

**Untersuchungen zum intrazellulären
Transportweg und der *in vivo* Toxizität
von Ricin A (RTA) in Hefe**

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

vorgelegt von

Diplom-Biologin
Tina Schnöder

Saarbrücken 2009

Tag des Kolloquiums:

25. September 2009

Dekan:

Prof. Dr.-Ing. Stefan Diebels

Prüfungsausschuss:

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Manfred J. Schmitt

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Richard Zimmermann

Vorsitzender:

Prof. Dr. Volkhard Helms

Akademischer Mitarbeiter:

Dr. Gert-Wieland Kohring

„Es ist nicht genug, zu wissen,
man muss auch anwenden;
es ist nicht genug, zu wollen,
man muss auch tun.“

Johann Wolfgang Goethe

Für meine Familie

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikation

Li, S., Spooner, R.A., Allen, S.C.H., Guise, C.P., Ladds, G., Schnöder, T., Schmitt, M.J., Lord, M.J. und Roberts, L.M. (2009)
Cytosolic ERAD pathway components can discriminate between different forms of the same substrate. J Biol Chem, submitted

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	
Abstract	

I Einleitung¹

1. Das Pflanzengift Ricin	1
1.1 Entdeckung und Struktur von Ricin	2
1.2 Funktion der Ricin-Untereinheiten.....	3
1.3 Biosynthese von Ricin	4
1.4 Intoxifikation von Säugerzellen mit Ricin	6
2. Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIPs).....	10
3. A/B-Toxine und die ER-assoziierte Degradation (ERAD)	14
4. Ziele und Fragestellungen der Arbeit.....	21

II Material und Methoden

1. Organismen	22
1.1 Bakterienstämme	22
1.2 Hefestämme	23
2. Plasmide.....	25
3. Oligonukleotide.....	32
3.1 PCR-Primer	32
4. Nährmedien	34
5. Puffer und Lösungen	36
5.1 Standard-Puffer und-Lösungen	36
6. Material.....	37
6.1 Restriktionsendonukleasen	37
6.2 Antikörper.....	37
6.3 Chemikalien und Kits	38
7. Kulturbedingungen	39
7.1 Kryokulturen	39

8. Zellzahlbestimmung.....	40
8.1 Gesamtzellzahl.....	40
8.2 Optische Dichte.....	40
9. Transformationsmethoden.....	40
9.1 Transformation rekombinanter Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> mittels Elektroporation	40
9.2 Hitzeschock-Transformation von <i>E. coli</i>	42
9.3 Transformation von Hefen mit rekombinanter Plasmid-DNA (Lithiumacetat-Methode).....	43
10. Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	45
10.1 Alkalische Lyse	45
10.2 Plasmid-Präparation mittels Plasmid-Miniprep.....	46
11. Polymerasekettenreaktion (PCR)	47
12. TOPO-Klonierung von Plasmid-DNA.....	50
13. Acceptor-Cloning	50
14. DNA-Sequenzierung.....	51
15. Restriktion von Plasmid-DNA	51
16. Agarosegelelektrophorese.....	52
17. Bestimmung von Konzentration, Reinheit und Größe der DNA.....	53
18. DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	55
19. Ligation von DNA-Fragmenten	55
20. Zellaufschluss rekombinanter Hefen	56
20.1 S80-Methode.....	56
21. Analyse von Proteinen durch SDS-PAGE	57
22. Western Analyse	60
22.1 „Semi-Dry-Blotting“	61
22.2 Immunodetektion.....	61
23. <i>In vitro</i> Transkription/Translation	62
24. Pulsmarkierung („pulse labeling“).....	65
24.1 Markierungsexperimente mit [³⁵ S]-Methionin	69
24.2 Direkte Autoradiographie.....	71

25. Screening nach RTA-resistenten <i>S. cerevisiae</i> -Mutanten	72
25.1 Assay zur Quantifizierung der toxischen Wirkung von RTA auf Hefen (Wachstumstest)	72
25.2 Mikrotiterplatten-Fluoreszenzreader-System.....	72
26. Probenvorbereitung zur Fluoreszenzmikroskopie (BiFC)	74

III Ergebnisse75

**Teil A: Untersuchung der Retrotranslokation von Ricin A (RTA)
durch Transformation ausgewählter Deletionsmutanten
eines Gen-„Knock-out“ Pools der Hefe**

1. Nachweis der <i>in vivo</i> Toxizität verschiedener RTA-Varianten nach Expression in Hefe.....	76
2. Nachweis der <i>in vivo</i> Expression der verschiedenen RTA-Derivate im Zellysat.....	81
2.1 Western Analyse	82
2.2 <i>In vitro</i> Transkription/Translation der verschiedenen RTA-Derivate in Gegenwart von [³⁵ S] Methionin	82
2.3 Markierungsexperimente mit [³⁵ S] Methionin („Pulse“) zum Nachweis der toxischen Ricin A Kette im Zellysat sensitiver Hefezellen	84
3. Untersuchungen zum intrazellulären Transport von Ricin A in Hefe	88
3.1 Untersuchung zur Beteiligung von Komponenten des SEC-Komplexes am ER-Import von K1- bzw. K28-RTA	88
3.2 Untersuchung zum Einfluss cytosolischer Chaperone auf den ER-Import und die Toxizität von RTA	93
3.3 Untersuchungen zum Einfluss von Komponenten des Signalpeptidase-Komplexes auf die <i>in vivo</i> Toxizität von K1- bzw. K28-RTA	97

3.4 Untersuchungen zum Nachweis des ER-Golgi Transportes von Ricin A.....	99
4. Untersuchung der ER/Cytosol-Dislokation von Ricin A	100
4.1 Untersuchung zur Beteiligung von Komponenten des Hrd1-Komplexes an der Retrotranslokation von RTA	103
4.2 Untersuchung zur Beteiligung von Komponenten des Doa10-Komplexes an der Retrotranslokation von RTA	107
5. Untersuchungen zum Einfluss einer Ubiquitinierung auf den ER-Export von RTA	109
5.1 Herstellung lysinfreier RTA-Derivate und Analyse ihrer <i>in vivo</i> Toxizität.....	109
5.2 Untersuchungen zum Einfluss des Cdc48-Komplexes sowie verschiedener Komponenten des Ubiquitin- Proteasom Systems auf die Retrotranslokation von RTA	112
5.3 Einfluss des Deubiquitinierungs-Enzyms Doa4p auf die <i>in vivo</i> Toxizität von RTA	117
5.4 Untersuchung der <i>in vivo</i> Toxizität von RTA nach gleichzeitiger Überexpression einer mutierten Ubiquitin- Variante mit Defekt in der Bildung von Polyubiquitin- Ketten.....	119
5.5 Nachweis der <i>in vivo</i> Interaktion zwischen RTA und Ubiquitin mit Hilfe der bimolekularen Fluoreszenz- komplementation (BiFC).....	121
5.5.1 Konstruktion der „Fänger“- und „Beute“-Plasmide zur Untersuchung der RTA-Ubiquitin Interaktion mittels BiFC.....	122
5.5.2 Positivkontrolle	124
5.5.3 Negativkontrolle	125
5.5.4 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Protein-Protein-Interaktion zwischen der Ricin A Kette und Ubiquitin	126

6. Beteiligung ER-luminaler Chaperone an der Retrotranslokation der Ricin A Kette.....	128
7. Ricin-Phänotyp ausgewählter Hefe-Deletionsmutanten mit Defekten in der ribosomalen Untereinheiten	132

Teil B: Entwicklung eines genetischen Screens zur Identifizierung neuer zellulärer Proteine, die an der Retrotranslokation der Ricin A-Kette beteiligt sind

1. Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) von G418 auf den Hefestamm BY4742	139
2. Untersuchung zur Hemmung der GFP-Translation in Hefen durch das Antibiotikum Geneticin (G418).....	141
3. Einfluss von Ricin A auf die Translation von GFP	143
4. Cotransformation ausgewählter Hefe-Deletionsmutanten zur Untersuchung der <i>in vivo</i> Toxizität von RTA mit Hilfe des Fluoreszenz-„Reader“-Systems.....	145

IV Diskussion 149

Untersuchung der <i>in vivo</i> Toxizität und des intrazellulären Transportes verschiedener RTA-Derivate	151
Untersuchung der Retrotranslokation der Ricin A Kette	163
Beteiligung klassischer ERAD-Komponenten	163
Nachweis der Ubiquitinierung der Ricin A Kette.....	169
Vergleich der Retrotranslokation von intrazellulär exprimiertem RTA unter Verwendung verschiedener ER-Importsignale.....	183
1. Retrotranslokation von Kar2-RTA/Kar2-RTA Δ	183
2. Retrotranslokation von K1-/K28-RTA	185

V Zusammenfassung 188

VI Literaturverzeichnis	192
Erklärung	247
Danksagung	248
Lebenslauf	251

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BiFC	„bimolecular fluorescence complementation“
bp	Basenpaare
CPY	Carboxypeptidase der Hefe
CPY*	Mutierte Variante der Carboxypeptidase
CT	Cholera Toxin
C-Terminus	Carboxyterminus von Proteinen
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
d/o	„drop out“
ds	doppelsträngig
DT	Diphtherie Toxin
DUB	Deubiquitinierungsenzym
EDTA	Ethylen-N, N, N', N'-Tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assozierte Degradation
GLB	„gel loading buffer“
GTE	Glukose-Tris-EDTA
h	Stunden
Hsp	Hitzeschockprotein
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	„Luria Bertani“
LiAc	Lithium-Acetat

LSM	„Laser scanning microscope“
LZZ	Lebendzellzahl
MCS	„multiple cloning site“
N-Terminus	Aminoterminus von Proteinen
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“
ori	Peplikationsursprung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pαF	Pro-α-Faktor
PAP	„pokeweed antiviral protein“
PCR	„polymerase chain reaction“
PEG	Polyethylenglykol
pptox	Präprotoxin
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
RIP	„ribosome-inactivating protein“
RNase	Ribonuklease
rpm	„rotations per minute“
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SLT	„Shiga-like“ Toxin
SOE-PCR	„Splicing by overlapping extension“ PCR
SP	Signalpeptid
ss	„single stranded“
Stx	Shiga Toxin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	„Tris buffered saline“
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydromethyl)-aminomethan
ü.N.	über Nacht
UE	Untereinheit
UPR	„unfolded protein response“
UV	Ultraviolett
v/v	„volume per volume“

w/o	„without“
w/v	„weight per volume“
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- β -D-Thiogalaktosid
YEPD	“Yeast” Extrakt Pepton Dextrose
YNB	“Yeast nitrogen base”

Abstract

The plant toxin ricin is a member of the so-called A-B toxin family in which a catalytic A subunit is associated with one or more cell-binding B subunits. Ricin reaches the Golgi apparatus of the target cell after receptor-mediated endocytosis and subsequently enters the endoplasmic reticulum. Once in the cytosol ricin A chain depurinates rRNA and blocks protein synthesis.

In this study, mechanism of ER-to-cytosol dislocation of ricin A chain were investigated in yeast cells. Intracellular expression of cytotoxic RTA variants in the ER lumen demonstrated that after signal peptide cleavage RTA can exploit ER-associated degradation (ERAD) to translocate into the cytosol of intoxicated yeast cells. Thereby RTA behaved like an ERAD-L substrate using Hrd1 complex for retrotranslocation as well as ERAD-C substrate ubiquitinated by the Doa10 complex. Polyubiquitination of RTA played a decisive role in ER-to-cytosol translocation of the toxin whereas a direct *in vivo* interaction of ricin A with ubiquitin was detected by using BiFC. Cdc48 complex and the protein Rpn10p of the proteasomal 19S cap are also involved in *in vivo* toxicity of RTA.

Das Pflanzentoxin Ricin gehört zur Familie der A/B Toxine, bei denen eine katalytische A-Kette mit ein oder mehreren B-Ketten assoziiert ist. Ricin gelangt über Rezeptor-vermittelte Endozytose zum Golgi-Apparat der Zielzelle und erreicht schließlich das Endoplasmatische Reticulum. Im Cytosol bewirkt die Ricin A Kette (RTA) durch Depurinierung der rRNA eine Hemmung der Proteinbiosynthese.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Mechanismus der ER/Cytosol-Dislokation der Ricin A Kette in Hefen näher untersucht. Durch die intrazelluläre Expression von cytotoxischen RTA-Varianten im ER-Lumen konnte gezeigt werden, dass nach Abspaltung der Signalsequenz die Ricin A Kette unter Ausnutzung der ER-assoziierten Degradation (ERAD) in das Cytosol transloziert. Dabei verhält sich RTA zum einen Teil als ERAD-L Substrat und nutzt den Hrd1-Komplex zur Retrotranslokation, auf der anderen Seite kann es aber auch als ERAD-C Substrat über den Doa10-Komplex ubiquitiniert werden. Die Polyubiquitinierung von Ricin A spielt eine entscheidende Rolle für die ER/Cytosol-Translokation des Toxins, wobei eine direkte *in vivo* Interaktion von Ricin A mit Ubiquitin mittels BiFC gezeigt werden konnte. Der Cdc48-Komplex sowie das Protein Rpn10p der 19S-Kappe des Proteasoms sind ebenfalls an der *in vivo* Toxizität von RTA beteiligt.

I Einleitung

1. Das Pflanzengift Ricin

Ein wichtiger Bestandteil der Evolution und ein probates Mittel in der Natur ist die Verwendung von Chemikalien zur Verteidigung oder als Angriffswaffen. Gifte finden sich in fast allen Klassen von Organismen, von Bakterien bis zu Säugetieren. Im Hinblick auf ihre chemischen Strukturen als auch auf ihre biologischen Wirkungen ist die Varianz der natürlichen Gifte besonders groß. Pflanzliche Toxine können neben dem Fraßschutz auch zur Abwehr von Mikroorganismen dienen. Eine Einteilung nach dem Wirkort ist kaum möglich, da die Giftwirkung häufig durch ein komplexes Gemisch unterschiedlicher Inhaltsstoffe verursacht wird. Der Begriff Toxin wurde ursprünglich für filtrierbare (subzelluläre) Stoffe benutzt, die Krankheiten auslösen. Als erstes wurde Diphtheriatoxin als ein von Bakterien (*Corynebacterium diphtheriae*) produziertes Gift erkannt (Roux and Yersin, 1888). Heute sind hunderte Toxine bekannt, deren Gemeinsamkeit die tödliche Wirkung auf lebende Zellen ist.

Ricin ist ein Pflanzengift, das in den reifen Samen der *Ricinus communis*-Pflanze, welche zur Familie der *Euphorbiaceae* (Wolfsmilchgewächse) gehört, gespeichert wird. Die Samen enthalten etwa 1-5 % Ricin (Balint, 1974; Bradberry *et al.*, 2003). Die subtropische bis tropische Pflanze wird in großem Maßstab, vorwiegend in Indien, Brasilien und China für die Herstellung von Ricinusöl angebaut. Die Ricinuspflanze ist eine der ältesten Arzneipflanzen, die schon um 1500 vor unserer Zeitrechnung in Ägypten eingesetzt wurde. Das aus den Früchten gewonnene Ricinusöl wird als starkes Abführmittel eingesetzt. Außerdem wird das Öl zur Herstellung von Farben, Lacken und Motorölen in Flugzeugen verwendet (Brugsch, 1960). Im Ricinusöl selbst ist kein aktives Ricin mehr zu finden, da das Toxin bei der Öl-Herstellung durch die hohen Temperaturen inaktiviert wird (Parker *et al.*, 1996; Burrows und Renner,

1999). Gereinigtes Ricin liegt als weißer Puder vor, welcher wasserlöslich und über einen weiten pH-Bereich stabil ist (Cope *et al.*, 1945; Parker *et al.*, 1996). Befindet sich das Toxin in Lösung, so kann es durch Inkubation für eine Stunde bei 80° C inaktiviert werden (Parker *et al.*, 1996). Ricin ist eines der stärksten Gifte biologischer Herkunft und ist in der Liste der verbotenen Stoffe des Chemiewaffenübereinkommens (CWÜ) aufgeführt. Bei einer oralen Aufnahme sind 3µg/kg (LD₅₀) tödlich. Die letale Menge kann durchaus durch den Verzehr eines Samens erreicht werden. Die weite Verbreitung der Ricinuspflanze und die einfache Aufbereitung des giftigen Ricins machen es zu einer bevorzugten biologischen Waffe. Ricin war bereits im Zweiten Weltkrieg unter dem Codenamen „W“ als Kampfstoff von den Alliierten bereitgestellt worden, wurde aber nie eingesetzt. In den Jahren 2003 und 2004 wurden Spuren von Ricin in einem Briefzentrum in South Carolina (USA) und in einem Briefumschlag, der an das Weiße Haus in Washington, D.C. adressiert war, entdeckt (Centers for Disease and Prevention (CDC), 2003). Weiterhin wurde das Toxin auch im Besitz von Anhängern terroristischer Verbindungen außerhalb der USA gefunden (Bale *et al.*, 2003; Mayor, 2003). Ricin-basierte Immunotoxine, bei denen RTA oder Ricin chemisch an monoklonale Antikörper gekoppelt sind, werden heute in der Krebstherapie eingesetzt (Blythman *et al.*, 1981; Lambert *et al.*, 1991).

1.1 Entdeckung und Struktur von Ricin

Im 19. Jahrhundert begann Hermann Stillmark mit Untersuchungen, um die Komponenten, die für die Toxizität der Ricinussamen verantwortlich sind, zu charakterisieren. Er stellte fest, dass Extrakte der Ricinussamen zur Agglutination von Erythrozyten führen. Außerdem konnte er die dafür verantwortliche Substanz isolieren und nannte sie „Ricin“ (Stillmark, 1888). Heute weiß man, dass Stillmark's „Ricin“-Extraktion sowohl das cytotoxische Ricin als auch das nicht toxische

Ricinus communis Agglutinin enthielt (Olsnes, 1978). Paul Ehrlich führte daraufhin Versuche mit Mäusen durch. Er zeigte, dass Mäuse, die wiederholt nicht-toxische Dosen von Ricin erhalten hatten, gegenüber einer tödlichen Dosis von Ricin immun waren (Ehrlich, 1891).

Bei Ricin handelt es sich um ein dimeres Glykoprotein, das aus den zwei Glykoproteinketten A (oder RTA für „ricin toxin A chain“) mit 32 kDa und B (oder RTB für „ricin toxin B chain“) mit 34 kDa besteht, die durch eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden sind. Jede Kette besitzt zwei N-Glykosylierungsstellen. Die Primärsequenz der Ketten wurde durch Proteinsequenzierung bestimmt (Funatsu *et al.*, 1978, 1979). Die Röntgenkristallstrukturen von Ricin und Ricin A wurden ebenfalls aufgeklärt (Montfort *et al.*, 1987; Weston *et al.*, 1994). RTA besitzt drei strukturelle Domänen, die etwa 50% des Polypeptids ausmachen und α -Helices oder β -Faltblätter enthalten (Katzin *et al.* 1991; Mlsna *et al.* 1993). Dagegen bildet RTB eine bilobale Struktur, α -Helices und β -Faltblätter fehlen (Villafranca und Robertus, 1981).

1.2 Funktion der Ricin-Untereinheiten

Ricin gehört zur Familie der A/B-Toxine, bei denen eine katalytische A-Untereinheit mit einer oder mehreren zellbindenden B-Untereinheiten assoziiert ist. RTB ist für die Bindung des Toxins an komplexe Kohlenhydrate auf der Zelloberfläche verantwortlich, die terminal N-Acetylgalactosamin oder β -1,4-Galaktosereste gebunden haben (Olsnes und Pihl, 1982). RTA hat die Funktion einer N-Glykosidase, die ein spezifisches Adenin von der zellulären 28S rRNA eukaryotischer Ribosomen entfernt und deshalb auch als Ribosomen-inaktivierendes Protein (RIP, Typ II) bezeichnet wird (Endo und Tsurugi, 1987). Dabei liegt das Ziel-Adenin in einem Tetraloop (GAGA), der sich innerhalb eines konservierten Bereiches von zwölf Ribonukleotiden befindet und als α -Sarcin/Ricin-Loop (SRL) bezeichnet wird (Szewczak *et al.* 1993). Dieser Bereich ist entscheidend für die Bindung des Elongationsfaktors EF2 während der Translation (Moazed *et al.*, 1988). Wird dieses Adenin

entfernt, bleibt das Phosphodiester-Rückgrat der rRNA zwar intakt (Endo und Tsurugi 1987), aber die Ribosomen, denen das Adenin fehlt, können keine Proteine mehr synthetisieren. RTA kann jedoch nicht alle Ribosomen gleichermaßen verändern. Die Ribosomen der Pflanzen reagieren fünfmal weniger empfindlich gegenüber RTA wie die Ribosomen von Säugetieren (Cawley *et al.*, 1977; Harley und Beevers, 1982; Taylor *et al.*, 1994). Prokaryoten sind gegenüber dem Toxin immun (Nilsson und Nygard, 1986). Es wird angenommen, dass einige ribosomale Proteine den Zugang des Toxins zu seinem Ziel erlauben oder verhindern. Außerdem kann Ricin nicht-ribosomale Substrate in menschlichen Endothelzellen verändern, die dadurch zu einer Adenosin-Glykosidase werden (Barbieri *et al.*, 1997; Brigotti *et al.*, 2002).

1.3 Biosynthese von Ricin

Ricin ist in den Speicher-Vakuolen der Endospermzellen von reifen *Ricinus communis*-Samen lokalisiert (Tulley und Beevers, 1976; Youle und Huang, 1976). Die Synthese von Ricin erfolgt während der Samenreifung (Roberts und Lord, 1981). Dabei gibt es mehrere Isoformen von Ricin (Ricin D, Ricin E, *Ricinus communis* Agglutinin (RCA)). Sie machen etwa 5% der Proteine in den reifen Samen aus. Die A- und B-Untereinheiten des Ricins werden gemeinsam als Teil eines Vorläufer-Polypeptids (576 AS) synthetisiert (Butterworth und Lord, 1983). Dieser Vorläufer wird als Präproricin bezeichnet und zeigt folgenden Aufbau: am N-Terminus befindet sich ein Signalpeptid (26 AS) für den cotranslationalen Import des naszierenden Polypeptids in das ER (Ferrini *et al.*, 1995). Darauf folgen ein 9 AS langes Propeptid, RTA, ein kurzes (12 AS) intramolekulares Propeptid (Linker-Propeptid) und RTB (Lamb *et al.*, 1985). Das N-terminale Signalpeptid wird im ER-Lumen entfernt und es entsteht ein Proricin. Dieses wird dann ebenfalls im ER-Lumen in seinem Kern glykosyliert (Lord, 1985a) und bildet fünf Disulfidbrücken (vier innerhalb von RTB und eine, die den C-Terminus

von RTA und den N-Terminus von RTB verbindet) aus, bevor es über den Golgi-Apparat zu den Speicher-Vakuolen transportiert wird (Lord, 1985b). Der Transport von Proricin erfolgt in PAC-Vesikeln („precursor accumulating vesicles“) (Hara-Nishimura *et al.*, 1998). Während dieses Transportes finden weitere Modifikationen statt, wie das kovalente Verknüpfen von Oligosacchariden und Fucose an RTA (Lord und Harley, 1985). Die beiden Propeptide werden nach der Aufnahme des Proricins in die Speicher-Vakuolen entfernt (Harley und Lord, 1985), wobei ein reifes, über eine Disulfidbrücke verbundenes, RTA-RTB-Dimer entsteht. Während die Funktion des N-terminalen Propeptids unklar ist, wird das Linker-Propeptid zwischen RTA und RTB für die Zielsteuerung von Proricin in die Vakuolen benötigt (Frigerio *et al.*, 1998b, 2001). Dieses Linker-Propeptid ist atypisch für ein Zielsteuerungssignal, da es intramolekular vorliegt, während sich solche Sequenzen typischerweise am C- oder N-Terminus befinden (Vitale und Raikhel, 1999). Außerdem enthält das Propeptid die Aminosäuresequenz LIRP. Diese ähnelt dem Sortiersignal NPIR, das von Proteinen benutzt wird, die nicht für die Speicher-Vakuolen, sondern für lytische Vakuolen in vegetativen Pflanzengewebe bestimmt sind. Aufgrund dieser Tatsache wird spekuliert, ob die zur BP80-Familie gehörenden vakuolären Sortierrezeptoren, die NPIR-Proteine zu lytischen Vakuolen dirigieren, auch an der Zielsteuerung von Proricin zu den Speicher-Vakuolen beteiligt sind (Frigerio *et al.*, 2001).

Rekombinantes Proricin ist zwar als Lektin funktionell und kann an Galaktose binden, aber es besitzt keine RNA N-Glykosidase-Aktivität (Richardson *et al.*, 1989). Diese Tatsache bestätigt die Berichte verschiedener Arbeitsgruppen, dass RTA seine katalytische Aktivität als N-Glykosidase erst erlangt, wenn es proteolytisch von RTB abgespalten wird (Lewis und Youle, 1986; Wright und Robertus, 1987). Denn sowohl bei dem reifen RTA-RTB Toxin als auch bei Proricin scheint RTB die aktive Seite von RTA sterisch zu blockieren. Die gemeinsame Biosynthese von RTA und RTB als inaktive Vorstufen erklärt, warum die *Ricinus*-Endospermien große Toxinmengen synthetisieren können,

ohne dass ihre eigenen Ribosomen empfänglich für das Toxin werden (Harley und Beevers, 1982). Trotzdem muss die Pflanzenzelle sich schützen, falls es zu Fehlern bei der Synthese oder Prozessierung der Präproricin-mRNA kommt und so mutiertes Toxin entsteht. Die Gefahr für die Zelle liegt in freiem RTA, das die ER-Membran in Richtung Cytosol durchquert und dort die Ribosomen schädigen kann (Di Cola *et al.*, 2001). Zwei Lysinreste sichern die schnelle Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von naszierendem RTA oder von RTA-Fragmenten, die durch vorzeitige Termination bei der Präproricin-mRNA-Translation entstanden sind (Lord und Roberts, 2005). Durch den Transport des Toxins in die Vakuole und die Reifung erst innerhalb dieser, schützt sich die Pflanze vor dem eigenen Toxin. Der niedrige pH-Wert in den Vakuolen ist dafür verantwortlich, dass die Disulfidbrücke zwischen RTA und RTB stabilisiert wird (Argent *et al.*, 2000). Durch die Speicherung von katalytisch aktivem Toxin in einem abgegrenzten Kompartiment, den Vakuolen, ist es den Ricinussamen möglich, große Mengen an Ricin zu synthetisieren und zu speichern, ohne ihr eigenes Überleben zu gefährden. Für das Toxin selbst wird spekuliert, dass es als Fraßschutz von der Pflanze produziert wird (Lord und Roberts, 2005).

1.4 Intoxifikation von Säugerzellen mit Ricin

Die meisten Säugetierzellen besitzen auf ihrer Oberfläche verschiedene Glykoproteine und Glykolipide, an welche Ricin binden kann (Sandvig *et al.*, 1976), wobei nicht alle als Rezeptoren für Ricin fungieren. Ricin bindet an komplexe Glykane mit N-terminalem N-Acetylgalaktosamin oder β -1,4 gebundenen Galaktoseresten (Olsnes und Pihl, 1982). Glykosphingolipide dienen nicht als Rezeptoren (Spilsberg *et al.*, 2003). Ricin kann aber auch mit Hilfe seiner eigenen N-terminal gebundenen Glykane an die Zelloberfläche binden. Eine kleine Anzahl von Zellen exprimiert Mannose-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, an die Ricin binden kann. Diese Rezeptoren wurden auf Makrophagen (Simmons *et*

al., 1986) und Leberendothelzellen der Ratte (Magnusson *et al.*, 1993) nachgewiesen. Die Aufnahme des Toxins in die Säugetierzelle erfolgt mittels Endozytose. Dieser Prozess kann entweder Clathrin-vermittelt oder Clathrin-unabhängig erfolgen (Moya *et al.*, 1985). Die Clathrin-unabhängige Endozytose (Nicholas und Lippincott-Schwartz, 2001) schließt die Aufnahme durch Caveolae (Pelkmans *et al.*, 2001) und Makropinocytose (Grimmer *et al.*, 2002) ein. Sie kann Dynamin-abhängig oder unabhängig von Dynamin erfolgen (Damke *et al.*, 1995). Wird dieser Clathrin-unabhängige Mechanismus durch Cholesterol-Extraktion gestört, können die Zellen über alternative Wege weiterhin Ricin aufnehmen (Rodal *et al.*, 1999). Ricin kann somit verschiedene Eintrittswege nutzen, die derzeit jedoch noch nicht vollständig verstanden sind. Unabhängig vom Mechanismus des Zelleintritts, endet Ricin nach der Internalisierung in den Endosomen. Von dort wird der größte Teil des aufgenommenen Toxins entweder zur Zelloberfläche zurücktransportiert oder zu den Lysosomen gebracht, wo es abgebaut wird (Sandvig und van Deurs, 1996). Nur eine kleine Menge Ricin (5%) tritt in den Golgi-Apparat ein (van Deurs, 1988). Wird der Golgi-Apparat durch Gifte wie Brefeldin A zerstört (Sandvig *et al.*, 1991; Yoshida *et al.*, 1991; Prydz *et al.*, 1992) oder wird der Transport vom Endosom zum Golgi-Apparat mittels Temperaturerniedrigung blockiert (Sandvig und van Deurs 1996), werden die Zellen gegenüber der toxischen Wirkung von Ricin geschützt. Der Transport des Toxins zum oder durch den Golgi-Apparat ist somit wichtig, damit ein toxischer Effekt auftritt. Dabei kann Ricin über verschiedene Wege zum Golgi-Apparat gelangen. Eine Möglichkeit stellt die Rab9-abhängige Route dar, über die Mannose-6-Rezeptoren von späten Endosomen zum trans-Golgi-Netzwerk transportiert werden (Lombardi *et al.*, 1993; Riederer *et al.*, 1994). Der Transport kann auch unabhängig von Rab9 erfolgen (Simpson *et al.*, 1995; Sandvig und van Deurs, 2002). Ob dieser alternative Transportweg vom frühen oder vom späten Endosom zum Golgi-Apparat stattfindet, ist jedoch unklar. Ebenso unbekannt ist, wie der retrograde Transport von Ricin vom Golgi-Apparat zum ER erfolgt. Der klassische retrograde Transport von löslichen Proteinen des ER-

Lumens erfolgt über COPI-umhüllte Vesikel (Cosson und Letourneur, 1994, 1997). Die betreffenden Proteine besitzen eine C-terminale KDEL-Sequenz (Lys-Asp-Glu-Leu), die vom zellulären KDEL-Rezeptor gebunden wird und einen Rücktransport zum ER ermöglicht. Die meisten A/B-Toxine besitzen ein KDEL-ähnliches ER-Retentionssignal, RTA hingegen fehlt ein solches Motiv. Deshalb wird vermutet, dass Ricin an Proteine bindet, die ein solches ER-Retentionssignal enthalten (Griffith *et al.*, 1994) und dadurch indirekt in den Golgi-Apparat gelangt. Es konnte gezeigt werden, dass Ricin mit dem Chaperon Calreticulin, welches ein KDEL-Motiv besitzt, wechselwirken kann (Day *et al.*, 2001). Dieser Golgi-ER Transportweg stellt wahrscheinlich nicht die Haupttransportroute für Ricin dar, denn Zellen, denen Calreticulin fehlt, bleiben sensitiv für Ricin. Es wird außerdem spekuliert, dass Ricin den Golgi-Komplex ähnlich wie das Cholera Toxin durchlaufen kann. Dieses Toxin gelangt direkt vom trans-Golgi-Netzwerk zum ER ohne die Golgi-Cisternen zu passieren und unabhängig von COPI-Vesikeln und dem KDEL-Rezeptor (Feng *et al.*, 2004). Ein COPI-unabhängiger Weg wurde ebenfalls beim retrograden Transport des *Shigella*-Toxins identifiziert. Dieser Transport wird durch Rab6A reguliert (Girod *et al.*, 1999). Durch Versuche an 1d1F CHO-Zellen, die eine temperatursensitive Mutation in der ϵ -COP-Untereinheit tragen, und bei der restriktiven Temperatur mit Ricin behandelt wurden, konnte nachgewiesen werden, dass die Zellen für eine Intoxifikation empfänglich bleiben (Chen *et al.*, 2002). Bei einer Ausschaltung des COPI-unabhängigen Wegs fand ebenfalls eine Intoxifikation statt. Ricin scheint somit in 1d1F CHO-Zellen einen alternativen Weg von den Endosomen zum ER zu nehmen, der den Golgi-Apparat umgeht (Llorente *et al.*, 2003). Damit Ricin die zellulären Ribosomen erreicht, muss es die ER-Membran passieren. In den neunziger Jahren wurde angenommen, dass für diesen Transport bestimmte Kanäle zur Verfügung stehen (Pelham *et al.*, 1992). Dazu zählen TAP („abundant peptide transporter“) (Russ *et al.*, 1995) und/oder Sec61p-Komplexe (Johnson und van Maes 1999), die in die ER-Membran integriert sind. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen, denen TAP fehlt, trotzdem für

Ricin empfänglich sind (Sandvig und van Deurs, 1996; Smith *et al.*, 2002). Die Möglichkeit, dass Sec61-Komplexe an der Translokation von Ricin beteiligt sind, verstärkte sich, als entdeckt wurde, dass diese Komplexe am Transport falsch gefalteter Proteine vom ER zum Cytosol beteiligt sind (Tsai und Rapoport, 2002). Dieser Vorgang wird als Retrotranslokation bezeichnet. Er ist Teil der zellulären ER-Qualitätskontrolle, bei der falsch gefaltete oder entfaltete Proteine erkannt und zum proteasomalen Abbau in das Cytosol exportiert werden (Sommer und Wolf, 1997). Dieser Prozess wird als ER-assoziierte Degradation (ERAD) bezeichnet. Die Sec61-Komplexe werden mit der Retrotranslokation von Ricin (Simpson *et al.*, 1999; Wesche *et al.*, 1999) und anderen Toxinen wie *Pseudomonas* Exotoxin A (JO *et al.*, 2000; Koopman *et al.*, 2000), Cholera Toxin (Schmitz *et al.*, 2000) und K28-Toxin (Eisfeld *et al.*, 2000) in Verbindung gebracht. Außerdem zeigten CHO-Zelllinien mit einem genetischen Defekt in der ER-assoziierten Degradation eine zunehmende Resistenz gegen Ricin (Teter und Holmes, 2002). Da Ricin ein natives Protein ist, wird vermutet, dass Toxine wie Ricin vom ER ins Cytosol gelangen, indem sie sich als ERAD-Substrate maskieren (Lord, 1996; Hazes und Read, 1997). Frigerio *et al.* (1998) zeigten, dass Toxin-Heterodimere (RTA-RTB) im ER-Lumen für eine Retrotranslokation inkompetent sind (Frigerio *et al.*, 1998). Im ER-Lumen wird deshalb die Disulfidbrücke zwischen RTA und RTB reduziert. Die reduktive Spaltung führt zur Freilegung einer hydrophoben Region am C-Terminus von RTA, die es dieser Untereinheit erlaubt, mit der ER-Membran, mit Chaperonen sowie mit dem Sec61-Translocon in Kontakt zu treten (Simpson *et al.*, 1999). Was mit der reduzierten B-Kette passiert, ist bisher unklar.

Es war auffallend, dass die katalytische Untereinheit einer ganzen Reihe von Toxinen, die das ER erreichen, nur wenige Lysinreste besitzen (Hazes und Read, 1997). RTA enthält zwei Lysinreste, andere TyplI-RIPs tragen im Durchschnitt ebenfalls zwei Lysinreste. Die TyplI-RIPs, die Säugetierzellen normalerweise nicht mittels Endozytose penetrieren, enthalten im Durchschnitt achtzehn Lysinreste (Deeks *et al.*, 2002). Es wird vermutet, dass RTA aufgrund seiner wenigen

Lysinreste die ER-assoziierte Degradation ausnutzen kann und einer Lysin-gesteuerten Ubiquitinierung weitestgehend entkommt. In Versuchen mit RTA-Varianten, die zusätzliche Lysinreste enthielten, konnte gezeigt werden, dass diese Reste einen gesteigerten proteasomalen Abbau von RTA fördern (Deeks *et al.*, 2002). Der geringe Lysingehalt erlaubt Ricin eine verlängerte Halbwertszeit im Cytosol, lang genug, um Zielsubstrate zu zerstören. Der größte Teil des über ERAD exportierten RTA wird proteasomal abgebaut. Die Frage ist, wie ein geringer Anteil diesem Abbau entgeht und so die Zelle schädigen kann. Natives RTA ist extrem resistent gegenüber proteolytischem Abbau, während falsch gefaltetes oder entfaltetes RTA Protease-sensitiv ist (Walker *et al.*, 1996). Damit RTA die ER-Membran passieren kann, muss es sich teilweise entfalten. Nach der Translokation wird der größte Teil des entfalteteten RTA proteasomal abgebaut. Ein kleiner Teil gewinnt seine native Konformation wieder zurück und wird resistent gegenüber dem Abbau (Simpson *et al.*, 1999).

2. Ribosomen-inaktivierende Proteine

Ribosomen-inaktivierende Proteine (RIPs) sind Enzyme, die Ribosomen irreversibel schädigen, indem sie einen oder mehrere Adenin-Reste von der zellulären rRNA entfernen (Stirpe und Batelli, 2006). Dabei gibt es zwischen den verschiedenen RIPs jedoch Unterschiede bezüglich ihrer Cytotoxizität. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurden zwei potentielle Toxine, Ricin aus *Ricinus communis* und Abrin aus *Abrus precatorius*, entdeckt und von Paul Ehrlich benutzt, um die ersten Antikörper zu entwickeln (Ehrlich, 1891). Erst etwa 70 Jahre später, nachdem die Struktur und die Wirkungsweise der beiden Toxine analysiert worden war, zählte man Ricin und Abrin zu den ersten identifizierten RIPs (Olsnes and Pihl, 1973). Für die Einteilung der RIPs wurden verschiedene Ansätze vorgeschlagen (Walsh *et al.*, 1994; Reinbothe *et al.*, 1994; Peumans *et al.*, 2001; Van Damme *et al.*, 2001), wobei sich die ursprüngliche

Einteilung in zwei Klassen, Typl-RIPs und TyplI-RIPs, am besten durchgesetzt hat. Typl-RIPs bestehen aus einer einzigen Polypeptidkette und haben eine Größe von etwa 30 kDa, während TyplI-RIPs aus zwei Untereinheiten aufgebaut sind. Eine Untereinheit ist etwa 30 kDa groß, während die andere Untereinheit etwa 35 kDa groß ist und ein Lektin darstellt (Barbieri und Stirpe, 1982). Insgesamt wurden mehr Typl- als TyplI-RIPs beschrieben, wobei jedoch nur wenige hochtoxische TyplI-RIPs zu finden sind. Die TyplI-RIPs werden deshalb nochmals in toxische und nicht-toxische Proteine unterteilt (Stirpe, 2004). Zu den stärksten TyplI-RIPs zählen Volkensin aus *Adenia volkensis*, Abrin aus *Abrus precatorius* und Ricin aus *Ricinus communis* (Audi *et al.*, 2005). Die RIPs sind in der Natur weitverbreitet und ubiquitär in der Pflanzenwelt. Typl-RIPs findet man in verschiedenen Konzentrationen bei einer Vielzahl von Pflanzen, darunter auch Pflanzen, die roh verzehrt werden wie zum Beispiel Spinat und Tomaten (Prestle *et al.*, 1992; Ishizaki *et al.*, 2002; Barbieri *et al.*, 2006). Während Ricin lediglich in den Samen der Ricinus-Pflanze zu finden ist, ist Saporin in allen Geweben des Seifenkrauts anzutreffen (Ferreras *et al.*, 1993). Es kommt auch vor, dass ein Typl-RIP zusammen mit einem TyplI-RIP in derselben Pflanze zu finden ist (z. B. *Cinnamomum camphora*) oder aber ein toxisches RIP zusammen mit einem nicht-toxischen RIP coexistiert, wie z. B. Ricin und *Ricinus* Agglutinin in den Ricinussamen (Knight, 1979; Ling *et al.*, 1995). Weitere Produzenten von RIPs können Bakterien (z.B. Shiga Toxin aus *Shigella dysenteriae* und Shiga-„like“ Toxin aus pathogenen *Escherichia coli*-Stämmen), Algen (z. B. *Laminaria japonica*) sowie verschiedene Pilze sein (Sandvig, 2001; Girbes *et al.*, 2004; Stirpe, 2004). Betrachtet man die enzymatische Wirkungsweise der RIPs, so scheinen alle diese Proteine als N-Glykosidase zu fungieren, wobei sie einen spezifischen Adenin-Rest von der 28S rRNA entfernen. Trotzdem bestehen Unterschiede bezüglich der Wirkungsweise der verschiedenen RIPs auf die Ribosomen. So benötigen einige RIPs ATP und Cofaktoren, um ihre enzymatische Aktivität entfalten zu können (Carnicelli *et al.*, 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Shiga-Toxin und Ricin zu einer

frühen Schädigung von nukleärer DNA in Endothelzellen führen. Dies geschieht entweder gleichzeitig mit Hemmung der Proteinbiosynthese (Ricin) oder aber nach erfolgter Blockade der Translation (Shiga-Toxin), was vermuten lässt, dass diese Toxine eventuell in den Zellkern gelangen können (Brigotti *et al.*, 2002).

Auf der anderen Seite spielen die RIPs jedoch auch eine wichtige Rolle in der Landwirtschaft und in der Medizin, denn sie besitzen eine antivirale Wirkung und werden außerdem für die Herstellung von Antikörper-Konjugaten eingesetzt (sogenannte „Immunotoxine“). Es gibt zahlreiche TypI-RIPs, die eine antivirale Wirkung auf Pflanzen-, Pilz- und Tier-Viren besitzen (Wang und Tumer, 2000; Parikh und Tumer, 2004), aber nur wenige TypII-RIPs (z.B. das Toxin aus *S. nigra*) mit einer entsprechenden Wirkung (Kumar *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 2002). Die Tatsache, dass RIPs antiviral gegenüber Tier-Viren wirken, führte zu einer Reihe von Studien, die sich mit der Wirkung dieser Proteine auf HIV-infizierte Zellen beschäftigten. Die Replikation von HIV wurde durch einige RIPs inhibiert (z. B. Trichosanthin aus *Trichosanthes kirilowii*, PAP aus *Phytolacca americana*), was darauf hoffen ließ, die Toxine für die Aids-Therapie einsetzen zu können (Parikh und Tumer, 2004; Shaw *et al.*, 2005). Leider lieferten die klinischen Studien mit Trichosanthin nicht den gewünschten Erfolg. Das Problem bestand darin, dass keine Immunantwort gegen das zugeführte Toxin ausgelöst wurde und es außerdem zum Auftreten neurologischer Symptome kam (Garcia *et al.*, 1993; Kahn *et al.*, 1994). Der Mechanismus, durch welchen die RIPs ihre antivirale Wirkung entfalten, ist immer noch ungeklärt. Anfangs wurde vermutet, dass die Proteine in Kontakt mit den infizierten Zellen treten und deren Ribosomen schädigen, was zum Zelltod und zum Arrest der viralen Proliferation führen sollte. Durch die Einführung rekombinanter Techniken konnten schließlich mutierte RIPs hergestellt werden, und es wurde möglich, die antiviralen und Ribosomen-inaktivierenden Eigenschaften der Toxine voneinander zu trennen (Stirpe und Batelli, 2006). So führt TAP29 (verändertes Trichosanthin) bei einer

bestimmten Konzentration zu einer HIV-Inhibition, hat jedoch nur einen geringen Effekt auf die Ribosomen (Lee-Huang *et al.*, 1991). Es wurde vermutet, dass der Mechanismus der antiviralen Wirkung der RIPs sich von dem Mechanismus ihrer N-Glykosidase-Aktivität unterscheidet. Eine PAP-Mutante zeigte keine Depurinierung der Ribosomen mehr, war aber immer noch in der Lage, eine Virusinfektion in Tabakpflanzen zu verhindern (Tumer *et al.*, 1997; Zoubenko *et al.*, 2000), während eine Trichosanthin-Mutante, die den größten Teil ihrer anti-HIV Aktivität verloren hatte, weiterhin eine komplette N-Glykosidase-Aktivität besaß (Wang *et al.*, 2003).

Die Fusion der RIPs an Carrier-Proteine wie zum Beispiel Antikörper, Wachstumsfaktoren, Hormone oder Lektine erlaubt den spezifischen Transport der Toxine zu einem bestimmten Zelltyp. Diese sogenannten Immunotoxine sollten vor allem in der Krebstherapie zum Einsatz kommen (Theuer und Pastan, 1993; Oldfield und Youle, 1993; Frankel *et al.*, 2003), aber auch zur Behandlung von Spasmus und Augenerkrankungen eingesetzt werden sowie in der Schmerztherapie (Clark *et al.*, 1998; Bolognesi und Polito, 2004; Harrison *et al.*, 2004; Ralston, 2005). TyplI-RIPs sind für den Therapieeinsatz nicht geeignet, da ihre B-Ketten an die Oberfläche jeder beliebigen Zelle binden können. Deshalb werden nur TyplI-RIPs sowie die A-Ketten der TyplI-RIPs für diese Art der Anwendung verwendet (Bolognesi und Polito, 2004; Fracasso *et al.*, 2004). Die Tatsache, dass die RIP-basierenden Immunotoxine sehr stark in ihrer Wirkung sind und sowohl sich teilende als auch nicht teilende Zellen attackieren, verschafft ihnen einen Vorteil gegenüber den konventionellen Chemotherapeutika. Doch trotz dieser Tatsache konnte der Einsatz von Immunotoxinen in der Krebstherapie die erwarteten Hoffnungen bis jetzt noch nicht erfüllen. Die größten Schwierigkeiten bereiten die Nebenwirkungen. So kam es zur Bildung von Antikörpern gegen die Immunotoxine mit anschließenden allergischen Reaktionen bis hin zum anaphylaktischen Schock. Aber auch Niereninsuffizienz, Fieber, Myalgien und Lebervergiftung traten als Nebeneffekte auf (Fracasso *et al.*, 2004).

Es sollte auch nicht unerwähnt bleiben, dass einige TypII-RIPs als Biogefährdung eingestuft und als Biowaffe missbraucht werden. Vor allem das Pflanzengift Ricin kann relativ einfach produziert und aufgereinigt werden. Wird das Toxin injiziert oder inhaliert, dann ist es bereits in kleinen Mengen tödlich. So wurde der bulgarische Journalist und Regime-Kritiker Georgi Markov 1978 in London durch eine Ricin-Injektion in seinen Oberschenkel getötet, der Täter wurde bis heute nicht gefasst (Knight, 1979; Papaloucas *et al.*, 2008). Die Sorge, dass Ricin oder ähnliche Toxine über die Luft als Staub oder Aerosol verteilt werden könnten, regte eine Vielzahl von Studien an. So ließ man Ratten Ricin bzw. Abrin inhalieren und stellte fest, dass die Schädigung auf das Lungenepithel beschränkt war (Griffiths *et al.*, 1995). Ein Anliegen vieler Studien bestand darin, eine Methode zu entwickeln, mit der man Ricin detektieren und quantifizieren konnte, um so im Ernstfall schnelle Ergebnisse zu erhalten. So wurden Methoden entwickelt, die ähnlich wie ein Immunoassay funktionieren und es wurden massenspektrometrische Analysen durchgeführt (Rubina *et al.*, 2005; Fredriksson *et al.*, 2005). Für das Toxin Viscumin aus *Viscum album* wurde ein Immuno-PCR Ansatz bereitgestellt (Adler *et al.*, 2003). Weiterhin wird immer noch versucht, Antikörper und Vakzine herzustellen, um einen Schutz gegen eine Ricin-Kontamination zu erhalten (Guo *et al.*, 2005; Mantis, 2005; Middlebrook, 2005; Marsden *et al.*, 2005). Obwohl die zahlreichen Studien über RIPs in den letzten Jahren schon einige Einblicke in die Struktur und Wirkungsweise dieser Proteine erbrachten, bleiben doch noch viele Aspekte ungeklärt.

3. A/B Toxine und die ER-assozierte Degradation (ERAD)

Das Pflanzentoxin Ricin zählt neben weiteren Proteintoxinen wie Shiga Toxin aus *Shigella dysenteriae* und Shiga-„like“ Toxin aus pathogenen *Escherichia coli*-Stämmen zur Familie der A/B-Toxine, bei denen eine katalytische A-Kette mit einer oder mehreren zellbindenden B-Ketten kovalent verbunden ist. Während Ricin eine B-Untereinheit besitzt, ist

die A-Kette von Shiga-Toxin mit fünf B-Ketten assoziiert (Sandvig und van Deurs, 2002). Die Toxine werden zunächst als nicht-toxische Vorstufe synthetisiert und erst später durch proteolytische Spaltung aktiviert (Spooner *et al.*, 2006). So erfolgt die Aktivierung von Ricin noch in den Samen der *Ricinus communis*-Pflanze selbst, während Shiga-Toxin und Shiga-„like“ Toxin erst nach Aufnahme in die Zielzelle in den frühen Endosomen bzw. Recycling-Endosomen aktiviert werden (Sandvig *et al.*, 2004). Die Bindung der Toxine über ihre B-Kette(n) an ihre jeweiligen Rezeptoren auf der Zelloberfläche ist ausschlaggebend für die endozytotische Aufnahme. Die Toxine der Shiga-Toxin-Familie binden an die Trisaccharid-Domäne von Globotriaosylceramiden (Gb₃/CD77) (Jacewicz *et al.*, 1986; Lindberg *et al.*, 1987; Waddell, Cohen und Lingwood, 1990). Für das Pflanzentoxin Ricin konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt keine spezifischen Rezeptoren gefunden werden. Die B-Kette von Ricin ist ein Lektin, das sowohl Glykoproteine als auch Glykolipide mit endständigen Galaktoseresten bindet und somit auf der gesamten Zelloberfläche Möglichkeiten zur Bindung findet (Sandvig *et al.*, 1976; Sandvig und van Deurs, 2002; Spooner *et al.*, 2004). Nach der Internalisierung werden die Toxine schließlich retrograd bis zum ER transportiert. Dabei scheint es jedoch keinen einheitlichen Transportmechanismus zu geben, der für alle Toxine gleichermaßen zutrifft (Spooner *et al.*, 2006). Während Toxine der Shiga Toxin-Familie in Abhängigkeit von der kleinen GTPase Rab9 von den Endosomen zum trans-Golgi-Netzwerk transportiert werden (Lombardi *et al.*, 1993), gelangt Ricin Rab9-unabhängig zum Golgi-Apparat (Iversen *et al.*, 2001). Auch die Route vom trans-Golgi-Netzwerk zum endoplasmatischen Reticulum variiert zwischen den Toxinen. Über den Golgi/ER-Transport von Ricin ist sehr wenig bekannt. Das Toxin besitzt kein KDEL-ähnliches Signal wie z. B. *Pseudomonas* Exotoxin A und kann somit nicht mit Hilfe der zellulären KDEL-Rezeptoren in das ER-Lumen gelangen. Es wurde jedoch gezeigt, dass Ricin mit dem Chaperon Calreticulin im Golgi-Apparat interagiert. Calreticulin besitzt ein KDEL-Motiv und gelangt mit Hilfe von zellulären KDEL-Rezeptoren COPI-abhängig zum Endoplasmatischen

Retikulum. Dies scheint jedoch nicht die Hauptroute für Ricin zu sein, da Zellen, denen Calreticulin fehlt, weiterhin sensitiv für Ricin sind (Day *et al.*, 2001). Im ER schließlich wird die Disulfidbrücke zwischen den beiden Ricin-Untereinheiten mit Hilfe der Proteindisulfid-Isomerase (PDI) reduziert und die A-Kette zum Teil entfaltet (Tsai *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass das komplette Toxin inaktiv gegenüber freien Ribosomen *in vitro* ist, da die B-Kette eine sterische Hinderung für die A-Kette darstellt und diese an der Ausübung ihrer katalytischen Aktivität hindert (Richardson *et al.*, 1989). Dies würde bedeuten, dass die Trennung der Untereinheiten für die Toxizität der Toxine ausschlaggebend ist. Auch für Shiga Toxin scheint die PDI eine wichtige Rolle bei der Trennung der Toxin-Untereinheiten zu spielen (Orlandi, 1997; Spooner *et al.*, 2006). Weiterhin gibt es Hinweise, dass das Sec61-Translocon am ER-Export der Proteintoxine beteiligt ist (Wesche, Rapak und Olsnes, 1999; Koopmann *et al.*, 2000; Yu und Haslam, 2005). Unklar bleibt weiterhin, welches die treibende Kraft für die ER-Dislokation der Toxine sein könnte. Es ist jedoch anzunehmen, dass dabei ein cytosolischer Motor involviert ist. Fast alle fehlgefalteten Proteine im ER werden während der Translokation der ER-Membran polyubiquitiniert (Spooner *et al.*, 2006). Die AAA-ATPase p97 und ihre Adaptor-Moleküle Ufd1 und Npl4 sind bei der Dislokation einer ganzen Reihe von ERAD-Substraten involviert und es ist somit anzunehmen, dass dieser Komplex auch bei der Toxin-Dislokation beteiligt sein könnte (Abujarour *et al.*, 2005; Kothe *et al.*, 2005).

