikation des Dimers zu einer vollständigen Resistenz. Auch das Letalkonstrukt zeigte in beiden *kar2* Mutanten nur noch eine geringfügige Toxizität. Ein äquivalenter Phänotyp wurde bereits in der temperatursensitiven Mutante *kar2-159* beschrieben. Allerdings kann hier nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Mutation ebenfalls auf den Protein-Import und somit auch auf die Konzentration ER-luminaler Chaperone bzw. den Sec61p-Gehalt auswirkt, so dass sekundäre Effekte ausgebildet werden. Anhand des Interaktions-Nachweises mittels BiFC kann ebenfalls nicht differenziert werden, ob es sich um eine Wechselwirkung während des Imports oder der Retrotranslokation handelt (KELKEL, 2009).

Da sich die Punktmutationen in *kar2-1* sowie *kar2-133* ausschließlich auf den ER-Export auswirken, konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig der Zusammenhang zwischen Toxinwirkung und Funktionalität des Chaperons Kar2p im Retrotranslokationsprozess nachgewiesen werden. Somit scheint Kar2p eine entscheidende Rolle am ER-Export des K28-Dimers als auch der K28 α -Untereinheit zu spielen. Da beschrieben ist, dass in beiden Mutanten bereits bei semi-restriktiver Temperatur ein gesteigerter Kar2p-Gehalt vorliegt, kann es allerdings auch durch Induktion der UPR zu einem verstärkten Abbau von K28 kommen.

Da die ATPase-Aktivität der Hsp70 Chaperone nur schwach ausgeprägt ist, benötigen sie Hsp40-Co-Chaperone, die die ATP-Hydrolyse beschleunigen und somit die maximale Chaperon-Aktivität vermitteln (HENNESSY *ET AL.*, 2005). Die Interaktion von Hsp70 und Hsp40 erfolgt über die J-Domäne der Hsp40 Proteine, wobei ein Hsp70 mit mehreren Hsp40 Co-Chaperonen interagieren und somit verschiedene zelluläre Funktionen beeinflussen kann (VEMBAR *ET AL.*, 2010). In Hefe interagiert das Hsp70 Chaperon Kar2p mit drei Hsp40 Co-Chaperonen: Sec63p, einem Membranprotein, das die ER-Membran dreimal durchspannt und die J-Domäne im ER-luminalen Teil trägt; Jem1p, das mit der ER-Membran assoziiert ist sowie Scj1p, einem löslichen ER-Protein (FELDHEIM *ET AL.*, 1992; NISHIKAWA UND ENDO, 1997; SCHLENSTEDT *ET AL.*, 1995). Die Interaktion von Kar2p und Sec63p ist verantwortlich für den co- und post-translationalen Proteinimport, wohingegen Jem1p und Scj1p hierfür nicht benötigt werden. Beide Hsp40 Co-Chaperone interagieren mit Kar2p, um die Löslichkeit fehlerhafter Proteine zu erhalten, die daraufhin retrotransloziert und proteasomal abgebaut werden (NISHIKAWA *ET AL.*, 2001). Im Gegensatz zu *JEM1* und *SCJ1* hat eine Mutation in *SEC63* nur einen geringen Einfluss auf ERAD. Die Funktion von BiP scheint durch die Interaktion mit unterschiedlichen Hsp40 Partnern bestimmt zu werden, da es in der Mutante *kar2R217A*, deren Wechselwirkung mit Sec63p nicht jedoch mit Jem1p beeinträchtigt, zu einem Translokations- jedoch nicht zu einem Dislokationsdefekt kommt. Jem1p und Scj1p repräsentieren nicht essentielle ER-luminale Proteine, wobei sich eine Doppelmutante profizient bezüglich ihrer Eigenschaft des ER-Imports verhält, jedoch das ERAD-Substrat CPY* stabilisiert. Im Rahmen dieser Arbeit zeigten die beiden Deletionsmutanten $\Delta scj1$ und $\Delta jem1$ entgegen früherer Untersuchungen eine verstärkte Sensitivität gegenüber K28 α , was auf eine verminderte Degradation hindeuten könnte (KELKEL, 2009).

Nach Applikation des Dimers kam es dagegen zu keiner Veränderung. Dass das K28-Heterodimer dennoch in Abhängigkeit dieser Hsp40-Proteine disloziert, belegen frühere Untersuchungen einer $\Delta scj1\Delta jem1$ Doppelmutante, die im MBA-Test keine Sensitivität mehr ausbildete (HEILIGENSTEIN *ET AL.*, 2006). Dieser Stamm wurde in der vorliegenden Studie jedoch nicht bezüglich der Expression von K28 α untersucht. Allerdings wurde bereits anhand der einfachen Deletionsmutanten deutlich, dass die beiden Co-Chaperone über ihre J-Domäne den ER-Export im Zuge der Degradation von K28 α unterstützen.

Lhs1p charakterisiert ein Hsp70-verwandtes Protein, das entgegen BiP nicht essentiell für das Überleben der Zelle ist, jedoch aufgrund seiner Funktion als treibende Kraft für translozierende Polypeptide, bei Deletion Defekte im post-translationalen ER-Import zeigt (CRAVEN *ET AL.*, 1996; SARIS *ET AL.*, 1997; TYSON UND STIRLING, 2000). Lhs1p wird darüber hinaus benötigt, um Proteine nach Denaturierung wieder zu falten, jedoch nicht um sie abzubauen (NISHIKAWA *ET AL.*, 2001). Außerdem fungiert es neben Sil1p zusätzlich als Nukleotidaustauschfaktor (NEF) für Kar2p und stellt somit dessen Funktion sicher. In einer $\Delta lhs1$ -Deletionsmutante kam es im Gegensatz zu vorangegangenen Experimenten zu einer stark verminderten Sensitivität gegenüber K28 α . Der Verlust von *LHS1* scheint somit die Funktionalität von Kar2p stärker einzuschränken als ein „knock-down“ im genetischen Hintergrund der *kar2* DAmP-Mutante. Da sich ein Verlust von Lhs1p auf zwei verschiedenen Ebenen des post-translationalen ER-Imports auswirkt, muss davon ausgegangen werden, dass nur noch wenige K28 α -Moleküle in den Sekretionsweg gelangen und eine Bedeutung dieses Chaperons und NEF exklusiv für den ER-Export an dieser Stelle nicht ermittelt werden konnte. Dass sich der Effekt bereits auf Ebene des ER-Imports manifestiert, wurde dadurch deutlich, dass die Sensitivität nach Applikation des K28-Dimers nicht beeinträchtigt war, obwohl das reife Toxin ebenfalls mit Hilfe von Kar2p in das Zytosol transloziert.

Ebenso grundlegend für eine effiziente Retrotranslokation des K28-Dimers ist eine ausgeglichene Ca²⁺-Homöostase der Zelle. Die Deletion der Ca²⁺-Pumpe Pmr1p, die Ca²⁺-Ionen aus dem Zytosol in den Golgi transportiert und somit die Ca²⁺-Konzentration im Sekretionsweg aufrecht erhält, führt zu einer um 50 % reduzierten Ca²⁺-Konzentration im ER und somit zu einem starken Funktionsverlust der meisten ER-luminalen Chaperone (DURR *ET AL.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte festgestellt werden, dass es in einer $\Delta pmr1$ Mutante analog zur Applikation des K28-Dimers nach Expression des Letalkonstrukts zu einer fast vollständigen Resistenz gegenüber K28 α kam (HEILIGENSTEIN, 2008).

Demnach scheint der ER-Export beider Toxinvarianten sehr stark von einer stabilen Ca^{2+} -Konzentration und somit der Aktivität zahlreicher Chaperone abzuhängen. Für K28 α muss in diesem Zusammenhang die duale Rolle der Chaperone am ER-Export als auch am Import berücksichtigt werden, die anhand von Wachstumstests nicht unterschieden werden kann.

Rolle der Pdi1p am Dislokationsprozess des Killertoxins

Das Endoplasmatische Retikulum wird von einem Membrannetzwerk gebildet und ist an vielen Prozessen der Proteinsynthese wie Translation, Faltung, Qualitätskontrolle sowie post-translationalen Modifikationen beteiligt. Darüber hinaus gewährleistet es die benötigten Redoxbedingungen zur Faltung neu synthetisierter Polypeptide sowie zur Modulation fehlerhafter Proteine. Die PDI gehört zu denjenigen Chaperonen, die über einen Redoxzyklus anstelle eines ATPase-Zyklus reguliert werden. Sie katalysiert sowohl die Einführung von Disulfidbrücken in ein Protein, als auch die Umlagerung bzw. Isomerisierung bereits gebildeter Disulfidbrücken und variiert ihre Aktivität je nach Redoxbedingungen und zellulären Bedürfnissen (TSAI *ET AL.*, 2001). Hefen besitzen neben Pdi1p noch vier weitere nicht-essentielle Disulfidisomerasen (NORGAARD *ET AL.*, 2001), doch lediglich das Homolog *MPD1* kann die Letalität einer PDI-Deletion supprimieren (HWANG *ET AL.*, 1992; TACHIKAWA *ET AL.*, 1995).

Pdi1p nimmt Elektronen vom Substrat auf und oxidiert dabei die Thiolgruppe eines Cysteinrestes des entstehenden Intermediates, wodurch eine Disulfidbrücke entsteht. In einer FAD-abhängigen Reaktion transferiert Ero1p die Elektronen von Pdi1p auf molekularen Sauerstoff (O_2), so dass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in Form von H_2O_2 gebildet werden. Reduziertes Glutathion (GSH) kann bei der Reduktion fehlgefalteter Proteine assistieren, wodurch es selbst in die oxidierte Glutathion-Form (GSSG) übergeht. Eines dieser Substrate stellt die Pdi1p selbst dar, da sie in ihrem reduzierten Zustand die Reduktion fehlerhafter Disulfidbrücken katalysiert (Isomeraseaktivität), dabei selbst oxidiert und im Anschluss vermutlich durch Interaktion mit GSH wieder in den reduzierten Zustand zurückkehrt (ZHANG UND KAUFMAN, 2008). Sie kann außerdem als Chaperon agieren, das seine Substrataffinität während der Redoxreaktion ändert. Dabei ist unklar, wie die Chaperonaktivität mit der Oxidoreduktasefunktion verknüpft ist, da auch Proteine ohne Disulfidbrücken erkannt werden (WANG UND TSOU, 1993).

Für die Isomerasefunktion ist eine Chaperonfunktion von Vorteil, um fehlerhafte Substrate erkennen und in die korrekte Konformation überführen zu können. Pdi1p interagiert darüber hinaus mit Komponenten der Faltungsmaschinerie wie Kar2p und der Mannosidase Htm1p (GAUSS *ET AL.*, 2011; KIMURA *ET AL.*, 2005). Für diese Wechselwirkung besitzen Disulfidisomerasen divergierende Domänen, um in Kooperation mit spezifischen ER-Chaperonen ein breites Spektrum an Zielproteinen falten bzw. einer Degradation (ERAD) zuführen zu können (VITU *ET AL.*, 2008). Des Weiteren repräsentiert sie eines der Haupt-caliciumbindenden Proteine im ER (MACER UND KOCH, 1988), wobei diese Interaktion zwar schwach ausgeprägt ist, jedoch mit hoher Kapazität eine Konformationsänderung des Chaperons herbeiführt (LEBECHE *ET AL.*, 1994). Im Gegensatz zu nativen Proteinen konkurrieren fehlgefaltete Proteine um die Bindung der PDI (KLAPPA *ET AL.*, 1997). Diese Konkurrenz verläuft unabhängig vom Thiolgehalt des Proteins und impliziert, dass PDI ähnlich wie BiP zwischen ERAD-Substraten und Polypeptiden im Faltungsprozess unterscheiden kann. Fehlgefaltete Proteine werden über PDI an BiP gebunden und gelangen somit eventuell zum Exportkanal (PILON *ET AL.*, 1997), wodurch Mutationen der aktiven Zentren zu einem verzögerten Export von CPY* führen. Die Retrotranslokation des ERAD-Substrats Δ gp α , das im Unterschied zur mutierten Carboxypeptidase Y keine Disulfide enthält, blieb hingegen unbeeinträchtigt (YOUNG *ET AL.*, 1993). In der vorliegenden Arbeit war die Abnahme der Pdi1p-Konzentration nicht ausreichend, um analog zur Δ pdi1 Deletion eine Toxinresistenz gegen K28 herbeizuführen. Im Unterschied zum Δ pdi1 „knock-out“ war die betreffende DAMP-Mutante für Untersuchungen der intrazellulär exprimierten α -Untereinheit geeignet, da sie keinen signifikanten Wachstumseffekt aufwies.

Pdi1p enthält zwei Thioredoxin-ähnliche Domänen (a bzw. a'), die jeweils ein aktives Zentrum mit CGHC-Motiv beinhalten und durch die Strukturdomänen b bzw. b' voneinander getrennt werden (EDMAN *ET AL.*, 1985). Die katalytische Aktivität wird dabei durch reversible Reduktion und Oxidation interner Disulfidbrücken zwischen beiden Cysteinresten eines Motivs aufrechterhalten (HOLST *ET AL.*, 1997). Die beiden Domänen a bzw. a' sind funktionell nicht äquivalent. Die a-Domäne besitzt eventuell aufgrund einer bevorzugten Oxidation durch Ero1p eine entsprechend stärkere Oxidaseaktivität. Die a-Domäne würde somit bevorzugt die Neusynthese von Disulfiden, die a'-Domäne hingegen eher eine Isomerisierung katalysieren (WESTPHAL *ET AL.*, 1999). Für die Umlagerung bestehender bzw. Ausbildung gemischter Disulfidbrücken ist der jeweils erste Cys-Rest des aktiven Zentrums verantwortlich (WUNDERLICH *ET AL.*, 1995).

Eine effiziente Oxidation durch PDI ist jedoch nur möglich, wenn beide Cysteine der katalytischen Einheit vorhanden sind. Der CS-Typ sollte daher das Substrat nicht mehr oxidieren, jedoch weiterhin seine Isomerisierung katalysieren können (HOLST *ET AL.*, 1997). Exprimiert die Zelle PDIa' als alleinige Kopie, besitzt sie eine vollständige Oxidaseaktivität, wohingegen lediglich 5 % der Isomeraseaktivität verbleiben und nach Applikation von K28 kein Hemmhof mehr ausgebildet wird. Nach Komplementation mit PDI SS-SS, die keinerlei aktive Cysteinreste mehr besitzt, wurde die Sensitivität nicht wiederhergestellt, woraus geschlossen werden kann, dass K28 nicht allein die Chaperonaktivität der Protein-Disulfidisomerase benötigt. Dagegen scheint die Aktivität beider Thioredoxin-Domänen die Retrotranslokation von K28 zu unterstützen, da der Stamm $\Delta pdi1$ pPDIa' sowohl nach Co-Expression von PDI SS-CC als auch von PDI CC-SS eine der WT-Variante PDI CC-CC entsprechende Sensitivität aufwies. Der Phänotyp nach Komplementation mit PDI CC-SS könnte auf eine Funktion der Reduktaseaktivität der α -Domäne im Retrotranslokationsprozess zurückzuführen sein, bei der zunächst eine gemischte Disulfidbrücke zwischen Toxin und N-terminalem Cysteinrest der α -Untereinheit ausgebildet wird, die in einem weiteren Schritt durch einen nukleophilen Angriff des C-terminalen Cysteins der Pdi1p gelöst und mit der Bildung eines alternativen Disulfids abgeschlossen wird. Ist der C-terminale Cysteinrest allerdings durch Serin ersetzt (PDI CS-SS), kann die Verknüpfung mit K28 eventuell nicht mehr getrennt werden, so dass die Entlassung des K28-Dimers und somit eine Wiederherstellung der Sensitivität gegen das reife Toxin unterbleibt (ABBILDUNG 48).

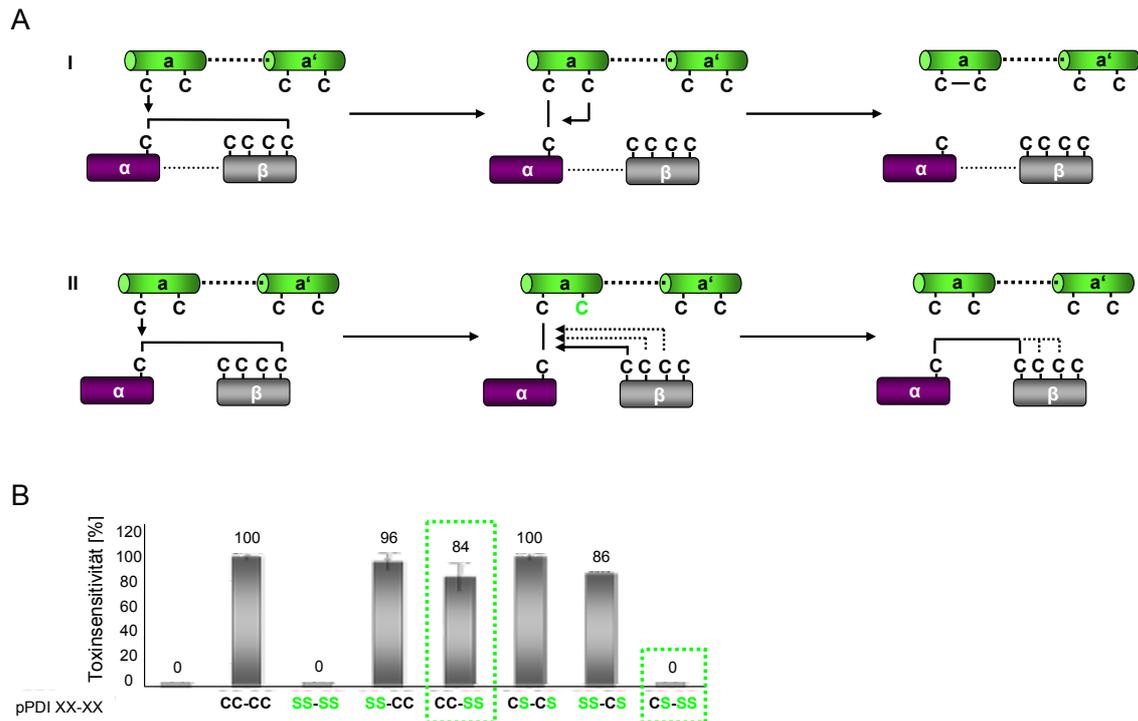


Abbildung 48: **A:** Schematische Darstellung einer möglichen Wechselwirkung der Protein-Disulfidisomerase Pdi1p und K28. Die Reduktaseaktivität der a-Domäne der Pdi1p ist möglicherweise am Retrotranslokationsprozess des Toxins beteiligt. Der C-terminale Cysteinrest der a-Domäne könnte eine gemischte Disulfid-Brücke zwischen Toxin und N-terminalem Cysteinrest der a-Domäne angreifen und somit K28 α aus dem Dimer entlassen. Wird die dimere Struktur des Toxins neben der Disulfidbrücke zwischen α - und β -Untereinheit durch zusätzliche Wechselwirkungen aufrechterhalten, würde eine Dissoziation des Toxins vor dem ER-Export verhindert (I). Die Ausbildung einer alternativen Disulfid-Brücke zwischen K28 α und K28 β durch einen nukleophilen Angriff der β -Untereinheit erscheint unwahrscheinlich, da in diesem Fall nach Substitution des C-terminalen Cysteinrests der a-Domäne durch Serin die Sensitivität gegen K28 erhalten bleiben würde (II). **B:** Sensitivität des Stammes PDIa' nach Komplementation mit den angegebenen Pdi1p-Varianten. Der Hemmhof im MBA-Test nach Applikation des K28-Dimers wurde nach Komplementation mit PDI CC-CC (100 %) verglichen. Die entsprechenden Stämme, die auf eine Beteiligung der Reduktaseaktivität der Protein-Disulfidisomerase schließen lassen, sind durch Markierung hervorgehoben.

Nach Expression der Variante PDI SS-CC wird vermutlich eine gemischte Disulfidbrücke zwischen dem N-terminalen Cystein-Rest der katalytischen a'-Domäne und dem Toxin generiert, deren Spaltung im Anschluss durch einen nukleophilen Angriff eines reduzierten Thiolrestes des Toxins erfolgt. Daher kann die Reaktion nach Mutation des C-terminalen Cysteinrestes der a'-Domäne im Stamm PDI SS-CS weiterhin ablaufen und die Sensitivität gegen das reife Dimer rekonstituiert werden (ABBILDUNG 49). Somit erfüllt die Isomeraseaktivität der a'-Domäne wahrscheinlich eine Schlüsselrolle in der Retrotranslokation von K28.

Dabei führt sie abhängig von stabilisierenden Wechselwirkungen innerhalb des Dimers entweder durch Reduktion der Disulfidbrücke zur Dissoziation des Heterodimers (ABBILDUNG 49A I) oder sie unterstützt durch Umlagerung intramolekularer Disulfidbrücken die Entfaltung des Dimers, so dass das Toxin effizienter mit der Export-Maschinerie bzw. der ER-Membran interagieren kann (ABBILDUNG 49A II).

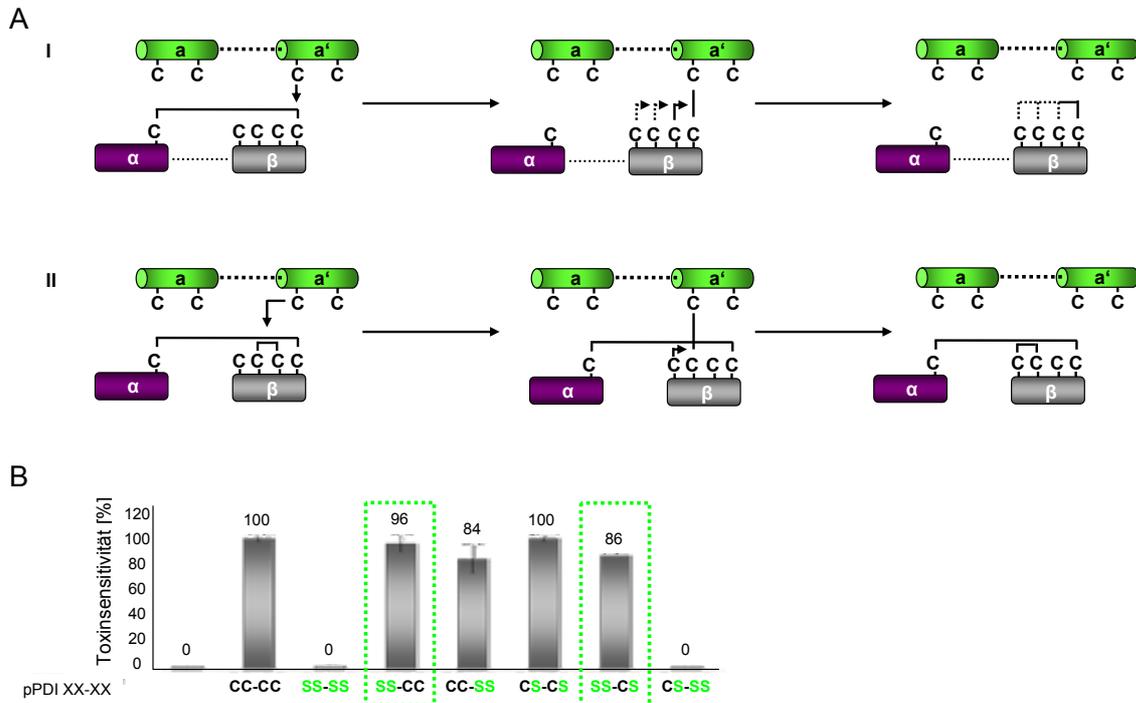


Abbildung 49: **A:** Schematische Darstellung einer möglichen Wechselwirkung der Protein-Disulfidisomerase Pdi1p und K28. Die Isomeraseaktivität der α' -Domäne der Pdi1p ist möglicherweise am Retrotranslokationsprozess des Toxins beteiligt. Ein Cysteinrest der K28 β -Untereinheit könnte eine gemischte Disulfid-Brücke zwischen Toxin und N-terminalem Cysteinrest der α' -Domäne angreifen und somit K28 α aus dem Dimer entlassen. Wird die dimere Struktur des Toxins neben der Disulfidbrücke zwischen α - und β -Untereinheit durch zusätzliche Wechselwirkungen aufrechterhalten, würde eine Dissoziation des Toxins vor dem ER-Export verhindert (I). Die Ausbildung einer alternativen Disulfid-Brücke innerhalb des K28 β -Monomers durch einen nukleophilen Angriff der β -Untereinheit erscheint ebenso möglich, wonach die Retrotranslokation ins Zytosol durch Veränderung der dreidimensionalen Struktur des Toxins unterstützt würde (II). **B:** Sensitivität des Stammes PD1a' nach Komplementation mit den angegebenen Pdi1p-Varianten. Der Hemmhof im MBA-Test nach Applikation des K28-Dimers wurde nach Komplementation mit PDI CC-CC (100 %) verglichen. Die entsprechenden Stämme, die auf eine Beteiligung der Reduktaseaktivität der Protein-Disulfidisomerase schließen lassen, sind durch Markierung hervorgehoben.

Im Modell zur Ausbildung der natürlichen Immunität einer K28-Killerhefe gegenüber dem eigenen Toxin, interagiert das endozytierte und retrotranslozierte Dimer im Zytosol mit dem Toxinvorläufer (pptoX). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass bereits die zytosolisch vorliegende α -Untereinheit in der Lage ist pptoX zu binden und eine funktionelle Immunität zu vermitteln (nicht dargestellt). Somit besteht keine Notwendigkeit in der Dislokation als Dimer, was die Rolle der Pdi1p im Export-Prozess neu definieren könnte.

Auch für bakterielle Toxine wurde bereits eine Abhängigkeit von der Protein-Disulfidisomerase im Retrotranslokationsprozess als gemeinsame Eigenschaft dieser Toxin-Klasse festgestellt. Im Falle des Cholera Toxins basiert dieses Phänomen vermutlich auf einer Exposition hydrophober Bereiche im ER, aufgrund derer CTA1 von der Protein-Disulfidisomerase als Substrat erkannt werden kann. Die PDI bindet im reduzierten Zustand die A1 Kette, entfaltet sie, erhält dabei den B-Ring und entlässt in ihrer oxidierten Form das Toxin durch Spaltung der Disulfidbrücke zwischen A1 und A2 (TSAI UND RAPOPORT, 2002; TSAI ET AL., 2001). Die A1-Kette wird freigesetzt, retrotransloziert und aktiviert aufgrund ihrer ADP-Ribosyltransferase-Aktivität die α -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins der Adenylatcyclase, während die A2-Kette mit dem B-Ring verbunden bleibt (MAJOUL ET AL., 1997). Da CTA1 in der Lage ist, sich nach Freisetzung durch die Protein-Disulfidisomerase spontan zurückzufalten, ist dieser Entlassungsschritt vermutlich mit der Retrotranslokation gekoppelt (MATLACK ET AL., 1998). Im Verlauf der Intoxikation mit Ricin erfüllt PDI hingegen eher die Funktion einer Reduktase, was dazu führt, dass das Einfügen weiterer Disulfidbrücken in RTA dessen Faltung stabilisiert und dadurch dessen *in vivo* Toxizität reduziert (ARGENT ET AL., 1994; BELLISOLA ET AL., 2004; TSAI ET AL., 2001).

Rolle von Sec61p in der Retrotranslokation von K28

Die Proteinsekretion beginnt mit der Translokation über Sec61p in das Endoplasmatische Retikulum, wo sekretorische Proteine zu ihrer funktionellen Form reifen und schließlich über Transportvesikel zu ihren Zielorten gelangen. Die nicht korrekt oder unvollständig gefalteten Proteine, werden im ER zurückgehalten bzw. wieder dorthin zurückgeführt, um im Zytosol proteasomal abgebaut zu werden (MCCRACKEN UND BRODSKY, 1996). Sec61p bildet hierbei möglicherweise einen Teil des dynamischen Export-Komplexes, der sich darüber hinaus aus weiteren ERAD-Komponenten und akzessorischen Proteinen zusammensetzt (ROMISCH, 2005). Angaben in der Literatur zum Durchmesser dieser Pore schwanken zwischen 40-60 Å (HAMMAN *ET AL.*, 1998; HANEIN *ET AL.*, 1996). Die Hypothese, dass Sec61p den Retrotranslokationskanal im Prozess der ER-assoziierten Degradation darstellt, wurde erstmals 1996 aufgestellt, als mittels Co-Immünpräzipitation in Säugerzellen eine Interaktion eines ERAD-Substrates mit Sec61p nachgewiesen wurde (WIERTZ *ET AL.*, 1996B). Desweiteren konnte in Hefe in einer *sec61* Mutante eine verminderte Degradation des ERAD-Substrates CPY* sowie des mutierten α -Faktors beobachtet werden (PILON *ET AL.*, 1997; PLEMPER *ET AL.*, 1997).

Auch A/B-Toxine wie das *Pseudomonas* Exotoxin A und Ricin interagieren im Zuge der Retrotranslokation mit dem Sec61 Translokon (WESCHE *ET AL.*, 1999). Im Hinblick auf den ER-Export waren in vorherigen Arbeiten die Mutanten *sec61-2* sowie *sec61-3* untersucht worden, die sowohl lösliche als auch Membranproteine stabilisieren, jedoch auch durch Defekte im ER-Import gekennzeichnet sind, da die beiden isolierten Allele die Stabilität des Translokons bereits bei permissiver Temperatur beeinträchtigen (BIEDERER *ET AL.*, 1996; SOMMER UND JENTSCH, 1993; ZHOU UND SCHEKMAN, 1999). Diese verstärkte Proteolyse limitiert neben dem starken Translokationsdefekt den Einsatz beider Mutanten in der Funktionsanalyse von Sec61p, weshalb in dieser Arbeit auf alternative Stämme zurückgegriffen wurde.

„KNOCK-DOWN“ VON SEC61P

Ein „knock-down“ von Sec61p wurde durch Insertion eines Kanamycin-Resistenzgens in die 3'UTR Region des Translokons erreicht, die zur Destabilisierung der korrespondierenden mRNA und somit einem reduzierten Proteingehalt führt. Die Sensitivität dieses Stammes war gegenüber dem Letalkonstrukt K28 α nicht beeinträchtigt. Somit erscheint der ER-Import durch „knock-down“ des Translokons nicht signifikant eingeschränkt zu sein, so dass noch ausreichende Mengen an K28 α in den sekretorischen Weg gelangen. Auch die unveränderte Sekretionsrate des prozessierten α/β -Toxins basierend auf dem ER-Import des Vorläufertoxins (pptox) bestätigte einen uneingeschränkten anterograden Proteintransport über die ER-Membran. Da sich keine Resistenz gegenüber dem Letalkonstrukt einstellte, sollte auch die Retrotranslokation von K28 α unbeeinflusst sein. Über eine Beeinträchtigung von sec61 DAmP in der Retrotranslokation von K28 α kann somit aufgrund der potentiellen Beteiligung an beiden Transportschritten keine genaue Aussage getroffen werden. Gegenüber dem K28-Dimer zeigte der Stamm jedoch eine deutlich verminderte Sensitivität, die sich in einem um 5 mm verkleinerten Hemmhof äußerte. Anhand der unveränderten Sensitivität nach Applikation des K1-Toxins, wurde sichergestellt, dass Proteine der Plasmamembran den sekretorischen Weg mit gleicher Effizienz durchlaufen und somit auch der Membranrezeptor von K1 in ausreichender Konzentration vorhanden ist. Daher kann angenommen werden, dass Erd2p als Plasmamembran-Rezeptor des Killertoxins K28 ebenfalls auf der Zelloberfläche lokalisiert und es nicht aufgrund einer verminderten Toxinaufnahme zu einem Verlust der Sensitivität kam. Somit konnte erstmals ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von Sec61p an der Retrotranslokation des Heterodimers erbracht werden, der nicht auf der Untersuchung temperatursensitiver Mutanten beruht, die meist einen starken ER-Import Defekt aufweisen und sich zudem durch eine Instabilität Translokons auszeichnen (HEILIGENSTEIN *ET AL.*, 2006).

FUNKTION DER CYSTEINRESTE DES (RETRO)TRANSLOKONS

Anhand der Untersuchungen zur Rolle der Pdi1p im Retrotranslokationsprozess konnte gezeigt werden, dass die Cysteinreste des Killertoxins eine bedeutende Rolle in der Vermittlung des toxischen Effekts spielen und vermutlich eine Funktion im intramolekularen Umlagerungsprozess von K28 erfüllen. Eine weitere Funktion der Cysteine könnte neben der bisher vermuteten Aufgabe der Isomerisierung ebenfalls eine Interaktion mit Sec61p während des ER-Exports sein. Dieser Mechanismus wurde bereits für das ERAD-M-Substrat Deg1-Sec62-ProtA beschrieben, dessen zytosolisch lokalisierter N-Terminus im Zuge der N-Glykosylierung in das ER transferiert wird. Wird die Konsensussequenz am N-Terminus des Substrates verändert, findet keine Glykosylierung mehr statt, der Abbau verläuft hingegen mit gleicher Effizienz, was auf eine eher mechanistische Rolle dieser Modifikation hinweist (SCOTT UND SCHEKMAN, 2008). Während der ER-Translokation wird zwischen Substrat und Translokon über den Cysteinrest C373 des Kanals eine Disulfidbrücke geknüpft, was in einer *sec61 C373I* Mutante einen beschleunigten Abbau mit doppelter Effizienz zur Folge hat. Die mutierte Cysteinposition ist in Transmembrandomäne 8 lokalisiert, die gemeinsam mit weiteren Transmembrandomänen an der Bildung des lateralen „gate“ beteiligt ist. Die beiden Cysteine C150 sowie C121 hatten keinen Einfluss auf die Umsetzung des Membransubstrates, allerdings zeigte eine Substitution von C373 eine leichte Stabilisierung des löslichen Substrates CPY*. Da in K28 die beiden Untereinheiten α und β über eine einzelne Disulfidbrücke verknüpft sind, besitzt auch das A/B-Toxin das Potential über einen seiner Cysteinreste mit Sec61p im Retrotranslokationsprozess zu wechselwirken.

Der Phänotyp nach Applikation des Heterodimers entsprach in allen Cysteinmutanten dem Wildtyp. Demnach wurde kein verändertes Transportverhalten für K28 erkannt und somit kein Hinweis auf ein potentielles Intermediat von Toxin und Translokon erhalten. Im artifizialen System konnten nach Expression des Letalkonstrukts im Stamm *sec61 C150V* nur 67 % der Sensitivität erreicht werden, was neben einer erhöhten Degradation ebenso in einem verzögerten ER-Export bzw. einem ineffizienten ER-Import begründet sein könnte. Somit kann an dieser Stelle keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob Sec61p das Toxin im Zusammenhang mit ERAD erkennt und nach Punktmutation von C150 die α -Untereinheit verstärkt dem Proteasom zuführt oder ob K28 α aufgrund seines Unvermögens ein Intermediat mit dem Kanal zu bilden, schlechter retrotranslozieren kann.

Ein Defekt im Eintritt in den sekretorischen Weg wurde in früheren Arbeiten ausgeschlossen. Bildet K28 α während seines Transportes eine Disulfidbrücke über Cystein C150 mit Sec61p aus, sollte nach Mutation des einzigen Cysteinrestes der α -Untereinheit eine verminderte Sensitivität zu beobachten sein. Nach einem Cys/Ser Aminosäureaustausch, kam es im Wildtyp BY4742 allerdings zu einer Hypersensitivität gegenüber K28 α Cys/Ser (nicht dargestellt), wodurch für K28 α die Bildung einer Disulfidbrücke mit Sec61p während des ER-Exports ausgeschlossen werden kann. Demnach wäre die Reduktion der Sensitivität nur durch einen bisher unbekanntem oder Substrat-abhängigen Import-Defekt der beschriebenen Mutanten zu erklären bzw. durch die indirekte Auswirkung eines Interaktionsverlustes übriger Dislokations-Komponenten mit den beschriebenen *sec61* Varianten.

SEC61 MUTANTEN MIT DEFECTEN IN DER RETROTRANSLOKATION

In einem Screen wurden Mutanten isoliert (*sec61-R1-R4*), die Defekte in der Retrotranslokation von ERAD-Substraten zeigen, jedoch gleichzeitig naszierende Polypeptide mit unveränderter Effizienz in das ER importieren (ZHOU UND SCHEKMAN, 1999). In Untersuchungen zum ER-Export wurden Mikrosomen dieser Stämme nach *in vitro* Translation des Substrates in isoliertem Zytosol sowie einem ATP-regenerierenden System aufgenommen. Im WT wurden etwa 50 % des Proteins in 40 min transportiert, wohingegen aus Mikrosomen der Mutanten lediglich 10-20 % in das Zytosol transloziert wurden. Dabei sind verschiedene Eigenschaften der (Retro)translokation betroffen. Durch den Austausch hydrophober gegen hydrophile Aminosäuren, können *sec61-R1* und *sec61-R2* BiP eventuell nicht mehr entlassen, wodurch das Chaperon mit Sec61p assoziiert bleibt und den Transport von K28(α) zum Exportkanal nicht mehr unterstützen kann. Aufgrund des leichten Import-Defekts von *sec61-R3* weist die Mutante auch einen verringerten Sec61-Gehalt auf (ZHOU UND SCHEKMAN, 1999). Daher kann der Effekt entweder auf einer ineffektiven Retrotranslokation oder einem Mangel ER residenter Proteine beruhen, die für den ER-Export des K28-Dimers verantwortlich sind. Die Substitution der Aminosäuren in den Stämmen *sec61-R3* und *sec61-R4* könnte Protein-Protein-Wechselwirkungen mit anderen Membranproteinen wie ERAD-Komponenten beeinträchtigen, die sowohl an der Dislokation als auch der Degradation beteiligt sind. Da Sec61p darüber hinaus auch mit dem Proteasom interagieren kann, um den Abbau eines ERAD-Substrates einzuleiten, kann es durch diesen Interaktionsverlust auch zu einer verminderten Degradation kommen.

Die Effekte der beschriebenen Mutanten erscheinen bezüglich der beiden Testsysteme disparat. Während die Stämme *sec61-R1* und *sec61-R2* keine phänotypische Veränderung gegenüber dem reifen α/β -Toxin zeigten, verhielten sie sich nahezu resistent gegenüber dem K28 α Lethalkonstrukt. In *sec61-R3* sowie *sec61-R4* kam es zu einem gegenläufigen Effekt, bei dem sich in den Mutanten eine Resistenz gegenüber niedrigen Toxinkonzentrationen einstellte, während eine starke Hypersensitivität gegenüber K28 α auftrat. Für *sec61-R1* und *sec61-R2* kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es aufgrund eines bisher noch nicht beobachteten Importdefekts zu einer solchen Reduktion der Sensitivität kommt. Allerdings wäre in diesem Fall auch einen Einfluss auf den ER-Export des K28-Dimers zu erwarten, da die Konzentration an ER-luminalen Proteinen ebenfalls stark verändert sein müsste. Somit ist nicht auszuschließen, dass die Stämme *sec61-R1* und *sec61-R2* die Retrotranslokation des Letalkonstruktes verhindern. Die unterschiedlichen Phänotypen der Mutanten auf die Wirkung von K28 α bzw. dem natürlichen α/β -Toxin lässt vermuten, dass entweder das Heterodimer andersartige Ansprüche an den ER-Exportkanal stellt als die isolierte α -Untereinheit oder dass sich die Substrateigenschaft des Toxins verändert, wenn es im artifiziellen System isoliert von der β -Untereinheit vorliegt.

Für *sec61-R3* und *sec61-R4* kann ein indirekter Einfluss einer reduzierten Chaperonkonzentration eher ausgeschlossen werden, da der ER-Import in diesen Mutanten vermutlich nicht beeinträchtigt ist. Gestützt wird diese Annahme durch den hypersensitiven Phänotyp nach Expression des Letalkonstrukts, der im Falle eines Import-Defekts hätte ausbleiben müssen. Auch hier wird deutlich, dass beide Toxinvarianten als ER-Exportsubstrate vermutlich unterschiedliche Ansprüche an die Funktionalität von Sec61p stellen, da es im Gegensatz zur leicht reduzierten Sensitivität nach Applikation des K28-Dimers im artifiziellen System aufgrund der gesteigerten Toxinsensitivität entweder zu einem verbesserten Exportverhalten oder zu einer reduzierten Degradation von K28 α kommt. Dies entspricht dem beschriebenen Interaktionsverlust von *sec61-R4* mit ERAD-Komponenten, deren Beteiligung am Abbau von K28 α in der vorliegenden Arbeit bereits charakterisiert werden konnte. Die leicht reduzierte Sensitivität dieser Stämme gegenüber dem reifen Toxin stimmt somit mit der Schlussfolgerung überein, dass das Ubiquitin-Proteasom-System für den Abbau des Dimers keine gleichermaßen entscheidende Rolle spielt wie für K28 α und sich eine Störung der Interaktion des potentiellen Export-Kanals mit ERAD-Komponenten dementsprechend moderat auf die Sensitivität des Heterodimers auswirkt. Beide Mutanten, *sec61-R3* und *sec61-R4*, scheinen somit eher die Dislokation von K28 negativ zu beeinflussen.

Interaktion von K28 und Sec61p

Eine gängige Methode, den funktionellen Zusammenhang zweier Proteine zu untersuchen, ist der direkte Nachweis ihrer Interaktion. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung einer Interaktion von K28 mit Sec61p ein Stamm verwendet, dessen einzige Sec61p-Kopie am C-Terminus eine 13-fache Wiederholung des c-myc-Epitops aufweist und dennoch biologisch aktiv ist (CARVALHO *ET AL.*, 2010). Nach Sphäroplastierung und Toxininkubation wurde die Membran- von der löslichen Fraktion getrennt, in der sich nach Digitonisierung der Sec61-Komplex befand. Nach Präzipitation mittels anti-c-myc konnte die Untereinheit Sbh1p im Sec61-Komplex nachgewiesen werden, so dass angenommen werden kann, dass der vollständige, trimäre Komplex des Translokons aus der ER-Membran herausgelöst wurde. K28 war in dieser Fraktion jedoch nicht zu detektieren, was entweder gegen eine Interaktion mit Sec61p während des ER-Exports spricht oder ihr Nachweis durch experimentelle Limitierung auf dieser Ebene ausgeschlossen ist.

In vorherigen Untersuchungen war K28 in Zellfraktionierungsexperimenten in der zytosolischen Fraktion detektiert worden, wobei nicht auszuschließen ist, dass es sich dabei um den Teil des Toxins handelt, der mit der Plasmamembran assoziiert vorliegt und durch Homogenisierung der Zellen in die lösliche Fraktion überging. Ein weiterer Grund könnte die transiente Wechselwirkung von Substrat und Exportkanal sein, die vermutlich in einem kleinen Zeitfenster ohne „crosslink“ oder radioaktive Markierung immunologisch nicht darzustellen ist. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass K28 während der Retrotranslokation für Antikörper nicht zugänglich und somit in der Western-Analyse nicht nachweisbar ist. Es scheint daher unumgänglich, die Membranfraktion aus einer deutlich höheren Zellzahl anzureichern und/oder etablierte *in vitro* Methoden mit radioaktiv markiertem Substrat und einen „crosslinker“ einzusetzen, um die transiente Interaktion von Substrat und potentiell Exportkanal zu stabilisieren. Für die „crosslink“-Versuche wurde eine verkürzte Variante des CPY* mit drei HA-„tags“ und einer DHFR-Fusion verwendet, wodurch der Abbau erheblich verzögert werden konnte. Dieses Substrat zeigte lediglich im Unterschied zu Hrd1p einen sehr schwachen „crosslink“ mit Sec61p der zudem unabhängig von der Präsenz anderer ERAD-Komponenten war. Diese Ergebnisse sprachen somit gegen eine Beteiligung von Sec61p an der Retrotranslokation (CARVALHO *ET AL.*, 2010).

Um den Einfluss verschiedener *sec61* Mutationen auf den Export fehlgefalteter Proteine zu untersuchen, werden meist „Pulse-Chase“-Experimente durchgeführt und die Halbwertszeit verschiedener ERAD Substrate bestimmt. So konnte die Interaktion von ERAD-Substraten mit Sec61p und weiteren Translokation-Komponenten nach Präparation und Solubilisierung von Mikrosomen und „crosslink“-Reaktionen nachgewiesen werden (TRETTER *ET AL.*, 2013). In Säugerzellen wurde für das „crosslinking“ das Sulfhydryl-reaktive Bis-Maleimido-Hexan (BMH) eingesetzt (KALIES *ET AL.*, 1998), wohingegen in Hefe gemeinhin das Amin-reaktive Disuccinimidyl-Suberat (DSS) verwendet wurde. Beide besitzen mit 10,9 Å annähernd die gleiche „linker“-Länge, wobei DSS ein breiteres Spektrum an Aminosäuren erreicht (TRETTER *ET AL.*, 2013). Auch die A-Kette des Cholera Toxins (CTA1) war hinsichtlich einer Interaktion mit Sec61p untersucht worden. Dazu wurde CTA1 nach *in vitro* Translation in Gegenwart radioaktiv markierter Aminosäuren in Mikrosomen importiert und nach Entfernen der Ribosomen mittels Puromycin die Membranen zur Stabilisierung des Exportmediats in Export-Puffer ohne ATP inkubiert. Die Solubilisierung der Mikrosomen ließ den Sec61-Komplex intakt, der im Anschluss immunpräzipitiert werden konnte. Die Retrotranslokation des Toxins erfolgte nach Zugabe von isoliertem Zytosol, wobei dieser Schritt durch Applikation eines konkurrierenden Import-Substrats inhibiert wurde (SCHMITZ *ET AL.*, 2000).

Um komplexe Methoden des *in vitro* Exports aus Mikrosomen sowie das Arbeiten mit radioaktivem Material zu umgehen, wurde eine mögliche Interaktion von K28 und Sec61p mit Hilfe des „Split-Ubiquitin-System“ (SUS) untersucht, da diese Methode bereits erfolgreich zum Interaktionsnachweis von Translokationskomponenten eingesetzt wurde (WITTKÉ *ET AL.*, 2002; WITTKÉ *ET AL.*, 1999). Grundlage dieses Modells ist die Fusion eines Fänger- sowie Beuteproteins mit dem N-Terminus (NubG; AS 1-37) von Ubiquitin bzw. dessen C-terminaler Domäne (Cub; AS 35-76) sowie dem Transkriptionsfaktor PLV (STAGLJAR *ET AL.*, 1998). Interagieren Fänger- und Beuteprotein, so bilden NubG und Cub wieder ein intaktes Ubiquitinmolekül aus, so dass der Transkriptionsfaktor PLV abgespalten wird, in den Kern diffundiert und die Transkription der β -Galaktosidase (*lacZ*) aktiviert. In der vorliegenden Arbeit wurde der diploide Stamm Sec61p/Sec61p-CPLV verwendet, dessen Mikrosomen den mutierten α -Faktor mit regulärer Effizienz translozieren und somit einen ungestörten post-translationalen Protein-Import zeigen. Eine Analyse der Wechselwirkung von Sec61p und K28 α konnte anhand dieses Testsystems nicht durchgeführt werden, da die Fusion der α -Untereinheit mit NubG zum Verlust der biologischen Aktivität des Toxins führte. Des Weiteren wäre mit Hilfe des „Split-Ubiquitin-Systems“ keine Differenzierung zwischen einer Wechselwirkung während des ER-Imports oder der Dislokation in das Zytosol möglich gewesen.

Nachdem sowohl die Membranlokalisierung von Sec61-CPLV als auch die Funktionalität des Heterodimers K28-NubG bestätigt werden konnte, wurde die Expression des Reporterproteins nach Applikation des „getaggen“ Toxins im Stamm Sec61p/Sec61p-CPLV untersucht. Der Nachweis einer Interaktion dieser Komponenten war jedoch auch über diesen Weg nicht festzustellen und gelang lediglich für die als Positiv-Kontrolle eingesetzten Komponenten des Ost-Komplexes (Ost1-NubG und Wbp1-CPLV). Über SUS gelang zwar bereits ein Interaktionsnachweis von Sec61p mit Sss1p und Sbh1p, den Komponenten des trimären Sec61-Komplexes, jedoch nicht mit den Translokation-Untereinheiten Sec62p und Sec63p. In „crosslink“-Experimenten konnte hingegen für Sec63p eine Wechselwirkung mit Sec61p nachgewiesen werden. Demnach scheint es lediglich möglich, starke Interaktionen mittels SUS darzustellen, die bereits in „crosslink“-Versuchen bzw. über Co-Immünpräzipitation ermittelt worden waren. Das Testsystem zeichnet sich somit durch eine hohe Genauigkeit, jedoch eine niedrige Sensitivität aus (WITTKÉ ET AL., 1999). Vermutlich ist die fehlende Darstellung der Wechselwirkung des Oligosaccharyl-Transferase-Komplexes (Ost1p) und Sec61p über *lacZ*-Aktivierung ebenfalls auf eine labile Bindung zurückzuführen, da auch hier lediglich der Interaktionsnachweis über Abspaltung des Transkriptionsfaktors gelang. Somit bietet SUS vermutlich auch keine ausreichende Sensitivität, um eine transiente Verbindung, wie sie beim Transport zwischen „cargo“ und Kanal entsteht, nachzuweisen. Eine weitere Möglichkeit, die potentielle Wechselwirkung von Sec61-CPLV mit K28-NubG genauer zu untersuchen, bestünde demnach im immunologischen Nachweis der Spaltung von CPLV. Da bereits zahlreiche Hefestämme existieren, in denen Schlüsselkomponenten des ERAD-Pathways mit NubG fusioniert wurden, eröffnete dies die Möglichkeit, die in Toxizitätstests nachgewiesene Beteiligung dieses Prozesses an der Degradation von K28 anhand eines Interaktionsnachweises zu verifizieren. Prinzipiell besteht die Komplikation eines CPLV-Fusionsproteins ohne Membrananker darin, dass der Transkriptionsfaktor auch ohne Interaktion mit dem Translokation in den Nukleus diffundieren kann, um dort das Reportergen zu aktivieren. Da PLV jedoch mit der β -Untereinheit des Killertoxins verbunden wäre, die nach Retrotranslokation aus dem ER proteasomal degradiert wird, könnte dies möglicherweise vermieden werden. Der modifizierte Ansatz war jedoch ebenfalls ungeeignet, da die Fusion von K28 mit CPLV zum Verlust der biologischen Aktivität des Killertoxins führte.

Toxinwirkung und „unfolded protein response“ (UPR)

Eine korrekte Faltung sekretorischer Proteine im ER ist essentiell für das Überleben der Zelle. Während dieses Prozesses assistieren Chaperone bei der Faltung naszierender Polypeptide, die durch post-translationale Modifikationen wie die Ausbildung von Disulfidbrücken oder N-Glykosylierungen zu ihrer funktionellen Konformation reifen (FEIGE UND HENDERSHOT, 2011; HULSMIEIER *ET AL.*, 2011). Anomalien in diesem Prozess können zur Fehlfaltung von Proteinen führen, deren Akkumulation von ER-Kontrollmechanismen erkannt und durch Aktivierung der „unfolded protein response“ (UPR) bekämpft wird. Den einzigen UPR-Sensor in Hefe repräsentiert Ire1p (MORI, 2009). Während der Aktivierung der UPR wird das Chaperon Kar2p von Ire1p entlassen, wodurch dieses dimerisiert, autophosphoryliert und mit Hilfe seiner Ribonuklease-Aktivität ein Intron der *HAC1*-mRNA entfernt (COX UND WALTER, 1996; KIMATA *ET AL.*, 2007). Der daraus abgeleitete Transkriptionsfaktor Hac1p reguliert viele Funktionen der Zelle, deren korrespondierende Gene, wie Chaperone oder ERAD-Komponenten, zur ER-Qualitätskontrolle beitragen (HARDING *ET AL.*, 1999; YOSHIDA *ET AL.*, 2003). Darüber hinaus stimuliert Hac1p die Expansion der ER-Membran, um die Faltungskapazität des ERs zu steigern (SCHUCK *ET AL.*, 2009). Kann die UPR nicht induziert bzw. wieder inhibiert werden, kann es aufgrund von anhaltendem ER-Stress zur Induktion von Apoptose und somit zum Zelltod kommen (TABAS UND RON, 2011).

Auch A/B-Toxine können aufgrund der Nutzung von ERAD-Komponenten sowie einer partiellen Degradation im Zuge der Retrotranslokation mit der UPR in Zusammenhang gebracht werden. Ricin gehört zur Klasse der Ribosomen-inaktivierenden Proteine (RIP), die einen stark konservierten Adeninrest innerhalb des Sarcin/Ricin-Loops von 80S Ribosomen spalten (ENDO UND TSURUGI, 1987), so dass das depurinierete Ribosom die Proteinsynthese nicht mehr fortführen kann (LORD *ET AL.*, 1994). Diese Hemmung der Proteinbiogenese reicht allerdings nicht aus, um Zelltod zu induzieren (LI *ET AL.*, 2007). Da die UPR-Aktivierung am Ende zur Expression von ERAD-Komponenten und damit indirekt auch zu einer verstärkten Proteolyse des Toxins führt, wirkt die zelluläre Stressantwort zum Teil auch einer Intoxikation von Ricin entgegen. Um dies zu minimieren, inhibiert Ricin auch das Spleißen der *HAC1*-mRNA und stoppt somit den Verteidigungsprozess der Zelle. Für Shiga Toxin konnte eine konträre Wirkungsweise beobachtet werden, indem das Toxin durch UPR-Induktion das anhaltende Stress-Signal der Zelle nutzt, um Apoptose zu induzieren (TESH, 2012A).

Um im Rahmen dieser Arbeit die Induktion von UPR in Hefe nach Behandlung mit K28 untersuchen zu können, wurde unter anderem das Reporterkonstrukt UPRE-mCherry eingesetzt (MERKSAMER *ET AL.*, 2008). In diesem von LAJOIE *ET AL.* entwickelten System wird die Expression von mCherry von einem minimalen Promotor mit vier UPR-Elementen kontrolliert, so dass die Synthese ausschließlich unter Stress-Bedingungen stattfindet. Die Applikation von 5 mM Dithiothreitol (DTT), das die Bildung von Disulfidbrücken in neu synthetisierten Proteinen verhindert, führte über einen Zeitraum von 10 h zu einer Steigerung der mittleren Fluoreszenzintensität um etwa 5.500 relative Fluoreszenzeinheiten (rFE) (LAJOIE *ET AL.*, 2012).

Da in diesen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass die Toxinwirkung abhängig von ERAD-Komponenten variiert, wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe dieses Systems untersucht, ob dieser Effekt in Zusammenhang mit der Induktion der UPR steht. Um das Expressionsverhalten des Fluoreszenzproteins nach Behandlung mit K28 bestimmen zu können, wurde der Teststamm mit Toxin bzw. mit McILvaine Puffer versetzt und mit der relativen Fluoreszenzänderung nach Behandlung mit Tunikamycin (TM) verglichen. Die Inkubation mit Tunikamycin führte zur Verdopplung der rFE, die weder durch Applikation von K28 erreicht, noch bei gleichzeitiger Gabe von TM und K28 wieder reduziert werden konnte. Somit zeigt das Toxin weder eine induzierende noch eine reprimierende Wirkung auf die zelluläre UPR.

Im Falle des Letalkonstrukts K28 α erbrachte das mCherry-Reportersystem keine reproduzierbaren Ergebnisse, weshalb auf ein alternatives System zurückgegriffen wurde, in dem die Expression der β -Galaktosidase (*lacZ*) von UPR-Elementen der Promotorregion kontrolliert wird. Auch die Wirkung von Ricin wurde über dieses System charakterisiert und zeigte, dass RTA nach zehnstündiger Expression die Induktion der UPR verhindern kann, indem es das Spleißen der *HAC1*-mRNA und somit das „signalling“ durch Ire1p blockiert. Als Kontrolle diente eine gleichzeitige Expression von *lacZ* unter Kontrolle des *PGK*-Promotors, um auszuschließen, dass die fehlende Induktion der UPR nicht auf eine generelle Inhibierung der Proteinsynthese zurückzuführen war (PARIKH *ET AL.*, 2008). Eine Expression des Letalkonstrukts K28 α führte in diesem Stamm weder unter nicht-induzierenden noch unter induzierenden Bedingungen zur Aktivierung des *lacZ*-Reporters. Lediglich die Behandlung mit Tunikamycin konnte in allen Ansätzen eine Reaktion hervorrufen, die auch nach gleichzeitiger Expression von K28 α nicht inhibiert wurde. Somit zeigte auch das artifizielle System keinen Zusammenhang mit der UPR.

Ein direkter Nachweis zeigte, dass die Expression des Letalkonstrukts auch das Spleißen der *HAC1*-mRNA weder induzieren, noch nach simultaner Behandlung mit Tunikamycin inhibieren konnte. K28 sowie K28 α unterscheiden sich in den ER-Exportmechanismen demnach nicht nur in der Nutzung von ERAD-Komponenten von anderen A/B-Toxinen, sondern zeigen auch im Hinblick auf die Bedeutung der UPR keine Übereinstimmung mit klassischen Vertretern dieser Toxin-Klasse. Klar scheint jedoch, dass weder K28 noch K28 α die UPR zur Intoxikation einbeziehen, wenn die Beteiligung klassischer ERQC-Komponenten eher dem Degradations- als dem Retrotranslokationsprozess zugeordnet werden kann.

Hrd1p-unabhängige Proteolyse (HiP) im ER-Export von K28

Die ER-Qualitätskontrolle (ERQC) beinhaltet die ER-Retention, die ER-assoziierte Degradation (ERAD) und das Rückführen von Proteinen aus Organellen des weiteren Sekretionsweges (ELLGAARD *ET AL.*, 1999), die mit Hilfe luminaler Chaperone sowie Glykosylierungsschritten gewährleistet wird (BRODSKY UND MCCRACKEN, 1999; JAKOB *ET AL.*, 1998). Der Hrd1-Komplex des ERAD-L-Pathways kann viele Substrate dem proteasomalen Abbau zuführen, wobei sich Deletionsmutanten lediglich durch einen verzögerten Abbau auszeichnen und keinen vollständigen Verlust in der Protein-Degradation aufweisen (WILHOVSKY *ET AL.*, 2000). Dies legt die Vermutung nahe, dass ein alternativer Degradationsmechanismus oder zumindest eine alternative Ubiquitin-Ligase existiert (HILL UND COOPER, 2000; WILHOVSKY *ET AL.*, 2000). CALDWELL *ET AL.* (2001) beschrieben diesbezüglich die Hrd1p-unabhängige Proteolyse (HiP), welche die Notwendigkeit eines ER-Golgi-ER-Transportes zur effizienten Degradation eines ERAD-L-Substrats beschreibt, weshalb der Abbau von CPY* erst nach Inhibition beider Degradationswege zum Erliegen kommt. HAYNES *ET AL.* formulierten die Theorie, dass der Golgi-Transport eher die Konsequenz eines ineffizienten Rückhalte-Mechanismus des Hrd1-Pathway im ER charakterisiert oder dass durch Modifikationen in diesem Kompartiment die Affinität des Substrates zur Degradationsmaschinerie gesteigert wird. Dieser Rückhol-Mechanismus nutzt größtenteils den Standard-Vesikel-Transport (HAYNES *ET AL.*, 2002).

ERKENNUNG UND ABBAU

Der duale Mechanismus der ER-Qualitätskontrolle ist unzureichend charakterisiert, da beide Wege in der terminalen Degradation zusammenfließen und eine Inhibition dieses Schrittes in einer dauerhaften Akkumulation im ER resultiert (VASHIST *ET AL.*, 2001). Dennoch wurden verschiedene Komponenten der HiP identifiziert und verschiedenen Abschnitten zugeordnet. Erv29p ist verstärkt in COPII-Vesikeln lokalisiert, die das ER verlassen und zyklisiert wahrscheinlich zwischen ER und Golgi (CALDWELL *ET AL.*, 2001). Ohne diesen Rezeptor erliegt die HiP des ERAD-Substrats CPY*, wodurch das Polypeptid stabilisiert wird. Erv29p erkennt ein Motiv aus hydrophoben Aminosäuren (ILV), das mit ILYVL in modifizierter Form auch in K28 α vorkommt (OTTE UND BARLOWE, 2004). Eine Δ erv29 Deletionsmutante zeigte nach Expression von K28 α einen hypersensitiven Phänotyp, so dass es vermutlich analog zu CPY* zu einem verzögerten Golgi-Transport kommt, wodurch mehr Toxin direkt in das Zytosol gelangen und sein „target“ erreichen kann (ABBILDUNG 50).

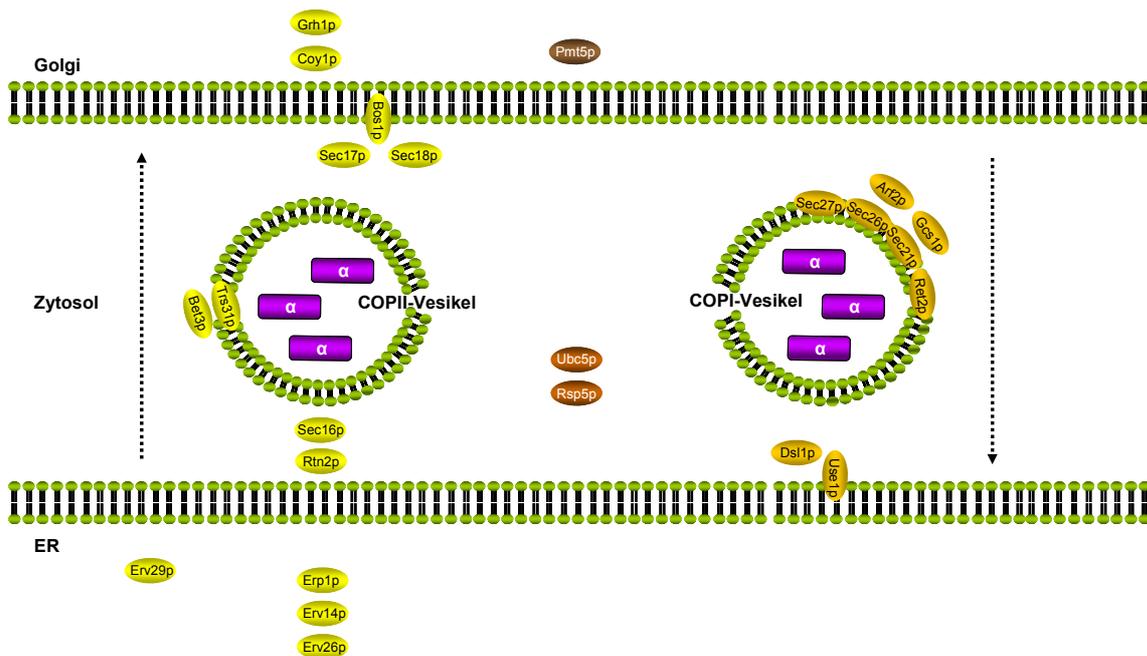


Abbildung 50: Schematische Darstellung der beteiligten Komponenten der Hrd1-unabhängigen Proteolyse (HiP) im Degradationsprozess von K28 α . Zunächst erfolgt die Erkennung des Toxins im ER, die Verpackung in COPII-Vesikel sowie der Transport zum Golgi. Nach einer potentiellen Modifikation durch Pmt5p gelangt das Toxin über COPI-Vesikel zurück zum ER und im Zuge der Retrotranslokation weiter ins Zytosol. Dem anschließenden proteasomalen Abbau geht vermutlich die Ubiquitinierung mittels Ubc5p und Rsp5p voraus.

Im Anschluss an die Erkennung durch Erv29p, werden die Substrate abhängig von ihrer Affinität zu Hüllproteinen bzw. assoziierten Rezeptoren in Vesikel verpackt. Dazu ist es nötig, dass Hüllproteine über einen bestimmten Zeitraum einen nur teilweise assemblierten Zustand aufrechterhalten. Der negative Effekt von *BST* Genen auf die weitere Formierung der Transportvesikel dient somit der Sortierung des „cargos“. Ohne diesen Checkpoint können Vesikel ausgebildet werden, bevor die Substrat-Selektion abgeschlossen ist. (ELROD-ERICKSON UND KAISER, 1996; SCHIMMOLLER *ET AL.*, 1995). Infolge dessen kommt es nach Mutation einzelner *BST* Gene zur Sekretion ER-residenter Proteine wie Kar2p und Pdi1p. Fast die Hälfte des Pdi1p Gehaltes sowie 38 % der Kar2p-Moleküle werden in einer *bst1bst3* Doppelmutante innerhalb von 3 h sezerniert. Dabei handelt es sich um den stärksten nichtletalen ER-Retentionsdefekt, der bisher beschrieben wurde (ELROD-ERICKSON UND KAISER, 1996). Somit sinkt die Konzentration ER-luminaler Chaperone, die sowohl am ER-Import als auch am Export beteiligt sind. Gleichzeitig wird die Transportrate sekretorischer Proteine verringert. Dies bedeutet, dass nach dem Verlust einzelner *BST* Genprodukte im ER nur noch schlecht zwischen sekretorischen und zurückzuhaltenden Proteinen unterschieden werden kann. Bst1p ist darüber hinaus an der Reifung von GPI-verankerten Proteinen beteiligt, wodurch eventuell die Aufnahme von K28 im Stamm $\Delta bst1$ durch Veränderungen der Zellwand reduziert und eine Resistenz im MBA-Test ausgebildet wird. Daher müsste der Einfluss dieses Allels an sphäroplastierten Zellen wiederholt werden, um ausschließlich Effekte „downstream“ der Toxininternalisierung zu identifizieren. Nach Expression des Letalkonstrukts zeigte eine $\Delta bst1$ Deletionsmutante einen Rückgang der Sensitivität um lediglich 19 %. Somit konnte die zuvor beobachtete Resistenz dieses Stammes nicht bestätigt werden (KELKEL, 2009). Es kann daher angenommen werden, dass die Chaperon-Konzentration ausreicht, um K28 α in das ER zu importieren und anschließend in das Zytosol zu retrotranslozieren. Das Toxin selbst wird vermutlich nicht sezerniert, da sich in diesem Fall ein stärkerer Rückgang der Sensitivität hätte abzeichnen müssen. Bst1p scheint somit keinen entscheidenden Einfluss auf die Sortierung von K28 α für den Abbau zu haben.

Der eigentliche Degradationsprozess erfolgt im HiP-Weg abhängig von einer Ubiquitin-Ligase sowie entsprechenden konjugierenden Enzymen. Rsp5p zählt in *S. cerevisiae* zu dem einzigen Vertreter der E3-Nedd-Ubiquitinligasen, die eine HECT-Domäne besitzen. Neben seiner Funktion im Export der mRNA bzw. der Prozessierung von Transkriptionsfaktoren, ist Rsp5p an der Endozytose von Transportproteinen der Plasmamembran beteiligt (HOPPE *ET AL.*, 2000; RODRIGUEZ *ET AL.*, 2003). Diese werden Rsp5p-abhängig ubiquitiniert, anschließend internalisiert und in der Vakuole abgebaut (DUPRE *ET AL.*, 2004).

Manche Rsp5p-Substrate tragen ein PY-Motiv [L/P]PxY], andere werden über Adaptern mit diesem Motiv erkannt (STAWIECKA-MIROTA *ET AL.*, 2007) und mit kurzen Lys63-verknüpften Ubiquitinketten modifiziert, was die Voraussetzung für eine effiziente Endozytose darstellt (GALAN UND HAGUENAUER-TSAPIS, 1997). Rsp5p kann ebenso die Bildung von Lys48-Verknüpfungen katalysieren, was zu einem proteasomalen Abbau des Substrates führt (BELGAREH-TOUZE *ET AL.*, 2008). Weder K28 α noch das K28-Dimer enthalten eines der Erkennungsmotive. Dennoch kam es in *rsp5* und *ubc5*-„knock-down“ Mutanten zu einer Hypersensitivität nach Expression des Letalkonstrukts bzw. zu einer moderaten Reduktion der Sensitivität gegen das heterodimere α/β -Toxin (ABBILDUNG 50). Dies könnte für eine verminderte Degradation von K28 α im Zuge des alternativen ERAD-Pathways und einer verringerten endozytotischen Aufnahme des reifen Toxins sprechen, womit die Bedeutung der Ubiquitinligase sowie des konjugierenden Enzyms für die Retrotranslokation des K28-Dimers offen bleibt.

COPII-VESIKELTRANSPORT

Nach Selektion des „cargos“ erfolgt die Verpackung in COPII-Vesikel für den weiteren Transport zum Golgi. Dazu werden Proteine der Erv-Familie (Erv14p, Erv25p, Erv41p, Erv46p) sowie der p24-Familie (Emp24p, Erv25p, Erv1-6p) benötigt, deren Rolle noch weitestgehend unverstanden ist. Sie sind negative Regulatoren des Eintritts in COPII-Vesikel und dienen als Adapter, um Proteine mit der COPII-Hülle zu verbinden (SPRINGER *ET AL.*, 2000). Ohne diese Gerüstproteine haben ERAD-Substrate oder A/B-Toxine wie RTA ungehinderten Zugang zu COPII-Vesikeln, was dazu führt, dass sie fälschlicherweise verpackt und transportiert werden (HAYNES *ET AL.*, 2002). Obwohl Erv14p und Erv29p CPY* stabilisieren, ist es unwahrscheinlich, dass sie am gleichen Schritt im Transport zwischen ER und Golgi beteiligt sind (POWERS UND BARLOWE, 1998). Erv14p könnte eine Rolle bei der Verpackung löslicher Substrate im Golgi spielen, um diese wieder retrograd zum ER zu transportieren (TRAVERS *ET AL.*, 2000). Dies würde erklären, warum der Abbau von CPY* in einer Deletionsmutante verlangsamt ist, der anterograde Transport jedoch normal abläuft (POWERS UND BARLOWE, 1998). Auch eine Deletion von Emp24p führt zu einer signifikanten Verzögerung des ER-Exportes, genau wie in Δ *erv29* (SCHIMMOLLER *ET AL.*, 1995).

Da sowohl der Verlust von *ERV14*, *ERV26* bzw. *ERP1* zu einer Hypersensitivität gegenüber K28 α führte, kann gefolgert werden, dass ein funktionaler Golgi-Transport sowohl für Membranproteine (*ERV26*) als auch für lösliche Proteine (*ERP1*) als Teil der HiP zur Toxindegradation benötigt wird. Ein weiter Hinweis hierauf war die gesteigerte Sensitivität nach Verlust von *RTN2*, dessen Genprodukt an der lokalen Krümmung der ER-Membran zur Ausbildung von COPII-Vesikeln beteiligt ist (OKAMOTO *ET AL.*, 2012) (ABBILDUNG 50). Die beschriebenen Stämme zeigten keinen Effekt im MBA-Test gegen das K28-Dimer, was sekundäre Effekte des anterograden Sekretionsweges auf den Phänotyp nach Expression des Letalkonstrukts weitestgehend ausschließt.

Die COPII-Hülle selbst setzt sich aus den Untereinheiten Sar1p, Sec23p, Sec14p, Sec13p sowie Sec31p zusammen. Die Assemblierung wird durch Sar1p initiiert, das durch Sec12p aktiviert wird. Sar1p assoziiert mit der ER-Membran und rekrutiert Sec23/Sec24 und anschließend Sec13/Sec31p. Sec23 aktiviert die GTPase-Aktivität von Sar1p und wird selbst wiederum durch Sec13p/31p stimuliert (BI *ET AL.*, 2007). Sec16p reguliert die GTP-Hydrolyse negativ, um den zusammengelagerten „coat“ während der Substrat-Selektion zu stabilisieren und wird nicht für die Knospung selbst benötigt (KUNG *ET AL.*, 2012) (ABBILDUNG 50). Erst durch die GTP-Hydrolyse entsteht ein „uncoated vesicle“, auf dessen Oberfläche die SNARE-Proteine zur Fusion mit der Zielmembran exponiert werden (SUPEK *ET AL.*, 2002). Eine deutliche Hypersensitivität gegenüber K28 α war nur in einer *sec16* „knock-down“ Mutante zu erkennen. Ein verminderter Sec16p-Gehalt führt vermutlich zu einer unkontrollierten GAP-Aktivität von Sec31p, wodurch Vesikel bereits vor Beladung mit dem entsprechenden „cargo“ knospen. Es ist möglich, dass die Stämme *sar1* DAmP und *sec31* DAmP nach Destabilisierung ihrer mRNA weiterhin eine ausreichende Proteinmenge bereitstellen, um den COPII-Transport zu gewährleisten. Auch gegenüber dem K28-Heterodimer war kein veränderter Hemmhof im MBA-Test im Vergleich zum WT zu erkennen.

Am Zielkompartiment wird die Initiation der Interaktion zwischen ankommenden Vesikeln und Zielmembran benötigt; ein essentieller Prozess, der als „tethering“ bezeichnet wird (WHYTE UND MUNRO, 2002). Beim ER-Golgi-Transport werden COPII-Vesikel über den TRAPPI-Komplex an die Zielmembran gebunden (SACHER *ET AL.*, 2001), der sich aus den sechs Untereinheiten Trs20p, Trs23p, Trs31p, Bet5p, Bet3p und eventuell Trs33p zusammensetzt. Darüber hinaus werden auch Proteine des Golgi wie Grh1p und Coy1p für diesen Schritt benötigt. Bet3p bindet Sec23p, wodurch TRAPPI an COPII-Vesikeln assembliert (CAI *ET AL.*, 2007).