Ungefähr ein Drittel aller Proteine in eukaryotischen Zellen treten über das Endoplasmatische Retikulum (ER) in den Sekretionsweg ein (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Die Proteine translozieren die ER-Membran in ungefaltetem Zustand über einen engen Kanal, welcher von dem heterotrimeren Sec61p-Komplex gebildet wird (Matlack *et al.*, 1998). Im ER-Lumen befinden sich molekulare Chaperone, die die Proteinfaltung unterstützen, sowie weitere Enzyme, die für co- und posttranslationale Modifikationen (z. B. N-Glykosylierung, Ausbildung von Disulfidbrücken) zuständig sind. Die korrekte Faltung der Proteine

im ER-Lumen wird durch einen ER-Qualitätskontroll-Mechanismus, die ER-assoziierte Degradation (ERAD), sichergestellt (Ellgaard und Helenius, 2003). Die primären Komponenten dieser Qualitätskontrolle sind molekulare Chaperone. Diese helfen den Polypeptiden nicht nur bei deren Faltung, sondern sie begutachten auch deren Konformation. Erlangt ein Polypeptid seine native Konformation, so wird es letztendlich zu seinem Bestimmungsort weitergeleitet. Kommt es jedoch zum Auftreten inkorrekturer Konformationen, so wird das entsprechende Substrat entweder einem erneuten Faltungszyklus unterworfen oder es wird für die ER-assoziierte Degradation markiert (Mc Cracken und Brodsky, 1996). Erste Hinweise auf die Existenz für einen ERAD-Pathway lieferten Studien von Lippincott-Schwartz *et al.* (1988), die das „Turnover“ von Untereinheiten des heptameren T-Zell-Rezeptor Komplexes untersuchten (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1988). Die Studien von Sommer und Jentsch (1993) ließen vermuten, dass die Degradation von ER-Proteinen einen cytoplasmatischen Faktor benötigt. Sie konnten in der Hefe zeigen, dass eine thermosensitive Mutation in dem *SEC61*-Gen, welches für den Translokationskanal Sec61p in der ER-Membran codiert, durch die Disruption von *UBC6*, einem Gen, das für ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2) codiert, funktionell komplementiert wird. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass das Proteasom fehlgefaltete ER-Membranproteine degradiert, da die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme für die Ubiquitinierung von Proteasom gesteuerten Substraten verantwortlich sind (Sommer und Jentsch, 1993). Dieses Model wurde von späteren Studien an dem humanen Cystischen Fibrose Transmembran-Regulator (CFTR), einem Chloridkanal in der Plasmamembran, der, wenn er mutiert ist, zu Cystischer Fibrose führt, untermauert (Jensen *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1995). Kurz darauf konnte ebenfalls in Hefe gezeigt werden, dass fehlgefaltete lösliche ER-Proteine wie z. B. der Pro-alpha-Faktor (pαF) oder die fehlgefaltete Form der hefeeigenen vakuolären Protease Carboxypeptidase Y (CPY^{*}) durch das Proteasom degradiert werden. Damit dies möglich ist, müssen die entsprechenden Substrate vom ER in das Cytosol retrotransloziert werden (Mc Cracken und Brodsky,

1996; Werner *et al.*, 1996; Hiller *et al.*, 1996). Neuere Untersuchungen belegen, dass auch Toxine wie z. B. Cholera-Toxin, Shiga-Toxin und Ricin, Elemente der ER-assoziierten Degradation nutzen, um ihre Zielzellen zu vergiften (Lord *et al.*, 2005). Eine Vielzahl der Komponenten, die für ERAD benötigt werden, wurden bereits durch genetische als auch biochemische Ansätze identifiziert (Sayeed und Ng, 2005; Herbert und Molinari, 2007; Nakatsukasa und Brodsky, 2008). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde deutlich, dass ERAD-Substrate zunächst als solche erkannt werden müssen und dann zur ER-Membran transportiert werden. Danach erfolgt die Retrotranslokation und Polyubiquitinierung der entsprechenden Proteine und schließlich die Degradation durch das 26S Proteasom. Es konnten einzelne Komponenten entdeckt werden, die bestimmte Schritte während des ERAD-Prozesses katalysieren, wobei die meisten dieser Proteine von der Hefe zum Menschen konserviert vorliegen (Vembar und Brodsky, 2008). Fehlfaltete Proteine sind jedoch nicht die einzigen Substrate für die ER-assoziierte Degradation. So wird der regulierte Abbau eines Schlüsselenzyms des Mevalonat-Weges, nämlich HMGR (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase), mit Hilfe dieses Mechanismus reguliert (Hampton, 2002). In der Hefe gibt es zwei Isozyme der HMG-CoA-Reduktase, Hmg1p und Hmg2p. Während Hmg2p durch den Ubiquitin-Proteasom „Pathway“ degradiert wird, bleibt Hmg1p stabil. Bei der Untersuchung der ER/Cytosol Dislokation von Hmg2p wurden eine Reihe von involvierten ERAD-Komponenten identifiziert, darunter der Ubiquitin-Ligase-Komplex Hrd1p/Der3p in der ER-Membran (Bays *et al.*, 2001; Deak und Wolf, 2001). Diese Beobachtung ließ darauf schließen, dass Hmg2p durch eine Konformations-änderung in ein Substrat der ER-Qualitätskontrolle umgewandelt wurde und so seine Degradation selbst steuert (Shearer und Hampton, 2004; 2005).

Die Mechanismen der ER-assoziierten Degradation variieren von Organismus zu Organismus. Das gemeinsame Bindeglied zwischen den verschiedenen ERAD-Wegen ist der letzte Schritt: die Degradation der Substrate durch das 26S-Proteasom. Dabei besitzen alle ERAD-

Systeme bestimmte Faktoren, welche die fehlgefalteten Substrate erkennen, diese über die ER-Membran transportieren und sie letztendlich zum Proteasom dirigieren. Die von der Hefe betriebenen Systeme sind die fundamentalsten dieser Art mit zwei definierten Transportwegen, die jeweils von einer bestimmten Ubiquitin-Ligase, Hrd1p oder Doa10p, kontrolliert werden (Kostova *et al.*, 2007). Die Relevanz dieser beiden Pathways wird durch ihre Konservierung in allen Eukaryoten unterstrichen (Yoshida, 2007). In der Hefe *S. cerevisiae* definiert der Hrd1-Komplex den ERAD-L Pathway, der für die Degradation von Proteinen mit fehlgefalteten luminalen Domänen verantwortlich ist (Caldwell *et al.*, 2001; Vashist *et al.*, 2001). Dieser Komplex benötigt die Ubiquitin-Ligase Hrd1p für die Polyubiquitinierung der Substrate (Hampton *et al.*, 1996; Bordallo *et al.*, 1998; Bays *et al.*, 2001). Hrd1p ist mit dem Membranprotein Hrd3p assoziiert, dessen Funktion noch weitestgehend unbekannt ist (Gardner *et al.*, 2000). Diese beiden Proteine bilden einen Kernkomplex in der ER-Membran, indem sie zusätzlich über das Linkerprotein Usa1p an das Membranprotein Der1p binden. Dieser Kernkomplex wird über Hrd3p mit dem Lektin Yos9p, einem Substraterkennungsprotein im ER-Lumen, assoziiert. Substrate mit fehlgefalteten Membran-Domänen (ERAD-M) werden ebenfalls mit Hilfe des Hrd1p/Hrd3p Komplexes degradiert, wobei die Proteine Der1p und Usa1p dabei nicht involviert sind (Carvalho *et al.*, 2006). Der ERAD-C Pathway, durch welchen Proteine mit fehlgefalteten cytosolischen Domänen degradiert werden, wird durch die Ubiquitin-Ligase Doa10p definiert (Swanson *et al.*, 2001). Alle drei ERAD-Wege nutzen den ATPase-Komplex Cdc48p/Ufd1p/Npl4p und das erst seit kurzem identifizierte Adapter-Protein Ubx2p, welches über seine Ubx-Domäne an Cdc48p bindet (Neuber *et al.*, 2005; Schuberth und Buchberger, 2005). Die genauen mechanistischen Unterschiede zwischen dem ERAD-C bzw. ERAD-L Pathway sind weiterhin ungeklärt. Ebenso ist auch die genaue Funktion vieler Komponenten noch unklar beziehungsweise umstritten (Carvalho *et al.*, 2006). Ein weiterer Streitpunkt bleibt der Kanal, über welchen zumindest die löslichen Substrate aus dem ER transportiert werden.

Eine Möglichkeit wäre, dass die Retrotranslokation über denselben Sec61-Kanal stattfindet, der auch beim Import von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum fungiert. Jedoch sind die Untersuchungen diesbezüglich nicht vollkommen überzeugend (Tsai *et al.*, 2002). So werden mittlerweile auch die Ubiquitin-Ligase Hrd1p und das Membranprotein Der1p als geeignete Kandidaten gehandelt (Lilley und Ploegh, 2004; Ye *et al.*, 2004; Gauss *et al.*, 2006).

Obwohl gezeigt werden konnte, dass ERAD-Substrate verschiedene Routen in der Zelle durchlaufen, bleibt die Identifizierung der beteiligten Komponenten sowie deren Funktion weiterhin ein wichtiges Anliegen der Forschung. Der Begriff der ER-assoziierten Degradation wurde erstmals vor ca. 13 Jahren ins Leben gerufen. Basierend auf der raschen Geschwindigkeit, mit welcher neue Entdeckungen in den letzten Jahren gemacht wurden, kann davon ausgegangen werden, dass die bisher unbeantworteten Fragen in den nächsten Jahren geklärt sein könnten (Vembar und Brodsky, 2008).

4. Ziele und Fragestellungen der Arbeit

Das Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit bestand darin, den molekularen Retrotranslokations-Mechanismus der Ricin Toxin A-Kette (RTA) näher zu untersuchen und dabei zelluläre Komponenten zu identifizieren, die in diesem Prozess eine Rolle spielen. Da Hefen keine galaktosehaltigen Oberflächenstrukturen besitzen, an die RTB binden kann (Lord *et al.*, 1994), werden sie von extern zugegebenem Ricin nicht abgetötet. Wird hingegen RTA mit Hilfe eines N-terminalen ER-Importsignals in das Lumen des ER eingeschleust, so wirkt es *in vivo* toxisch, da es nicht zur Sekretion gelangt, sondern vermutlich über den Sec61-Komplex in das Cytosol disloziert und an freien Ribosomen der Hefe seine Toxizität entfaltet (Simpson *et al.*, 1999). Der eigentliche ER/Cytosol-Export von RTA erfolgt wahrscheinlich unter Ausnützung des hefeeigenen ERAD, der dem von Säugerzellen funktionell homolog

ist (Lord und Roberts, 2005). Aufbauend auf diesen Beobachtungen war das Ziel dieser Arbeit, Hefezellen zu identifizieren bzw. zu isolieren, die sich resistent gegenüber einer RTA-Expression im ER verhalten, um somit Einblicke in den ER/Cytosol-Transport von RTA zu erhalten.

Zu diesem Zweck wurden RTA-Varianten mit verschiedenen Signalpeptiden am N-Terminus konstruiert. Dabei wurde auf die Signalsequenzen zweier Killertoxine, K28 und K1, zurückgegriffen. Zunächst sollte die *in vivo* Funktionalität sowie der *in vivo* Nachweis der verschiedenen RTA-Konstrukte in Wildtyp-Hefe analysiert werden. Das „Screening“ einer Kollektion von Hefe-Deletionsmutanten, die Defekte im intrazellulären Transport aufweisen, sollte weiteren Aufschluss über Resistenzen bzw. Hypersensitivitäten gegen RTA liefern. Dabei wurden Hefe-Mutanten mit Deletionen in Proteinen des ER-Imports, der ER-assoziierten Degradation, des Ubiquitin/Proteasom Pathways sowie der ribosomalen Untereinheiten näher untersucht.

Ein weiteres Anliegen bestand darin, eine „Screening“-Methode zu entwickeln, mit der es möglich ist, relativ einfach und schnell eine große Anzahl an Deletionsmutanten bezüglich ihres Phänotyps gegenüber RTA zu testen.

II. Material und Methoden

1. Organismen

1.1 Bakterienstämme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme wurden - sofern nicht anders vermerkt - der Stammsammlung des Instituts für Molekular- und Zellbiologie der Universität des Saarlandes entnommen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Verwendete *E. coli*-Stämme sowie deren Genotyp und Herkunft

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
DH5 α	<i>F⁻, λ^{-}, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, deoR, Δ (argF-lacZYA9, U196, ϕ80 lacZΔM15)</i>	Hanahan und Meselson, 1983
TOP10F [']	<i>F[']{lacIq Tn10 (Tet^R) mcrAΔ (mrr-hsdRMS mcrBC)ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(STR^R) endA1 nupG}</i>	Invitrogen
TOP10F	<i>F['] mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC)ϕ80lacZΔM15ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(STR^R) endA1 nupG}</i>	Invitrogen
NovaBlue Singles	<i>endA1 hddR17 (r_{K12}⁻ m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lacF['][proA⁺B⁺ lacI^q ZΔM15::Tn 10] (Tet^R)</i>	Novagen

1.2 Hefestämme

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Hefestämme (Tabelle 2) wurden, sofern nicht anders vermerkt, der Institutssammlung entnommen. Deletionsmutanten wurden von der Firma "Open Biosystem" (Huntsville, USA) bezogen (Tabelle 3).

Tabelle 2: Verwendete Hefestämme, deren Genotyp und Herkunft

Saccharomyces cerevisiae-Stamm	Genotyp	Herkunft
BWG1-7a	<i>Mat a, his4-519, ura3-52, ade 1-100, leu2-3, -112</i>	Ye <i>et al.</i> , 2001
PM373	<i>Mat a, his4-519, ura3-52, ade 1-100, leu2-3, -112 ufd1-1</i>	Ye <i>et al.</i> , 2001
RSY255	<i>MAT α ura3-52 leu2-3,112</i>	Stirling <i>et al.</i> , 1992
RSY524	<i>MAT a leu2-3, 112 ade2 ura3-52 pep4-2 SUC2 sec61-2</i>	R. Schekman
RSY1132	<i>MAT α, trp1-Δ1, leu2, 3-112, ura3-52, sec61-3</i>	Stirling <i>et al.</i> , 1992
SEY6210	<i>Mat α, leu2-3, 112 ura3-52, his3-Δ200, trp1-Δ901, lys2-801, suc2-Δ9</i>	Robinson <i>et al.</i> , 1988
SNY1026-7A	<i>MAT α Δjem1::LEU2 Δscj1::TRP1 ura3, leu2, trp1, his3, lys2, suc2</i>	Nishikawa <i>et al.</i> , 1997
WCG4	<i>Mat α, ura3, his3-11,15 leu2-3, 112</i>	Heinemeyer <i>et al.</i> , 1991 ; 1993
WCG4-11a	<i>Mat α, ura3, his3-11,15 leu2-3, 112, pre1-1</i>	Heinemeyer <i>et al.</i> , 1991 ; 1993
WCG4-22a	<i>Mat α, ura3, his3-11,15 leu2-3, 112, pre2-2</i>	Heinemeyer <i>et al.</i> , 1991 ; 1993
WPY106	<i>Mat a, cdc48-3, ura3-52, leu2-3</i>	Ye <i>et al.</i> , 2001
YTX5	<i>MAT α, ubc6::HIS3</i>	W. Seufert
YTX237	<i>Mat α Δubc1::HIS3, Δubc7::LEU2 prc1-1 trp1-1(am) his3-Δ200 ura3-52 lys2-801 leu2-3,-112</i>	W. Seufert
YTX233	<i>Mat a Δubc1::HIS3 Δhrd1::TRP1 prc1-1 trp1-1(am) his3-Δ200 ura3-52 lys2-801 leu2-3,-112</i>	W. Seufert

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stamm	Genotyp	Herkunft
YTX234	<i>Mat a Δubc7::HIS3 Δhrd1::TRP1 prc1-1 trp1-1(am) his3-Δ200 ura3-52 lys2-801 leu2-3,-112</i>	Riezmann et al., 1997
YWO1	<i>MAT α prc1-1, trp1, his3, ura3, lys2, leu2</i>	W. Seufert
YWO13	<i>MAT α prc1-1, trp1, his3, ura3, lys2, leu2 Δubc4:: HIS3</i>	W. Seufert

Tabelle 3: Verwendete Hefe-Deletionsmutanten der Firma Open Biosystem (Wildtyp zu den verwendeten Stämmen: *S. cerevisiae* BY4742). Die aufgeführten „Knock-out“-Mutanten wurden zur Untersuchung der Retrotranslokation und der *in vivo* Toxizität der Ricin A Kette eingesetzt

ORF	Deletiertes Gen	ORF	Deletiertes Gen
YAL058W	<i>CNE1</i>	YOL039W	<i>RPP2A</i>
YMR264W	<i>CUE1</i>	YDR382W	<i>RPP2B</i>
YBR201W	<i>DER1</i>	YBR171W	<i>SEC71</i>
YDR069C	<i>DOA4</i>	YLR292C	<i>SEC72</i>
YIL030C	<i>DOA10</i>	YJR010C-A	<i>SPC1</i>
YMR276W	<i>DSK2</i>	YML055W	<i>SPC2</i>
Yol013C	<i>HRD1</i>	YAL005C	<i>SSA1</i>
YLR207W	<i>HRD3</i>	YBL075C	<i>SSA3</i>
YHR204W	<i>HTM1</i>	YDL229W	<i>SSB1</i>
YBR170C	<i>NPL4</i>	YER100W	<i>UBC6</i>
YPL096W	<i>PNG1</i>	YMR022W	<i>UBC7</i>
YEL037C	<i>RAD23</i>	YML013W	<i>UBX2</i>
YDR418W	<i>RPL12B</i>	YDL190C	<i>UFD2</i>
YHR200W	<i>RPN10</i>	YML029W	<i>USA1</i>
YDL081C	<i>RPP1A</i>	YNL064C	<i>YDJ1</i>
YDL130W	<i>RPP1B</i>	YDR057W	<i>YOS9</i>

2. Plasmide

Die in dieser Arbeit eingesetzten und konstruierten Plasmide sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengefasst.

Ein kurzer Überblick über die verwendeten Vektoren liefert die Abbildung 1, eine detaillierte Beschreibung erfolgt im Ergebnis-Teil.

Tabelle 4: Eingesetzte Plasmide mit deren Eigenschaften und Herkunft

Plasmid (Größe)	Eigenschaften/Marker	Herkunft
pYES2.1/V5-His-TOPO [®] (5,8 kb)	„TOPO TA Cloning“-Vektor zur möglichen Insertion von PCR-Produkten mit 3`-A-Überhängen; <i>GAL1</i> -Promotor, V5, 6 x His, <i>CYC1 TT</i> , pUC ori, Amp ^R -Gen, <i>URA3</i> -Gen, 2 μ origin, f1 ori	Invitrogen
pSTblue-1 (3,8 kb)	„Cloning“-Vektor, bei dem die Insertion eines PCR-Produktes mit 3`-A-Überhängen in die MCS das <i>lacZ</i> -Gen zerstört und in <i>E. coli</i> eine Blau-Weiß-Selektion erlaubt; Amp ^R -Gen; Kan ^R -Gen; T7- und SP6-Promotor	Novagen
pRS316.PT (5,6 kb)	Centromervektor; f1 ori, T7-Promotor, <i>lacZ</i> /MCS, T3-Promotor, pMB1 ori, <i>URA3</i> , <i>CEN6</i> , <i>ARSH4</i> , Amp ^R -Gen; einklonierter <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1 TT</i> aus pYES2.1/V5-His-TOPO [®]	Diplomarbeit E. Gießelmann (2007)
pRS315.PT (6,2 kb)	Centromervektor; f1 ori, T7-Promotor, <i>lacZ</i> /MCS, T3-Promotor, pMB1 ori, <i>LEU2</i> , <i>CEN6</i> , <i>ARSH4</i> , Amp ^R -Gen; einklonierter <i>GAL1</i> -Promotor und <i>CYC1 TT</i> aus pYES2.1/V5-His-TOPO [®]	Diplomarbeit I. Posaric (2007)
pJC2433gempre RTA delta (3,8 kb)	„Cloning“-Vektor; Amp ^R -Gen; T7- und SP6-Promotor; hat pre-RTAΔ über <i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i> in die MCS einkloniert	J.C. Cook, University of Warwick, UK
pYES-SS (K28) GFP (6,8 kb)	pYES-Vektor mit einkloniertem GFP und der Signalsequenz von K28 pptox am N-Terminus (808 bp)	Dissertation T. Sendzik (2006)

Plasmid (Größe)	Eigenschaften/Marker	Herkunft
pRS315-MCnLi-ptox_stop (7,8 kb)	pRS315.PT mit ORF des C-terminalen Teils von mCherry (234 bp) mit Linker (GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT) sowie dem K28-pro-Toxin im 3'-Bereich, einkloniert über <i>Sall/XbaI</i>	Diplomarbeit N. Schäuble (2008)
pRS315-preMCnLi-ptox_stop (8 kb)	pRS315.PT mit ORF der K28-pre-Sequenz (108 bp) und des C-terminalen Teils von mCherry (234 bp) ohne Stoppcodon und mit Linker (GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT) sowie dem K28-pro-Toxin im 3'-Bereich, einkloniert über <i>Sall/XbaI</i>	Diplomarbeit N. Schäuble (2008)
pRS315-Sis1p-Li-MN (8,2 kb)	pRS315.PT mit ORF des Hefegens SIS1 ohne Stoppcodon im 5'-Bereich, kloniert über <i>Sall/PauI</i> ; mit Linker (GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT) sowie dem ORF des N-terminalen Teils von mCherry (477 bp)	Diplomarbeit N. Schäuble (2008)
pRS316-Sis1p-Li-MC (6,8 kb)	pRS315.PT mit ORF des Hefegens SIS1 ohne Stoppcodon im 5'-Bereich, kloniert über <i>Sall/PauI</i> ; mit Linker (GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT) sowie dem ORF des C-terminalen Teils von mCherry (234 bp)	Diplomarbeit N. Schäuble (2008)
pRS315-MN (6,7 kb)	pRS315.PT mit einkloniertem N-terminalen Teil von mCherry (477 bp)	Diplomarbeit S. Schorr (2009)
pRS316-MC (5,8 kb)	pRS316.PT mit einkloniertem C-terminalen Teil von mCherry (234 bp)	Diplomarbeit S. Schorr (2009)
pRS316-MNLi-Ubiquitin (7,3 kb)	pRS316.PT mit ORF des N-terminalen Teils von mCherry (477 bp) mit Linker (GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT) sowie dem ORF von Ubiquitin im 3'-Bereich, einkloniert über <i>Sall/XbaI</i>	Diplomarbeit S. Schorr (2009)
pWO21	2 μ -Vektor, enthält das Ubiquitin-Gen aus <i>S. cerevisiae</i> mit Lysin/Arginin-Austausch an Position 48 und 63 unter Kontrolle des induzierbaren <i>CUP1</i> -Promotors, <i>TRP1</i> , Amp ^R	D.Wolf

Tabelle 5: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide mit deren Eigenschaften und Herkunft

Plasmid (Größe)	Eigenschaften	Herkunft
pYES-RTA (6,6 kb)	pYES -Vektor mit einkloniertem RTA (801 bp)	diese Arbeit
pYES-K1 RTA (6,7 kb)	pYES -Vektor mit einkloniertem RTA und der Signalsequenz von K1 pptox am N-Terminus (879 bp)	diese Arbeit
pYES-K28 RTA (6,7 kb)	pYES -Vektor mit einkloniertem RTA und der Signalsequenz von K28 pptox (909 bp)	diese Arbeit
pYES- RTA ^{E177D} (6,6 kb)	pYES-Vektor mit einkloniertem RTA ^{E177D} (801 bp); diese RTA-Variante besitzt einen Aminosäureaustausch an Position 177 (Glu→Asp) und zeigt einen 50-fach reduzierten k_{cat} -Wert gegenüber dem wildtypischen RTA	diese Arbeit
pYES-K1 RTA ^{E177D} (6,7 kb)	pYES-Vektor mit einkloniertem RTA ^{E177D} und der Signalsequenz von K1 pptox am N-Terminus (879 bp); diese RTA-Variante besitzt einen Aminosäureaustausch an Position 177 (Glu→Asp) und zeigt einen 50-fach reduzierten k_{cat} -Wert gegenüber dem wildtypischen RTA	diese Arbeit
pYES-K28 RTA ^{E177D} (6,7 kb)	pYES-Vektor mit einkloniertem RTA ^{E177D} und der Signalsequenz von K28 pptox am N-Terminus (909 bp); diese RTA-Variante besitzt einen Aminosäureaustausch an Position 177 (Glu→Asp) und zeigt einen 50-fach reduzierten k_{cat} -Wert gegenüber dem wildtypischen RTA	diese Arbeit
pYES-ppK28- RTA-K28 β (7,3 kb)	pYES-Vektor mit einkloniertem K28 pptox, wobei die α -Untereinheit durch RTA ersetzt wurde (1,5 kb)	diese Arbeit
pYES- FLAG/RTA (6,6 kb)	pYES -Vektor mit einkloniertem RTA und einem FLAG-Tag am N-Terminus (830 bp)	diese Arbeit
pYES- RTA/FLAG (6,6 kb)	pYES -Vektor mit einkloniertem RTA und einem FLAG-Tag am C-Terminus (830 bp)	diese Arbeit
pYES- K1/FLAG/RTA (6,7 kb)	pYES -Vektor mit einkloniertem RTA, der Signalsequenz von K1 pptox am N-Terminus und einem FLAG-Tag (941 bp)	diese Arbeit
pYES-RTA ^{Δlys} (6,6 kb)	pYES -Vektor mit einkloniertem RTA (801 bp); die Lysinreste an Position 4 und 239 wurden durch Argininreste ersetzt	diese Arbeit

Plasmid (Größe)	Eigenschaften	Herkunft
pYES-K1 RTA ^{Δlys} (6,6 kb)	pYES -Vektor mit einkloniertem RTA und der Signalsequenz von K1 pptox am N-Terminus (879 bp); die Lysinreste an Position 4 und 239 wurden gegen Argininreste ersetzt	diese Arbeit
pYES-K28 RTA ^{Δlys} (6,7 kb)	pYES -Vektor mit einkloniertem RTA und der Signalsequenz von K28 pptox am N-Terminus (909 bp); die Lysinreste an Position 4 und 239 wurden gegen Argininreste ersetzt	diese Arbeit
pRS316-RTA (6,4 kb)	pRS316.PT-Vektor mit einkloniertem RTA (801 bp)	diese Arbeit
pRS316-K1 RTA (6,5 kb)	pRS316.PT-Vektor mit einkloniertem RTA und der Signalsequenz von K1 pptox am N-Terminus (879 bp)	diese Arbeit
pRS316-K28 RTA (6,5 kb)	pRS316.PT-Vektor mit einkloniertem RTA und der Signalsequenz von K28 pptox am N-Terminus (909 bp)	diese Arbeit
pRS316- RTA ^{E177D} (6,4 kb)	pRS316.PT-Vektor mit einkloniertem RTA ^{E177D} (801 bp); diese RTA-Variante besitzt einen Aminosäureaustausch an Position 177 (Glu→Asp) und zeigt einen 50-fach reduzierten k_{cat} -Wert gegenüber dem wildtypischen RTA	diese Arbeit
pRS316-K1 RTA ^{E177D} (6,5 kb)	pRS316.PT-Vektor mit einkloniertem RTA ^{E177D} und der Signalsequenz von K1 pptox am N-Terminus (879 bp); diese RTA-Variante besitzt einen Aminosäureaustausch an Position 177 (Glu→Asp) und zeigt einen 50-fach reduzierten k_{cat} -Wert gegenüber dem wildtypischen RTA	diese Arbeit
pRS316-K28 RTA ^{E177D} (6,5 kb)	pRS316.PT-Vektor mit einkloniertem RTA ^{E177D} und der Signalsequenz von K28 pptox am N-Terminus (909 bp); diese RTA-Variante besitzt einen Aminosäureaustausch an Position 177 (Glu→Asp) und zeigt einen 50-fach reduzierten k_{cat} -Wert gegenüber dem wildtypischen RTA	diese Arbeit
pRS316- ppK28-RTA- K28β (7,1 kb)	pRS316.PT-Vektor mit einkloniertem K28 pptox, wobei die α -Untereinheit durch RTA ersetzt wurde (1,5 kb)	diese Arbeit
pRS316- FLAG/RTA (6,6 kb)	pRS316 -Vektor mit einkloniertem RTA und einem FLAG-Tag am N-Terminus (830 bp)	diese Arbeit

Plasmid (Größe)	Eigenschaften	Herkunft
pRS316-RTA/FLAG (6,6 kb)	pRS316 -Vektor mit einkloniertem RTA und einem FLAG-Tag am C-Terminus (830 bp)	diese Arbeit
pRS316-RTA ^{Δlys} (6,4 kb)	pRS316.PT-Vektor mit einkloniertem RTA (801 bp); die Lysinreste an Position 4 und 239 wurden gegen Argininreste ersetzt	diese Arbeit
pRS316-K1 RTA ^{Δlys} (6,5 kb)	pRS316.PT-Vektor mit einkloniertem RTA und der Signalsequenz von K1 pptox am N-Terminus (879 bp); die Lysinreste an Position 4 und 239 wurden gegen Argininreste ersetzt	diese Arbeit
pRS316-K28 RTA ^{Δlys} (6,5 kb)	pRS316.PT-Vektor mit einkloniertem RTA und der Signalsequenz von K28 pptox am N-Terminus (909 bp); die Lysinreste an Position 4 und 239 wurden gegen Argininreste ersetzt	diese Arbeit
pRS316/Met (5,5 kb)	pRS316.PT; der GAL1-Promotor wurde durch einen Methionin-Promotor (383 bp) ersetzt; CYC1 TT-Terminator	diese Arbeit
pRS316/Met-RTA (6,3 kb)	pRS316/Met-Vektor mit einkloniertem RTA (801 bp)	diese Arbeit
pRS316/Met-K1 RTA (6,4 kb)	pRS316/Met-Vektor mit einkloniertem RTA und der Signalsequenz von K1 pptox am N-Terminus (879 bp)	diese Arbeit
pRS316/Met-K28 RTA (6,4 kb)	pRS316/Met-Vektor mit einkloniertem RTA und der Signalsequenz von K28 pptox am N-Terminus (909 bp)	diese Arbeit
pGEM-RTA ^{E177D} (3,8 kb)	pGEM-Vektor mit einkloniertem RTA ^{E177D} (801 bp); diese RTA-Variante besitzt einen Aminosäureaustausch an Position 177 (Glu→Asp) und zeigt einen 50-fach reduzierten k_{cat} -Wert gegenüber dem wildtypischen RTA ; einkloniert über <i>EcoRI/SalI</i>	diese Arbeit
pGEM-K1 RTA ^{E177D} (3,9 kb)	pGEM-Vektor mit einkloniertem K1-RTA ^{E177D} (879 bp); diese RTA-Variante besitzt einen Aminosäureaustausch an Position 177 (Glu→Asp) und zeigt einen 50-fach reduzierten k_{cat} -Wert gegenüber dem wildtypischen RTA; einkloniert über <i>EcoRI/SalI</i>	diese Arbeit

Plasmid (Größe)	Eigenschaften	Herkunft
pGEM-K28 RTA ^{E177D} (3,9 kb)	pGEM-Vektor mit einkloniertem K28-RTA ^{E177D} (909 bp); diese RTA-Variante besitzt einen Aminosäureaustausch an Position 177 (Glu→Asp) und zeigt einen 50-fach reduzierten k_{cat} -Wert gegenüber dem wildtypischen RTA; einkloniert über <i>EcoRI/SalI</i>	diese Arbeit
pSTBlue- SalI RTA ^{Xba}	pSTBlue-1-Vektor mit einkloniertem RTA (801 bp) über die Schnittstellen <i>SalI/XbaI</i>	diese Arbeit
pRS315- SS(K28)-GFP (7 kb)	pRS315.PT-Vektor mit einkloniertem GFP und der Signalsequenz von K28 ptox am N-Terminus (808 bp)	diese Arbeit
pRS315-SS (K28)-Mcnli- RTA ^{E177D}	pRS315.PT mit ORF der K28-pre-Sequenz (108 bp) und des C-terminalen Teils von mCherry (234 bp) ohne Stoppcodon und mit Linker (GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTG GTTCT) sowie der mutierten RTA-Variante RTA ^{E177D} im 3'-Bereich, einkloniert über <i>SalI/XbaI</i>	diese Arbeit
pRS315- Mcnli- RTA ^{E177D}	pRS315.PT mit ORF des C-terminalen Teils von mCherry (234 bp) mit Linker (GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTG GTTCT) sowie der mutierten RTA-Variante RTA ^{E177D} im 3'-Bereich, einkloniert über <i>SalI/XbaI</i>	diese Arbeit
pRS315- Mcnli- RTA ^{E177D} Δ lys	pRS315.PT mit ORF des C-terminalen Teils von mCherry (234 bp) mit Linker (GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTG GTTCT) sowie der mutierten RTA-Variante RTA ^{E177D} im 3'-Bereich deren Lysine an Position 4 und 239 durch Arginine ausgetauscht wurden, einkloniert über <i>SalI/XbaI</i>	diese Arbeit

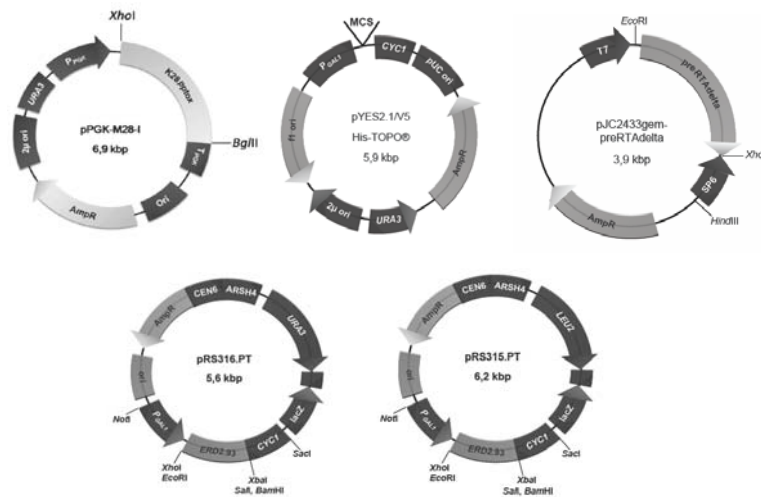


Abbildung 1: Schematische Vektorkarten der verwendeten Klonierungsvektoren. Der zur TOPO-Klonierung eingesetzte Vektor pYES2.1/V5-HIS-TOPO[®] ermöglicht die regulierte Expression (*GAL1*-Promotor) einklonierter Konstrukte; ebenfalls unter der Kontrolle eines *GAL1*-Promotors stehen Konstrukte, die in die Vektoren pRS315.PT bzw. pRS316.PT ligiert wurden. Der Vektor pSTBlue-1 wurde zur Zwischenklonierung und Sequenzierung einzelner Konstrukte eingesetzt. Der Vektor pJC2433gem-preRTA Δ wurde für die Versuche zur *in vitro* Transkription/Translation eingesetzt.

3. Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma (Steinheim) hergestellt.

3.1 PCR-Primer

Tabelle 6: Auflistung der zur PCR eingesetzten Primer. Die Sequenzangabe erfolgt immer in 5`-3`-Orientierung. Start- bzw. Stopp-Kodons sind hervorgehoben, die Schnittstellen sind in Großbuchstaben, die eigentliche Sequenz in Kleinbuchstaben dargestellt.

Primer	Sequenz	Größe
5`-RTA	TCTAGAGGATCCGAATTCatgatattccc caaacaataccaattataaactttacc	36-mer
3`-RTA	GCGGCCGCGTCGACTtaaaactgtgacg atggaggagggtgcg	25-mer
5`-RTA/FLAG	TCTAGAGGATCCGAATTCatggattaca aggatgatgatgataagatattcccaaacaatacc caattataaactttacc	81-mer
3`-RTA/FLAG	GCGGCCGCGTCGACTtactatcatcatcat ccttgtaatcaaactgtgacgatggaggagggtgcg	66-mer
5` (SP1) K1FLAGRTA	TCTAGAGGATCCGAATTCatgacgaag ccaaccaagtattagtagatccgtagatattttt tcatcacattact acacctagtcg	94-mer
5` (SP2) K1FLAGRTA	tttcatcacattactacacctagtcgtagcggattac aaggatgatgatgataagatattcccaaacaatac ccaattataaac	86-mer
5`-RTA/5`-SPK1	CTCGAGGAATTCatgacgaagccaacca agtattagtagatccgtagatatttttcatcacat tactacacctagtcgtagcgatattcccaaacaata ccaattataaactttacc	126-mer
5`-RTA K4R	TCTAGAGGATCCGAATTCatgatattccc cagacaataccaattataaactttaccac	59-mer
3`-RTA K240R	GCGGCCGCGTCGACTtaaaactgtgacg atggaggagggtgcgcatctataccatgagagcta tgatagggattaatat actcacatcgtacacactgaatctggaaccattacgt ctt	120-mer
5`-RTA/5`- SP(K1) K>R	CTCGAGGAATTCatgacgaagccaacca agtattagtagatccgtagatatttttcatcacat tactacacctagtcgtagcgatattcccagacaata ccaattataaac	120-mer

Primer	Sequenz	Größe
5` (SP2)-K28 innen	ttcaaatctcaaatatgcacgggtatattccccaac ac	39-mer
5`K28FLAG SP1	TCTAGAGGATCCGAATTCatggagagc gttcctcattatattaacatttttcaacaatcatggtaa ctataaatcgtagttctagcactattaagtgttcaaat ctc	93-mer
5` (SP2) K28 K4R	gttctagcactattaagtgttcaaatctcaaatatgca cgggtatattcccagacaataccaattataaac tta	79-mer
5-K28 (Xho/Eco)	CTCGAGGAATTCatggagagcgttcctcatt atattaacatttttc	47-mer
3-K28d/5-RTA	gtggtaaagttataattgggtattggttggggaatata cgttcttctaagccctgctgtctctcagatg	70-mer
5` RTA/3` K28d	catctgagagacagcagggcttagaagaacgtata ttcccaaacaataccaattataaactttacc	68-mer
5-K28g/3-RTA	cgcacctccaccatcgtcacagttataacaatcgcgt agtcttataaccgggtctgc	70-mer
3-RTA/5-K28g	gcagaccgggtataagactacgcgattgtataaact gtgacgatggtggagggtgcg	56-mer
3-K28 (Not/Sal)		40-mer
5`delta RTA	caaatgatttcagacgcagcaagatt	26-mer
3`delta RTA	aatcttgctgcgtctgaaatcatttg	26-mer
5 Met25_Not	GCGGCCGCcggatgcaagggttcgaatc	28-mer
3`Met25_XhoEco	GAATTCCTCGAGtgtatggatgggggtaata gaattgat	40-mer
5_SalRTA	GTCGACatgatattcccaaacaataccaatt ataaactttac	44-mer
3_XbaRTA	TCTAGAttaaaaactgtgacgatggtggagg	30-mer
5_Sal RTA	GTCGACatgatattcccaaacaataccaatt ataaactttac	44-mer
3_Xba RTA	TCTAGAttaaaaactgtgacgatggtggagg	30-mer

4. Nährmedien

LB-Medium

Pepton	1,0 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	0,5 %

Zur Herstellung von LB-Agar wurden dem Medium 1,5 % Agar hinzugefügt. Zur Selektion von Plasmiden mit Amp^R- bzw. Kan^R-Gen-Expressions-kassette wurde dem Medium Ampicillin bzw. Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt. Zur Blau-weiß-Selektion bei Klonierung in den Vektor pSTBlue-1 wurden zusätzlich pro Platte 40 µl X-Gal-Lösung und 20 µl IPTG-Lösung zugegeben.

X-Gal-Stammlösung

X-Gal	20,0 mg/ml
-------	------------

Die Stammlösung wurde in N,N-Dimethylformamid angesetzt und für den weiteren Gebrauch bei -20° C gelagert.

Ampicillin-Stammlösung

Ampicillin	50,0 mg/ml
------------	------------

Die Lösung wurde mit 50 % Ethanol angesetzt und für den weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

Kanamycin-Stammlösung

Kanamycin	25,0 mg/ml
-----------	------------

Die Lösung wurde mit Aqua dest. angesetzt und für den weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

IPTG-Stammlösung

IPTG 0,1 M

Die Lösung wurde mit Aqua dest. angesetzt und für den weiteren Gebrauch bei -20° C gelagert.

YEPD-Medium

Glucose oder Galactose	2,0 %
Pepton	2,0 %
Hefeextrakt	1,0 %

Zur Herstellung von YEPD-Agar wurden 1,5 % Agar-Agar zugefügt.

Drop-out-Medium (d/o)

“Yeast nitrogen base” (YNB)	0,17 %
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 %
Glucose / Galactose / Raffinose	2,0 %
10x d/o-Lösung	100 ml
H ₂ O _{bidest}	880 ml

Die 10x d/o-Lösung sowie die Glucose-, Galactose- bzw. Raffinose-Lösungen wurden getrennt autoklaviert. YNB wurde in 20 ml sterilem Wasser gelöst und sterilfiltriert. Zur Herstellung von d/o-Agarplatten wurden 1,5 % Agar-Agar der Glucose-, Raffinose- bzw. Galactose-Lösung zugefügt.

10x-Aminosäurestammlösung

Isoleucin	300 mg/ml
Valin	1500 mg/ml
Adenin	200 mg/ml
Arginin	200 mg/ml
Histidin	200 mg/ml
Leucin	1000 mg/ml
Lysin	300 mg/ml
Methionin	200 mg/ml
Phenylalanin	500 mg/ml
Threonin	2000 mg/ml
Tryptophan	200 mg/ml
Tyrosin	300 mg/ml
Uracil	200 mg/ml

Zur Herstellung der jeweiligen 10x d/o-Lösung wurden die zur Selektion der Hefen nötigen Aminosäuren/Basen weggelassen.

5. Puffer und Lösungen

5.1 Standard-Puffer und -Lösungen

70 % Ethanol

Ethanol	70 %	(v/v)
---------	------	-------

10 %-iges Glycerin

Glycerin	10%	(v/v)
----------	-----	-------

10x TBS-Puffer

Tris/HCl	1 M
NaCl	1 M

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

6. Material

6.1 Restriktionsendonukleasen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Roche bzw. Fermentas bezogen.

6.2 Antikörper

In Tabelle 7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und ihre Herkunft beschrieben.

Tabelle 7: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Verdünnung	Herkunft
anti-RTA	polyklonaler, primärer AK (Sheep)	1:25 (Immunpräzipitation) 1:1000 (Western Analyse)	L.Roberts, University of Warwick, UK
anti-Ubiquitin	polyklonaler, primärer AK (Mouse)	1:400	Santa Cruz Biotechnology
anti-Sheep	monoklonaler, sekundärer AK, HRP-gekoppelt	1:25000	Sigma
anti-Mouse	monoklonaler, sekundärer AK, HRP-gekoppelt	1:40000	Sigma

6.3 Chemikalien und Kits

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien und Kits sind in Tabelle 8 dargestellt. Die Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von der Firmen Roth (Karlsruhe) bzw. Applichem (Darmstadt) bezogen.

Tabelle 8: Herkunft der verwendeten Chemikalien und Kits

Firma (Firmensitz)	Produkte
Applichem (Darmstadt)	X-Gal; 10x Ligationspuffer ; T4-DNA-Ligase; verschiedene Chemikalien
BioRad (München)	Elektroporationsküvetten
Biozym (Hameln)	Agarose
Difco (Detroit, USA)	“Yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium sulfate”
Eurogentec (Seraining, Belgien)	„Smart Ladder“
Fermentas (St. Leon-Rot)	Restriktionsenzyme und -puffer; DNase-freie RNase
GE Healthcare (München)	Protein A Sepharose
Invitrogen (Karlsruhe)	“pYES2.1 TOPO [®] TA Expression Kit”
Marcor (New Jersey, USA)	Agar-Agar; Hefeextrakt; Pepton
Millipore (Eschborn)	Dialysefilter
Müllers Mühle (Gelsenkirchen)	Dextrose
Novagen	“pSTBlue-1AccepTor [™] Vector Giga Kit”
Omega bio-tek	“E.Z.N.A. Gel Extraction Kit”
PeqLab (Erlangen)	“peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II”
Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)	“Easytag Express [³⁵ S] Protein Labeling Mix”
Pierce (Rockford, IL, USA)	SuperSignal [®] West Dura Trial Kit
Roche (Mannheim)	“FastStart High Fidelity PCR System, dNTPack”, Nonidet P40, “Protease inhibitor cocktail tablets”

Firma (Firmensitz)	Produkte
Serva (Heidelberg)	β -Mercaptoethanol; Chloroform; Phenol;
Sigma (Deisenhofen)	Ampicillin; Bromphenolblau; Taq- Polymerase; Heringssperma-DNA;
Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)	CL-Xposure TM Film
Merck (Darmstadt) Roth (Karlsruhe)	alle restlichen Chemikalien

7. Kulturbedingungen

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme erfolgte in LB-Flüssigmedium auf einem Rundschtüttler bei 37°C und 220 rpm; LB-Agarplatten wurden in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Die Anzucht der Hefen erfolgte in YEPD- und d/o-Flüssigmedium bei 30°C und 220 rpm; YEPD- und d/o-Agarplatten wurden bei 30°C in einem Brutschrank inkubiert.

7.1 Kryokulturen

Zum Anfertigen einer Dauerkultur wurden 700 μ l einer Übernachtskultur 1:1 mit 99%-igem, sterilem Glycerin in ein steriles Kryoröhrchen gegeben und dieses bei -80°C gelagert. Dauerkulturen sind unter diesen Bedingungen über Jahre hinweg lagerungsfähig.

8. Zellzahlbestimmung

8.1 Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl der Hefen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Kammerfläche 0,0025 mm²; Kammertiefe 0,1 mm) mikroskopisch ermittelt.

8.2 Optische Dichte

Die Trübungsmessungen zur Ermittlung der optischen Dichte (OD) von Hefe- bzw. Bakterienkulturen wurden mit dem Spektralphotometer „Ultrospec 2100 pro“ (Amersham Biosciences) bei einer Wellenlänge von 586 nm (Bakterien) bzw. 600 nm (Hefen) gegen unbeimpftes Medium durchgeführt. Die Schichtdicke der Küvette betrug 1 cm.

9. Transformations-Methoden

9.1 Transformation rekombinanter Plasmid-DNA in *E. coli* mittels Elektroporation

SOC-Medium

Hefeextrakt	0,5 %	(w/v)
Trypton	2,0 %	(w/v)
Glucose	20	mM
KCl	2,5	mM
MgCl ₂	10	mM
NaCl	10	mM
MgSO ₄	10	mM

Das Medium wurde nach Sterilisation durch Autoklavieren bei 4°C gelagert.

Bei der Elektroporation handelt es sich um eine Technik, mit deren Hilfe Makromoleküle wie DNA in lebende Zellen eingeschleust werden können. Dabei werden die Zellen in ein elektrisches Feld gebracht und kurzen, elektrischen Pulsen hoher Feldstärke ausgesetzt, wodurch sich kurzzeitig Poren in der Zellmembran öffnen, über welche die Fremd-DNA in die Zelle gelangt (Calvin und Hannawalt, 1988; Dower et al., 1988).

Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 100 ml LB-Medium 1%-ig mit einer frischen Übernachtskultur *E. coli* DH5 α angeimpft und die Zellen bis zu einer OD₅₈₆ von 0,5-0,7 auf einem Schüttler bei 37°C angezogen. Die *E. coli*-Kultur wurde 15 min auf Eis inkubiert und die Zellen anschließend 15 min bei 6000 rpm und 4°C geerntet. Das Pellet wurde zweimal mit 100 ml kaltem, sterilem Glycerin (10 %) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und in sterile 2 ml-Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 8000 rpm, RT) gewonnen. Ein Teil des Überstandes wurde abgehoben, das Volumen des Pellets geschätzt und in dem gleichen Volumen 10%-igem Glycerin vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden in Aliquots zu 40 μ l in Eppendorfgefäße überführt und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert. Die Ligationsansätze wurden vor der Elektroporation gegen 10%-iges Glycerin eine Stunde dialysiert und das nach der Dialyse verbleibende Volumen wurde komplett zur Transformation eingesetzt.

Einem Aliquot elektrokompenter Zellsuspension wurde die vorbereitete DNA zugesetzt, bevor beides in die vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt wurde. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV/25 μ F/200 Ω mittels eines „Gene Pulsers“ der Firma BioRad. Zur Stabilisierung wurden direkt nach der Transformation 1 ml SOC-Medium zu den Zellen gegeben und diese 1 h bei 37°C und 220 rpm auf einem Rundschtüttler zwecks Regeneration und Ausbildung der Antibiotika-Resistenz inkubiert. 60 bis 300 μ l des Ansatzes wurden auf LB_{Amp} bzw. LB_{Kan}-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

9.2 Hitzeschock-Transformation von *E. coli*

TB-Puffer

Pipes	10 mM
CaCl ₂	15 mM
KCl	250 mM

Der Ansatz wurde mit Aqua dest. auf ca. 80 ml aufgefüllt und mit KOH auf pH 6,7 eingestellt.

MnCl ₂	55 mM
-------------------	-------

Der Puffer wurde auf 100 ml aufgefüllt, sterilfiltriert und bei 4° C gelagert.

Die Bakterienzellen werden bei dieser Methode mit Calciumchlorid behandelt, so dass zwischen der negativ geladenen DNA und der negativ geladenen Zellmembran weniger abstoßende Kräfte bestehen. Bei einem kurzen Hitzeschock entstehen Poren in der Membran, so dass die DNA in die Zellen gelangen kann. Die *E. coli*-Zellen müssen dafür über eine spezielle Prozedur chemisch kompetent gemacht werden.

Zur Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurde eine Einzelkolonie einer frisch ausplattierten Kryokultur des *E. coli*-Stammes TOP10 in 2 ml LB-Medium über Nacht bei 37° C angezogen. 250 ml SOB-Medium wurden mit der ü.N.-Kultur inokuliert und bei 20° C bis zu einer OD₅₇₈ von 0,4 kultiviert. Danach wurden die Zellen 10 min auf Eis gestellt, bevor sie bei 4000 rpm und 4° C für 10 min zentrifugiert wurden. Das Pellet wurde vorsichtig in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert, erneut 10 min auf Eis gelagert und schließlich 10 min bei 4000 rpm und 4° C erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen und mit 1,4 ml DMSO versetzt. Die Zellen wurden in Aliquots zu 100 µl aufgeteilt und sofort bei -80° C gelagert.

Je Transformationsansatz wurde ein Reaktionsgefäß mit 100 µl kompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut. Der gesamte Ligationsansatz (20 µl) wurde zu den Zellen hinzupipettiert. Nach Zugabe der DNA wurden die Zellen 20 min auf Eis inkubiert. Es folgten ein Hitzeschock für 90 sec bei 42° C und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Danach wurden 500 µl SOC-Medium hinzugegeben und die Zellen eine Stunde bei 37° C auf einem Schüttler inkubiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf drei LB-Agarplatten ausplattiert. Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen wurden die Platten zuvor mit Antibiotikum vorbehandelt. Die LB-Platten wurden über Nacht bei 37° C inkubiert.

9.3 Transformation von Hefen mit rekombinanter Plasmid-DNA (Lithiumacetat-Methode)

10x LiAc-Lösung

Lithiumacetat	1 M
---------------	-----

Der pH-Wert wurde mittels Essigsäure auf pH 7,5 eingestellt und die Lösung anschließend autoklaviert.

50 % Polyethylenglycol

PEG-4000	50 %	(w/v)
Aqua dest.	ad 50 ml	

10x TE-Puffer

Tris/HCl	10 mM
EDTA	1,0 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt und der Puffer anschließend autoklaviert.

LiAc/TE-Lösung

10x TE, pH 7,5	1 Teil
10x LiAc, pH 7,5	1 Teil
Aqua dest.	8 Teile

PEG-Lösung

50 % PEG	8 Teile
10x TE, pH 7,5	1 Teil
10x LiAc, pH 7,5	1 Teil

Carrier-DNA

Heringssperma	10 mg
Aqua dest.	ad 1 ml

Das gelöste Heringssperma wurde zur Nukleinsäure-Fragmentierung ultraschallbehandelt und anschließend sterilfiltriert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Die Lithiumacetat-Methode beruht auf der Beobachtung, dass alkalische Kationen die Kompetenz von Hefezellen zur Aufnahme von DNA stark erhöhen (Ito et al., 1983). Diese Kompetenz wird zusätzlich noch durch die Verwendung hochmolekularer Carrier-DNA gesteigert (Schiestl und Gietz, 1989).

Hierzu wurden 5 ml YEPD-Medium mit 100 µl einer frischen Übernachtskultur der zur Transformation einzusetzenden Hefe beimpft und die Zellen über Nacht auf dem Schüttler (30° C, 200 rpm) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (5 min, 9000 rpm, RT), das Pellet in 500 µl LiAc/TE-Lösung gewaschen und in 200 µl LiAc/TE-Puffer resuspendiert. Zu 200 µl der nun kompetenten Hefezellen wurden 1-5 µg Plasmid-DNA, 15 µl Carrier-DNA (Heringssperma-DNA, 10 mg/ml, hitzedenaturiert), 50 µl 10x LiAc-Lösung und 600 µl PEG-Lösung gegeben. Der Ansatz wurde 1 Stunde bei 30° C auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem Hitzeschock (15 min, 42° C) wurden die

Zellen geerntet (20 s, 13000 rpm) und zweimal mit 500 µl 1x TE-Puffer gewaschen und schließlich in 300 µl 1x TE-Puffer resuspendiert. Zuletzt wurden die transformierten Hefezellen auf entsprechendem Selektivmedium ausplattiert und für drei bis fünf Tage bei 30° C kultiviert. Die Anzucht der Transformanten erfolgte auf d/o-Platten, um durch Selektionsdruck den Erhalt der transformierten Plasmide zu gewährleisten und das Wachstum untransformierter Zellen zu unterdrücken.

10. Plasmidisolierung aus *E. coli*

10.1 Alkalische Lyse

GTE-Lösung

Glucose	50 mM
Tris/HCl	25 mM
EDTA	10 mM

5 M Kaliumacetat-Lösung

Zur Herstellung der Lösung wurden 29,5 ml Essigsäure (98 %) mit KOH-Plätzchen auf einen pH-Wert von 4,8 eingestellt; anschließend wurde mit Aqua dest. auf ein Endvolumen von 100 ml aufgefüllt.

NaOH/SDS-Lösung

NaOH	0,2 M
SDS	1 % (w/v)

Die alkalische Lyse ermöglicht eine schnelle Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* in großen Mengen. Diese ist allerdings noch erheblich mit RNA und Proteinen verunreinigt, so dass eine Behandlung der Plasmid-DNA mit DNase-freier RNase notwendig ist.

Das im GTE-Puffer enthaltene EDTA komplexiert mit den die Cytoplasmamembran stabilisierenden bivalenten Metallkationen (Mg^{2+} ,

Ca²⁺). Die Lyse der Bakterienzellwand erfolgt durch Zugabe einer SDS und NaOH-haltigen Lösung. Dabei denaturiert SDS die bakteriellen Proteine, während NaOH diese Wirkung auf die chromosomale und die Plasmid-DNA ausübt. Durch Zugabe von Kaliumacetat kommt es zur Neutralisation und damit zur Renaturierung der Plasmid-DNA, während chromosomale DNA, Proteine und SDS ausfallen. Die Präzipitate lassen sich durch Zentrifugation leicht entfernen, Plasmid-DNA und RNA bleiben in Lösung. Die Nukleinsäuren werden anschließend durch EtOH gefällt (Birnboim, 1983; Birnboim und Doly, 1979).

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden 5 ml LB_{Amp} bzw. LB_{Kan}-Flüssigmedium mit einer Kolonie der jeweiligen Transformante beimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. 1,5 ml Zellkultur wurden 20 s bei 13000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl GTE-Lösung resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl NaOH/SDS-Lösung und mehrmaligem Invertieren wurde der Ansatz 5 min auf Eis belassen, bis die Lösung klar wurde. Zur Neutralisation wurden 150 µl einer 5 M Kaliumacetat-Lösung (pH 4,8) hinzugefügt, nochmals invertiert und 5 min auf Eis gestellt. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm (10 min, 4° C) wurden die Zelltrümmer entfernt. Nachdem der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde, wurden zur Fällung der Nukleinsäuren 800 µl Ethanol (99 %) zugegeben. Nach 2 min bei RT wurde die DNA durch eine einminütige Zentrifugation bei 13000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet getrocknet, anschließend in 20 µl Aqua dest. resuspendiert und die Lösung bei -20° C aufbewahrt.

10.2 Plasmid-Präparation mittels Plasmid-Miniprep

Das „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit II“ der Firma Peqlab dient zur Gewinnung reiner Plasmid-DNA, die frei von RNA ist. Die Plasmid-Isolierung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Die verwendete Methode basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse mit nachfolgender Aufreinigung der Plasmid-DNA über eine Anionen-

Austauscher-Säule. RNA, chromosomale DNA, Proteine und niedermolekulare Verunreinigungen werden durch einen Waschpuffer niedriger Salzkonzentration von der Säule entfernt, um dann die reine Plasmid-DNA mit einem Puffer hoher Salzkonzentration zu eluieren. Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde spektralphotometrisch mit Hilfe eines „GeneQuant“-Gerätes der Firma Pharmacia (Erlangen) bestimmt.

11. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein *in vitro* Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch aus Nukleinsäure-Molekülen. Man nutzt hierzu die Eigenschaften von DNA-Polymerasen aus, die einen Einzelstrang zum Doppelstrang ergänzen können, sofern ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht. Die Amplifikation einer spezifischen DNA-Sequenz erfolgt mit Hilfe zweier Oligonukleotid-Primer, die zu Regionen auf einander gegenüberliegenden DNA-Strängen komplementär sind, und wird in alternierenden Zyklen aus drei aufeinanderfolgenden Schritten durchgeführt. Der PCR-Ansatz, bestehend aus der „Template DNA“, den Oligonukleotid-Primern, einer thermostabilen Polymerase, Desoxyribonukleotiden und $MgCl_2$, wird in einem ersten Schritt auf $95^\circ C$ erhitzt, um die Ausgangs-DNA zu denaturieren. Anschließend erfolgt bei einer auf die Primer abgestimmten „Annealing“-Temperatur eine Anlagerung der Oligonukleotide an die einzelsträngige DNA and als letzter Schritt eine „Elongation“, das heißt eine Neusynthese des DNA-Fragmentes bei $72^\circ C$ durch die Taq-Polymerase. Durch Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte erhält man eine exponentielle Vervielfältigung des neusynthetisierten DNA-Fragmentes. Die PCR wurde in einem Thermocycler „Advanced Primus 96“ der Firma PeqLab durchgeführt.

Die PCR-Ansätze wurden folgendermaßen auf Eis zusammenpipettiert:

10x Puffer mit MgCl ₂	5,0 µl
Primer 3` (25 pmol/µl)	0,5 µl
Primer 5` (25 pmol/µl)	0,5 µl
dNTP-Mix (25 mmol/µl)	0,4 µl
Taq-Polymerase/Hifi-Polymerase	0,7 µl
“Template DNA”	1,0 µl
Aqua dest.	41,9 µl

Im folgenden ist das allgemeine “Cycle”-Programm dargestellt, das als Grundlage für alle in der Arbeit durchgeführten PCR-Zyklen verwendet wurde.

Denaturierung	94° C, 4 min	
Denaturierung	94° C, 30 s	} 35 Zyklen
“Annealing”	54° C, 30 s	
Elongation	72° C, 45 s	
Terminaler		
Elongationsschritt	72° C, 7 min	

Die PCR-Produkte wurden zur Größen-, Konzentrations- und Reinheitsbestimmung nach der Amplifikation auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und die DNA bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C gelagert.

SOE-PCR

Zur Konstruktion der RTA/K28-β Toxinchimäre bzw. zur Herstellung der mutierten RTA^{E177D}-Variante wurde die SOE-Technik („splicing by overlapping extension“) angewandt. Diese Methode erlaubt mit Hilfe der PCR die Verknüpfung von DNA-Molekülen an genau definierten Verbindungsstellen, ohne Rücksicht auf die DNA-Spleißstellen nehmen zu müssen (Horton et al., 1989). Daher kann am Fusionsort auf das

Einfügen von Restriktionsschnittstellen verzichtet werden, so dass das resultierende Fusionsprotein keine durch Restriktionsschnittstellen kodierte Aminosäuren enthält. Die SOE-PCR ermöglicht darüber hinaus die Insertion kleiner Epitop-kodierender DNA-Sequenzen zwischen zwei Genfragmenten, wodurch arbeits- und zeitintensive Klonierungsschritte umgangen werden sowie ortsspezifische Mutagenesen, bei denen Primer-kodierte Punktmutationen in das Amplikon eingeführt werden.

Zwei DNA-Fragmente, die fusioniert werden sollen, werden in getrennten PCR-Reaktionen amplifiziert. In einer ersten Amplifikation finden pro Reaktion ein äußerer Primer, der am 5'- bzw. 3'-Ende des jeweiligen Genfragmentes hybridisiert, und ein innerer Primer Verwendung. Die beiden inneren Primer werden derart konstruiert, dass die zu verknüpfenden Enden der PCR-Produkte komplementäre Sequenzen erhalten, welche nach Mischen innerhalb einer zweiten Amplifikation überlappen, durch eine DNA-Polymerase verlängert und in Anwesenheit der äußeren Primer vervielfältigt werden können.

Nach der ersten PCR wurden die vollständigen Ansätze gelelektrophoretisch analysiert. Die korrekten Banden wurden aus dem Gel reisoliert und jeweils 5 µl davon als „Template“ für die zweite PCR eingesetzt.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten SOE-PCR-Ansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

Reisolat 1	5 µl
Reisolat 2	5 µl
5`Primer	0,5 µl
3`Primer	0,5 µl
10 x PCR Puffer mit MgCl ₂	5 µl
dNTP`s	0,4 µl
Taq-Polymerase/Hifi-Polymerase	0,7 µl
Aqua dest.	32,9 µl

Für die SOE-PCR wurde das gleiche Programm wie für die Standard-PCR verwendet.

12. TOPO-Klonierung von PCR-Produkten

Das „pYES2.1 TOPO[®] TA Expression Kit“ der Firma Invitrogen gestattet eine schnelle Insertion von PCR-Produkten in den Vektor pYES2.1/V5-His TOPO. Der linearisierte Vektor trägt an beiden Enden eine kovalent gebundene Topoisomerase und weist 3'-Überhänge auf. Da die mit Hilfe der Taq-Polymerase amplifizierten PCR-Produkte 3'-A-Überhänge aufweisen, kann das Enzym Vektor und Insert miteinander verknüpfen, wobei es sich von der DNA ablöst. Nach der TOPO-Klonierung, die nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde, wurden die rekombinanten Plasmide in *E. coli* TOP10-Zellen per Hitzeschock (30 s, 42°C) transformiert. Die Zellen wurden auf Ampicillin-haltigen LB-Platten ausplattiert, da der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen enthält und somit nur Plasmid-tragende Zellen auf dem entsprechenden Medium wachsen können. Die Transformanten wurden mittels Restriktionsanalyse auf das entsprechende Insert untersucht und anschließend für die Sequenzierung eingesetzt.

13. Acceptor-Cloning

Der linearisiert vorliegende „AccepTor Vektor pSTBlue-1“ besitzt 3'-dU-Überhänge, so dass eine direkte Ligation von PCR-Produkten mit 3'-dA-Überhängen möglich ist. Wird der Vektor nach der Transformation in *E. coli* repliziert, wird Uracil durch Thymin ersetzt. Die Klonierung wurde nach dem Protokoll der Firma Novagen (AccepTor Vector Kits, TB248 05/01) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Transformation der im Kit enthaltenen chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen per Hitzeschock (42° C, 30 s) und die positiven Klone wurden mittels Blau-Weiß-Selektion identifiziert. Dabei macht man sich zu Nutze, dass durch die Insertion des PCR-Produktes in den TOPO-Vektor der Leserahmen des vektoreigenen *lacZ*-Gens zerstört wird, welches für das Enzym β -Galactosidase kodiert. Dieses Enzym ist in der Lage, die glykosidische Bindung innerhalb von X-Gal, einem Galactopyranosid, zu spalten, was

zu einem blauen Produkt führt. In Anwesenheit von X-Gal im Medium färben sich somit diejenigen Klone blau, die einen insertfreien Vektor besitzen, während die Kolonien weiß bleiben, die einen TOPO-Vektor mit Insert beinhalten. Die weißen und somit positiven Transformanten wurden mittels Restriktionsanalyse auf das entsprechende Insert untersucht und anschließend für die Sequenzierung eingesetzt.

14. DNA-Sequenzierung

Zur Ermittlung der Basenabfolge innerhalb der klonierten Konstrukte diente das Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (1977). Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der partiellen Neusynthese eines DNA-Einzelstranges entlang einer vorgegebenen Matrize, der unter Verwendung von 2`-3`-Didesoxynukleotiden gezielt unterbrochen wird. Sobald eines dieser Didesoxynukleotide in den neusynthetisierten Strang eingebaut wird, kommt es zum Abbruch der Synthese, da wegen der fehlenden 3`-OH-Gruppe kein weiteres Nukleotid angefügt werden kann. Somit entsteht eine Population unterschiedlich langer DNA-Fragmente, die sich durch ein identisches 5`-Ende und verschiedene 3`-Enden mit jeweils einer der vier verschiedenen Basen auszeichnen. Die Fraktionierung und Detektion der Fragmente erfolgte in einem hochauflösenden Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen. Die Sequenzierung der hergestellten Konstrukte erfolgte durch die Firma GATC (Konstanz).

15. Restriktion von Plasmid-DNA

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um Enzyme bakterieller Herkunft mit der Fähigkeit, in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen in beiden Strängen eines dsDNA-Moleküls innerhalb spezifischer Basensequenzen (= Erkennungssequenzen) intramolekulare Phosphodiesterbindungen zu spalten. In der Molekularbiologie kommt dabei den

Restriktionsendonukleasen vom Typ II die größte Bedeutung zu, da diese auch innerhalb ihrer Erkennungssequenz schneiden. Bei dieser handelt es sich meist um eine Tetra-oder Hexanukleotid-Sequenz.

Zum Verdau von Plasmid-DNA wurden 1 µl DNA mit 0,5 µl des jeweiligen Restriktionsenzym versetzt und nach Angaben des Herstellers mit Reaktionspuffer und sterilem Aqua dest. auf ein Volumen von 15 µl aufgefüllt. Der Reaktionspuffer besitzt als essentiellen Bestandteil Mg^{2+} -Ionen sowie eine für das jeweilige Enzym optimale NaCl-Konzentration. Zum Verdau der nach DNA-Isolierung mittels alkalischer Lyse noch vorhandenen RNA wurden zusätzlich 0,5 µl DNase-freie RNase hinzugegeben. Der Verdau wurde dann 1h (DNA aus alkalischer Lyse) bzw. 3 h bis über Nacht (Miniprep-DNA) bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur durchgeführt. Die Vollständigkeit des Verdau wurde jeweils mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

16. Agarosegelelektrophorese

10x TBE-Puffer

Tris/HCl	0,89 M
Borsäure	0,89 M
EDTA	20 mM

“Gel-loading”-Puffer (GLB)

Glycerin (96%)	50 %	(v/v)
SDS	1,0 %	(w/v)
EDTA	125 mM	
Bromphenolblau	0,05 %	(w/v)
Xylencyanol	0,05 %	(w/v)

Der Nachweis und die Analyse isolierter Plasmid-DNA oder genomischer DNA erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Die elektrophoretische Beweglichkeit geladener Teilchen ist maßgeblich von der Gesamtladung, Größe und Gestalt des Moleküls, der Porengröße des Trägers, der Ionenstärke des Puffers und der elektrischen Feldstärke abhängig. Unter elektrophoretischen Bedingungen sind die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren ionisiert und wandern als Anionen im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Agarosegele wirken aufgrund ihrer Porenstruktur als Molekularsiebe, deren Porengröße durch die Agarosekonzentration bestimmt wird. Durch Variation der Agarosekonzentration können lineare Fragmente von 0,1 bis 60 kbp voneinander getrennt werden.

Die gelelektrophoretische Auftrennung isolierter Plasmid-DNA erfolgte nach Vorschrift (Sambrook et al., 1989) in einem 1%-igen Agarosegel in 1x TBE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 8 V/cm. Zur Markierung der Lauffront wurden die Proben mit 1/5 Volumen eines „Gel-loading“-Puffers (GLB) versetzt. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurden jeweils 6 µl eines Größenstandards („SmartLadder“, Eurogentec) mitgeführt. Zur Detektion der DNA wurde das Gel nach erfolgter Elektrophorese 15 min in einer Ethidiumbromid-haltigen Lösung (Wasser:Ethidiumbromid 1:10000) angefärbt. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäurebereiche und fluoresziert bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm. Die bildliche Dokumentation der fluoreszierenden Gele erfolgte mit dem „ChemiDoc XRS system“ der Firma BioRad.

17. Bestimmung von Konzentration, Reinheit und Größe der DNA

Die Konzentration und Reinheit der isolierten DNA wurde spektralphotometrisch mit Hilfe des „Gene Quant“ der Firma Pharmacia bestimmt. Dafür wurde 1 µl der DNA-Lösung mit 59 µl Aqua dest. vermischt und die UV-Absorption dieser 1:60-Verdünnung bei

Wellenlängen von 260 nm und 280 nm gegen Aqua dest. als Referenz ermittelt. Zur Messung wurde eine Quarzküvette verwendet, deren Schichtdicke 1 cm betrug. Während das Absorptionsmaximum reiner DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm liegt, ist es für aromatische Aminosäuren, die stellvertretend für die Bestimmung der Proteinkonzentration herangezogen werden, bei 280 nm zu finden. Durch Berechnung der Ratio A_{260}/A_{280} lässt sich die Reinheit der DNA ermitteln. In Anwesenheit reiner DNA beträgt der Quotient 1,8. Ein höherer Wert deutet auf das Vorhandensein von RNA hin, während ein Wert unter 1,8 Proteinverunreinigungen anzeigt.

Als alternative Methode zur Konzentrations- und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurden vergleichende Agarosegelelektrophoresen (siehe 2.18) mit einem DNA-Längenstandard bekannter Konzentration („Smart Ladder“, Eurogentec) durchgeführt. In Tabelle 9 sind die Fragmentgrößen und -konzentrationen des „Smart Ladders“ wiedergegeben.

Tabelle 9: Fragmentgrößen und -konzentrationen des „Smart Ladder“ DNA-Längenstandards

Fragmentgröße [bp]	Fragmentkonzentration [ng/5 µl Marker]
10.000	100
8.000	80
6.000	60
5.000	50
4.000	40
3.000	30
2.500	25
2.000	20
1.500	15
1.000	100
800	80
600	60
400	40
200	20

18. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Extraktion und Aufreinigung von DNA aus TBE-Agarosegelen wurde das „E.Z.N.A. Gel Extraction Kit“ der Firma Omega bio-tek verwendet und nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Diese Methode basiert auf der reversiblen Adsorption von Nukleinsäuren an einer Glasfiebermembran. Die gewünschte DNA-Bande wurde nach Anfärben des Gels mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Dem Agarosegelstück wurden 450 µl Bindepuffer zugegeben und das Gelstück bei 60°C in einem Thermoblock geschmolzen. Danach wurde das DNA-haltige Gemisch auf eine Säule mit Glasfiebermembran gegeben und 1 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert, wobei die DNA reversibel an die Membran am Boden der Säule bindet. Der Durchlauf wurde verworfen und 300 µl Bindepuffer auf die Säule gegeben. Es wurde erneut 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Die gebundene DNA wurde durch Verwendung eines Waschpuffers von Salzen und organischen Molekülen gereinigt, anschließend mit 40 µl Elutionspuffer eluiert und bei -20°C gelagert.

19. Ligation von DNA-Fragmenten

In Anwesenheit von ATP und NAD^+ katalysieren DNA-Ligasen die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen freien 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylgruppen und ermöglichen so beispielsweise die Klonierung von „Fremd-DNA“ in einen Vektor. Eine Voraussetzung für die Ligation zweier DNA-Fragmente besteht darin, dass Vektor und Insert zuvor mit den gleichen Enzymen verdaut und bis zur Ligation in linearisierter Form behalten wurden. Die verdaute DNA wurde in einem 1%-igen Agarosegel aufgetrennt, anschließend die entsprechende Vektor- bzw. Insertbande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA aufgereinigt (siehe 2.17).

Das Volumen des Ligationsansatzes betrug 20 µl. Es wurde ein Vektor:Insert-Verhältnis von 3:1 bzw. 1:1 gewählt, wobei die

eingesetzten Vektor- und Insert-Mengen nach folgender Formel berechnet wurden:

$$\text{Insertmenge [ng]} = \frac{\text{Vektormenge [ng]} \times \text{Insertgröße [kb]}}{\text{Vektorgröße [kb]}} \times \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}}$$

Ein Ligationsansatz (Endvolumen 20 µl) wies folgende Zusammensetzung auf:

Insert	x µl
Vektor	y µl
10x Ligationspuffer	2,0 µl
T4-Ligase	1,0 µl

Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C belassen und anschließend auf einer 0,025 µm dünnen Nitocellulose-Membran (Millipore) 1 h gegen 10%-iges, steriles Glycerin dialysiert. Durch die Dialyse werden die im Ansatz enthaltenen Salze entfernt, welche bei der Elektroporation störend wirken. Zur Elektroporation wurde der gesamte Ansatz eingesetzt.

20. Zellaufschluss rekombinanter Hefen

20.1 S80-Methode

Der S80-Zellaufschluss von Hefezellen stellt ein schnelles Verfahren zur Gewinnung von Hefe-Rohextrakten dar. Hierzu wurden 5 ml Medium 1-2 %-ig aus frischen Hefe-Vorkulturen beimpft und über Nacht kultiviert. Nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase wurden 3×10^8 Hefezellen ausgezählt und die Kultur durch Zentrifugation (9000 rpm, 5 min) geerntet. Das Pellet wurde einmal in 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte bei -80° C

über einen Zeitraum von einer Stunde. Die Zellen wurden danach auf Eis aufgetaut, das Pellet mit 50 µl reduzierendem 2 x SDS-Probenpuffer versetzt und kurz gevortext. Die Denaturierung der Proteine erfolgte durch 10-minütiges Aufkochen und gelegentliches Vortexen. Anschließend wurden die Ansätze 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 20 µl zur SDS-PAGE eingesetzt, die restlichen Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

21. Analyse von Proteinen durch SDS-PAGE

Tris-HCl/SDS

Tris	3 M
SDS	0,3 %

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,45 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4° C gelagert.

5 x Anodenpuffer

Tris/HCl	121,0 g/l
----------	-----------

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,9 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei 4° C.

5 x Kathodenpuffer

Tris	60,60 g/l
Tricin	89,60 g/l
SDS	5,00 g/l

Die Lagerung erfolgte bei 4° C.

SDS-Probenpuffer (2x)

SDS	8 %
Tris/HCl pH 6,8	120 mM
Glyzerin (96 %)	20 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 %

Von Tris/HCl pH 6,8 wurde eine 0,5 M Stammlösung angesetzt, die dann entsprechend dem Endvolumen des Probenpuffers verdünnt wurde. Unter reduzierenden Bedingungen wurden dem Probenpuffer noch 10 % β -Mercaptoethanol frisch hinzugefügt.

Zur Analyse von Proteinen erfolgte die Trennung der Proteingemische durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Shapiro et al., 1967). Bei einer SDS-PAGE werden Proteine elektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Trennwirkung beruht auf der Assoziation des Natriumdodecylsulfats (SDS) mit den Aminosäureketten. Dabei werden nicht-kovalente Bindungen der Proteine zerstört und die Proteine linearisiert. Weiterhin erhalten die Proteine durch die Sulfatgruppen des SDS eine stark negative Ladung, so dass die native Ladung der Proteine maskiert wird. Im elektrischen Feld zeigt sich daher ein einheitliches Wanderungsverhalten der Proteine, welches eine Auftrennung gemäß der Molmasse zur Folge hat (Shapiro et al., 1967). Die Molmasse oder Größe wird durch Vergleich mit der elektrophoretischen Mobilität von Proteinen bekannter Größe (Marker) ermittelt.

In dieser Arbeit wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt. Mit der diskontinuierlichen Elektrophorese verhindert man das Aggregieren von Proteinen beim Eintritt in das Gel und erhält schärfere Banden. Die Gelmatrix wird hierfür in zwei Bereiche eingeteilt: das obere Drittel des Gels besteht aus einem weitporigen Sammelgel, die unteren zwei Drittel des Gels bestehen aus einem engerporigen Trenn- oder Laufgel. Das Sammelgel hat die Aufgabe, die Probe, sobald sie durch das Gel läuft, zu konzentrieren, sodass sie bei Eintritt in das Trenngel eine schmale

Bande bildet. Im Trenngel findet dann die eigentliche Auftrennung des Proteingemisches statt.

Probenvorbereitung für SDS-PAGE

Soweit nicht anders angegeben wurden je 20 µl der Proteinprobe mit reduzierendem 2x SDS-Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95° C denaturiert, kurz sedimentiert und auf das Tris/Tricin-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80-100 V im vertikalen Elektrophoresesystem „Mini-Protean II“ (Firma BioRad). Danach wurden die Gele zum Western Blot eingesetzt. Dabei wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und im Rahmen der Western Analyse immunologisch detektiert. Als Längenstandards wurden der „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Firma Fermentas) sowie der „[¹⁴C] Protein Molecular Weight Marker CFA756“ (Firma GE Healthcare) verwendet. In Tabelle 10 sind die molekularen Massen der Markerproteine zusammengefasst.

Tabelle 10: Auflistung der molekularen Massen von Markerproteinen der zur SDS-PAGE eingesetzten Längenstandards

PageRuler™ Prestained Protein Ladder [kDa]	[¹⁴ C] Protein Molecular Weight Marker [kDa]
170	220
130	97
95	66
72	45
55	30
43	20
34	14
26	--
17	--
10	--

In der vorliegenden Arbeit wurden 10 %-ige Tris/Tricin-Gele in einem Tricin-Puffersystem verwendet.

Ansatz zur Herstellung von zwei Sammel- und Trenngelen:

Trenngel:

Rotiphoresegel 30 (Roth)	5,88 ml
Tris-HCl/SDS, pH 8,45	5,0 ml
Aqua dest.	2,12 ml
Glycerin (79 %)	2,0 ml
APS (10 %)	80 µl
TEMED	25 µl

Sammelgel:

Rotiphoresegel 30 (Roth)	1,62 ml
Tris-HCl/SDS, pH 8,45	3,1 ml
Aqua dest.	7,78 ml
APS (10 %)	80 µl
TEMED	25 µl

Zuerst wurde das Trenngel gegossen und mit 2-Propanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das 2-Propanol abdekantiert, das Gel mit Wasser gewaschen, dies wieder vollständig entfernt und schließlich das Sammelgel gegossen.

22. Western Analyse

Transferpuffer

Tris	3,03 g/l
Glycin	14,40 g/l
SDS	1,00 g/l
Methanol	200 ml/l

Blockingpuffer

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

10 x TBS

Tris/HCl	121,12 g/l
NaCl	58,40 g/l

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

Waschpuffer

Tris	1 M
NaCl	1 M
Tween 20	0,05 % (v/v)

22.1 „Semi-dry-blotting“

Die Polyacrylamidgele wurden nach beendeter Elektrophorese 20 min in kaltem Transferpuffer äquilibriert. Ebenso wurde mit der PVDF-Membran verfahren, nachdem sie 30 sec in 100 %-igem Methanol getränkt worden war. Der horizontale Transfer der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran erfolgte während 90 min in einer „Trans Blot SD Electrophoretic Transfer Cell“ (Firma BioRad) bei 50 mA pro Gel.

22.2 Immundetektion

Zum selektiven Nachweis bestimmter Proteine auf der Membran werden diese mit spezifischen Antikörpern zur Reaktion gebracht. Dabei macht man sich das Antigen-Antikörper-Bindungsprinzip zunutze: spezifische Antikörper (monoklonal oder polyklonal) binden an das passende Protein auf der PVDF-Membran. An die Fc-Region des primären Antikörpers bindet wiederum ein sekundärer Markierungsantikörper, über den dann die Detektion erfolgt.

Die mittels „semi-dry-blotting“ erhaltene PVDF-Membran wurde über Nacht in 30 ml Blockingpuffer belassen, um die Membran abzusättigen und ein unspezifisches Binden der Antikörper zu verhindern. Es folgte das Hybridisieren mit dem primären Antikörper (siehe Tabelle 7), welcher in 20 ml Blockingpuffer verdünnt und eine Stunde auf der Membran belassen wurde. Die Membran wurde zweimal 5 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 7) in Blockingpuffer hybridisiert. Vor Zugabe des Substrates wurde die Membran viermal 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Je 200 µl der Luminol/Enhancer- und der Peroxid-Lösung des „SuperSignal West Dura Trial Kit“ (Firma Pierce) wurden gemischt und auf die abgetropfte Membran gegeben. Zur Detektion der Proteine wurde die Membran in Klarsichtfolie eingeschweißt und für zwei Stunden auf einen Röntgenfilm (Firma Roche) gelegt. Danach erfolgte die Entwicklung des Films.

23. *In vitro* Transkription/Translation

Die *in vitro* Transkription ist eine im Reagenzglas durchgeführte spezifische und weitgehend fehlerfreie RNA-Synthese, wobei als Matrize eine gereinigte DNA verwendet wird. Jede DNA, die eine RNA-Polymerase-Bindungsstelle besitzt, kann transkribiert werden. Da jedoch die wenigsten DNA-Moleküle eine solche Bindungsstelle besitzen, wird die gewünschte DNA in einen Vektor inkloniert, welcher eine RNA-Polymerase-Bindungsstelle enthält. Am besten eignet sich ein Vektor, der links und rechts der Klonierungsstelle eine SP6 bzw. eine T7- oder T3-Bindungsstelle besitzt. Auf diese Weise kann man später nach Belieben beide Stränge transkribieren, indem man die entsprechende RNA-Polymerase auswählt. Vor der Transkription wird die Plasmid-DNA zunächst linearisiert, um sogenannte „run-off“-Transkripte zu erhalten, die lediglich die gewünschte DNA-Sequenz enthalten. Man sollte keine Restriktionsenzyme verwenden, die überhängende 3'-Enden produzieren, weil diese ebenfalls als

Startpunkt für die RNA-Polymerase dienen können (Schenborn und Mierendorf, 1985). Nach erfolgter RNA-Synthese kann die Translation der RNA entweder in einem Weizenkeimextrakt („wheat germ extract“) oder einem Reticulocytenlysate durchgeführt werden. Dies sind die beiden möglichen eukaryotischen Translationssysteme. Meist führt man die Translation in Gegenwart von ^{35}S -Methionin durch, um das Protein durch eine anschließende Autoradiographie nachweisen zu können. Steht jedoch ein proteinspezifischer Antikörper zur Verfügung, so kann der Nachweis auch immunologisch über eine Western Blot-Hybridisierung erfolgen (Krieg und Melton, 1987; Promega „Protocols and Applications Guide“, 1996).

In dieser Arbeit wurden die hergestellten rekombinanten Plasmide zunächst durch Restriktion mit *HindIII* linearisiert. Zum Verdau der Plasmid-DNA wurden 5 µg DNA mit 5 µl des Restriktionsenzym *HindIII* versetzt und nach Angaben des Herstellers mit Reaktionspuffer und sterilem Aqua dest. auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für mindestens drei Stunden bei 37° C inkubiert. Die restringierte DNA wurde dann mittels Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol präzipitiert, um absolut reine DNA zu erhalten, die bei der Transkription zu einer höheren Ausbeute an RNA führen soll. Dazu wurde der DNA Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol im Verhältnis 1:1 zugesetzt und der Ansatz gevortext. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 3 min wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dieser Schritt noch einmal wiederholt. Der wässrigen Phase wurde das gleiche Volumen an Isopropanol zugesetzt und die Probe 30 min bei -20° C gelagert. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurde das Pellet zweimal mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, im „SpeedVac“ (Firma Bachofer) getrocknet und in 5 µl Aqua dest. gelöst.

In der vorliegenden Arbeit wurde das „Riboprobe[®] in vitro Transcription Systems“ Kit der Firma Promega verwendet. Folgender Ansatz wurde bei RT zusammenpipettiert:

5 x Transkriptionspuffer	5,0 µl
DTT (100 mM)	2,5 µl
RNasin	0,5 µl
rNTPs	5,0 µl
Ribo m ⁷ G Cap Analogon	2,5 µl
Linearisierte DNA	2,0 µl
Nukleasefreies Wasser	6,5 µl
T7 Polymerase	1,0 µl

Das Ribonukleotidgemisch wurde so pipettiert, dass jeweils 5 µl rATP, rCTP und rUTP mit 5 µl rGTP einer 1:10-Verdünnung (1 µl rGTP + 9 µl Nukleasefreies Wasser) gemischt wurden (Endkonzentration: je 0,5 mM). Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37° C inkubiert. Danach wurden erneut 1 µl T7 Polymerase sowie 2 µl rGTP (1:10 verdünnt) zugegeben und die Reaktion für eine weitere Stunde bei 37° C inkubiert. Die RNA wurde sofort auf Trockeneis gelagert und bis zur weiteren Verwendung bei -80° C gelagert.

Zur *in vitro* Translation wurde das „Wheat Germ Extract“ Kit der Firma Promega eingesetzt. Folgender Ansatz wurde auf Eis zusammenpipettiert:

„Wheat Germ Extract“	25,0 µl
Aminosäure-Mix, ohne Methionin	4,0 µl
RNA	2,0 µl
Kaliumacetat	3,5 µl
RNasin	1,0 µl
Nukleasefreies Wasser	9,0 µl
[³⁵ S] Methionin (60 µCi)	5,5 µl

Die Translationsreaktion wurde eine Stunde bei 30° C inkubiert. Für die SDS-PAGE wurden die entsprechenden Proben mit 50 µl reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95° C im Wasserbad aufgeköcht.

24. Pulsmarkierung („pulse labeling“)

Protein A Sepharose

1,5 g Protein A Sepharose-Pulver wurden mit 25 ml Net-Puffer versetzt und für 4 h zum Aufquellen der Sepharose im Kühlraum gelagert. Danach wurde die Sepharose durch Zentrifugation (8000 rpm, 10 min) bei 4° C sedimentiert, in 10 ml 1 M Tris-Puffer (pH 7,5) resuspendiert und für eine Stunde im Kühlraum gelagert. Nach erneuter Zentrifugation (8000 rpm, 10 min, 4° C) wurde die Protein A Sepharose schließlich in 15 ml Net-Puffer resuspendiert und bis zum weiteren Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt.

ConA-Puffer

NaCl	500 mM
Tris/HCl	20 mM
Triton X-100	1 %
Natriumazid	2 mM

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

IP-Puffer

NaCl	150 mM
Triton X-100	1 %
SDS	0,1 %
Tris/HCl	100 mM
Natriumazid	2 mM

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

Tris/NaCl-Puffer

NaCl	50 mM
Tris/HCl	20 mM
Natriumazid	2 mM

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

Urea-Puffer

Harnstoff	2 M
NaCl	200 mM
Triton X-100	1 %
Tris/HCl	100 mM
Natriumazid	2 mM

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

Net-Puffer

Tris/HCl	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Nonidet P-40	0,1 %

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

100 x Chase Mix

Cystein	0,3 %
Methionin	0,4 %
Ammoniumsulfat	100 mM

EndoH-Puffer

Natriumcitrat	0,25 mM
SDS	0,2 %

1 M DTT

DTT 1M

Lysepuffer

Tris/HCl 20 mM

SDS 1 %

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

1 M Natriumazid

Natriumazid 1 M

250 mM Tris-Puffer (pH6,8)

Tris/HCl 250 mM

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 6,8 eingestellt.

1 M Tris-Puffer (pH 9,4)

Tris/HCl 1 M

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 9,4 eingestellt.

1 M Tris-Puffer (pH 7,5)

Tris/HCl 1 M

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

Protease Inhibitor

Zur Herstellung der Stammlösung wurde eine „Protease inhibitor cocktail“ Tablette (Firma Roche) in 2 ml IP-Puffer gelöst. Für die Pulse Chase Experimente wurden 200 µl der Stammlösung mit 10 ml IP-Puffer verdünnt und entsprechend verwendet.

2 x „Loading buffer“ für SDS-Proben

Tris/HCl (pH 6,8)	250 mM
SDS	10 %
Glycerol	50 %
β-Mercaptoethanol	25 %
Bromphenolblau	5 %

Laemmli-Puffer für ¹⁴C-Proteinmarker

Tris/HCl (pH 6,8)	62,5 mM
SDS	2 %
Glycerin	10 %
β-Mercaptoethanol	5 %
Bromphenolblau	0,001 %

Mit der Pulsmarkierung ist es möglich, einen intrazellulären Prozess, der über einen bestimmten Zeitraum entsteht, genauer zu untersuchen. So können zum Beispiel intrazelluläre Ortsveränderungen von Proteinen oder die Umwandlung von Metaboliten im zeitlichen Verlauf verfolgt werden. Dabei wird eine Zellprobe für einen kurzen Zeitraum („pulse“) mit einer radioaktiven Verbindung versetzt, dann mit Puffer gewaschen, um die radioaktive Verbindung zu entfernen und schließlich mit einer nichtmarkierten Form derselben Verbindung inkubiert („chase“). In dieser Arbeit wurde lediglich ein „Labeling“ der Ricin A-Kette durchgeführt, jedoch kein komplettes „Pulse Chase“-Experiment.

24.1 Markierungsexperimente mit [³⁵S]-Methionin

Eine deutlich sensitivere Methode als die konventionelle Western Analyse zum Nachweis der *in vivo* Expression von RTA in Hefen stellt die Markierung des exprimierten Toxins mit Radioisotopen dar. In dieser Arbeit wurde der β-Strahler ³⁵S eingesetzt, der im Vergleich zu ³²P zwar eine ungefähr zehnfach geringere Emmissionsenergie besitzt,

jedoch eine längere Lebensdauer aufweist. Der Nachweis des radioaktiv markierten Toxins erfolgte mittels Immunpräzipitation. Bei dieser Methode kommt es zur Ausfällung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Nachdem die Zellen lysiert wurden, werden Antikörper hinzugegeben, welche an eines der Proteine spezifisch binden. Über diese Antikörper kann dann das gesuchte Protein gewonnen werden. Hierbei bedient man sich in der Regel der spezifischen Eigenschaften von Protein A, das aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus* stammt, und/oder Protein G, welches ein Bestandteil der Zellwand bestimmter Streptokokken-Stämme ist. Protein A und G binden mit hoher Spezifität an die Fc-Region der meisten Säugetier-Immunglobuline. Mit diesen Proteinen werden nun Kügelchen beschichtet (sogenannte Beads, z.B. aus Sepharose oder magnetischen Mikropartikeln), um in einer solchen Immunpräzipitation die Antikörper-Protein-Komplexe an sich zu binden. Die Isolierung der Komplexe erfolgt in der Regel über Zentrifugation sowie mehrere Waschschriffe, um unspezifische Proteine zu entfernen. Die Proteine werden von den Beads durch Denaturierung gelöst (Firestone and Winguth, 1990, MacMillan-Crow and Thompson, 1999). Die Proben wurden in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und mittels Röntgenfilm detektiert.

Für den Versuch wurden 20 ml ura d/o-Raffinose Medium mit 5 ml einer ü. N.-Kultur der jeweiligen Transformante beimpft. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl ermittelt und auf $1,48 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Die geernteten Zellen wurden in 1 ml vorgewärmten ura d/o-Galaktose Medium resuspendiert, um die Expression der jeweiligen RTA-Konstrukte zu induzieren. Es folgten zwei weitere Waschschriffe in d/o-Galaktose Medium. Nach dem letzten Waschschriff wurde das Pellet schließlich in 10 ml ura d/o-Galaktose Medium aufgenommen und für die entsprechende Induktionszeit (0 h bzw. 4 h) bei 30° C auf einem Rundschrüttler inkubiert. Zum entsprechenden Zeitpunkt wurden die Zellen geerntet (8000 rpm, 10 min) und in 1 ml ura/met d/o-Galaktose Medium resuspendiert. Die Probe wurde halbiert und 500 µl der Zellen wurden bei 13000 rpm für

eine Minute zentrifugiert und in 1 ml ura/met d/o-Galaktose Medium resuspendiert. Nach einem erneuten Waschschrift in ura/met d/o-Galaktose Medium wurden die Zellen in 250 µl des gleichen Mediums aufgenommen und 30 min bei 30° C inkubiert. Dieser Inkubationsschritt dient dazu, den Zellen Methionin aus dem Medium zu entziehen und sie somit kompetent für den Einbau des später zugegebenen radioaktiv markierten Methionins in ihre Stoffwechselprodukte zu machen. Die Zellen wurden kurz gevortext und mit 5,5 µl ³⁵S-Methionin (Endkonzentration 60 µCi) versetzt und 20 min bei 30° C inkubiert. Danach wurden der Probe 750 µl eiskalte Tris/Azid-Lösung zugegeben und die Zellen 5 min auf Eis gelagert. Durch die Behandlung der Zellen mit Aziden, wird der Zellstoffwechsel gehemmt, da die Azide irreversibel an das Enzym Cytochrom c-Oxidase der Atmungskette binden. Die Zellen werden schließlich pelletiert (13000 rpm, 1 min) und das Pellet in 750 µl Tris/DTT/Azid-Lösung resuspendiert. Der Zuckeralkohol Dithiothreitol führt zu einer Konservierung der Proteine im Zellinnern. Die Zellen wurden durch einminütige Zentrifugation bei 13000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Durch Zugabe von 200 µl Glasperlen in Lysepuffer erfolgte der Aufschluss der Zellen nach folgendem Schema:

Trockeneis	2 min	}	3 Zyklen
Vortexen	2 min		
Wasserbad (95° C)	3 min		
Vortexen	2 min		

Nach dem Zellaufschluss wurden 800 µl Protease-Inhibitor-Mix zugegeben und die Glasperlen durch Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 min sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in welchem bereits 50 µl Pansorbin-Zellen vorgelegt wurden. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugieren (13000 rpm, 1 min) wurden die Pansorbin-Zellen pelletiert und der Überstand wurde zu 100 µl 10% Protein A Sepharose und 4 µl anti-RTA-Antikörper gegeben und die Proben ü.N. bei 4° C auf

dem Drehrad inkubiert. Am nächsten Tag wurden der Ansatz 1 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet verschiedenen Waschschritten unterzogen. Zunächst wurden die Ansätze jeweils zweimal mit IP- und Urea-Puffer gewaschen, anschließend je einmal mit ConA- und Tris/HCl-Puffer. Nach dem letzten Waschschrift wurde vorsichtig der gesamte Überstand abgenommen und das Sepharose-Pellet mit 35 µl 2 x SDS-Probenpuffer (reduzierend) versetzt. Durch fünfminütiges Erhitzen der Proben auf 95° C wurden die Proteine denaturiert und von der Antikörper-gekoppelten Sepharose gelöst und konnten nun in einer SDS-PAGE analysiert werden. Als Größenstandard diente ein [¹⁴C]-markierter „Protein molecular weight marker CFA75G“ (GE Healthcare).

24.2 Direkte Autoradiographie

Die Detektion des radioaktiven Toxins erfolgte in Blotformaten über Autoradiographie mit Röntgenfilmen, die zur Dokumentation dauerhaft aufbewahrt werden können. Bei der direkten Autoradiographie wird die strahlende Fläche (PVDF-Membran) direkt mit dem Röntgenfilm (Firma Eppendorf) in Kontakt gebracht. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte bei -80° C für drei Tage, um eine ausreichende Signalstärke zu gewährleisten. Der Film wurde mit Röntgenentwickler entsprechend der Hersteller-Vorschrift entwickelt.

25. Screening nach RTA-resistenten *S. cerevisiae*-Mutanten

Nach der Transformation des Wildtyp-Hefestammes *S. cerevisiae* BY4742 sowie diverser Hefe-Deletionsmutanten mit den verschiedenen RTA-Konstrukten (in pRS316.PT) wurden verschiedene Methoden angewandt, um das Wachstum der Hefen nach intrazellulärer Expression von RTA zu untersuchen.

25.1 Assay zur Quantifizierung der toxischen Wirkung von RTA auf Hefen (Wachstumstest)

Um die *in vivo* Toxizität der jeweiligen RTA-Varianten für die Hefen quantifizieren zu können, wurde untersucht, ob die mit RTA transformierten Hefezellen eine intrazelluläre Expression von RTA tolerieren. Die transformierten Hefen wurden über Nacht in 5 ml d/o-Raffinose Medium bei 30° C auf einem Rundschüttler angezogen. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Die entsprechenden Zellen wurden geerntet (9000 rpm, 5 min) und das Pellet in 50 µl d/o-Raffinose Medium resuspendiert. Es wurden 5 Verdünnungsstufen hergestellt ($10^7 - 10^2$) und von jeder Verdünnung wurden 5 µl auf eine d/o-Glukose Platte (reprimierende Bedingungen) bzw. eine d/o-Galaktose Platte (induzierende Bedingungen) aufgetropft. Die Platten wurden 5 Tage bei 30° C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Hefezellen, die mit dem entsprechenden Leervektor transformiert waren, mitgeführt.

25.2 Mikrotiterplatten-Fluoreszenz-„Reader“-System

Eine weitere Methode zur Untersuchung der *in vivo* Toxizität der verschiedenen RTA-Varianten in Hefe, stellt das Mikrotiterplatten-Fluoreszenzreader-System dar. Um einen Hinweis auf das Zellwachstum und das Überleben der Hefen nach der intrazellulären Expression von RTA zu erhalten, wurde indirekt die *in vivo* Translation des Reporterproteins GFP („green fluorescent protein“) durch Messung der GFP-Fluoreszenz bestimmt. Dabei sollten ein GFP-Konstrukt und ein entsprechendes RTA-Konstrukt zusammen in Hefe coexprimiert werden. Nach Induktion der intrazellulären Expression von RTA und GFP sollte die Translation von GFP gehemmt werden, was wiederum in einer Änderung der Fluoreszenzintensität innerhalb der Zelle detektiert werden kann.

Als Messgerät wurde der „Fluoroskan Ascent CF“ der Firma Thermo Labsystems eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein Fluorometer, das

die verwendete Mikrotiterplatte durch den Boden der Platte bestrahlt und die Emission misst. Dieses Gerät ist ideal für zelluläre Untersuchungsmethoden wie zum Beispiel die Messung der Zellproliferation, die Durchführung zytotoxischer Assays oder Reporterprotein-Assays. Das Filterpaar mit einer Absorptions-Wellenlänge von 485 nm und einer Emissions-Wellenlänge von 527 nm ist optimal geeignet, um GFP-Proben zu analysieren (Thermo Labsystems „Fluoroskan[®] Ascent CF User Manual“, 2002).

Zur Versuchsdurchführung wurden 20 ml d/o-Raffinose Medium mit 5 ml einer frischen ü. N.-Kultur der entsprechend cotransformierten Hefe beimpft und über Nacht bei 30° C auf einem Rundschüttler inkubiert. Die OD₆₀₀ der Hefekultur wurde auf 10 eingestellt, die entsprechende Menge an Zellen geerntet (8000 rpm, 10 min) und das Pellet in d/o-Raffinose Medium resuspendiert. Zur Messung wurden 200 µl der Probe in eine Vertiefung der 96-Well Platte gegeben. Dabei wurden je Probe drei parallele Ansätze zur Messung eingesetzt, von denen dann ein Mittelwert gebildet wurde. Durch Zugabe von 2 % Galaktose wurde die Expression von RTA und GFP induziert. Die Platte wurde zur Messung in das Fluorometer eingestellt und bei 30° C und 1020 rpm für mindestens 20 h inkubiert.

26. Probenvorbereitung zur Fluoreszenzmikroskopie (BiFC)

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie können fluoreszierende Moleküle, sogenannte Fluorochrome, beobachtet werden. Diese absorbieren Licht einer definierten Wellenlänge und emittieren Licht einer anderen, längeren Wellenlänge. Wird ein Fluorochrom im Bereich seiner spezifischen absorbierenden Wellenlänge angeregt, kann es mittels eines geeigneten Emissionsfilters betrachtet werden.

Zur Kotransformation von Hefezellen mit rekombinanten „Fänger“- und „Beute“-Plasmiden wurde der *S. cerevisiae*-Stamm BY4742 verwendet. Nach Selektion von positiven Transformanten auf *ura leu* d/o Glukose

Platten wurden jeweils 3 Kolonien in ura leu d/o Glukose Medium ü. N. kultiviert. 4 ml der ü. N.-Kultur wurden 3 min bei 9000 rpm geerntet. Das Pellet wurde zweimal in 1 ml ura leu d/o Galaktose Medium gewaschen, um die Zellen von Glukose zu befreien und so eine Katabolitrepression zu vermeiden. Danach wurden die Zellen zur Induktion der Expression der Konstrukte in 4 ml ura leu d/o Galaktose-Medium aufgenommen und ein bis zwei Tage bei 20° C auf einem Rundschtüttler inkubiert. Die niedrige Temperatur wurde gewählt, da bestimmte Fluoreszenzproteine, wie z.B. GFP, unter diesen Bedingungen eine verbesserte Reifung aufweisen (Tsien, 1998). Jeweils ein und zwei Tage nach Induktion wurde aus jedem Röhrchen eine Probe von 500 µl entnommen. Davon wurden 5 µl auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Alle fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop „Biozero BZ-8000“ der Firma KEYENCE durchgeführt. Als Fluoreszenzfilter wurde der Filter TxRed („Texas Red“) derselben Firma verwendet (Anregungswellenlänge: 560/40 nm; Absorptionswellenlänge: 630/60 nm; Wellenlänge des Dichroitischen Spiegels: 595 nm). Alle Aufnahmen wurden mit einer Ölimmersions-Objektivlinse (Nikon, PlanApo; VC 100xH; NA: 1,40) mit 50-facher Vergrößerung gemacht. Die Belichtungszeit aller Fluoreszenzaufnahmen betrug 0,25 s. Von jeder Probe wurden mindestens drei Hellfeld- und Fluoreszenzbilder angefertigt.

III Ergebnisse

Teil A: Untersuchung der Retrotranslokation von Ricin A (RTA) durch Transformation ausgewählter Deletionsmutanten eines Gen-„Knock-out“ Pools der Hefe

Von Pflanzen und Bakterien wird eine Vielzahl von Proteintoxinen produziert, welche bestimmte Komponenten im Cytosol von Säugerzellen als Target haben. Um ihre Zielorganelle zu erreichen, müssen die Toxine verschiedene Membransysteme passieren. Dabei nutzen Pathogene bereits existierende physiologische Mechanismen der Zelle aus (Hazes and Read, 1997). Für einige A/B-Toxine wird vermutet, dass sie nach endozytotischer Aufnahme in die Zelle und anschließendem retrograden Transport bis zum Endoplasmatischen Retikulum, schließlich die ER-assoziierte Degradation ausnutzen, um aus dem ER in das Cytosol zu gelangen (Lord, 1996; Frigerio et al., 1998; Simpson et al., 1999; Lord et al., 2003). Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Retrotranslokation der Ricin A Kette aus dem Endoplasmatischen Retikulum in das Cytosol von Hefen. Für die katalytische A-Kette (RTA) des Pflanzentoxins Ricin konnte bereits gezeigt werden, dass sie mit Hilfe eines N-terminal anfusionierten Signalpeptids in das ER von Hefen transportiert werden kann und dort einen RTA-sensitiven Phänotyp auslöst (Schnöder, 2005). Aufgrund dieses Phänotyps muss darauf geschlossen werden, dass das cytotoxische RTA-Konstrukt einen Weg gefunden haben muss, um aus dem ER zurück in das Cytosol zu gelangen. Pulse-Chase Experimente lieferten den Beweis, dass das retrotranslozierte RTA proteolytisch abgebaut wird, während in einer Hefe-Mutante, die einen Defekt im ER-Export für das Sec61-Translocon trägt, die Menge an proteolytisch degradiertem RTA signifikant reduziert war (Simpson et al., 1999). Die *in vivo* Expression einer toxischen RTA-Variante erlaubt somit die Aufklärung der retrograden Toxintranslokation durch „Screening“ ausgewählter Hefe-Deletionsmutanten auf

Sensitivitätsveränderungen. Dadurch sollte es möglich sein, weitere Interaktionspartner von RTA zu identifizieren und einen Rückschluss auf deren Funktion beim ER-Export von RTA zu ziehen.

1. Nachweis der *in vivo* Toxizität verschiedener RTA-Varianten nach Expression in Hefe

Simpson et al. (1999) konnten RTA mit Hilfe des hefeeigenen ER-Import Signals von Kar2p (Kar2-RTA) in das ER-Lumen dirigieren und mittels „Pulse Chase“-Experimenten zeigen, dass im ER-Lumen das Signalpeptid abgespalten und RTA glykosyliert wurde. Die Arbeitsgruppe verwendete jedoch nicht wildtypisches RTA, da Hefezellen die Kar2-RTA Expression im ER nicht tolerierten (Simpson et al., 1999). Deshalb wurde eine mutierte RTA-Variante (RTA^{E177D}) eingesetzt, bei der durch einen Aminosäureaustausch an Position 177 (Glutamat in Aspartat) eine Reduktion des k_{cat} -Wertes um das 50-Fache gegenüber Wildtyp-RTA erreicht wurde (Chaddock and Roberts, 1993). Um die ER/Cytosol-Dislokation von RTA näher untersuchen zu können, sollten verschiedene RTA-Varianten hergestellt und zunächst bezüglich ihrer Toxizität auf Hefezellen untersucht werden. Die in Abbildung 2 dargestellten Toxinvarianten wurden mittels spezifischer Primer amplifiziert und in den „Shuttle“-Vektor pRS316.PT einkloniert. Dieser Zentromervektor liegt mit einer Kopienzahl von ein bis zwei pro Zelle vor. Die Transkriptionsstärke wird durch Anschalten des *GAL1*-Promotors circa 1000-fach gesteigert.