Nähern sich COPII-Vesikel der Zielmembran, aktiviert TRAPPI Ypt1p durch seine Nukleotidaustausch-Aktivität. GTP-gebundenes Ypt1p bindet an den Mediator Uso1p, der Vesikel zur Initiation der Fusion nahe an die Zielmembran dirigiert und TRAPPI vom COPII-Vesikel entlässt (YU UND LIANG, 2012). Die Dissoziation des „coats“ wird durch GTP-Hydrolyse initiiert. Dadurch wird die Interaktion von Sar1p zu anderen „coat“-Proteinen und der Membran destabilisiert (ANTONNY *ET AL.*, 2001). Der Verbrauch von aktiviertem Sar1p reguliert die Lokalisation und Lebensdauer der COPII-Hülle. Erst durch GTP-Hydrolyse entsteht ein „uncoated“-Vesikel, auf dessen Oberfläche die SNARE-Proteine Sed5p, Bos1p und Sec22p exponiert und mit Hilfe von Sec17p und Sec18p recyclet werden (SUPEK *ET AL.*, 2002).

Die „knock-down“ Mutanten *bet3* DAmP, *trs31* DAmP, *bos1* DAmP, *sly* DAmP, *sec17* DAmP und *sec18* DAmP sowie die Deletionsmutanten $\Delta grh1$, $\Delta coy1$ und $\Delta sec22$ verhielten sich nach Expression des K28 α -Letalkonstrukts hypersensitiv, woraus gefolgert werden kann, dass auch die effiziente Fusion von COPII-Vesikeln mit der Golgi-Membran eine Voraussetzung für die Degradation von K28 α darstellt (ABBILDUNG 50). Die unterschiedliche Ausprägung dieses Effekts ist vermutlich auf einen unterschiedlichen Proteingehalt nach „knock-down“ beziehungsweise auf potentielle Redundanz verschiedener Komponenten zurückzuführen.

Ein intakter früher sekretorischer Weg ist somit Voraussetzung für einen effizienten ERAD-Pathway, der auf stabilen ER-Strukturen beruht (TAXIS *ET AL.*, 2002). Der Abbau löslicher ERAD-Substrate wie CPY* und KHN, der auf den Transport zwischen ER und Golgi angewiesen ist, kommt daher in *sec18*, *sec12 erv14* und *erv29* Mutanten zum Erliegen (CALDWELL *ET AL.*, 2001; VASHIST *ET AL.*, 2001). Dagegen scheint die Degradation von ERAD-M-Substraten wie Ste6p oder CFTR davon nicht betroffen zu sein, da diese Proteine vor ihrer Proteolyse nicht in post-ER-Kompartimente des sekretorischen Weges transportiert, sondern in spezialisierten ER-Subdomänen zurückgehalten werden (KISER *ET AL.*, 2001; LOAYZA *ET AL.*, 1998; VASHIST *ET AL.*, 2001). Es ist unbekannt, welcher molekulare Mechanismus dieser Sequestrierung zugrunde liegt und ob dieser für die Retrotranslokation sowie den proteasomalen Abbau benötigt wird (KAMHI-NESHER *ET AL.*, 2001). Da die Sensitivität gegenüber K28 α in Abhängigkeit von Deletionen verschiedener Abschnitte des COPII-Transports verändert war, zeigte das Letalkonstrukt eher die Charakteristik eines löslichen ERAD-Substrates als die eines Membranproteins. Die Verbindung zwischen sekretorischer Kompetenz des ER und der Degradation von CPY* wurde anhand von Mutanten des ER-Golgi-„trafficking“ postuliert (TAXIS *ET AL.*, 2002), wobei Komponenten des sekretorischen Wegs wie Sec18p, Erv14p sowie Erv29p die Struktur des ER beeinflussen (PRINZ *ET AL.*, 2000).

Dadurch kann es aufgrund einer Fehllokalisierung von Kar2p, das für den Abbau von CPY* essentiell ist, zum verzögerten Abbau des ERAD-Substrates kommen (NISHIKAWA *ET AL.*, 1994; PLEMPER *ET AL.*, 1997).

In den beschriebenen Stämmen kam es nach Expression von K28 α zu einer Hypersensitivität, die vermutlich auf eine reduzierte Degradation zurückzuführen ist (ABBILDUNG 50). Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass K28 α vermutlich in Abhängigkeit von Kar2p seinen Zielort erreicht, ist ein sekundärer Effekt auf die Chaperonkonzentration der beschriebenen COPII-Mutanten eher auszuschließen, da in diesem Fall nach Expression des Letalkonstrukts analog zu den untersuchten Stämmen *kar2-1* sowie *kar2-133* eine Resistenz gegenüber K28 α zu erwarten wäre; dies wurde jedoch nicht beobachtet.

MODIFIKATION IM GOLGI

Ein Grund für den Transport fehlgefalteter Proteine über den Golgi ist neben einer Sequestrierung die Modifikation des Substrates zur besseren Interaktion mit der ERAD-Maschinerie. In diesem Zusammenhang wurde die O-Mannosylierung beschrieben, die verglichen mit der N-Glykosylierung, variabel in ihren Zuckerkomponenten sowie der Art der Verknüpfung ist. In Pilzen werden sekretorische Proteine vorwiegend durch O-Mannosyltransferasen (*PMT*) im ER mannosyliert und durch Glykosyltransferasen im Golgi weiter modifiziert. Diese Art der Reifung kann ein Protein in Funktion, Stabilität oder Löslichkeit verändern (GOTO, 2007) und besteht in *S. cerevisiae* aus bis zu fünf linearen Mannoseresten. Initiiert wird diese Modulation im ER durch den Transfer eines Mannoserestes vom Donor Dolicholphosphatmannose auf einen Serin- oder Threoninrest des sekretorischen Proteins (STRAHL-BOLSINGER *ET AL.*, 1999; TANNER UND LEHLE, 1987); auch für A/B-Toxine scheint diese Reaktion relevant zu sein. Der größte Teil der A-Kette des Shiga-like Toxins SLTxA1 liegt im ER O-mannosyliert vor, worauf vermutlich die lange Verweildauer im ER zurückzuführen ist. Im Vergleich zu RTA, das mit einer Halbwertszeit von 20 min das ER verlässt, benötigt SLTxA1 für diesen Schritt etwa 60 min (LI *ET AL.*, 2010). Pmt1p und Pmt2p können neben ihrer Funktion in der O-Mannosylierung auch einen Komplex mit ER-luminalen Chaperonen, der Ubiquitinligase Hrd1p, der Proteindisulfidisomerase Pdi1p sowie dem p24-Komplex bilden und sind somit direkt oder indirekt an der Proteinfaltung beteiligt. Eine Rolle von Pmt2p konnte in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden. Da eine Deletion von *PMT1* allerdings zu keiner veränderten Sensitivität gegenüber K28 bzw. K28 α führt, scheint eine Chaperon-ähnliche Funktion des Pmt1-Pmt2-Komplexes eher unwahrscheinlich.

Auch die Wirkung des Shiga Toxins konnte in $\Delta pmt1$ nicht gesteigert werden, obwohl die nicht-O-mannosylierte Form vermutlich für den toxischen Effekt verantwortlich ist. Diese Modifikation scheint die Löslichkeit von SLTxA1 im ER aufrecht zu erhalten, wie es auch für das ERAD-Substrat ppa-Faktor beschrieben wurde (LI *ET AL.*, 2012; NAKATSUKASA *ET AL.*, 2004). Die Pmt2p-abhängige O-Mannosylierung steht ebenfalls in Zusammenhang mit ERAD, wobei die mutierte Form des α -Faktors in Folge dieser Modifikation leicht stabilisiert und somit vor der ER-assoziierten Degradation geschützt wird (HARTY *ET AL.*, 2001). Ein Verlust dieser Modifikation könnte somit wie bei SLTxA1 oder α -Faktor zu einer höheren Stabilität beitragen, die sich in einer gesteigerten Sensitivität der Deletionsmutante äußert. Im Falle des ERAD-Substrates Gas1*p bildet die O-Mannosylierung allerdings die Voraussetzung für einen effizienten proteasomalen Abbau, was dazu führt, dass das Substrat ohne diese Modifikation vorwiegend in der Vakuole abgebaut wird (HIRAYAMA *ET AL.*, 2008). Einen größeren Einfluss hatte hingegen die Deletion von *PMT5*, die sich in einer starken Hypersensitivität gegenüber K28 α äußerte. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass K28 α mit Hilfe von Pmt5p mannosyliert wird, um später effektiver von ERAD-Komponenten erkannt zu werden (ABBILDUNG 50). Eine Bedeutung für das K28-Dimer müsste an Sphäroplasten untersucht werden, da durch einen Eingriff in die O-Mannosylierung auch die Struktur der Hefezellwand verändert wird. Dadurch kommt es vermutlich auf Ebene der Zelloberfläche zu einem Verlust der Interaktion mit dem Primärrezeptor des Toxins, was die Resistenz der $\Delta pmt5$ Mutante nach Applikation des Heterodimers erklärt.

COPI-VESIKELTRANSPORT

Das kontinuierliche Rückführen von Proteinen aus post-ER Kompartimenten zum ER wird unter anderem über den COPI-Vesikeltransport (TOWNSLEY UND PELHAM, 1994) sowie ein Di-Lysin (KKXX)- bzw. HDEL-Signal des Substrates sichergestellt (COSSON *ET AL.*, 1996; LETOURNEUR *ET AL.*, 1994). Diese Signale interagieren mit dem „coatomer“, das sich aus den sieben Untereinheiten Cop1p, Sec26p, Sec27p, Sec21p, Ret2p sowie Sec28p zusammensetzt und eine Hülle um Vesikel bildet, die vom Golgi knospen.

Um ausgehend vom Golgi wieder zurück zum ER transportiert zu werden, benötigt K28 α daher entweder ein solches Di-Lysinsignal oder ein Retentions-Signal (HDEL) bzw. ein Adapterprotein mit einem entsprechenden Motiv. Gleiches gilt auch für das K28-Heterodimer, das nach Endozytose retrograd über den Golgi zum ER transportiert wird und ebenfalls auf einen Transportmechanismus zum ER angewiesen ist. Das Cholera Toxin trägt beispielsweise ein KDEL-Motiv und wird daher über COPI-Vesikel retrograd transportiert (LENCER *ET AL.*, 1995). Da K28 ebenfalls ein HDEL-Signal an seiner β -Untereinheit trägt, könnte auch hier der ER-Transport durch COPI-beschichtete Vesikel erfolgen. K28 α trägt weder ein Di-Lysin- noch ein HDEL-Motiv und besitzt somit keine der benötigten Eigenschaften, um mit dem „coatomer“, den Komponenten der COPI-Hülle, zu interagieren.

Im MBA-Test zeichnete sich allerdings keine verminderte Sensitivität in Deletions- bzw. „knock-down“ Mutanten ab, die auf eine Beteiligung von COPI-Komponenten am retrograden Transport von K28 schließen ließen. In einer *sec21* DAMP-Mutante konnte sogar eine Hypersensitivität gegenüber dem K28-Dimer nachgewiesen werden. Dieser Effekt ist vermutlich auf einen indirekten Einfluss auf den anterograden Sekretionsweg zurückzuführen. Auch Komponenten, die für die Assemblierung des „coats“ verantwortlich sind, lieferten keine Hinweise auf eine Unterstützung des COPI-Vesikel-Transports von K28. Dagegen wurde auch hier nach Deletion der GTPase *ARF2* sowie deren Aktivator *GCS1*, das möglicherweise auch an der „cargo“-Selektion beteiligt ist, eine Hypersensitivität nach Expression des Letalkonstrukts beobachtet (ABBILDUNG 50).

COPI spielt aufgrund seiner Funktion im Rücktransport von Proteinen mit Di-Lysin- bzw. HDEL-Motiv, zu denen auch Komponenten des anterograden Transports zählen, eine wichtige Rolle in der Erhaltung des ER in Funktion und Struktur. Daher üben COPI-Mutanten oft einen indirekten Effekt auf den frühen sekretorischen Weg aus und haben somit Auswirkungen auf die Vitalität und Toleranz der Zelle gegenüber Toxinen (COSSON *ET AL.*, 1996). Dieser Zusammenhang muss auch in Bezug auf das Letalkonstrukt K28 α berücksichtigt werden, da sich hier in den DAMP-Stämmen *sec27*, *sec21* und *ret2* jeweils eine Hypersensitivität zeigte (ABBILDUNG 50). Neben Sec22p benötigt der HDEL-Rezeptor Erd2p, das Golgi-Syntaxin-Homolog Sed5p sowie luminaire Chaperone für diesen Transport (LEWIS UND PELHAM, 1996). Daher wäre die Hypersensitivität nach Expression des Letalkonstrukts aufgrund der Bedeutung ER-residenter Proteine für Degradation bzw. Retrotranslokation, eventuell indirekt auf einen reduzierten Abbau des Letalkonstrukts zurückzuführen. Während manche Substrate in *sec21* Mutanten normal sezernieren, werden andere wie CPY* oder die mutierte Form des α -Faktors im ER zurückgehalten.

Diese benötigen vermutlich Rezeptoren, die abhängig vom COPI-Transport im ER lokalisieren. Nach Expression des Letalkonstrukts K28 α stellte sich auch in der *sec21* DAmP-Mutante eine Hypersensitivität ein. Da gezeigt wurde, dass K28 α Rezeptoren wie Erp1p, Erv26p sowie Erv14p für einen effizienten COPII-Transport benötigt, hat eine *sec21* Mutation vermutlich einen sekundären Effekt auf den ER-Golgi-Transport. Möglich ist auch hier eine allgemein reduzierte Widerstandsfähigkeit der Zelle in Folge eines veränderten Sekretionsweges. Die übrigen Komponenten der COPI-Hülle zeigten nach Deletion bzw. nach „knock-down“ eine moderat erhöhte Sensitivität nach Expression von K28 α . Da der Hemmhof in diesen Stämmen nach Applikation des Dimers nicht verändert war, kann ein sekundärer Effekt auf den anterograden Sekretionsweg vernachlässigt werden, der zu einer unspezifischen Hypersensitivität gegenüber dem Killertoxin führen würde.

Die Fusion von COPI- oder COPII-Vesikeln ist abhängig von spezifischen Anlagerungsreaktionen, die sicherstellen, dass ausschließlich passende Membranen verschmelzen. Die Anlagerung selbst besteht aus zwei Schritten, dem Anbinden („tethering“) und Andocken („docking“), wobei spezifische Proteine den jeweiligen Vorgang unterstützen (GUO *ET AL.*, 2000). Andock-Faktoren sind periphere membranassoziierte Proteinkomplexe aus bis zu zehn unterschiedlichen Untereinheiten mit geringer Sequenzähnlichkeit. Beim „docking“ sind spezifische Membranproteine beteiligt, sogenannte SNARE's („soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor“). Um die Membranfusion zu induzieren, müssen die SNARE-Proteine der entsprechenden Membranen miteinander interagieren. Die Bildung eines Bündels aus vier Helices stellt ausreichend Energie für die Verschmelzung des Lipid-Bilayers zur Verfügung (WEBER *ET AL.*, 1998). Dsl1p interagiert mit dem „coatomer“ und ist an einem Schritt zwischen „uncoating“ und „docking“ beteiligt (ANDAG *ET AL.*, 2001). Allerdings kam es auch hier nach einem „knock-down“ der Schlüsselkomponenten zu Sekundäreffekten des beeinträchtigten Sekretionsweges, da in einer *ds1-22* Mutante beispielsweise die COPII-SNAREs Sec22p und Bos1p fehllokalisieren. Auch das „Recycling“ der ER-luminalen Chaperone Kar2p und Pdi1p, deren Transport vom HDEL-Rezeptor Erd2p abhängt, war betroffen (ANDAG *ET AL.*, 2001; SEMENZA *ET AL.*, 1990), wodurch in einer *ds1-22* Mutante, genau wie nach *SEC22*-Deletion, Kar2p sezerniert wird (SEMENZA *ET AL.*, 1990). Ein unzureichender Kar2p- bzw. Pdi1p-Gehalt kann den ER-Export bzw. den Abbau von „cargo“-Molekülen beeinträchtigen (HOLST *ET AL.*, 1997; SIMONS *ET AL.*, 1995).

Eine *ds1* DAmP Mutante war nach Applikation des K28-Dimers leicht hypersensitiv verglichen mit dem WT, zeigte aber erst nach Expression von K28 α eine enorme Steigerung der Sensitivität, was den bisherigen Ergebnissen entgegensteht, in denen keine Veränderung nach Mutation dieser Komponente beobachtet wurde (KELKEL, 2009). Gleiches zeigte sich nach dem „knock-down“ von Use1p, nach dem die Sensitivität gegenüber K28 α auf das Doppelte anstieg (ABBILDUNG 50). Der indirekte Einfluss einer potentiell verringerten Chaperonkonzentration im ER durch Veränderung des COPI-Transports hat somit eher Konsequenzen für die Proteolyse des Toxins und minimiert nicht die Retrotranslokation in das Zytosol. Dementsprechend nehmen Komponenten des COPI-Transportes, im Gegensatz zu den bisher erhaltenen Daten, Einfluss auf die Wirkung von K28 α und tragen vermutlich zu dessen Degradation bei. Somit scheint der Transport von K28 α zum Golgi und wieder zurück zum ER Teil des Degradationsprozesses zu sein.

TRANSPORT ZUR VAKUOLE

Bisher wurde dokumentiert, dass zumindest einige der K28 α -Moleküle äquivalent zu zahlreichen ERAD-Substraten nach dem ER-Import in COPII-Vesikel verpackt und zum Golgi transportiert wird. Von dort gelangt ein Teil des Toxins wieder über COPI-Vesikel zurück zum ER, wird proteasomal abgebaut oder alternativ zu seinem Wirkungsort in den Zellkern transportiert. Eine Alternative zur Rückführung zum ER, ist das „targeting“ zur Vakuole. Neu synthetisierte Komponenten dieses Kompartiments werden meist über das ER zum Golgi transportiert und gelangen im Anschluss über den Clathrin-abhängigen Weg weiter über prä-vakuoläre Kompartimente zur Vakuole (ANAND *ET AL.*, 2009). Neben Komponenten der V-ATPase ist die Carboxypeptidase Y (CPY) eines der bekanntesten Substrate dieses Pathways. CPY wird als inaktiver Vorläufer synthetisiert und nach Abspaltung der Signalsequenz im ER N-glykosyliert (p1) und im Golgi weiter modifiziert (p2). In einem rezeptorvermittelten Schritt wird das Enzym schließlich vom sekretorischen Weg getrennt und zur Vakuole transportiert, wo es zu seiner aktiven Form reift (mCPY). Das Motiv, welches für diese Selektion verantwortlich ist, codiert die Aminosäuresequenz QRPL (STEVENS *ET AL.*, 1986). p2 CPY bindet im späten Golgi den Rezeptor Vps10p (Pep1p), wird über Vesikel zum Endosom oder dem prä-vakuolären Kompartiment (PVC) transportiert, dissoziiert von seinem Rezeptor und gelangt zur Vakuole, während Vps10p „recyclet“ wird.

Vps10p scheint auch für das „targeting“ fehlgefalteter Proteine zur Vakuole verantwortlich zu sein, da der Rezeptor vermutlich ein breites Spektrum an Signalpeptiden erkennt, deren Sequenz bisher unbekannt ist (HONG *ET AL.*, 1996; MARCUSSON *ET AL.*, 1994). K28 nutzt Vps10p vermutlich nicht zur Selektion, da die Sensitivität einer $\Delta vps10$ Mutante weder gegenüber K28 α noch gegenüber dem K28-Dimer verändert war. *S. cerevisiae* besitzt darüber hinaus Vps10-Homologe, die von anderen vakuolären Proteinen wie PrA aber auch CPY beansprucht werden, um ihr Zielkompartiment zu erreichen. Sie scheinen unterschiedliche Rollen bei der Sortierung zur Vakuole zu spielen und könnten auch am Transport von K28 beteiligt sein (WESTPHAL *ET AL.*, 1996). Demzufolge wurden entsprechende Mutanten untersucht, um eventuell einen Rezeptor für den Transport von K28 zur Vakuole zu identifizieren.

An der Vesikel-Knospung ist unter anderem Vps1p, das Homolog zu Dynamin in Säugerzellen, beteiligt, das normalerweise für die Endozytose und für das Abschnüren der Vesikel von der Plasmamembran benötigt wird. Zellen ohne Vps1p zeigen allerdings keinen Defekt in der Endozytose, sezernieren jedoch p2-CPY und vakuoläre Proteine zur Plasmamembran (NOTHWEHR *ET AL.*, 1995; WARNOCK UND SCHMID, 1996). Vps34p und Vps15p bilden dabei einen regulatorischen Komplex und beeinflussen vermutlich den Transfer des K28-Dimers zur Vakuole. Beschrieben wurde bisher lediglich ein Transport von K28 nach Endozytose über Endosomen zur Vakuole. Die vorliegenden Untersuchungen des VPS („vacuolar protein sorting“)-Weges legen jedoch nahe, dass ein Teil des Toxins, das bereits auf dem retrograden Sekretionsweg den Golgi erreicht hat, ebenfalls zur Vakuole gelangt. Deletionen entsprechender VPS Gene sowie Defekte in Komponenten des SNARE-Komplexes zur effizienten Fusion mit PVC, führten zu einem hypersensitiven Phänotyp. Die Komponenten Vps6p, Vps21p, Vps45p sowie Vps19p zeigten nach Deletion der betreffenden Gene einen vergrößerten Hemmhof im MBA-Test sowie eine gesteigerte Sensitivität nach intrazellulärer Expression von K28 α .

Neben dem beschriebenen VPS-Pathway existiert noch ein alternativer, selektiver Clathrin-unabhängiger Weg vom TGN zur Vakuole ohne Passage der Endosomen, der den AP-3-Adapterkomplex, bestehend aus den Untereinheiten Apl5p und Apl6p, nutzt (STEPP *ET AL.*, 1997). „Cargos“ dieses Pathways enthalten ein Di-Leucin-ähnliches- oder Tyrosinmotiv YXX ϕ , wobei ϕ einen großen hydrophoben Aminosäurerest repräsentiert (SUN *ET AL.*, 2004; VOWELS UND PAYNE, 1998). An dieser selektiven Vesikelbildung ist auch Vps41p beteiligt, eine Untereinheit von HOPS („homotypic vacuole fusion and vacuole protein sorting“-Komplex) (NAKAMURA *ET AL.*, 1997).

Diese Einheit verbindet Vesikel mit der Vakuole und ist somit auch für den Clathrin-abhängigen Weg notwendig, erfüllt allerdings im phosphorylierten Zustand aufgrund einer Interaktion mit AP-3 eine selektive Rolle beim AP-3-abhängigen Weg (DARSOW *ET AL.*, 2001; OSTROWICZ *ET AL.*, 2008). Der AP-3-Weg wird nur von wenigen spezifischen Faktoren gesteuert, die gemeinsam mit allgemeinen Komponenten vieler Transportwege zusammenarbeiten. Manche, wie Vps41p und Vps35p, sind multifunktional und besitzen eine spezifische Aktivität bezüglich AP-3 (ANAND *ET AL.*, 2009; BONANGELINO *ET AL.*, 2002). Außer für Vps35p war nach Deletion der übrigen Komponenten eine Hypersensitivität gegenüber K28 und im Fall von $\Delta ap15$ und $\Delta ap16$ ebenfalls gegenüber K28 α ein gesteigerter Effekt zu beobachten. Somit scheint auch der alternative Weg zur Vakuole eine Bedeutung für die Degradation beider Toxinformen zu haben. Das t-SNARE Vam3p spielt sowohl für den Clathrin-abhängigen als auch unabhängigen Weg eine wichtige Rolle. Eine Deletionsmutante zeigte nach Applikation des Dimers einen vergrößerten Hemmhof und nach Expression von K28 α eine um fast 100 % gesteigerte Sensitivität. Im Rahmen dieser Arbeit konnte daher nachvollzogen werden, dass K28 α nach post-translacionalem ER-Import nicht nur den Golgi-Apparat erreicht und anschließend wieder zurück zum ER zurückgeführt wird, sondern dass einige Toxin-Moleküle sowohl über den VPS- als auch den AP-3-abhängigen Weg zur Vakuole gelangen und abgebaut werden. Darüber hinaus konnten die Erkenntnisse über den Transport des Dimers dahingehend erweitert werden, als dass ein Teil der K28-Moleküle, der nach endozytotischer Aufnahme bereits den Golgi erreicht hat, vermutlich ebenfalls über beide Wege dem vakuolären Abbau zugeführt wird.

Autophagozytose und K28-Retrotranslokation

ERKENNUNG UND EXTRAKTION

Hefen besitzen neben dem 26S Proteasom eine weitere Möglichkeit zur Protein-Degradation. Die Vakuole stellt hierbei ein spezialisiertes proteolytisches Kompartiment dar, das mit Hilfe seiner hydrolysierenden Enzyme Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und Nukleinsäuren umsetzt, um der Zelle Aminosäuren, Fettsäuren, Zucker und Nukleoside bereitzustellen (BOCHTLER *ET AL.*, 1999; SCHREIBER UND PETER, 2013). Die Autophagozytose repräsentiert einen Mechanismus, der sein „cargo“ bestehend aus zytoplasmatischen Komponenten und Organellen dem beschriebenen vakuolären Abbau zuführt. Das zu degradierende Material wird dabei zunächst in einem neugebildeten Kompartiment, den Autophagosomen, vom Rest der Zelle abgegrenzt. Diese bilden sich vermutlich durch die Expansion isolierter Membranen, die auch als **prä-autophagosomale Struktur** (PAS) bezeichnet werden und einen Teil des Zytoplasmas in der wachsenden Doppelmembran-Struktur einschließen. Die äußere Membran fusioniert schließlich mit der lysosomalen bzw. vakuolären Membran, so dass der Inhalt gemeinsam mit der inneren Membran der Autophagosomen degradiert wird. Im Gegensatz zum proteasomalen Abbau ist diese Art der Autophagozytose ein eher nicht-selektiver Prozess, in dem eine große Menge intrazellulärer Proteine umgesetzt wird (Makrophagozytose). Die Autophagie wird als Antwort auf oxidativen, osmotischen und ER-Stress sowie auf Nährstoffknappheit induziert und somit durch physiologische Signale reguliert, um durch den Abbau zelleigener Komponenten neue Metabolite für die Zelle zu generieren. Darüber hinaus existiert auch eine selektivere Form der Autophagozytose, deren Autophagosomen beispielsweise beschädigte Organellen, akkumulierte Proteine oder Bakterien umhüllen. In Hefe wurden 31 „autophagy related genes“ (ATG) identifiziert von denen 15 ATG Gene die Kernmaschinerie sowohl für die Makroautophagie als auch für das selektive „**cytoplasm-to-vacuole-targeting**“ (Cvt), den Syntheseweg vakuolärer Proteine, repräsentieren (KIM *ET AL.*, 1997). Diese werden wiederum in den regulatorischen (PtdIns) 3-Kinase-Komplex, das Atg12- und Atg8-Konjugationssystem sowie in eine Kategorie mit Proteinen unbekannter Funktion unterteilt. Cvt-Vesikel sind den Autophagosomen morphologisch sehr ähnlich, erscheinen mit 150 nm allerdings erheblich kleiner als Autophagosomen mit einer Größe von 500 nm (BABA *ET AL.*, 1997). Die Biogenese beider Vesikelformen geht von einer prä-autophagosomalen Struktur aus, deren Bildung einer spezifischen Hierarchie folgt (SUZUKI UND OHSUMI, 2010).

Zunächst kann Atg13p bei Nährstoffmangel nicht mehr von TORC1 (target of rapamycin) phosphoryliert werden, bindet daher an Atg1p und steigert somit dessen Kinaseaktivität, wodurch weitere ATGs rekrutiert werden. Im Rahmen der PAS-Bildung existieren zwei Konjugationssysteme, in denen unter anderem Atg8p mit Phosphatidylethanolamin (PE) verknüpft wird. Die Autophagozytose dient darüber hinaus der Kompensation eines gesättigten bzw. überanspruchten ERAD-Pathways sowie der darauf einsetzenden „unfolded protein response“, da die Akkumulation fehlgefalteter Proteine zur Expansion des ER führt, um die Konzentration defekter Polypeptide zu reduzieren und mehr Raum für den Faltungsprozess zu schaffen. Durch die Abgrenzung eines ER-Segments in ein Autophagosom, wird Zeit geschaffen, um dem Zellstress entgegenzuwirken (JIN *ET AL.*, 2013). In diesem Prozess der Retikulophagie kann die ATG-Maschinerie die Erweiterung neuer Membranen katalysieren, die für die Abgrenzung von ER-Fragmenten oder dem Rearrangement von ER-Bereichen benötigt werden, um die limitierenden Membranen zur Bildung der Autophagosomen zu erzeugen (BERNALES *ET AL.*, 2006; HAYASHI-NISHINO *ET AL.*, 2009). Die angereicherten Substrate und Aggregate können so positioniert werden, dass sie sich in räumlicher Nähe zum Syntheseort der Autophagosomen befinden. Andererseits kann die Substratselektion auch von Atg-Proteinen unterstützt werden, die die PAS zum „cargo“ dirigieren. Diese Art der Autophagie wäre parallel zu ERAD in der Lage, die ER-Homöostase während der UPR zu erhalten, indem Segmente abgegrenzt bzw. abgebaut werden (KRUSE *ET AL.*, 2006). Regulation und Mechanismus der Retikulophagie sind weitgehend unbekannt, sodass diesem Prozess noch keine spezifischen Atg-Proteine zugeordnet werden konnten, die die Erkennung und Abgrenzung katalysieren (CEBOLLERO *ET AL.*, 2012). Dies kann auch auf weitere Formen der selektiven Autophagie übertragen werden, die jedoch einigen generellen Prinzipien folgen. Die Erkennung des „cargos“ findet über den Rezeptor Atg19p statt, der neben Atg8p sowie dem Gerüstprotein Atg11p die restliche ATG-Maschinerie rekrutiert und das „cargo“ zum Autophagosom dirigiert (CEBOLLERO *ET AL.*, 2012). Somit fungiert Atg11p als zentraler PAS-Organisator, indem es „cargo“-Adaptoren und Zielproteine zur Bildung der autophagosomalen Membran bindet (SCHREIBER UND PETER, 2013). Während der Induktion der Autophagie wird Atg8p mit der PAS assoziiert und verbindet aufgrund seiner Wechselwirkung das „cargo“ mit der „prä-autophagosomalen Struktur“ (ICHIMURA *ET AL.*, 2000; JIN *ET AL.*, 2013). Die physiologische Rolle der selektiven Autophagie ist noch nicht gänzlich verstanden und der Mechanismus verschiedener Zweige ist größtenteils unbekannt (SUZUKI, 2013).

Eine wesentliche Erkenntnis wurde jedoch durch die Möglichkeit der Inklusion des Cvt-Pathways in den Prozess der ER-assoziierten Degradation erbracht (MAZON *ET AL.*, 2007), wobei die Erkennung und Retrotranslokation eines ERAD-M-Substrates dokumentiert werden konnte. In Deletionsmutanten von Schlüsselkomponenten war die Degradation von Myc-Hmg2 verzögert, wobei die Obstruktion auf der Bildung eines stabilen Komplexes zwischen ERAD-Substrat und Komponenten der Autophagie-Maschinerie beruht (KARIO *ET AL.*, 2011). Dieses Verständnis eröffnet die Möglichkeit, dass auch A/B-Toxine wie K28 bzw. K28 α in einem assoziierten Prozess aus dem ER translozieren und in das Zytosol entlassen werden.

Nachdem die Deletionsmutanten $\Delta atg19$ sowie $\Delta atg8$ eine Hypersensitivität nach Expression des Letalkonstrukts K28 α zeigten, wäre es möglich, dass K28 α im Zuge einer selektiven Form der Autophagie degradiert wird. Ob es dabei bereits auf Ebene der ER-Membran erkannt und mit Hilfe der ATG-Maschinerie extrahiert wird, kann an dieser Stelle weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Das K28-Dimer scheint im Gegensatz dazu diesem Degradationsweg nicht zu folgen, da es weder in einer $\Delta atg8$ noch in einer $\Delta atg19$ oder $\Delta atg11$ Mutante zu einer veränderten Sensitivität kam.

VAKUOLÄRER ABBAU

Um den Inhalt des Autophagosoms degradieren zu können, benötigen proteolytische Enzyme der Vakuole einen sauren pH-Wert, der durch die Aktivität der V-ATPase gewährleistet wird. Darüber hinaus ist bei pH-Fehlregulation nicht nur die vakuoläre Degradation durch ein Defizit entsprechender Enzyme sowie die Vesikelfusion mit der Vakuole betroffen, sondern bereits der Transport des „cargos“ zum Zielkompartiment. Die V-ATPase lässt sich in zwei Domänen unterteilen. Die V1-Domäne liegt der Membran auf und vermittelt die ATP-Hydrolyse, während die V0-Domäne die Membran der Vakuole durchspannt und am Protonentransport beteiligt ist. Der Verlust einer Untereinheit führt entweder zu einer fehlerhaften Assemblierung des V-ATPase-Komplexes oder zum Transport eines inaktiven Komplexes zur Vakuole.

Zwei der sechs V1-Untereinheiten (Vma5p und Vma10p) sowie die jeweilige Deletion der vier V0-Komponentengene *VOA1*, *VPH1*, *STV1* und *PKR1* zeigten nach Expression des Letalkonstrukts eine Hypersensitivität. Auch assoziierte Proteine wie Vph2p, Vma8p, Vma21p, Vma22p und Rav1p führten nach Deletion zu einer gesteigerten Sensitivität.

Bezüglich des K28-Dimers konnte zwar auch für vier Untereinheiten der V1-Domäne (Vma4p, Vma5p, Vma10p, Vma13p), für drei der vier Untereinheiten der V0-Domäne (Voa1p, Vph1p, Pkr1p) sowie für die assoziierten Proteine Vph2p, Vma8p und Vma21p nach Deletion eine moderate bis starke Zunahme des Hemmhofdurchmessers beobachtet werden. Allerdings kann an dieser Stelle nicht differenziert werden, ob die vakuoläre Degradation eine Bedeutung im Rahmen der Autophagozytose besitzt oder ob es sich um den bereits postulierten Transport des Dimers zur Vakuole im Anschluss an die Endozytose bzw. im Verlauf des retrograden Transports handelt.

„Lipid droplets“ und Toxin-Retrotranslokation

Sec61p, Der1p und Hrd1p werden jeweils als potentieller Exportkanal beschrieben, da sie sich aus zahlreichen Transmembrandomänen zusammensetzen, die sich in räumlicher Nähe zu anderen Membrankomponenten des ERAD-Pathways befinden und mit Dislokationsintermediaten interagieren (OLZMANN UND KOPITO, 2011). Die Struktur und Existenz einer solchen Pore wird jedoch weiterhin kontrovers diskutiert (BAGOLA *ET AL.*, 2011; PLOEGH, 2007), da die Fähigkeit des Retrotranslokationsapparates, auch gefaltete Substrate, Glykoproteine und sogar intakte Viren zu transportieren, dieser Theorie widerspricht (LI *ET AL.*, 2010; LILLEY *ET AL.*, 2006; TIROSH *ET AL.*, 2003). Beispielsweise zeigten Untersuchungen mit Magnet-Resonanz, dass durch Verknüpfung von MHCI mit einem high-Mannose-Glykan ein Protein entsteht, welches aufgrund seiner Größe und des dadurch hervorgerufenen Rotationsradius stark an der Dislokation in das Zytosol gehindert sein müsste (RUDD *ET AL.*, 1995). Auch Fusionen mit GFP oder Dihydrofolat-Reduktase beeinflussten den ER-Export von MHCI nicht (TIROSH *ET AL.*, 2003).

PLOEGH schlug daher eine Alternative vor, in der die Retrotranslokation mit der Bildung von „lipid droplets“ (LDs) am ER gekoppelt ist. Hiernach käme es während der LD-Synthese entweder zur Bildung einer transienten Pore, durch die luminale ERAD-Substrate entkommen oder Polypeptide werden direkt durch Assoziation mit der LD-Membran extrahiert (PLOEGH, 2007). Die Passage von Virionen oder fehlgefalteten Proteinen würde einen „gating“-Mechanismus erfordern, um die Aufrechterhaltung eines Ionengradienten im ER zu gewährleisten, welcher für die Funktion des ER von essentieller Bedeutung ist (LIAO *ET AL.*, 1997).