Damit die Toxine in das ER dirigiert werden, wurden verschiedene ER-Import-Signale eingesetzt. Zum einen wurde das Signalpeptid des viralen Killertoxin-Vorläufers K28 aus *S. cerevisiae* an den N-Terminus der Ricin A Kette fusioniert. Breinig et al. (2006) postulierten, dass der K28 Toxinvorläufer posttranslational in das ER von Hefen dirigiert wird. Dabei fand die Gruppe eine reduzierte Sekretion von reifem K28-Toxin in Hefemutanten mit Defekten in zellulären Komponenten, welche am posttranslationalen Protein-Import in das ER beteiligt sind. So war die Toxinsekretion in einer $\Delta sec72$ - bzw. $\Delta sec71$ -Mutante fast vollständig

gehemmt, während Mutanten mit einem Defekt in dem Protein Sec62p eine deutlich verringerte Toxinsekretion zeigten (Breinig et al., 2006). Diese drei Proteine bilden zusammen einen cytosolischen Rezeptor-Komplex, der an dem SRP-unabhängigen posttranslationalen Protein-Import in das Endoplasmatische Retikulum involviert ist (Deshaies et al., 1988; Becker et al., 1996). Ein Hydrophobizitäts-Plot von K28 ptox deutete ebenfalls auf einen posttranslationalen Import des K28 Toxinvorläufers hin (Eisfeld, 2001). Zum anderen diente die Signalsequenz des K1-Toxinvorläufers als ER-Importsignal für RTA. Das Killertoxin K1 aus *S. cerevisiae* tötet sensitive Hefezellen derselben Species ab, indem der Ionen-Gradient über der Plasmamembran unterbrochen wird, nachdem das Toxin an seinen Zellwandrezeptor (β -1,6-Glucan) gebunden hat (Flegelova et al., 2001). Das 26 Aminosäuren große und stark hydrophobe Signalpeptid des K1-Killertoxin-Vorläufers zeigt typische Charakteristika eines cotranslational aktiven ER-Importsignals (Bostian et al., 1984).

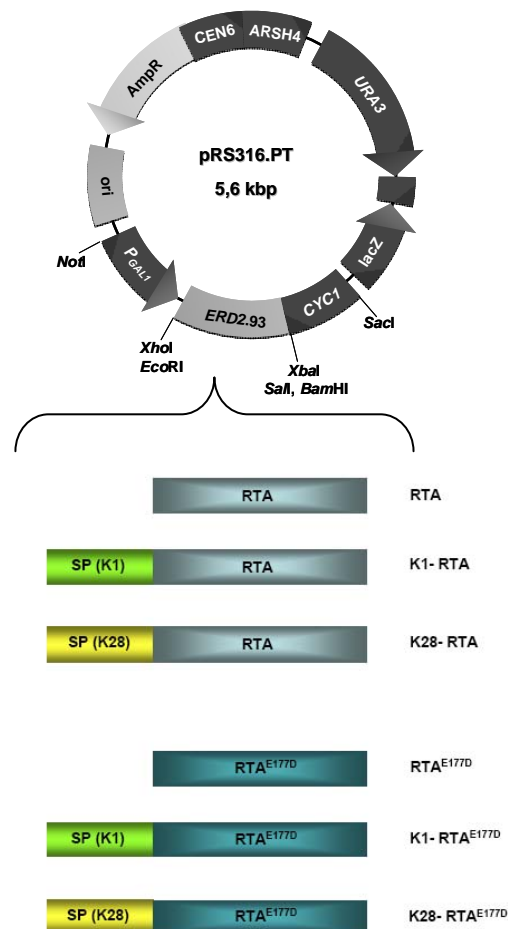


Abbildung 2: Schematische Darstellung der hergestellten RTA-Derivate zur Überprüfung der *in vivo* Toxizität und Expression der RTA-Untereinheit . Die Konstrukte wurden mit sequenzspezifischen Primern (siehe Material und Methoden, Tabelle 6) mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pRS316.PT einkloniert. Als 5'-Schnittstellen wurden die Sequenzen *XbaI/BamHI/EcoRI* bzw. *XhoI/EcoRI* anfusioniert, als 3'-Schnittstellen *NotI/Sall* (SP, Signalpeptid).

Die Transformation der rekombinanten Plasmide erfolgte zunächst in den sensitiven Wildtyp-Hefestamm BY4742. Dieser Stamm wurde ausgewählt, da es sich hierbei um den isogenen Wildtyp zu den später getesteten Deletionsmutanten handelt. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pRS316.PT in BY4742 transformiert und mitgeführt. Um die Toxizität der einzelnen RTA-Konstrukte besser quantifizieren und vergleichen zu können, wurde ein *in vivo* Wachstumstest der

transformierten Hefen durchgeführt, der besonders geeignet ist, um das Absterben einer transformierten Hefe nach *in vivo* Expression von RTA zu ermitteln. Zur Anzucht der Hefen wurde Raffinose als Kohlenstoffquelle ausgewählt, um eine Katabolitrepression zu vermeiden, die bei dem „Shiften“ der Zellen von Glukose auf Galaktose auftritt. Mindestens drei verschiedene Transformanten wurden in *ura* d/o Raffinose Medium angezogen und dann jeweils 1×10^7 Zellen geerntet. Es wurden parallele Verdünnungsreihen (10^7 – 10^2 Zellen) hergestellt und jeweils 5 μ l jeder Verdünnung auf *ura* d/o Glucose Agar (reprimierende Bedingungen) bzw. *ura* d/o Galaktose Agar (induzierende Bedingungen) aufgetropft und die Platten 5 Tage bei 30° C inkubiert. Danach wurde das Wachstum der Transformanten in den einzelnen Verdünnungsstufen nach Induktion untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 dargestellt.

Die Toxizitätsuntersuchungen in der Hefe BY4742 zeigten, dass die wildtypischen RTA-Varianten eine signifikant stärkere *in vivo* Toxizität auf die Hefezellen ausüben als die mutierten RTA^{E177D}-Konstrukte. Während bei der Expression von cytosolischem RTA keine Zellen überlebten, war die Toxizität der RTA-Varianten mit einem Signalpeptid am N-Terminus vermindert. Hierbei konnte ein Wachstum der transformierten Hefezellen bei den ersten beiden Verdünnungsstufen (10^6 und 10^5) festgestellt werden. Es war jedoch kein Unterschied in der Toxizität bezüglich des verwendeten ER-Importsignals zu erkennen. Betrachtet man die Art der verwendeten ER-Importsignale (co- bzw. posttranslational), so könnte vermutet werden, dass RTA, welches posttranslational in das ER-Lumen importiert wird eine eventuell stärker manifestierte Toxizität für die Hefen aufweist als das cotranslational gesteuerte RTA-Konstrukt. Da K28-RTA bereits komplett translatiert im Hefe-Cytosol vorliegt, bevor es in das ER eingeschleust wird, besteht die Möglichkeit, dass es bereits vor ER-Eintritt seine toxische Wirkung auf die Ribosomen entfaltet. Diese Theorie konnte in dem durchgeführten Toxizitätstest jedoch nicht bestätigt werden. Das cytosolisch exprimierte RTA^{E177D}-Konstrukt zeigte trotz der 50-fach reduzierten Toxizität gegenüber WT-RTA noch eine deutlich toxische

Wirkung auf die transformierten Hefezellen. Dabei war ein Wachstum der mit RTA^{E177D} transformierten Zellen bei den ersten drei Verdünnungsstufen (10^6 bis 10^4) zu sehen. Die mit K1- bzw. K28-RTA^{E177D} transformierten Hefezellen erwiesen sich resistent gegen RTA (Abbildung 3).

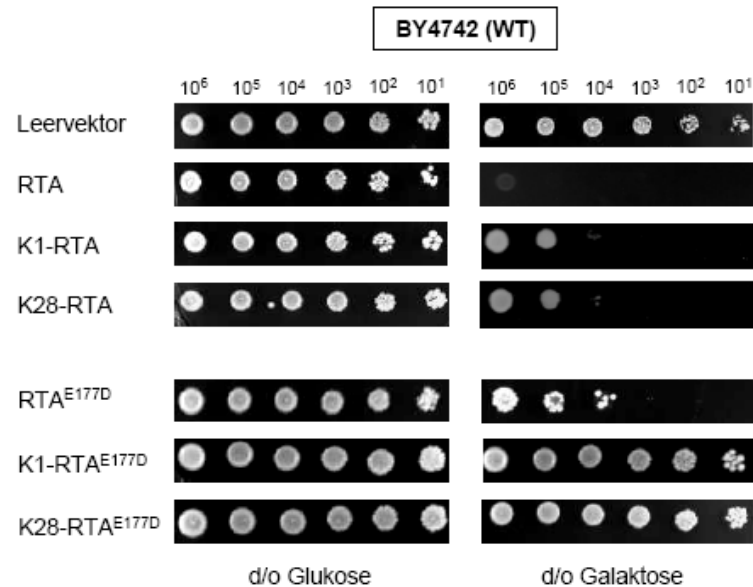


Abbildung 3: Untersuchung der *in vivo* Toxizität von verschiedenen RTA-Varianten in der Wildtyp-Hefe BY4742. Die eingesetzten Konstrukte wurden in den Zentromervektor pRS316.PT inkloniert und in die sensitive Hefe BY4742 transformiert. Die Anzucht der Hefe-Transformanten erfolgte ü.N. auf ura d/o Raffinose Medium. Es wurden 1×10^7 Hefezellen geerntet und in $50 \mu\text{l}$ ura d/o Raffinose Medium aufgenommen und eine logarithmische Verdünnungsreihe (1:10) hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je $5 \mu\text{l}$ auf Selektionsagar mit Glukose (reprimierende Bedingungen, links) und Galaktose (induzierende Bedingungen, rechts) aufgetropft und die Platten wurden 5 Tage bei 30°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pRS316.PT in BY4742 transformiert und entsprechend behandelt.

2. Nachweis der *in vivo* Expression der verschiedenen RTA-Derivate im Zellysat

2.1 Western Analyse

Um zu überprüfen, ob die jeweiligen RTA-Varianten auch intrazellulär in der Hefe BY4742 nachgewiesen werden können, wurden die entsprechend transformierten Hefezellen nach der S80-Methode aufgeschlossen. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die mit dem Leervektor pRS316.PT transformiert waren. Als Positivkontrolle wurde aus *E. coli* aufgereinigtes RTA mitgeführt. Nach dem Zellaufschluss wurden die Zellpellets in 50 µl reduzierendem 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert und aufgekocht. Die Probenauftrennung erfolgte in einem 10%-igen Tris/Tricin Gel. Nach SDS-PAGE und Western-Blotting wurden die Konstrukte mit einem anti-RTA-Antikörper detektiert. Es konnten weder die WT-RTA-Varianten noch die RTA^{E177D}-Konstrukte im Zellysat der entsprechend transformierten Hefen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Lediglich bei der Positivkontrolle wurde eine Bande bei ca. 32 kDa sichtbar, die der Ricin A Kette entsprach. Aufgrund der hohen Toxizität von RTA reichen bereits wenige Moleküle aus, um die Proteinbiosynthese der Zelle zu hemmen (Eiklid et al., 1989). Es ist wahrscheinlich, dass vor dem Absterben der Zelle nicht ausreichend RTA-Moleküle vorliegen, um diese mittels Western Analyse zu detektieren. Überraschenderweise konnte auch im Zellysat der mit K1- bzw. K28-RTA^{E177D} transformierten Hefen kein RTA nachgewiesen werden, obwohl diese Hefetransformanten nach intrazellulärer Expression von RTA im Wachstumstest eine Resistenz zeigten (siehe Abbildung 2). Da es mit Hilfe der konventionellen Western Analyse nicht gelungen war, die Expression der verschiedenen RTA-Fusionen in Wildtyphefen zu zeigen, wurde eine deutlich sensitivere Nachweismethode mittels radioaktiver Protein-Markierung gewählt. Diese Methode wurde bereits durch verschiedene Arbeitsgruppen für RTA etabliert und ist besonders geeignet, um sehr geringe Proteinmengen in der Zelle nachzuweisen.

2.2 *In vitro* Transkription/Translation der verschiedenen RTA-Derivate in Gegenwart von radioaktivem [³⁵S] Methionin

Zur genauen Definition der bei den radioaktiven Markierungsexperimenten detektierten Banden, wurden die verschiedenen RTA-Konstrukte zunächst *in vitro* transkribiert und translatiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt, um sicherzustellen, dass ein Größenunterschied zwischen der cytosolisch exprimierten RTA-Variante und den RTA-Konstrukten mit Signalpeptid am N-Terminus zu erkennen war. Eine solche *in vitro* Translation ist sinnvoll, da sie nach der Auftrennung der Proteine im SDS-Gel zur Größenabschätzung der *in vivo* translatierten Produkte herangezogen werden kann. Das erleichtert zudem den Nachweis möglicher posttranslationaler Modifikationen. Da jedoch die wenigsten DNA-Moleküle eine RNA-Polymerase-Bindungsstelle besitzen, wurde die gewünschte DNA in den Vektor pJC2433gem-preRTAdelta inkloniert, welcher eine solche RNA-Polymerase-Bindungsstelle enthält. Für alle weiteren radioaktiven Markierungsexperimente wurden lediglich die abgeschwächten Toxin-Konstrukte RTA^{E177D}, K1-RTA^{E177D} und K28-RTA^{E177D} eingesetzt, da diese RTA-Derivate deutlich weniger cytotoxisch für die Hefzellen sind als die entsprechenden WT-RTA-Konstrukte. Die in Abbildung 4 dargestellten RTA^{E177D}-Derivate wurden in den „multi-copy“-Vektor pJC2433gem-preRTAdelta inkloniert und zur *in vitro* Transkription/Translation eingesetzt (siehe Punkt 23, Material und Methoden).

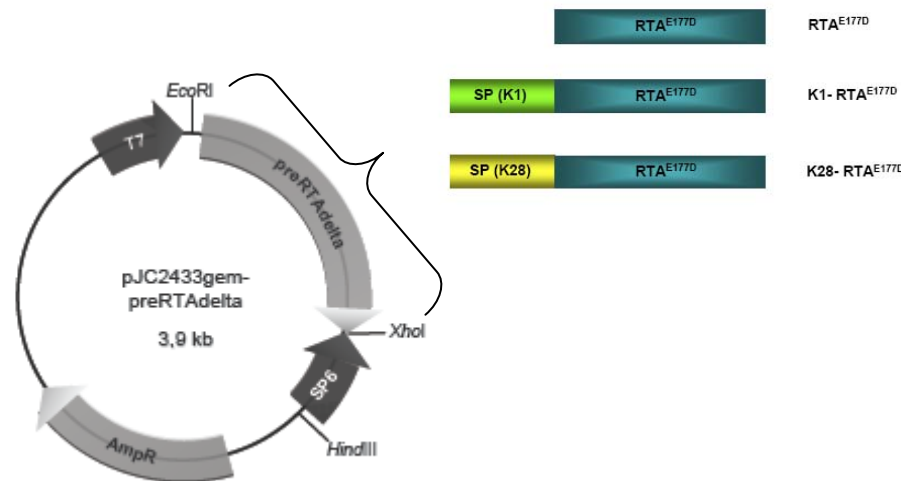


Abbildung 4: Schematische Darstellung der hergestellten RTA^{E177D}-Varianten in dem „multi-copy“-Vektor pJC2433gem-preRTAdelta zur *in vitro* Transkription/Translation. Die Konstrukte wurden mittels der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *SalI* in den Vektor einkloniert.

Für die SDS-PAGE wurden die entsprechenden Proben mit 50 µl reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95° C im Wasserbad aufgeköcht.

Alle RTA^{E177D}-Konstrukte konnten nach *in vitro* Transkription/Translation nachgewiesen werden. Die Ricin A-Kette hat eine Größe von 32 kDa, während die Konstrukte mit Signalpeptid eine Größe von ca. 35 kDa (K1-RTA^{E177D}) bzw. 36 kDa (K28-RTA^{E177D}) besitzen sollten. Wie erwartet, war ein Größenunterschied zwischen der cytosolischen RTA^{E177D}-Variante und den beiden Signalpeptid-Fusionen zu erkennen (Abbildung 5).

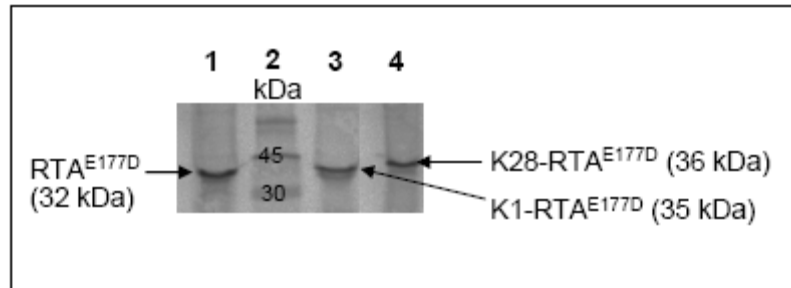


Abbildung 5: Nachweis der *in vitro* Transkription/Translation der verschiedenen RTA^{E177D}-Derivate. Die rekombinanten RTA-Plasmide wurden zunächst durch Restriktion mit *Hind*III linearisiert. Die restringierte DNA wurde dann mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol präzipitiert und zur *in vitro* Transkription mit dem „Riboprobe[®] *in vitro* Transcription Systems“ Kit verwendet. Zur anschließenden *in vitro* Translation wurde das „Wheat Germ Extract“ Kit eingesetzt. Für die SDS-PAGE wurden die entsprechenden Proben mit 50 μ l reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95° C im Wasserbad aufgekocht.

Spur 1: *in vitro* Translation pGEM-RTA^{E177D}, 10 μ l

Spur 2: Protein-Standard, „[¹⁴C] Protein Molecular Weight Marker“, 10 μ l

Spur 3: *in vitro* Translation, pGEM-K1-RTA^{E177D}, 10 μ l

Spur 4: *in vitro* Translation, pGEM-K28-RTA^{E177D}, 10 μ l

2.3 Markierungsexperimente mit [³⁵S] Methionin („Pulse“) zum Nachweis der toxischen Ricin A Kette im Zelllysat sensibler Hefen

Eine deutlich sensitivere Methode als die konventionelle Western Analyse zum Nachweis der *in vivo* Expression von RTA in Hefen, stellt die Markierung des exprimierten Toxins mit Radioisotopen dar. Der Nachweis des radioaktiv markierten Toxins erfolgte mittels Immunpräzipitation. Die Proben wurden in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und mittels Röntgenfilm detektiert. Dabei konnte die *in vivo* Expression aller RTA^{E177D}-Varianten in dem Hefestamm BY4742 nachgewiesen werden (Abbildung 6). Zusätzlich wurde als Kontrolle die *in vivo* Expression der Kar2-

RTA^{E177D}-Variante (Simpson et al., 1999; Li et al., 2009) untersucht (Abbildung 7).

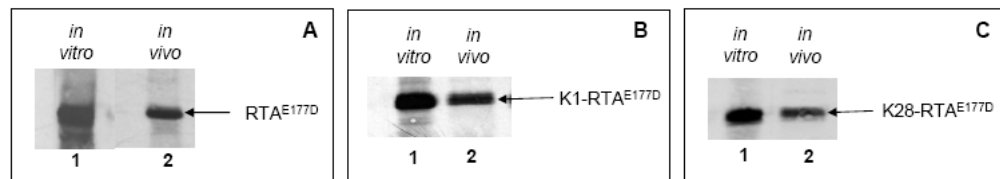


Abbildung 6: Nachweis der *in vivo* Expression verschiedener RTA-Konstrukte in der sensitiven Wildtyp-Hefe BY4742 mittels [³⁵S] Markierung und anschließender Immunpräzipitation. Zum *in vivo* Nachweis der translatierten RTA-Derivate wurde die Wildtyp-Hefe BY4742 mit den entsprechenden RTA-Konstrukten transformiert. Die transformierten Hefezellen wurden in ura d/o Raffinose Medium kultiviert und es wurde eine Zellzahl von $1,48 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden 4 h in ura d/o Galaktose Medium inkubiert und anschließend in ura met d/o Galaktose Medium resuspendiert und erneut 30 min bei 30° C inkubiert. Danach erfolgte ein „Labeling“ der Zellen für 20 min in Gegenwart von [³⁵S] Methionin (Endkonzentration 60 µCi). Die Zellen wurden lysiert und der RTA-Nachweis erfolgte mittels Immunpräzipitation und anti-RTA-Antikörper. Die Proben wurden mit 35 µl reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95° C aufgekocht und dann zur SDS-PAGE eingesetzt. Die Detektion der Proben erfolgte mittels Röntgenfilm. Die *in vitro* translatierten RTA-Konstrukte dienten als Größenvergleich der entsprechenden *in vivo* Proben.

- A** Spur 1: *in vitro* Translation, pGEM- RTA^{E177D}, 10 µl
 Spur 2: *in vivo* Translation, pRS316- RTA^{E177D}, 20 µl
- B** Spur 1: *in vitro* Translation, pGEM- K1-RTA^{E177D}, 10 µl
 Spur 2: *in vivo* Translation, pRS316- K1-RTA^{E177D}, 20 µl
- C** Spur 1: *in vitro* Translation, pGEM- K28-RTA^{E177D}, 10 µl
 Spur 2: *in vivo* Translation, pRS316- K28-RTA^{E177D}, 20 µl

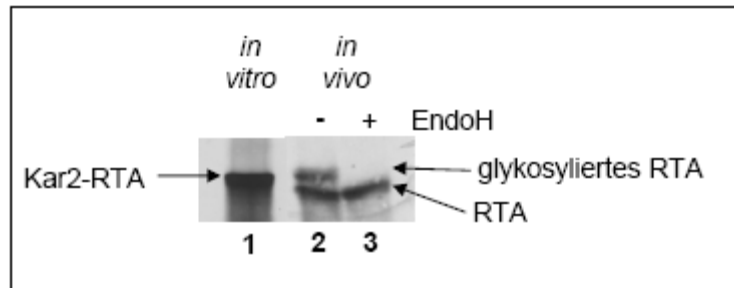


Abbildung 7: Nachweis der *in vivo* Expression von Kar2-RTA in der sensitiven Wildtyp-Hefe BY4742 mittels [³⁵S] Markierung und anschließender Immunpräzipitation. Zum *in vivo* Nachweis des translatierten RTA-Derivates wurde die Wildtyp-Hefe BY4742 mit Kar2-RTA transformiert. Die transformierten Hefezellen wurden in ura d/o Raffinose Medium kultiviert und es wurde eine Zellzahl von $1,48 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden 4 h in ura d/o Galaktose Medium inkubiert und anschließend in ura met d/o Galaktose Medium resuspendiert und erneut 30 min bei 30° C inkubiert. Danach erfolgte ein „Labeling“ der Zellen für 20 min in Gegenwart von [³⁵S] Methionin (Endkonzentration 60 µCi). Die Zellen wurden lysiert und der RTA-Nachweis erfolgte mittels Immunpräzipitation und anti-RTA-Antikörper. Die Proben wurden zusätzlich mit EndoH (+) bzw. mit Aqua dest. (-) für drei Stunden bei 37° C inkubiert und schließlich mit 35 µl reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95° C aufgekocht und dann zur SDS-PAGE eingesetzt. Die Detektion der Proben erfolgte mittels Röntgenfilm. Die *in vitro* translatierten RTA-Konstrukte dienten als Größenvergleich der entsprechenden *in vivo* Proben.

Spur 1: *in vitro* Translation, pGEM Kar2-RTA^{E177D}, 10 µl
 Spur 2: *in vivo* Translation, pRS316-Kar2-RTA^{E177D} ohne EndoH, 20 µl
 Spur 3: *in vivo* Translation, pRS316-Kar2-RTA^{E177D} mit EndoH, 20 µl

Die entsprechende *in vitro* Probe wurde jeweils als Größenstandard mitgeführt. Wie zu erwarten, konnte im Zelllysat der mit der cytosolischen RTA^{E177D}-Variante transformierten Hefe eine spezifische Bande nachgewiesen werden, die auf der gleichen Höhe wie die entsprechende *in vitro* Bande lief und somit cytosolisch exprimiertem RTA entsprach. Aufgrund der Untersuchungen von Simpson et al. (1999) zur *in vivo* Expression von Kar2-RTA^{E177D} in Hefen sollten bei den RTA-Derivaten mit Signalpeptid am N-Terminus zwei immunoreaktive Banden detektiert werden können. Bei der unteren

Bande handelt es sich um nichtglykosyliertes, prozessiertes RTA, während die obere Bande RTA zuzuordnen ist, welches an einer seiner beiden Glykosylierungsstellen glykosyliert ist (Simpson et al., 1999). Die als Kontrolle mitgeführte Kar2-RTA Variante zeigte das von Simpson et al. beobachtete Bandenmuster. Die Behandlung der Proben mit Endoglykosidase H, einem Enzym, das die Bindung zwischen zwei N-Acetylglucosamin-Molekülen spaltet, bestätigte die Glykosylierung von RTA im ER-Lumen. Bei den Konstrukten K1-RTA^{E177D} und K28-RTA^{E177D} war hingegen jeweils nur eine einzelne immunoreaktive Bande zu sehen, die auf Höhe der entsprechenden *in vitro* Probe lief. Um sicher zu sein, dass es sich bei dieser Bande um die glykosylierte RTA-Form handelte und nicht um den unprozessierten Toxin-Vorläufer, wurde als nächstes eine Behandlung der Proben mit Endoglykosidase H durchgeführt. Dadurch sollte ebenfalls gezeigt werden, dass RTA durch die entsprechenden ER-Importsignale in das ER-Lumen dirigiert und dort modifiziert wird. Die Ergebnisse zeigten, dass die Inkubation der Proben mit Endoglykosidase H nicht zu einem Verschwinden bzw. zu einer Abschwächung der nachgewiesenen Bande führte (Daten nicht gezeigt). Dadurch war anzunehmen, dass es sich bei der detektierten Bande lediglich um die unprozessierte Toxinvariante vor Eintritt in das ER handelte, jedoch nicht um glykosyliertes RTA, da die Bande mit der Größe der jeweiligen *in vitro* Probe übereinstimmte. Da jedoch die vorhergegangenen Toxizitätsuntersuchungen im Wildtyp-Hefestamm BY4742 einen sensitiven Phänotyp der Hefen gegenüber RTA zeigten (siehe Abbildung 2), kann angenommen werden, dass ein Teil des Toxins in das ER-Lumen eingetreten war und die ER-Membran auch wieder transloziert, um seine toxische Wirkung an den Ribosomen im Cytosol zu entfalten. Dabei scheint es sich jedoch nur um wenige Toxinmoleküle zu handeln, die trotz Einsatz der sehr sensitiven [³⁵S] Markierung nicht detektiert werden konnten.

3. Untersuchungen zum intrazellulären Transport von Ricin A in Hefe

3.1 Untersuchung zur Beteiligung von Komponenten des SEC-Komplexes am ER-Import von K1- bzw. K28-RTA

Um nachzuweisen, ob tatsächlich ein ER-Import der luminalen Varianten K1-RTA und K28-RTA stattfindet, wurden die entsprechenden Konstrukte in die Hefe-Deletionsmutanten $\Delta sec71$ und $\Delta sec72$, die einen Defekt im posttranslationalen ER-Import besitzen, transformiert. Nach Anschalten der RTA-Expression durch „Shift“ auf Selektionsagar mit 2% Galaktose wurden die Mutanten auf ihre Fähigkeit getestet, die *in vivo* Expression von RTA im ER zu überleben. In entsprechenden Mutanten sollte somit der ER-Import der Ricin A-Kette mit Sekretionssignal gestört sein. Dies sollte sich in einer verminderten Sensitivität dieser Mutanten gegenüber der *in vivo* Expression der toxischen RTA-Konstrukte manifestieren.

Aufgrund des vollständig entschlüsselten Genoms der Bäckerhefe *S. cerevisiae* und den genetischen und biochemischen Untersuchungsmöglichkeiten, die dieser eukaryotische Modellorganismus bietet, gehören die Translokationssysteme in das ER von *S. cerevisiae* zu den am Besten untersuchten. Insgesamt gibt es drei unabhängige Komplexe, die schematisch in Abbildung 8 dargestellt sind.

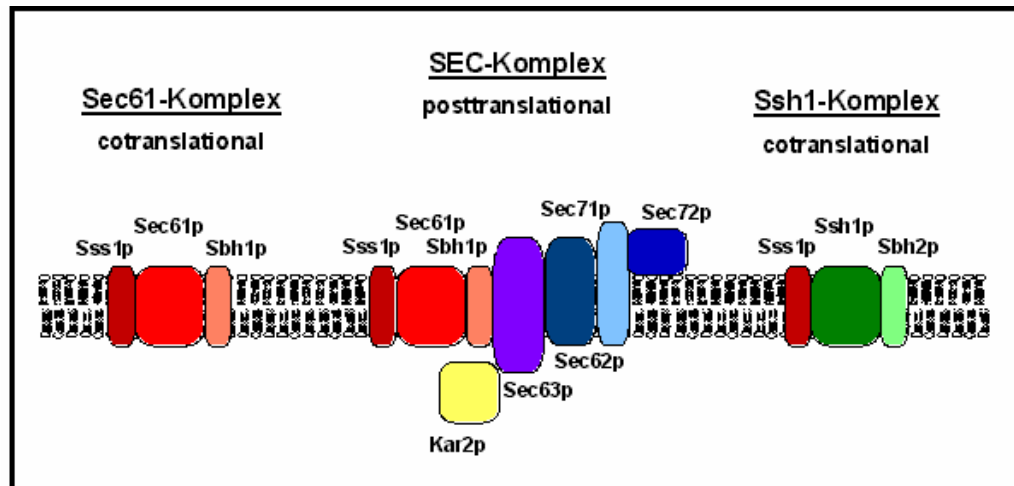


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Translokationssysteme in der Hefe *S. cerevisiae* (Unger, 2000). Der trimere Sec61-Komplex (rot) spielt eine zentrale Rolle. Als eigenständiger Komplex ist er essentiell für den cotranslationalen ER-Import von Proteinen verantwortlich. Zusammen mit dem Sec62/63-Subkomplex (blau) bildet er den zur posttranslationalen Translokation fähigen SEC-Komplex. Das luminaire Hsp70-Chaperon Kar2p (gelb) ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil des posttranslationalen Transportmechanismus. Der Ssh1-Komplex (grün) ist nicht essentiell. Er assoziiert nicht mit dem Sec62/63-Subkomplex und hat vermutlich eine Rolle bei der Regulation der Proteinsekretion.

Der heterotrimere Sec61-Komplex, der aus den Proteinen Sec61p, Sbh1p und Sss1p aufgebaut ist, fungiert als cotranslationaler Proteintranslokationskanal. Er assembliert mit dem Sec63/Sec62-Komplex, was zur Bildung eines heptameren SEC-Komplexes führt (Deshaies et al., 1991; Panzner et al., 1995; Wittke et al., 1999). Dieser SEC-Komplex zeigt keine Bindungsaktivität an Ribosomen und fungiert somit als posttranslationaler Translokationskanal (Panzner et al., 1995; Matlack et al., 1997, 1999). Der nicht essentielle, heterotrimere Ssh1-Komplex, der aus den Proteinen Ssh1p, Sbh2p und Sss1p aufgebaut ist, zeigt keine Assoziation mit dem Sec62/Sec63-Komplex (Finke et al., 1996) und dient als cotranslationaler Translokationskanal (Prinz et al., 2000; Wittke et al., 2002). Der Sec62/63-Subkomplex besteht aus den vier Proteinen Sec62p, Sec63p, Sec71p und Sec72p. Sowohl Sec71p (früher Sec66p) als auch Sec72p wurden durch unterschiedliche Arbeitsgruppen parallel identifiziert. Green et al. (1992) identifizierten

SEC71 und *SEC72* in einem genetischen Screen und wiesen Transportdefekte in entsprechenden Deletionsmutanten nach. Sec71p ist ein integrales Membranprotein, sein N-Terminus liegt im ER-Lumen und ist zweifach glykosyliert (Feldheim et al., 1993; Kurihara und Silver, 1993). Sec72p ist das einzige Protein des heptameren SEC-Komplexes, das keinen Membrananker besitzt und als peripheres Membranprotein mit dem SEC-Komplex assoziiert ist. Keines der beiden Proteine ist essentiell für die Zelle bei 30°C. Eine Nullmutante von *SEC71* ist bei 37°C letal (Kurihara und Silver, 1993; Feldheim et al., 1993). Die Deletion des *SEC72*-Gens führt zu einer vermehrten Akkumulation von Vorläufer-Polypeptiden im Cytosol *in vivo* (Fang und Green, 1994; Feldheim und Schekman, 1994). Interessanterweise ist in einer *sec71*-Deletionsmutante kein Sec72p nachweisbar (Feldheim et al., 1993, 1994; Fang und Green, 1994), sondern wird - wie durch radioaktive Markierungsexperimente nachgewiesen - mit einer Halbwertszeit von 12 min degradiert (Feldheim et al., 1994). Sec71p scheint somit einen stabilisierenden Einfluß auf Sec72p zu haben.

Wie aus Abbildung 9 zu erkennen ist, waren beide Mutanten nach Deletion der Gene *SEC71* und *SEC72* in der Lage, die *in vivo* Expression von RTA zu überleben. In allen Verdünnungsstufen war ein Zellwachstum detektierbar. Dabei war auffällig, dass es keine Unterschiede in der Toxizität bezüglich des verwendeten ER-Importsignal gab. Falls RTA mit Hilfe der Signalsequenz von K1 pptox cotranslational in das ER importiert werden würde, so sollte bei der mit K1-RTA transformierten „Knock-out“-Mutante ein ähnlicher Phänotyp wie bei der Wildtyp-Hefe BY4742 zu beobachten sein, da der ER-Import durch das Fehlen eines der beiden Gene *SEC71* bzw. *SEC72* nicht beeinträchtigt werden sollte. Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse kann aber davon ausgegangen werden, dass sowohl das Signalpeptid von K28 pptox, als auch das Signalpeptid von K1 pptox in Abwesenheit ihrer jeweiligen Pro-Sequenz einen posttranslationalen Import von RTA in das ER vermitteln. Weiterhin konnte erneut bestätigt werden, dass die beiden unprozessierten Toxinvorläufer keine toxische Wirkung auf die Ribosomen vor Eintritt in das ER besitzen.

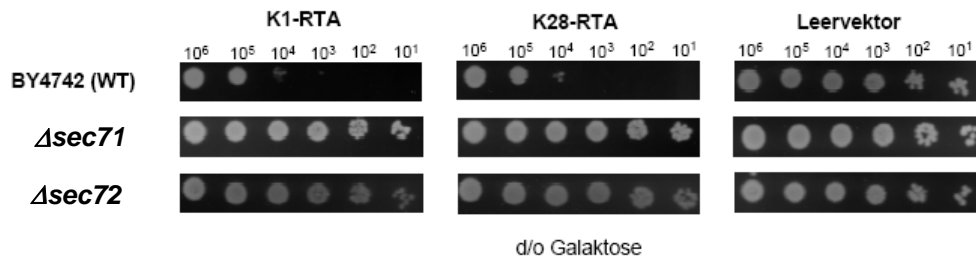


Abbildung 9: Untersuchung der *in vivo* Toxizität von verschiedenen RTA-Varianten in den Hefedeletionsmutanten $\Delta sec71$ und $\Delta sec72$. Die eingesetzten Konstrukte wurden in den Zentromervektor pRS316.PT inkloniert und in die Nullmutanten $\Delta sec71$ und $\Delta sec72$ transformiert. Die Anzucht der Hefetransformanten erfolgte in ura d/o Raffinose Medium. Es wurden 1×10^7 Hefezellen in 50 μ l ura d/o Raffinose Medium aufgenommen und jeweils eine Verdünnungsreihe (10^6 bis 10^2 Zellen) hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 5 μ l auf eine ura d/o Galaktose Platte (induzierende Bedingungen) aufgetropft und die Platten wurden 5 Tage bei 30° C inkubiert.

Um sicher zu gehen, dass die entsprechenden RTA-Konstrukte *in vivo* exprimiert wurden und der resistente Phänotyp tatsächlich auf der intrazellulären RTA-Expression beruhte, wurde von einer mit K1- bzw. K28-RTA^{E177D} transformierten $\Delta sec71$ -Mutante ein „Pulse-Labeling“ durchgeführt, um die *in vivo* Expression von RTA nachzuweisen. Aufgrund der stark cytotoxischen Wirkung von Wildtyp-RTA auf Hefezellen wurde hier auf die RTA^{E177D}-Variante zurückgegriffen. Diese mutierte RTA-Form zeigt eine korrekte native Faltung und ist lediglich in ihrer toxischen Wirkung reduziert, so dass RTA^{E177D} als Vergleichskonstrukt zu RTA herangezogen werden konnte. Die transformierten Hefen wurden in ura d/o Raffinose Medium kultiviert und es wurde eine Zellzahl von $1,48 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden 4 h in ura d/o Galaktose Medium inkubiert und anschließend in ura met d/o Galaktose Medium resuspendiert und erneut 30 min bei 30° C inkubiert. Danach erfolgte ein „Labeling“ der Zellen für 20 min in Gegenwart von [³⁵S] Methionin. Die Zellen wurden lysiert und der RTA-Nachweis erfolgte durch Immunpräzipitation mit Hilfe eines anti-RTA-Antikörpers. Die Proben wurden mit 35 μ l

reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95° C aufgeköcht und dann zur SDS-PAGE eingesetzt. Die Detektion der Proben erfolgte mittels Röntgenfilm (Abbildung 10).

Die entsprechende *in vitro* Probe wurde jeweils als Größenstandard mitgeführt. Bei den Konstrukten K1-RTA^{E177D} (Abbildung 10 A) und K28-RTA^{E177D} (Abbildung 10 B) war jeweils eine immunoreaktive Bande auf Höhe der jeweiligen *in vitro* Probe zu erkennen. Um sicher zu stellen, dass es sich um den Toxin-Vorläufer handelt, wurde außerdem eine Behandlung der Proben mit Enoglykosidase H durchgeführt. Es kam nicht zu einem Verschwinden der *in vivo* Banden, was bestätigt, dass durch den Defekt im SEC-Komplex, der ER-Import der RTA-Varianten mit Sekretionssignal blockiert ist und diese scheinbar im Cytosol akkumulieren.

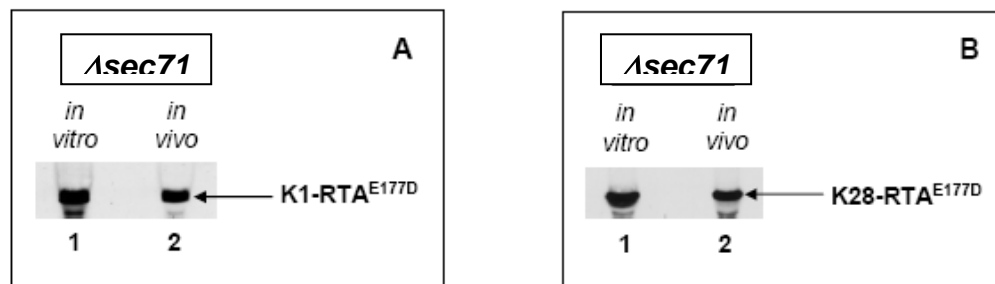


Abbildung 10: Nachweis der *in vivo* Expression verschiedener RTA-Konstrukte in der $\Delta sec71$ -Mutante mittels [³⁵S] Markierung und anschließender Immunpräzipitation. Die transformierten Hefezellen wurden in ura d/o Raffinose Medium kultiviert und es wurde eine Zellzahl von $1,48 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden 4 h in ura d/o Galaktose Medium inkubiert und anschließend in ura met d/o Galaktose Medium resuspendiert und erneut 30 min bei 30° C inkubiert. Danach erfolgte ein „Labeling“ der Zellen für 20 min mit [³⁵S] Methionin. Die Zellen wurden lysiert und der RTA-Nachweis erfolgte mittels Immunpräzipitation und anti-RTA-Antikörper. Die Proben wurden mit 35 μ l reduzierendem SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95° C aufgeköcht und dann zur SDS-PAGE eingesetzt. Die Detektion der Proben erfolgte mittels Röntgenfilm. Die *in vitro* translatierten RTA-Konstrukte dienten als Größenvergleich der entsprechenden *in vivo* Proben.

A

Spur 1: *in vitro* Translation, pGEM- K1-RTA^{E177D}, 10 μ l

Spur 2: *in vivo* Translation, pRS316- K1-RTA^{E177D}, 20 μ l

B

Spur 1: *in vitro* Translation, pGEM- K28-RTA^{E177D}, 10 μ l

Spur 2: *in vivo* Translation, pRS316- K28-RTA^{E177D}, 20 μ l

Weiterhin wurden zwei temperatursensitive *sec61*-Mutanten (*sec61-2*, *sec61-3*) bezüglich ihres Phänotyps nach intrazellulärer RTA-Expression im ER-Lumen getestet. Aufgrund der Tatsache, dass die entsprechenden Mutanten bereits nach der Transformation und Expression des Leervektors pRS316.PT einen starken Wachstumsdefekt aufwiesen, konnte keine Aussage über die Beteiligung von Sec61p getroffen werden. Da der Sec61-Kanal sowohl am ER-Import als auch –Export von Proteinen beteiligt ist, wäre eine eindeutige Zuordnung der Ergebnisse dieser Mutanten nicht möglich gewesen. Simpson et al. (1999) untersuchten zwei temperatursensitive *sec61*-Mutanten (*sec61-32*, *sec61-41*) mit einem spezifischen Defekt im ER-Export. Nach Expression von Kar2-RTA^{E177D} wurde in Pulse Chase Experimenten deutlich, dass es zu einer Stabilisation von RTA^{E177D} in beiden Mutanten kam, während in den Wildtyp-Hefezellen ein rapider ER-Export mit anschließender Degradation von RTA^{E177D} auftrat.

3.2 Untersuchung zum Einfluss cytosolischer Chaperone auf den ER-Import und die Toxizität von RTA

Molekulare Chaperone übernehmen lebenswichtige Aufgaben bei vielen zellulären Prozessen wie z. B. der Proteinfaltung, Degradation, Membran-Translokation sowie der Neuordnung von Multi-Protein-Komplexen. Obwohl die Chaperone unabhängig arbeiten können, fungieren sie doch im Allgemeinen als Komponenten eines großen Multi-Chaperon Verbandes. So arbeiten Hsp70- und Hsp40-Chaperone zusammen, um eine Vielfalt an essentiellen Prozessen in der Zelle zu bewerkstelligen (Walsh et al., 2004; Hennessy et al., 2005; Mayer und Bukau, 2005). Hsp70-Chaperone besitzen eine N-terminale ATPase-Domäne sowie eine C-terminale Substrat-Bindedomäne (Flaherty et al., 1990; Wang et al., 1993; Zhu et al., 1996). Die Hydrolyse von ATP induziert eine Konformationsänderung, die es der Substrat-Bindedomäne erlaubt, Peptide mit einer hohen Affinität zu binden (McCarty et al., 1995; Russell et al., 1999). Hsp70-Chaperone sind selbst schwache ATPasen und benötigen deshalb Hsp40 Co-

Chaperone und Nukleotidaustausch-faktoren (NEF), um ihre maximale Aktivität zu erreichen. Hsp40-Chaperone können außerdem an die Peptidsubstrate binden und diese zu den Hsp70-Chaperonen transportieren (Wickner et al., 1991; Langer et al., 1992; Szabo et al., 1996; Rudiger et al., 2001; Han und Christen, 2003). Alle Hsp40-Chaperone besitzen eine ~70 Aminosäuren große J-Domäne, die mit der ATPase-Domäne des Hsp70-Chaperons zu interagieren scheint und somit dessen ATPase-Aktivität stimuliert (Cheetham und Caplan, 1998; Gassler et al., 1998; Suh et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der cytosolischen Hsp70-Chaperone Ssa1p, Ssa3p und Ssb1p sowie des cytosolischen Hsp40-Chaperons Ydj1p auf den intrazellulären Transport und die *in vivo* Toxizität von RTA untersucht. Alle eukaryotischen Zellen besitzen ein Set von verschiedenen Hsp70-Chaperonen. In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* sind bislang 14 verschiedene Hsp70-Chaperone beschrieben, die sich zum Teil im Cytoplasma, im Endoplasmatischen Retikulum und in den Mitochondrien lokalisieren (James et al., 1997). Das Cytosol von *S. cerevisiae* enthält zwei vorherrschende Klassen von Hsp70-Chaperonen, die Ssa-Proteine („stress seventy A“), die von den Genen *SSA1-4* kodiert werden und die Ssb-Proteine („stress seventy B“), die von den Genen *SSB1-2* kodiert werden (Craig und Huang, 2005). Die Proteine Ssa1-4p üben größtenteils redundante Funktionen aus, wobei mindestens eines der *SSA*-Gene vorhanden sein muss, damit die Hefezelle lebensfähig ist (Werner-Washburne et al., 1987). Die Ssa-Chaperone sind an verschiedenen zellulären Prozessen wie der Translation, der Proteintranslokation und der Proteinfaltung beteiligt (Frydman, 2001). Die ATPase-Aktivität der Ssa-Chaperone wird durch regulierende Proteine wie das DnaJ-Homolog Ydj1p gesteuert, welches die ATPase-Aktivität des Chaperons um das Zehnfache erhöht (Kabani et al., 2002). Becker et al. (1996) untersuchten die *in vivo* Interaktionen von *SSA1* und *YDJ1* in Bezug auf die Proteintranslokation des Präpro- α -Faktors (pp α F) in das ER und die Mitochondrien der Hefe. Mit Hilfe von „Pulse Chase“-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass pp α F in einer Temperatur-sensitiven *ssa1*-Mutante im Cytosol der

Hefen akkumuliert und nicht in das ER transloziert wird (Becker et al., 1996). Hefestämme, die ein mutiertes Ssa1p-Chaperon besaßen, dessen ATP-Bindungstaschen nicht mehr in der Lage waren effektiv mit Ydj1p zu interagieren, zeigten ebenfalls eine Akkumulation von ppαF im Cytosol (McClellan und Brodsky, 2000). Es wird außerdem vermutet, dass cytosolische Chaperone auch eine Rolle bei der ER-assoziierten Degradation (ERAD) spielen. So wird das Hsp70-Chaperon Ssa1p für den ERAD einiger Membranproteine benötigt, wie z.B. Ste6-166p, CFTR und Vph1p (Hill und Cooper, 2000; Zhang et al., 2001; Huyer et al., 2004). Dabei wird angenommen, dass die beiden Hsp40-Cochaperone Hlj1p und Ydj1p das Hsp70-Chaperon bei der Degradation der Membranproteine Ste6-166p und CFTR unterstützen (Huyer et al., 2004; Youker et al., 2004). Da Ssa1p jedoch für die ER-assoziierte Degradation von luminalen Proteinen keine Rolle spielt, kann vermutet werden, dass Ssa1p nicht die treibende Kraft für die Retrotranslokation von Substraten aus dem ER in das Cytosol darstellt (Brodsky et al., 1999; Taxis et al., 2003). Es ist eher wahrscheinlich, dass Ssa1p die cytosolischen Domänen der Membranproteine in einem löslichen Zustand hält und dadurch deren Transport zum Proteasom erleichtert (Nishikawa et al., 2005). Eine andere Subklasse von Hsp70-Chaperonen, die im Cytosol der Hefe zu finden ist und die sich funktionell von den Ssa-Proteinen unterscheidet, sind die Ssb-Chaperone. Diese Proteine sind sowohl mit den Ribosomen selbst, als auch mit naszierenden Peptidketten, die aus dem Ribosom austreten, assoziiert (Pfund et al., 1998). Bis jetzt konnte für die Ssb-Chaperone jedoch weder eine Bindung an Substrate *in vitro* nachgewiesen werden, noch werden diese Chaperone durch klassische Hsp70-Substrate stimuliert (Pfund et al., 2001). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Ribosomen-assoziierte Komplex (RAC), ein Heterodimer aus dem Hsp70-Chaperon Ssz1p und dem J-Protein Zuo1p, die ATPase-Aktivität der Ssb-Proteine spezifisch und effizient antreibt (Gautschi et al., 2002; Hundley et al., 2002; Huang et al., 2005).

In dieser Arbeit wurden Mutanten, bei denen die Gene *SSA1*, *SSA3*, *SSB1* und *YDJ1* deletiert waren, auf veränderte Sensitivität gegen die intrazellulär exprimierten RTA-Derivate untersucht, um weitere indirekte Hinweise auf den posttranslationalen ER-Import der Letalkonstrukte K1- bzw. K28-RTA zu erhalten. Als Negativkontrollen wurden die mit dem Leervektor pRS316.PT transformierten Hefe-Deletionsmutanten mitgeführt. Die mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Deletionsmutante wurde zunächst in *ura* d/o Raffinose Medium angezogen und dann auf eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Es wurde eine Verdünnungsreihe ($10^7 - 10^2$ Zellen) aufgestellt und jeweils 5 μ l jeder Verdünnung auf *ura* d/o Glucose Agar (reprimierende Bedingungen) bzw. *ura* d/o Galaktose Agar (induzierende Bedingungen) aufgetropft und die Platten 5 Tage bei 30° C inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Deletionsmutanten Δ *ssa1*, Δ *ssa3* und Δ *ssb1* zeigten ein Wachstum bei allen Verdünnungsstufen und waren somit in der Lage, die *in vivo* Expression von K1- bzw. K28-RTA zu überleben. Die Δ *ydj1*-Nullmutante zeigte eine verminderte Sensitivität gegenüber RTA, wobei ein Wachstum bis zur vierten Verdünnungsstufe zu erkennen war.

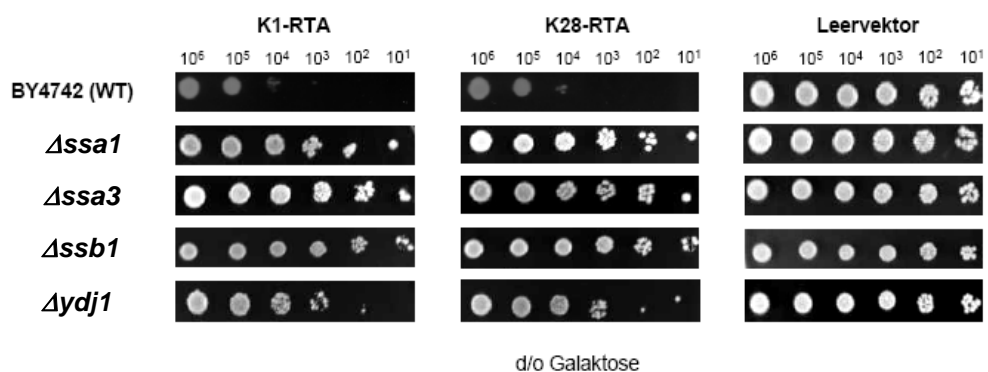


Abbildung 11: Untersuchung der *in vivo* Toxizität von verschiedenen RTA-Varianten in Hefe-Deletionsmutanten mit Defekten in cytosolischen Chaperonen. Es wurden 1×10^7 Hefezellen in 50 μ l *ura* d/o Raffinose-Medium aufgenommen und jeweils eine Verdünnungsreihe (10^6 bis 10^2 Zellen) hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 5 μ l auf eine *ura* d/o Galaktose-Platte (induzierende Bedingungen) aufgetropft und die Platten wurden 5 Tage bei 30° C inkubiert.

3.3 Untersuchungen zum Einfluss von Komponenten des Signalpeptidase-Komplexes auf die *in vivo* Toxizität von K1- bzw. K28-RTA

Da mit Hilfe der radioaktiven Markierungsexperimente nicht gezeigt werden konnte, dass RTA im ER glykosyliert wird und somit mit Hilfe des entsprechenden Signalpeptides in das ER transportiert wird, wurden zwei weitere Mutanten, $\Delta spc1$ und $\Delta spc2$, bezüglich ihres RTA-Phänotyps untersucht, um einen indirekten Hinweis für den tatsächlichen Import von RTA in das ER zu erhalten. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pRS316.PT in die entsprechenden Mutanten transformiert und mitgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

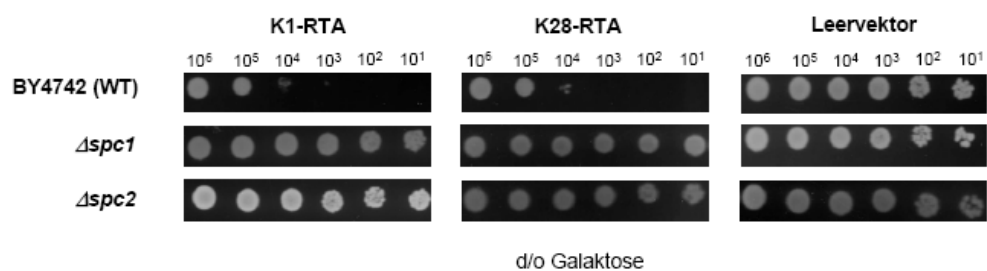


Abbildung 12: Wachstumstest zum Nachweis einer Beteiligung der beiden Untereinheiten Spc1p und Spc2p des Signalpeptidase-Komplexes auf die *in vivo* Toxizität von K1- bzw. K28-RTA. Hefe-Mutanten mit einer Deletion der Gene *SPC1* und *SPC2* wurden mit den Konstrukten K1- bzw. K28-RTA und dem Leervektor pRS316-PT als Negativkontrolle transformiert und das Überleben der Transformanten im Wachstumstest analysiert.

Die Signalsequenz, die ein Protein zum ER dirigiert, wird normalerweise durch einen Membrankomplex, den sogenannten Signalpeptidase-Komplex (SPC), während oder kurz nach der Translokation des Proteinvorläufers in das ER abgespalten (Blobel und Dobberstein, 1975). Bei der Hefe *S. cerevisiae* besteht dieser Komplex aus den vier Polypeptiden Spc1p, Spc2p, Spc3p und Sec11p (YaDeau et al., 1991). Spc3p und Spc11p besitzen jeweils eine einzelne Membrandomäne, während der Hauptteil des Proteins im ER-Lumen lokalisiert ist. Beide

Proteine sind für die Lebensfähigkeit der Hefen essentiell und die Deletion eines der beiden Proteine führt zum Verlust der Signalpeptidase-Aktivität *in vivo* und *in vitro* (Bohni et al., 1988; Meyer und Hartmann, 1997; Fang et al., 1997). Über die beiden anderen Proteine des SPC ist noch wenig bekannt. Fang et al. (1996) konnten nachweisen, dass Spc1p, welches homolog zum Säugerprotein SPC12 ist, wichtig für eine effiziente enzymatische Aktivität der Signalpeptidase ist. Spc1p ist jedoch nicht essentiell für das Wachstum der Hefen (Fang et al., 1996). Auch das Protein Spc2p wird für die komplette enzymatische Aktivität des SPC benötigt. Durch Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass Spc2p mit den beiden Untereinheiten des Sec61-Komplexes, Sbh1p und Sbh2p, komplexiert. Die Depletion von Spc2p vermindert außerdem die Expressionsrate der anderen Komponenten des Signalpeptidase-Komplexes und der Sbh2p-Untereinheit des Sec61-Translocons. Aufgrund dieser Daten wird vermutet, dass die Hauptfunktion von Spc2p darin besteht, die Interaktion zwischen den verschiedenen Translokations-Komponenten zu erleichtern (Antonin et al., 2000). Analog zum Test der ER-Import-Mutanten wurden die beiden Deletionsstämme $\Delta spc1$ und $\Delta spc2$ mit den Konstrukten K1- bzw. K28-RTA transformiert, die in dem Vektor pRS316.PT unter der Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors vorlagen. Die Transformanten wurden anschließend auf Galaktosehaltigen Selektions-Agar getropft, um ein Überleben der intrazellulären Expression dieser toxischen Varianten nachzuweisen. In Abwesenheit von Spc1p und Spc2p zeigten die Zellen eine Resistenz gegenüber intrazellulär exprimiertem RTA. Dieses Ergebnis lieferte einen indirekten Hinweis darauf, dass durch einen defekten Signalpeptidase-Komplex die Abspaltung der Signalsequenz nicht mehr effizient genug erfolgen und somit weniger natives RTA die Ribosomen der Zelle angreifen kann.

3.4 Untersuchungen zum Nachweis des ER-Golgi Transportes von Ricin A

Die Untersuchung von Deletionsmutanten mit Defekt in der Bildung von COPII-Vesikeln sollte Aufschluss darüber geben, ob ein Weitertransport der ER-luminalen RTA-Varianten K1- bzw. K28-RTA bis zum Golgi-Apparat erfolgt und ob eine Störung dieses Transportweges eine Auswirkung auf deren Toxizität hat. Für eine ER-luminale Variante von Ricin A konnte bereits gezeigt werden, dass der Eintritt in den Golgi-Apparat für die *in vivo* Toxizität des Toxins essentiell ist, denn eine Blockierung des ER-Golgi-Transportes durch Brefeldin A führte zu einer Stabilisierung von RTA (Li et al., 2009). Weiterhin wurde in dieser Studie die Beteiligung verschiedener p24-Proteine an der *in vivo* Toxizität von RTA untersucht. Bei den Proteinen der p24-Familie handelt es sich um kleine Transmembran-Proteine, die den Transport von sekretorischen Proteinen vom ER zum Golgi-Apparat vermitteln (Springer et al., 2000) und von denen in Hefe acht Mitglieder bekannt sind (Emery et al., 1999). Es stellte sich heraus, dass vor allem das p24-Protein Erp2p nach intrazellulärer Expression von RTA im ER-Lumen im Wachstumstest einen resistenten Phänotyp zeigte und auch in „Pulse Chase“-Experimenten stabilisiert wurde (Li et al., 2009). Um zu überprüfen, ob Erp2p auch einen Effekt auf die *in vivo* Toxizität der beiden ER-luminalen Konstrukte K1- bzw. K28-RTA ausübt, wurde die Deletionsmutante $\Delta erp2$ mit den beiden Konstrukten transformiert und im Wachstumstest analysiert (Abbildung 13). In Abwesenheit von *ERP2* zeigten die transformierten Hefezellen einen sensitiven Phänotyp, der mit dem isogenen Wildtyp vergleichbar war.

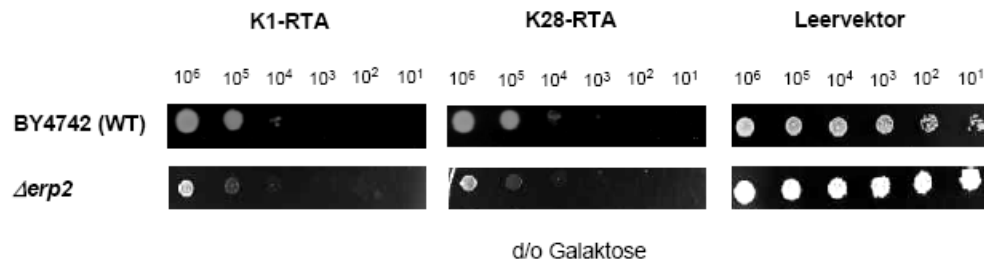


Abbildung 13 : Untersuchung des Einflusses von Erp2p auf die *in vivo* Toxizität von RTA. Die Hefedeletionsmutante $\Delta erp2$ sowie der entsprechende isogene Wildtyp BY4742 wurden mit einer RTA-Variante mit N-terminalem Sekretionssignal transformiert. Die Sensitivität der Transformanten wurde mittels Wachstumstest analysiert.

4. Untersuchung der ER/Cytosol-Dislokation von Ricin A

Eine Vielzahl von Proteinen wie z.B. sekretorische Proteine, Proteine der Plasmamembran oder Proteine des ER und des Golgi-Apparates werden im Cytosol synthetisiert und translozieren dann über die ER-Membran bzw. werden in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums integriert (Tsai et al., 2002). Im Lumen des ER durchlaufen die entsprechenden Proteine verschiedene Modifikationen wie Glykosylierung und Disulfidbrücken-Bildung, welche die Faltung der Proteine in ihre native Konformation erleichtern (Meusser et al., 2005). Die Faltung der Proteine im ER wird durch einen ER-Qualitätskontroll-Mechanismus (ERQC) überwacht. Proteine, die den Kriterien dieses Kontrollsystems entsprechen, gelangen über den Sekretionsweg zu ihrem Bestimmungsort, während fehlgefaltete Proteine und/oder nicht korrekt assemblierte Untereinheiten multimerer Proteine über die ER-assoziierte Degradation (ERAD) abgebaut werden (Vembar und Brodsky, 2008). Dafür müssen die entsprechenden Proteine aus dem ER in das Cytosol exportiert werden, wo sie schließlich mit Hilfe des Ubiquitin-Proteasom-Systems degradiert werden (Brodsky und Mc Cracken, 1997). Eine große Anzahl der Komponenten, die bei ERAD

eine Rolle spielen, wurde sowohl mit Hilfe genetischer Screens als auch biochemischer Methoden identifiziert (Sayeed und Ng, 2005; Hebert und Molinari, 2007; Nakatsukasa und Brodsky, 2008). Basierend auf diesen Aspekten wurde deutlich, dass die ER-assoziierte Degradation in mehreren Schritten erfolgt, welche in Abbildung 14 schematisch dargestellt sind (Vembar und Brodsky, 2008). Aufgrund des breit gefächerten Spektrums an ERAD-Substraten scheint es unwahrscheinlich, dass lediglich ein einzelner Degradationsweg ausreicht, der für alle Proteine charakteristisch ist. Studien an Hefen und Säugerzellen zeigten, dass mehrere Pfade gleichzeitig agieren, um die Qualitätskontrolle im ER zu sichern (Hammond und Helenius, 1994; Caldwell et al., 2001; Vashist et al., 2001; Yamamoto et al., 2001). Vashist und Ng (2004) postulierten, dass ERAD-Substrate abhängig von der Lokalisation ihres fehlgefalteten Bereiches zu ihrem entsprechenden ERAD-Pathway dirigiert werden (Vashist und Ng, 2004). Diese verschiedenen Abbauege sind in der Hefe *S. cerevisiae* am besten charakterisiert (Huyer et al., 2004; Vashist und Ng, 2004) und können unterschiedlichen Ubiquitin-Ligase-Komplexen zugeordnet werden (Carvalho et al., 2006). Membranproteine mit fehlgefalteten cytosolischen Domänen, sogenannte ERAD-C Substrate, werden mit Hilfe der Ubiquitin-Ligase Doa10p rasch degradiert, während die Degradation von Proteinen mit fehlgefalteten luminalen Domänen (ERAD-L Substrate) etwas langsamer mit Hilfe der Ubiquitin-Ligase Hrd1p/Hrd3p erfolgt. Proteine mit fehlgefalteten Transmembran-Domänen (ERAD-M Substrate) durchlaufen ebenfalls den ERAD-L Pathway, wobei jedoch nicht alle Komponenten des Hrd1p/Hrd3p Ligase-Komplexes beteiligt sind (Carvalho et al., 2006).

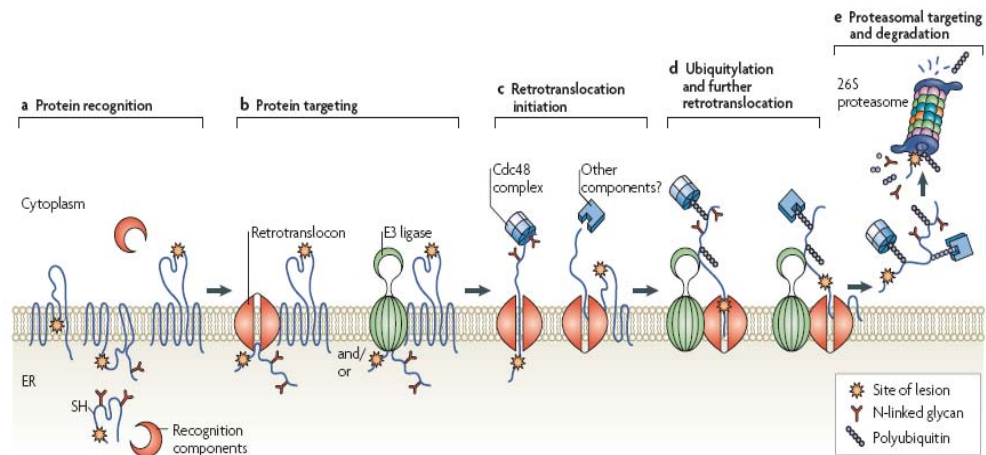


Abbildung 14: Schematische Darstellung der ER-assoziierten Degradation (Vembar und Brodsky, 2008). a) Die Erkennung der fehlgefalteten Proteine erfolgt durch cytosolische bzw. luminaire Chaperone und deren Cofaktoren. b) Die ERAD-Substrate werden zum Retrotranslocon und/oder zum E3 Ligase-Komplex dirigiert. c) Die Retrotranslokation der Substrate erfolgt zum Teil mit Hilfe des Cdc48-Komplexes, aber auch anderer Komponenten wie molekularer Chaperone sowie dem Proteasom. d) Sobald die ERAD-Substrate das Retrotranslocon passieren, werden sie durch E3 Ligasen polyubiquitiniert und somit immer weiter in das Cytosol gezogen. Cytoplasmatische Proteinkomplexe unterstützen diesen Vorgang ebenfalls. e) Nachdem das polyubiquitinierte Substrat in das Cytosol entlassen wurde, wird es von Rezeptormolekülen im 19S-Cap des Proteasoms erkannt. Deubiquitinierungsenzyme (nicht gezeigt) entfernen das Polyubiquitin-Tag und N-Glycanasen (nicht gezeigt) werden wahrscheinlich ebenfalls für eine effiziente Degradation benötigt. Das Substrat wird schließlich mit Hilfe des 26S-Proteasoms degradiert.

Ricin, Cholera-Toxin und Shiga-Toxin gehören zur Familie der A/B-Toxine und werden mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen. Die Toxine gelangen über den Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum, bevor sie in das Cytosol translozieren, um an ihren cytosolischen Targets ihre toxische Wirkung zu entfalten (Sandvig und van Beurs, 2002). Damit die Toxine aus dem ER exportiert werden, wurde vermutet, dass sie sich als ERAD-Substrate maskieren und so das zelluläre ER-Kontrollsystem ausnutzen, um in das Cytosol zu gelangen. Zumindest ein Teil des jeweiligen Toxins muss sich jedoch der Degradation im Cytosol wieder entziehen, um seine toxische Wirkung entfalten können (Lord et al., 2003). Untersuchungen zur

ER/Cytosol-Dislokation von RTA in Hefe und in Pflanzen lieferten Hinweise, dass RTA Komponenten der ER-assoziierten Degradation nutzt, um aus dem ER in das Cytosol zu gelangen (Frigerio et al., 1998; Simpson et al., 1999). Basierend auf diesen Ergebnissen, sollte RTA mit Hilfe eines anfusionierten ER-Importsignals in das ER-Lumen dirigiert und die ER/Cytosol-Dislokation des Toxins näher untersucht werden. Da die intrazelluläre Expression eines RTA-Letalkonstruktes im ER einer sensitiven Hefe zur Entstehung eines letalen Phänotyps führt, eignet sich dieses System besonders, um gezielt den Mechanismus der RTA-Retrotranslokation in das Cytosol zu analysieren. Zu diesem Zweck wurden die Konstrukte K1- bzw. K28-RTA in verschiedene Deletionsmutanten transformiert, die einen Defekt in einer klassischen ERAD-Komponente aufweisen. Die Transformanten wurden schließlich mittels Wachstumstests auf Toxinsensitivität/-resistenz getestet.

4.1 Untersuchung zur Beteiligung von Komponenten des Hrd1-Komplexes an der Retrotranslokation von RTA

Zunächst wurde die Wirkung von RTA auf Deletionsmutanten mit einem Defekt in einer Komponente des Hrd1p/Hrd3p-Komplexes untersucht. Dieser Komplex besteht aus der Ubiquitin-Ligase Hrd1p, einem Transmembranprotein, welches die ER-Membran mehrmals durchspannt und eine cytosolische Ringfinger-Domäne besitzt. Dabei ist Hrd1p mit dem Membranprotein Hrd3p assoziiert, welches eine vergleichsweise große luminaire Domäne besitzt (Gardner et al., 2000) und dessen Funktion bis dato nicht bekannt ist. Zum einen wird vermutet, dass Hrd3p eine stabilisierende Wirkung auf Hrd1p ausübt (Gardner et al., 2000), jedoch schließt die stark konservierte, große luminaire Domäne dieses Proteins eine zusätzliche Beteiligung von Hrd3p an frühen ERAD-L Ereignissen nicht aus (Denic et al., 2006). Die cytosolische Ringfinger-Domäne von Hrd1p arbeitet mit dem luminalen Ubiquitin-konjugierenden Enzym Ubc7p zusammen (Gardner et al., 2001; Swanson et al., 2001), welches über das Membran-Ankerprotein Cue1p an die ER-Membran rekrutiert wird (Biederer et al.,

1997; Bordallo et al., 1998). Die Hrd1p-Ligase kann auch mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym Ubc6p auf der cytosolischen Seite der ER-Membran interagieren (Gardner et al., 2001; Swanson et al., 2001). Für die Proteine Usa1p und Der1p wird vermutet, dass sie zusammen mit Hrd1p einen Kanal bilden, der für den Transport der ERAD-Substrate über die ER-Membran dient (Carvalho et al., 2006). Usa1p wurde als Hauptpartner aller ERAD-L Substrate gefunden und ebenso als Interaktionspartner von Hrd1p (Gavin et al., 2006). Der Kernmembran-Komplex aus Hrd1p/Hrd3p, Usa1p und Der1p ist mit dem luminalen ER-Protein Yos9p assoziiert. Dieses Lektin dient als Rezeptor für fehlgefaltete Glykoprotein-Substrate im ER-Lumen und ist an der Initialerkennung einiger ERAD-L Substrate involviert (Buschhorn et al., 2004; Bhamidipati et al., 2005; Kim et al., 2005; Szathmary et al., 2005). Yos9p transferiert sein gebundenes Substrat über Hrd3p an den Kern-Komplex. Andere luminaire Faktoren wie das Protein Htm1p spielen wahrscheinlich ebenfalls eine Rolle bei der Substraterkennung und dem Substrattransport zum Hrd1p Kern-Komplex (Gillece et al., 1999; Jakob et al., 2001). Ubx2p vermittelt die Rekrutierung des ATPase-Komplexes Cdc48p an die ER-Membran (Neuber et al., 2005; Schuberth und Buchberger, 2005).

Alle in Abbildung 15 dargestellten Komponenten wurden auf ihre Bedeutung für die Cytotoxizität von RTA untersucht. Dazu wurde in Abwesenheit des jeweiligen Genproduktes untersucht, ob die Galaktose-induzierte Expression der Letalkonstrukte K1- bzw. K28-RTA im ER der entsprechenden Deletionsmutante einen sensitiven Phänotyp induzierten oder ob die Sensitivität gegen RTA vermindert ist.

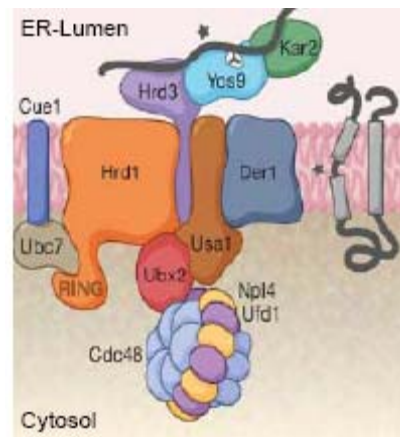


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Hrd1p/Hrd3p-Komplexes in Hefe (verändert nach Ismael und Ng, 2006). Die Polyubiquitinierung der Substrate erfolgt durch die Ubiquitin-Ligase Hrd1p, die zusammen mit den Proteinen Hrd3p, Der1p und Usa1p einen Kernkomplex bildet. Hrd1p arbeitet mit den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen Ubc7p, Ubc1p und in geringem Maße mit Ubc6p zusammen. Im ER-Lumen hält das Chaperon Kar2p die Substrate in einer löslichen Konformation, während das Lektin Yos9p für die Erkennung glykosylierter Substrate verantwortlich ist. Ubx2p vermittelt die Rekrutierung des Cdc48p/Ufd1p/Npl4p-Komplexes an die ER-Membran, welcher durch die AAA ATPase-Aktivität von Cdc48p wahrscheinlich die treibende Kraft für den ER-Export fehlergefalteter Proteine bereitstellt.

Die Ergebnisse in Abbildung 16 machen deutlich, dass mit Ausnahme der transformierten $\Delta yos9$ -Mutante alle übrigen Deletionsmutanten, die intrazelluläre RTA-Expression tolerieren. Dabei war wiederum zu erkennen, dass keine phänotypischen Unterschiede bei den Toxizitätstests auftraten bezüglich der Art des verwendeten Signalpeptids. Die transformierte Mutante $\Delta yos9$ zeigte einen ähnlichen Phänotyp wie die entsprechend transformierte Wildtyp-Hefe BY4742. Als Negativkontrolle wurden die entsprechenden Mutanten mit dem Leervektor pRS316.PT transformiert und unter den gleichen Bedingungen untersucht. Ferner wurden temperatursensitive *kar2*-Mutanten mit Defekt in der Peptid-Bindedomäne getestet, die lediglich eine Störung in der ER-Retrotranslokation, nicht aber im ER-Import aufweisen (Kabani et al., 2003), was darauf schließen lässt, dass die Rolle des Chaperons Kar2p bei der Proteintranslokation sowie der Retrotranslokation verschieden sind (Brodsky et al., 1999).

Entsprechende Wachstumstests der Mutanten *kar2-1* und *kar2-133* nach *in vivo* Expression von K1- bzw. K28-RTA konnten jedoch nicht ausgewertet werden, da selbst bei der permissiven Temperatur sehr starke Wachstumsdefekte auftraten.

Die Ergebnisse der Mutanten mit Defekt im ATPase-Komplex Cdc48p/Ufd1p/Npl4p sind, da sie eine essentielle Rolle bei der Ubiquitinierung der ERAD-Substrate spielen, getrennt unter Punkt 5.2 aufgeführt.

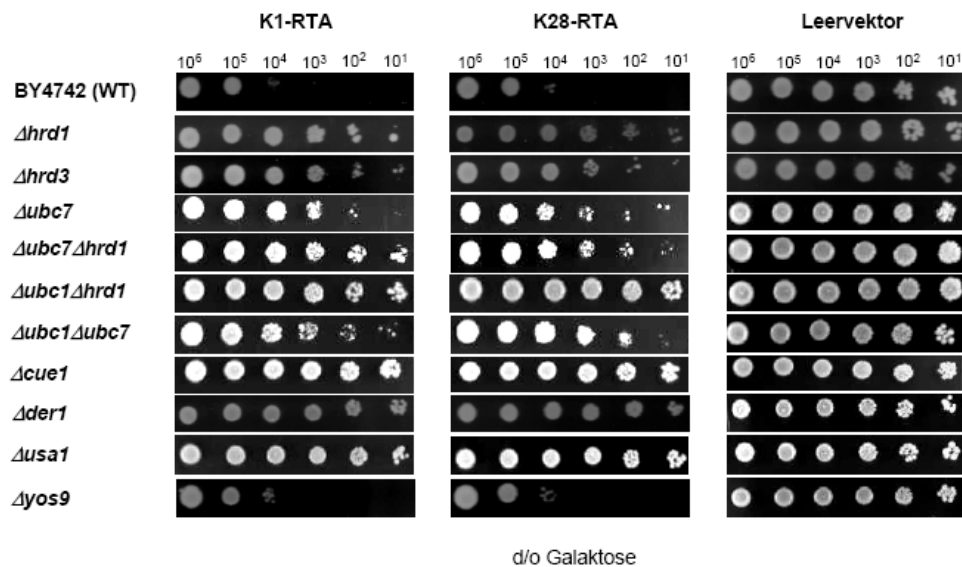


Abbildung 16: Sensitivitätstest verschiedener Deletionsmutanten mit Defekt in einer spezifischen Komponente des Hrd1-Komplexes nach intrazellulärer Expression der Konstrukte K1- bzw. K28-RTA. Hefe-Deletionsmutanten mit einem Defekt in einer ERAD-Komponente des Hrd1-Komplexes wurden mit den Konstrukten pRS316-K1-RTA und pRS316-K28-RTA transformiert. Die Toxinsensitivität der Transformanten wurde mittels Wachstumstest analysiert und mit dem isogenen Wildtyp BY4742 verglichen.

4.2 Untersuchung zur Beteiligung von Komponenten des Doa10-Komplexes an der Retrotranslokation von RTA

Im folgenden wurde die Wirkung von RTA auf Deletionsmutanten mit einem Defekt in einer Komponente des Doa10p-Komplexes untersucht. Dieser Komplex ist normalerweise für die Degradation von Membranproteinen mit fehlgefalteten cytosolischen Domänen (ERAD-C Substrate) verantwortlich (Carvalho et al., 2006). Obwohl es sich bei RTA um ein lösliches Protein handelt, sollte dennoch untersucht werden, ob A/B-Toxine eventuell in der Lage sind, verschiedene ERAD-Pathways auszunutzen, um letztendlich zu ihrem Zielort im Cytosol zu gelangen. Der Doa10p-Komplex besteht aus weniger Komponenten als der Hrd1p/Hrd3p-Komplex. Bei der zentralen Ubiquitin-Ligase Doa10p handelt es sich um ein Transmembran-Protein, das die ER-Membran mehrmals durchspannt und eine cytosolische Ringfinger-Domäne besitzt (Swanson et al., 2001). Zu dem Komplex gehören außerdem das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc7p, welches über den membranverankernden Faktor Cue1p an die ER-Membran rekrutiert ist. Zusätzlich zu Ubc7p vermittelt hier vor allem das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc6p zusammen mit der Ubiquitin-Ligase Doa10p die Polyubiquitinierung der ERAD-C Substrate (Hampton et al., 2002; Kostova et al., 2007). Eine weitere Komponente dieses Komplexes stellt der Cdc48-Komplex dar, welcher durch das ER-Membranprotein Ubx2p an den Doa10p-Komplex rekrutiert wird und für die Translokation des ERAD-C Substrates in das Cytosol verantwortlich ist (Ismail und Ng, 2006). Doa10p kann außerdem cytosolische und nukleäre Substrate polyubiquitinieren, wodurch es weniger wichtig für ERAD sein könnte als die Hrd1p-Ligase (Swanson et al., 2001; Neuber et al., 2005; Ravid et al., 2006). In Abbildung 17 ist der Doa10p-Komplex mit seinen weiteren Komponenten schematisch dargestellt.

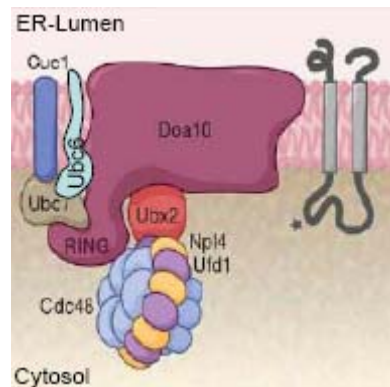


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Doa10p-Komplexes in Hefe (verändert nach Ismael und Ng, 2006). Der Doa10-Komplex hat einen einfacheren Aufbau als der Hrd1-Komplex. Er besteht lediglich aus der Ubiquitin-Ligase Doa10p sowie den beiden Ubiquitin-konjugierenden Enzymen Ubc6p und Ubc7p, wobei letzteres über das Ankerprotein Cue1p an die ER-Membran rekrutiert wird. Der Cdc48/Ufd1/Npl4-Komplex wird von beiden Ubiquitin-Ligase Komplexen genutzt.

Zusätzlich zum Hrd1-Komplex wurden die beiden Doa10-Komplex spezifischen Proteine Doa10p und Ubc6p untersucht. Zu diesem Zweck wurden die beiden Nullmutanten $\Delta doa10$ und $\Delta ubc6$ mit den Konstrukten K1- bzw. K28-RTA transformiert. Nach Anschalten der Expression durch „Shift“ auf Selektionsagar mit 2% Galaktose wurden die Mutanten auf ihre Fähigkeit getestet, die *in vivo* Expression von RTA im ER zu überleben. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. Es war zu erkennen, dass die $\Delta doa10$ -Mutante die intrazelluläre Expression von K1- bzw. K28-RTA im ER-Lumen tolerierte und ein Wachstum bei allen Verdünnungsstufen zeigte, während die entsprechend transformierte $\Delta ubc6$ -Mutante deutlich sensitiver auf die *in vivo* Expression von RTA reagierte. Da die beiden RTA-Konstrukte mit N-terminalem Sekretionssignal als lösliche Proteine im ER-Lumen vorliegen sollten, wäre eigentlich zu erwarten gewesen, dass der Doa10-Komplex keine Rolle bei der Retrotranslokation von K1- bzw. K28-RTA spielt. Bislang wurde der Doa10-Komplex ausschließlich im Rahmen der Degradation von Membranproteinen mit fehlgefalteten cytosolischen Domänen beschrieben (Carvalho et al., 2006).

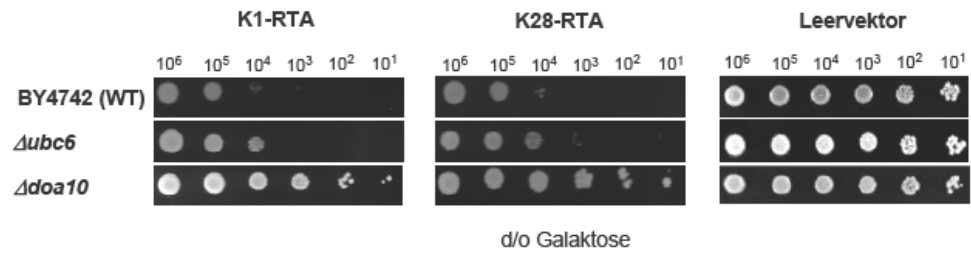


Abbildung 18: Sensitivitätstest der beiden Deletionsmutanten $\Delta ubc6$ und $\Delta doa10$ des Doa10-Komplexes nach intrazellulärer Expression der Konstrukte K1- bzw. K28-RTA. Hefe-Deletionsmutanten mit einem Defekt in einer ERAD-Komponente des Doa10-Komplexes wurden mit den Konstrukten pRS316-K1-RTA und pRS316-K28-RTA transformiert. Die Toxinsensitivität der Transformanten wurde mittels Wachstumstest analysiert und mit dem isogenen Wildtyp BY4742 verglichen.

5. Untersuchungen zum Einfluss einer Ubiquitinierung auf den ER-Export von RTA

Die bisherigen Ergebnisse an ERAD-Mutanten lassen darauf schließen, dass die Ubiquitinierung von RTA eine kritische Rolle spielen könnte, um das Toxin aus dem ER in das Cytosol intoxifizierter Hefezellen zu translokieren, zumal sowohl Komponenten des Doa10p-Komplexes als auch des Hrd1p/Hrd3p-Komplexes, beides Ubiquitin-Ligasen, für die *in vivo* Dislokation von RTA notwendig sind. Im folgenden sollte daher die Cytotoxizität von lysinfreien RTA-Varianten analysiert werden.

5.1 Herstellung lysinfreier RTA-Derivate und Analyse ihrer *in vivo* Toxizität

Lysinreste stellen die Hauptansatzpunkte zur Anlagerung von Ubiquitinmolekülen und dem damit verbundenen proteasomalen Abbau im Rahmen der als ERAD bezeichneten Protein-Degradation dar (Hochstrasser et al., 1999; Schmidt et al., 2005; Elsasser und Finley, 2005). Die meisten ERAD-Substrate werden ubiquitiniert, bevor sie zum Proteasom transportiert werden. Zur Protein-Ubiquitinierung werden

Ubiquitin-aktivierende Enzyme (E1), Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2) und Ubiquitin-Ligasen (E3) benötigt (Nakatsukasa et al., 2008). Bei der Hefe sind die beiden Ubiquitin-Ligasen Hrd1p und Doa10p an der Degradation aller bisher untersuchten ERAD-Substrate beteiligt (Vembar und Brodsky, 2008). Eine Reihe von A/B-Toxinen, die den zellulären Mechanismus der ER-assoziierten Degradation nutzen, um aus dem ER in das Cytosol der Zelle zu gelangen, besitzen in ihrer katalytischen A-Untereinheit keine beziehungsweise sehr wenige Lysinreste, während ihre B-Ketten einen normalen Lysingehalt aufweisen (London und Luongo, 1989). Hazes und Read (1997) postulierten, dass der geringe Lysingehalt einen Mechanismus darstellt, welcher es den Toxinen ermöglicht, einer Ubiquitin-vermittelten Degradation zu entgehen, nachdem die Toxine aus dem ER in das Cytosol translozieren (Hazes und Read, 1997). Die 267 Aminosäuren große A-Kette von Ricin besitzt lediglich zwei Lysinreste an Position 4 und 239 (Lord und Roberts, 2005). Das Einfügen zusätzlicher Lysine in RTA, Abrin A und in die A1-Kette des Cholera Toxins führte zu einem verstärkten proteasomalen Abbau der entsprechenden Toxine (Deeks et al., 2002; Rodighiero et al., 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die potenziellen Ubiquitinierungsstellen der A-Kette von Ricin zerstört, indem alle Lysinreste gegen Arginin ausgetauscht und die Lysin-freien Toxinvarianten bezüglich ihrer Toxizität untersucht wurden. Folglich sollte eine Ubiquitinierung der Ricin A-Kette nicht mehr möglich sein. Hierzu wurden die in Abbildung 19 dargestellten Toxinvarianten konstruiert, in den Zentromervektor pRS316.PT inkloniert und in Hefe unter der Kontrolle des *GAL1*-Promotors exprimiert. Durch einen anschließenden Wachstumstest sollte die *in vivo* Toxizität der jeweiligen Lysin-freien RTA Konstrukte analysiert werden (Abbildung 20).

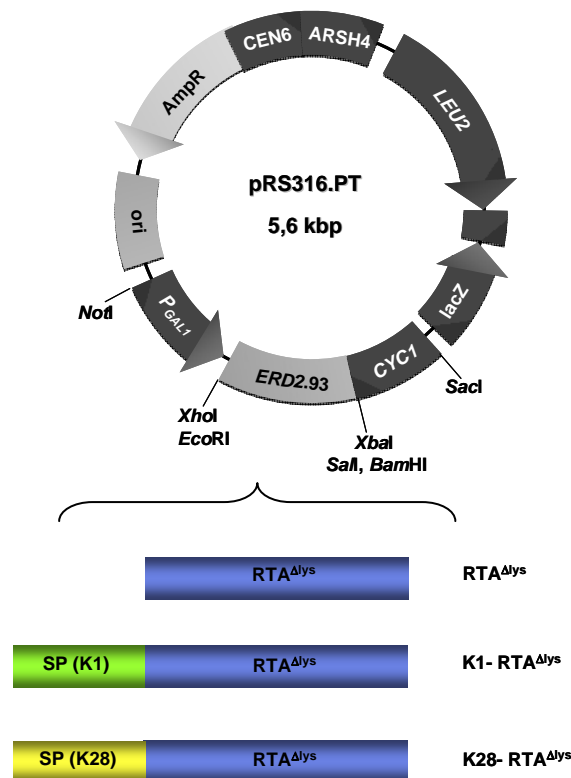


Abbildung 19: Schematische Darstellung der hergestellten RTA^{Δlys}-Derivate zur Untersuchung des Einflusses von Ubiquitinierung auf die Toxinaktivität. Die Konstrukte wurden mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pRS316.PT inkloniert. Als 5'-Schnittstellen wurden die Sequenzen *XbaI/BamHI/EcoRI* bzw. *XhoI/EcoRI* anfusioniert, als 3'-Schnittstellen *NotI/SalI* (SP, Signalpeptid)

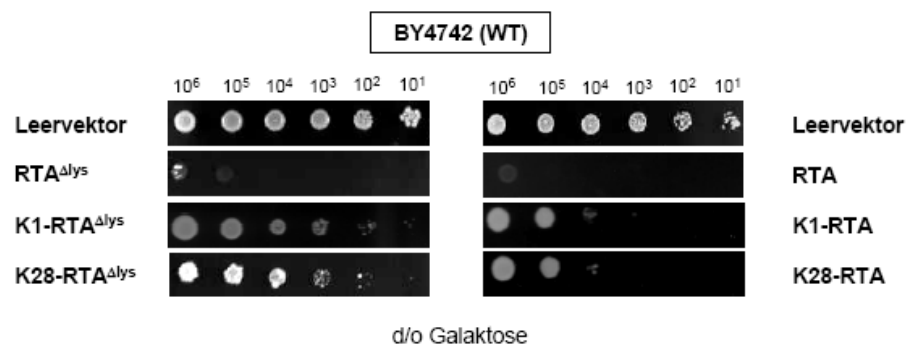


Abbildung 20: Untersuchung der *in vivo* Toxizität Lysin-freier RTA^{Δlys}-Varianten. Der Wildtyp-Hefestamm BY4742 wurde mit verschiedenen RTA-Varianten transformiert, in denen die zwei internen Lysine in RTA an den Positionen 4 und 239 durch Arginine ersetzt wurden. Die Toxin-Konstrukte befanden sich im Zentromervektor pRS316.PT unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors. Im Vergleich dazu dargestellt sind die Wachstumstests der mit der wildtypischen RTA-Variante transformierten Hefe BY4742 (rechte Seite).

Es war zu erkennen, dass die Hefezellen, welche mit der cytosolischen RTA^{Δlys}-Variante transformiert wurden, sensitiv auf die intrazelluläre RTA-Expression reagierten und lediglich ein Wachstum bis zur ersten Verdünnungsstufe zeigten. Im Vergleich dazu konnte bei den mit der cytosolischen Wildtyp-RTA-Variante transformierten Hefen keine Lebensfähigkeit mehr detektiert werden. Die lysinfreien RTA-Varianten mit Signalpeptid am N-Terminus hatten ihre Toxizität fast vollständig verloren, während Hefezellen die *in vivo* Expression der entsprechenden wildtypischen RTA-Konstrukte (Abbildung 20, rechte Seite) deutlich weniger tolerierten. Dabei konnte kein Unterschied in der Toxizität bezüglich des verwendeten ER-Importsignals festgestellt werden. Diese Ergebnisse lieferten weitere Hinweise dafür, dass die Ubiquitinierung von RTA einen kritischen Punkt für die ER/Cytosol-Dislokation des Toxins darstellt. Ein vollständiger Aktivitätsverlust konnte nicht beobachtet werden, auch nach Entfernen der Lysinreste blieb eine minimale Restaktivität erhalten.

5.2 Untersuchungen zum Einfluss des Cdc48-Komplexes sowie verschiedener Komponenten des Ubiquitin-Proteasom Systems auf die Retrotranslokation von RTA

Nachdem die fehlgefalteten Proteine durch die ERAD-Maschinerie erkannt und durch Ubiquitinierung zum Abbau markiert wurden, werden sie durch den Cdc48p-Komplex gebunden, aus dem ER „gezogen“ und schließlich durch das zelluläre 26S Proteasom degradiert (Kostova und Wolf, 2003). Die AAA-ATPase Cdc48p der Hefe *S. cerevisiae* (homolog zu p97 in Säugerzellen) bildet dabei einen stabilen Komplex mit den Proteinen Ufd1p und Npl4p (Hitchcock et al., 2001; Rape et al., 2001). Der Komplex ist in Hefe wahrscheinlich aufgrund seiner Interaktion mit der UBX-Domäne des Membranproteins Ubx2p an die ER-Membran rekrutiert (Neuber et al., 2005; Schuberth und Buchberger, 2005). Da Cdc48p auch mit dem Proteasom-Cap assoziiert ist, könnten die fehlgefalteten Proteine auch direkt von dem Cdc48-Komplex zum Proteasom geleitet und dort degradiert werden. Es wird jedoch

vermutet, dass verschiedene Faktoren, welche mit Cdc48 und dem Proteasom interagieren, eine entscheidende Rolle im Vorfeld der Substrat-Degradation spielen könnten (Raasi und Wolf, 2007). Um den Einfluss des Cdc48-Komplexes auf die Translokation von RTA zu testen, wurden Hefemutanten der entsprechenden Gene auf ihre Toxinsensitivität untersucht. Neben der Deletionsmutante $\Delta npl4$ wurden die beiden temperatursensitiven Mutanten *ufd1-1* und *cdc48-3* mit den toxischen Konstrukten K1- bzw. K28-RTA transformiert und im Toxizitätstest analysiert (Abbildung 21). Wie alle bisher getesteten temperatursensitiven Mutanten ließen sich auch *ufd1-1* und *cdc48-3* im Wachstumstest nicht auswerten, da selbst bei permissiver Temperatur sehr starke Wachstumsdefekte auftraten. Lediglich die Nullmutante $\Delta npl4$ konnte bezüglich ihres Phänotyps nach *in vivo* Expression der beiden RTA-Konstrukte untersucht werden. In Abwesenheit von Npl4p zeigte sich ein Wachstum der Transformanten bei allen Verdünnungsstufen, was einen indirekten Hinweis auf die Beteiligung des Cdc48-Komplexes an der RTA-Retrotranslokation lieferte.

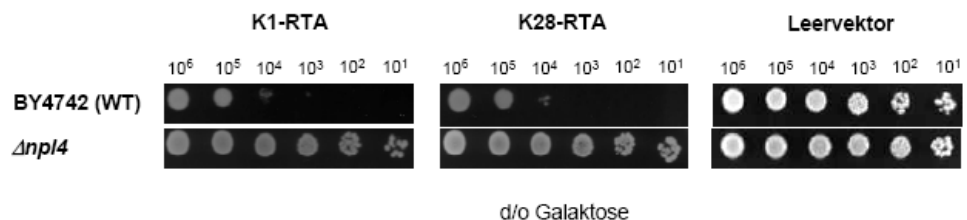


Abbildung 21: Wachstumstest einer $\Delta npl4$ Deletionsmutante nach intrazellulärer Expression der RTA-Konstrukte mit N-terminalem Sekretionssignal. Die Nullmutante $\Delta npl4$ wurde mit pRS316-K1-RTA bzw. pRS316-K28-RTA transformiert. Nach *in vivo* Expression der RTA-Konstrukte wurde das Wachstum analysiert und mit dem des isogenen Wildtyps BY4742 verglichen.

Die beiden Proteine Dsk2p und Rad23p wurden als Polyubiquitin-bindende Proteine identifiziert (Wilkinson et al., 2001; Chen und Madura, 2002; Funakoshi et al., 2002; Hartmann-Petersen et al., 2003) und besitzen eine N-terminale Ubiquitin-ähnliche Domäne (UBL), die an

eine spezifische Stelle der 19S-Kappe des Proteasoms bindet sowie eine C-terminale Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA), die Polyubiquitinketten binden kann (Wilkinson et al., 2001; Rao und Sastry, 2002; Hartmann-Petersen et al., 2003). Diese charakteristische Struktur der beiden Proteine lässt vermuten, dass zum Abbau markierte Substrate über ihre Polyubiquitinkette an die UBA-Domäne von Dsk2p und Rad23p binden und durch die Interaktion der UBL-Domäne der Proteine mit der 19S-Kappe zum Proteasom transportiert werden (Medicherla et al., 2004). Der Ubiquitin-Assemblierungsfaktor Ufd2p ist das erste bislang identifizierte E4 Enzym, das Mono-/Di-Ubiquitinreste zu einer Polypeptidkette verlängert (Koegl et al., 1999). Ufd2p und Cdc48p versehen ERAD-Substrate mit einer verkürzten Ubiquitinstruktur aus vier bis sechs Resten. Diese Oligoubiquitinketten werden von den Zulieferproteinen Rad23p und Dsk2p erkannt und zum Proteasom dirigiert (Richly et al., 2005).

Um zu untersuchen, ob der Verlust der beiden Polyubiquitin-bindenden Proteine Rad23p und Dsk2p sowie des Ubiquitin-Assemblierungsfaktors Ufd2p einen Einfluss auf die Toxizität der beiden Konstrukte K1- bzw. K28-RTA ausübt, wurden die entsprechenden Deletionsmutanten mit den RTA-Derivaten transformiert und im Wachstumstest analysiert (Abbildung 22). Hierbei zeigte sich, dass alle drei Mutanten die intrazelluläre RTA-Expression im ER-Lumen tolerierten und ein normales Zellwachstum zeigten.

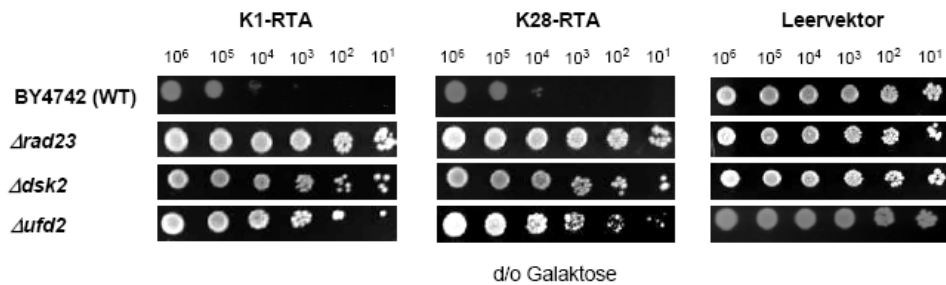


Abbildung 22: Sensitivitätstest von $\Delta rad23$, $\Delta dsk2$ und $\Delta ufd2$ Hefedeletionsmutanten nach intrazellulärer Expression der letalen Konstrukte K1-RTA bzw. K28-RTA. Die *S. cerevisiae*-Stämme $\Delta rad23$, $\Delta dsk2$ und $\Delta ufd2$ sowie der isogene Wildtyp BY4742 wurden mit den Konstrukten pRS316-K1- bzw. K28-RTA transformiert. Die Transformanten wurden im Wachstumstest auf ihre Sensitivität getestet. Als Negativkontrolle wurden die entsprechenden Mutanten mit dem Leervektor pRS316.PT transformiert und mitgeführt.

Viele ERAD-Substrate werden im ER-Lumen N-glykosyliert (Yoshida, 2003; Helenius und Aebi, 2004). Durch Computersimulationen konnte gezeigt werden, dass das „sperrige“ N-gekoppelte Oligosaccharid abgespalten werden muss, bevor das entsprechende Substrat degradiert wird, um die Effizienz des Proteasoms aufrecht zu erhalten (Hirsch et al., 2003). Funktionalitätsstudien ließen vermuten, dass die N-Glykanase Png1p das primäre, wenn nicht einzige, cytosolische Deglykosylierungs-Enzym ist (Suzuki et al., 2000; Blom et al., 2004). Bis jetzt konnte jedoch noch kein distinktes ERAD-Substrat identifiziert werden, welches Png1p für seine Degradation benötigt. So war der Abbau verschiedener glykosylierter ERAD-Substrate wie der mutierten Form der Carboxypeptidase Y oder der α -Kette des T-Zell-Rezeptors in einer $\Delta png1$ Hefedeletionsmutante nicht signifikant beeinflusst (Suzuki et al., 2000). Da auch die Ricin A Kette normalerweise im ER-Lumen glykosyliert wird, sollte im Wachstumstest überprüft werden, ob die Abwesenheit der N-Glykanase Png1p einen Einfluss auf die Toxizität von RTA hat. Die Nullmutante $\Delta png1$ zeigte nach intrazellulärer Expression der beiden cytotoxischen Konstrukte K1- bzw. K28-RTA einen sensitiven Phänotyp ähnlich dem des Wildtyps (Abbildung 23).

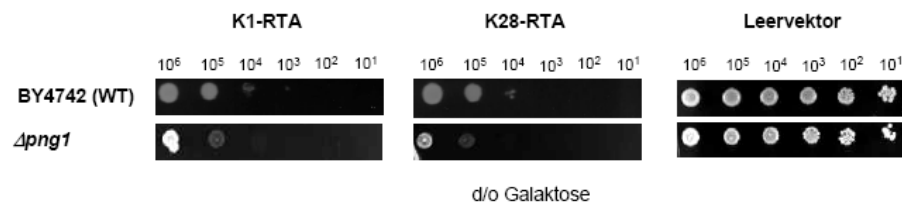


Abbildung 23: Wachstumstest einer $\Delta png1$ -Nullmutante nach intrazellulärer Expression der cytotoxischen Konstrukte K1- bzw. K28-RTA. Die Hefedeletionsmutante $\Delta png1$ sowie der entsprechende isogene Wildtyp BY4742 wurden mit einer RTA-Variante mit N-terminalem Sekretionssignal transformiert. Die Sensitivität der Transformanten wurde mittels Wachstumstest analysiert.

Das 26S-Proteasom besteht aus dem katalytischen 20S-Kernkomplex, der auf beiden Seiten von einem regulatorischen 19S-Komplex flankiert wird. Mit Ausnahme der Ornithin-Decarboxylase erkennt der 26S-Komplex spezifisch nur Ubiquitin-markierte Proteine (Chiechanover, 1998). Der Kernkomplex besteht aus vier Ringen, zwei α - und zwei β -Ringen, die jeweils nochmals in 7 verschiedene Untereinheiten unterteilt sind. Eine interessante Frage bleibt weiterhin, wie Substrate in das Proteasom eintreten und wie die proteolytischen Produkte schließlich aus dem Proteasom exportiert werden. Das Proteasom des Archaeobakteriums *Thermoplasma acidophilum* besitzt zwei Eintrittsporen an den Enden des zylinderförmigen Proteasoms, die jedoch im 20S Proteasom der Hefe fehlen. Bei der Hefe sind seitliche Öffnungen zwischen den Berührungsflächen der α - und β -Ringe vorhanden, welche direkt zum aktiven Zentrum des Proteasoms führen. Die Substraterkennung durch das 26S-Proteasom wird vermutlich durch die Interaktion spezifischer Untereinheiten des regulatorischen 19S-Komplexes mit den Polyubiquitinketten der zum Abbau markierten Substrate vermittelt (Chiechanover, 1998). Dazu zählt unter anderem auch das Protein Rpn10p („regulatory particle non-ATPase-10“), das an die polyubiquitinierten Proteine bindet und die Substrate zur Degradation in den 20S-Kernkomplex geleitet (Vembar und Brodsky, 2008). Ein gewisser Prozentsatz an Proteasomen befindet sich auch auf der Oberfläche der ER-Membran und ist somit optimal positioniert, um ERAD-Substrate direkt aufzunehmen und zu degradieren (Rivett,

1993). Um weitere Hinweise zu erhalten, ob Komponenten des Proteasoms einen direkten Einfluss auf die Retrotranslokation und *in vivo* Toxizität von RTA ausüben, wurde eine $\Delta rpn10$ -Deletionsmutante mit den beiden Konstrukten K1- bzw. K28-RTA transformiert und die Sensitivität der entsprechenden Transformanten im Wachstumstest ermittelt (Abbildung 24). Sowohl die mit K1-RTA als auch mit K28-RTA transformierten Mutanten zeigten einen sensitiven Phänotyp, der im Vergleich zum isogenen Wildtyp fast noch stärker ausgeprägt war.

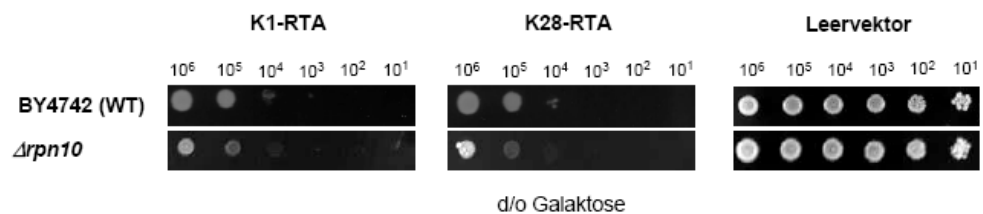


Abbildung 24: Untersuchung der *in vivo* Toxizität von verschiedenen RTA-Varianten in einer $\Delta rpn10$ Hefedeletionsmutante. Eine $\Delta rpn10$ Nullmutante und der isogene Wildtyp BY4742 wurden mit den Konstrukten K1- bzw. K28-RTA sowie dem Leervektor pRS316.PT (Negativkontrolle) transformiert. Nach *in vivo* Expression von RTA im ER wurde das Wachstum der Transformanten analysiert und mit dem des isogenen Wildtyps verglichen.

5.3 Einfluss des Deubiquitinierungs-Enzyms Doa4p auf die *in vivo* Toxizität von RTA

Zur weiteren Untersuchung der Ubiquitinierung von RTA wurden die Konstrukte K1- bzw. K28-RTA in eine $\Delta doa4$ -Mutante transformiert und bezüglich ihrer *in vivo* Toxizität untersucht (Abbildung 24). Ubiquitin ist ein Protein mit einer langen Halbwertszeit und muss deshalb von dem ubiquitinierten Substrat entfernt werden, bevor oder während dieses degradiert wird (Swaminathan et al., 1999). In Hefe wurden 17 Deubiquitinierungsenzyme (DUBs) anhand der kompletten genomischen Sequenz vorausgesagt. Einige von ihnen wurden zwar teilweise untersucht, jedoch ist über die physiologische Funktion und die natürlichen Substrate der Enzyme relativ wenig bekannt (Wilkinson

und Hochstrasser, 1998). Zu den am Besten charakterisierten Deubiquitinierungsenzymen zählt das Protein Doa4p der Hefe *S. cerevisiae*, für welches gezeigt wurde, dass es sowohl bei der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse, als auch bei der Ubiquitin-Homöostase eine Rolle spielt (Papa und Hochstrasser, 1993; Singer et al., 1996; Papa et al., 1999; Swaminathan et al., 1999). Doa4p scheint dabei seine Funktion im späten Ubiquitin-Proteasom-Weg auszuüben, indem es Ubiquitin von Substraten, die zum Proteasom transportiert wurden, abspaltet. Ein beträchtlicher Teil des Enzyms ist mit dem 26S-Proteasom assoziiert (Amerik et al., 2000).