Die Zelle könnte auf eine vorübergehende Bruchstelle der ER-Membran leichter durch Modifikation des Lipidpathways reagieren, um die entstandene Öffnung zu verschließen, als durch die Kontrolle eines porenformenden Proteinkomplexes. Darüber hinaus scheint das ER durch sein Oberflächen-Volumen-Verhältnis eine kurze lokale Disruption der ER-Membran zu tolerieren. Zuvor galten LDs ausschließlich als Speicherdepots für Zellbausteine, bevor das Verständnis bezüglich regulatorischer Funktionen dieser Organellen erweitert werden konnte. Sie halten beispielsweise überschüssiges Erg1p, das die Sterol-Biosynthese kontrolliert, zurück und sind aufgrund ihrer Interaktion mit dem ER, den Mitochondrien und Peroxisomen in der Lage, die kumulierten Polypeptide bei Bedarf wieder an ihrem Wirkungsort zu entlassen (BINNS *ET AL.*, 2006; PU *ET AL.*, 2011; SORGER *ET AL.*, 2004). Bisher sind jedoch keine Faktoren bekannt, die für die relative Verteilung zwischen LDs und ER verantwortlich sind. Für Proteine der „lipid droplets“ existiert kein klassisches „targeting“-Signal, weshalb die Exposition einer hydrophoben Domäne vermutlich genügt, um eine Wechselwirkung sicherzustellen (MULLNER *ET AL.*, 2004). Die Interaktion kann jedoch auch indirekt über LD-verankerte Proteine vermittelt werden. LDs kommen in allen eukaryontischen Organismen vor und beinhalten während ihrer Biogenese die lokale Delamination der ER-Membran durch die Ansammlung neutraler Lipide wie Triacylglycerol (TAG) oder Steryl-Ester (SE). Der naszierende Lipidtropfen knospt schließlich vom ER und wird von einem Phospholipid-Monolayer umgeben, mit dem auch einige ER-luminale Proteine wie BiP assoziiert sind. Lokale „bilayer“-Strukturen des „droplets“ ermöglichen es vermutlich auch Membranproteinen, mit diesen Organellen zu interagieren. Fehlgefaltete Proteine, die für den Abbau bestimmt sind, könnten „huckepack“ mit Chaperonen wie Calnexin bzw. BiP das ER verlassen. Das Apolipoprotein B (ApoB) wird beispielsweise über das Ubiquitin-Proteasom-System degradiert, ist während dieses Prozesses mit LDs assoziiert und rekrutiert das Proteasom zu diesen Organellen. Über die präzise Synthese von „lipid droplets“ existieren bisher lediglich erste Modelle, die in ABBILDUNG 51A zusammengefasst sind. In Modell 1 wird ein Teil der zytoplasmatischen Oberfläche des ER abgespalten, um den neutralen Lipidkern zu umschließen. Bei der „bicell“-Formation wird vorgeschlagen, dass beide Membranoberflächen des ER den Monolayer der LDs bilden und lokal ein „bilayer“ generiert wird, der die Insertion von Membranproteinen während des Exports erlaubt. Im Knospungsmodell verlässt das Zielprotein das ER im Nachstrom eines knospenden Lipidtropfens, wobei die entstandene Lücke durch das Verschmelzen der ER-Membran verschlossen werden kann. Eine solche transiente Ruption scheint effektiver kontrollierbar als ein Exportkanal, dessen Regulation von „gating“-Mechanismen abhängt.

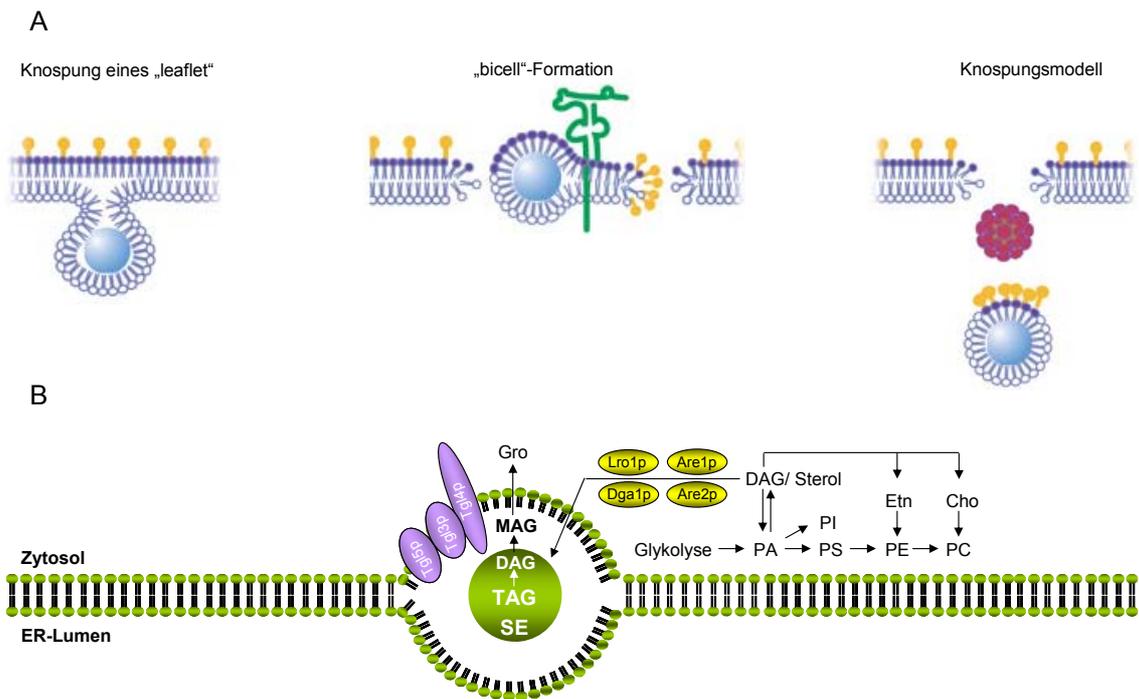


Abbildung 51: A: Modelle zur „lipid droplet“ (LD) Formation, die mit der Akkumulation neutraler Lipide im ER-„bilayer“ beginnt. Bei der Knospung eines „leaflet“ werden die neutralen Lipide von einem Phospholipid-Monolayer umschlossen, der durch Knospung der zytoplasmatischen Seite des ER entsteht. Das Modell der „bicell“-Formation wird für den Export des MHC1-Moleküls vorgeschlagen und ist repräsentativ für ein Klasse 1 Membranprotein. Das Polyomavirus könnte das ER im Nachstrom eines knospenden Tropfens verlassen, indem eine „bicell“-stabilisierte Ruption der Membran entsteht (PLOEGH, 2007). **B:** Übersicht des Zusammenspiels der Glycerolipid- und LD-Synthese. Phospholipide und Triacylglycerol (TAG) werden aus den Vorläufern Diacylglycerol (DAG) sowie Phosphatidsäure (PA) gebildet. PA stellt darüber hinaus ein Intermediat von Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylserin (PS) dar. PS wird zu Phosphatidylethanolamin (PE) decarboxyliert, aus dem nach Methylierung Phosphatidylcholin (PC) entsteht. PA kann zu DAG dephosphoryliert werden, das im Kennedy-Pathway als Vorläufer für PE und PC dient. Ausgehend von DAG wird entweder TAG oder durch Phosphorylierung PA gebildet. Cho: Cholin; Etn: Ethanolamin; MAG: Monoacylglycerol; Gro: Glycerol (VERÄNDERT NACH HENRY *ET AL.*, 2012).

Triacylglycerole (TAG) dienen unter anderem der Speicherung von Energie und Fettsäuren und werden für die Synthese von Membranlipiden benötigt. Ihre Produktion wird von Dga1 und Lro1p katalysiert, wobei Lro1p hauptsächlich Phosphatidylcholin (PC) und Phosphatidylethanolamin (PE) als Acyl-Quelle verwendet (OELKERS *ET AL.*, 2000). Dga1p ist sowohl im ER als auch auf „lipid droplets“ lokalisiert, während sich Lro1p nur im ER befindet (SORGER UND DAUM, 2003). Fehlen beide Enzyme, verbleiben noch 5 % der Aktivität, um Diacylglycerol (DAG) zu Triacylglycerol (TAG) zu verestern. Die beiden Acyltransferasen Are1p und Are2p sind für die Synthese von Sterylestern (SE) verantwortlich, die eine weitere Form neutraler Lipide repräsentieren, welche als LDs gespeichert werden (OELKERS *ET AL.*, 2002; SORGER *ET AL.*, 2004) (ABBILDUNG 51B). SE werden aus Produkten des Mevalonat-Weges gebildet, der die Zelle mit Sterol und Isoprenoid-Vorläufern versorgt, wobei über dessen Regulation nur wenig bekannt ist.

Das Hauptprodukt in Hefe ist Ergosterol, eine wichtige Komponente aller zellulären Membranen, die ihre Fluidität sowie Permeabilität beeinträchtigt (KALISZEWSKI UND ZOLADEK, 2008). Sterole sind darüber hinaus essentiell für den Ablauf der Endozytose, die Regulation des Zellzyklus sowie die Fusion mit der Vakuole (HEESE-PECK *ET AL.*, 2002; KATO UND WICKNER, 2001; RODRIGUEZ UND PARKS, 1983).

Fehlen der Zelle *LRO1* und *DGA1*, werden weniger Triacylglyceride und somit fast keine LDs mehr gebildet. Die Sensitivität entsprechender Mutanten war nach Applikation des K28-Dimers nicht verändert, zeigte jedoch nach Expression des Letalkonstrukts nur noch eine Sensitivität von 32 %. Nach zusätzlicher Deletion von *ARE2* sank die Sensitivität um weitere 27 %. Darauf aufbauend wurde untersucht, ob auch die Lipolyse der LDs in einem Zusammenhang mit der Toxinwirkung steht. Diese Reaktion wird unter anderem von Tgl4p vermittelt, dessen Verlust zur verstärkten Bildung vergrößerter LDs führt. Im Hinblick darauf, dass eine reduzierte LD-Synthese zu einer Resistenz nach Expression von K28 α führte, wurde bei einem erhöhten LD-Gehalt eine Hypersensitivität gegenüber dem Toxin erwartet. Da es dementsprechend in einer *tgl4* Mutante ebenfalls zu einer reduzierten Sensitivität kam, konnte die Theorie eines Export-Mechanismus von K28 α über LDs weder bestätigt noch gänzlich ausgeschlossen werden. Eventuell trägt die LD-Bildung nur bei bestimmten ERAD-Substraten zum ER-Export bei, da die Degradation von CPY* in einer $\Delta hrd1$ Deletionsmutante, nicht jedoch in LD-Mutanten beeinträchtigt war (BAGOLA *ET AL.*, 2011). Ein Grund, weshalb es dennoch zu einer Toxin-Resistenz der Stämme mit Defekten in der LD-Synthese kam, könnte alternativ auf einen sekundären Effekt zurückzuführen sein, der durch Verknüpfung der LD-Bildung mit der Phospholipidsynthese beruht.

Phospholipid- und TAG-Metabolismus sind eng miteinander verknüpft, sodass die Inaktivierung eines Zweiges zur Kompensation durch den jeweils anderen führt. Die Biosynthese von Phospholipiden und Sterolen findet hauptsächlich am ER statt und ihre Homöostase wird von Sensoren am ER über Transkription bzw. posttranslationale Mechanismen abgestimmt (CARMAN UND HENRY, 1999). Den wesentlichen Gehalt der Phospholipide in *S. cerevisiae* repräsentieren Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylserin (PS) (CARMAN UND HENRY, 1989). PS, PE und PC werden ausgehend von Phosphatidsäure (PA) über den CDP-DAG-Pathway synthetisiert, wobei PE und PC ebenfalls von Ethanolamin und Cholin über den Kennedy-Pathway abgeleitet werden können (ABBILDUNG 51B).

Die Regulation von Enzymen des Lipidmetabolismus ist ein essentieller und sehr komplexer Mechanismus, der die Lipidzusammensetzung von Membranen beeinflusst und sich somit auf Zellwachstum, Funktion von Organellen und Stressantwort auswirkt (CARMAN UND HENRY, 1999). Der Umstand, dass es in den beschriebenen Mutanten neben einer Akkumulation von TAG auch zu einem erhöhten Gehalt an freien Sterolen sowie zu Defekten im COPII-Vesikel-„trafficking“ kommt, weist darauf hin, dass durch den Eingriff in die LD-Bildung zusätzlich der Lipidmetabolismus betroffen ist (CHANG *ET AL.*, 2004; LEBER *ET AL.*, 2004). Durch veränderte Membraneigenschaften könnten somit nach Deletion von *LRO1*, *DGA1* oder *ARE2* Import-Defekte entstehen, die infolgedessen zur Resistenz gegenüber K28 α führen. Fehler in der Translokation würden demnach gleichermaßen weitere luminal Proteine wie z.B. Chaperone betreffen, so dass die Reorganisation ebenfalls einen indirekten Einfluss auf die Sensitivität gegenüber dem reifen Toxin haben müsste.

Somit repräsentiert K28 α das bisher einzige A/B-Toxin, dessen Aktivität mit der Bildung von LDs assoziiert zu sein scheint; entsprechende LD-Mutanten zeigten keinen Einfluss auf die Toxizität von RTAE177A (OLZMANN UND KOPITO, 2011). Dies schließt jedoch eine Rolle dieser Partikel am Export anderer Polypeptide nicht aus. Da auf der Oberfläche von LDs unter anderem ERAD-Komponenten lokalisiert sind, die für die Proteolyse des LD-Proteoms verantwortlich sind, besteht die Möglichkeit, dass die Beobachtung der Hypersensitivität vieler ERAD-Mutanten gegenüber K28 α darauf zurückzuführen ist, dass der Abbau von LD-assoziiertem Toxin in ERAD-Deletionsmutanten erliegt und sich das Toxin stattdessen vom Partikel lösen kann bzw. „huckepack“ mit diesen Komponenten über LDs aus dem ER entkommen könnte. Unterschiede in der Bedeutung von LDs für K28 α und das Heterodimer könnten auf die Hydrophobizität der α -Untereinheit zurückzuführen sein. Die A-Kette vergleichbarer A/B-Toxine exponiert nach Entlassen des jeweiligen Holo-Toxins eine hydrophobe Domäne mit starker Assoziation zur ER-Membran (HAUSMAN UND BURNS, 1992; ISHIDA *ET AL.*, 1983; TOMASI UND MONTECUCCO, 1981). In der vorliegenden Arbeit wurden erste Hinweise dafür erbracht, dass das K28-Holotoxin vor seiner Retrotranslokation mit Hilfe der PDI1 teilweise entfaltet bzw. isomerisiert wird, wobei der hydrophobe Bereich der α -Untereinheit jedoch im Verbund mit der B-Kette weiterhin verdeckt bleiben könnte und eine effiziente Interaktion mit Lipiden somit verhindert wird.

Alternative Mechanismen der Retrotranslokation

KOPPLUNG VON IMPORT UND EXPORT

Aufgrund der Kontroverse über die Existenz eines stetig existierenden Exportkanals ist vorstellbar, dass die Retrotranslokation aus dem ER dem Proteinimport in Peroxisomen ähnelt, bei dem ein „cargo“-aktivierter Kanal gebildet wird. Dieser ist in Peroxisomen in seiner Größe sehr flexibel, um die Translokation vollständig gefalteter Proteine zu gewährleisten (MEINECKE *ET AL.*, 2010). Der Import in dieses Organell unterscheidet sich insbesondere dadurch, dass auch gefaltete, oligomere Proteine transloziert werden können; dies ähnelt somit der ERAD-Maschinerie (MCNEW UND GOODMAN, 1994). Im Zuge der peroxisomalen Translokation erkennt ein Rezeptor sein „cargo“ über ein „targeting“-Signal im Zytosol (BROCARD UND HARTIG, 2006) und erfährt nach Bindung eine Konformationsänderung, was den „docking“-Prozess begünstigt (STANLEY *ET AL.*, 2006). Ein Teil des membrangebundenen Importrezeptors integriert in den Bilayer der peroxisomalen Membran und formt mit einem weiteren Membranprotein eine große dynamische Pore (MEINECKE *ET AL.*, 2010). Das „gating“ hängt dabei von der Größe des „cargo“-Rezeptor-Komplexes ab und kann einen Durchmesser von etwa 9 nm einnehmen, was der Größe von Sec61p entspricht (WIRTH *ET AL.*, 2003). Die Assoziation des „cargo“-Rezeptor-Komplexes mit der Pore scheint dabei starke dynamische Veränderungen in der Porengröße hervorzurufen. Der eigentliche Transport ist ATP-abhängig, benötigt jedoch weder eine Entfaltung des Substrats noch die Hilfe von luminalen Chaperonen. Der Mechanismus, mit dem dies möglich ist, ist ein exportgetriebener Proteinimport. Dabei assoziiert der „cargo“-Rezeptor-Komplex mit dem Porenkomplex und integriert in die bestehende Pore. Das ATP-abhängige Entfernen des Importrezeptors scheint dabei das Entlassen des „cargos“ durch die Induktion einer Konformationsänderung herbeizuführen (SCHLIEBS *ET AL.*, 2010). Nachdem das „cargo“ entlassen ist, kann der Rezeptor wiederverwendet oder proteasomal abgebaut werden, wobei der zugrunde liegende Mechanismus der Extraktion aus der Membran nicht bekannt ist. Prinzipiell benötigt die Exportmaschinerie eine Markierung des Rezeptors, die als Exportsignal fungiert, sowie eine AAA-ATPase, die an die Membran andockt und mit der Importmaschinerie interagiert (PLATTA *ET AL.*, 2005). Eine Monoubiquitinierung markiert den Rezeptor für das Recycling und wird entfernt, bevor ein neuer Durchgang begonnen wird (PLATTA *ET AL.*, 2007). Die Parallelen des ERAD-Pathways und des peroxisomalen Imports bestehen daher in der Notwendigkeit einer Ubiquitinierungsmaschinerie sowie in dem Zusammenspiel von Ubiquitinierung und Entlassung des Substrats mit Hilfe einer AAA-ATPase, die die Bewegung des fehlgefalteten Proteins bzw. des Rezeptors bewerkstelligt.

INSERTION IN DIE ER-MEMBRAN

A/B-Toxine wie CT, PT und Ricin, die in das ER transportiert werden, exponieren während ihrer Dissoziation ein hydrophobes, entfaltetes Peptid, das die Toxine für die Retrotranslokation markiert und dazu führt, dass die jeweilige A-Kette mit Lipiden der ER-Membran interagieren kann (HAUSMAN UND BURNS, 1992; ISHIDA *ET AL.*, 1983; TOMASI UND MONTECUCCO, 1981). DT benötigt hierfür eine saure Umgebung, was eine Konformationsänderung hervorruft und die Insertion des Toxin in die Membran begünstigt (SANDVIG UND OLSNES, 1980). Cholera Toxin und PTA müssen zuvor reduziert werden, um ihre Tertiärstruktur zu verändern (HAUSMAN UND BURNS, 1992; TOMASI UND MONTECUCCO, 1981). CTA1 ist im Anschluss vermutlich in der Lage, sich durch schnelle Faltung selbst aus dem ER zu extrahieren (LENCER UND TSAI, 2003). Auch der hydrophobe C-Terminus von SLTxA1 leistet einen essentiellen Beitrag zur Toxizität, da er bei niedrigem pH mit der Lipidmembran interagiert, bei neutralem pH vermutlich in den „bilayer“ inseriert und anschließend als ERAD-Substrat erkannt werden kann (MENIKH *ET AL.*, 1997).

RTA ändert in Gegenwart von negativ geladenen Lipiden ebenfalls seine räumliche Anordnung und kann somit in die Membran von Mikrosomen integrieren. RTA nutzt diese Eigenschaft vermutlich für den ER-Export, der sowohl ER-Proteine als auch den ER-Bilayer selbst benötigt (REDMANN *ET AL.*, 2011). Diese Insertion ist wahrscheinlich durch eine Konformationsänderung möglich, die durch ER-luminale Faktoren wie PDI hervorgerufen und die Interaktion mit Sel1p und Hrd1p ermöglicht (LI *ET AL.*, 2010; REDMANN *ET AL.*, 2011; SPOONER *ET AL.*, 2004). Bei 37°C wird vermutlich der C-Terminus exponiert, was im Anschluss zu einer Reduktion und Dissoziation von RTB führt (SIMPSON *ET AL.*, 1995; SPOONER *ET AL.*, 2004). Diese Exposition scheint die Interaktion mit Chaperonen zu fördern, die für die Translokation verantwortlich sind. Alternativ kann dieser hydrophobe Bereich auch die Interaktion mit Membranlipiden fördern. Wurde RTA mit Liposomen inkubiert, die das negativ geladene Phospholipid Phosphatidylserin (PS) enthalten, kam es zu einer Konformationsänderung, die an den Bilayer gebunden und sensitiv gegenüber einer Proteasebehandlung blieb. PS ist hauptsächlich auf der zytosolischen Seite des ER lokalisiert. Daher wurde die Bindung von RTA an die zytosolische Seite von Mikrosomen untersucht, um Komplikationen durch eine Interaktion von RTA mit luminalen ER-Proteinen auszuschließen (MAYERHOFER *ET AL.*, 2009; ZACHOWSKI, 1993). Bei 30°C scheint RTA nur mit der ER-Membran und Liposomen zu assoziieren.

Der Übergang von RTA von einem gefalteten löslichen Protein zu einem teilweise entfaltenen Protein und der damit verbundene Membran-exponierte Zustand scheinen die Erkennung von RTA als fehlgefaltetes Protein durch ERAD-Komponenten zu fördern (MAYERHOFER *ET AL.*, 2009). RTA wird eventuell über einen Protein-Kanal über die ER-Membran transportiert, worauf Co-Immunpräzipitationen mit Sec61p und Chaperonen hinweisen (ODA *ET AL.*, 2003; WESCHE *ET AL.*, 1999). Da diese Experimente bei 37°C durchgeführt wurden, ist es wahrscheinlich, dass RTA bereits vor dieser Interaktion in die Membran inseriert war. Eine alternative Option wäre die eigenständige Ausbildung einer Pore, die die Unterstützung des Exports durch einen Kanal aufhebt. Es bleibt jedoch diskutabel, ob RTA nach Insertion die Membran ohne Hilfestellung überwinden kann oder ob es vorher von ERAD-Komponenten erkannt und die Dislokation dadurch begünstigt wird. Für die Bindung an die Membran benötigt RTA vermutlich nur negativ geladene Phospholipide und keine weiteren Membranproteine (MAYERHOFER *ET AL.*, 2009; ZACHOWSKI, 1993).

Es wäre denkbar, dass K28 ebenfalls bereits im ER dissoziiert oder zumindest entfaltet wird, so dass ein hydrophober Bereich zur Interaktion mit der ER-Membran exponiert wird. Auch K28 α könnte auf diese Weise seine Retrotranslokation unterstützen. Über die Fusion mit mRFP konnte bereits gezeigt werden, dass K28 α sowohl nach seinem ER-Import als auch nach zytosolischer Expression eine starke Tendenz zur Assoziation mit der ER-Membran zeigt.

Modell zur ER-Zytosol-Retrotranslokation von K28 und K28 α

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden aufschlussreiche Erkenntnisse über den Transport des Killertoxins K28 sowie der intrazellulär exprimierten toxischen Untereinheit K28 α gewonnen. Nach externer Applikation (ABBILDUNG 52) gelangt das reife Dimer über Rezeptor-vermittelte Endozytose retrograd über Endosomen zum Golgi. Bisher wurde postuliert, dass ein Teil des Toxins ausgehend von endosomalen Kompartimenten zur Vakuole transportiert wird und dort teilweise der Degradation durch hydrolysierende Enzyme unterliegt. Diese Theorie wurde durch die Beobachtung erweitert, dass auch Moleküle, die bereits den Golgi-Apparat erreicht haben über den VPS-Pathway mit Hilfe von Vps15p, Vps6p, Vps19p, Vps21p, Vps45p, Vps34p und Vam3p sowie über einen alternativen Weg in Abhängigkeit von Vps41p, Vps1p, Apl5p und Apl6p zur Vakuole gelangen. Die Funktionalität dieses Kompartiments steht im Zusammenhang mit ihrer Azidifizierung, die über die V-ATPase vermittelt wird. Daher sichern die Untereinheiten, Vma4p, Vma5p, Vma8p, Vma10p, Vma13p, Vph1p, Vph2p und Pkr1p dieser Protonenpumpe den Abbauprozess des reifen Heterodimers. Ausgehend vom Golgi gelangt das restliche Toxin vermutlich über einen COPI-unabhängigen Prozess zum Endoplasmatischen Retikulum, wo es durch Unterstützung des Chaperons Kar2p sowie dessen Co-Faktoren Scj1p und Jem1p partiell entfaltet wird. Auch die Protein-Disulfidisomerase katalysiert mit Hilfe ihrer Isomerase-Aktivität die Formation eines exportkompetenten Intermediats, das im Anschluss wahrscheinlich über Sec61p in das Zytosol disloziert. Einige Moleküle werden eventuell mit Hilfe der ERAD-L-Komponenten Hrd1p sowie Ubc7p ubiquitiniert, über die proteasomalen Untereinheiten Rpt2p sowie Rpt5p aus der Membran extrahiert und im Anschluss degradiert. Das restliche Toxin erreicht seine Zielproteine im Nukleus, was zur Ausbildung des letalen Effekts führt.

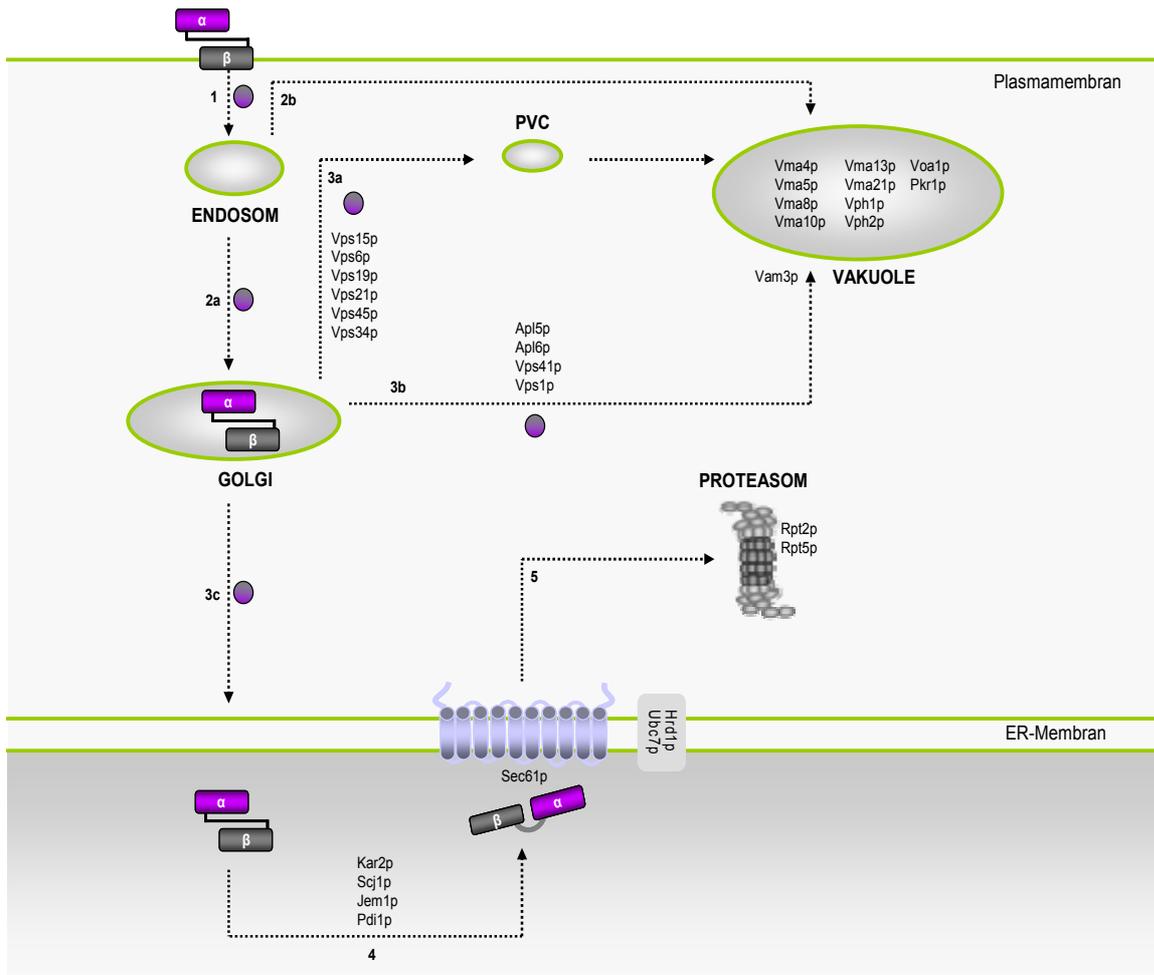


Abbildung 52: Schematische Darstellung des K28-Transportwegs nach externer Applikation. Das Killertoxin erreicht nach endozytischer Aufnahme das endosomale Kompartiment über den retrograden sekretorischen Weg (1). Ein Teil des Toxins gelangt zur Vakuole und unterliegt der Proteolyse (2b), die restlichen Moleküle werden weiter zum Golgi transportiert (2a). Ausgehend von diesem Kompartiment erfolgt ein zusätzlicher Sortiermechanismus über den VPS-Weg (3a) sowie einen alternativen Pathway (3b), die beide in der vakuolären Lokalisation münden. Toxinmoleküle, die das ER erreichen (3c), werden mit Hilfe von Chaperonen sowie der Isomerase-Aktivität der Protein-Disulfidisomerase Pdi1p auf den Retrotranslokationsprozess vorbereitet (4), in dem Sec61p vermutlich eine Schlüsselfunktion als Teil des Export-Kanals erfüllt. Eventuell vermittelt die Ubiquitinierung mit Hilfe der ERAD-L-Komponenten Hrd1p sowie Ubc7p die Degradation durch das Proteasom (5), wohingegen die übrigen Toxinmoleküle zu ihrem Zielort gelangen, um den letalen Effekt zu induzieren.

Wird die toxische α -Untereinheit (präpro α) intrazellulär exprimiert (ABBILDUNG 53), gelangt sie aufgrund ihrer N-terminalen post-translationalen Importsequenz zunächst in das ER, wo es zur Abspaltung des Signalpeptids kommt. K28pro α wird im Anschluss mit Hilfe der Rezeptoren und Adaptoren Erv29p, Erp1p, Erv26p und Erv14p in COPII-Vesikel verpackt und zum Golgi transportiert, wo die Fusion mit der Zielmembran durch die Komponenten Bet3p, Trs31p, Grh1p, Bos1p, Sec17p und Sec18p sichergestellt wird. Im Golgi selbst erfolgt die Prozessierung der Pro-Region sowie des C-Terminus der α -Untereinheit mittels Kex1p bzw. Kex2p, der sich eventuell die Modifikation einer potentiellen O-Glykosylierung durch Pmt5p anschließt. Ausgehend von diesem Kompartiment besitzt das Toxin verschiedene Möglichkeiten für seinen weiteren Weg durch die Zelle. Äquivalent zum reifen Dimer wurde auch für K28 α im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit erschlossen, über den VPS-Weg und/oder einen alternativen Weg zur Vakuole zu gelangen. Auch die Degradation in diesem Kompartiment konnte analog zum Heterodimer anhand der identischen Untereinheiten der V-ATPase charakterisiert werden. Die übrigen Moleküle der α -Untereinheit erreichen über den durch Arf2p, Gcs1p, Sec21p, Sec26p, Sec27p und Ret2p vermittelten COPI-Vesikeltransport das ER, wobei das Verschmelzen mit der Zielmembran durch Use1p und Dsl1p gewährleistet wird. Zur anschließenden Dislokation stehen verschiedene Wege zur Verfügung, wobei die bisher untersuchten Mechanismen eher einen Degradationsprozess darstellen. Im Zuge des ERAD-L-Pathways erfolgt die Erkennung der α -Untereinheit über die luminalen Proteine Kar2p, Htm1p, Yos9p und Hrd3p, und die anschließende Retrotranslokation über die ER-Membran. Dieser Schritt beinhaltet vermutlich einen Protein-gestützten Mechanismus, der auf der Bildung einer Pore beruht. Im artifizialen System setzt sich diese wahrscheinlich aus Sec61p und Der1p zusammen, wobei den einzelnen Komponenten keine explizite Kanal-Funktion, sondern lediglich eine Beteiligung am Dislokationsprozess zuzuordnen war. Im Zytosol kann K28 α von weiteren Untereinheiten des ERAD-Pathways, wie Ubc7p, Hrd1p und Doa10p, mit Ubiquitin markiert und im Anschluss proteolytisch in Abhängigkeit von Blm10p, Rpt3p, Rpt5p sowie Ubp6p durch das Proteasom abgebaut werden. Alternativ ist die Erkennung des Toxins durch die Komponenten Atg8p und Atg19p der selektiven Autophagie während der Translokation möglich, welche die Verpackung in Autophagosomen und somit die Voraussetzung zur vakuolären Degradation durch Unterstützung von Vma5p, Vma8, Vma10p, Vma21p, Vma22p, Vph1p, Vph2p, Voa1p, Pkr1p sowie Stv1p bildet. Die Synthese von „lipid droplets“ (LDs) definiert eine dritte Möglichkeit luminaler Proteine aus dem Endoplasmatischen Retikulum zu entkommen. Optional erfolgt die Interaktion mit der Phospholipid-Membran der knospenden Tropfen direkt aufgrund der Hydrophobizität des Toxins oder indirekt durch Wechselwirkung LD-assoziierter Polypeptide des ER.

Am Ende dieses lipidabhängigen Prozesses steht oft die terminale Degradation durch das Proteasom, der K28 α entgeht, sofern die Abhängigkeit von Toxinwirkung und Synthese neutraler Lipide auf die LD-Bildung zurückzuführen ist.

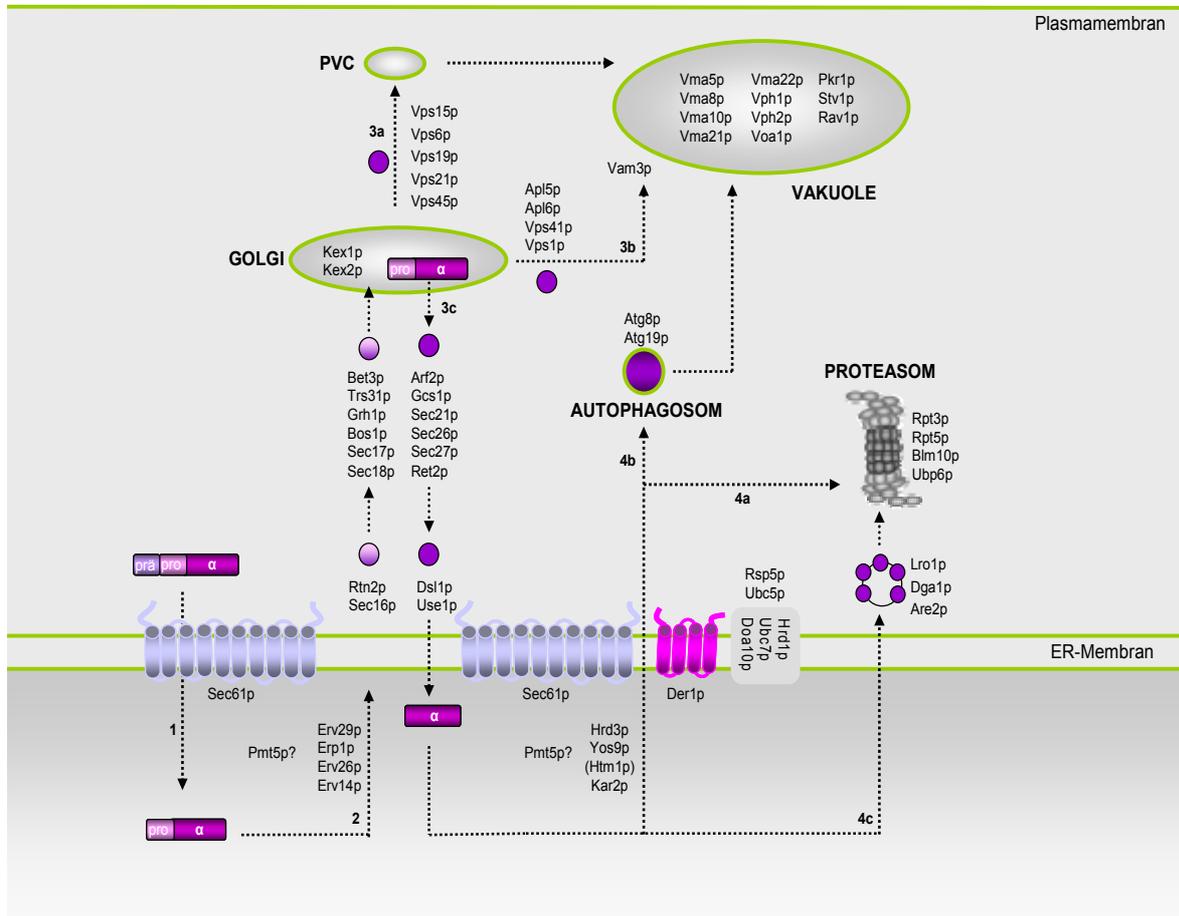


Abbildung 53: Schematische Darstellung des K28 α -Transportwegs nach intrazellulärer Expression. Zunächst erreicht die α -Untereinheit das Endoplasmatische Retikulum, wo es zur Abspaltung des ER-Signalpeptids (prä-Region) kommt (1). Das Toxin wird im Anschluss in COPII-Vesikel verpackt und zum Golgi transportiert (2). Ausgehend von diesem Kompartiment können einige Moleküle über den VPS-Pathway (3a) bzw. eine alternative Route (3b) zur Vakuole gelangen, wo sie proteolytisch degradiert werden. Das restliche Toxin wird über COPI-Vesikel wieder zum ER geleitet (3c), wo es entweder zum Teil über ERAD-L (4a) oder selektive Autophagozytose (4b) abgebaut wird. Die Komponenten Sec61p sowie Der1p der ER-assoziierten Degradation vermitteln vermutlich gemeinsam mit Kar2p die Retrotranslokation in das Zytosol, die nicht für den gesamten Toxingehalt mit der terminalen Degradation assoziiert ist, sondern ebenfalls den Transport zum Wirkungsort und somit die Ausbildung des letalen Effekts ermöglicht. Dieser Dislokations-Prozess steht eventuell ebenfalls im Zusammenhang mit der Synthese und Knospung von „lipid droplets“, die es dem Toxin durch hydrophobe Wechselwirkung ermöglichen könnten, das ER zu verlassen (4c).