Durch intrazelluläre Expression der toxischen Konstrukte K1-RTA und K28-RTA im ER einer $\Delta doa4$ -Mutante sollte analysiert werden, ob bei Verlust dieses Proteins eine Stabilisierung von RTA erfolgt. Die entsprechend transformierte Mutante wurde zunächst in d/o Raffinose Medium angezogen und dann auf eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen eingestellt. Es wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, von der jeweils 5 μ l auf d/o Glukose Agar (reprimierende Bedingungen) bzw. d/o Galaktose Agar (induzierende Bedingungen) aufgetropft und zur Wachstumsanalyse 5 Tage bei 30° C inkubiert wurden. Als Negativkontrolle wurden die mit dem Leervektor pRS316.PT transformierten Hefezellen mitgeführt. Wie aus Abbildung 25 zu erkennen ist, zeigten die Transformanten im Vergleich zum isogenen Wildtyp eine vollständige Resistenz gegenüber RTA.

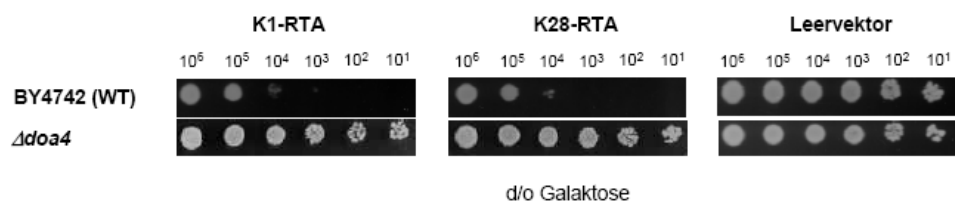


Abbildung 25: Untersuchung der *in vivo* Toxizität von verschiedenen RTA-Varianten in der Hefedeletionsmutante $\Delta doa4$. Eine $\Delta doa4$ -Mutante wurde mit den Konstrukten pRS316-K1-RTA bzw. pRS316-K28-RTA transformiert. Nach *in vivo* Expression der beiden toxischen Konstrukte wurde das Wachstum der Transformanten untersucht und mit dem des isogenen Wildtyps verglichen.

5.4 Untersuchung der *in vivo* Toxizität von RTA nach gleichzeitiger Überexpression einer mutierten Ubiquitin-Variante mit Defekt in der Bildung von Polyubiquitin-Ketten

Des Weiteren wurde die Toxizität der SP-RTA-Konstrukte in Wildtyp-Hefen bei gleichzeitiger Überexpression einer mutierten Ubiquitin-Variante untersucht. Dazu wurde die Wildtyp-Hefe SEY6210 nicht nur mit K1- bzw. K28-RTA transformiert, sondern zusätzlich mit einem Plasmid, welches für Ubiquitin kodiert, in welchem die Lysin-Reste 48 und 63 durch Arginin ersetzt wurden. Durch den Einbau dieser Ub-RR^{48/63}-Moleküle wird die Bildung von Polyubiquitin-Ketten gehemmt (Arnason und Ellison, 1994). Die Expression von Ubiquitin in der Hefe erfolgte unter Kontrolle des Kupfer-induzierbaren Promotors *CUP1*.

Ubiquitin selbst besitzt 7 Lysinreste (K6, K11, K27, K29, K33, K48 und K63), die sich jeweils mit einem anderen Ubiquitinmolekül verbinden und somit Polyubiquitin-Ketten ausbilden können (Ikeda und Dikic, 2008). Polyubiquitin-Ketten, die über den Lysinrest K48 von Ubiquitinentstehen, sind normalerweise dafür verantwortlich, dass die betreffenden Proteine zur Degradation dem Proteasom zugeführt werden, während Polyubiquitin-Ketten, die über die übrigen Lysinreste verknüpft sind, eher proteolytische bzw. nicht proteolytische Funktionen ausüben (Chen und Sun, 2009). Durch die Überexpression der mutierten Ubiquitin-Variante sollten daher keine oder zumindest deutlich weniger Polyubiquitin-Ketten ausgebildet werden können. Da jedoch eine Polyubiquitinierung der ERAD-Substrate als Signal für deren proteasomalen Abbau und auch für deren ER-Export essentiell ist (Chau et al., 1989; Tsai et al., 2002), sollten nicht-ubiquitinierte Substrate im ER akkumulieren. Die Akkumulation von RTA im ER-Lumen sollte wiederum einen Toxizitätsverlust zur Folge haben, da RTA nicht in das Cytosol gelangt, um die rRNA der Ribosomen zu depurinieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt.

Um auszuschließen, dass die alleinige Expression der mutierten Ubiquitin-Variante einen Effekt auf die Lebensfähigkeit der Hefezellen hat, wurde die Hefe SEY6210 mit dem Plasmid pWO21, welches für das mutierte Ubiquitin Ub-RR^{48/63} kodiert, transformiert und ebenfalls im

Wachstumstest untersucht. Es war jedoch keine Beeinträchtigung des Wachstums der mit pWO21 transformierten Hefezellen festzustellen. Die entsprechenden Hefezellen zeigten ein Wachstum bei allen Verdünnungsstufen. Die *in vivo* Expression der letalen Konstrukte K1-RTA und K28-RTA in der Wildtyp-Hefe SEY6210 führte zur Ausbildung eines sensitiven Phänotyps, wobei die transformierten Hefen lediglich ein Wachstum bis zur zweiten Verdünnungsstufe aufwiesen. Der sensitive *S. cerevisiae*-Stamm SEY6210 wurde schließlich mit den Toxinvarianten pRS316-K1- bzw. K28-RTA sowie dem Plasmid pWO21, welches die Expression der mutierten Ubiquitin-Variante Ub-RR^{48/63} durch Induktion mit 100 µM CuSO₄ erlaubt (Arnason und Ellison, 1994), cotransformiert. In Selektionsmedium mit 2% Galaktose und nach Zusatz von 100 µM CuSO₄ zeigte sich ein signifikant vermindert sensibler Phänotyp. Die Transformanten zeigten ein Wachstum bis zur vierten Verdünnungsstufe. Dieses Experiment unterstützt somit die These, dass RTA polyubiquitiniert werden muss, um ins Cytosol zu gelangen.

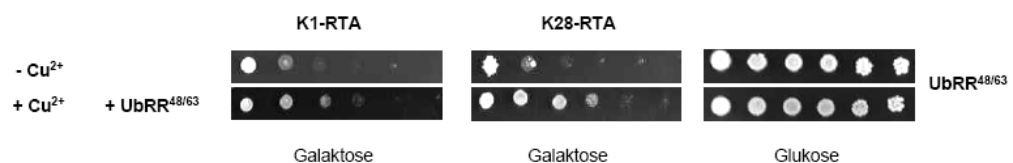


Abbildung 26: Untersuchung der *in vivo* Toxizität von RTA nach gleichzeitiger Überexpression von Ub-RR^{48/63} in der Wildtyp-Hefe SEY6210. Das Plasmid pWO21 kodiert für eine mutierte Ubiquitin-Variante (Ub-RR^{48/63}), die keine Polyubiquitinketten mehr ausbilden kann. Das Plasmid besitzt einen *TRP1*-Marker sowie einen induzierbaren *CUP1*-Promotor. Die Wildtyp-Hefe SEY6210 wurde mit den Konstrukten pRS316-K1-RTA und pRS316-K28-RTA sowie dem Plasmid pWO21 cotransformiert. Die Transformanten wurden in *ura trp* d/o Raffinose Medium angezogen und die Zellzahl auf 1×10^7 Zellen eingestellt. Es wurde jeweils eine Verdünnungsreihe (10^7 bis 10^2 Zellen) hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 5 µl auf eine *ura trp* d/o Glukose-Platte (reprimierende Bedingungen) mit 100 µM CuSO₄ sowie auf eine *ura trp* d/o Galaktose-Platte mit 100 µM CuSO₄ (induzierende Bedingungen) aufgetropft. Als Kontrolle wurde die Hefe SEY6210 mit dem Leervektor pRS316.PT und pWO21 cotransformiert und entsprechend behandelt. Die Platten wurden 5 Tage bei 30° C inkubiert.

5.5 Nachweis der *in vivo* Interaktion zwischen RTA und Ubiquitin mit Hilfe der bimolekularen Fluoreszenz-komplementation (BiFC)

Der BiFC-Assay („bimolecular fluorescence complementation“) ist ein erweitertes „Yeast-Two-Hybrid“-System, das auf der *in vivo* Rekonstitution eines Fluoreszenzproteins aus seinen zwei nicht fluoreszierenden Teilen basiert (Hu et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, dass zwei nicht oder nur gering fluoreszierende Proteinderivate, NGFP und CGFP (N-terminaler und C-terminaler Teil des „green fluorescent protein“), durch Bildung einer Leucizipper-Bindung wieder zusammengebracht werden können, was zu einer Wiederherstellung der Fluoreszenz führt (Ghosh et al., 2000). Gegenüber dem konventionellen „Yeast-Two-Hybrid“-System hat der BiFC-Assay einige Vorteile. Zum einen wird das Problem der sogenannten Autoaktivierung umgangen, da keine Transkriptionsfaktoren und aktivierbare Reportergene verwendet werden (Fashena et al., 2000). Zudem wird auch kein Substrat benötigt, da das System auf der direkten Rekonstitution der Proteinfragmente basiert. Schäuble (2008) konnte in seiner Diplomarbeit ein BiFC-System mit dem rot fluoreszierenden Protein mCherry etablieren, welches in seiner Arbeit als Reporter verwendet wurde. Das 237 Aminosäuren große Protein ist eine durch Mutation optimierte Variante des mRFP1 („monomeric red fluorescent protein“), welches wiederum eine monomere Form des obligat tetrameren Fluoreszenzproteins dsRed aus der Scheibenanemone *Dicosoma spec.* darstellt. Ausgehend von diesem „Split“-mCherry-System sollte in dieser Arbeit die *in vivo* Interaktion zwischen RTA und Ubiquitin in Hefe untersucht werden. Als „Fänger“-Plasmide dienten RTA-Derivate, die an bestimmte mCherry-Fragmente fusioniert wurden. Dabei wurde wiederum die mutierte RTA-Variante RTA^{E177D} verwendet, um den Zellen genügend Zeit zu geben, eine eventuelle Protein-Protein-Interaktion auszubilden. Das „Beute“-Plasmid enthielt das Protein Ubiquitin sowie ein zum „Fänger“-Plasmid korrespondierendes mCherry-Fragment.

5.5.1 Konstruktion der „Fänger“- und „Beute“-Plasmide zur Untersuchung der RTA-Ubiquitin Interaktion mittels BiFC

Da Schäuble (2008) in seiner Diplomarbeit das „split“-mCherry-System bereits verwendet hatte, konnten die von ihm konstruierten Fängerplasmide übernommen werden. Lediglich die Ricin A Kette musste durch einen Klonierungsschritt in die entsprechenden Plasmide eingefügt werden. Das korrespondierende Beuteplasmid MN-Ubiquitin stammte aus der Diplomarbeit von Schorr (2009) und konnte direkt für den Versuch eingesetzt werden. Die Fängerplasmide beruhen auf dem Grundvektor pRS315.PT, der als besondere Charakteristika eine Hefe-Zentromersequenz (CEN), einen *LEU2*-Marker sowie die Promotorsequenz P_{GAL1} und die Terminatorsequenz *CYC TT* aus dem TOPO-Klonierungsvektor pYES/V5-His-TOPO[®] enthält. Dies gewährleistet eine Galaktose-induzierbare Expression der „split“-mCherry-Fusionsproteine. Die entsprechende RTA-Variante (RTA^{E177D}) wurde über die Schnittstellen *SaI* und *XbaI* stromabwärts der mCherry-Fragmente einkloniert. Das Beuteplasmid geht aus dem Vektor pRS316.PT hervor, der die gleichen Charakteristika wie der Vektor pRS315.PT besitzt, als Selektionsmarker jedoch ein *URA3*-Gen enthält. Die in dieser Arbeit eingesetzten Plasmide sind in Abbildung 27 schematisch dargestellt.

Um zu überprüfen, ob das mCherry-basierende BiFC-System in *S. cerevisiae* funktionell ist, wurden mehrere Positiv- und Negativkontrollen eingesetzt und fluoreszenzmikroskopisch visualisiert. Hiermit sollte bestätigt werden, dass eine Fluoreszenzwiederherstellung sowie das Auftreten der gewünschten Fluoreszenz nur durch Rekonstitution der Fragmente des Fluoreszenzproteins erfolgen kann. Diese Fluoreszenz sollte nur auftreten, wenn die Fusionsproteine an den beiden mCherry-Teilen miteinander interagieren. Die untersuchten Kontrollplasmide sind ebenfalls in Abbildung 27 zusammengefasst.

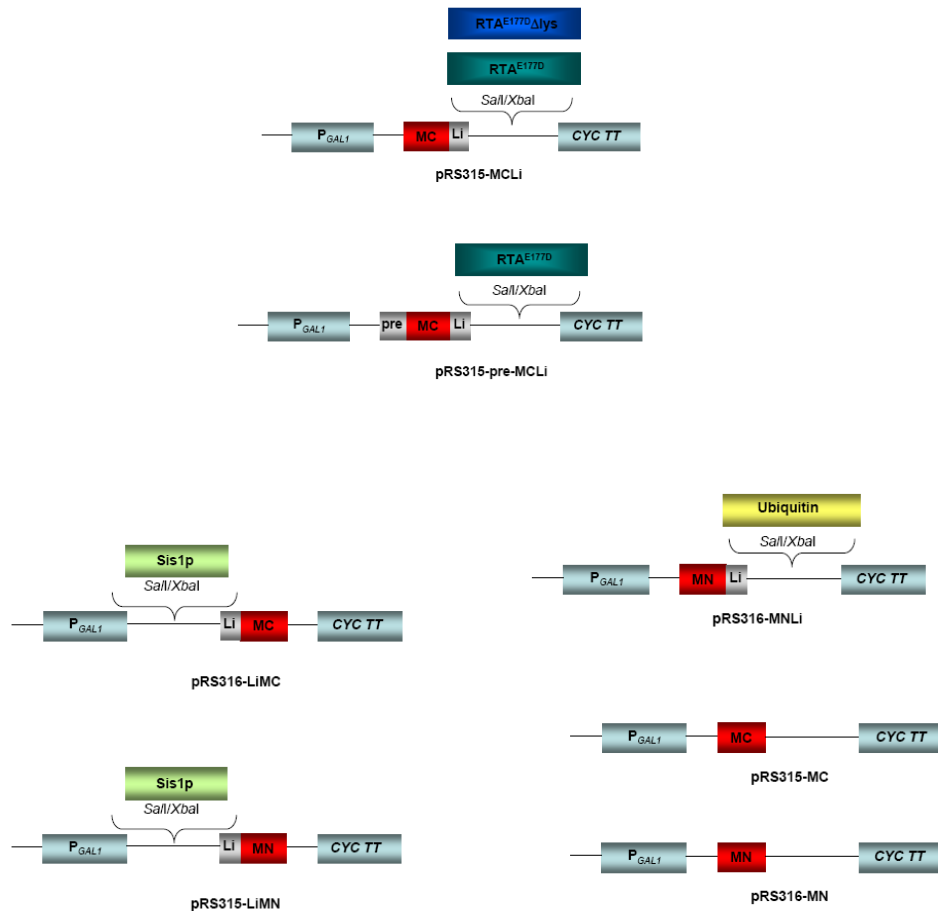


Abbildung 27: Schematische Darstellung der zur bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) eingesetzten Konstrukte und deren Klonierung in die Fänger- bzw. Beutevektoren. Die Varianten pRS315-MC und pRS316-MN dienen als Negativkontrolle. **Linker:** GGTGGTGGTGGTTCTGGTGGTGGTGGTTCT; **MN:** N-terminaler Teil von mCherry (1-477 bp); **MC:** C-terminaler Teil von mCherry (488-711 bp); **pre:** Sekretionssignal des Hefetoxins K28, das den posttranslationalen ER-Import gewährt. Die Konstrukte RTA^{E177D}, RTA^{E177D}Δlys und Ubiquitin wurden über die Schnittstellen *SaI* und *XbaI* in die jeweiligen Vektoren einkloniert, Sis1p über die Schnittstellen *SaI* und *Paul*.

5.5.2 Positivkontrolle

Als Positivkontrolle wurde das Hsp40 Co-Chaperon Sis1p verwendet, das aufgrund seiner Fähigkeit, Homodimere ausbilden zu können, in „Fänger“- und „Beute“-Plasmid jeweils an eines der mCherry-Fragmente (MN = N-terminaler mCherry-Teil, 234 bp; MC = C-terminaler mCherry-Teil, 477 bp) fusioniert wurde (Sha et al., 2000). Es wurde eine Kontrolle getestet, die bereits von Schäuble (2008) erfolgreich eingesetzt wurde. Es handelte sich um eine Variante, bei der Sis1p C-terminal an mCherry fusioniert vorliegt (Sis1p-Li-MC und Sis1p-Li-MN). Die Kontrolle zeigte eine rote Fluoreszenz im Cytosol sowie teilweise im Nukleus der Zellen und somit die erwartete Rekonstitution des Fluoreszenzproteins (Abbildung 28).

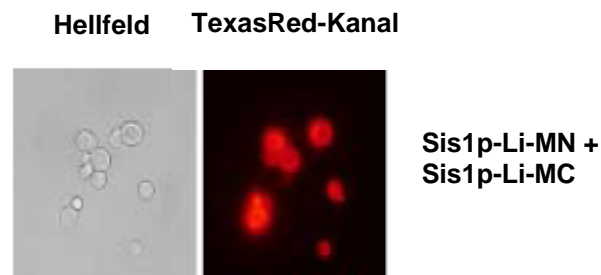


Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopische Nachweis einer *in vivo* Homodimerisierung des Hsp40-Chaperons Sis1p mittels BiFC-Analyse. Die Hefe BY4742 wurde mit den Sis1p-Varianten mit jeweils C-terminal fusionierten mCherry-Fragmenten cotransformiert. Zur Induktion der Koexpression der Fusionsproteine wurden die Zellen auf *ura leu d/o* Galaktose Medium „geschiftet“, ein bis zwei Tage bei 20° C auf einem Rundschüttler inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

5.5.3 Negativkontrolle

Um Autofluoreszenz sowie unspezifische Fluoreszenz durch alleinige Zusammenlagerung der mCherry-Fragmente ausschließen zu können, wurden verschiedene Vektorkombinationen als Negativkontrollen herangezogen. Zuerst wurden die beiden mCherry-Fragmente (MN und MC) koexprimiert, womit eine von Testproteinen unabhängige Fluoreszenzrekonstitution ausgeschlossen werden sollte. Erwartungsgemäß konnte keine Fluoreszenz detektiert werden. Außerdem wurde eine Variante getestet, die ein RTA^{E177D}-„split“-mCherry-Fusionsprotein zusammen mit einem einzelnen mCherry-Fragment koexprimiert (MN + MCLi-RTA^{E177D}). Die cotransformierten Hefen wiesen keine Fluoreszenzsignale auf. Alle mikroskopischen Aufnahmen der Negativkontrollen sind in Abbildung 29 dargestellt.

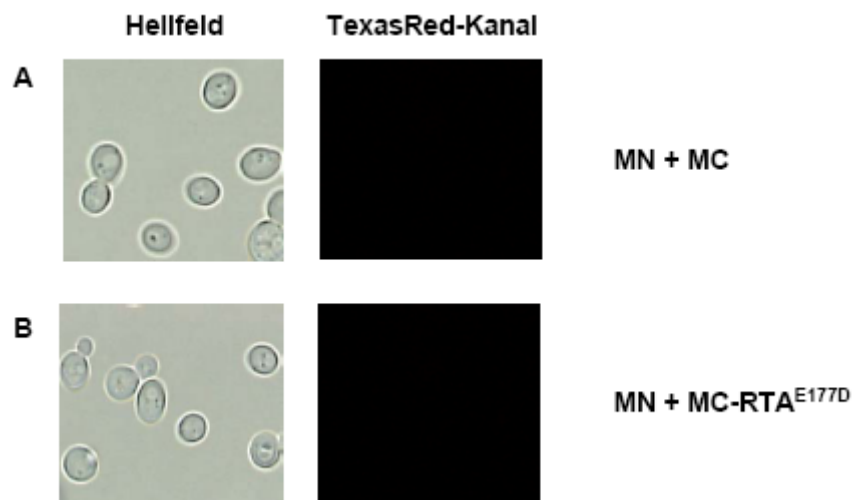


Abbildung 29: Untersuchung der Funktionalität des mCherry-basierenden BiFC-Systems anhand verschiedener Negativkontrollen. Die Hefe BY4742 wurde mit den jeweiligen „split“-mCherry-Plasmiden cotransformiert. Zur Induktion der Koexpression der Fusionsproteine wurden die Zellen auf *ura leu d/o Galaktose* Medium „geschiftet“, ein bis zwei Tage bei 20° C auf einem Rundschüttler inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

- (A) Koexpression von MN und MC
 (B) Koexpression von MN mit MCLi-RTA^{E177D}

5.5.4 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Protein-Protein-Interaktion zwischen der Ricin A Kette und Ubiquitin

Die vorangegangenen Sensitivitätstests, bei denen die intrazelluläre Expression von RTA in verschiedenen Hefe-Deletionsmutanten analysiert wurde, deuteten auf eine Ubiquitinierung von RTA als Voraussetzung zur Retrotranslokation hin. Mit Hilfe des von Schäuble (2008) für Hefe etablierten „split“-mCherry-Systems sollte im folgenden ein Nachweis für eine direkte physikalische Interaktion zwischen Ricin A und Ubiquitin erbracht werden. Dazu wurde der Hefestamm BY4742 mit den „Fänger“-Plasmiden pRS315-MCLi-RTA^{E177D} und pRS315-pre(K28)-MCLi-RTA^{E177D} sowie dem „Beute“-Plasmid pRS316-MN-Ubiquitin cotransformiert. Bei einer Ubiquitinierung von Ricin A, als Voraussetzung für die Retrotranslokation, war zu erwarten, dass eine RTA-Variante mit K28-Sekretionssignal N-terminal von mCherry (pre-MCLi-RTA^{E177D}) eine rote Fluoreszenz zeigt, während eine RTA-Variante ohne Signalsequenz (MCLi-RTA^{E177D}) kein Signal produzieren sollte. Die Transformanten wurden in *ura leu d/o* Raffinose Medium ü. N bei 30° C inkubiert. Zur Induktion der Koexpression der Fusionsproteine wurden die Zellen auf *ura leu d/o* Galaktose Medium „geschiftet“ und ein bis zwei Tage bei 20° C auf einem Rundschüttler inkubiert. Die niedrige Temperatur sollte eine verbesserte Reifung des Fluoreszenzproteins bewirken. Diese Tatsache wurde bereits bei dem grünfluoreszierenden Protein GFP nachgewiesen (Tsien, 1998). Außerdem verhalten sich die BiFC-Systeme allgemein sehr temperaturabhängig. Eine erniedrigte Inkubationstemperatur (20-25° C) bewirkt eine verbesserte Rekonstitution der Fluoreszenz bei Annäherung der Fluoreszenzfragmente (Fan et al., 2008). Zur fluoreszenzmikroskopischen Detektion von *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen wurde ein Tropfen der Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben. Die Zellen wurden mit einer Objektivvergrößerung von 50 x betrachtet und alle Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mit einer Belichtungszeit von 0,5 s. Wie Abbildung 30 zu entnehmen ist, zeigte die mit pre-MCLi-RTA^{E177D} und MN-Ubiquitin cotransformierte Hefe eine rote

Fluoreszenz. Die mit dem RTA-mCherry-Fragment ohne Signalsequenz transformierten Hefen hingegen wiesen keine signifikanten Fluoreszenzsignale auf. Beide Ergebnisse wurden zusätzlich durch „Overlay“ von Hellfeld- und Fluoreszenzbild verdeutlicht (Abbildung 31). Dadurch konnte eine *in vivo* Interaktion zwischen Ubiquitin und einer RTA-Variante mit ER-Importsignal am N-Terminus gezeigt und somit verifiziert werden, dass die Ubiquitinierung eine entscheidende Rolle für die *in vivo* Toxizität von Ricin A spielt.

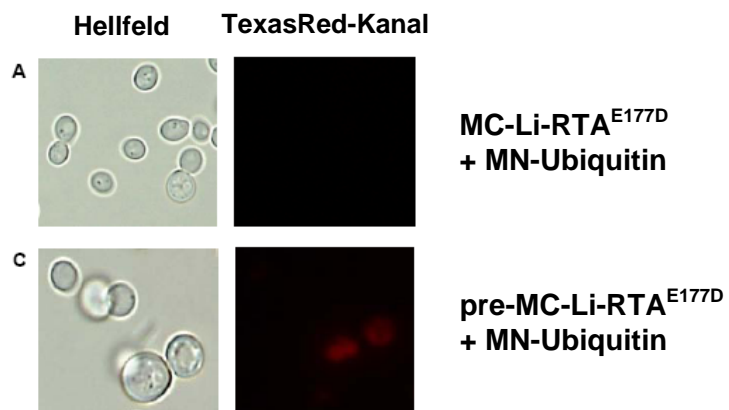


Abbildung 30: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von *in vivo* Interaktionen zwischen Ricin A und Ubiquitin. Der Hefestamm BY4742 wurde mit den Fängerplasmiden pRS315-MCLi-RTA^{E177D}, pRS315-MCLi-RTA^{E177D} Δ lys und pRS315-pre(K28)-MCLi-RTA^{E177D} sowie dem Beuteplasmid pRS316-MN-Ubiquitin cotransformiert. Die Transformanten wurden in *ura leu d/o* Raffinose Medium \ddot{u} .N. bei 30° C inkubiert. Zur Induktion der Koexpression der Fusionsproteine wurden die Zellen auf *ura leu d/o* Galaktose Medium „geshiftet“ und ein bis zwei Tage bei 20° C auf einem Rundschüttler inkubiert.

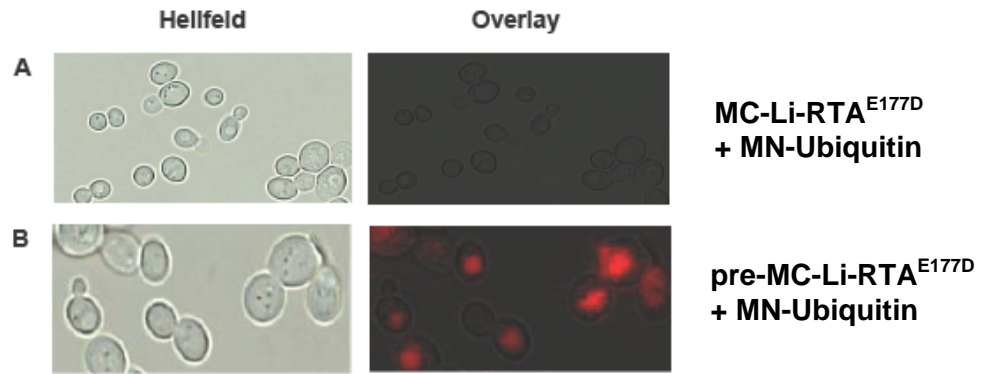


Abbildung 31: Visualisierung cotransformierter Hefezellen mittels Fluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung einer *in vivo* Wechselwirkung zwischen Ricin A und Ubiquitin. Dargestellt ist eine Hellfeldaufnahme sowie ein „Overlay“ der Hellfeld- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme. Die Zellen wurden mit einer Objektivvergrößerung von 50 x betrachtet und alle Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mit einer Belichtungszeit von 0,5 s.

6. Beteiligung ER-luminaler Chaperone an der Retrotranslokation der Ricin A Kette

Die primären Mediatoren der ER-Qualitätskontrolle sind molekulare ER-Chaperone, welche Polypeptide im Sekretionsweg nicht nur bei deren Faltung unterstützen, sondern auch deren Konformation kontrollieren. Sobald ein Polypeptid seine native Konformation erhält, kann es zu seinem endgültigen Wirkort geleitet werden; erfolgt die Faltung nicht korrekt, so wird das Polypeptid entweder erneut in einen Faltungszyklus eingeleitet oder zur ER-assoziierten Degradation markiert (McCracken und Brodsky, 1996). Da aberrante Proteine hydrophobe Regionen und freie Cysteinreste exponieren und zur Aggregation neigen, spielen molekulare Chaperone eine Schlüsselrolle bei der ER-Qualitätskontrolle. Sie erkennen fehlgefaltete sowie aggregierte Proteine (Fewell et al., 2001). Das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums beherbergt drei Gruppen von molekularen Chaperonen/Faltungsenzymen: Hsp70-Chaperone und deren Cochaperone (Hsp40), Lektin-Chaperone und Oxidoreduktasen der PDI

(„protein disulfide isomerase“-)Familie (Nishikawa et al., 2005). Die meisten dieser Proteine interagieren mit der translozierenden, naszierenden Polypeptidkette direkt nach deren Eintritt in das ER-Lumen und erleichtern die Proteinfaltung, Oligomerisierung, Reifung und das Anfügen posttranslationaler Modifikationen, wie Glykosylierung und Disulfidbrücken-Bildung (Fewell et al., 2001; Trombetta und Parodi, 2003). Die ER-Chaperone entlassen ihre Substrate, sobald diese ihre native Konformation einnehmen. Falls es zu einer Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen im ER-Lumen kommt, binden die Chaperone vermehrt an die akkumulierten Substrate, was zu einer Abnahme der freien Chaperon-Konzentration im ER-Lumen führt. Um mit dem daraus resultierenden ER-Stress zurecht zu kommen, lösen die Zellen die „unfolded protein response“ (UPR) aus. Die UPR induziert die Aktivierung eines bestimmten Signalweges, der zu einer erhöhten Produktion von molekularen Chaperonen führt, die an der Proteinfaltung beteiligt sind, und schwächt außerdem die zelleigene Proteintranslation, um die Menge an neu in das ER-Lumen importierten Proteinen zu reduzieren (Kaufmann et al., 2002). Bleibt dieser Mechanismus jedoch ohne Erfolg, so werden die fehlgefalteten Proteine mit Hilfe der ER-assoziierten Degradation aus dem ER-Lumen entfernt (Brodsky und McCracken, 1997; Tsai et al., 2002; McCracken und Brodsky, 2003). Die Funktion der verschiedenen ER-Chaperone beim ERAD ist dabei verschieden. Lektin-Chaperone wie z.B. Calnexin und Calreticulin erkennen spezifisch N-gebundene Carbohydrat-Ketten auf Glykoproteinen. Diese Strukturen entstehen, wenn glykosylierte Proteine im ER nicht gefaltet werden beziehungsweise eine verzögerte Faltung aufweisen. Durch die Bindung von Calnexin oder Calreticulin an die Proteine werden diese im ER zurückgehalten und ihre Faltung unterstützt (Helenius und Aebi, 2004). Die Chaperone der Hsp70-Familie erkennen dagegen hydrophobe Regionen auf den Peptiden, die normalerweise nur im Inneren der nativen Proteine zu finden sind. Die Bindung und das Loslösen der fehlgefalteten Substrate ist ATP-abhängig (Bukau und Horwich, 1998). Eine wichtige Funktion der ER-Chaperone während der ER-assoziierten Degradation ist es, die

Aggregation fehlgefalteter Proteine im ER-Lumen zu unterdrücken, bevor diese retrotransloziert werden. Obwohl das Entfalten der Substrate keine Voraussetzung für die Retrotranslokation darstellt (Tirosh et al., 2003), verbleiben die ERAD-Substrate im ER-Lumen sobald sie aggregieren. Im Endoplasmatischen Retikulum der Hefe werden typische ERAD-Substrate wie die mutierte Form der Carboxypeptidase Y (CPY^{*}) durch das Hsp70-Chaperon Kar2p und seine beiden Hsp40 Co-Chaperone Scj1p und Jem1p in einer löslichen Konformation gehalten (Nishikawa et al., 2001). Durch *in vitro* Untersuchungen einer mutierten Form des α -Mating-Faktors (Δ Gp α F) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das Hefe-Chaperon Kar2p der nötig ist, um die Löslichkeit von Δ Gp α F zu erhalten (McCracken und Brodsky, 1996; Nishikawa et al., 2001), während der wildtypische pro- α -Faktor eine lösliche Konformation auch beibehält, wenn Kar2p inaktiviert wurde (Nishikawa et al., 2001). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass es zu einer Aggregation von CPY^{*} und Δ Gp α F bei erhöhten Temperaturen kommt und dadurch die Funktion von Kar2p und der beiden Co-Chaperone inaktiviert wird. Die Funktion von Kar2p ist hingegen für die Degradation von ERAD-Membranproteinen wie Ste6-166p oder Sec61-2p nicht ausschlaggebend (Nishikawa et al., 2001; Huyer et al., 2004). Auch das Säuger-Homolog BiP spielt eine wichtige Rolle bei der Erkennung fehlgefalteter Proteine und sorgt ebenfalls dafür, dass diese Proteine zum Abbau in einer löslichen Konformation bleiben und in den ERAD-„Pathway“ eingeleitet werden (Ellgaard und Helenius, 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Chaperonmutanten auf die *in vivo* Toxizität der Konstrukte K1- bzw. K28-RTA untersucht (Abbildung 32). Dazu wurden die Doppel-„Knock-out“-Mutante Δ scj1 Δ jem1 sowie eine Δ cne1-Mutante mit den verschiedenen RTA-Konstrukten transformiert und bezüglich ihres Phänotyps im Wachstumstest analysiert. Bei Deletion der beiden Hsp40-Co-chaperone Scj1p und Jem1p zeigte sich nach intrazellulärer Expression von K1- bzw. K28-RTA eine deutliche Sensitivität der transformierten Doppelmutante gegenüber RTA, während sich

Hefezellen mit einer Deletion im Calnexin-kodierenden *CNE1*-Gen resistent gegen RTA verhielten.

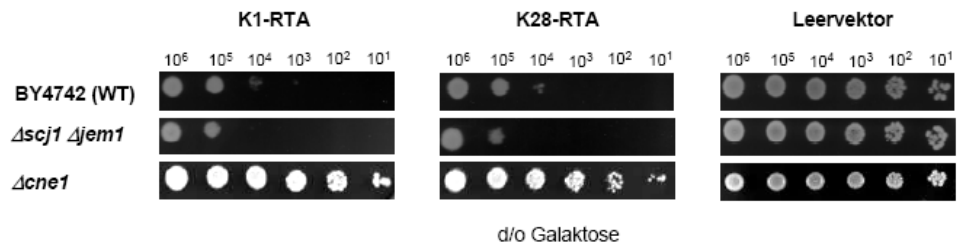


Abbildung 32: Untersuchung der *in vivo* Toxizität verschiedener RTA-Varianten in Hefedeletionsmutanten mit Defekten in ER-luminalen Chaperonen. Die Hefedeletionsmutante *Δcne1*, der entsprechende isogene Wildtyp BY4742 sowie die Doppel-„Knock-out“-Mutante *Δscj1Δjem1* und der isogene Wildtyp SEY6210 wurden mit K1- bzw. K28-RTA transformiert. Die Sensitivität der Transformanten wurde mittels Wachstumstest analysiert.

Da es sich bei dem Hsp70-Chaperon Kar2p um ein essentielles Protein handelt, steht hier keine „Knock-out“-Mutante zur Verfügung, da die Zellen sonst nicht lebensfähig sind. In dieser Arbeit wurden deshalb zwei Temperatur-sensitive Mutanten (*kar2-1* und *kar2-133*, Kabani et al. 2003) sowie der entsprechende Wildtyp (*KAR2*) eingesetzt. Im Gegensatz zu anderen *kar2*-Mutanten kommt es bei den verwendeten Mutanten *kar2-1* und *kar2-133* lediglich zu einer Beeinträchtigung der ERAD-Effizienz, während die Proteintranslokation beim ER-Import nicht betroffen ist (Kabani et al., 2003), was darauf schließen lässt, dass die Rolle von Kar2p bei der Proteintranslokation sowie der Retrotranslokation verschieden ist (Brodsky et al., 1999). Die permissive Temperatur der mutanten Kar2p-Varianten liegt bei 30° C, wohingegen die restriktive Temperatur bei 15° C liegt. Aufgrund der Tatsache, dass die getesteten temperatursensitiven *kar2*-Mutanten bereits nach Transformation und Expression des Leervektors pRS316.PT einen starken Wachstumsdefekt aufwiesen, konnte keine eindeutige Aussage über die Beteiligung von Kar2p getroffen werden.

7. Ricin-Phänotyp ausgewählter Deletionsmutanten mit Defekten in ribosomalen Untereinheiten

Das Pflanzentoxin Ricin zählt zu den Ribosomen-inaktivierenden Proteinen der Klasse II (RIP II) und führt zu einer irreversiblen Schädigung der Ribosomen, indem es einen spezifischen Adenin-Rest von der rRNA der großen ribosomalen Untereinheit entfernt (Lord und Roberts, 2004). Dieser Adenin-Rest liegt innerhalb eines hochkonservierten Bereiches, der als α -Sarcin/Ricin-Loop (SRL) bezeichnet wird (Wool et al., 1992). In diesem Loop interagieren die Elongationsfaktoren mit dem Ribosom während der Proteinbiosynthese (Moazed et al., 1988). Es ist sehr wenig darüber bekannt, wie die Ricin A Kette mit den Ribosomen in Interaktion tritt und welchen molekularen Mechanismus RTA nutzt, um die infizierten Zellen abzutöten. Auch die beiden bakteriellen Toxine Shiga-Toxin und Shiga-„like“-Toxin sowie das Pflanzentoxin „Pokeweed Antiviral Protein“ (PAP), das zu den Ribosomen-inaktivierenden Proteinen vom Typ I zählt, depurinieren rRNA an derselben Position im α -Sarcin/Ricin-Loop wie RTA (Endo et al., 1988a), wobei sich aber Unterschiede in der Spezifität für prokaryotische und eukaryotische Ribosomen zeigen. Während Ricin eukaryotische Ribosomen deutlich effizienter depuriniert wie prokaryotische Ribosomen, kann PAP beide Ribosomen-Typen gleichermaßen inaktivieren (Chiou et al., 2008). Ricin zeigt eine ca. 23.000-fach höhere Effizienz für Ribosomen der Rattenleber im Vergleich zu Ribosomen von Pflanzen, während die Ribosomen von Bakterien resistent gegenüber Ricin sind (Harley und Beevers, 1992). Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass die unterschiedliche Sensitivität verschiedener RIPs, die den gleichen Wirkort besitzen, auf Unterschieden in ihrer Interaktion mit dem Ribosom zurückzuführen sind (Hudak et al., 1999; Chan et al., 2007; McCluskey et al., 2008).

Der „ribosomal stalk“ stellt eine flexible Struktur der großen Ribosomen-Untereinheit dar und spielt eine essentielle Rolle während der Proteintranslation, da er an der Interaktion der Ribosomen mit den Elongationsfaktoren beteiligt ist (Möller und Maassen, 1986).

Biochemische Untersuchungen zeigten, dass der ribosomale Fortsatz aus einem pentameren Komplex besteht, der aus einem rRNA-bindenden Protein besteht, L10 bei prokaryotischen Ribosomen und P0 bei eukaryotischen Ribosomen, sowie aus zwei heterodimeren Protein-Paaren L7/L12 (Bakterien) beziehungsweise P1/P2 (Eukaryoten) (Gonzalo und Reboud, 2003). In *Saccharomyces cerevisiae* wurden jeweils zwei Proteine des P1-Typs (P1 α und P1 β) und des P2-Typs (P2 α und P2 β) identifiziert (Newton et al., 1990). Der ribosomale Fortsatz in Hefen wird deshalb von dem Protein P0 sowie jeweils einer Kopie der Proteine P1 α , P1 β , P2 α und P2 β gebildet (Guarinos et al., 2003), welche wiederum zu zwei Heterodimeren, P1 α /P2 β und P1 β /P2 α , assoziiert sind (Guarinos et al., 2001; Tchorzewski, 2003). Für das RIP I „Pokeweed Antiviral Protein“ konnte bereits nachgewiesen werden, dass es mit dem ribosomalen Protein L3 interagiert, um den spezifischen Adenin-Rest im α -Sarcin/Ricin-Loop zu depurinieren, und dass dieses Protein eine kritische Rolle für die Toxizität von PAP spielt (Hudak et al., 1999). Um zu untersuchen, ob die Proteine des ribosomalen Fortsatzes der Hefe, eine entscheidende Komponente für die Toxizität von RTA darstellen, wurden die Hefedeletionsmutanten $\Delta rpp1A$ (P1 α), $\Delta rpp1B$ (P1 β), $\Delta rpp2A$ (P2 α) und $\Delta rpp2B$ (P2 β) mit den Konstrukten K1- bzw. K28-RTA transformiert und im Toxizitätstest bezüglich ihres Phänotyps untersucht. Als Negativkontrollen wurden die jeweils mit dem Leervektor pRS316.PT transformierten Hefedeletionsmutanten mitgeführt. Wie aus Abbildung 33 zu erkennen ist, zeigten die entsprechenden Mutanten nach intrazellulärer RTA-Expression einen sensitiven Phänotyp, der im Vergleich zum isogenen Wildtyp fast noch stärker ausgeprägt war.

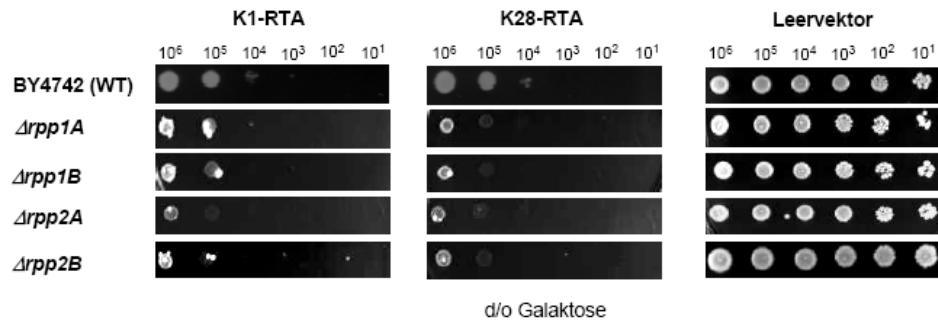


Abbildung 33: Untersuchung der *in vivo* Toxizität von verschiedenen RTA-Varianten in Hefedeletionsmutanten mit einem Defekt in einer Komponente des „ribosomal stalk“. Es wurden 1×10^7 Hefezellen in 50 μ l d/o Raffinose-Medium aufgenommen und jeweils eine Verdünnungsreihe (10^6 bis 10^2 Zellen) hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 5 μ l auf eine d/o Galaktose-Platte (induzierende Bedingungen) aufgetropft und die Platten wurden 5 Tage bei 30° C inkubiert.

Die ribosomale Region, die an der Hydrolyse des an den Elongationsfaktor 2 (EF2) gebundenen GTP-Moleküls bei der Interaktion von EF2 mit dem Ribosom während der Translation beteiligt ist, wird als sogenannte ribosomale GTPase-Domäne bezeichnet (Briones et al., 1998). Diese Domäne wird zum größten Teil von dem Protein L12 (früher L15) gebildet. In der Hefe *S. cerevisiae* wird dieses Protein von einem duplizierten Gen, *RPL12A* und *RPL12B*, kodiert (Pucciarelli et al., 1990). Das zu dem Protein L12 homologe Protein L11 in Bakterien ist für die Lebensfähigkeit der Bakterien ebenfalls verzichtbar (Cundliffe et al., 1979), doch trotzdem gibt es entscheidende Unterschiede zwischen L11 und L12 bezüglich der Rolle, die die Proteine für die Stabilität des ribosomalen Fortsatzes spielen. So enthalten bakterielle Mutanten, denen das Protein L11 fehlt, weiterhin einen gewissen Standard an den „Stalk“-Proteinen L7/12 (Stöffler et al., 1980), während die L12-defizienten Hefestämme lediglich zwei der vier 12 kDa großen „Stalk“-Proteine enthalten, jedoch kein Protein P1 α und P2 β . Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Protein L12 entweder direkt oder indirekt in die Interaktion dieser ribosomalen Proteine mit dem eukaryotischen Ribosom verwickelt ist (Briones et al., 1998). Eine direkte Interaktion der Proteine

P1/P2 des Ribosoms mit dem Protein L12 konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden, obwohl bereits gezeigt werden konnte, dass die entsprechenden Proteine in Lösung assoziieren (Saenz-Robles et al., 1988). Um zu untersuchen, ob das Hauptprotein der GTPase-Domäne eine Rolle für die Toxizität von RTA spielt, wurde eine $\Delta rpl12B$ „Knock-out“ Mutante, bei der eine Kopie des L12-Gens zerstört war, mit verschiedenen RTA-Konstrukten transformiert und im Wachstumstest bezüglich ihres Phänotyps untersucht. Als Negativkontrollen wurde die mit dem Leervektor pRS316.PT transformierte Hefedeletionsmutante mitgeführt. Die entsprechenden Transformanten zeigten unter induzierenden Kulturbedingungen eine vollständige Resistenz gegen RTA (Abbildung 34).

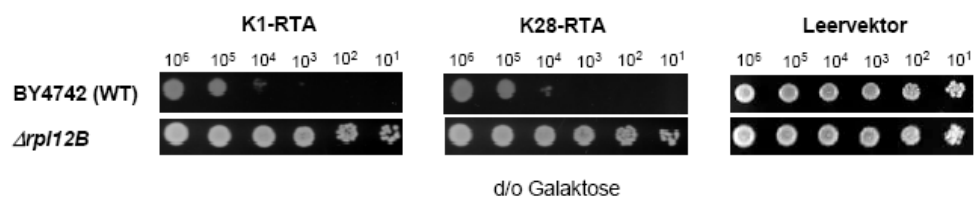


Abbildung 34: Untersuchung der *in vivo* Toxizität von verschiedenen RTA-Varianten in einer Hefedeletionsmutante mit Defekt im Protein L12 der ribosomalen GTPase-Domäne. Es wurden 1×10^7 Hefezellen in 50 μ l d/o Raffinose-Medium aufgenommen und jeweils eine Verdünnungsreihe (10^6 bis 10^2 Zellen) hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden je 5 μ l auf eine d/o Galaktose-Platte (induzierende Bedingungen) aufgetropft und die Platten wurden 5 Tage bei 30° C inkubiert.

Teil B: Entwicklung eines genetischen Screens zur Identifizierung zellulärer Proteine, die an der Retrotranslokation von Ricin A beteiligt sind

Mit Hilfe der durchgeführten Wachstumstests war es möglich, eine Reihe von zellulären Komponenten zu identifizieren, die für die ER/Cytosol Dislokation von Ricin A eine entscheidende Rolle spielen. Da diese Methode vergleichsweise arbeits- und zeitaufwendig ist, bestand ein weiteres Anliegen dieser Arbeit darin, eine „Screening“-Methode zu etablieren, mit der es möglich war, effektiv und in relativ kurzer Zeit eine Vielzahl von Hefe-„Knock-out“-Mutanten auf Sensitivität gegen RTA zu untersuchen und somit weitere Komponenten zu identifizieren, die für den intrazellulären Transport und die *in vivo* Toxizität von RTA eine Rolle spielen. Als indirektes Maß für das Wachstum beziehungsweise die Überlebensrate der Hefezellen nach intrazellulärer Expression von RTA sollte die *in vivo* Translation des Reporterproteins GFP („green fluorescent protein“) dienen, indem die GFP-Fluoreszenz mit Hilfe eines Fluoreszenz-„Readers“ gemessen wurde. Dabei sollte GFP zusammen mit einem RTA-Konstrukt in die Hefe zu transformiert werden. Beide Konstrukte liegen dabei in einem Zentromer-Vektor mit jeweils unterschiedlichen Selektionsmarkern unter der Kontrolle eines Galaktose-induzierbaren *GAL 1*-Promotors vor. Durch die Zugabe von Galaktose in das Medium wird die Expression von GFP und RTA gleichzeitig induziert. Aus den bereits durchgeführten Toxizitätstests war bekannt, dass cytosolisch exprimiertes RTA, aber auch RTA-Varianten mit N-terminalem Signalpeptid, auf die Wildtyp-Hefe BY4742 eine toxische Wirkung besitzen (siehe Teil A, Abbildung 2). Das heißt durch die Zugabe von Galaktose sollte die RTA-Expression induziert werden, was wiederum zu einer Hemmung der Translation von GFP führt. Dadurch sollte der GFP-Gehalt im Cytosol sehr niedrig sein, während eine nur mit GFP und dem Leervektor transformierte Hefe nach Induktion eine „normale“ GFP-Expression zeigt, was mit Hilfe eines Fluoreszenzmeßgerätes analysiert werden kann. Die Messung wurde in „96-well“ Mikrotiter-Platten durchgeführt. Bevor jedoch mit den eigentlichen Versuchen

begonnen werden konnte, mussten zunächst verschiedene Vorversuche durchgeführt werden, um optimale Voraussetzungen für die Messung zu finden. Die Messungen wurden deshalb unter verschiedenen Bedingungen ausgeführt, indem a) die GFP-Konstrukte, b) die optische Ausgangsdichte (OD_{600}), c) die Schüttelraten und d) die Galaktose-Konzentration variiert wurden.

Dabei wurde deutlich, dass das GFP-Konstrukt mit dem Sekretionssignal von K28 pptoX am N-Terminus im Vergleich zu einer cytosolisch exprimierten GFP-Variante deutlich höhere Fluoreszenzwerte im „Reader“ lieferte. Die eingesetzten Hefezellen zeigten bei einer OD_{600} von 10 die stärkste messbare Fluoreszenz im Fluorometer. Bei einer Erhöhung der Galaktose-Konzentration zur Induktion der GFP-Expression von 2% auf 4% konnte keine Veränderung der GFP-Fluoreszenz beobachtet werden. Auch das Variieren der Schüttelrate hatte keinen Einfluss auf die gemessenen Fluoreszenzwerte (Daten nicht gezeigt). Für alle weiteren Versuche wurde deshalb das SP(K28)-GFP-Konstrukt eingesetzt, wobei die eingesetzten Hefezellen zuvor auf eine OD_{600} von 10 eingestellt wurden. Die Messungen wurden bei einer Schüttelrate von 1020 rpm und 30° C durchgeführt. Zur Induktion der GFP- bzw. RTA-Expression wurden der Probe jeweils 2% sterilfiltrierte Galaktose zugegeben. In Abbildung 35 sind die zur Fluoreszenz-Messung eingesetzten RTA- und GFP-Plasmide nochmals schematisch dargestellt.

Als nächstes musste nun geklärt werden, ob durch die Hemmung der GFP-Proteinbiosynthese eine Abnahme der GFP-Fluoreszenz detektiert werden kann.

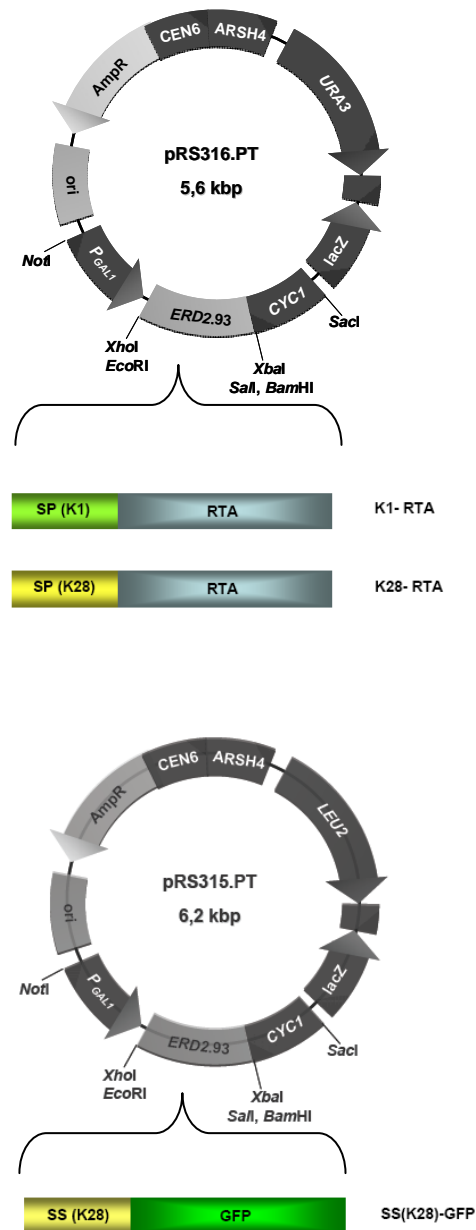


Abbildung 35: Schematische Darstellung der RTA- und GFP-Derivate zum Einsatz im Fluoreszenz „Reader“-System. Die RTA-Konstrukte wurden mit sequenzspezifischen Primern (siehe Material und Methoden, Tabelle 6) mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pRS316.PT einkloniert. Als 5'-Schnittstellen wurden die Sequenzen *XbaI/BamHI/EcoRI* bzw. *XhoI/EcoRI* anfusioniert, als 3'-Schnittstellen *NotI/SalI* (SP, Signalpeptid). Das GFP-Konstrukt wurde der Dissertation von Sendzig (2006) entnommen und über die Schnittstellen *EcoRI/SalI* in den Zentromervektor pRS315.PT einkloniert (Diplomarbeit Posaric, 2007).

1. Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) von G418 auf den Hefestamm BY4742

Mit Hilfe verschiedener Pharmazeutika ist es möglich, die Proteinbiosynthese verschiedener Organismen zu hemmen. Aminoglykosid-Antibiotika, die zur Gruppe der Oligosaccharid-Antibiotika zählen, wirken stark bakterizid durch Hemmung der Proteinbiosynthese auf proliferierende und ruhende Erreger, indem sie an die kleine Untereinheit der Ribosomen ankoppeln und Ablesefehler der mRNA verursachen. Dadurch werden fehlerhafte Proteine („Nonsense“-Proteine) gebildet, die vielfach nicht mehr funktionell sind. In der Konsequenz werden z.B. defekte Proteine in die Zytoplasmamembran des Bakteriums eingebaut, was zur Lyse des Erregers führt (Mutschler et al., 2001). Streptomycin war das erste Aminoglykosid-Antibiotikum, das bereits 1944 durch die Gruppe um Selman Waksman entdeckt wurde. Nachfolgend wurden viele ähnliche Wirkstoffe aus Actinomyceten vor allem der Gattungen *Streptomyces* und *Micromonospora* isoliert. Das Antibiotikum Geneticin (G418) gehört ebenfalls zur Gruppe der Aminoglykoside. Während viele Aminoglykoside ausschließlich prokaryotische 70S Ribosomen in verschiedenen Stadien der Translation inhibieren, wirkt Geneticin auch auf die Proteinbiosynthese in eukaryotischen Zellen (Bar-Nun et al., 1983) und findet deshalb keine therapeutische Anwendung. Sein wichtigstes Anwendungsgebiet ist die Zellbiologie, in welcher Geneticin zur Selektion von genetisch veränderten Zelllinien dient. Geneticin wurde erstmals 1974 aus dem *Micromonospora rhodorangea*-Stamm NRRL 5326 isoliert (Wagman et al., 1974). Um herauszufinden, ab welcher G418-Konzentration die Wildtyp-Hefe BY4742 kein Wachstum mehr zeigt, wurde zunächst die minimale Hemmstoffkonzentration des *S. cerevisiae* Stammes BY4742 für das Antibiotikum G418 bestimmt. Panchal et al. (1984) untersuchten den *S. cerevisiae* Stamm 1434 (RH218) bezüglich dessen Resistenz gegen G418. Dabei fanden sie heraus, dass die Hefen bei G418-Konzentrationen von 150-500 µg/ml sehr anfällig für das Antibiotikum waren und einen Wachstumsdefekt aufwiesen (Panchal et al., 1984). Die Hefezellen BY4742 wurden

zunächst ü. N. in YPD-Medium angezogen. 1 ml der Zellen wurde geerntet, das Pellet in Aqua dest. gewaschen und schließlich in 1 ml synthetischem Medium resuspendiert. Danach wurden jeweils 5 ml synthetisches Medium mit je 100 µl Kultur beimpft und G418 in folgenden Endkonzentrationen zugegeben: 10, 50, 100, 250, 500, 750 und 1000 µg/ml. Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne G418 mitgeführt. Die Zellen wurden 2 Tage bei 30° C im Schüttler inkubiert und anschließend auf Wachstum untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 36 dargestellt.

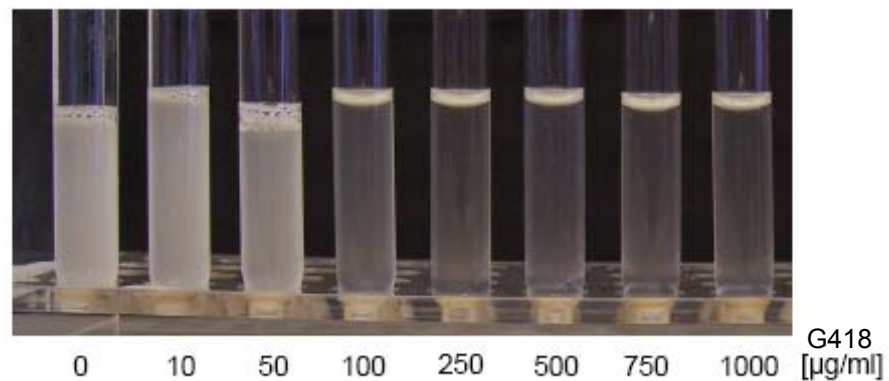


Abbildung 36: Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration der Wildtyp-Hefe BY4742 gegen Geneticin (G418). Die Hefezellen wurden ü. N. in YPD-Medium angezogen, gewaschen und in synthetisches Medium überführt. 100 µl Kultur wurden jeweils in 5 ml synthetisches Medium überführt und eine G418-Endkonzentration von 10, 50, 100, 250, 500, 750 und 1000 µg/ml eingestellt. Außerdem wurde eine Probe ohne Geneticin als Negativkontrolle mitgeführt.

Die Hefezellen zeigten bis zu einer G418-Konzentration von 50 µg/ml ein der Kontrolle vergleichbares Wachstum. Ab einer Antibiotikum-Konzentration von 100 µg/ml war kein Zellwachstum mehr zu erkennen. Diese Konzentration sollte somit ausreichen, um die Translation der Wildtyp-Hefe BY4742 zu hemmen.

2. Untersuchung zur Hemmung der GFP-Translation in Hefen durch das Antibiotikum Geneticin (G418)

Als nächstes wurde untersucht, ob durch Zugabe von Geneticin zu GFP-exprimierenden Hefezellen, die Translation des Reporterproteins gehemmt werden kann. Die daraus resultierende Abnahme an intrazellulärem GFP sollte als Abnahme der GFP-Fluoreszenz mit Hilfe eines Fluoreszenzmessgerätes detektiert werden. Das Antibiotikum übernimmt in diesem Versuch als Proteinsynthese-Hemmer die Rolle der Ricin A Kette, die ebenfalls zu einer Hemmung der Proteintranslation führt. Durch die zuvor durchgeführten Versuche wurde eine minimale Hemmstoffkonzentration von 100 µg/ml für die Hefe BY4742 ermittelt. Zur Messung im Fluoreszenz-„Reader“ wurden die transformierten Hefen jedoch noch einmal mit verschiedenen G418-Konzentrationen inkubiert und danach zur Messung eingesetzt. Zur Versuchsdurchführung wurden 50 ml leu d/o Raffinose Medium mit 5 ml einer frischen ü. N.-Kultur der mit SP(k28)-GFP transformierten Hefe BY4742 beimpft und über Nacht bei 30° C auf einem Rundschüttler inkubiert. Mindestens drei verschiedene Transformanten wurden in leu d/o Raffinose Medium angezogen und zur Messung eingesetzt. Die OD₆₀₀ der Hefekultur wurde entsprechend eingestellt und die entsprechende Menge an Zellen geerntet (8000 rpm, 10 min) und das Pellet in leu d/o Raffinose Medium resuspendiert. Zur Anzucht der Hefen wurde Raffinose als Kohlenstoffquelle ausgewählt, um eine Katabolitrepression zu vermeiden, die beim „Shiften“ der Zellen von Glukose auf Galaktose auftritt. Zur Messung wurden 200 µl Probe in eine Vertiefung der „96-Well“ Platte gegeben. Dabei wurden je Probe drei Parallelwerte gemessen, von denen dann ein Mittelwert gebildet wurde. Durch Zugabe von 2% Galaktose wurde die Expression von GFP induziert. Die Platte wurde zur Messung in das Fluorometer eingestellt und bei 30° C und 1020 rpm für mindestens 20 h inkubiert und die Fluoreszenz abgeleitet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 37 zusammengefasst.

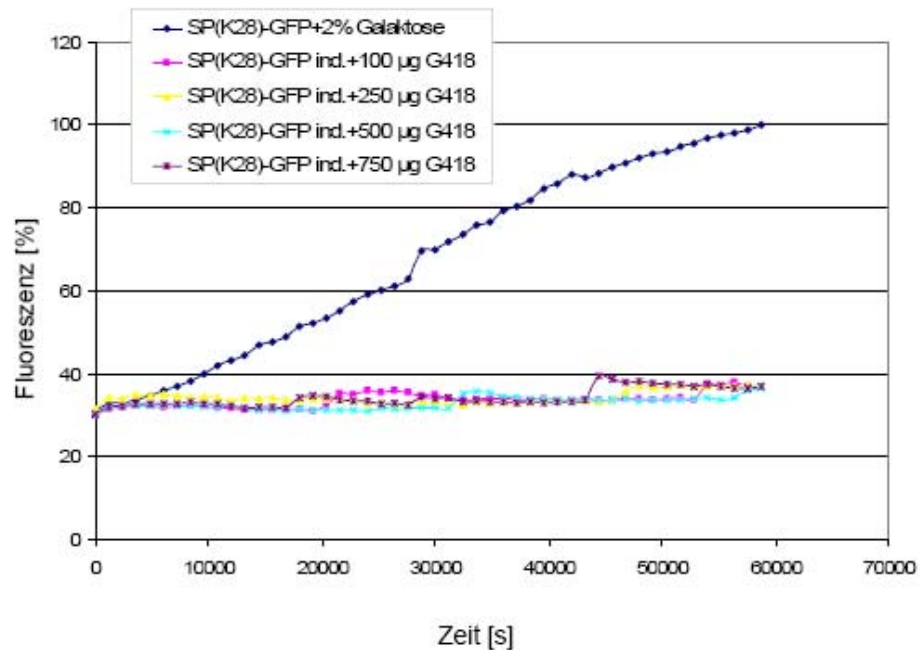


Abbildung 37: Untersuchung des Einflusses von Geneticin (G418) auf die Translation von GFP in der Hefe BY4742. Die Wildtyp-Hefe BY4742 wurde mit SP(K28)-GFP transformiert und die Zellen wurden auf eine OD_{600} von 10 eingestellt und zur Messung eingesetzt. Die Expression von GFP wurde durch Zugabe von 2% Galaktose in das Medium induziert. Außerdem wurde das Antibiotikum G418 in verschiedenen Konzentrationen (100, 250, 500, 750 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt und die Proben im Anschluss bei 1020 rpm und 30° C im Fluorometer ausgewertet. Als Kontrolle wurde eine induzierte Probe ohne G418 mitgeführt.

Die transformierten Hefezellen, die kein Antibiotikum im Medium enthielten, zeigten nach Zugabe von Galaktose (induzierende Bedingungen) einen signifikanten Anstieg in der Fluoreszenz (blaue Kurve), während die mit G418 behandelten Proben nach Induktion keine Zunahme der Fluoreszenz erkennen ließen (alle anderen Kurven). Es wurde erneut bestätigt, dass eine Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin ausreicht, um die Proteinbiosynthese von GFP zu inhibieren. Alle weiteren eingesetzten G418-Konzentrationen hatten die gleiche translationshemmende Wirkung auf die Zellen. Dieses Ergebnis machte deutlich, dass die durch die Hemmung der Translation bedingte Abnahme der intrazellulären GFP-Fluoreszenz mit Hilfe des

Fluoreszenz-„Reader“-Systems detektiert werden kann. Somit war dieses System prinzipiell geeignet, um die toxische Wirkung von RTA zu untersuchen, indem die GFP-Fluoreszenz als indirektes Maß für das Wachstum und die Überlebensrate der Hefen gemessen wurde.

3. Einfluss von Ricin A auf die Translation von GFP

Im nächsten Schritt wurde die Wildtyp-Hefe BY4742 mit GFP und einem RTA-Konstrukt cotransformiert. Dabei wurden zum einen die wildtypischen RTA-Varianten eingesetzt und zum anderen die RTA^{E177D}-Derivate, deren Toxizität ungefähr 50-fach reduziert war gegenüber WT-RTA. Die bereits zuvor durchgeführten Sensitivitätstests zeigten, dass die wildtypischen RTA-Varianten eine signifikant stärkere *in vivo* Toxizität auf Hefezellen ausüben als die mutierten RTA^{E177D}-Konstrukte (siehe Teil A, Abbildung 2). Es war somit zu erwarten, dass auch mit Hilfe des Fluoreszenz-„Reader“ Systems ein Unterschied zwischen beiden RTA-Formen bezüglich ihrer cytotoxischen Wirkung auf die mit GFP transformierten Hefezellen zu erkennen ist. Zur Versuchsdurchführung wurden 50 ml ura leu d/o Raffinose Medium mit 5 ml einer frischen ü. N.-Kultur der mit GFP und RTA cotransformierten Hefe BY4742 beimpft und über Nacht bei 30° C auf einem Rundschtüttler inkubiert. Mindestens drei verschiedene Transformanten wurden in ura leu d/o Raffinose Medium angezogen und dann zur Messung eingesetzt. Die OD₆₀₀ der Hefekultur wurde entsprechend eingestellt und die entsprechende Menge an Zellen geerntet (8000 rpm, 10 min) und das Pellet in ura leu d/o Raffinose Medium resuspendiert. Zur Messung wurden 200 µl der Probe in eine Vertiefung der „96-Well“ Platte gegeben. Dabei wurden je Probe drei Parallelwerte gemessen, von denen dann ein Mittelwert gebildet wurde. Durch Zugabe von 2% Galaktose wurde die Expression von GFP und RTA induziert. Die Platte wurde zur Messung in das Fluorometer eingestellt und bei 30° C und 1020 rpm für mindestens 20 h inkubiert und die Fluoreszenz abgeleitet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 38 zusammengefasst.

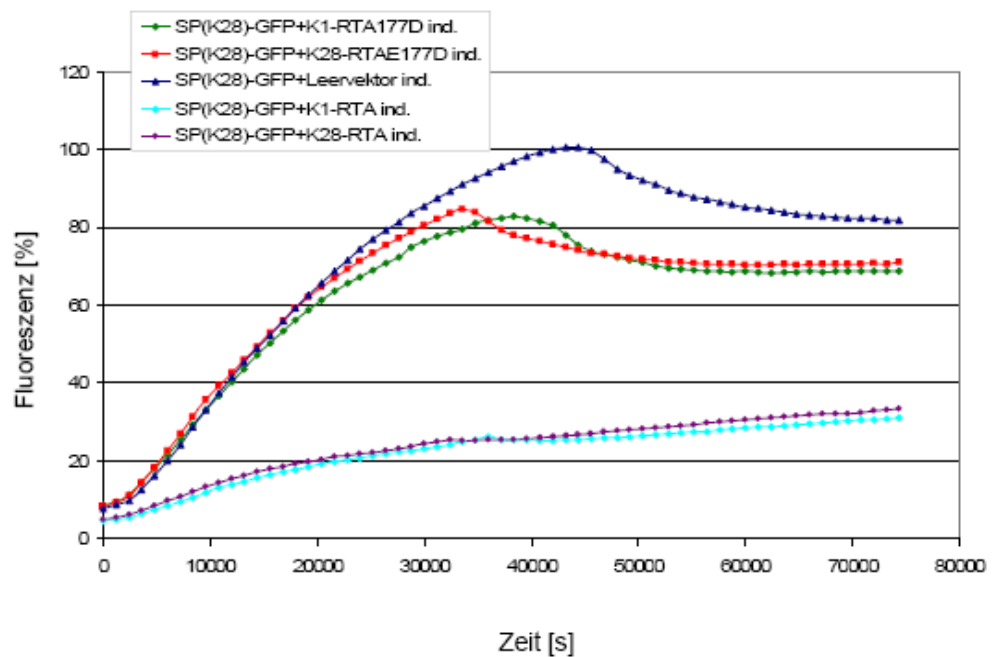


Abbildung 38: Untersuchung des Einflusses der Ricin A Kette auf die Proteinsynthese von GFP in der Hefe BY4742. Die mit den angegebenen Expressionsvektoren cotransformierten Hefezellen wurden ü.N. in *ura leu d/o* Raffinose Medium kultiviert, auf eine OD_{600} von 10 eingestellt und zur Fluoreszenzmessung eingesetzt. Die Induktion der GFP- bzw. RTA-Expression erfolgte durch Zugabe von 2% Galaktose zum Zeitpunkt „0“. Die Messung erfolgte bei 1020 rpm und 30° C. Als Negativkontrolle wurde eine mit GFP und dem Leervektor pRS316.PT cotransformierte Hefe mitgeführt.

Es ist zu erkennen, dass lediglich die mit dem Leervektor cotransformierten Hefen den stärksten Anstieg in der Fluoreszenz zeigten (blaue Kurve), während die mit den mutierten RTA-Varianten K1- bzw. K28-RTA^{E177D} transformierten Hefen einen Anstieg in der GFP-Fluoreszenz bis zu 80% der Negativkontrolle erkennen ließen (rote und grüne Kurve). Bei den mit den Wildtyp-RTA-Derivaten K1- bzw. K28-RTA transformierten Hefezellen war lediglich ein Anstieg der Fluoreszenz auf maximal 30% zu sehen. Dabei fiel auf, dass die Kurven der beiden eingesetzten RTA-Varianten einen ähnlichen Verlauf zeigten und kein Unterschied im Hinblick auf das verwendete Signalpeptid zu erkennen war. Aus den Diagrammen ist zu schließen, dass die

Expression von wildtypischem RTA eine stärkere Hemmung der Translation von GFP zur Folge hat als die Expression der abgeschwächten RTA^{E177D}-Derivate. Dadurch konnten die Ergebnisse der Toxizitätstests zur Untersuchung der *in vivo* Expression der verschiedenen RTA-Varianten bestätigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe dieses Fluoreszenz-Testsystems eine Aussage über die Cytotoxizität von RTA auf Hefezellen getroffen werden kann. Zur weiteren Bestätigung des Messsystems wurden im folgenden verschiedene Hefe-Deletionsmutanten im Fluorometer untersucht, bei welchen bereits zuvor in Sensitivitätstests ein sensitiver beziehungsweise resistenter Phänotyp nach intrazellulärer RTA-Expression detektiert werden konnte.

4. Cotransformation ausgewählter Hefe-Deletionsmutanten zur Untersuchung der *in vivo* Toxizität von RTA mit Hilfe des Fluoreszenz- „Reader“-Systems

Im ersten Teil dieser Arbeit konnten bereits verschiedene intrazelluläre Proteine identifiziert werden, die bei der Retrotranslokation beziehungsweise für die *in vivo* Toxizität von RTA eine Rolle zu spielen scheinen. Zur Bestätigung der bereits erhaltenen Ergebnisse wurden die Hefe-Deletionsmutanten $\Delta hrd1$, $\Delta der1$ und $\Delta rpl12B$, die im Sensitivitätstest einen resistenten Phänotyp gegen RTA zeigten (siehe Teil A, Abbildung 16 und 34), erneut im Fluoreszenz-„Reader“-System überprüft. Des Weiteren wurde die Mutante $\Delta yos9$, welche die intrazelluläre Expression von RTA nicht tolerierte, ebenfalls im Fluorometer untersucht. Die oben genannten Deletionsmutanten wurden mit SP(K28)-GFP und einem entsprechenden RTA-Konstrukt cotransformiert und zur Messung eingesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 39 und 40 dargestellt. Es wurde deutlich, dass die gemessenen Fluoreszenzwerte in den untersuchten Deletionsmutanten $\Delta hrd1$, $\Delta der1$ und $\Delta rpl12B$ im Vergleich zum Wildtyp BY4742 signifikant höher lagen. Lediglich die $\Delta yos9$ -Mutante zeigte einen ähnlichen Kurvenverlauf wie der entsprechende isogene Wildtyp. Nachdem die

Expression von RTA und GFP durch Zugabe von Galaktose induziert worden war, kam es bei der $\Delta hrd1$ - und $\Delta der1$ -Nullmutante zu einem Anstieg der Fluoreszenz bis zu 70%, während bei der ribosomalen Mutante $\Delta rpl12B$ sogar eine Zunahme der Fluoreszenz bis auf 80% zu verzeichnen war. Sowohl bei der Wildtyp-Hefe BY4742 als auch bei der $\Delta yos9$ -Mutante konnte ein Anstieg der Fluoreszenz bis auf 35% gemessen werden. Es wurde deutlich, dass die GFP-Translation in diesen beiden Hefen stärker gehemmt wurde als in den übrigen Deletionsmutanten. Dadurch konnte erneut bestätigt werden, dass die Proteine Hrd1p, Der1p und Rpl12B scheinbar eine entscheidende Rolle für die *in vivo* Toxizität von RTA spielen. Außerdem konnte ein Messsystem etabliert werden, mit dem nunmehr möglich ist, einen Gen-„Knock-out“-Pool der Hefe in relativ kurzer Zeit und sehr effektiv zu „screenen“, um weitere intrazelluläre Komponenten zu identifizieren, die an Transport, Retrotranslokation und/oder *in vivo* Toxizität von RTA beteiligt sind.

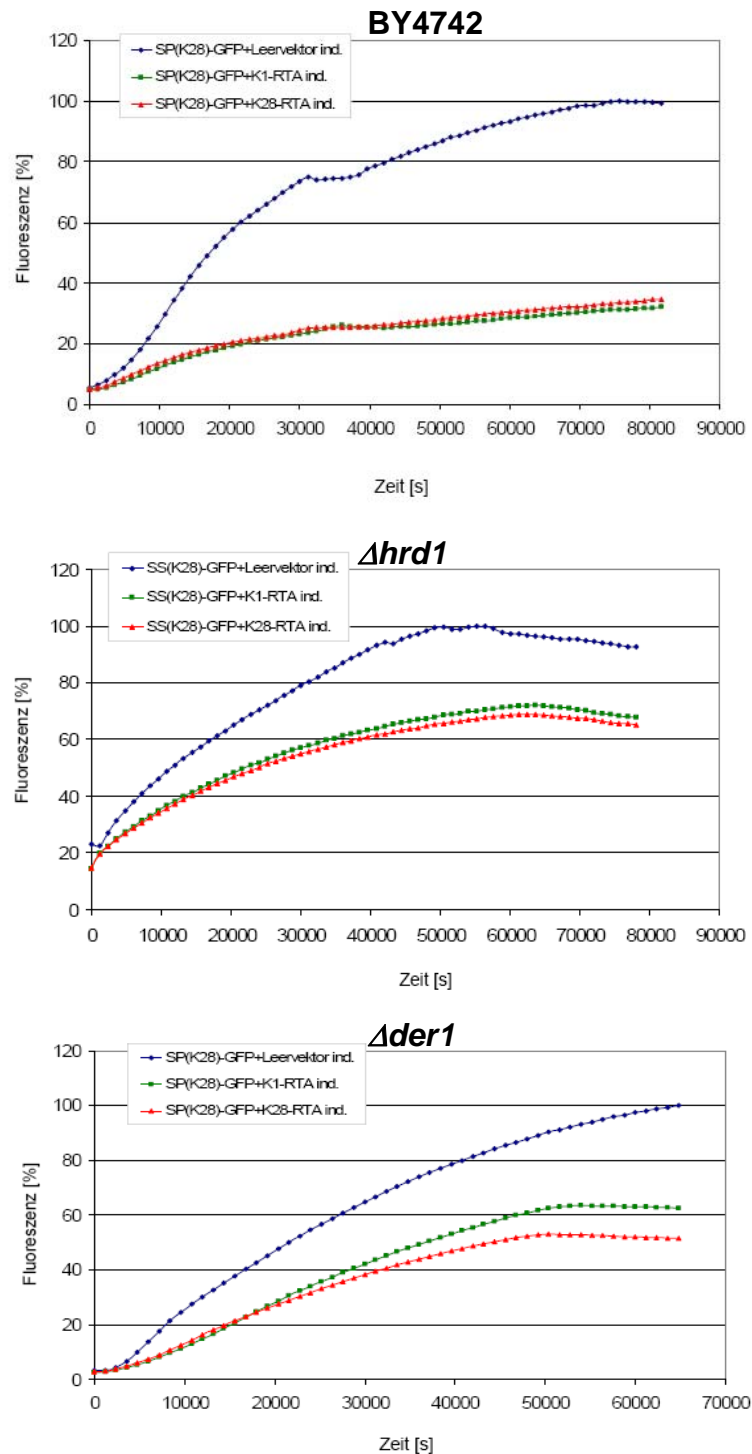


Abbildung 39: Analyse verschiedener Hefe-Deletionsmutanten im Fluoreszenz „Reader“-System. Die Hefe-Deletionsmutanten $\Delta hrd1$ und $\Delta der1$ sowie der entsprechende Wildtyp BY4742 wurden mit SP(K28)-GFP und K1- bzw. K28-RTA cotransformiert. Nach Einstellen der OD_{600} auf 10 wurden die Zellen geerntet und in *ura leu* Raffinose Medium resuspendiert. Es wurden jeweils 200 μ l jeder Probe in ein „Well“ pipettiert und die Expression von RTA und GFP durch Zugabe von 2% Galaktose zum Medium induziert. Die Messung erfolgte im Fluorometer bei 1020 rpm und 30° C. Als Negativkontrolle wurden jeweils Hefen mitgeführt, die mit GFP und dem Leervektor pRS316.PT transformiert waren.

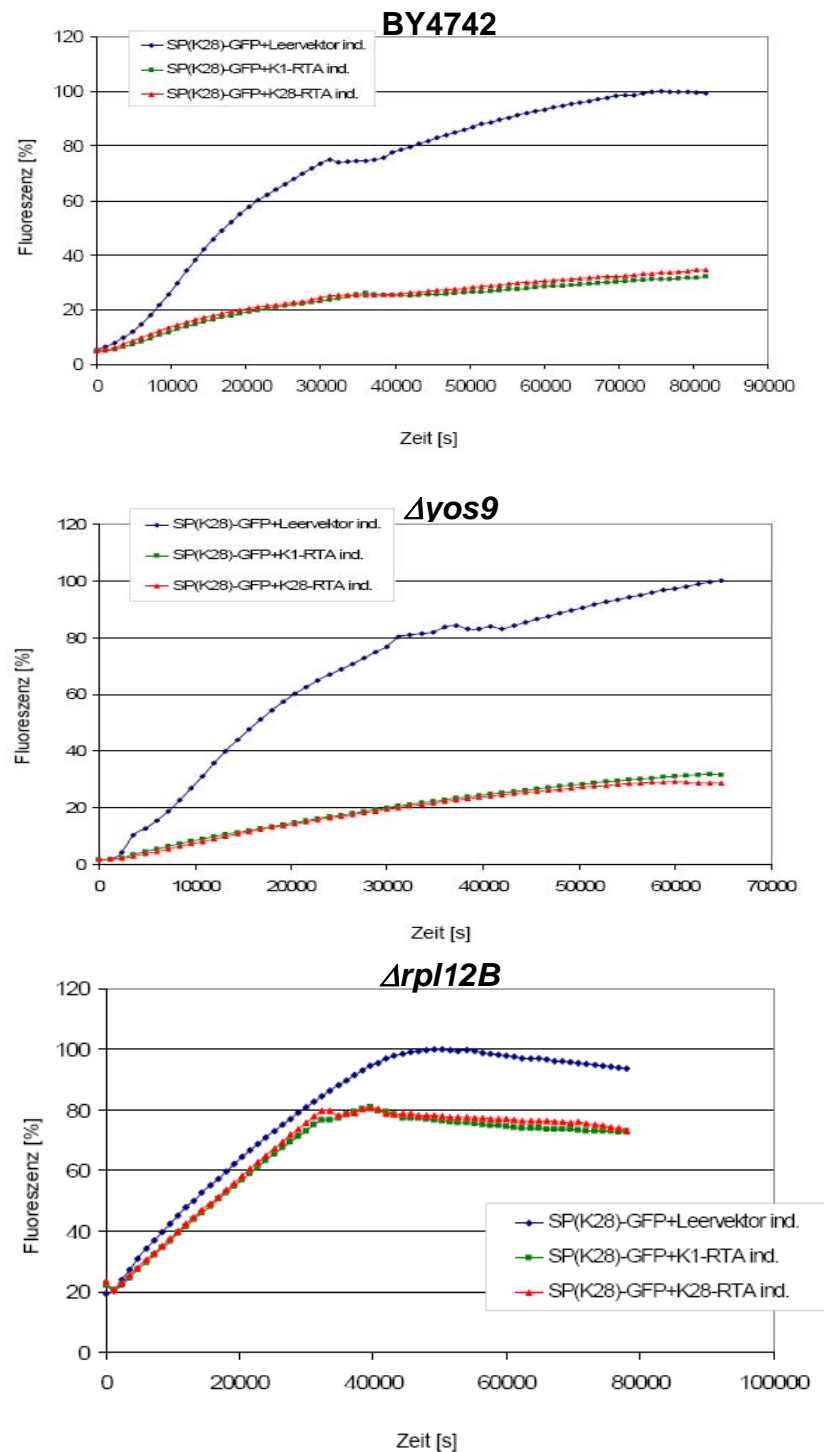


Abbildung 40: Analyse verschiedener Hefe-Deletionsmutanten im Fluoreszenz „Reader“-System. Die Hefe-Deletionsmutanten $\Delta yos9$ und $\Delta rpl12B$ sowie der entsprechende Wildtyp BY4742 wurden mit SP(K28)-GFP und K1- bzw. K28-RTA cotransformiert. Nach Einstellen der OD_{600} auf 10 wurden die Zellen gerntet und in *ura leu* Raffinose Medium resuspendiert. Es wurden jeweils 200 μ l jeder Probe in ein „Well“ pipettiert und die Expression von RTA und GFP durch Zugabe von 2% Galaktose zum Medium induziert. Die Messung erfolgte im Fluorometer bei 1020 rpm und 30° C. Als Negativkontrolle wurden jeweils Hefen mitgeführt, die mit GFP und dem Leervektor pRS316.PT transformiert waren.

IV Diskussion

Pflanzen und Bakterien produzieren eine Vielzahl von Proteintoxinen, die ihre toxische Wirkung auf cytosolische Komponenten in Säugerzellen ausüben. Dazu zählt auch die Gruppe der sogenannten A/B-Toxine. Diese Toxine bestehen aus einer katalytischen A-Kette, welche die Toxizität vermittelt, sowie aus einer oder mehreren B-Ketten, die für die Zellbindung und den Eintritt des Toxins in die Zielzelle verantwortlich sind (Hazes und Read, 1997). Toxine wie Ricin, Shiga Toxin, Shiga-„like“-Toxin oder Cholera Toxin gehören zu der Gruppe von A/B-Toxinen, die nach endozytotischer Aufnahme in die Zelle zum Golgi-Apparat gelangen und von dort aus das Endoplasmatische Retikulum erreichen (Joseph et al., 1978; Lendaro et al., 1994). Das Cholera Toxin kann mit Hilfe seines C-terminalen ER-Retentionssignals KDEL zum ER gelangen (Cieplak et al., 1995), während weiterhin ungeklärt ist, wie Toxine ohne ein solches Retentionssignal das ER erreichen können. Im Endoplasmatischen Retikulum kommt es unter Mitwirkung von ER-luminalen Chaperonen zur Reduktion Toxin-interner Disulfidbrücken, um die katalytisch aktiven A-Ketten somit für den Transport über die ER-Membran kompetent zu machen. Dabei scheint der Sec61-Komplex an der Dislokation einiger Toxine aus dem ER in das Cytosol beteiligt zu sein. Sowohl die Ricin A Kette als auch das Cholera Toxin konnten mit dem Sec61-Komplex in Säugerzellen co-immunopräzipitiert werden (Wesche et al., 1999; Koopmann et al., 2000) und der ER-Export von RTA über den Sec61-Komplex konnte auch in der Hefe *S. cerevisiae* biochemisch gezeigt werden (Simpson et al., 1999). Der Sec61-Kanal ist nicht nur am ER-Import neu synthetisierter Proteine in das ER beteiligt (Rapoport et al., 1996), sondern auch an der Retrotranslokation fehlgefalteter ER-Proteine in das Cytosol (Tsai und Rapoport, 2002). Die Retrotranslokation ist Teil der ER-assoziierten Degradation (ERAD), bei der die fehlgefalteten Proteine im ER erkannt und schließlich zur proteasomalen Degradation in das Cytosol transportiert werden

(Sommer und Wolf, 1997). Dadurch entstand die Hypothese, dass einige Toxine den zellulären Prozess der ER-assoziierten Degradation ausnutzen, um die ER-Membran zu translozieren. Mit Hilfe von Hefe-Mutanten, die einen Defekt in einer bestimmten ERAD-Komponente aufwiesen, konnten Simpson et al. (1999) zeigen, dass RTA, welches mittels eines anfusionierten ER-Importsignals in das Hefe-ER dirigiert wurde, den Weg der ER-assoziierten Degradation ausnutzt, um aus dem ER in das Hefe-Cytosol zu gelangen. Weiterhin konnte in Protoplasten der Tabakpflanze, in denen RTA durch ein angefügtes ER-Importsignal in das ER-Lumen dirigiert wurde sowie für das A-Fragment des Cholera Toxins, welches in ER-Mikrosomen eingebaut wurde, gezeigt werden, dass beide Toxine den ERAD-Weg nutzen, um in das Cytosol zu translozieren (Frigerio et al., 1998; Schmitz et al., 2000). Auch Studien mit einer dominant negativen Form des Gens *CDC48* aus *Arabidopsis thaliana* in Protoplasten der Tabakpflanze lieferten den Beweis, dass *CDC48* am ER-Export von RTA und *Ricinus communis* Agglutinin beteiligt ist. Diese AAA-ATPase spielt eine Rolle bei der ER-assoziierten Degradation der meisten ERAD-Substrate in Hefen und Säugern (Marshall et al., 2008). In einer aktuellen Studie konnten Li et al. (2009) nachweisen, dass die native Ricin A Kette nach ER-Import verschiedene ERAD-Komponenten benötigt, um aus dem ER in das Cytosol von Hefen zu translozieren. Dabei wurden diverse Hefe-Deletionsmutanten mit einem Defekt in spezifischen ERAD-Komponenten bezüglich ihrer Sensitivität gegen RTA untersucht und es stellte sich heraus, dass der Hrd1-Komplex eine entscheidende Rolle für die *in vivo* Toxizität und die Retrotranslokation von RTA spielt (Li et al., 2009). Ein Problem für die Toxine ist die Tatsache, dass normalerweise auf die Retrotranslokation von ERAD-Substraten eine proteasomale Degradation der Substrate im Cytosol folgt (Chillaron und Haas, 2000). Um dennoch ihre toxische Wirkung im Cytosol entfalten zu können, muss wenigstens ein Teil des translozierten Toxins diesem Schicksal entgehen. Wesche et al. (1999) konnten nachweisen, dass Säugerzellen, die mit einem Proteasomen-Inhibitor behandelt wurden, eine um das Dreifache reduzierte Sensitivität gegen Ricin im Vergleich

zu unbehandelten Zellen besitzen. Dadurch wurde deutlich, dass der größte Teil des Toxins nach Erreichen des Cytosols degradiert wird (Wesche et al., 1999). Die Tatsache, dass die Toxizität auch in Abwesenheit von Proteasomen-Inhibitoren signifikant hoch war, ließ jedoch erkennen, dass ein gewisser Teil des Toxins der Degradationsmaschinerie entkommt.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Ricin A Kette mit Hilfe verschiedener Signalsequenzen in das ER der Hefe dirigiert werden, um im Anschluss die ER/Cytosol-Dislokation des Toxins genauer zu untersuchen. Dabei sollte zum einen eine phänotypische Analyse ausgewählter Hefe-Deletionsmutanten durchgeführt werden und zum anderen eine „Screening“-Methode entwickelt werden, mit der eine schnelle und effiziente Analyse von Hefe-Deletionsmutanten möglich ist, die eine intrazelluläre Expression von RTA im ER überleben.

Untersuchung der *in vivo* Toxizität und des intrazellulären Transportes verschiedener RTA-Derivate

Obwohl die 25S rRNA der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sehr sensitiv für RTA ist, sind Hefen für extern zugegebenes Ricin nicht empfänglich. Hefen besitzen keine Galaktosyltransferase und ihnen fehlen folglich galaktosylierte Oberflächen-Rezeptoren, an welche die B-Kette von Ricin bindet (Gemmill und Trimble, 1999). Trotzdem ist es verschiedenen Arbeitsgruppen gelungen, den finalen Schritt des Intoxifikationsprozesses von RTA nachzustellen, nämlich den Transport des Toxins in das ER und die darauf folgende Dislokation der A-Kette in das Cytosol. Um das Einschleusen von RTA in das ER zu gewährleisten, wurde an den N-Terminus der Ricin A Kette ein ER-Importsignal angefügt. Dabei wurde sowohl das hefeeigene ER-Importsignal von Kar2p verwendet, als auch die Signalsequenz des Ricin-Vorläufertoxins (Simpson et al., 1999; Allen et al., 2007; Parikh et al., 2008; Li et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der ER-Import von RTA anhand zweier weiterer Signalpeptide untersucht, die beide von viralen Killertoxinen der Hefe abstammen. Dabei sollte

geklärt werden, ob Unterschiede in der *in vivo* Toxizität von RTA bezüglich der Art des verwendeten ER-Importsignals zu beobachten sind. Frühere Untersuchungen von Simpson et al. (1999) zeigten bereits, dass Hefezellen die intrazelluläre Expression von wildtypischem RTA nicht tolerieren. Diese Beobachtung wurde im Rahmen dieser Arbeit bestätigt, indem eine cytosolische RTA-Variante in Hefe exprimiert wurde. Es entstand ein letaler Phänotyp, wobei keine Hefezellen überlebten. Durch das Anfügen einer N-terminalen Signalsequenz an Wildtyp-RTA konnte die *in vivo* Toxizität von RTA verringert werden. Auffallend war jedoch, dass kein signifikanter Unterschied im Phänotyp der mit K1- bzw. K28-RTA transformierten Hefen zu sehen war, obwohl sich die Signalpeptide von K1 pptox und K28 pptox deutlich unterscheiden. Das K1 Toxin wird als Vorläufertoxin (pptox) synthetisiert und besitzt am N-Terminus eine 26 Aminosäuren große hydrophobe Region, die typische Charakteristika einer Signalsequenz aufweist (Perlman und Halvorson, 1983; von Heijne, 1983, 1984). Das K1 Präprotoxin wird *in vitro* in Hundepankreas-Mikrosomen cotranslational prozessiert (Bostian et al., 1980; 1983). Bostian et al. (1984) konnten ebenfalls zeigen, dass der Transport, das Andocken an die ER-Membran sowie die Translokation für die Prozessierung des Toxin-Vorläufers cotranslational erfolgen (Bostian et al., 1984). Trotz geringer Sequenzhomologien und fundamentalen Unterschieden im Wirkungsmechanismus zeigen die Killertoxine K1 und K28 erhebliche Übereinstimmungen hinsichtlich Synthese, Prozessierung und Toxinsekretion. So wird auch das K28 Toxin als Vorläufer synthetisiert. Am N-Terminus befindet sich eine 36 Aminosäuren große hydrophobe Signalsequenz, die den ER-Import steuert (Schmitt und Breinig, 2002). Die Hydrophobizität einer Signalsequenz entscheidet darüber, ob ein Protein co- oder posttranslational in das ER transloziert wird (Ng et al., 1996). Durch Anwendung eines Algorithmus von Kyte und Doolittle (1982) wurde ein Hydrophobizitäts-Plot erhalten, der auf einen posttranslationalen ER-Import von K28 pptox schließen lässt (Eisfeld, 2001). Außerdem sind $\Delta sec71$, $\Delta sec72$ und $sec62$ -Mutanten, deren Genprodukte am SRP-

unabhängigen posttranslationalen ER-Import beteiligt sind, kaum mehr in der Lage, K28 Toxin zu sezernieren. Auch die cytosolischen Chaperone Ssa1p und Ssa2p, die am posttranslationalen ER-Import beteiligt sind, spielen eine Rolle bei der Toxinsekretion (Breinig et al., 2006). Aufgrund dieser unterschiedlichen Eigenschaften der eingesetzten ER-Importsignale bestand die Vermutung, dass K28-RTA nach *in vivo* Expression einen deutlich sensitiveren Phänotyp in der Hefe bewirken könnte, da das Vorläufer-Toxin bereits vor Eintritt in das ER vollständig translatiert im Cytosol vorliegt und seine cytotoxische Wirkung an den Ribosomen entfalten könnte. Diese Vermutung konnte jedoch nicht bestätigt werden, beide RTA-Derivate lieferten den gleichen Phänotyp in Hefe. Die hohe Toxizitätsrate der verschiedenen RTA-Konstrukte konnte auch dadurch bestätigt werden, dass ein Nachweis der Derivate im Zelllysate mittels Western Analyse nicht möglich war. Auch durch Einsatz einer deutlich sensitiveren Nachweismethode, dem radioaktiven „Labeling“ der Toxine, gelang es nicht, die verschiedenen RTA-Konstrukte nach *in vivo* Expression zu detektieren. Ein Grund hierfür könnte sein, dass unter optimalen Bedingungen bereits wenige RTA-Moleküle ausreichen, um 1500 Ribosomen pro Minute zu inaktivieren und somit den Zelltod auszulösen (Eiklid et al., 1980). Das wiederum würde bedeuten, dass bevor die Zelle in Apoptose geht, zu wenige RTA-Moleküle synthetisiert würden, um im Zelllysate nachgewiesen werden zu können. Aufgrund dieser Tatsache und zur Überwindung der Toxizität wurden eine weitere cytosolische und zwei Varianten mit Signalpeptid hergestellt, wobei eine mutierte und *in vivo* weniger toxische RTA-Form verwendet wurde. Die dreidimensionale Struktur von Ricin wurde mittels Röntgen-Kristallographie aufgeklärt (Montfort et al., 1987). Dabei wurde eine markante tiefe Spalte entdeckt, die als enzymatisch aktive Seite nominiert wurde (Montfort et al., 1987; Ready et al., 1988; Robertus, 1988). Ein Beweis für diese Annahme war, dass einige Aminosäuren mit polaren Seitenketten in dieser Spalte bei einer ganzen Reihe von Pflanzen- und bakteriellen Toxinen, die die Ribosomen hemmen, konserviert vorliegen. Darunter befinden sich Ricin, Shiga Toxin, Shiga-

„like“ Toxin und Trichosanthin (Ready et al., 1988). Bei den konservierten Aminosäuren handelt es sich um Glutamat an Position 177, Arginin an Position 180 und Tryptophan an Position 211 (Schlossmann et al., 1989). Hovde et al. (1989) tauschten die Aminosäure Glutamat an Position 167 in Shiga-„like“ Toxin I (entspricht Glu-177 in RTA) gegen Aspartat aus und konnten eine um das 1000-fache reduzierte enzymatische Aktivität feststellen, was wiederum vermuten ließ, dass diese Spalte eine kritische Rolle für die Enzymaktivität spielt (Hovde et al., 1989). Bereits Schlossmann und Mitarbeiter konnten durch den Austausch von Glu-177 in RTA gegen Aspartat zeigen, dass die Asp-177-Mutante eine 80-fach reduzierte Enzymaktivität gegenüber der Kontrolle aufweist, jedoch immer noch deutlich aktiv ist. Dabei benutzten sie einen Assay, der auf der Messung der Proteinbiosynthese-Inhibition beruht; Effekte auf die Werte K_m und k_{cat} wurden nicht untersucht (Schlossmann et al., 1989). In einer späteren Studie entwickelten Chaddock und Roberts eine Methode, um die durch RTA katalysierte Depurinierung zu messen. Dabei ermittelten sie einen k_{cat} -Wert von RTA^{E177D} (Glu-177 → Asp), der gegenüber Wildtyp-RTA um das 50-fache reduziert war (Chaddock und Roberts, 1993). Es konnte weiterhin biochemisch nachgewiesen werden, dass diese mutierte RTA-Variante eine korrekte native Faltung aufweist und somit mit der wildtypischen RTA-Form vergleichbar ist (Simpson et al., 1999). Die durchgeführten Sensitivitätstests bestätigten die reduzierte Toxizität von RTA^{E177D} im Vergleich zu RTA. Trotzdem zeigte das cytosolisch exprimierte RTA^{E177D}-Derivat einen signifikant sensitiveren Phänotyp als die beiden Signalpeptid-Varianten. Die direkte *in vivo* Expression von RTA im Cytosol ermöglicht es dem Toxin, direkt im Anschluss an seine Translation die Ribosomen zu attackieren und die Proteinbiosynthese zu hemmen. RTA-Konstrukte mit Signalpeptid am N-Terminus müssen hingegen zunächst den Weg über das ER nehmen, bevor sie wieder in das Cytosol translozieren und ihre toxische Wirkung entfalten können. Auf diesem Weg wird wahrscheinlich auch ein großer Teil des dislozierten Toxins über den Ubiquitin-Proteasom „Pathway“ abgebaut. Mit Hilfe radioaktiver

„Labeling“-Experimente ist es gelungen, die *in vivo* Expression aller in vorliegender Arbeit hergestellter RTA^{E177D}-Derivate im Zellysat nachzuweisen. Dadurch sollte ebenfalls gezeigt werden, dass RTA durch die entsprechenden ER-Importsignale in das ER-Lumen dirigiert und dort posttranslational modifiziert wird. Wie erwartet zeigte die cytosolisch exprimierte RTA^{E177D}-Variante eine immunoreaktive Bande auf Höhe von 32 kDa. Die zur Definition der Bandengrößen mitgeführte *in vitro* Probe lief auf der gleichen Höhe. Auch bei den Proben K1- bzw. K28-RTA^{E177D} wurde jeweils eine einzelne immunoreaktive Bande auf Höhe der entsprechenden *in vitro* Proben detektiert. Aus früheren „Labeling“-Experimenten war jedoch bekannt, dass es bei einer ER-luminalen RTA-Variante zu posttranslationalen Modifikationen kommt. RTA besitzt zwei interne N-Glykosylierungsstellen und zwei Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine Glykosylierung von RTA^{E177D} im ER-Lumen an mindestens einer dieser beiden Stellen stattfindet. Dieses Phänomen führte zum Auftreten von zwei immunoreaktiven Banden *in vivo*, wobei die untere Bande dem prozessierten, nicht glykosylierten RTA entspricht, während die obere Bande einfach glykosyliertes RTA darstellt (Simpson et al., 1999; Li et al., 2009). Da nach Auftrennung der *in vivo* Proben von K1- bzw. K28-RTA^{E177D} mittels SDS-PAGE und anschließender Detektion durch Autoradiographie lediglich eine Bande zu sehen war, die auf Höhe der entsprechenden *in vitro* Probe verlief, musste sichergestellt werden, ob es sich dabei um glykosyliertes RTA handelte, damit ein biochemischer Beweis für die Translokation von RTA in das ER geliefert werden konnte. Dazu wurde eine Behandlung mit Endoglykosidase H durchgeführt. Dieses Enzym spaltet die Bindung zwischen zwei N-Acetylglukosamin-Molekülen, welche bei der N-Glykosylierung zusammen mit Glukose- und Mannose-Molekülen als Oligosaccharidvorstufe an ein Protein angefügt werden (Alberts et al., 2001). Nach Behandlung der K1- bzw. K28-RTA^{E177D} Proben mit Endoglykosidase H kam es jedoch nicht zu einer Abschwächung beziehungsweise einem Verschwinden der detektierten Bande. Dies stellte sicher, dass es sich bei der detektierten Bande nicht um die glykosylierte RTA-Form handeln konnte. Vielmehr musste

vermutet werden, dass die nachgewiesene immunoreaktive Bande jeweils die unprozessierte Toxin-Vorstufe darstellt, da sie sich auf der gleichen Höhe mit der entsprechenden *in vitro* Probe befand. Es stellte sich somit die Frage, ob die beiden SP-RTA-Derivate nicht effizient oder überhaupt nicht mit Hilfe der jeweiligen Signalsequenzen in das ER importiert wurden. Bei den vorher durchgeführten Sensitivitätstest zeigte sich jedoch deutlich, dass die *in vivo* Expression von K1- bzw. K28-RTA einen sensitiven Phänotyp in den transformierten Hefezellen auslöste. Es sollte also ein gewisser Teil des Toxins in das ER-Lumen gelangen und dann erneut die ER-Membran translozieren, um im Cytosol die Ribosomen zu schädigen. Es wäre natürlich möglich, dass nur ein ganz geringer Prozentsatz an RTA in das ER dirigiert wird und folglich auch nur wenige prozessierte Toxin-Moleküle erneut in das Cytosol translozieren. Diese geringe Menge Toxin reicht zwar aus, um einen sensitiven Phänotyp in den Hefezellen zu bewirken, jedoch wäre die Anzahl der Toxin-Moleküle für den biochemischen Nachweis mittels radioaktiver Markierungsexperimente zu gering. Es stellte sich somit die Frage, warum ein ER-Import der Konstrukte K1- bzw. K28-RTA nicht wie erwartet erfolgte. Ein Grund hierfür könnte sein, dass jeweils nur die Signalsequenz der beiden Toxinvorläufer K1 und K28 an RTA anfusioniert wurde, nicht aber die entsprechende Pro-Region. Sowohl für die 13 Aminosäuren große Pro-Region von K28 ptox als auch für die 18 Aminosäuren große Pro-Region von K1 ptox konnte die jeweilige Funktion bisher noch nicht aufgeklärt werden (Bussey et al., 1990; Schmitt und Breinig, 2002). Für andere Vorläufer-Proteine wurde der Pro-Region eine Chaperon-ähnliche Funktion oder eine Rolle als „Spacer“ zugesprochen, die entweder die korrekte Faltung des Proteins unterstützt oder die Erkennung der Signalsequenz beim ER-Import erleichtert (Lesage et al., 2003; Joliffe et al., 2006). Kelkel (2009) konnte in ihrer Dissertation zeigen, dass die intrazelluläre Expression der cytotoxischen K28 α -Untereinheit mit N-terminaler Signalsequenz eine verringerte Toxizität gegenüber einer Variante mit Signalsequenz und Pro-Region zeigte (Kelkel, 2009). Sicher ist jedoch, dass durch Fehlen der Pro-Region auch die Hydrophobizität der entsprechenden

SP-Regionen reduziert wird, was wiederum einen Einfluss auf den ER-Import bewirken kann. Um die Wahrscheinlichkeit auszuschließen, dass die Toxizität von RTA auf einer Interaktion des unprozessierten Toxinvorläufers mit den Ribosomen basiert und um einen Nachweis für den ER-Import beider SP-RTA-Derivate zu erhalten, wurden in dieser Arbeit zwei Mutanten mit Defekt in den beiden nicht essentiellen Untereinheiten des Sec63-Komplexes getestet, $\Delta sec71$ und $\Delta sec72$. In einem ersten Schritt des posttranslationalen Proteinimports wechselwirkt die hydrophobe Signalsequenz mit einem ER-Membrankomplex bestehend aus dem heterotrimeren Sec61-Komplex, der den Transportkanal darstellt, und dem tetrameren Sec63-Komplex bestehend aus Sec62p, Sec63p, Sec71p und Sec72p (Panzner et al., 1995; Lyman und Schekman, 1997; Plath et al., 1998; Deshaies et al., 1991). Der Eintritt der Polypeptidkette in das Sec61-Translokon und der darauffolgende ER-Import sind abhängig von der ATPase-Funktion des Hsp70-Chaperons Kar2p/BiP (Matlack et al., 1999). Die Deletion eines der beiden Gene *SEC71* und *SEC72* führt zur Akkumulation einiger Vorläuferproteine im Cytosol *in vivo* (Feldheim et al., 1993; Kurihara und Silver, 1993). Feldheim et al. (1993) untersuchten die ER-Translokation von Carboxypeptidase Y (CPY) in einer $\Delta sec71$ -Mutante. CPY wird normalerweise als Präproprotein translatiert, dessen Signalsequenz nach Eintritt in das ER abgespalten wird (Stevens et al., 1982). In einer $\Delta sec71$ Nullmutante kommt es jedoch zur Hemmung der Proteintranslokation und einer Akkumulation des Vorläufer-Proteins im Cytosol (Feldheim et al., 1993). Da das gleiche Phänomen in einer $\Delta sec71$ -Mutante bei den Proteinvorläufern von Invertase und Kar2p sowie dem Präpro- α -Faktor beobachtet werden konnte, wird die Annahme unterstützt, dass Sec71p zwar keine essentielle Funktion besitzt, jedoch eine wichtige Rolle bei der Proteintranslokation in das ER spielt, welche durch die Proteine Sec61p, Sec62p, Sec63p und Kar2p vermittelt wird (Feldheim et al., 1993; Kurihara und Silver, 1993). $\Delta sec71$ - und $\Delta sec72$ -Mutanten zeigten nach *in vivo* Expression der beiden Konstrukte K1- bzw. K28-RTA im Sensitivitätstest ein komplettes Wachstum. Zum einen konnte damit bestätigt werden, dass

der sensitive Phänotyp der beiden SP-RTA-Derivate in der Wildtyp-Hefe BY4742 nicht auf einer vorzeitigen Wechselwirkung der unprozessierten Toxinvorläufer mit den Ribosomen vor Eintritt in das ER zurückzuführen ist. Dies ist ein Hinweis darauf, dass ein gewisser Prozentsatz an RTA-Molekülen mit Hilfe der verwendeten Signalsequenzen in das ER gelangen muss und dann erneut in das Cytosol gelangt, um seine toxische Wirkung zu entfalten. Da für die beiden Komponenten Sec71p und Sec72p eine spezifische Rolle beim posttranslationalen ER-Import beschrieben ist, unterstützt der resistente Phänotyp beider Mutanten die These dieses Importweges. Zum anderen konnte hierdurch ausgeschlossen werden, dass RTA mit dem N-terminalen Signalpeptid von K1 pptox cotranslational in das ER importiert wird, da sich kein Unterschied im Phänotyp bezüglich der verschiedenen ER-Importsignale zeigte. Obwohl Bostian et al. sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine cotranslationale Translokation des K1 pptox zeigen konnten (Bostian et al., 1980; 1981; 1984), wurde von Lolle und Bussey (1986) auch ein posttranslationaler ER-Import des K1 Vorläufertoxins postuliert. Sie konnten nach Expression von K1 pptox in *S. cerevisiae* drei Protein-Spezies nachweisen. Die Charakterisierung dieser Toxin-Varianten erfolgte mit Hilfe von Wirtsstämmen, die einen Defekt im Sekretionsweg besaßen. Aufgrund der Ergebnisse wurde schließlich vermutet, dass die Abspaltung der Signalsequenz und die Translokation des Präprotoxins auch posttranslational stattfinden kann (Lolle und Bussey, 1984). Aber auch die fehlende Pro-Region von K1 pptox könnte ein Grund für den posttranslationalen ER-Import von K1-RTA darstellen. Die Berechnung der Hydrophobizitätswerte für die Signalsequenzen der beiden Killertoxin-Vorläufer nach Cornette et al. (1987) ergab für die SP-Region von K28 pptox einen Wert von 2,2, während der Wert für das Signalpeptid von K1 pptox bei 3,8 liegt und damit eine signifikant stärkere Hydrophobizität gegenüber K28 (SP) aufweist. Betrachtet man zusätzlich die Pro-Region von K1, so steigert sich dieser Wert nochmals (F. Breinig, persönliche Mitteilung). Da die Hydrophobizität einer Signalsequenz darüber entscheidet, ob ein Protein co- oder posttranslational in das ER transloziert wird (Ng et al.,

1996), könnte dies der Grund für den stattfindenden posttranslationalen ER-Import von K1-RTA darstellen. Ein Ziel zukünftiger Untersuchungen sollte es sein, RTA-Varianten herzustellen, die am N-Terminus sowohl die Signalpeptide als auch die entsprechenden Pro-Regionen der jeweiligen K1 bzw. K28 Toxin-Vorläufer enthalten, um zu analysieren, ob dieser kleine Sequenzabschnitt einen Einfluss auf die Effizienz oder die Art des ER-Imports von RTA ausübt. Durch den Nachweis der *in vivo* Expression beider RTA-Konstrukte im Zellysat der $\Delta sec71$ Nullmutante mittels radioaktiver „Labeling“-Experimente, konnte außerdem sicher gestellt werden, dass beide RTA-Derivate *in vivo* exprimiert werden. Weiterhin wurden Temperatur-sensitive *sec61*- und *kar2*-Mutanten auf Sensitivität gegen die intrazelluläre Expression der beiden cytotoxischen Konstrukte K1- bzw. K28-RTA untersucht. Die entsprechenden Wachstumstests waren jedoch nicht auswertbar, da selbst nach Transformation mit dem Leervektor als Kontrollkonstrukt, ein starker Wachstumsdefekt der Mutanten zu beobachten war. Die Proteintranslokation in das ER wird außerdem durch cytosolische Chaperone unterstützt (Fewell et al., 2001). Cytosolische Hsp70-Chaperone, wie die Proteine der SSA-Genfamilie, werden für den posttranslationalen ER-Import von ppαF *in vivo* und *in vitro* benötigt (Deshaies und Schekman, 1987; Chirico et al., 1988). Caplan et al. (1992) fanden heraus, dass auch das Hsp40 Co-Chaperon Ydj1p für die effiziente Translokation des ppαF eine wichtige Rolle spielt (Caplan et al., 1992). Dabei stimuliert Ydj1p die ATPase-Aktivität von Ssa1p (Cyr et al., 1992). In Abwesenheit von *SSA1* und *SSA2*, verloren die Konstrukte K1- bzw. K28-RTA deutlich an Toxizität, so dass entsprechende Transformanten die *in vivo* Expression von RTA im ER überlebten. In einer $\Delta ydj1$ Nullmutante bildete sich keine vollständige Resistenz aus, die jeweiligen Transformanten zeigten ein Wachstum bis zur vierten Verdünnungsstufe. Auch die Abwesenheit eines weiteren cytosolischen Hsp70-Chaperons, Ssb1p, führte zu einem resistenten Phänotyp gegen K1- bzw. K28-RTA. Diese Ergebnisse bestätigten erneut einen posttranslationalen ER-Importmechanismus der beiden cytotoxischen Konstrukte K1-/K28-RTA. Da mit Hilfe der radioaktiven

Markierungsexperimente nicht gezeigt werden konnte, dass die Ricin A Kette in das ER transportiert und dort glykosyliert wurde, sollte in dieser Arbeit ebenfalls der Einfluss der beiden nicht essentiellen Untereinheiten Spc1p und Spc2p des Signalpeptidase-Komplexes (SPC) auf die RTA-Toxizität untersucht werden, um einen Hinweis für den tatsächlichen ER-Import der beiden SP-RTA-Derivate zu erhalten. Der an die ER-Membran gebundene SPC katalysiert die proteolytische Abspaltung des N-terminalen Signalpeptides neu synthetisierter Präproteine (von Heijne, 1994). Bei der Hefe *S. cerevisiae* besteht dieser Komplex aus vier Untereinheiten, den beiden essentiellen Proteinen Sec11p und Spc3p sowie den beiden nicht essentiellen Komponenten Spc1p und Spc2p (YaDeau et al., 1991). Über die genaue Funktion von Spc1p und Spc2p ist noch wenig bekannt, es wird jedoch vermutet, dass sie eine entscheidende Rolle für die volle enzymatische Aktivität des SPC spielen (Mullins et al., 1996; Antonin et al., 2000). In Abwesenheit der beiden Proteine war ein kompletter Verlust der RTA-Aktivität zu beobachten und die entsprechend transformierten Hefezellen zeigten eine Resistenz gegen RTA. Diese Ergebnisse deuten auf einen ER-Import von K1- bzw. K28-RTA hin, jedoch auf eine nicht stattfindende Abspaltung der Signalsequenz im ER-Lumen. Dadurch lässt sich auch der RTA-resistente Phänotyp in diesen Deletionsmutanten erklären, denn die Abspaltung der Signalsequenz ist Voraussetzung dafür, dass die Vorläufer-Proteine weitere Prozessierungsschritte im ER durchlaufen und letztendlich das ER-Lumen wieder verlassen können (Pelham, 1989; Gething und Sambrook, 1992). Obwohl es mit Hilfe radioaktiver Markierungsexperimente nicht gelungen war, eine Glykosylierung der RTA-Derivate mit Signalpeptid am N-Terminus *in vivo* nachzuweisen und somit den ER-Import der Ricin A Kette mit Hilfe der eingesetzten Signalpeptide zu bestätigen, so lieferten die Sensitivitätstests der Hefe-Deletionsmutanten jedoch einen indirekten Hinweis auf einen stattfindenden posttranslationalen ER-Import der Konstrukte K1- bzw. K28-RTA.