Wirkung von K28 bzw. K28 α auf höhere Eukaryonten

Der retrograde Transport ist essentiell für die Invasion verschiedener Pathogene sowie deren Produkte in die Zielzelle. Das Shiga Toxin aus dem Bakterium *Shigella dysenteriae* wird nach Endozytose retrograd über Endosomen bis zum ER transportiert und erreicht schließlich das Zytosol, wo es die Proteinsynthese inhibiert (SANDVIG UND VAN DEURS, 2005). Auch andere Toxine wie das Cholera Toxin aus *Vibrio cholerae*, das Exotoxin aus *Pseudomonas aeruginosa*, die Shiga-like Toxine aus enterohämorrhagischen *E. coli* Stämmen sowie das Pflanzentoxin Ricin haben einen ähnlichen Transportweg (JOHANNES UND POPOFF, 2008). Toxine gehen diesen „Umweg“ über das Endoplasmatische Retikulum, da sie von dort an ihren Zielort gelangen können (PELHAM ET AL., 1992). Die Retrotranslokation in das Zytosol stellt dabei einen natürlichen zellulären Prozess dar, der üblicherweise von fehlgefalteten Proteinen im Rahmen der ER-assoziierten Degradation besprochen wird, wobei sich A/B-Toxine weitgehend einer terminalen Degradation entziehen (BRODSKY UND MCCRACKEN, 1997). Obwohl der intrazelluläre Transport verschiedener A/B-Toxine prinzipiell ähnlich verläuft, werden für die einzelnen Schritte teils unterschiedliche Mechanismen beansprucht. Diese genau zu verstehen und zu identifizieren erweitert das Aufzeigen paralleler Transportwege sowie eine gezielte medizinische Therapie bei Infektion oder der adaptierten Nutzung im „drug delivery“ und ergänzt das Spektrum der gezielten Anwendung in der Forschung.

In der Chemotherapie ist der größte Anspruch des „drug delivery“ das „targeting“ zu optimieren sowie Nebenwirkungen zu minimieren. Dazu ist ein detailliertes Wissen über Eigenschaften der Zellen und die Entwicklung effektiver Strategien nötig. Probleme in der Chemotherapie sind meist die Überwindung der Plasmamembran als Barriere für geladene Moleküle, die häufig als Vehikel für unterschiedliche Wirkstoffe genutzt werden. Ein weiteres Problem stellt die Aufrechterhaltung der chemischen Stabilität der Präparate auf dem Weg zu ihrem Wirkungsort sowie die Minimierung des lysosomalen Abbaus dar (TARRAGO-TRANI UND STORRIE, 2007). Die B-Kette des Shiga Toxins kann in diesem Zusammenhang als Werkzeug genutzt werden, um therapeutische Wirkstoffe in die Zelle zu schleusen. Sie ist sowohl in einem breiten pH-Bereich als auch in Gegenwart von Proteasen stabil, wodurch das Toxin Gewebesbarrieren überwinden kann und sich so effektiver einer extra- und intrazellulären Inaktivierung entzieht (JOHANNES UND DECAUDIN, 2005). Der von der B-Kette genutzte Gb3-Rezeptor wird in verschiedenen Tumoren bzw. Zelllinien überexprimiert (GARIEPY, 2001). Eine intratumorale Injektion des Holotoxins konnte zudem im Maus-Modell das Tumorstadium inhibieren (ISHITOYA ET AL., 2004).

Die große Anzahl an Transportfaktoren lässt die Frage aufkommen, wie ihre Funktionen miteinander verbunden sind und ihre große Diversität weist auf parallele Wege des gleichen „cargos“ zwischen Endosomen und TGN hin (MALLARD *ET AL.*, 1998). Im Gegensatz zu Toxin-spezifischen Genen (Ricin 1030, PE 748), war die Anzahl der Allele, welche die beiden Toxine Ricin und PE in gleichem Maße beeinflussen mit 13 % sehr gering (MOREAU *ET AL.*, 2011). Im Vergleich mit K28 sollte bewertet und abgeschätzt werden, in wie weit sich die Ansprüche eines Hefetoxins verglichen mit den beiden säugerspezifischen Toxinen unterscheiden. In Hefe wurden 165 Gene identifiziert, die für den Transport von K28 in Hefe benötigt werden (MOREAU *ET AL.*, 2011). Da das Killertoxin K28 starke Parallelen zum Transport klassischer human-pathogener A/B-Toxine aufweist, besitzt es das Potential, auch Säugerzellen zu infizieren, indem es über homologe K/HDEL-Rezeptoren der Zelloberfläche höherer Eukaryonten internalisiert werden kann (RAYKHEL *ET AL.*, 2007). Dabei könnte eine erhöhte UPR-Aktivität verschiedener Tumorvarianten die verstärkte Toxinaufnahme durch Lokalisation des KDEL-Rezeptors an der Oberfläche fördern.

K28 besitzt somit das Potential, alternative Transportwege in höheren Eukaryonten aufzuzeigen und durch Nutzung seiner β -Untereinheit als Fusionskonstrukt mit verschiedenen Wirkstoffen die Zielsteuerung im „drug-delivery“ zu variieren und eventuell zu optimieren. Auch eine spezifische Wirkung von K28, die sich auf Hefe begrenzt, könnte bei der Behandlung von Mykosen immunsupprimierter Patienten von Vorteil sein (SCHMITT UND BREINIG, 2002). Bisher konnte in Untersuchungen zahlreicher Hefe-Toxine jedoch keine Wirkung auf höhere Eukaryonten nachgewiesen werden.

Expression von K28 α in HeLa-Zellen

Um die Wirkung von K28 α auf höhere Eukaryonten untersuchen zu können, wurde zunächst ein *in vivo* Testsystem etabliert, das einen reproduzierbaren Nachweis einer toxischen Wirkung von K28 auf Säugerzellen erlaubt. In Hefe wird K28 α nach intrazellulärer Expression zunächst in das ER importiert, um nach weiterem Transport über Golgi und zurück zum ER in das Zytosol und schließlich in den Zellkern zu gelangen und dort sein „target“ zu erreichen. Der ER-Import kann prinzipiell co- oder post-translational erfolgen, abhängig von der Hydrophobizität der Signalsequenz. Das toxineigene Importsignal deutet auf einen post-translationalen Mechanismus hin.

Da es sich im Falle von K28 allerdings um ein hefespezifisches Signal handelt, konnte nicht davon ausgegangen werden, dass es auch in Säugerzellen einen effizienten ER-Import gewährleistet. Daher wurde neben der endogenen Sequenz (prä; p) ein ER-Importsignal von Lactin (ssPI) verwendet, das einen co-translationalen Import vermittelt.

In einem Sequestrierexperiment konnte gezeigt werden, dass sowohl ppa als auch ssPIpa nach *in vitro* Transkription und Translation in Säuger-Mikrosomen importiert und die Signalsequenz abgespalten wurde. Diese Fraktion war außerdem vor Proteinase K geschützt und unterschied sich somit von der zytosolisch exprimierten K28 α -Variante. Beide Signalsequenzen waren demnach für die *in vivo* Toxizitätsbestimmung von K28 α geeignet.

In vorangegangenen Studien führte die intrazelluläre Expression von K28 α mit toxineigenem ER-Importsignal sowie die zytosolische Expression in der Karzinomzelllinie HCT116 in einem Kolonie-Bildungsassay zu einem eingeschränkten Wachstumsverhalten. Den stärksten Effekt erreichte eine K28 α -Variante mit zusätzlichem Kernlokalisierungssignal, was zu einer Wachstumsinhibierung von 50 % führte (SPINDLER, 2004). Um den Effekt der Toxinexpression genauer charakterisieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit statt des Wachstums die Stoffwechselaktivität transfizierter Zellen mittels XTT-Test bestimmt. Dabei setzen stoffwechselaktive Zellen das Tetrazoliumsalz XTT zu einem orange-farbenen Formazan-Derivat um, dessen Absorption photometrisch bei 450 nm bestimmt werden kann. Die optimale DNA-Konzentration von 1 μ g zur Transfektion von HeLa-Zellen war zuvor durchflusszytometrisch ermittelt worden (nicht dargestellt). Nach Transfektion mit ssPIpa war nach 48 h nur noch eine Vitalität von 40 %, mit ppa von 29 % und mit pa von 47 % messbar. Anhand dieses Ergebnisses konnte erstmalig ein Zusammenhang zwischen Toxinexpression und einer quantifizierbaren Zellvitalität über die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen gezeigt werden. Auch die biologische Aktivität V5-„getaggtter“ K28 α -Varianten konnte im XTT-Test bestätigt werden, die jedoch gegenüber dem unmarkierten Toxin um etwa 20 % verringert war. Die Expression konnte durch Verwendung des proteasomalen Inhibitors MG132 in der Western-Analyse verifiziert werden, ebenso die intrazelluläre Lokalisation mittels indirekter Immunfluoreszenz, die für ssPIpV5 α und ppV5 α eine typische Verteilung im sekretorischen Weg und für pV5 α die Lokalisation im Zytosol bestätigte, sichtbar gemacht werden.

Terminaler Phänotyp nach intrazellulärer Expression von K28 α in HeLa-Zellen

A/B-Toxine vermitteln in höheren Eukaryonten Apoptose. Der programmierte Zelltod wird in Folge externer aber auch interner Signale eingeleitet ohne Zellen des Restgewebes zu schädigen. Nach Induktion einer Caspase-Kaskade, schrumpft die Zelle und fragmentiert die DNA. Doch auch einzellige Organismen wie Hefe antworten auf Pathogene oder Toxine. Die Applikation des K28-Dimers sowie die intrazelluläre Expression der α -Untereinheit führt in Hefe zu einem Zellzyklusarrest und im Falle des reifen Toxins bei subletaler Dosis zur Apoptose (SCHMITT UND BREINIG, 2006). Die Möglichkeit zur Induktion des programmierten Zelltodes scheint für Killertoxine ein wesentlicher Bestandteil ihrer Wirkung zu sein, falls durch eine zu geringe Toxinkonzentration der primäre Effekt nicht ausgelöst werden kann (STARMER *ET AL.*, 1987). Auch im Rahmen der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass K28 α , analog zu beschriebenen A/B-Toxinen, in höheren Eukaryonten Apoptose einleitet. Die Toxinvarianten ssPlp α , pp α und p α wurden über 24 h exprimiert, die Zellen anschließend mit Propidiumiodid gefärbt und durchflusszytometrisch zur Bestimmung des DNA-Gehalts eingesetzt. Der Gehalt an fragmentierter DNA apoptotischer Zellen war verglichen mit der Negativkontrolle prozentual jeweils um den Anteil gesteigert, um den die beiden Zellzyklus-Phasen G1 und G2 reduziert waren; mit 20 % war der Effekt nach Expression von pp α am stärksten ausgeprägt. Somit war die Vermittlung eines Zellzyklusarrestes entsprechend der intrazellulären Toxinexpression in Hefe ausgeschlossen und ein Zusammenhang mit der Wirkungsweise anderer A/B-Toxine in höheren Eukaryonten hergestellt. Die Menge apoptotischer Zellen korrelierte somit auch mit der ermittelten Zellvitalität, die ebenfalls nach Expression von pp α den stärksten Effekt zeigte. Eine Behandlung mit FITC-Annexin V erbrachte den Beweis früher apoptotischer Ereignisse, die auf einer Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran beruht. Da der Zellzyklus immortalisierter Zellen meist nicht mehr endogenen Kontrollmechanismen unterliegt, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Vermittlung der Apoptose darauf beruht, dass der primäre Effekt des Zellzyklusarrestes aufgrund einer fehlenden Funktion von Regulatoren bzw. des „targets“ selbst, nicht vermittelt werden kann.

Bakterielle A/B-Toxine induzieren Zelltod meist als Folge einer anhaltenden UPR-Induktion. Anhand dieser Signaltransduktion wird die Produktion von ER-Proteinen erhöht, die an der Faltung von Proteinen beteiligt sind und somit der Stress-Bewältigung dienen. Kann der Belastung nicht entgegen gewirkt werden, ist die Apoptose der letzte Schritt, den die Zelle zum Schutz des Zellverbands unternehmen kann. Im Gegensatz zu Hefe besitzen höhere Eukaryonten eine komplexere Kontrolle der UPR, die über drei verschiedene Wege ablaufen kann. Shiga Toxin aktiviert die UPR in erster Linie über die Inhibition der Proteinsynthese, die zur Akkumulation fehlgefalteter Proteine und somit zu einem konstanten Stresssignal führt, auf das die Zelle mit Induktion der Apoptose antwortet. Zwei Stunden nach Toxinbehandlung sind alle UPR-Sensoren aktiviert. Die *XBP1*-mRNA wurde gespleißt, der Elongationsfaktor eIF-2 α durch PERK phosphoryliert und der Transkriptionsfaktor ATF6 zu seiner aktiven Form prozessiert. Auch die CHOP-Expression wird über Stunden der Toxinbehandlung hochreguliert (TESH, 2012A), wodurch die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 reduziert wird (MCCULLOUGH *ET AL.*, 2001). Das Subtilase-Toxin spaltet nach retrogradem Transport das Chaperon BiP, inhibiert dadurch die Proteinsynthese und aktiviert ebenfalls alle UPR-Sensoren (TESH, 2012B; WOLFSON *ET AL.*, 2008). Ricin aktiviert die Signalkaskade über JNK und p38. Es ist allerdings unbekannt, wie diese Antwort der Inhibierung der Proteinsynthese zuzuordnen ist. Durch Mutation (P95L/E145K sowie S215F) konnte das Toxin zwar weiterhin Ribosomen depurinieren und die Proteinsynthese hemmen, jedoch keine Apoptose mehr induzieren (JETZT *ET AL.*, 2012).

Der Zusammenhang von ERAD, UPR und der Wirkungsweise von A/B-Toxinen besteht darin, dass durch die „unfolded protein response“ Komponenten des ER-Exports verstärkt exprimiert bzw. die Synthese der Faktoren für den Abbau inhibiert werden. Daraus entstand die Hypothese, dass das Cholera Toxin (CT) selbst ER-Proteine hochreguliert, um die Sensitivität der Wirtszelle zu erhöhen. Tatsächlich werden BiP, Derlin 1 und Derlin 2 nach Behandlung mit CT bzw. CTB verstärkt exprimiert und ein „knock-down“ von Derlin 1 schützt die Zellen vor der Wirkung des Toxins (DIXIT *ET AL.*, 2008). Aufbauend darauf wäre in nachfolgenden Experimenten zu bewerten, ob die Induktion der Apoptose durch K28 α in HeLa-Zellen ebenfalls eine Folge der UPR darstellt oder ob diese Form der ER-Qualitätskontrolle äquivalent zu Hefe nicht in die Wirkungsweise des Toxins involviert ist. Neben dem Nachweis der *XBP1*-mRNA würden der Gehalt von BiP und CHOP sowie der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration Aufschluss über einen einsetzenden UPR-Pathway geben.

Rolle des proteasomalen Abbaus von K28 α in HeLa-Zellen

Der ERAD-Pathway wurde das erste Mal in Hefe beschrieben und ist in Säugerzellen konserviert (WIERTZ *ET AL.*, 1996A). Am Ende der ER-Qualitätskontrolle steht in der Regel die Degradation durch das Proteasom. Obwohl A/B-Toxine nach dem ER-Export aufgrund ihres niedrigen Lysingehalts größtenteils einer Ubiquitinierung und somit dem Abbau entgehen, unterliegt dennoch ein Teil diesem Prozess. Durch Applikation eines entsprechenden Inhibitors sollte die Degradation daher weiter minimiert werden können. In der Tat scheint die Gabe des proteasomalen Inhibitors Clasto-Lactacystin β -Lacton die Aktivität von Ricin zu steigern, das Cholera Toxin wird dagegen nicht beeinflusst, da es sich nach seiner Retrotranslokation vermutlich schneller zurückfalten kann (DEEKS *ET AL.*, 2002; RODIGHIERO *ET AL.*, 2002). Ein weiteres Indiz für diese Theorie besteht darin, dass CTA1 auch nach Verlust seiner Lysinreste sowie einer Blockierung des N-Terminus aus dem ER exportiert wird und seine Toxizität vermitteln kann. Die Ubiquitinierung stellt daher keine treibende Kraft für die Retrotranslokation dar. Vielmehr wird spekuliert, dass sich CTA1 aufgrund seiner schnellen Faltung selbst aus dem ER extrahieren kann (LENCER UND TSAI, 2003).

Um einschätzen zu können, ob K28 α nach Expression ebenfalls der proteasomalen Degradation unterliegt, wurde exemplarisch die Expression von ssPIpV5 α abhängig von verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors MG132 untersucht. Wie sich zeigte, war die Toxinexpression nur nach Inhibierung des Proteasoms nachzuweisen und stieg gleichzeitig mit dessen Konzentration an. MG132 aktiviert außerdem die Kinase JNK1, was zur Induktion der Apoptose führt. Da dies der toxischen Wirkung von K28 α in HeLa-Zellen gleichkommt, wurde die Auswirkung einer Toxinexpression in Gegenwart von MG132 zunächst umgangen. Um dennoch abschätzen zu können, ob die biologische Aktivität von K28 α in Zusammenhang mit einer proteasomalen Degradation steht, wurde zusätzlich der letale Effekt nach Mutation der Lysinreste untersucht. Die lysinfreien Toxinvarianten beeinträchtigten die Zellvitalität nicht in gleichem Maße wie die lysinhaltigen Formen, was eventuell auf eine verminderte Exportrate zurückzuführen sein könnte. Dennoch kam die Aktivität des Toxins nicht vollständig zum Erliegen, was darauf hinweist, dass eventuell eine Ubiquitinierung an alternativen Aminosäuren bzw. am N-Terminus stattfinden kann und somit, im Gegensatz zu CTA1, den Antrieb der Retrotranslokation sichert. Somit war durch Substitution der Lysinreste keine Steigerung der Toxinaktivität durch Reduktion der Degradation zu erreichen.

Der Abbau der α -Variante scheint daher erst im Anschluss an die Retrotranslokation durch Inhibierung des Proteasoms minimiert werden zu können, wohingegen der Austausch der Lysinreste eher die Dislokation beeinträchtigt.

Wirkung des reifen Toxins auf höhere Eukaryonten

PELHAM und Mitarbeiter identifizierten mit KDEL in Säugerzellen und HDEL in Hefezellen ein C-terminales Tetrapeptidmotiv, das als Bestandteil zahlreicher ER-luminaler Proteine als Retentions- bzw. Rückführungssignal fungiert, um Chaperone im ER zu lokalisieren (MUNRO UND PELHAM, 1987). Proteine mit K/HDEL-Motiv können somit in einem rezeptorvermittelten Prozess das ER verlassen, im Golgi modifiziert und wieder zum ER zurücktransportiert werden (DEAN UND PELHAM, 1990). *ERD1* und *ERD2* codieren in Hefe für integrale Membranproteine, deren Deletion zur Sekretion von Proteinen mit HDEL-Motiv und zu Defekten in ihrer N-Glykosylierung führt (HARDWICK *ET AL.*, 1990; SEMENZA *ET AL.*, 1990). Das endogene System des KDEL-Rezeptors für den retrograden Transport kann auch von Toxinen genutzt werden, um nach endozytischer Aufnahme über den retrograden Weg in das Zytosol zu gelangen (WATSON UND SPOONER, 2006). Manche dieser Protein-Toxine wie Cholera Toxin oder *Pseudomonas* Exotoxin A tragen ein KDEL- bzw. ein KDEL-ähnliches Motiv am C-Terminus, um einen effizienten Transport vom Golgi zum ER sicherzustellen. Für einige Toxine ist dieser Weg allerdings nicht essentiell. Anhand eines neuen Modells wurde postuliert, dass KDEL-Rezeptoren bereits die Bindung an die Zelloberfläche ermöglichen bzw. erleichtern. Das humane Genom besitzt drei KDEL-Rezeptorgene mit bisher unbekanntem funktionellen Unterschieden (CAPITANI UND SALLESE, 2009). In Hefe interagiert K28 mit dem HDEL-Rezeptor Erd2p bereits auf Ebene der Plasmamembran und wird anschließend über diesen rezeptorvermittelten Prozess endozytiert. Da die homologen humanen Rezeptoren ebenfalls auf der Plasmamembran lokalisiert sind, sollte ein analoger Prozess der Toxininternalisierung auch in höheren Eukaryonten möglich sein.

Während K28 seine optimale Aktivität bei 20°C und pH 4,7 entfaltet, benötigen Säugerzellen einen physiologischen pH-Wert von 7,3 sowie eine Umgebungstemperatur von 37°C. In vorherigen Untersuchungen war es bereits gelungen, die Versuchsbedingungen bezüglich des pH-Wertes den Ansprüchen der Wirtszelle und des Toxins anzunähern. Bei pH 5,8 war der Hemmhof im MBA-Test zwar verkleinert, doch das Toxin war noch in der Lage, sein „target“ zu erreichen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nach einer Inkubationszeit von der Verwendung der Hefe *S. cerevisiae* zur Toxinsynthese kein Verlust der Zellvitalität festgestellt werden. Eine Übertragung der Versuchsbedingungen auf das Hefesystem zeigte, dass sowohl die erhöhte Temperatur von 37°C im Säugersystem sowie der gesteigerte pH-Wert, die biologische Aktivität des Killertoxins massiv herabsetzt und somit keine bzw. lediglich eine stark beeinträchtigte Sensitivität sensitiver Hefezellen festzustellen war. Untersucht wurden hierbei Stämme, die nach Deletion des Toxinrezeptors (*ERD2*) mit humanen Homologen des KDEL-Rezeptors komplementiert worden waren. Unabhängig von pH-Wert und *ERD2*-Variante konnte im MBA bei 37°C kein Hemmhof mehr ausgebildet werden. Somit scheint die Temperatur die Wirkung des Toxins am Stärksten einzuschränken. Doch auch ein Anstieg des optimalen pH-Wertes von 4,7 auf 5,9 reduzierte den Hemmhofdurchmesser im WT um die Hälfte und führte zu einer Resistenz nach Komplementation der $\Delta erd2$ Deletionsmutante mit den säugerspezifischen Formen *ERD2.2* und *ERD2.3*. Im Hefesystem spielen somit optimale Umgebungsbedingungen wie pH-Wert und Temperatur eine essentielle Rolle für den Toxintransport. Anhand dieser Ergebnisse war allerdings nicht zu beurteilen, ob das Toxin bei 37°C oder einem pH-Wert von 5,9 verstärkt akkumuliert und daraufhin nicht mehr mit seinem Rezeptor interagieren kann oder ob K28 durch die veränderten Parameter verstärkt zur Vakuole gelangt und abgebaut wird.

Auch die Rückschlüsse vorheriger Studien bezüglich Aufnahme und Wirkung des Killertoxins sind wage; in der Colonkarzinomzelllinie HCT116 war bisher nach zweistündiger Toxinbehandlung anhand des DNA-Gehalts in einer FACS-Analyse kein Einfluss auf Zellzyklusphasen oder Apoptose erkennbar (SPINDLER, 2004). Ein Versuchsansatz bei zweistündiger Toxininkubation der Zellen bei pH 5,8 führte zwar zu einer um 40 % reduzierten Proteinbiosynthese sowie einer um 60 % reduzierten DNA-Neusynthese, die Negativkontrolle des toxinfreien Überstandes aus *K. lactis* die DNA-Neusynthese jedoch ebenfalls um 50 % senkte (KELKEL, 2009). Der einzige Hinweis auf die Wirkung des reifen Toxins wurde bisher nach Mikroinjektion von K28 erhalten, die dazu führte, dass sich etwa 50 % der behandelten Zellen über einen Zeitraum von 3 h ablösten und somit auf eine einsetzende Apoptose hinwiesen (KELKEL, 2009).

Die Wirkung anderer A/B-Toxine, wie dem Diphtherie-Toxin, konnte bereits anhand verschiedener pH-Werte untersucht werden. Ein solches Puffersystem sowie die Inkubation bei 30°C wären neben einer Überexpression der *ERD*-Rezeptorvarianten auch für die Applikation von K28 Optionen, die Toxinaufnahme zu ermöglichen und somit den weiteren Weg eines Hefetoxins in höheren Eukaryonten zu verfolgen. Dies wurde für den neurotrophen Faktor MANF gezeigt, der Signalwege in Neuronen aktiviert und über sein KDEL-ähnliches RTDL-Motiv an die Zelloberfläche bindet. Durch die Behandlung mit Thapsigargin, das ER-Stress induziert und die luminaire Ca^{2+} -Konzentration senkt, akkumuliert der KDEL-Rezeptor an der Oberfläche, allerdings ohne den gesamten zellulären Level des Rezeptors zu verändern. Wird der Rezeptor überexprimiert, kommt es ebenfalls zu einer verstärkten Bindung von MANF an die Zelloberfläche (HENDERSON *ET AL.*, 2012).

5 Ausblick

ALTERNATIVE TESTSYSTEME

Die Schwierigkeit in der Untersuchung der Retrotranslokation liegt in der Differenzierung der Transportrichtung entsprechender ERAD-Substrate. Eine Quantifizierung der Translokationskinetik ist daher komplex, da der Export in gängigen Experimenten nicht synchron abläuft. Studien an „knock-out“ Mutanten erschweren zudem die Differenzierung zwischen primären und sekundären Effekten, da es sich bei zahlreichen Komponenten um teilweise oder vollständig redundante Proteine handelt. Um den ER-Export von K28 synchron, in Echtzeit und ohne konkurrierende Translokation zu beobachten, existieren verschiedene *in vitro* Testsysteme, welche die *in vivo* Untersuchungen der vorliegenden Arbeit unterstützen und ergänzen könnten. Beispielsweise wurde zur Darstellung eines dislozierenden Proteins im Zytosol der Farbstoff BODIPY FL (BOF) durch tRNALys (BOF-Lys-tRNALys) in ein Präprosubstrat inkorporiert, mit ausgewählten luminalen Proteinen in rekonstituierte raue humane Mikrosomen eingeschlossen und mit aufgereinigten zytosolischen Proteinen inkubiert. Die Retrotranslokation konnte im Anschluss spektroskopisch nachzuvollzogen werden, indem dem Zytosol BOF-Antikörper appliziert wurden, die durch Binden des Substrats dessen Emission quenchen. Somit konnte der Export-Prozess anhand der Reduktion der Emissionsintensität dargestellt werden (WAHLMAN *ET AL.*, 2007). Ein alternativer, divergenter Ansatz beschreibt die Degradation des zu untersuchenden Proteins und somit einen Prozess der den Export aus dem Endoplasmatischen Retikulum voraussetzt und indirekt reflektiert. Sogenannte „pulse-chase“-Experimente beruhen auf der radioaktiven Markierung („pulse“) eines Modell-Substrats während dessen Translation sowie einem anschließenden „chase“, in dem die Synthese mit unmarkierten Aminosäuren fortgesetzt wird. Gemessen über einen festgelegten Zeitraum kann somit die Abnahme des Signals Aufschluss über die Degradationskinetik und somit über die Effizienz der Retrotranslokation geben. Unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors war bisher unter den gewählten Parametern auch nach ausgedehnten „chase“-Zeiträumen keine Reduktion der α -Untereinheit erkennbar, dem eventuell durch Dezimierung der Toxinmenge entgegenzuwirken wäre. Die Expression von *GALS-K28 α* , könnte somit die Nutzung des ERAD-Pathways zur Degradation des Letalkonstrukts verifizieren und eine Überlagerung potentieller Dislokations-Ereignisse deutlicher abgrenzen.

Um den Einfluss klassischer ERAD-Komponenten auf die Umsetzung von K28 bzw. K28 α zu bestätigen, sollte in aufbauenden Arbeiten ein Interaktionsnachweis mit Schlüsselfaktoren dieses Pathways angeschlossen werden. Dementsprechend wurden in der vorliegenden Arbeit bereits einzelne Ansätze verfolgt, um Hinweise auf eine Wechselwirkung des Killertoxins mit Sec61p während der Dislokation zu erhalten. Neben den beschriebenen Experimenten sollten mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) durch räumliche Nähe der Test-Komponenten auch die an Fänger- und Beuteprotein fusionierten Fragmente des Reporters mCherry zusammengefügt werden und somit anhand des Fluoreszenzsignals die Interaktion von K28 mit dem potentiellen Export-Kanal Sec61p signalisieren. Das rekombinante Toxin wies jedoch keine biologische Aktivität auf, weshalb zur weiteren Analyse einer Wechselwirkung mit ERAD-Komponenten auf alternative Methoden zurückgegriffen werden müsste. Die bisherigen Versuche, eine Wechselwirkung mit Sec61p mittels Co-Immunpräzipitation bzw. Split-Ubiquitin-System nachzuweisen, scheiterten vermutlich an einem zu schnellen Export-Prozess. Um solch transiente Reaktionen zu stabilisieren, besteht die Möglichkeit einer permanenten Verknüpfung mittels „crosslinkern“, wobei die kovalente Fixierung durch Veresterung der Proteine erfolgt. So konnte beispielsweise der Nachweis einer Wechselwirkung des mutierten α -Faktors Δ gpaf mit Sec61p nach *in vitro* Translation in isolierte Mikrosomen und anschließendem chemischem „crosslink“ mit DSP nach Zugabe von isoliertem Zytosol erbracht werden (MCCRACKEN UND BRODSKY, 1996; PILON ET AL., 1997). Eine weitere Option stellt die Fusion mit DHFR (Dihydrofolat-Reduktase) dar. Die Zugabe des Substrathomologs Trimetaxat induziert dabei die Faltung des Fusionsproteins und verzögert somit den ER-Export. Publiziert wurde diese Anwendung unter anderem für das ERAD-Substrat CPY*-DHFR, dessen Mikrosomenfraktion nach intrazellulärer Expression geerntet, mit Digitonin solubiliert und anschließend immunpräzipitiert wurde (SCHAFER UND WOLF, 2009). Alternativ könnte in einem eher rudimentären Ansatz eine potentielle Interaktion anhand immobilisierter Peptide des Translokons mit anschließender Toxinbehandlung in einem „Dot-Blot“ untersucht werden.

Da sich bisher abzeichnete, dass K28 den ERAD-Pathway zur Degradation nutzt, bleibt die Frage nach dem Mechanismus der Retrotranslokation weiterhin offen. In aufbauenden Experimenten wären diesbezüglich alternative Prozesse zu untersuchen, die beispielsweise die Integration von K28 bzw. K28 α in die ER-Membran sowie die durch Rückfaltung angetriebene Extraktion aus dem Kompartiment mit einschließt. Prinzipiell könnte das Toxin durch Insertion in den Bilayer selbst einen Kanal ausbilden. Anhand von Liposomen wäre näher zu bestimmen, ob das Toxin diese Eigenschaft besitzt und welche luminalen sowie zytosolischen Komponenten diesen Prozess vermitteln.

Um den Einfluss verschiedener Mutationen auf den Transport des reifen Toxins zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Studie eine Methode verwendet, die auf Diffusion von K28 im Methylenblau-Agar beruht. Da lediglich in wenigen Fällen größere Abweichungen im Hemmhofdurchmesser dokumentiert werden konnten, erwies sich dieses Testsystem als ungeeignet, geringe Veränderungen in der Retrotranslokation zu erkennen. Äquivalent zum artifiziellen System sollte daher auch der Effekt des reifen Toxins über einen definierten Zeitraum bestimmt werden. In Flüssigkultur stellte sich jedoch keine Toxinwirkung ein, die anhand einer veränderten optischen Dichte bzw. eines reduzierten Sauerstoffverbrauchs definiert werden konnte. Lediglich Sphäroplasten reagierten nach Applikation des K28-Dimers mit einem verringerten Sauerstoffpartialdruck. Da jedoch durch den enzymatischen Abbau der Zellwand UPR induziert wird, stellt dieser Ansatz kein geeignetes Modell dar, um Veränderungen der Toxinwirkung zu ermitteln, die auf ERAD-Komponenten zurückzuführen sind. Daher sollte auf biochemische Methoden zurückgegriffen werden, um anhand einer veränderten Signalstärke des Toxins im Zytosol einen direkten Hinweis auf eine veränderte Transportkinetik zu erhalten. Zellfraktionierungsexperimente gaben Aufschluss über die subzelluläre Verteilung des Proteins, wobei diese Form der differentiellen Zentrifugation wenig reproduzierbar war und ebenfalls nicht auszuschließen ist, dass membrangebundenes Toxin der Plasmamembran mitgeführt wird. Untermuert wird dieser Aspekt durch die Tatsache, dass fluoreszenzmarkiertes K28 nach Applikation bisher nicht in der Zelle nachgewiesen werden konnte, so dass der eigentliche intrazelluläre Toxingehalt vermutlich zu gering für gängige Nachweismethoden ist (GIEßELMANN, 2011). Daher scheiterte ein Versuch, K28 ausschließlich nach ER-Export durch Biotinylierung mit Hilfe einer zytosolisch exprimierten Biotin-Ligase sichtbar zu machen, wobei das Testsystem im Hinblick auf eine geeignete Positivkontrolle optimiert werden könnte. Somit wäre vermutlich lediglich die Inkubation mit radioaktiv markiertem Toxin eine vielversprechende Option, K28 während des retrograden Transportes sichtbar zu machen.

SPEZIFIZIERUNG DER TOXINWIRKUNG IN HÖHEREN EUKARYONTEN

Im Rahmen dieser Arbeit konnte anhand der Zellvitalität die toxische Wirkung der intrazellulär exprimierten K28 α -Untereinheit auf Säugerzellen nachgewiesen und diesbezüglich mit der Aktivität des Proteasoms in Zusammenhang gebracht werden. Offen blieb jedoch die Auswirkung der Applikation eines proteasomalen Inhibitors auf den terminalen Phänotyp, wofür eine Toxinkonzentration zu wählen wäre, die keine Induktion der Apoptose auslöst und somit nicht den eigentlichen Toxin-Effekt überlagert.

Nach Applikation des reifen Dimers konnte in höheren Eukaryonten bisher kein letaler Effekt nachgewiesen werden, vermutlich da die Toxizität von K28 auf Hefezellen optimiert ist. Eine verbesserte Toxin-Internalisierung könnte eventuell durch Überexpression einzelner K/HDEL-Rezeptoren erreicht und mit der Bedeutung des hefeeigenen Erd2p-Rezeptors verglichen werden. Auch Veränderungen des Mediums bezüglich pH-Wert und der Wahl eines geeigneten Puffersystems sowie die Absenkung der Temperatur während der Toxin-Inkubation sollten zur Optimierung in weiterführenden Studien berücksichtigt werden.

Um die ER-Membran zu überwinden, nutzen Cholera Toxin, Shiga Toxin sowie *Pseudomonas* Exotoxin A und Ricin den ERAD Pathway, der normalerweise der Retrotranslokation fehlgefalteter Proteine dient. Dabei spielen meist PDI, Sec61 sowie Derlin 1 bzw. Derlin 2 eine entscheidende Rolle (LIN *ET AL.*, 2008; SANDVIG *ET AL.*, 2002; SIMPSON *ET AL.*, 1999; SLOMINSKA-WOJEWODZKA *ET AL.*, 2006) und sollten demnach ebenfalls in „knock-down“ Experimenten in Zusammenhang mit K28 untersucht werden. Äquivalent dazu wäre der Einfluss der UPR zu bestimmen, die ebenfalls in einigen Fällen die Toxinwirkung unterstützt.

Darüber hinaus wurden bereits kleine Moleküle identifiziert, die sowohl den intrazellulären Transport des Shiga Toxins als auch die Wirkung von Ricin beeinflussen (WAHOME *ET AL.*, 2010). Eeyarestatin I und II repräsentieren beispielsweise hydrophobe und strukturell verwandte ERAD-Inhibitoren, die die glykosylierte Form eines Modellsstrats in der Membranfraktion stabilisiert, wobei noch unklar ist, welcher Schritt im ERAD-Prozess durch die Substanzen blockiert wird (FIEBIGER *ET AL.*, 2004). Der retrograde Transport kann außerdem durch Behandlung mit Brefeldin A (YOSHIDA *ET AL.*, 1991) bzw. Golgizid A (SAENZ *ET AL.*, 2009), Retro1 und Retro2 inhibiert werden, was eine Verringerung der Aktivität zahlreicher Toxine zur Folge hat. Die Behandlung mit Retro2 konnte Mäuse vor der Auswirkung des Pflanzentoxins Ricin schützen (STECHMANN *ET AL.*, 2010), blieb jedoch gegenüber anderen Toxinen aufgrund paralleler bzw. redundanter Transportwege wirkungslos. Die Applikation dieser Wirkstoffe zu K28-behandelten Zellen könnte Rückschlüsse auf verwandte Transportwege von bakteriellen sowie mykotischen A/B-Toxinen ermöglichen.

6 Zusammenfassung

Das Killertoxin K28 wird als Vorläuferpeptid synthetisiert und nach Modifikation und Faltung von der Zelle sezerniert. Das gereifte heterodimere Toxin, bestehend aus einer α - und β -Untereinheit, wird in einem Rezeptor-vermittelten Prozess endozytiert und retrograd über Endosomen und Golgi zum ER transportiert. Nach der Dislokation in das Zytosol dissoziiert das Dimer in seine beiden Untereinheiten, wobei K28 β der proteasomalen Degradation unterliegt, während α im Nukleus die DNA-Synthese hemmt und den Zellzyklus am G1/S-Übergang arretiert. Im Fokus der vorliegenden Arbeit stand die Aufklärung der Retrotranslokation des reifen α/β -Toxins K28 sowie dessen α -Untereinheit nach intrazellulärer Expression. In vorherigen Studien wurde bereits die Ausbildung eines Selbstkillerphänotyps nach Expression von K28 α im ER postuliert. Durch Verwendung eines verkürzten *GAL1*-Promotors (*GALS*) gelang es im Rahmen dieser Arbeit den toxischen Effekt zu reduzieren und somit das Testsystem zu optimieren. Der resultierende Phänotyp nach K28 α -Expression konnte analog zum reifen α/β -Toxin einem G1-Arrest zugeordnet werden; für beide Toxinformen konnte ein Einfluss auf die zelluläre ER-Stressantwort (UPR) ausgeschlossen werden.

Im Rahmen dieser Studie zeigten sowohl klassische ERAD-Komponenten zur Erkennung der Fehlfaltung (*HTM1*, *YOS9*, *HRD3*) als auch der Dislokation (*DER1*), Ubiquitinierung (*DOA10*, *HRD1*, *UBC7*) und Degradation (*RPT3*, *RPT5*, *BLM10*) nach Deletion bzw. „knock-down“ einen hypersensitiven Phänotyp gegen K28 α . Ein Verlust von Ubp6p, das die Substrat-Selektion am Proteasom steuert, führte hingegen zu einem starken Sensitivitätsverlust, der eine Beteiligung am Abbau der α -Untereinheit impliziert. Eine Ausnahme bildete Der1p, dessen Überexpression im Unterschied zur Ubiquitinligase Hrd1p in einer gesteigerten Sensitivität gegenüber K28 α resultierte. Da Der1p und Hrd1p als potentielle Untereinheiten eines Export-Kanals im ER diskutiert werden, könnte Der1p möglicherweise am Transport von K28 α über die ER-Membran beteiligt sein. Im Vergleich dazu, zeigten Mutationen der meisten Komponenten des ERAD-L-Weges keinen Einfluss auf die Sensitivität gegen das reife Toxin. Eine Ausnahme bildeten Hrd1p und Rpt5p, die nach Überexpression (Hrd1p) bzw. Deletion (Rpt5p) die Toxizität von K28 deutlich reduzierten.

Durch Untersuchung der in der Retrotranslokation gestörten Hsp70-Mutanten *kar2-1* und *kar2-133*, konnte erstmals die Bedeutung von Kar2p/BiP im Zuge der Dislokation beider Toxinvarianten gezeigt werden. Darüber hinaus konnte die Isomerase-Aktivität der katalytischen Untereinheiten der Protein-Disulfidisomerase Pdi1p explizit der Retrotranslokation des reifen α/β -Toxins zugeordnet werden.

Ein „knock-down“ des potentiellen ER-Exportkanals Sec61p führte bei Erhalt der Proteinsekretionsaktivität zu einer stark verminderten Sensitivität gegen das von außen applizierte K28-Dimer. Auch die in der Retrotranslokation defekten Mutanten *sec61-R3* sowie *sec61-R4* zeigten im MBA-Test eine deutlich eingeschränkte Toxinsensitivität. Eine direkte Interaktion von K28 mit Sec61p konnte jedoch weder durch Co-Immunpräzipitation noch mit Hilfe des „Split-Ubiquitin-Systems“ nachgewiesen werden. Da auch nach Expression von K28 α in den Import-profizienten Mutanten *sec61-R1* und *sec61-R2* eine deutliche Abnahme der *in vivo* Toxizität beobachtet wurde, kann angenommen werden, dass Sec61p an der Dislokation beider Toxin-Formen beteiligt ist.

Die Wirkung von K28 α konnte zusätzlich mit der Hrd1p-unabhängigen Proteolyse (HiP) in Verbindung gebracht werden. Demnach scheint K28 α Rezeptoren, Adaptoren und SNARE-Proteine des diesbezüglichen COPII-Vesikeltransports zu nutzen, so dass „knock-out“ bzw. „knock-down“ Mutanten in den betreffenden Genen eine deutlich erhöhte Sensitivität zeigten. Eine vergleichbare Hypersensitivität wurde in Mutanten beobachtet mit Defekten im COPI-vermittelten Rücktransport zum ER bzw. in der Protein-Ubiquitinierung.

Für beide Toxinformen (α ; α/β) konnte gezeigt werden, dass während des retrograden Transports auch ein Teil der Toxinmoleküle vom Golgi-Apparat sowohl auf direktem Wege als auch über das prävakuoläre Kompartiment (PVC) zur Vakuole transportiert wird. Demzufolge bewirken Mutationen in Genen des vakuolären Proteintransports sowie Defekte in der vakuolären V-ATPase eine deutliche Hypersensitivität gegen K28.

Auch die selektive Autophagozytose verantwortet den Abbau einiger K28 α -Moleküle. Die dazu benötigten Untereinheiten *ATG8* und *ATG19* sind eventuell an der Degradation, jedoch nicht der Dislokation von K28 α beteiligt.

Im Unterschied zum α/β heterodimeren Toxin stand die Wirkung von K28 α auch mit der Bildung von „lipid droplets“ in Zusammenhang, da ein Verlust dieser Speicher- und Regulationskompartimente in den Mutanten $\Delta Iro1\Delta dga1$ und $\Delta Iro1\Delta dga1\Delta are2$ zu einer erheblich eingeschränkten Sensitivität führte.

Im Vergleich zur Hefe, konnte eine toxische Wirkung von K28 auf HeLa-Zellen unabhängig vom Eintritt der α -Untereinheit in den sekretorischen Weg beobachtet werden. Ebenfalls divergent verliefen die Induktion der Apoptose nach intrazellulärer α -Expression sowie die Abhängigkeit der Toxinwirkung von internen Lysinresten. Ein kompletter Lys/Arg-Austausch in K28 α hatte eine deutliche Reduktion der Toxizität in Säugerzellen zur Folge, was darauf hindeutet, dass die Ubiquitinierung der α -Untereinheit möglicherweise die treibende Kraft für die Dislokation in das Zytosol darstellt.

7 Literatur

- Abujarour, R. J., Dalal, S., Hanson, P. I. und Draper, R. K. *p97 Is in a complex with cholera toxin and influences the transport of cholera toxin and related toxins to the cytoplasm.* *J Biol Chem* (2005) 280, 15865-15871.
- Afshar, N., Black, B. E. und Paschal, B. M. *Retrotranslocation of the chaperone calreticulin from the endoplasmic reticulum lumen to the cytosol.* *Mol Cell Biol* (2005) 25, 8844-8853.
- Allen, A., Islamovic, E., Kaur, J., Gold, S., Shah, D. und Smith, T. J. *Transgenic maize plants expressing the Totivirus antifungal protein, KP4, are highly resistant to corn smut.* *Plant Biotechnol J* (2011) 9, 857-864.
- Anand, V. C., Daboussi, L., Lorenz, T. C. und Payne, G. S. *Genome-wide analysis of AP-3-dependent protein transport in yeast.* *Mol Biol Cell* (2009) 20, 1592-1604.
- Andag, U., Neumann, T. und Schmitt, H. D. *The coatomer-interacting protein Dsl1p is required for Golgi-to-endoplasmic reticulum retrieval in yeast.* *J Biol Chem* (2001) 276, 39150-39160.
- Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P. und Chabre, M. *N-terminal hydrophobic residues of the G-protein ADP-ribosylation factor-1 insert into membrane phospholipids upon GDP to GTP exchange.* *Biochemistry* (1997) 36, 4675-4684.
- Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L. und Schekman, R. *Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues.* *Nat Cell Biol* (2001) 3, 531-537.
- Argent, R. H., Roberts, L. M., Wales, R., Robertus, J. D. und Lord, J. M. *Introduction of a disulfide bond into ricin A chain decreases the cytotoxicity of the ricin holotoxin.* *J Biol Chem* (1994) 269, 26705-26710.
- Audi, J., Belson, M., Patel, M., Schier, J. und Osterloh, J. *Ricin poisoning: a comprehensive review.* *Jama* (2005) 294, 2342-2351.
- Baba, M., Osumi, M., Scott, S. V., Klionsky, D. J. und Ohsumi, Y. *Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome.* *J Cell Biol* (1997) 139, 1687-1695.
- Bagola, K., Mehnert, M., Jarosch, E. und Sommer, T. *Protein dislocation from the ER.* *Biochim Biophys Acta* (2011) 1808, 925-936.
- Baker, D., Wuestehube, L., Schekman, R., Botstein, D. und Segev, N. *GTP-binding Ypt1 protein and Ca²⁺ function independently in a cell-free protein transport reaction.* *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990) 87, 355-359.
- Barlowe, C., d'Enfert, C. und Schekman, R. *Purification and characterization of SAR1p, a small GTP-binding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum.* *J Biol Chem* (1993) 268, 873-879.
- Barlowe, C. K. und Miller, E. A. *Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway.* *Genetics* (2013) 193, 383-410.
- Behnia, R., Barr, F. A., Flanagan, J. J., Barlowe, C. und Munro, S. *The yeast orthologue of GRASP65 forms a complex with a coiled-coil protein that contributes to ER to Golgi traffic.* *J Cell Biol* (2007) 176, 255-261.
- Belden, W. J. und Barlowe, C. *Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport.* *J Biol Chem* (1996) 271, 26939-26946.
- Belden, W. J. und Barlowe, C. *Distinct roles for the cytoplasmic tail sequences of Emp24p and Erv25p in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi complex.* *J Biol Chem* (2001a) 276, 43040-43048.
- Belden, W. J. und Barlowe, C. *Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ER-derived transport vesicles.* *Science* (2001b) 294, 1528-1531.
- Belgareh-Touze, N., Leon, S., Erpapazoglou, Z., Stawiecka-Mirota, M., Urban-Grimal, D. und Haguener-Tsapis, R. *Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking.* *Biochem Soc Trans* (2008) 36, 791-796.
- Bellisola, G., Fracasso, G., Ippoliti, R., Menestrina, G., Rosen, A., Solda, S., Udali, S., Tomazzolli, R., Tridente, G. und Colombatti, M. *Reductive activation of ricin and ricin A-chain immunotoxins by protein disulfide isomerase and thioredoxin reductase.* *Biochem Pharmacol* (2004) 67, 1721-1731.
- Bernales, S., McDonald, K. L. und Walter, P. *Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response.* *PLoS Biol* (2006) 4, e423.

- Bernardi, K. M., Williams, J. M., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E. J., Ye, Y. und Tsai, B. *The E3 ubiquitin ligases Hrd1 and gp78 bind to and promote cholera toxin retrotranslocation.* *Mol Biol Cell* (2010) 21, 140-151.
- Bevan, E. A. und Makower, M. *The physiological basis of the killer character in yeast.* *Proc XIth Int Congr Genet* (1963), 202-203.
- Bi, X., Mancias, J. D. und Goldberg, J. *Insights into COPII coat nucleation from the structure of Sec23.Sar1 complexed with the active fragment of Sec31.* *Dev Cell* (2007) 13, 635-645.
- Biederer, T., Volkwein, C. und Sommer, T. *Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway.* *Embo J* (1996) 15, 2069-2076.
- Binns, D., Januszewski, T., Chen, Y., Hill, J., Markin, V. S., Zhao, Y., Gilpin, C., Chapman, K. D., Anderson, R. G. und Goodman, J. M. *An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies.* *J Cell Biol* (2006) 173, 719-731.
- Birnboim, H. C. *A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA.* *Methods Enzymol* (1983) 100, 243-255.
- Bloom, J., Amador, V., Bartolini, F., DeMartino, G. und Pagano, M. *Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation.* *Cell* (2003) 115, 71-82.
- Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C. und Huber, R. *The proteasome.* *Annu Rev Biophys Biomol Struct* (1999) 28, 295-317.
- Bonangelino, C. J., Chavez, E. M. und Bonifacino, J. S. *Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in Saccharomyces cerevisiae.* *Mol Biol Cell* (2002) 13, 2486-2501.
- Bonifacino, J. S. und Glick, B. S. *The mechanisms of vesicle budding and fusion.* *Cell* (2004) 116, 153-166.
- Boone, C., Sdicu, A.-M., Wagner, J., Degré, R., Sanchez, H. und Bussey, H. *Integration of the Yeast K1 Killer Toxin Gene into the Genome of Marked Wine Yeasts and Its Effect on Vinification.* *Am. J. Enol. Vitic* (1990) 41, 37-42.
- Braun, S., Matuschewski, K., Rape, M., Thoms, S. und Jentsch, S. *Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates.* *Embo J* (2002) 21, 615-621.
- Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admon, A. und Ciechanover, A. *A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein.* *Embo J* (1998) 17, 5964-5973.
- Brocard, C. und Hartig, A. *Peroxisome targeting signal 1: is it really a simple tripeptide?* *Biochim Biophys Acta* (2006) 1763, 1565-1573.
- Brodsky, J. L. *Post-translational protein translocation: not all hsc70s are created equal.* *Trends Biochem Sci* (1996) 21, 122-126.
- Brodsky, J. L. und McCracken, A. A. *ER-associated and proteasome-mediated protein degradation: how two topologically restricted events came together.* *Trends Cell Biol* (1997) 7, 151-156.
- Brodsky, J. L. und McCracken, A. A. *ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation.* *Semin Cell Dev Biol* (1999) 10, 507-513.
- Brodsky, J. L., Werner, E. D., Dubas, M. E., Goeckeler, J. L., Kruse, K. B. und McCracken, A. A. *The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct.* *J Biol Chem* (1999) 274, 3453-3460.
- Bryant, N. J. und Stevens, T. H. *Vacuole biogenesis in Saccharomyces cerevisiae: protein transport pathways to the yeast vacuole.* *Microbiol Mol Biol Rev* (1998) 62, 230-247.
- Burd, C. G., Peterson, M., Cowles, C. R. und Emr, S. D. *A novel Sec18p/NSF-dependent complex required for Golgi-to-endosome transport in yeast.* *Mol Biol Cell* (1997) 8, 1089-1104.
- Bussey, H. und Skipper, N. *Membrane-mediated killing of Saccharomyces cerevisiae by glycoproteins from Torulopsis glabrata.* *J Bacteriol* (1975) 124, 476-483.
- Butler, A. R., White, J. H. und Stark, M. J. *Analysis of the response of Saccharomyces cerevisiae cells to Kluyveromyces lactis toxin.* *J Gen Microbiol* (1991) 137, 1749-1757.
- Buttner, S., Eisenberg, T., Herker, E., Carmona-Gutierrez, D., Kroemer, G. und Madeo, F. *Why yeast cells can undergo apoptosis: death in times of peace, love, and war.* *J Cell Biol* (2006) 175, 521-525.
- Cadwell, K. und Coscoy, L. *Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase.* *Science* (2005) 309, 127-130.

- Cai, H., Yu, S., Menon, S., Cai, Y., Lazarova, D., Fu, C., Reinisch, K., Hay, J. C. und Ferro-Novick, S. *TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23*. *Nature* (2007) 445, 941-944.
- Caldwell, S. R., Hill, K. J. und Cooper, A. A. *Degradation of endoplasmic reticulum (ER) quality control substrates requires transport between the ER and Golgi*. *J Biol Chem* (2001) 276, 23296-23303.
- Calvin, N. M. und Hanawalt, P. C. *High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation*. *J Bacteriol* (1988) 170, 2796-2801.
- Cao, X. und Barlowe, C. *Asymmetric requirements for a Rab GTPase and SNARE proteins in fusion of COPII vesicles with acceptor membranes*. *J Cell Biol* (2000) 149, 55-66.
- Capitani, M. und Sallese, M. *The KDEL receptor: new functions for an old protein*. *FEBS Lett* (2009) 583, 3863-3871.
- Carman, G. M. und Henry, S. A. *Phospholipid biosynthesis in yeast*. *Annu Rev Biochem* (1989) 58, 635-669.
- Carman, G. M. und Henry, S. A. *Phospholipid biosynthesis in the yeast Saccharomyces cerevisiae and interrelationship with other metabolic processes*. *Prog Lipid Res* (1999) 38, 361-399.
- Carvalho, P., Stanley, A. M. und Rapoport, T. A. *Retrotranslocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p*. *Cell* (2010) 143, 579-591.
- Cebollero, E., Reggiori, F. und Kraft, C. *Reticulophagy and ribophagy: regulated degradation of protein production factories*. *Int J Cell Biol* (2012) 2012, 182834.
- Chang, H. J., Jesch, S. A., Gaspar, M. L. und Henry, S. A. *Role of the unfolded protein response pathway in secretory stress and regulation of INO1 expression in Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* (2004) 168, 1899-1913.
- Chen, B., Choi, G. H. und Nuss, D. L. *Attenuation of fungal virulence by synthetic infectious hypovirus transcripts*. *Science* (1994) 264, 1762-1764.
- Chen, X., Lee, B. H., Finley, D. und Walters, K. J. *Structure of proteasome ubiquitin receptor hRpn13 and its activation by the scaffolding protein hRpn2*. *Mol Cell* (2010) 38, 404-415.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem* (1987) 162, 156-159.
- Christianson, J. C., Shaler, T. A., Tyler, R. E. und Kopito, R. R. *OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD*. *Nat Cell Biol* (2008) 10, 272-282.
- Connerly, P. L., Esaki, M., Montegna, E. A., Strongin, D. E., Levi, S., Soderholm, J. und Glick, B. S. *Sec16 is a determinant of transitional ER organization*. *Curr Biol* (2005) 15, 1439-1447.
- Cosson, P., Demolliere, C., Hennecke, S., Duden, R. und Letourneur, F. *Delta- and zeta-COP, two coatomer subunits homologous to clathrin-associated proteins, are involved in ER retrieval*. *Embo J* (1996) 15, 1792-1798.
- Cowles, C. R., Odorizzi, G., Payne, G. S. und Emr, S. D. *The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole*. *Cell* (1997a) 91, 109-118.
- Cowles, C. R., Snyder, W. B., Burd, C. G. und Emr, S. D. *Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component*. *Embo J* (1997b) 16, 2769-2782.
- Cox, J. S. und Walter, P. *A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response*. *Cell* (1996) 87, 391-404.
- Craven, R. A., Egerton, M. und Stirling, C. J. *A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors*. *Embo J* (1996) 15, 2640-2650.
- Cronin, S. R., Khoury, A., Ferry, D. K. und Hampton, R. Y. *Regulation of HMG-CoA reductase degradation requires the P-type ATPase Cod1p/Spf1p*. *J Cell Biol* (2000) 148, 915-924.
- Czabany, T., Athenstaedt, K. und Daum, G. *Synthesis, storage and degradation of neutral lipids in yeast*. *Biochim Biophys Acta* (2007) 1771, 299-309.
- d'Enfert, C., Wuestehube, L. J., Lila, T. und Schekman, R. *Sec12p-dependent membrane binding of the small GTP-binding protein Sar1p promotes formation of transport vesicles from the ER*. *J Cell Biol* (1991) 114, 663-670.
- Dai, R. M. und Li, C. C. *Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation*. *Nat Cell Biol* (2001) 3, 740-744.

- Dange, T., Smith, D., Noy, T., Rommel, P. C., Jurzitza, L., Cordero, R. J., Legendre, A., Finley, D., Goldberg, A. L. und Schmidt, M. *Blm10 protein promotes proteasomal substrate turnover by an active gating mechanism. J Biol Chem* (2011) 286, 42830-42839.
- Darby, N. J. und Creighton, T. E. *Functional properties of the individual thioredoxin-like domains of protein disulfide isomerase. Biochemistry* (1995) 34, 11725-11735.
- Darsow, T., Katzmann, D. J., Cowles, C. R. und Emr, S. D. *Vps41p function in the alkaline phosphatase pathway requires homo-oligomerization and interaction with AP-3 through two distinct domains. Mol Biol Cell* (2001) 12, 37-51.
- de la Pena, P., Barros, F., Gascon, S., Lazo, P. S. und Ramos, S. *Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem* (1981) 256, 10420-10425.
- Dean, N. und Pelham, H. R. *Recycling of proteins from the Golgi compartment to the ER in yeast. J Cell Biol* (1990) 111, 369-377.
- Deeks, E. D., Cook, J. P., Day, P. J., Smith, D. C., Roberts, L. M. und Lord, J. M. *The low lysine content of ricin A chain reduces the risk of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. Biochemistry* (2002) 41, 3405-3413.
- Denic, V., Quan, E. M. und Weissman, J. S. *A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. Cell* (2006) 126, 349-359.
- Dixit, G., Mikoryak, C., Hayslett, T., Bhat, A. und Draper, R. K. *Cholera toxin up-regulates endoplasmic reticulum proteins that correlate with sensitivity to the toxin. Exp Biol Med (Maywood)* (2008) 233, 163-175.
- Dupre, S., Urban-Grimal, D. und Haguener-Tsapis, R. *Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. Biochim Biophys Acta* (2004) 1695, 89-111.
- Durr, G., Strayle, J., Plemper, R., Elbs, S., Klee, S. K., Catty, P., Wolf, D. H. und Rudolph, H. K. *The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca²⁺ and Mn²⁺ required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. Mol Biol Cell* (1998) 9, 1149-1162.
- Edman, J. C., Ellis, L., Blacher, R. W., Roth, R. A. und Rutter, W. J. *Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin. Nature* (1985) 317, 267-270.
- Eisfeld, K., Riffer, F., Mentges, J. und Schmitt, M. J. *Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. Mol Microbiol* (2000) 37, 926-940.
- Ellgaard, L., Molinari, M. und Helenius, A. *Setting the standards: quality control in the secretory pathway. Science* (1999) 286, 1882-1888.
- Elrod-Erickson, M. J. und Kaiser, C. A. *Genes that control the fidelity of endoplasmic reticulum to Golgi transport identified as suppressors of vesicle budding mutations. Mol Biol Cell* (1996) 7, 1043-1058.
- Endo, Y., Mitsui, K., Motizuki, M. und Tsurugi, K. *The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. J Biol Chem* (1987) 262, 5908-5912.
- Endo, Y. und Tsurugi, K. *RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. J Biol Chem* (1987) 262, 8128-8130.
- Enenkel, C., Lehmann, A. und Kloetzel, P. M. *Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. Embo J* (1998) 17, 6144-6154.
- Falguieres, T. und Johannes, L. *Shiga toxin B-subunit binds to the chaperone BiP and the nucleolar protein B23. Biol Cell* (2006) 98, 125-134.
- Falnes, P. O. und Sandvig, K. *Penetration of protein toxins into cells. Curr Opin Cell Biol* (2000) 12, 407-413.
- Feige, M. J. und Hendershot, L. M. *Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. Curr Opin Cell Biol* (2011) 23, 167-175.
- Feldheim, D., Rothblatt, J. und Schekman, R. *Topology and functional domains of Sec63p, an endoplasmic reticulum membrane protein required for secretory protein translocation. Mol Cell Biol* (1992) 12, 3288-3296.
- Fiebiger, E., Hirsch, C., Vyas, J. M., Gordon, E., Ploegh, H. L. und Tortorella, D. *Dissection of the dislocation pathway for type I membrane proteins with a new small molecule inhibitor, eeyarestatin. Mol Biol Cell* (2004) 15, 1635-1646.
- Finley, D. *Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. Annu Rev Biochem* (2009) 78, 477-513.
- Finley, D., Ulrich, H. D., Sommer, T. und Kaiser, P. *The ubiquitin-proteasome system of Saccharomyces cerevisiae. Genetics* (2012) 192, 319-360.

- Frankel, A. E., Kreitman, R. J. und Sausville, E. A. Targeted toxins. *Clin Cancer Res* (2000) 6, 326-334.
- Gabriely, G., Kama, R. und Gerst, J. E. Involvement of specific COPI subunits in protein sorting from the late endosome to the vacuole in yeast. *Mol Cell Biol* (2007) 27, 526-540.
- Galan, J. M. und Haguenaer-Tsapis, R. Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *Embo J* (1997) 16, 5847-5854.
- Garipey, J. The use of Shiga-like toxin 1 in cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* (2001) 39, 99-106.
- Garza, R. M., Sato, B. K. und Hampton, R. Y. In vitro analysis of Hrd1p-mediated retrotranslocation of its multispansing membrane substrate 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase. *J Biol Chem* (2009) 284, 14710-14722.
- Gaspar, M. L., Jesch, S. A., Viswanatha, R., Antosh, A. L., Brown, W. J., Kohlwein, S. D. und Henry, S. A. A block in endoplasmic reticulum-to-Golgi trafficking inhibits phospholipid synthesis and induces neutral lipid accumulation. *J Biol Chem* (2008) 283, 25735-25751.
- Gauss, R., Kanehara, K., Carvalho, P., Ng, D. T. und Aebi, M. A complex of Pdi1p and the mannosidase Htm1p initiates clearance of unfolded glycoproteins from the endoplasmic reticulum. *Mol Cell* (2011) 42, 782-793.
- Gießelmann, E. Analyse der in vivo Topologie des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p. (2007).
- Gießelmann, E. Endozytose und intrazellulärer Toxintransport in Hefe- und Säugerzellen mittels fluoreszenzmarkierter K28-Varianten. (2011).
- Gillece, P., Luz, J. M., Lennarz, W. J., de La Cruz, F. J. und Romisch, K. Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J Cell Biol* (1999) 147, 1443-1456.
- Gillingham, A. K., Tong, A. H., Boone, C. und Munro, S. The GTPase Arf1p and the ER to Golgi cargo receptor Erv14p cooperate to recruit the golgin Rud3p to the cis-Golgi. *J Cell Biol* (2004) 167, 281-292.
- Gitan, R. S. und Eide, D. J. Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast ZRT1 zinc transporter. *Biochem J* (2000) 346 Pt 2, 329-336.
- Goder, V. und Melero, A. Protein O-mannosyltransferases participate in ER protein quality control. *J Cell Sci* (2011) 124, 144-153.
- Goldberg, A. L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* (2003) 426, 895-899.
- Goto, M. Protein O-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions. *Biosci Biotechnol Biochem* (2007) 71, 1415-1427.
- Graham, L. A., Hill, K. J. und Stevens, T. H. Assembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase occurs in the endoplasmic reticulum and requires a Vma12p/Vma22p assembly complex. *J Cell Biol* (1998) 142, 39-49.
- Groll, M., Bochtler, M., Brandstetter, H., Clausen, T. und Huber, R. Molecular machines for protein degradation. *Chembiochem* (2005) 6, 222-256.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D. und Huber, R. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* (1997) 386, 463-471.
- Gunge, N., Tamaru, A., Ozawa, F. und Sakaguchi, K. Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *J Bacteriol* (1981) 145, 382-390.
- Guo, W., Sacher, M., Barrowman, J., Ferro-Novick, S. und Novick, P. Protein complexes in transport vesicle targeting. *Trends Cell Biol* (2000) 10, 251-255.
- Guterman, A. und Glickman, M. H. Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem* (2004) 279, 1729-1738.
- Hale, S. J., Lovell, S. C., de Keyzer, J. und Stirling, C. J. Interactions between Kar2p and its nucleotide exchange factors Sil1p and Lhs1p are mechanistically distinct. *J Biol Chem* (2010) 285, 21600-21606.
- Hale, T. L. und Formal, S. B. Cytotoxicity of *Shigella dysenteriae* 1 for cultured mammalian cells. *Am J Clin Nutr* (1980) 33, 2485-2490.
- Hamman, B. D., Hendershot, L. M. und Johnson, A. E. BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* (1998) 92, 747-758.
- Hampton, R. Y. ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol* (2002) 14, 476-482.
- Hampton, R. Y. und Sommer, T. Finding the will and the way of ERAD substrate retrotranslocation. *Curr Opin Cell Biol* (2012) 24, 460-466.

- Hanahan, D. *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J Mol Biol* (1983) 166, 557-580.
- Hanein, D., Matlack, K. E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K. U., Miller, K. R., Rapoport, T. A. und Akey, C. W. *Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. Cell* (1996) 87, 721-732.
- Hanna, J., Hathaway, N. A., Tone, Y., Crosas, B., Elsasser, S., Kirkpatrick, D. S., Leggett, D. S., Gygi, S. P., King, R. W. und Finley, D. *Deubiquitinating enzyme Ubp6 functions noncatalytically to delay proteasomal degradation. Cell* (2006) 127, 99-111.
- Harding, H. P., Zhang, Y. und Ron, D. *Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. Nature* (1999) 397, 271-274.
- Hardwick, K. G., Lewis, M. J., Semenza, J., Dean, N. und Pelham, H. R. *ERD1, a yeast gene required for the retention of luminal endoplasmic reticulum proteins, affects glycoprotein processing in the Golgi apparatus. Embo J* (1990) 9, 623-630.
- Harris, S. L. und Waters, M. G. *Localization of a yeast early Golgi mannosyltransferase, Och1p, involves retrograde transport. J Cell Biol* (1996) 132, 985-998.
- Harsay, E. und Bretscher, A. *Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. J Cell Biol* (1995) 131, 297-310.
- Hartl, F. U. *Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature* (1996) 381, 571-579.
- Harty, C. und Romisch, K. *Analysis of Sec61p and Ssh1p interactions in the ER membrane using the split-ubiquitin system. BMC Cell Biol* (2013) 14, 14.
- Harty, C., Strahl, S. und Romisch, K. *O-mannosylation protects mutant alpha-factor precursor from endoplasmic reticulum-associated degradation. Mol Biol Cell* (2001) 12, 1093-1101.
- Hausman, S. Z. und Burns, D. L. *Interaction of pertussis toxin with cells and model membranes. J Biol Chem* (1992) 267, 13735-13739.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T. und Yamamoto, A. *A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. Nat Cell Biol* (2009) 11, 1433-1437.
- Hayes, S. A. und Dice, J. F. *Roles of molecular chaperones in protein degradation. J Cell Biol* (1996) 132, 255-258.
- Hayman, G. T. und Bolen, P. L. *Linear DNA plasmids of Pichia inositovora are associated with a novel killer toxin activity. Curr Genet* (1991) 19, 389-393.
- Haynes, C. M., Caldwell, S. und Cooper, A. A. *An HRD/DER-independent ER quality control mechanism involves Rsp5p-dependent ubiquitination and ER-Golgi transport. J Cell Biol* (2002) 158, 91-101.
- Hazes, B. und Read, R. J. *Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. Biochemistry* (1997) 36, 11051-11054.
- He, J., Kulkarni, K., da Fonseca, P. C., Krutauz, D., Glickman, M. H., Barford, D. und Morris, E. P. *The structure of the 26S proteasome subunit Rpn2 reveals its PC repeat domain as a closed toroid of two concentric alpha-helical rings. Structure* (2012) 20, 513-521.
- Heck, J. W., Cheung, S. K. und Hampton, R. Y. *Cytoplasmic protein quality control degradation mediated by parallel actions of the E3 ubiquitin ligases Ubr1 and San1. Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107, 1106-1111.
- Heese-Peck, A., Pichler, H., Zanolari, B., Watanabe, R., Daum, G. und Riezman, H. *Multiple functions of sterols in yeast endocytosis. Mol Biol Cell* (2002) 13, 2664-2680.
- Heiligenstein, S. *Endozytose, Retrotranslokation und Ubiquitinierung des viralen K28-Toxins der Hefe Saccharomyces cerevisiae. (2008).*
- Heiligenstein, S., Eisfeld, K., Sendzik, T., Jimenez-Becker, N., Breinig, F. und Schmitt, M. J. *Retrotranslocation of a viral A/B toxin from the yeast endoplasmic reticulum is independent of ubiquitination and ERAD. Embo J* (2006) 25, 4717-4727.
- Helenius, A. und Aebi, M. *Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. Annu Rev Biochem* (2004) 73, 1019-1049.
- Hendershot, L. M. *The ER function BiP is a master regulator of ER function. Mt Sinai J Med* (2004) 71, 289-297.
- Henderson, M. J., Richie, C. T., Airavaara, M., Wang, Y. und Harvey, B. K. *Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) secretion and cell surface binding are modulated by KDEL receptors. J Biol Chem* (2012) 288, 4209-4225.

- Hennessey, F., Nicoll, W. S., Zimmermann, R., Cheetham, M. E. und Blatch, G. L. *Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions.* *Protein Sci* (2005) 14, 1697-1709.
- Henry, S. A., Kohlwein, S. D. und Carman, G. M. *Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.* *Genetics* (2012) 190, 317-349.
- Herzig, Y., Sharpe, H. J., Elbaz, Y., Munro, S. und Schuldiner, M. *A systematic approach to pair secretory cargo receptors with their cargo suggests a mechanism for cargo selection by *Erv14*.* *PLoS Biol* (2012) 10, e1001329.
- Hicke, L. und Riezman, H. *Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis.* *Cell* (1996) 84, 277-287.
- Hill, K. und Cooper, A. A. *Degradation of unassembled *Vph1p* reveals novel aspects of the yeast ER quality control system.* *Embo J* (2000) 19, 550-561.
- Hirayama, H., Fujita, M., Yoko-o, T. und Jigami, Y. *O-mannosylation is required for degradation of the endoplasmic reticulum-associated degradation substrate *Gas1**p via the ubiquitin/proteasome pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.* *J Biochem* (2008) 143, 555-567.
- Hitt, R. und Wolf, D. H. **Der1p*, a protein required for degradation of malformed soluble proteins of the endoplasmic reticulum: topology and *Der1*-like proteins.* *FEMS Yeast Res* (2004) 4, 721-729.
- Hodgson, V. J., Walker, G. M. und Button, D. *A rapid colorimetric assay of killer toxin activity in yeast.* *FEMS Microbiol Lett* (1994) 120, 201-205.
- Hoffmann, T. *Untersuchungen zur Lokalisation und Wirkung des viralen K28a-Toxins in Hefezellen.* (2013).
- Höhfeld, J., Cyr, D. M. und Patterson, C. *From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation.* *EMBO Rep* (2001) 2, 885-890.
- Holst, B., Tachibana, C. und Winther, J. R. *Active site mutations in yeast protein disulfide isomerase cause dithiothreitol sensitivity and a reduced rate of protein folding in the endoplasmic reticulum.* *J Cell Biol* (1997) 138, 1229-1238.
- Hong, E., Davidson, A. R. und Kaiser, C. A. *A pathway for targeting soluble misfolded proteins to the yeast vacuole.* *J Cell Biol* (1996) 135, 623-633.
- Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H. D. und Jentsch, S. *Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing.* *Cell* (2000) 102, 577-586.
- Horn, S. C., Hanna, J., Hirsch, C., Volkwein, C., Schutz, A., Heinemann, U., Sommer, T. und Jarosch, E. **Usa1* functions as a scaffold of the HRD-ubiquitin ligase.* *Mol Cell* (2009) 36, 782-793.
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. und Pease, L. R. *Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension.* *Gene* (1989) 77, 61-68.
- Hughes, J. N., Lindsay, C. D. und Griffiths, G. D. *Morphology of ricin and abrin exposed endothelial cells is consistent with apoptotic cell death.* *Hum Exp Toxicol* (1996) 15, 443-451.
- Hulsmeier, A. J., Welti, M. und Hennet, T. *Glycoprotein maturation and the UPR.* *Methods Enzymol* (2011) 491, 163-182.
- Huyer, G., Piluek, W. F., Fansler, Z., Kreft, S. G., Hochstrasser, M., Brodsky, J. L. und Michaelis, S. *Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispansing membrane protein and a soluble luminal protein.* *J Biol Chem* (2004) 279, 38369-38378.
- Hwang, C., Sinskey, A. J. und Lodish, H. F. *Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum.* *Science* (1992) 257, 1496-1502.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T. und Ohsumi, Y. *A ubiquitin-like system mediates protein lipidation.* *Nature* (2000) 408, 488-492.
- Ishida, B., Cawley, D. B., Reue, K. und Wisniewski, B. J. *Lipid-protein interactions during ricin toxin insertion into membranes. Evidence for A and B chain penetration.* *J Biol Chem* (1983) 258, 5933-5937.
- Ishitoya, S., Kurazono, H., Nishiyama, H., Nakamura, E., Kamoto, T., Habuchi, T., Terai, A., Ogawa, O. und Yamamoto, S. *Verotoxin induces rapid elimination of human renal tumor xenografts in SCID mice.* *J Urol* (2004) 171, 1309-1313.

- Ivanovska, I. und Hardwick, J. M. *Viruses activate a genetically conserved cell death pathway in a unicellular organism. J Cell Biol (2005) 170, 391-399.*
- Jakob, C. A., Bodmer, D., Spirig, U., Battig, P., Marcil, A., Dignard, D., Bergeron, J. J., Thomas, D. Y. und Aebi, M. *Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. EMBO Rep (2001) 2, 423-430.*
- Jakob, C. A., Burda, P., Roth, J. und Aebi, M. *Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in Saccharomyces cerevisiae is determined by a specific oligosaccharide structure. J Cell Biol (1998) 142, 1223-1233.*
- Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D. H. und Sommer, T. *Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. Nat Cell Biol (2002) 4, 134-139.*
- Jetzt, A. E., Cheng, J. S., Li, X. P., Tumer, N. E. und Cohick, W. S. *A relatively low level of ribosome depurination by mutant forms of ricin toxin A chain can trigger protein synthesis inhibition, cell signaling and apoptosis in mammalian cells. Int J Biochem Cell Biol (2012) 44, 2204-2211.*
- Jin, M., Liu, X. und Klionsky, D. J. *SnapShot: Selective autophagy. Cell (2013) 152, 368-368 e362.*
- Johannes, L. und Decaudin, D. *Protein toxins: intracellular trafficking for targeted therapy. Gene Ther (2005) 12, 1360-1368.*
- Johannes, L. und Popoff, V. *Tracing the retrograde route in protein trafficking. Cell (2008) 135, 1175-1187.*
- Johannes, L. und Romer, W. *Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. Nat Rev Microbiol (2010) 8, 105-116.*
- Johnson, A. E. und van Waes, M. A. *The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. Annu Rev Cell Dev Biol (1999) 15, 799-842.*
- Johnsson, N. und Varshavsky, A. *Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A (1994) 91, 10340-10344.*
- Johnston, M. und Davis, R. W. *Sequences that regulate the divergent GAL1-GAL10 promoter in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol (1984) 4, 1440-1448.*
- Jonikas, M. C., Collins, S. R., Denic, V., Oh, E., Quan, E. M., Schmid, V., Weibezahn, J., Schwappach, B., Walter, P., Weissman, J. S. und Schuldiner, M. *Comprehensive characterization of genes required for protein folding in the endoplasmic reticulum. Science (2009) 323, 1693-1697.*
- Kabani, M., Kelley, S. S., Morrow, M. W., Montgomery, D. L., Sivendran, R., Rose, M. D., Gierasch, L. M. und Brodsky, J. L. *Dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation on the peptide binding domain and concentration of BiP. Mol Biol Cell (2003) 14, 3437-3448.*
- Kalies, K. U., Allan, S., Sergeyenko, T., Kroger, H. und Romisch, K. *The protein translocation channel binds proteasomes to the endoplasmic reticulum membrane. Embo J (2005) 24, 2284-2293.*
- Kalies, K. U., Rapoport, T. A. und Hartmann, E. *The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. J Cell Biol (1998) 141, 887-894.*
- Kaliszewski, P. und Zoladek, T. *The role of Rsp5 ubiquitin ligase in regulation of diverse processes in yeast cells. Acta Biochim Pol (2008) 55, 649-662.*
- Kamena, F. und Spang, A. *Tip20p prohibits back-fusion of COPII vesicles with the endoplasmic reticulum. Science (2004) 304, 286-289.*
- Kamhi-Nesher, S., Shenkman, M., Tolchinsky, S., Fromm, S. V., Ehrlich, R. und Lederkremer, G. Z. *A novel quality control compartment derived from the endoplasmic reticulum. Mol Biol Cell (2001) 12, 1711-1723.*
- Kanekal, S., Sahai, A., Jones, R. E. und Brown, D. *Storage-phosphor autoradiography: a rapid and highly sensitive method for spatial imaging and quantitation of radioisotopes. J Pharmacol Toxicol Methods (1995) 33, 171-178.*
- Kario, E., Amar, N., Elazar, Z. und Navon, A. *A new autophagy-related checkpoint in the degradation of an ERAD-M target. J Biol Chem (2011) 286, 11479-11491.*
- Katada, T., Tamura, M. und Ui, M. *The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein. Arch Biochem Biophys (1983) 224, 290-298.*
- Kato, M. und Wickner, W. *Ergosterol is required for the Sec18/ATP-dependent priming step of homotypic vacuole fusion. Embo J (2001) 20, 4035-4040.*

- Kawasaki-Nishi, S., Bowers, K., Nishi, T., Forgac, M. und Stevens, T. H. *The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and in vivo dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis.* *J Biol Chem* (2001) 276, 47411-47420.
- Kelkel, M. *Untersuchungen zum zellulären Mechanismus der ER/Cytosol-Retrotranslokation einer cytotoxischen α -Variante des viralen A/B-Toxins K28 der Hefe.* (2009).
- Kim, I., Ahn, J., Liu, C., Tanabe, K., Apodaca, J., Suzuki, T. und Rao, H. *The Png1-Rad23 complex regulates glycoprotein turnover.* *J Cell Biol* (2006) 172, 211-219.
- Kim, J., Scott, S. V., Oda, M. N. und Klionsky, D. J. *Transport of a large oligomeric protein by the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway.* *J Cell Biol* (1997) 137, 609-618.
- Kim, J. H., Zhao, Y., Pan, X., He, X. und Gilbert, H. F. *The unfolded protein response is necessary but not sufficient to compensate for defects in disulfide isomerization.* *J Biol Chem* (2009) 284, 10400-10408.
- Kimata, Y., Ishiwata-Kimata, Y., Ito, T., Hirata, A., Suzuki, T., Oikawa, D., Takeuchi, M. und Kohno, K. *Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins.* *J Cell Biol* (2007) 179, 75-86.
- Kimura, T., Hosoda, Y., Sato, Y., Kitamura, Y., Ikeda, T., Horibe, T. und Kikuchi, M. *Interactions among yeast protein-disulfide isomerase proteins and endoplasmic reticulum chaperone proteins influence their activities.* *J Biol Chem* (2005) 280, 31438-31441.
- Kiser, G. L., Gentsch, M., Kloser, A. K., Balzi, E., Wolf, D. H., Goffeau, A. und Riordan, J. R. *Expression and degradation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in Saccharomyces cerevisiae.* *Arch Biochem Biophys* (2001) 390, 195-205.
- Klappa, P., Hawkins, H. C. und Freedman, R. B. *Interactions between protein disulphide isomerase and peptides.* *Eur J Biochem* (1997) 248, 37-42.
- Klassen, R., Paluszynski, J. P., Wemhoff, S., Pfeiffer, A., Fricke, J. und Meinhardt, F. *The primary target of the killer toxin from Pichia acaciae is tRNA(Gln).* *Mol Microbiol* (2008) 69, 681-697.
- Klein, S. *Untersuchungen zur Wirkung und endozytotischen Aufnahme von K28 an Säugerzellen.* (2009).
- Koch, C., Wollmann, P., Dahl, M. und Lottspeich, F. *A role for Ctr9p and Paf1p in the regulation G1 cyclin expression in yeast.* *Nucleic Acids Res* (1999) 27, 2126-2134.
- Koivunen, P., Pirneskoski, A., Karvonen, P., Ljung, J., Helaakoski, T., Notbohm, H. und Kivirikko, K. I. *The acidic C-terminal domain of protein disulfide isomerase is not critical for the enzyme subunit function or for the chaperone or disulfide isomerase activities of the polypeptide.* *Embo J* (1999) 18, 65-74.
- Koltin, Y. und Day, P. R. *Specificity of Ustilago maydis killer proteins.* *Appl Microbiol* (1975) 30, 694-696.
- Kruse, K. B., Dear, A., Kaltenbrun, E. R., Crum, B. E., George, P. M., Brennan, S. O. und McCracken, A. A. *Mutant fibrinogen cleared from the endoplasmic reticulum via endoplasmic reticulum-associated protein degradation and autophagy: an explanation for liver disease.* *Am J Pathol* (2006) 168, 1299-1308; quiz 1404-1295.
- Kung, L. F., Pagant, S., Futai, E., D'Arcangelo, J. G., Buchanan, R., Dittmar, J. C., Reid, R. J., Rothstein, R., Hamamoto, S., Snapp, E. L., Schekman, R. und Miller, E. A. *Sec24p and Sec16p cooperate to regulate the GTP cycle of the COPII coat.* *Embo J* (2012) 31, 1014-1027.
- Kusmierczyk, A. R. und Hochstrasser, M. *Some assembly required: dedicated chaperones in eukaryotic proteasome biogenesis.* *Biol Chem* (2008) 389, 1143-1151.
- Lajoie, P., Moir, R. D., Willis, I. M. und Snapp, E. L. *Kar2p availability defines distinct forms of endoplasmic reticulum stress in living cells.* *Mol Biol Cell* (2012) 23, 955-964.
- Lam, Y. A., Lawson, T. G., Velayutham, M., Zweier, J. L. und Pickart, C. M. *A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal.* *Nature* (2002) 416, 763-767.
- Lander, G. C., Estrin, E., Matyskiela, M. E., Bashore, C., Nogales, E. und Martin, A. *Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle.* *Nature* (2012) 482, 186-191.
- LaPointe, P., Wei, X. und Gariepy, J. *A role for the protease-sensitive loop region of Shiga-like toxin 1 in the retrotranslocation of its A1 domain from the endoplasmic reticulum lumen.* *J Biol Chem* (2005) 280, 23310-23318.
- Lebeche, D., Lucero, H. A. und Kaminer, B. *Calcium binding properties of rabbit liver protein disulfide isomerase.* *Biochem Biophys Res Commun* (1994) 202, 556-561.

- Leber, J. H., Bernales, S. und Walter, P. *IRE1-independent gain control of the unfolded protein response. PLoS Biol* (2004) 2, E235.
- Lee, M. C., Miller, E. A., Goldberg, J., Orci, L. und Schekman, R. *Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. Annu Rev Cell Dev Biol* (2004a) 20, 87-123.
- Lee, R. J., Liu, C. W., Harty, C., McCracken, A. A., Latterich, M., Romisch, K., DeMartino, G. N., Thomas, P. J. und Brodsky, J. L. *Uncoupling retro-translocation and degradation in the ER-associated degradation of a soluble protein. Embo J* (2004b) 23, 2206-2215.
- Leggett, D. S., Hanna, J., Borodovsky, A., Crosas, B., Schmidt, M., Baker, R. T., Walz, T., Ploegh, H. und Finley, D. *Multiple associated proteins regulate proteasome structure and function. Mol Cell* (2002) 10, 495-507.
- Lencer, W. I., Constable, C., Moe, S., Jobling, M. G., Webb, H. M., Ruston, S., Madara, J. L., Hirst, T. R. und Holmes, R. K. *Targeting of cholera toxin and Escherichia coli heat labile toxin in polarized epithelia: role of COOH-terminal KDEL. J Cell Biol* (1995) 131, 951-962.
- Lencer, W. I. und Saslowsky, D. *Raft trafficking of AB5 subunit bacterial toxins. Biochim Biophys Acta* (2005) 1746, 314-321.
- Lencer, W. I. und Tsai, B. *The intracellular voyage of cholera toxin: going retro. Trends Biochem Sci* (2003) 28, 639-645.
- Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Demolliere, C., Duden, R., Emr, S. D., Riezman, H. und Cosson, P. *Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. Cell* (1994) 79, 1199-1207.
- Lewis, M. J. und Pelham, H. R. *A human homologue of the yeast HDEL receptor. Nature* (1990) 348, 162-163.
- Lewis, M. J. und Pelham, H. R. *SNARE-mediated retrograde traffic from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. Cell* (1996) 85, 205-215.
- Li, S., Spooner, R. A., Allen, S. C., Guise, C. P., Ladds, G., Schnoder, T., Schmitt, M. J., Lord, J. M. und Roberts, L. M. *Folding-competent and folding-defective forms of ricin A chain have different fates after retrotranslocation from the endoplasmic reticulum. Mol Biol Cell* (2010) 21, 2543-2554.
- Li, S., Spooner, R. A., Hampton, R. Y., Lord, J. M. und Roberts, L. M. *Cytosolic entry of Shiga-like toxin a chain from the yeast endoplasmic reticulum requires catalytically active Hrd1p. PLoS One* (2012) 7, e41119.
- Li, X. P., Baricevic, M., Saidasan, H. und Tumer, N. E. *Ribosome depurination is not sufficient for ricin-mediated cell death in Saccharomyces cerevisiae. Infect Immun* (2007) 75, 417-428.
- Liao, S., Lin, J., Do, H. und Johnson, A. E. *Both luminal and cytosolic gating of the aqueous ER translocon pore are regulated from inside the ribosome during membrane protein integration. Cell* (1997) 90, 31-41.
- Lilley, B. N., Gilbert, J. M., Ploegh, H. L. und Benjamin, T. L. *Murine polyomavirus requires the endoplasmic reticulum protein Derlin-2 to initiate infection. J Virol* (2006) 80, 8739-8744.
- Lilley, B. N. und Ploegh, H. L. *A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. Nature* (2004) 429, 834-840.
- Lin, J. H., Walter, P. und Yen, T. S. *Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. Annu Rev Pathol* (2008) 3, 399-425.
- Lingwood, C. A. *Role of verotoxin receptors in pathogenesis. Trends Microbiol* (1996) 4, 147-153.
- Lipson, C., Alalouf, G., Bajorek, M., Rabinovich, E., Atir-Lande, A., Glickman, M. und Bar-Nun, S. *A proteasomal ATPase contributes to dislocation of endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) substrates. J Biol Chem* (2008) 283, 7166-7175.
- Loayza, D., Tam, A., Schmidt, W. K. und Michaelis, S. *Ste6p mutants defective in exit from the endoplasmic reticulum (ER) reveal aspects of an ER quality control pathway in Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell* (1998) 9, 2767-2784.
- Lord, J. M., Deeks, E., Marsden, C. J., Moore, K., Pateman, C., Smith, D. C., Spooner, R. A., Watson, P. und Roberts, L. M. *Retrograde transport of toxins across the endoplasmic reticulum membrane. Biochem Soc Trans* (2003) 31, 1260-1262.
- Lord, J. M., Roberts, L. M. und Robertus, J. D. *Ricin: structure, mode of action, and some current applications. Faseb J* (1994) 8, 201-208.
- Lowes, K. F., Shearman, C. A., Payne, J., MacKenzie, D., Archer, D. B., Merry, R. J. und Gasson, M. J. *Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. Appl Environ Microbiol* (2000) 66, 1066-1076.
- Lu, J., Huang, B., Esberg, A., Johansson, M. J. und Bystrom, A. S. *The Kluyveromyces lactis gamma-toxin targets tRNA anticodons. Rna* (2005) 11, 1648-1654.

- Lussier, M., Sdicu, A. M., Winnett, E., Vo, D. H., Sheraton, J., Dusterhoft, A., Storms, R. K. und Bussey, H. Completion of the *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence allows identification of KTR5, KTR6 and KTR7 and definition of the nine-membered KRE2/MNT1 mannosyltransferase gene family in this organism. *Yeast* (1997) 13, 267-274.
- Macer, D. R. und Koch, G. L. Identification of a set of calcium-binding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* (1988) 91 (Pt 1), 61-70.
- Magliani, W., Conti, S., Arseni, S., Frazzi, R., Salati, A. und Polonelli, L. Killer anti-idiotypes in the control of fungal infections. *Curr Opin Investig Drugs* (2001) 2, 477-479.
- Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D. und Polonelli, L. Yeast killer systems. *Clin Microbiol Rev* (1997) 10, 369-400.
- Majoul, I., Ferrari, D. und Soling, H. D. Reduction of protein disulfide bonds in an oxidizing environment. The disulfide bridge of cholera toxin A-subunit is reduced in the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* (1997) 401, 104-108.
- Malkus, P., Jiang, F. und Schekman, R. Concentrative sorting of secretory cargo proteins into COPII-coated vesicles. *J Cell Biol* (2002) 159, 915-921.
- Mallard, F., Antony, C., Tenza, D., Salamero, J., Goud, B. und Johannes, L. Direct pathway from early/recycling endosomes to the Golgi apparatus revealed through the study of shiga toxin B-fragment transport. *J Cell Biol* (1998) 143, 973-990.
- Mancias, J. D. und Goldberg, J. The transport signal on Sec22 for packaging into COPII-coated vesicles is a conformational epitope. *Mol Cell* (2007) 26, 403-414.
- Marcusson, E. G., Horazdovsky, B. F., Cereghino, J. L., Gharakhanian, E. und Emr, S. D. The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* (1994) 77, 579-586.
- Martin, S. und Parton, R. G. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2006) 7, 373-378.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M. und Green, D. R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* (1995) 182, 1545-1556.
- Matlack, K. E., Misselwitz, B., Plath, K. und Rapoport, T. A. BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* (1999) 97, 553-564.
- Matlack, K. E., Mothes, W. und Rapoport, T. A. Protein translocation: tunnel vision. *Cell* (1998) 92, 381-390.
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R. und Yeung, T. COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* (1998) 93, 263-275.
- Mayer, M. P. und Bukau, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* (2005) 62, 670-684.
- Mayer, T. U., Braun, T. und Jentsch, S. Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein. *Embo J* (1998) 17, 3251-3257.
- Mayerhofer, P. U., Cook, J. P., Wahlman, J., Pinheiro, T. T., Moore, K. A., Lord, J. M., Johnson, A. E. und Roberts, L. M. Ricin A chain insertion into endoplasmic reticulum membranes is triggered by a temperature increase to 37 {degrees}C. *J Biol Chem* (2009) 284, 10232-10242.
- Mazon, M. J., Eraso, P. und Portillo, F. Efficient degradation of misfolded mutant Pma1 by endoplasmic reticulum-associated degradation requires Atg19 and the Cvt/autophagy pathway. *Mol Microbiol* (2007) 63, 1069-1077.
- McCracken, A. A. und Brodsky, J. L. Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol* (1996) 132, 291-298.
- McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y. und Holbrook, N. J. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol* (2001) 21, 1249-1259.
- McNew, J. A. und Goodman, J. M. An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *J Cell Biol* (1994) 127, 1245-1257.
- Medicherla, B., Kostova, Z., Schaefer, A. und Wolf, D. H. A genomic screen identifies Dsk2p and Rad23p as essential components of ER-associated degradation. *EMBO Rep* (2004) 5, 692-697.
- Mehnert, M., Sommer, T. und Jarosch, E. Der1 promotes movement of misfolded proteins through the endoplasmic reticulum membrane. *Nat Cell Biol* (2013).

- Meinecke, M., Cizmowski, C., Schliebs, W., Kruger, V., Beck, S., Wagner, R. und Erdmann, R. *The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore.* *Nat Cell Biol* (2010) 12, 273-277.
- Mekalanos, J. J., Collier, R. J. und Romig, W. R. *Enzymic activity of cholera toxin. II. Relationships to proteolytic processing, disulfide bond reduction, and subunit composition.* *J Biol Chem* (1979) 254, 5855-5861.
- Menikh, A., Saleh, M. T., Garipey, J. und Boggs, J. M. *Orientation in lipid bilayers of a synthetic peptide representing the C-terminus of the A1 domain of shiga toxin. A polarized ATR-FTIR study.* *Biochemistry* (1997) 36, 15865-15872.
- Merksamer, P. I., Trusina, A. und Papa, F. R. *Real-time redox measurements during endoplasmic reticulum stress reveal interlinked protein folding functions.* *Cell* (2008) 135, 933-947.
- Miller, E., Antony, B., Hamamoto, S. und Schekman, R. *Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit.* *Embo J* (2002) 21, 6105-6113.
- Moreau, D., Kumar, P., Wang, S. C., Chaumet, A., Chew, S. Y., Chevalley, H. und Bard, F. *Genome-wide RNAi screens identify genes required for Ricin and PE intoxications.* *Dev Cell* (2011) 21, 231-244.
- Mori, K. *Signalling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals.* *J Biochem* (2009) 146, 743-750.
- Mossessova, E., Bickford, L. C. und Goldberg, J. *SNARE selectivity of the COPII coat.* *Cell* (2003) 114, 483-495.
- Mullner, H., Zweytick, D., Leber, R., Turnowsky, F. und Daum, G. *Targeting of proteins involved in sterol biosynthesis to lipid particles of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.* *Biochim Biophys Acta* (2004) 1663, 9-13.
- Mumberg, D., Muller, R. und Funk, M. *Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression.* *Nucleic Acids Res* (1994) 22, 5767-5768.
- Muniz, M., Nuoffer, C., Hauri, H. P. und Riezman, H. *The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles.* *J Cell Biol* (2000) 148, 925-930.
- Munro, S. und Pelham, H. R. *A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins.* *Cell* (1987) 48, 899-907.
- Nakamura, N., Hirata, A., Ohsumi, Y. und Wada, Y. *Vam2/Vps41p and Vam6/Vps39p are components of a protein complex on the vacuolar membranes and involved in the vacuolar assembly in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.* *J Biol Chem* (1997) 272, 11344-11349.
- Nakatsukasa, K., Okada, S., Umebayashi, K., Fukuda, R., Nishikawa, S. und Endo, T. *Roles of O-mannosylation of aberrant proteins in reduction of the load for endoplasmic reticulum chaperones in yeast.* *J Biol Chem* (2004) 279, 49762-49772.
- Ng, W., Sergeyenko, T., Zeng, N., Brown, J. D. und Romisch, K. *Characterization of the proteasome interaction with the Sec61 channel in the endoplasmic reticulum.* *J Cell Sci* (2007) 120, 682-691.
- Nishi, T. und Forgac, M. *The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps.* *Nat Rev Mol Cell Biol* (2002) 3, 94-103.
- Nishikawa, S. und Endo, T. *The yeast JEM1p is a DnaJ-like protein of the endoplasmic reticulum membrane required for nuclear fusion.* *J Biol Chem* (1997) 272, 12889-12892.
- Nishikawa, S., Hirata, A. und Nakano, A. *Inhibition of endoplasmic reticulum (ER)-to-Golgi transport induces relocalization of binding protein (BiP) within the ER to form the BiP bodies.* *Mol Biol Cell* (1994) 5, 1129-1143.
- Nishikawa, S. I., Fewell, S. W., Kato, Y., Brodsky, J. L. und Endo, T. *Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation.* *J Cell Biol* (2001) 153, 1061-1070.
- Noiva, R. *Protein disulfide isomerase: the multifunctional redox chaperone of the endoplasmic reticulum.* *Semin Cell Dev Biol* (1999) 10, 481-493.
- Norgaard, P., Westphal, V., Tachibana, C., Alsoe, L., Holst, B. und Winther, J. R. *Functional differences in yeast protein disulfide isomerases.* *J Cell Biol* (2001) 152, 553-562.
- Nothwehr, S. F., Conibear, E. und Stevens, T. H. *Golgi and vacuolar membrane proteins reach the vacuole in vps1 mutant yeast cells via the plasma membrane.* *J Cell Biol* (1995) 129, 35-46.

- Novotna, D., Flegelova, H. und Janderova, B. Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* (2004) 4, 803-813.
- O'Brien, A. D. und Holmes, R. K. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol Rev* (1987) 51, 206-220.
- Oda, Y., Hosokawa, N., Wada, I. und Nagata, K. EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science* (2003) 299, 1394-1397.
- Oda, Y., Okada, T., Yoshida, H., Kaufman, R. J., Nagata, K. und Mori, K. Derlin-2 and Derlin-3 are regulated by the mammalian unfolded protein response and are required for ER-associated degradation. *J Cell Biol* (2006) 172, 383-393.
- Oelkers, P., Cromley, D., Padamsee, M., Billheimer, J. T. und Sturley, S. L. The DGA1 gene determines a second triglyceride synthetic pathway in yeast. *J Biol Chem* (2002) 277, 8877-8881.
- Oelkers, P., Tinkelenberg, A., Erdeniz, N., Cromley, D., Billheimer, J. T. und Sturley, S. L. A lecithin cholesterol acyltransferase-like gene mediates diacylglycerol esterification in yeast. *J Biol Chem* (2000) 275, 15609-15612.
- Okamoto, M., Kurokawa, K., Matsuura-Tokita, K., Saito, C., Hirata, R. und Nakano, A. High-curvature domains of the ER are important for the organization of ER exit sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* (2012) 125, 3412-3420.
- Olzmann, J. A. und Kopito, R. R. Lipid droplet formation is dispensable for endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* (2011) 286, 27872-27874.
- Ostrowicz, C. W., Meiringer, C. T. und Ungermann, C. Yeast vacuole fusion: a model system for eukaryotic endomembrane dynamics. *Autophagy* (2008) 4, 5-19.
- Otte, S. und Barlowe, C. Sorting signals can direct receptor-mediated export of soluble proteins into COPII vesicles. *Nat Cell Biol* (2004) 6, 1189-1194.
- Otte, S., Belden, W. J., Heidtman, M., Liu, J., Jensen, O. N. und Barlowe, C. Erv41p and Erv46p: new components of COPII vesicles involved in transport between the ER and Golgi complex. *J Cell Biol* (2001) 152, 503-518.
- Parikh, B. A., Tortora, A., Li, X. P. und Tumer, N. E. Ricin inhibits activation of the unfolded protein response by preventing splicing of the HAC1 mRNA. *J Biol Chem* (2008) 283, 6145-6153.
- Park, C. M., Berry, J. O. und Bruenn, J. A. High-level secretion of a virally encoded anti-fungal toxin in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol* (1996) 30, 359-366.
- Park, C. M., Bruenn, J. A., Ganesa, C., Flurkey, W. F., Bozarth, R. F. und Koltin, Y. Structure and heterologous expression of the *Ustilago maydis* viral toxin KP4. *Mol Microbiol* (1994) 11, 155-164.
- Parra, K. J., Keenan, K. L. und Kane, P. M. The H subunit (Vma13p) of the yeast V-ATPase inhibits the ATPase activity of cytosolic V1 complexes. *J Biol Chem* (2000) 275, 21761-21767.
- Pathare, G. R., Nagy, I., Bohn, S., Unverdorben, P., Hubert, A., Korner, R., Nickell, S., Lasker, K., Sali, A., Tamura, T., Nishioka, T., Forster, F., Baumeister, W. und Bracher, A. The proteasomal subunit Rpn6 is a molecular clamp holding the core and regulatory subcomplexes together. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) 109, 149-154.
- Paton, A. W., Beddoe, T., Thorpe, C. M., Whisstock, J. C., Wilce, M. C., Rossjohn, J., Talbot, U. M. und Paton, J. C. AB5 subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmic reticulum chaperone BiP. *Nature* (2006) 443, 548-552.
- Pelham, H. R., Roberts, L. M. und Lord, J. M. Toxin entry: how reversible is the secretory pathway? *Trends Cell Biol* (1992) 2, 183-185.
- Peng, R. und Gallwitz, D. Sly1 protein bound to Golgi syntaxin Sed5p allows assembly and contributes to specificity of SNARE fusion complexes. *J Cell Biol* (2002) 157, 645-655.
- Perez, F., Ramirez, M. und Regodon, J. A. Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antonie Van Leeuwenhoek* (2001) 79, 393-399.
- Petering, J. E., Symons, M. R., Langridge, P. und Henschke, P. A. Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces* wine yeast strain. *Appl Environ Microbiol* (1991) 57, 3232-3236.
- Peth, A., Besche, H. C. und Goldberg, A. L. Ubiquitinated proteins activate the proteasome by binding to Usp14/Ubp6, which causes 20S gate opening. *Mol Cell* (2009) 36, 794-804.
- Pietroni, P., Vasisht, N., Cook, J. P., Roberts, D. M., Lord, J. M., Hartmann-Petersen, R., Roberts, L. M. und Spooner, R. A. The proteasome cap RPT5/Rpt5p subunit prevents aggregation of unfolded ricin A chain. *Biochem J* (2013) 453, 435-445.

- Pilon, M., Schekman, R. und Romisch, K. *Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. Embo J (1997) 16, 4540-4548.*
- Piper, R. C., Bryant, N. J. und Stevens, T. H. *The membrane protein alkaline phosphatase is delivered to the vacuole by a route that is distinct from the VPS-dependent pathway. J Cell Biol (1997) 138, 531-545.*
- Piper, R. C., Cooper, A. A., Yang, H. und Stevens, T. H. *VPS27 controls vacuolar and endocytic traffic through a prevacuolar compartment in Saccharomyces cerevisiae. J Cell Biol (1995) 131, 603-617.*
- Platta, H. W., El Magraoui, F., Schlee, D., Grunau, S., Girzalsky, W. und Erdmann, R. *Ubiquitination of the peroxisomal import receptor Pex5p is required for its recycling. J Cell Biol (2007) 177, 197-204.*
- Platta, H. W., Grunau, S., Rosenkranz, K., Girzalsky, W. und Erdmann, R. *Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. Nat Cell Biol (2005) 7, 817-822.*
- Plempner, R. K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T. und Wolf, D. H. *Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. Nature (1997) 388, 891-895.*
- Ploegh, H. L. *A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. Nature (2007) 448, 435-438.*
- Polonelli, L., Lorenzini, R., De Bernardis, F. und Morace, G. *Potential therapeutic effect of yeast killer toxin. Mycopathologia (1986) 96, 103-107.*
- Poon, P. P., Cassel, D., Spang, A., Rotman, M., Pick, E., Singer, R. A. und Johnston, G. C. *Retrograde transport from the yeast Golgi is mediated by two ARF GAP proteins with overlapping function. Embo J (1999) 18, 555-564.*
- Powers, J. und Barlowe, C. *Transport of axl2p depends on erv14p, an ER-vesicle protein related to the Drosophila cornichon gene product. J Cell Biol (1998) 142, 1209-1222.*
- Prinz, W. A., Grzyb, L., Veenhuis, M., Kahana, J. A., Silver, P. A. und Rapoport, T. A. *Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in Saccharomyces cerevisiae. J Cell Biol (2000) 150, 461-474.*
- Pu, J., Ha, C. W., Zhang, S., Jung, J. P., Huh, W. K. und Liu, P. *Interactomic study on interaction between lipid droplets and mitochondria. Protein Cell (2011) 2, 487-496.*
- Quan, E. M., Kamiya, Y., Kamiya, D., Denic, V., Weibezahn, J., Kato, K. und Weissman, J. S. *Defining the glycan destruction signal for endoplasmic reticulum-associated degradation. Mol Cell (2008) 32, 870-877.*
- Radler, F., Herzberger, S., Schonig, I. und Schwarz, P. *Investigation of a killer strain of Zygosaccharomyces bailii. J Gen Microbiol (1993) 139, 495-500.*
- Rao, H. und Sastry, A. *Recognition of specific ubiquitin conjugates is important for the proteolytic functions of the ubiquitin-associated domain proteins Dsk2 and Rad23. J Biol Chem (2002) 277, 11691-11695.*
- Raykhel, I., Alanen, H., Salo, K., Jurvansuu, J., Nguyen, V. D., Latva-Ranta, M. und Ruddock, L. *A molecular specificity code for the three mammalian KDEL receptors. J Cell Biol (2007) 179, 1193-1204.*
- Redmann, V., Oresic, K., Tortorella, L. L., Cook, J. P., Lord, M. und Tortorella, D. *Dislocation of ricin toxin A chains in human cells utilizes selective cellular factors. J Biol Chem (2011) 286, 21231-21238.*
- Reiter, J. *Untersuchungen zur Wirkungsweise eines viralen A/B-Toxins der Hefe: Kernlokalisierung, Apoptose und Zellzyklus-Arrest. (2004).*
- Reiter, J., Herker, E., Madeo, F. und Schmitt, M. J. *Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeast. J Cell Biol (2005) 168, 353-358.*
- Robinson, M., Poon, P. P., Schindler, C., Murray, L. E., Kama, R., Gabriely, G., Singer, R. A., Spang, A., Johnston, G. C. und Gerst, J. E. *The Gcs1 Arf-GAP mediates Snc1,2 v-SNARE retrieval to the Golgi in yeast. Mol Biol Cell (2006) 17, 1845-1858.*
- Robinson, M. S. *Coats and vesicle budding. Trends Cell Biol (1997) 7, 99-102.*
- Rodighiero, C., Tsai, B., Rapoport, T. A. und Lencer, W. I. *Role of ubiquitination in retrotranslocation of cholera toxin and escape of cytosolic degradation. EMBO Rep (2002) 3, 1222-1227.*
- Rodriguez, M. S., Gwizdek, C., Haguenaer-Tsapis, R. und Dargemont, C. *The HECT ubiquitin ligase Rsp5p is required for proper nuclear export of mRNA in Saccharomyces cerevisiae. Traffic (2003) 4, 566-575.*

- Rodriguez, R. J. und Parks, L. W. *Structural and physiological features of sterols necessary to satisfy bulk membrane and sparking requirements in yeast sterol auxotrophs*. *Arch Biochem Biophys* (1983) 225, 861-871.
- Romisch, K. *Endoplasmic reticulum-associated degradation*. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2005) 21, 435-456.
- Rubenstein, E. M., Kreft, S. G., Greenblatt, W., Swanson, R. und Hochstrasser, M. *Aberrant substrate engagement of the ER translocon triggers degradation by the Hrd1 ubiquitin ligase*. *J Cell Biol* (2012) 197, 761-773.
- Rubin, D. M., Glickman, M. H., Larsen, C. N., Dhruvakumar, S. und Finley, D. *Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome*. *Embo J* (1998) 17, 4909-4919.
- Rudd, P. M., Woods, R. J., Wormald, M. R., Opdenakker, G., Downing, A. K., Campbell, I. D. und Dwek, R. A. *The effects of variable glycosylation on the functional activities of ribonuclease, plasminogen and tissue plasminogen activator*. *Biochim Biophys Acta* (1995) 1248, 1-10.
- Sacher, M., Barrowman, J., Wang, W., Horecka, J., Zhang, Y., Pypaert, M. und Ferro-Novick, S. *TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport*. *Mol Cell* (2001) 7, 433-442.
- Sacher, M., Jiang, Y., Barrowman, J., Scarpa, A., Burston, J., Zhang, L., Schieltz, D., Yates, J. R., 3rd, Abeliovich, H. und Ferro-Novick, S. *TRAPP, a highly conserved novel complex on the cis-Golgi that mediates vesicle docking and fusion*. *Embo J* (1998) 17, 2494-2503.
- Saenz, J. B., Doggett, T. A. und Haslam, D. B. *Identification and characterization of small molecules that inhibit intracellular toxin transport*. *Infect Immun* (2007) 75, 4552-4561.
- Saenz, J. B., Sun, W. J., Chang, J. W., Li, J., Bursulaya, B., Gray, N. S. und Haslam, D. B. *Golgicide A reveals essential roles for GBF1 in Golgi assembly and function*. *Nat Chem Biol* (2009) 5, 157-165.
- Saibil, H. *Molecular chaperones: containers and surfaces for folding, stabilising or unfolding proteins*. *Curr Opin Struct Biol* (2000) 10, 251-258.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science* (1988) 239, 487-491.
- Sambrook *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edn NY (1989).
- Sandvig, K., Grimmer, S., Lauvrak, S. U., Torgersen, M. L., Skretting, G., van Deurs, B. und Iversen, T. G. *Pathways followed by ricin and Shiga toxin into cells*. *Histochem Cell Biol* (2002) 117, 131-141.
- Sandvig, K. und Olsnes, S. *Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH*. *J Cell Biol* (1980) 87, 828-832.
- Sandvig, K. und van Deurs, B. *Membrane traffic exploited by protein toxins*. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2002) 18, 1-24.
- Sandvig, K. und van Deurs, B. *Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins*. *Gene Ther* (2005) 12, 865-872.
- Santos, A. und Marquina, D. *The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to proapoptotic concentrations of *Pichia membranifaciens* killer toxin*. *Fungal Genet Biol* (2011) 48, 979-989.
- Saris, N., Holkeri, H., Craven, R. A., Stirling, C. J. und Makarow, M. *The Hsp70 homologue *Lhs1p* is involved in a novel function of the yeast endoplasmic reticulum, refolding and stabilization of heat-denatured protein aggregates*. *J Cell Biol* (1997) 137, 813-824.
- Sato, B. K., Schulz, D., Do, P. H. und Hampton, R. Y. *Misfolded membrane proteins are specifically recognized by the transmembrane domain of the Hrd1p ubiquitin ligase*. *Mol Cell* (2009) 34, 212-222.
- Sato, K., Sato, M. und Nakano, A. *Rer1p, a retrieval receptor for endoplasmic reticulum membrane proteins, is dynamically localized to the Golgi apparatus by coatomer*. *J Cell Biol* (2001) 152, 935-944.
- Schafer, A. und Wolf, D. H. *Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery*. *Embo J* (2009) 28, 2874-2884.
- Schagger, H., Aquila, H. und Von Jagow, G. *Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis*. *Anal Biochem* (1988) 173, 201-205.

- Schauble, N., Lang, S., Jung, M., Cappel, S., Schorr, S., Ulucan, O., Linxweiler, J., Dudek, J., Blum, R., Helms, V., Paton, A. W., Paton, J. C., Cavalie, A. und Zimmermann, R. *BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER*. *Embo J* (2012) 31, 3282-3296.
- Schekman, R. *Cell biology: a channel for protein waste*. *Nature* (2004) 429, 817-818.
- Schimmoller, F., Singer-Kruger, B., Schroder, S., Kruger, U., Barlowe, C. und Riezman, H. *The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi*. *Embo J* (1995) 14, 1329-1339.
- Schindler, C., Rodriguez, F., Poon, P. P., Singer, R. A., Johnston, G. C. und Spang, A. *The GAP domain and the SNARE, coatamer and cargo interaction region of the ArfGAP2/3 Glo3 are sufficient for Glo3 function*. *Traffic* (2009) 10, 1362-1375.
- Schlenstedt, G., Harris, S., Risse, B., Lill, R. und Silver, P. A. *A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s*. *J Cell Biol* (1995) 129, 979-988.
- Schliebs, W., Girzalsky, W. und Erdmann, R. *Peroxisomal protein import and ERAD: variations on a common theme*. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2010) 11, 885-890.
- Schmidt, M., Haas, W., Crosas, B., Santamaria, P. G., Gygi, S. P., Walz, T. und Finley, D. *The HEAT repeat protein Blm10 regulates the yeast proteasome by capping the core particle*. *Nat Struct Mol Biol* (2005) 12, 294-303.
- Schmitt, M. und Radler, F. *Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of Saccharomyces cerevisiae strain 28*. *J Gen Microbiol* (1987) 133, 3347-3354.
- Schmitt, M. J. und Breinig, F. *The viral killer system in yeast: from molecular biology to application*. *FEMS Microbiol Rev* (2002) 26, 257-276.
- Schmitt, M. J. und Breinig, F. *Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection*. *Nat Rev Microbiol* (2006) 4, 212-221.
- Schmitt, M. J., Brendel, M., Schwarz, R. und Radler, F. *Inhibition of DNA Synthesis in Saccharomyces cerevisiae by yeast toxin K28*. *J Gen Microbiol* (1989) 135, 1529-1535.
- Schmitt, M. J., Klavehn, P., Wang, J., Schonig, I. und Tipper, D. J. *Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin*. *Microbiology* (1996) 142 (Pt 9), 2655-2662.
- Schmitt, M. J. und Tipper, D. J. *K28, a unique double-stranded RNA killer virus of Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* (1990) 10, 4807-4815.
- Schmitt, M. J. und Tipper, D. J. *Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an alpha/beta heterodimeric protein toxin*. *Virology* (1995) 213, 341-351.
- Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A. und Herzog, V. *Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex*. *J Cell Biol* (2000) 148, 1203-1212.
- Schmitz, A., Maintz, M., Kehle, T. und Herzog, V. *In vivo iodination of a misfolded proinsulin reveals co-localized signals for Bip binding and for degradation in the ER*. *Embo J* (1995) 14, 1091-1098.
- Schreiber, A. und Peter, M. *Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system*. *Biochim Biophys Acta* (2013).
- Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W. und Bannink, J. R. *Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes*. *Nature* (2000) 404, 770-774.
- Schuberth, C. und Buchberger, A. *Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation*. *Nat Cell Biol* (2005) 7, 999-1006.
- Schuck, S., Prinz, W. A., Thorn, K. S., Voss, C. und Walter, P. *Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response*. *J Cell Biol* (2009) 187, 525-536.
- Schwarz, F. und Aebi, M. *Mechanisms and principles of N-linked protein glycosylation*. *Curr Opin Struct Biol* (2011) 21, 576-582.
- Scott, D. C. und Schekman, R. *Role of Sec61p in the ER-associated degradation of short-lived transmembrane proteins*. *J Cell Biol* (2008) 181, 1095-1105.
- Sears, C. L. und Kaper, J. B. *Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion*. *Microbiol Rev* (1996) 60, 167-215.
- Seeger, M. und Payne, G. S. *A role for clathrin in the sorting of vacuolar proteins in the Golgi complex of yeast*. *Embo J* (1992a) 11, 2811-2818.
- Seeger, M. und Payne, G. S. *Selective and immediate effects of clathrin heavy chain mutations on Golgi membrane protein retention in Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* (1992b) 118, 531-540.

- Seguy, N., Polonelli, L., Dei-Cas, E. und Cailliez, J. C. *Effect of a killer toxin of Pichia anomala to Pneumocystis. Perspectives in the control of pneumocystosis. FEMS Immunol Med Microbiol* (1998) 22, 145-149.
- Semenza, J. C., Hardwick, K. G., Dean, N. und Pelham, H. R. *ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. Cell* (1990) 61, 1349-1357.
- Sendzik, T. *Identifizierung essentieller Komponenten des intrazellulären Transports eines viralen A/B-Toxins der Hefe. (2006).*
- Sevrieva, I. *Colocalization studies of the cellular HDEL-receptor Erd2p in the plasma membrane of Saccharomyces cerevisiae. (2009).*
- Shapiro, A. L., Vinuela, E. und Maizel, J. V., Jr. *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem Biophys Res Commun* (1967) 28, 815-820.
- Shimizu, Y., Okuda-Shimizu, Y. und Hendershot, L. M. *Ubiquitylation of an ERAD substrate occurs on multiple types of amino acids. Mol Cell* (2010) 40, 917-926.
- Simons, J. F., Ferro-Novick, S., Rose, M. D. und Helenius, A. *BiP/Kar2p serves as a molecular chaperone during carboxypeptidase Y folding in yeast. J Cell Biol* (1995) 130, 41-49.
- Simpson, J. C., Lord, J. M. und Roberts, L. M. *Point mutations in the hydrophobic C-terminal region of ricin A chain indicate that Pro250 plays a key role in membrane translocation. Eur J Biochem* (1995) 232, 458-463.
- Simpson, J. C., Roberts, L. M., Romisch, K., Davey, J., Wolf, D. H. und Lord, J. M. *Ricin A chain utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. FEBS Lett* (1999) 459, 80-84.
- Slominska-Wojewodzka, M., Gregers, T. F., Walchli, S. und Sandvig, K. *EDEM is involved in retrotranslocation of ricin from the endoplasmic reticulum to the cytosol. Mol Biol Cell* (2006) 17, 1664-1675.
- Smith, D. M., Chang, S. C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y. und Goldberg, A. L. *Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. Mol Cell* (2007) 27, 731-744.
- Solovyov, A., Xiao, R. und Gilbert, H. F. *Sulfhydryl oxidation, not disulfide isomerization, is the principal function of protein disulfide isomerase in yeast Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem* (2004) 279, 34095-34100.
- Sommer, T. und Jentsch, S. *A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. Nature* (1993) 365, 176-179.
- Sorger, D., Athenstaedt, K., Hrastnik, C. und Daum, G. *A yeast strain lacking lipid particles bears a defect in ergosterol formation. J Biol Chem* (2004) 279, 31190-31196.
- Sorger, D. und Daum, G. *Triacylglycerol biosynthesis in yeast. Appl Microbiol Biotechnol* (2003) 61, 289-299.
- Spang, A., Herrmann, J. M., Hamamoto, S. und Schekman, R. *The ADP ribosylation factor-nucleotide exchange factors Gea1p and Gea2p have overlapping, but not redundant functions in retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum. Mol Biol Cell* (2001) 12, 1035-1045.
- Spangler, B. D. *Structure and function of cholera toxin and the related Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Microbiol Rev* (1992) 56, 622-647.
- Spindler, J. *Untersuchungen zur endozytotischen Aufnahme und intrazellulären Expression von K28-Toxinderivaten in Hefe- und Säugerzellen. (2004).*
- Spooner, R. A., Watson, P. D., Marsden, C. J., Smith, D. C., Moore, K. A., Cook, J. P., Lord, J. M. und Roberts, L. M. *Protein disulphide-isomerase reduces ricin to its A and B chains in the endoplasmic reticulum. Biochem J* (2004) 383, 285-293.
- Springer, S., Chen, E., Duden, R., Marzioch, M., Rowley, A., Hamamoto, S., Merchant, S. und Schekman, R. *The p24 proteins are not essential for vesicular transport in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) 97, 4034-4039.
- Stack, J. H., Horazdovsky, B. und Emr, S. D. *Receptor-mediated protein sorting to the vacuole in yeast: roles for a protein kinase, a lipid kinase and GTP-binding proteins. Annu Rev Cell Dev Biol* (1995) 11, 1-33.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. und te Heesen, S. *A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A* (1998) 95, 5187-5192.

- Stanley, W. A., Filipp, F. V., Kursula, P., Schuller, N., Erdmann, R., Schliebs, W., Sattler, M. und Wilmanns, M. *Recognition of a functional peroxisome type 1 target by the dynamic import receptor pex5p*. *Mol Cell* (2006) 24, 653-663.
- Starmer, W. T., Ganter, P. F., Aberdeen, V., Lachance, M. A. und Phaff, H. J. *The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts*. *Can J Microbiol* (1987) 33, 783-796.
- Stawiecka-Mirota, M., Pokrzywa, W., Morvan, J., Zoladek, T., Haguenaer-Tsapis, R., Urban-Grimal, D. und Morsomme, P. *Targeting of Sna3p to the endosomal pathway depends on its interaction with Rsp5p and multivesicular body sorting on its ubiquitylation*. *Traffic* (2007) 8, 1280-1296.
- Stechmann, B., Bai, S. K., Gobbo, E., Lopez, R., Merer, G., Pinchard, S., Panigai, L., Tenza, D., Raposo, G., Beaumelle, B., Sauvaire, D., Gillet, D., Johannes, L. und Barbier, J. *Inhibition of retrograde transport protects mice from lethal ricin challenge*. *Cell* (2010) 141, 231-242.
- Stepp, J. D., Huang, K. und Lemmon, S. K. *The yeast adaptor protein complex, AP-3, is essential for the efficient delivery of alkaline phosphatase by the alternate pathway to the vacuole*. *J Cell Biol* (1997) 139, 1761-1774.
- Stevens, T. H. und Forgac, M. *Structure, function and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPase*. *Annu Rev Cell Dev Biol* (1997) 13, 779-808.
- Stevens, T. H., Rothman, J. H., Payne, G. S. und Schekman, R. *Gene dosage-dependent secretion of yeast vacuolar carboxypeptidase Y*. *J Cell Biol* (1986) 102, 1551-1557.
- Stolz, A., Besser, S., Hottmann, H. und Wolf, D. H. *Previously unknown role for the ubiquitin ligase Ubr1 in endoplasmic reticulum-associated protein degradation*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013) 110, 15271-15276.
- Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M. und Tanner, W. *Protein O-mannosylation*. *Biochim Biophys Acta* (1999) 1426, 297-307.
- Sun, B., Chen, L., Cao, W., Roth, A. F. und Davis, N. G. *The yeast casein kinase Yck3p is palmitoylated, then sorted to the vacuolar membrane with AP-3-dependent recognition of a YXXPhi adaptin sorting signal*. *Mol Biol Cell* (2004) 15, 1397-1406.
- Supek, F., Madden, D. T., Hamamoto, S., Orci, L. und Schekman, R. *Sec16p potentiates the action of COPII proteins to bud transport vesicles*. *J Cell Biol* (2002) 158, 1029-1038.
- Suzuki, K. *Selective autophagy in budding yeast*. *Cell Death Differ* (2013) 20, 43-48.
- Suzuki, K. und Ohsumi, Y. *Current knowledge of the pre-autophagosomal structure (PAS)*. *FEBS Lett* (2010) 584, 1280-1286.
- Swanson, R., Locher, M. und Hochstrasser, M. *A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation*. *Genes Dev* (2001) 15, 2660-2674.
- Tabas, I. und Ron, D. *Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress*. *Nat Cell Biol* (2011) 13, 184-190.
- Tachikawa, H., Takeuchi, Y., Funahashi, W., Miura, T., Gao, X. D., Fujimoto, D., Mizunaga, T. und Onodera, K. *Isolation and characterization of a yeast gene, MPD1, the overexpression of which suppresses inviability caused by protein disulfide isomerase depletion*. *FEBS Lett* (1995) 369, 212-216.
- Tanaka, S., Maeda, Y., Tashima, Y. und Kinoshita, T. *Inositol deacylation of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins is mediated by mammalian PGAP1 and yeast Bst1p*. *J Biol Chem* (2004) 279, 14256-14263.
- Tanner, W. und Lehle, L. *Protein glycosylation in yeast*. *Biochim Biophys Acta* (1987) 906, 81-99.
- Tarr, P. I., Gordon, C. A. und Chandler, W. L. *Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome*. *Lancet* (2005) 365, 1073-1086.
- Tarrago-Trani, M. T. und Storrie, B. *Alternate routes for drug delivery to the cell interior: pathways to the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum*. *Adv Drug Deliv Rev* (2007) 59, 782-797.
- Taxis, C., Hitt, R., Park, S. H., Deak, P. M., Kostova, Z. und Wolf, D. H. *Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD*. *J Biol Chem* (2003) 278, 35903-35913.
- Taxis, C., Vogel, F. und Wolf, D. H. *ER-golgi traffic is a prerequisite for efficient ER degradation*. *Mol Biol Cell* (2002) 13, 1806-1818.
- Tesh, V. L. *Activation of cell stress response pathways by Shiga toxins*. *Cell Microbiol* (2012a) 14, 1-9.
- Tesh, V. L. *The induction of apoptosis by Shiga toxins and ricin*. *Curr Top Microbiol Immunol* (2012b) 357, 137-178.

- Tirosh, B., Furman, M. H., Tortorella, D. und Ploegh, H. L. *Protein unfolding is not a prerequisite for endoplasmic reticulum-to-cytosol dislocation.* *J Biol Chem* (2003) 278, 6664-6672.
- Tomasi, M. und Montecucco, C. *Lipid insertion of cholera toxin after binding to GM1-containing liposomes.* *J Biol Chem* (1981) 256, 11177-11181.
- Townsley, F. M. und Pelham, H. R. *The KKXX signal mediates retrieval of membrane proteins from the Golgi to the ER in yeast.* *Eur J Cell Biol* (1994) 64, 211-216.
- Travers, K. J., Patil, C. K., Wodicka, L., Lockhart, D. J., Weissman, J. S. und Walter, P. *Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation.* *Cell* (2000) 101, 249-258.
- Tretter, T., Pereira, F. P., Ulucan, O., Helms, V., Allan, S., Kalies, K. U. und Romisch, K. *ERAD and protein import defects in a sec61 mutant lacking ER-lumenal loop 7.* *BMC Cell Biol* (2013) 14, 56.
- Trombetta, E. S. und Parodi, A. J. *Quality control and protein folding in the secretory pathway.* *Annu Rev Cell Dev Biol* (2003) 19, 649-676.
- Tsai, B. und Rapoport, T. A. *Unfolded cholera toxin is transferred to the ER membrane and released from protein disulfide isomerase upon oxidation by Ero1.* *J Cell Biol* (2002) 159, 207-216.
- Tsai, B., Rodighiero, C., Lencer, W. I. und Rapoport, T. A. *Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin.* *Cell* (2001) 104, 937-948.
- Tsai, B., Ye, Y. und Rapoport, T. A. *Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol.* *Nat Rev Mol Cell Biol* (2002) 3, 246-255.
- Tuomanen, E. I. und Hendley, J. O. *Adherence of Bordetella pertussis to human respiratory epithelial cells.* *J Infect Dis* (1983) 148, 125-130.
- Turturro, F. *Denileukin diftitox: a biotherapeutic paradigm shift in the treatment of lymphoid-derived disorders.* *Expert Rev Anticancer Ther* (2007) 7, 11-17.
- Tyson, J. R. und Stirling, C. J. *LHS1 and SIL1 provide a luminal function that is essential for protein translocation into the endoplasmic reticulum.* *Embo J* (2000) 19, 6440-6452.
- Vagnoli, P., Musmanno, R. A., Cresti, S., Di Maggio, T. und Coratza, G. *Occurrence of killer yeasts in spontaneous wine fermentations from the tuscan region of Italy.* *Appl Environ Microbiol* (1993) 59, 4037-4043.
- Varshavsky, A. *The N-end rule pathway and regulation by proteolysis.* *Protein Sci* (2011).
- Vashist, S., Kim, W., Belden, W. J., Spear, E. D., Barlowe, C. und Ng, D. T. *Distinct retrieval and retention mechanisms are required for the quality control of endoplasmic reticulum protein folding.* *J Cell Biol* (2001) 155, 355-368.
- Vembar, S. S., Jonikas, M. C., Hendershot, L. M., Weissman, J. S. und Brodsky, J. L. *J domain co-chaperone specificity defines the role of BiP during protein translocation.* *J Biol Chem* (2010) 285, 22484-22494.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd, Koonin, E. V. und Deshaies, R. J. *Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome.* *Science* (2002) 298, 611-615.
- Verma, R., Oania, R., Graumann, J. und Deshaies, R. J. *Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system.* *Cell* (2004) 118, 99-110.
- Vitu, E., Gross, E., Greenblatt, H. M., Sevier, C. S., Kaiser, C. A. und Fass, D. *Yeast Mpd1p reveals the structural diversity of the protein disulfide isomerase family.* *J Mol Biol* (2008) 384, 631-640.
- Vowels, J. J. und Payne, G. S. *A dileucine-like sorting signal directs transport into an AP-3-dependent, clathrin-independent pathway to the yeast vacuole.* *Embo J* (1998) 17, 2482-2493.
- Wahlman, J., DeMartino, G. N., Skach, W. R., Bulleid, N. J., Brodsky, J. L. und Johnson, A. E. *Real-time fluorescence detection of ERAD substrate retrotranslocation in a mammalian in vitro system.* *Cell* (2007) 129, 943-955.
- Wahome, P. G., Bai, Y., Neal, L. M., Robertus, J. D. und Mantis, N. J. *Identification of small-molecule inhibitors of ricin and shiga toxin using a cell-based high-throughput screen.* *Toxicon* (2010) 56, 313-323.
- Walker, S. S., Shen, W. C., Reese, J. C., Apone, L. M. und Green, M. R. *Yeast TAF(II)145 required for transcription of G1/S cyclin genes and regulated by the cellular growth state.* *Cell* (1997) 90, 607-614.
- Walter, P. und Ron, D. *The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation.* *Science* (2011) 334, 1081-1086.

- Wang, C. C. und Tsou, C. L. *Protein disulfide isomerase is both an enzyme and a chaperone. Faseb J* (1993) 7, 1515-1517.
- Wang, Q. und Chang, A. *Substrate recognition in ER-associated degradation mediated by Eps1, a member of the protein disulfide isomerase family. Embo J* (2003) 22, 3792-3802.
- Wang, W., Sacher, M. und Ferro-Novick, S. *TRAPP stimulates guanine nucleotide exchange on Ypt1p. J Cell Biol* (2000) 151, 289-296.
- Wang, X., Herr, R. A., Chua, W. J., Lybarger, L., Wiertz, E. J. und Hansen, T. H. *Ubiquitination of serine, threonine, or lysine residues on the cytoplasmic tail can induce ERAD of MHC-I by viral E3 ligase mK3. J Cell Biol* (2007) 177, 613-624.
- Warnock, D. E. und Schmid, S. L. *Dynamin GTPase, a force-generating molecular switch. Bioessays* (1996) 18, 885-893.
- Watson, P. und Spooner, R. A. *Toxin entry and trafficking in mammalian cells. Adv Drug Deliv Rev* (2006) 58, 1581-1596.
- Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T. H. und Rothman, J. E. *SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. Cell* (1998) 92, 759-772.
- Weinrauch, Y. und Zychlinsky, A. *The induction of apoptosis by bacterial pathogens. Annu Rev Microbiol* (1999) 53, 155-187.
- Wesche, J., Rapak, A. und Olsnes, S. *Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol. J Biol Chem* (1999) 274, 34443-34449.
- West, R. W., Jr., Yocum, R. R. und Ptashne, M. *Saccharomyces cerevisiae GAL1-GAL10 divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG. Mol Cell Biol* (1984) 4, 2467-2478.
- Westphal, V., Darby, N. J. und Winther, J. R. *Functional properties of the two redox-active sites in yeast protein disulphide isomerase in vitro and in vivo. J Mol Biol* (1999) 286, 1229-1239.
- Westphal, V., Marcusson, E. G., Winther, J. R., Emr, S. D. und van den Hazel, H. B. *Multiple pathways for vacuolar sorting of yeast proteinase A. J Biol Chem* (1996) 271, 11865-11870.
- Whyte, J. R. und Munro, S. *Vesicle tethering complexes in membrane traffic. J Cell Sci* (2002) 115, 2627-2637.
- Wickner, R. B. *Yeast virology. Faseb J* (1989) 3, 2257-2265.
- Wiertz, E. J., Jones, T. R., Sun, L., Bogyo, M., Geuze, H. J. und Ploegh, H. L. *The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. Cell* (1996a) 84, 769-779.
- Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A. und Ploegh, H. L. *Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. Nature* (1996b) 384, 432-438.
- Wilhovsky, S., Gardner, R. und Hampton, R. *HRD gene dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation. Mol Biol Cell* (2000) 11, 1697-1708.
- Wilkinson, B. M., Esnault, Y., Craven, R. A., Skiba, F., Fieschi, J., K'Epes, F. und Stirling, C. J. *Molecular architecture of the ER translocase probed by chemical crosslinking of Sss1p to complementary fragments of Sec61p. Embo J* (1997) 16, 4549-4559.
- Wilkinson, B. M., Tyson, J. R., Reid, P. J. und Stirling, C. J. *Distinct domains within yeast Sec61p involved in post-translational translocation and protein dislocation. J Biol Chem* (2000) 275, 521-529.
- Willer, M., Forte, G. M. und Stirling, C. J. *Sec61p is required for ERAD-L: genetic dissection of the translocation and ERAD-L functions of Sec61P using novel derivatives of CPY. J Biol Chem* (2008) 283, 33883-33888.
- Wilson, D. W., Lewis, M. J. und Pelham, H. R. *pH-dependent binding of KDEL to its receptor in vitro. J Biol Chem* (1993) 268, 7465-7468.
- Winkeler, A., Godderz, D., Herzog, V. und Schmitz, A. *BiP-dependent export of cholera toxin from endoplasmic reticulum-derived microsomes. FEBS Lett* (2003) 554, 439-442.
- Wirth, A., Jung, M., Bies, C., Fien, M., Tyedmers, J., Zimmermann, R. und Wagner, R. *The Sec61p complex is a dynamic precursor activated channel. Mol Cell* (2003) 12, 261-268.
- Wittke, S., Dunnwald, M., Albertsen, M. und Johnsson, N. *Recognition of a subset of signal sequences by Ssh1p, a Sec61p-related protein in the membrane of endoplasmic reticulum of yeast Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell* (2002) 13, 2223-2232.
- Wittke, S., Lewke, N., Muller, S. und Johnsson, N. *Probing the molecular environment of membrane proteins in vivo. Mol Biol Cell* (1999) 10, 2519-2530.
- Witvliet, M. H., Burns, D. L., Brennan, M. J., Poolman, J. T. und Manclark, C. R. *Binding of pertussis toxin to eucaryotic cells and glycoproteins. Infect Immun* (1989) 57, 3324-3330.

- Wolfson, J. J., May, K. L., Thorpe, C. M., Jandhyala, D. M., Paton, J. C. und Paton, A. W. *Subtilase cytotoxin activates PERK, IRE1 and ATF6 endoplasmic reticulum stress-signalling pathways. Cell Microbiol (2008) 10, 1775-1786.*
- Worthington, Z. E. und Carbonetti, N. H. *Evading the proteasome: absence of lysine residues contributes to pertussis toxin activity by evasion of proteasome degradation. Infect Immun (2007) 75, 2946-2953.*
- Wu, M. M., Grabe, M., Adams, S., Tsien, R. Y., Moore, H. P. und Machen, T. E. *Mechanisms of pH regulation in the regulated secretory pathway. J Biol Chem (2001) 276, 33027-33035.*
- Wunderlich, M., Otto, A., Maskos, K., Mucke, M., Seckler, R. und Glockshuber, R. *Efficient catalysis of disulfide formation during protein folding with a single active-site cysteine. J Mol Biol (1995) 247, 28-33.*
- Xiao, R., Solovyov, A., Gilbert, H. F., Holmgren, A. und Lundstrom-Ljung, J. *Combinations of protein-disulfide isomerase domains show that there is little correlation between isomerase activity and wild-type growth. J Biol Chem (2001) 276, 27975-27980.*
- Xiao, R., Wilkinson, B., Solovyov, A., Winther, J. R., Holmgren, A., Lundstrom-Ljung, J. und Gilbert, H. F. *The contributions of protein disulfide isomerase and its homologues to oxidative protein folding in the yeast endoplasmic reticulum. J Biol Chem (2004) 279, 49780-49786.*
- Xie, W. und Ng, D. T. *ERAD substrate recognition in budding yeast. Semin Cell Dev Biol (2010) 21, 533-539.*
- Ye, Y., Meyer, H. H. und Rapoport, T. A. *The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. Nature (2001) 414, 652-656.*
- Ye, Y., Meyer, H. H. und Rapoport, T. A. *Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. J Cell Biol (2003) 162, 71-84.*
- Ye, Y., Shibata, Y., Yun, C., Ron, D. und Rapoport, T. A. *A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. Nature (2004) 429, 841-847.*
- Yokomori, Y., Akiyama, H. und Schimizu, K. *Isolation of a wild Candida killer yeast with a novel killer property. Agric Biol Chem (1988) 52, 2791-2796.*
- Yorimitsu, T. und Klionsky, D. J. *Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. Mol Biol Cell (2005) 16, 1593-1605.*
- Yorimitsu, T. und Sato, K. *Insights into structural and regulatory roles of Sec16 in COPII vesicle formation at ER exit sites. Mol Biol Cell (2012) 23, 2930-2942.*
- Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kaufman, R. J., Nagata, K. und Mori, K. *A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. Dev Cell (2003) 4, 265-271.*
- Yoshida, T., Chen, C. C., Zhang, M. S. und Wu, H. C. *Disruption of the Golgi apparatus by brefeldin A inhibits the cytotoxicity of ricin, modeccin, and Pseudomonas toxin. Exp Cell Res (1991) 192, 389-395.*
- Yoshihisa, T., Barlowe, C. und Schekman, R. *Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. Science (1993) 259, 1466-1468.*
- Young, J., Kane, L. P., Exley, M. und Wileman, T. *Regulation of selective protein degradation in the endoplasmic reticulum by redox potential. J Biol Chem (1993) 268, 19810-19818.*
- Young, T. W. und Yagiu, M. *A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. Antonie Van Leeuwenhoek (1978) 44, 59-77.*
- Yu, M. und Haslam, D. B. *Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/ERdj3. Infect Immun (2005) 73, 2524-2532.*
- Yu, S. und Liang, Y. *A trapper keeper for TRAPP, its structures and functions. Cell Mol Life Sci (2012).*
- Yu, Y., Jiang, Y. W., Wellinger, R. J., Carlson, K., Roberts, J. M. und Stillman, D. J. *Mutations in the homologous ZDS1 and ZDS2 genes affect cell cycle progression. Mol Cell Biol (1996) 16, 5254-5263.*
- Zachowski, A. *Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. Biochem J (1993) 294 (Pt 1), 1-14.*
- Zanghellini, J., Natter, K., Jungreuthmayer, C., Thalhammer, A., Kurat, C. F., Gogg-Fassolter, G., Kohlwein, S. D. und von Grunberg, H. H. *Quantitative modeling of triacylglycerol homeostasis in yeast--metabolic requirement for lipolysis to promote membrane lipid synthesis and cellular growth. Febs J (2008) 275, 5552-5563.*
- Zhang, K. und Kaufman, R. J. *From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. Nature (2008) 454, 455-462.*

- Zhang, R. G., Scott, D. L., Westbrook, M. L., Nance, S., Spangler, B. D., Shipley, G. G. und Westbrook, E. M.** *The three-dimensional crystal structure of cholera toxin. J Mol Biol* (1995) 251, 563-573.
- Zhou, M. und Schekman, R.** *The engagement of Sec61p in the ER dislocation process. Mol Cell* (1999) 4, 925-934.
- Zink, S., Wenzel, D., Wurm, C. A. und Schmitt, H. D.** *A link between ER tethering and COP-I vesicle uncoating. Dev Cell* (2009) 17, 403-416.

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken,

(Nina Christine Müller)

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PROF. DR. MANFRED SCHMITT bedanken. Ihm gebührt nicht nur Dank für die Überlassung des Themas der „zugrunde liegenden Arbeit“, vielmehr geht die Verbundenheit weit über das übliche Maß für Vertrauen, Unterstützung und Hilfsbereitschaft hinaus. In unzähligen beratenden Gesprächen war er stets bemüht meine Arbeit zu fördern und ermöglichte mir durch die Teilnahme am „Graduierten-Kolleg“ viele Eindrücke neben dem Inhalt meiner Arbeit. Die Bezeichnung des „Doktor-Vaters“ beschreibt trefflich das beispielhafte Verständnis für außerberufliche Verhältnisse vorwiegend im letzten Jahr meiner Arbeit. Ihre aufmunternden Worte, Ihr Interesse in allen Lebenslagen sowie Ihre Rücksichtnahme und Toleranz gegenüber Tiefpunkten während der Schreibphase werde ich Ihnen niemals vergessen!

Ein grenzenloser Dank geht an PROF. DR. RICHARD ZIMMERMANN, der nicht nur die Zweitkorrektur dieser Arbeit übernommen, sondern sich stets meinen fachlichen Problemen und Fragen angenommen und mir durch seine Hilfsbereitschaft die Durchführung zahlreicher Experimente sowie die Nutzung vieler Geräte ermöglicht hat vor allem bei der Herstellung des K28-Antikörpers. Der gesamten Arbeitsgruppe, vor allem SVEN LANG, NICO SCHÄUBLE und MARTIN JUNG danke ich herzlich für die Mithilfe bei der Bewältigung etlicher Fragestellungen.

Vielen Dank der Arbeitsgruppe Römer, im Besonderen DR. KRISTINA HEYNE für die Unterstützung bei der FACS-Analyse.

GABRIELE AMOROSO danke ich für die wertvollen Erfahrungen im Rahmen des Graduierten-Kollegs sowie die damit verbundenen organisatorischen Leistungen und natürlich nicht zuletzt für die geselligen Runden in entspannter Atmosphäre.

Erwähnenswerte Anerkennung gebührt „unserem kleinen Labor“ bestehend aus DR. BJÖRN DIEHL, DR. BJÖRN BECKER, DR. ESTHER GIEßELMANN und DR. THORSTEN HOFFMANN, deren enorme Hilfsbereitschaft mir eine erhebliche Hilfestellung bedeutete und ohne die viele Versuche nicht so erfolgreich hätten durchgeführt werden können. Vielen Dank für hilfreiche Tipps und die Bereitstellung Eures ganzen Wissens, das ich unerschöpflich in Anspruch nahm. Danke für eine wunderbare Zeit in unsrer kleinen „Arbeits-Familie“☺!

Darüber hinaus danke ich den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe: DR. FRANK BREINIG für die Unterstützung bei vielen Fragen, NICOLE JUNDEL für eine organisatorische Glanzleistung, ROSWITHA SCHEPP für die Akkord-Arbeit während der „Screening“-Phasen, ANDREA KARRENBauer sowie SABINE PREDIGER für die Bereitstellung des Toxinkonzentrats, SARA SCHWARTZ, DR. YUTAKA SUZUKI, RUTH KIEFER, DOMENIC RAMMO, GUILLAUME WENDT sowie meinen F-PRAKTIKANTEN, DIPLOMANDEN und BACHELOR-STUDENTEN, die ebenfalls ihren Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Unverzichtbar war ebenfalls die „Vorkorrektur“ dieses Wälzers, der sich sowohl die beiden Björny's als auch Frank vorbildlich angenommen und sich konstruktiv durch den Dschungel einer Million Proteine gekämpft haben. Neben der wegweisenden Betreuung der „prä-pro-PhD“-Zeit gilt ein besonderer Dank BJÖRN DIEHL für auf- und anregende Diskussionen im Rahmen unserer „süß-sauren“ Beziehung sowie die Hilfe bei allen computer-technischen Fragen- Now, I know the button of the internet 😊.

Ein unermesslich großer Dank gebührt MEINER FAMILIE, die mich bis hierher und ganz besonders während meiner Ausbildung in jeder nur erdenklichen Art und Weise unterstützt, mir den nötigen emotionalen sowie finanziellen Rückhalt gegeben und mir so erst das Studium ermöglicht hat. Vielen Dank für die aufmunternden und ermutigenden Worte zur Verwirklichung meiner Ziele! Ich weiß nicht, wo ich ohne Euch wäre! Die Anerkennung gebührt zunächst meinen Eltern DÉsirÉE MÜLLER-MASCHUNAT und MARKUS MÜLLER für die Zuwendung während unzähliger schlafloser Nächte und nervlichen Tiefschlägen, meinen Großeltern OTTO und LENI MASCHUNAT sowie CHRISTA und KARL-HEINZ MÜLLER, ROSWITHA und HORST GREULICH, SONIA und WOLFGANG MASCHUNAT sowie INES GREULICH und ARNULF BURKHARD.

Auf diesem Wege möchte ich auch „meinen zwei Mädels“ KATHARINA SOSSONG und CAROLIN EISENLAUER für ihr Verständnis vernachlässigter Freundschaftsdienste danken, wenn während intensiver Arbeitsphasen nur sehr wenig Zeit für gemeinsame Unternehmungen blieb. Auf Euren Zuspruch, Eure Anteilnahme und Unterstützung hätte ich vor allem im letzten Jahr niemals verzichten können!

Vielen Dank auch an DANIELA RAUF, die mit mir zusammen bis zum Schluss durchgehalten hat und ohne die ich mir mein Studium gar nicht hätte vorstellen können. In jedem Praktikum an ihrer Seite, hat sich eine wunderbare Freundschaft entwickelt, die uns die teils harten Anforderungen gemeinsam überstehen ließ.

Anerkennen möchte ich auch die Unterstützung von Dr. DARIUS MAKUCH, der mir bereits während der Anfertigung dieser Arbeit stets versucht hat alle nur erdenklichen Türen im Hinblick auf die die „post“-Doktoranden-Zeit zu öffnen und mir einzigartige Einblicke in die Welt der Kriminalistik ermöglicht hat.

Zum Schluss gebührt ein weiterer Dank meiner Biologie Lehrerin MONIKA EWERLING-GRILL, die meine Begeisterung für die Biologie geweckt hat und mich bei Projekten wie „Jugend forscht“ und der „Bioolympiade“ immer begleitet und gefördert hat. Vielen Dank auch an DR. ADELHEID WOLLENSAH, die mich in zwei Jahren Biologie-Leistungskurs zu einem erfolgreichen Abitur geführt hat.