Komponenten des Qualitätskontroll-Systems des Endoplasmatischen Reticulums (ERQC) halten fehlfaltete Proteine zurück und leiten deren Abbau über die ER-assoziierte Degradation ein (Brodsky und McCracken, 1997). Für die löslichen ERAD-Substrate CPY* und PrA*, jedoch nicht für Transmembran-ERAD-Substrate, konnte gezeigt werden, dass ein ER/Golgi-Transport für deren Degradation essentiell ist (Caldwell et al., 2001). Korrekt gefaltete sekretorische Proteine werden über COP II-Vesikel aus dem ER zum Golgi-Apparat transportiert, wo sie weitere Modifikationen erfahren (Schekman und Orci, 1996). Die Familie der *ERV* („ER vesicle“)-Proteine hat dabei eine Funktion in der Vesikel-Bildung, der Befüllung der Vesikel und/oder der Membranfusion (Otte et al., 2001). Aber auch eine weitere Gruppe von Transmembranproteinen, die p24-Familie, ist an diesem Prozess beteiligt (Springer et al., 2000). Für die ER-luminale RTA-Variante Kar2-RTA konnte nachgewiesen werden, dass vor der Retrotranslokation von RTA, ein Transport über den Golgi-Apparat erfolgen muss. Dabei spielt lediglich das p24-Protein Erp2p eine entscheidende Rolle für die *in vivo* Toxizität von RTA, denn in Abwesenheit von *ERP2* überlebten Hefezellen die intrazelluläre Expression von Ricin A. Es konnten keine weiteren p24-Proteine beziehungsweise keine anderen COP II-Vesikel-Proteine identifiziert werden, deren Deletion eine Auswirkung auf die *in vivo* Toxizität von RTA erkennen ließ (Li et al., 2009). Eine Δ *erp2*-Deletionsmutante zeigte nach intrazellulärer Expression der beiden RTA-Derivate K1- bzw. K28-RTA im ER-Lumen einen letalen Phänotyp, was eine Beteiligung dieses Proteins am intrazellulären Transport der Ricin A Kette unwahrscheinlich macht. Hier wurde ein weiterer Hinweis geliefert, dass die in dieser Arbeit eingesetzten ER-luminalen Varianten K1-/K28-RTA scheinbar einem andern „Pathway“ folgen als das von Li et al. (2009) verwendete Konstrukt Kar2-RTA.

Das Pflanzentoxin Ricin zählt zu den Ribosomen-inaktivierenden Proteinen der Klasse II (RIP II) und führt zu einer irreversiblen Schädigung der Ribosomen, indem es einen spezifischen Adenin-Rest im α -Sarcin/Ricin-Loop der rRNA der großen ribosomalen Untereinheit entfernt (Lord und Roberts, 2004). Es ist sehr wenig darüber bekannt,

wie die Ricin A Kette mit den Ribosomen in Interaktion tritt und welchen molekularen Mechanismus RTA nutzt, um die infizierten Zellen abzutöten. Auch die beiden bakteriellen Toxine Shiga Toxin und Shig-„like“ Toxin gehören zur Gruppe der Ribosomen-inaktivierenden Proteine und depurinieren rRNA an der gleichen Stelle wie Ricin (Endo et al., 1988a). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob bestimmte ribosomale Proteine eine entscheidende Rolle für die *in vivo* Toxizität der beiden Konstrukte K1- bzw. K28-RTA spielen. Der α -Sarcin/Ricin-Loop ist in der großen ribosomalen 50S-/ 60S-Untereinheit prokaryotischer/eukaryotischer Ribosomen lokalisiert, in der Nähe des ribosomalen Fortsatzes („ribosomal stalk“), der eine flexible Struktur der großen Untereinheit darstellt (Li et al., 2009). Dieser „ribosomal stalk“ spielt eine essentielle Rolle während der Proteintranslation, da er an der Interaktion der Ribosomen mit den Elongationsfaktoren beteiligt ist (Möller und Maassen, 1986). In *S. cerevisiae* bildet der ribosomale Fortsatz einen pentameren Komplex, der von dem Protein Po sowie jeweils einer Kopie der Proteine P1 α , P1 β , P2 α und P2 β gebildet wird (Guarinos et al., 2003). Die Hefedeletionsmutanten $\Delta rpp1A$ (P1 α), $\Delta rpp1B$ (P1 β), $\Delta rpp2A$ (P2 α) und $\Delta rpp2B$ (P2 β) wurden mit den Konstrukten K1- bzw. K28-RTA transformiert und im Toxizitätstest bezüglich ihres Phänotyps untersucht. Die entsprechenden Mutanten zeigten nach intrazellulärer RTA-Expression einen sensitiven Phänotyp, der im Vergleich zum isogenen Wildtyp fast noch stärker ausgeprägt war. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass die ribosomalen Proteine P1 und P2 keinen Einfluss auf die *in vivo* Toxizität von K1- bzw. K28-RTA haben. Chioux et al. (2008) postulierten jedoch, dass der „ribosomal stalk“ als Andockstelle für RTA fungiert, von der aus das Toxin schließlich sein Ziel-Adenin lokalisiert. Sie konnten mittels SPR („surface plasmon resonance“) eine dynamische Interaktion zwischen RTA und Ribosomen in Wildtyp-Hefen zeigen, während isolierte Ribosomen aus P-Protein Deletionsmutanten eine deutlich reduzierte Bindung an RTA aufwiesen (Chioux et al., 2008). Die getestete $\Delta rpl12B$ -Deletionsmutante zeigte hingegen nach intrazellulärer Expression der beiden RTA-Konstrukte ein komplettes Wachstum und

lässt vermuten, dass das Protein L12 an der *in vivo* Toxizität der Ricin A Kette beteiligt ist. Die ribosomale Region, die an der Hydrolyse des an den Elongationsfaktor 2 (EF2) gebundenen GTP-Moleküls bei der Interaktion von EF2 mit dem Ribosom während der Translation beteiligt ist, wird als sogenannte ribosomale GTPase-Domäne bezeichnet (Briones et al., 1998). Diese Domäne wird zum größten Teil von einem bestimmten Protein gebildet, dem Protein L12 (früher L15). In der Hefe *S. cerevisiae* wird das Protein von einem duplizierten Gen, *RPL12A* und *RPL12B*, kodiert (Pucciarelli et al., 1990). Für ein optimales Wachstum der Hefezellen werden beide L12 Genkopien benötigt, da ansonsten nicht genügend ribosomales Protein zur Verfügung steht (Woolford, 1991). Eine Doppel-„Knock-out“ Mutante ist lebensfähig, zeigt aber ein verlangsamtes Wachstum. Die entsprechenden Mutanten können die Translation von Proteinen weiterhin *in vitro* ausführen, jedoch ist die Translationsrate um das Vierfache gegenüber dem Wildtyp vermindert (Briones et al., 1998). Die Beteiligung des Proteins L12 an der *in vivo* Toxizität von RTA konnte außerdem nochmals durch Einsatz des Fluoreszenz-„Reader“-Systems bestätigt werden.

Untersuchung der Retrotranslokation der Ricin A Kette

Beteiligung klassischer ERAD-Komponenten

Nachdem ein Protein als ERAD-Substrat erkannt wurde, wird es aus dem ER in das Cytosol transloziert und proteasomal abgebaut. Dabei spielt das Sec61-Translocon sowohl in Säugern als auch in der Hefe eine entscheidende Rolle nicht nur beim ER-Import von Proteinen, sondern auch beim Export von ERAD-Substraten (Wiertz et al., 1996; Pilon et al., 1997). Sowohl für Cholera Toxin als auch für das Pflanzentoxin Ricin konnte eine Co-Immunopräzipitation mit Sec61 nachgewiesen werden (Wesche et al., 1999; Schmitz et al., 2000), wobei die treibende Kraft für die ER-Dislokation weiterhin ungeklärt

bleibt. Slominska-Wojewodzka et al. (2006) konnten zeigen, dass das α -Mannosidase-ähnliche Protein EDEM im ER-Lumen (homolog zum Protein Htm1p in Hefe) direkt an der Retrotranslokation der Ricin A Kette aus dem ER in das Cytosol beteiligt ist. Eine aktuelle Studie lieferte den Beweis, dass RTA mit Hilfe des Ubiquitin-Ligase Komplexes Hrd1 in *S. cerevisiae* retrotransloziert wird und im Anschluss degradiert wird. Dabei wurde deutlich, dass die Zelle zwischen zwei verschiedenen Formen des gleichen Substrates unterscheiden kann und diese über unterschiedliche Abbauege degradiert. Die native, cytotoxische RTA-Form (RTA) wie auch eine fehlgefaltete RTA-Variante (RTA Δ) benötigen beide den Hrd1p/Hrd3p/Der1p-Komplex. Während RTA Δ sich wie ein klassisches ERAD-Substrat verhält und für die Extraktion aus dem ER den Cdc48-Komplex benötigt, scheint die native RTA-Form lediglich Komponenten der regulatorischen 19S-Kappe des Proteasoms zu benötigen (Li et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie die beiden Signalpeptid-Varianten von RTA mit Hilfe der ER-assoziierten Degradation in das Cytosol retrotransloziert werden. Die intrazelluläre Expression der beiden cytotoxischen Konstrukte K1- bzw. K28-RTA ist hervorragend geeignet, gezielt nach Mutanten mit einem Defekt in einer klassischen ERAD-Komponente zu suchen, die sich resistent gegen RTA verhalten. Am ER-Export fehlgefalteter Proteine sind verschiedene Proteinkomplexe beteiligt. Die Zuordnung der ERAD-Substrate zu ihrem entsprechenden „Pathway“ erfolgt aufgrund der Lokalisierung ihrer fehlgefalteten Domänen: ERAD-L (fehlgefaltete luminaire Proteine), ERAD-M (fehlgefaltete Membrandomäne) und ERAD-C (fehlgefaltete cytosolische Domäne) (Carvalho et al., 2006; Ismael und Ng, 2006). Würde sich Ricin A als ERAD-Substrat maskieren, so ist zu vermuten, dass der ERAD-L Abbauege an der Retrotranslokation des Toxins beteiligt ist, da RTA löslich im ER-Lumen vorliegt. Proteine mit fehlgefalteten luminalen Domänen werden mit Hilfe des Hrd1-Komplexes degradiert. In diesem Komplex wird die Ubiquitin-Ligase Hrd1p, die für die Polyubiquitinierung der Substrate verantwortlich ist, durch die Bindung an das Protein Hrd3p stabilisiert (Gardner et al.,

2000). Diese beiden Proteine bilden einen Kernkomplex in der ER-Membran, indem sie zusätzlich über das Linkerprotein Usa1p an das Membranprotein Der1p binden. Dabei werden neben Sec61p auch Hrd1p und Der1p als Kandidaten gehandelt, welche als Kanal für den Protein-Export aus dem ER fungieren könnten (Lilley und Ploegh, 2004; Ye et al., 2004; Gauss et al., 2006). Tatsächlich konnten Komponenten des Hrd1-Komplexes identifiziert werden, deren Deletion zu einer verminderten Sensitivität bzw. einer kompletten Resistenz gegen intrazellulär exprimiertes Ricin A führten und demnach an dessen Retrotranslokation beteiligt sind. Neben der Ubiquitin-Ligase Hrd1p und dem Protein Hrd3p spielen die Proteine Der1p, Usa1p, Cue1p und Ubc7p eine entscheidende Rolle für die Toxizität von RTA. Cue1p ist ein Transmembranprotein, welches für die Aktivität der Hrd1p Ubiquitin-Ligase essentiell ist und *in vivo* mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym Ubc7p interagiert (Kostova et al., 2009). Die Beteiligung der Proteine Hrd1p und Der1p an der Retrotranslokation von Ricin A konnte außerdem nochmals mit Hilfe des Fluoreszenz-„Reader“-Systems bestätigt werden.

Wie ERAD-Substrate schließlich als solche erkannt werden, ist noch nicht vollständig geklärt. Da aberrante Proteine jedoch hydrophobe Regionen und freie Cysteine exponieren und außerdem eine Tendenz zur Aggregation zeigen, scheinen molekulare Chaperone eine Schlüsselrolle in diesem Selektionsprozess zu spielen, da sie fehlgefaltete und aggregierende Proteine erkennen (Fewell et al., 2001). Es wird vermutet, dass beispielsweise das Chaperon Kar2p luminale Substrate in einer löslichen, translokationskompetenten Konformation hält und so deren Abbau über ERAD erleichtert (Nishikawa et al., 2001; Zhang et al., 2001; Kabani et al., 2003). Lektin-ähnliche Chaperone im ER wie z.B. Calnexin und Calreticulin in Säugern beziehungsweise Cne1p in *S. cerevisiae* erkennen spezifische N-gebundene Carbohydrat-Ketten auf Glykoproteinen (Xu et al., 2004). Diese Strukturen werden ausgebildet, sobald sich glykosylierte Proteine nicht in ihre native Konformation falten. Die Chaperone binden an die entsprechenden Proteine und unterstützen deren Faltung. Falls die

Glykoproteine ihre native Konformation nicht einnehmen können, werden sie über ERAD degradiert (Trombetta et al., 2003; Helenius et al., 2004). Nach intrazellulärer Expression der beiden cytotoxischen Konstrukte K1- bzw. K28-RTA bildete eine Mutante in Abwesenheit von Cne1p eine vollständige Resistenz aus. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass dieses Lektin an der Retrotranslokation der Ricin A Kette beteiligt ist. Da bis jetzt noch kein biochemischer Nachweis einer glykosylierten RTA-Form im Rahmen dieser Arbeit gelungen war, könnte dies der erste Hinweis auf eine stattfindende posttranslationale Modifikation von RTA sein. Für das Säugerhomolog Calnexin (CNX) wurde zunächst auch vermutet, dass es lediglich als Lektin fungiert, jedoch nicht als molekulares Chaperon (Rodan et al., 1996; Zapun et al., 1997). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass CNX auch als „echtes“ Chaperon fungiert. Ähnlich wie die Hsp70/40- und Hsp90-Chaperone verhindert Calnexin die Aggregation fehlgefalteter glykosylierter und nicht-glykosylierter Proteine (Lee et al., 1997) und unterstützt die Proteinfaltung (Ehrensperger et al., 1996). Die Erkennung der glykosylierten Substrate erfolgt weiterhin durch ein luminales Chaperon, das Lektin-ähnliche Protein Yos9p (Nakatsukasa et al., 2001; Bhamidipati et al., 2005; Kim et al., 2005; Szathmary et al., 2005). Eine Beteiligung dieses Proteins wäre zu erwarten gewesen, da Ricin A zwei N-Glykosylierungsstellen besitzt und an mindestens einer dieser Stellen im ER-Lumen eine Glykosylierung erfährt. In den durchgeführten Sensitivitätstests an einer entsprechenden $\Delta yos9$ -Mutante wurde jedoch deutlich, dass die Deletion von YOS9 keinen Sensitivitätsverlust hervorruft. Dieses Ergebnis konnte weiterhin mit Hilfe des Fluoreszenz-„Reader“-Systems bestätigt werden. Auch Li et al. (2009) untersuchten die *in vivo* Expression von RTA in einer $\Delta yos9$ -Nullmutante und konnten einen sensitiven Phänotyp der transformierten Deletionsmutante feststellen und somit eine Beteiligung von Yos9p für die Retrotranslokation von RTA ausschließen. Sie postulierten, dass RTA wahrscheinlich nicht als typisches ER-Glykoprotein betrachtet wird und deshalb nicht als Substrat für die typische ERAD-Maschinerie der Glykoproteine zählt (Li et al., 2009). Im Gegensatz zu den Lektin-

ähnlichen Chaperonen erkennen molekulare Chaperone der Hsp70-Familie (z.B. BiP/Kar2p) im ER kurze hydrophobe Polypeptid-Motive, die auf der Oberfläche fehlgefalteter Proteine exponiert vorliegen (Bukau und Horwich, 1998; Helenius und Aebi, 2004). Die Bindung und spätere Freisetzung der fehlgefalteten Substrate ist ATP-abhängig und wird durch Co-Chaperone der Hsp40-Familie reguliert (Bukau und Horwich, 1998). Ferner wurden temperatursensitive *kar2*-Mutanten mit einem Defekt in der Peptid-Bindedomäne analysiert, die lediglich eine Störung in der ER-Retrotranslokation, nicht jedoch im ER-Import aufweisen (Kabani et al., 2003). Entsprechende Wachstumstests der Mutanten *kar2-1* und *kar2-133* nach *in vivo* Expression von K1- bzw. K28-RTA konnten jedoch nicht ausgewertet werden, da selbst bei der permissiven Temperatur sehr starke Wachstumsdefekte auftraten. Eine *Δscj1Δjem1* Doppelmutante zeigte nach intrazellulärer Expression beider toxischer RTA-Konstrukte einen sensitiven Phänotyp, was auf fehlende Beteiligung der beiden Hsp40 Co-Chaperone an der Retrotranslokation von RTA schließen lässt. Auch die Beteiligung einiger cytoplasmatischer Hsp70 Chaperone an der Degradation von ERAD-C Substraten konnte gezeigt werden (Fewell et al., 2001; Nishikawa et al., 2005). Im Gegensatz dazu scheinen die cytosolischen Chaperone jedoch nicht in die ER-assoziierte Degradation von ERAD-L und ERAD-M Substraten involviert zu sein (Taxis et al., 2003). Han et al. (2007) konnten nachweisen, dass das Hsp70 Chaperon Ssa1p und seine beiden Co-Chaperone Ydj1p und Hlj1p an der Degradation einer mutierten Form der Plasmamembran H⁺-ATPase (Pma1-D378S) beteiligt sind (Han et al., 2007). Weiterhin unklar bleibt jedoch, in welcher Art und Weise die Chaperone die Degradation der fehlgefalteten Membranproteine unterstützen. So wurde vermutet, dass Hsp70 und Hsp40 Chaperone eine Aggregation der Transmembran-Substrate vor oder während der Dislokation verhindern, analog des Hsp70 Chaperons BiP/Kar2p, das fehlgefaltete luminaire Proteine in einer löslichen Konformation hält bevor diese retrotransloziert werden (Nishikawa et al., 2001). Von den getesteten cytosolischen Chaperonen schienen Ssa1p, Ssa3p, Ssb1p und Ydj1p die Aktivität von RTA zu

beeinflussen. Da Ssb1p eher am posttranslationalen ER-Import beteiligt ist (Pfund et al., 1998), erscheint eine Beteiligung am Retrotranslokationsmechanismus unwahrscheinlich. Normalerweise kann davon ausgegangen werden, dass RTA löslich im ER-Lumen vorliegt und deshalb eher der ERAD-L Abbauweg an der Retrotranslokation des Toxins beteiligt ist. Der resistente Phänotyp in den Mutanten Δ ssa1, Δ ssa3 und Δ ydj1 nach intrazellulärer Expression von RTA lässt jedoch vermuten, dass diese Chaperone ebenfalls eine Rolle bei der Retrotranslokation von Ricin A spielen könnten, wohingegen für typische luminaire ERAD-Substrate wie CPY* bisher keine Beteiligung dieser Chaperone nachgewiesen werden konnte (Taxis et al., 2003). Deshalb stellte sich die Frage, ob RTA neben dem ERAD-L Abbauweg auch andere „Pathways“ nutzt um aus dem ER in das Cytosol zu gelangen. Der Doa10-Komplex vermittelt die ER-assoziierte Degradation von Membranproteinen mit fehlgefalteter cytosolischer Domäne (Huyer et al., 2004) und sollte folglich nicht am ER-Export von Ricin A beteiligt sein. Dieser Komplex unterscheidet sich vom Hrd1-Komplex durch das Fehlen der ER-luminalen Komponenten Hrd3p, Kar2p, Yos9p sowie der Membranproteine Der1p und Usa1p. Die zentrale Komponente des Doa10-Komplexes bildet die Ubiquitin-Ligase Doa10p, ein Membranprotein mit einer cytosolischen RING-Fingerdomäne (Swanson et al., 2001). Als Ubiquitin-konjugierende Enzyme fungieren Ubc7p, welches über das Ankerprotein Cue1p an die ER-Membran gebunden ist, sowie Ubc6p (Carvalho et al., 2006). Die Deletion von *UBC6* bewirkte einen vermindert sensitiven Phänotyp im Vergleich zum isogenen Wildtyp, während eine Δ doa10-Mutante überraschenderweise die *in vivo* Expression der beiden toxischen Konstrukte K1- bzw. K28-RTA überlebte. Die Ubiquitin-Ligase Doa10p arbeitet wie Hrd1p sowohl mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym Ubc6p als auch Ubc7p zusammen (Gardner et al., 2001; Swanson et al., 2001), wobei durch die Sensitivitätstests bestätigt werden konnte, dass lediglich das Enzym Ubc7p, welches durch das Transmembranprotein Cue1p an die ER-Membran rekrutiert wird (Biederer et al., 1997), eine entscheidende Rolle für die Aktivität von

RTA spielt. Li et al. (2009) untersuchten in ihrer Studie ebenfalls die Wirkung von RTA auf eine $\Delta doa10$ -Mutante. Sie konnten jedoch weder im Wachstumstest einen resistenten Phänotyp beobachten, noch in den durchgeführten „Pulse Chase“- Experimenten eine Stabilisierung von RTA in der entsprechenden Mutante nachweisen (Li et al., 2009). Aufgrund der bisherigen Ergebnisse musste erneut vermutet werden, dass K1- bzw. K28-RTA einem anderen Retrotranslokationsmechanismus folgen als die von Li et al. verwendete ER-luminale Variante Kar2-RTA. Dabei schienen bereits bei dem Import der Toxine in das ER entscheidende Differenzen zu bestehen. Es stellte sich nun die Frage, warum die in dieser Arbeit hergestellten RTA-Derivate mit den Signalsequenzen von K1 und K28 ptox am N-Terminus sowohl Komponenten des ERAD-L Abbaufweges als auch der ERAD-C Maschinerie für die Retrotranslokation benötigen. Um weitere Einblicke in die ER/Cytosol-Dislokation der beiden SP-RTA-Konstrukte zu erhalten, wurde deshalb untersucht, ob die Ubiquitinierung für die Retrotranslokation von RTA über die ER-Membran ausschlaggebend ist und ob Komponenten des Ubiquitin-Proteasom-„Pathways“ ebenfalls eine entscheidende Rolle im Intoxifikationsprozess der Ricin A Kette spielen. Ziel zukünftiger Untersuchungen sollte es daher sein, die Beteiligung der beiden Ubiquitin-Ligase-Komplexe Hrd1 und Doa10 sowie verschiedener Chaperone an der Retrotranslokation von RTA biochemisch zu bestätigen. In „Pulse Chase“-Experimenten wäre abhängig von der Mutation eine Stabilisierung der Ricin A Kette im ER oder Cytosol der entsprechenden ERAD-Mutante zu erwarten.

Nachweis der Ubiquitinierung der Ricin A Kette

Die meisten ERAD-Substrate unterliegen während der Retrotranslokation einer Polyubiquitinierung, die als Signal für den proteasomalen Abbau im Cytosol dient (Biederer et al., 1997). Die Ubiquitinierung der Proteine erfordert drei Klassen von Enzymen. Ubiquitin-aktivierende Enzyme (E1) hydrolysieren ATP und bilden eine

Thioester-Bindung zwischen sich und dem Protein Ubiquitin aus und übertragen schließlich das Ubiquitin-Molekül auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym (E2), welches ebenfalls eine Thioester-Bindung mit Ubiquitin ausbildet. Ubiquitin-Ligasen (E3) binden letztendlich sowohl E2 als auch Ubiquitin und katalysieren den Transfer des Ubiquitins auf das Substrat (Richly et al., 2005). Lysinreste stellen die Hauptansatzpunkte zur Anlagerung von Ubiquitin-Molekülen und dem damit verbundenen proteasomalen Abbau dar (Hochstrasser et al., 1999; Schmidt et al., 2005; Elsasser und Finley, 2005). Seltener kann Ubiquitinierung auch am N-Terminus des Zielproteins erfolgen (Breitschopf et al., 1998). Eine Reihe von A/B-Toxinen, die den zellulären Mechanismus der ER-assoziierten Degradation nutzen, um aus dem ER in das Cytosol der Zelle zu gelangen, besitzen in ihrer katalytischen A-Untereinheit keine beziehungsweise nur sehr wenige Lysinreste, während ihre B-Ketten einen normalen Lysingehalt aufweisen (London und Luongo, 1989). Hazes und Read (1997) postulierten daher, dass der geringe Lysingehalt einen Mechanismus darstellt, welcher es den Toxinen ermöglicht, einer Ubiquitin-vermittelten Degradation zu entgehen, nachdem die Toxine aus dem ER in das Cytosol transloziert sind (Hazes und Read, 1997). Vergleicht man die Primärsequenzen der katalytischen Untereinheiten von sieben zytotoxischen Typ II-RIPs, so besitzen die Toxine im Durchschnitt nur jeweils zwei Lysinreste pro Polypeptid. Im Gegensatz dazu zeigt der Vergleich von 36 Typ I-RIPs, dass diese durchschnittlich 18 Lysinreste enthalten (Deeks et al., 2002). Die 267 Aminosäuren große A-Kette von Ricin besitzt lediglich zwei Lysinreste an Position 4 und 239 (Lord und Roberts, 2005). Das Einfügen zusätzlicher Lysine in RTA, Abrin A sowie die A1-Kette des Cholera Toxins führte zu einem verstärkten proteasomalen Abbau der entsprechenden Toxine (Deeks et al., 2002; Rodighiero et al., 2002). Dies wiederum unterstützt die Annahme, dass der geringe Lysingehalt den Toxinen eine verlängerte Halbwertszeit im Cytosol ermöglicht, lange genug, um ihre Zielsubstrate zu schädigen (Lord und Roberts, 2005). Die Beobachtung, dass die Ubiquitin-Ligasen Hrd1p und Doa10p sowie die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc1p

und Ubc7p die Toxizität von RTA beeinflussen, deutet bereits indirekt auf eine Ubiquitinierung der Ricin A Kette hin. Um einen Hinweis auf eine mögliche Ubiquitinmodifikation von RTA und deren Bedeutung für die Retrotranslokation zu erhalten, wurde der Einfluss der Lysinreste auf die *in vivo* Toxizität von RTA untersucht. Dazu wurden lysinfreie RTA-Varianten hergestellt (K1-RTA^{Δlys}, K28-RTA^{Δlys}), in denen die Lysin-reste der A-Kette an Position 4 und 239 durch Arginin ersetzt wurden. Falls die Ubiquitinierung die treibende Kraft für die Retrotranslokation des Toxins darstellt, sollten Derivate, in denen endogene Lysine fehlen, im ER akkumulieren und eine verminderte Toxizität zeigen. Wie erwartet zeichneten sich die beiden lysinfreien RTA-Varianten im Wachstumstest durch einen drastischen Toxizitätsverlust aus, was indirekt auf eine Ubiquitinierung und deren Bedeutung für den ER-Export von Ricin A schließen lässt. Dieses Ergebnis stand jedoch erneut im Widerspruch zu den Untersuchungen von Li et al. und anderen Arbeitsgruppen, die eine Ubiquitinierung von RTA als Voraussetzung für die Toxin-Retrotranslokation ausschließen. So wurde gezeigt, dass RTA, welches mit Hilfe des ER-Importsignals von Kar2p in das ER-Lumen geschleust wurde, nach Austausch aller Lysinreste gegen Arginin, seine ursprüngliche *in vivo* Toxizität beibehält (Li et al., 2009). Auch Deeks et al. (2002) postulierten, dass der Austausch der Lysinreste in den A-Ketten der Pflanzentoxine Abrin und Ricin gegen Arginin, keinen Effekt auf die Toxizität oder Stabilität der Toxine erkennen ließ (Deeks et al., 2002). Eine fehlgefaltete RTA-Variante (Kar2-RTA Δ) verhielt sich dagegen wie ein typisches ERAD-Substrat, welches als polyubiquitiniertes Protein durch den Cdc48-Komplex aus dem ER exportiert wurde (Li et al., 2009). Als nächstes wurde deshalb untersucht, ob der Cdc48/Ufd1/Npl4-Komplex einen Einfluss auf die Toxizität der Ricin A Kette besitzt. Nach der Polyubiquitinierung eines ERAD-Substrates erfolgt die Extraktion aus der ER-Membran. Dieses Ereignis kann entweder vor oder während des Transports zum Proteasom erfolgen (Vembar und Brodsky, 2008). Dabei ist der Cdc48-Komplex an der Erkennung und Proteasom-Präsentation polyubiquitiniertes ERAD-Substrate beteiligt (Bays und

Hampton, 2002). Die AAA-ATPase Cdc48p der Hefe *S. cerevisiae* (homolog zu p97 im Säuger) bildet dabei einen stabilen Komplex mit den Cofaktoren Ufd1p und Npl4p (Hitchcock et al., 2001; Rape et al., 2001). Bei der Degradation von Membranproteinen könnte Cdc48p die Transmembrandomäne eines Proteins aktiv aus der ER-Membran herausziehen (Ye et al., 2003; Carlson et al., 2006; Ravid et al., 2006). Alternativ könnte Cdc48p auch Polypeptide, die bereits retrotransloziert wurden, segregieren (Nakatsukasa et al., 2008). Es ist wahrscheinlich, dass die ATPase auch nach der Translokation der ERAD-Substrate noch aktiv ist, da eine Interaktion von Cdc48p mit verschiedenen Ubiquitin-bindenden Enzymen, darunter auch das Polyubiquitinketten verlängernde Enzym (E4) Ufd2p, nachgewiesen werden konnte (Richly et al., 2005; Rumpf und Jentsch, 2006). Der Komplex ist in Hefe aufgrund seiner Interaktion mit der UBX-Domäne des Membranproteins Ubx2p an die ER-Membran rekrutiert (Neuber et al., 2005; Schubert und Buchberger, 2005). Mutanten mit Defekten in der ATPase-Domäne von Cdc48p sind unfähig, ER-Proteine in das Cytosol zu translozieren, was wiederum impliziert, dass der Cdc48-Komplex Proteine aus dem ER in einem ATP-abhängigen Mechanismus extrahiert (Ye et al., 2003). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass in Abwesenheit von Cdc48p oder einer seiner Cofaktoren Ufd1p und Npl4p die proteasomale Degradation verschiedener Substrate wie z.B. dem Membranprotein Ste6p sowie löslicher ERAD-Substrate wie CPY* blockiert ist und die Proteine in der ER-Membran akkumulieren (Jarosch et al., 2002; Hoyer et al., 2004). Die entsprechenden Mutanten *cdc48-3*, *ufd1-1* und $\Delta npl4$ wurden mit den cytotoxischen Konstrukten K1- bzw. K28-RTA transformiert und im Wachstumstest analysiert. Wie alle bisher getesteten temperatursensitiven Mutanten ließen sich auch die *cdc48-3* und *ufd1-1* Mutante im Sensitivitätstest nicht eindeutig auswerten, da selbst bei der permissiven Temperatur sehr starke Wachstumsdefekte auftraten. Eine $\Delta npl4$ Nullmutante zeigte jedoch nach *in vivo* Expression der beiden Konstrukte einen resistenten Phänotyp aus. Dieses Ergebnis lieferte einen indirekten Hinweis auf

eine Beteiligung des Cdc48-Komplexes an der Retrotranslokation der ubiquitinierten Ricin A Kette.

Nach der Freisetzung der ERAD-Substrate von der ER-Membran, binden die cytosolischen Proteine Rad23p und Dsk2p polyubiquitinierte Substrate über ihre C-terminale Ubiquitin-assoziierte Domäne (UBA). Außerdem besitzen die beiden Proteine N-terminal eine Ubiquitin-ähnliche Domäne (UBL), die an eine spezifische Stelle der 19S-Kappen-Untereinheit des Proteasoms bindet (Wilkinson et al., 2001; Rao und Sastry, 2002; Hartmann-Petersen et al., 2003). Aufgrund dieser Charakteristika ist zu vermuten, dass die beiden Proteine als Zubringer polyubiquitiniertes Substrate zum Proteasom fungieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die proteasomale Degradation nicht aller ERAD-Substrate von Rad23p und Dsk2p abhängig ist. So wird die Degradation des cytosolischen ERAD-Substrates CPY^{*}-GFP in einer $\Delta rad23\Delta dsk2$ Doppelmutante nicht beeinflusst (Medicherla et al., 2004). Richly et al. (2005) postulierten, dass zwei parallele Routen existieren, über welche die fehlgefalteten Proteine ubiquitiniert und zum Proteasom transportiert werden. In einem Abbauweg werden die Substrate zunächst durch Ubiquitin-Ligasen mono- oder diubiquitiniert. Danach heftet der Ubiquitinketten-Assemblierungsfaktor Ufd2p weitere Ubiquitin-Moleküle an, wodurch ein oligoubiquitiniertes Substrat entsteht, das drei bis sechs Ubiquitin-Moleküle besitzt. Cdc48p und seine beiden Cofaktoren Ufd1p und Npl4p kooperieren dabei mit Ufd2p und begrenzen die Länge der Ubiquitinkette über einen bisher nicht bekannten Mechanismus. Das oligoubiquitinierte Substrat wird schließlich durch die Ubiquitin-bindenden Proteine Rad23p und Dsk2p zum Proteasom geleitet. In einem alternativen „Pathway“ werden die fehlgefalteten Substrate durch Ubiquitin-Ligasen polyubiquitiniert und direkt durch die 19S-Kappen-Untereinheit Rpn10p des Proteasoms erkannt. Auch hier ist nicht auszuschließen, dass die Ubiquitin-bindenden Proteine Rad23p und Dsk2p sowie andere Faktoren eine mitwirkende Rolle übernehmen (Richly et al., 2005). In Abwesenheit von Rad23p, Dsk2p und Ufd2p zeigte sich ein Wachstum aller Transformanten nach intrazellulärer Expression von Ricin A im ER-

Lumen. Das Ergebnis der Wachstumstests deutete darauf hin, dass weder Rad23p, noch Dsk2p für die Toxizität von RTA verantwortlich sind. Bei Abwesenheit eines der beiden Proteine findet trotzdem eine Degradation von RTA statt, wobei davon ausgegangen werden muss, dass RTA auch über einen alternativen Weg abgebaut werden kann. Dabei könnte es sich um den von Richly et al. postulierten Weg über Rpn10p, einem nicht ATPase-Protein des 19S regulatorischen Partikels handeln (Richly et al., 2005). Durch direkte Bindung des Proteasoms an polyubiquitiniertes RTA wird auch ein schnellerer Abbau des Toxins gewährleistet als bei dem über den Cdc48-Komplex und Rad23p/Dsk2p stattfindenden Mechanismus. Doch Medicherla et al. (2004) konnten ebenfalls zeigen, dass die Proteine Rad23p und Dsk2p überlappende Funktionen einnehmen (Medicherla et al., 2004). In Mutanten, bei denen lediglich eines der beiden Gene deletiert war, konnten nur geringe Mengen an akkumulierten polyubiquitinierten Proteinen nachgewiesen werden, während in einer $\Delta rad23\Delta dsk2$ -Doppelmutante ein deutlicher Anstieg in der Akkumulationsrate polyubiquitinerter Proteine zu verzeichnen war (Saeki et al., 2002). Um eine eindeutige Aussage über die Rolle der beiden „Zuliefer“-Proteine in Bezug auf RTA treffen zu können, sollte die *in vivo* Expression von Ricin A in einer Doppel-„Knock-out“-Mutante analysiert werden. Auch das Ubiquitinketten-verlängernde Protein Ufd2p scheint an der *in vivo* Toxizität und der Polyubiquitinierung der Ricin A Kette nicht beteiligt zu sein. Ufd2p ist das erste identifizierte E4 Enzym, das Mono-/Di-Ubiquitinreste zu einer Polyubiquitinkette verlängert (Koegl et al., 1999). Die Assemblierung von Polyubiquitin-Ketten ist jedoch nicht einzig von E4 Enzymen abhängig, sondern kann auch durch die Ubiquitin-Ligasen selbst bewerkstelligt werden (Richly et al., 2005). Da sich ein gewisser Prozentsatz an Proteasomen auf der Oberfläche der ER-Membran befindet, sind diese optimal positioniert, um ERAD-Substrate direkt aufzunehmen und zu degradieren (Rivett, 1993). In Hefe- und Säugerzellen konnte nachgewiesen werden, dass die Proteasomen über den Sec61-Kanal an die ER-Membran binden und mit den Ribosomen um die Bindung an den Kanal konkurrieren. Diese

Interaktion ist ATP-abhängig und wird durch den regulatorischen 19S-Partikel sowie Protease-sensitive cytosolische Loops des Sec61-Komplexes vermittelt (Kalies et al., 2005). Die Substraterkennung des 26S-Proteasoms wird vermutlich durch die Interaktion spezifischer Untereinheiten des regulatorischen 19S-Komplexes mit den Polyubiquitinketten der zum Abbau markierten Substrate vermittelt (Chiechanover, 1998). Die regulatorische 19S-Untereinheit besteht aus einem „Deckel-Komplex“, der aus acht Nicht-ATPase-Untereinheiten aufgebaut ist (Rpn3p, Rpn5-9p, Rpn11p, Rpn12p), während die „Basis-Untereinheit“ sechs ATPase-Proteine (Rpt1-6p) und 2 Nicht-ATPase-Einheiten (Rpn1p, Rpn2p) enthält (Glickmann et al., 1998; Saeki et al., 2000). Das Protein Rpn10p („regulatory particle non-ATPase-10“), eine weitere 19S-Untereinheit, die über ihre UIM-Domäne („ubiquitin-interacting motif“) Polyubiquitin-Ketten binden kann, befindet sich an der Grenzfläche zwischen Deckel und Basis (Glickmann et al., 1998). Die Deletion von *RPN10* führt nicht zu einem Wachstumsdefekt in Hefen und lediglich zu geringen Defekten bei der Protein-Degradation (Kominami et al., 1997; Fu et al., 1998; Wilkinson et al., 2000), was vermuten lässt, dass neben Rpn10p weitere Faktoren existieren, die polyubiquitinierte Substrate binden können. Lambertson et al. (1999) konnten den *in vivo* Nachweis erbringen, dass die beiden Proteine Rpn10p und Rad23p bei der Ubiquitin-abhängigen Degradation von Substraten überlappende Funktionen einnehmen (Lambertson et al., 1999). Neuere Studien belegen, dass die UIM-Domäne von Rpn10p die Aktivität von Rad23p und Dsk2p komplementiert (Elsasser et al., 2004; Verma et al., 2004), wobei die beiden Proteine stark überlappende Funktionen zu Rpn10p besitzen (Elsasser et al., 2004; Kim et al., 2004). Eine Mutante, bei der die drei Gene *DSK2*, *RAD23* und *RPN10* deletiert wurden, zeigte die stärkste Akkumulation an polyubiquitinierten Substraten im Cytosol im Vergleich zu Einzel- bzw. Doppel-„Knock-out“-Stämmen (Saeki et al., 2002). Eine entsprechende $\Delta rpn10$ -Deletionsmutante zeigte Wildtypsensitivität gegen intrazellulär exprimiertes RTA, was darauf hindeutet, dass die Abwesenheit dieses Proteins eine Stabilisation der Ricin A Kette im Cytosol der Hefen

bewirkt. Für hHR23, das humane Homolog-Protein zu Rad23p, konnte nachgewiesen werden, dass es über seine N-terminale „Ubiquitin-like“-Domäne (UBL) an das humane Rpn10p bindet (Hiyama et al., 1999) und dadurch mit dem 26S-Proteasom interagiert (Schauber et al., 1998; Wilkinson et al., 2001). Bei einer $\Delta rpn10$ -Mutante käme es folglich zu einer Störung dieses Mechanismus, was die Degradation von RTA behindern würde. Um den genauen Mechanismus zu verstehen, durch welchen die polyubiquitinierten Toxin-Moleküle zum Proteasom geleitet werden, müssten künftig noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Lipson et al. (2008) schlugen außerdem ein Modell vor, in dem die ATPase Cdc48p ERAD-Substrate aus dem ER zieht, die anschließend mit Hilfe einer AAA-ATPase des 19S regulatorischen Partikels, Rpt4p, zum 26S Proteasom überführt und mit Hilfe einer weiteren ATPase, Rpt2p, im 20S Kernpartikel degradiert werden (Lipson et al., 2008). Die Analyse der *rpt4B*-Mutante auf die *in vivo* Toxizität von RTA wäre sinnvoll, um einen tieferen Einblick in den genauen Retrotranslokationsmechanismus der Ricin A Kette zu erhalten. Für das Protein Rad23p konnte weiterhin eine Interaktion mit Png1p nachgewiesen werden. Dieses cytosolische Deglykosylierungs-Enzym entfernt N-glykosidisch gebundene Glukane von ER Substraten (Suzuki et al., 2001), damit diese effizient durch das Proteasom abgebaut werden können (Hirsch et al., 2003). Eine $\Delta png1$ -Deletionsmutante zeigte jedoch nach *in vivo* Expression von RTA einen dem isogenen Wildtyp vergleichbaren Phänotyp, was eine Beteiligung dieses Enzyms an der Toxizität von RTA ausschließt. Eigentlich wäre eine Mitwirkung von Png1p zu erwarten gewesen, da Ricin A im ER-Lumen glykosyliert und somit ein Substrat für das Enzym darstellen sollte. Kim et al. (2006) konnten zeigen, dass eine katalytisch inaktive RTA-Variante nach Glykosylierung im ER als *in vivo* Substrat für den Png1-Rad23 Degradationsweg fungiert (Kim et al., 2006), während für natives RTA bisher keine Interaktion mit Png1p nachgewiesen wurde (Li et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit war es nicht gelungen eine Glykosylierung von RTA *in vivo* nachzuweisen, was wiederum das Ergebnis der $\Delta png1$ -Deletionsmutante begründen könnte.

Ubiquitin ist ein globuläres Protein, das selbst sieben Lysinreste besitzt (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63), die sich jeweils mit einem anderen Ubiquitin-Molekül verbinden und somit Polyubiquitin-Ketten ausbilden können (Ikeda und Dikic, 2008). Polyubiquitin-Ketten, die über den Lysinrest K48 von Ubiquitin verknüpft sind, sind normalerweise dafür verantwortlich, dass die markierten Proteine zur proteasomalen Degradation geleitet werden (Chen und Sun, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass ein Aneinanderhängen mehrerer Ubiquitin-Moleküle auch an die Lysinreste K29 und K63 stattfinden kann und hauptsächlich von den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen Ubc4p und Ubc5p abhängig ist. Die Polyubiquitinierung über den Lysinrest K63 spielt hingegen eine entscheidende Rolle bei der Stressantwort (Arnason und Ellison, 1994), dem Proteintransport sowie der DNA-Reparatur (Pickart und Eddins, 2004). Die Überexpression einer Ubiquitinvariante (UbRR^{48/63}), in der beide Lysinreste an den Positionen 48 und 63 durch Arginin ausgetauscht wurden, verhindert durch ihren Einbau das Anheften weiterer Ubiquitin-Moleküle. Dadurch ist die Bildung funktionaler Polyubiquitin-Ketten drastisch gestört und es kommt zur Akkumulation fehlgefalteter, nicht-ubiquitinerter Substrate im ER (Arnason und Ellison, 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde der sensitive Hefestamm SEY6210 mit den Toxin-Varianten K1- bzw. K28-RTA sowie dem Plasmid pW021, welches die regulierte Expression der mutierten Ubiquitin-Variante UbRR^{48/63} erlaubt, cotransformiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass bei nicht stattfindender Polyubiquitinierung die Toxinaktivität von RTA deutlich eingeschränkt war. Diese Beobachtung stützt wiederum die These, dass der ER-Export von Ricin A eine Polyubiquitinierung erfordert. Trotzdem zeigten die Transformanten keine komplette Toxin-Resistenz, was darauf hindeutet, dass immer noch ein Teil des Toxins in das Cytosol transloziert werden kann. Ye et al. (2003) konnten zeigen, dass p97, das Säugerhomolog zu Cdc48p, sowohl polyubiquitinierte als auch nicht-ubiquitinierte Substrate erkennt. In Zellen, die das humane Cytomegalovirus-Protein US11 exprimieren, wird die schwere Kette des MHC Klasse I-Komplexes retrotransloziert und anschließend degradiert

(Wiertz et al., 1996). Dieser Komplex kann spezifisch mit p97 interagieren, ohne dass zuvor eine Modifikation mit Ubiquitin stattgefunden hat. Das Cdc48p/p97-Homolog der Archaeen, VAT, muss ebenfalls nicht-ubiquitinierte Substrate erkennen können, da bei Archae-Bakterien bislang keine Ubiquitinierung beschrieben wurde (Rapoport et al., 2003).

Die Ubiquitinierung von Proteinen wird durch die koordinierte Aktivität einer Vielzahl von Ubiquitin-konjugierenden Enzymen, Ubiquitin-Ligasen sowie deubiquitinierenden Enzymen (DUBs) kontrolliert (D'Andrea und Pellman, 1998). DUBs katalysieren die Disassemblierung von Ubiquitin-Protein-Konjugaten, was den Prozess der Ubiquitinierung reversibel macht. Das am besten charakterisierte Deubiquitinierungsenzym in Hefe ist Doa4p, welches sowohl eine entscheidende Rolle bei der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse, als auch bei der Ubiquitin-Homöostase spielt (Papa und Hochstrasser, 1993; Singer et al., 1996; Papa et al., 1996; Swaminathan et al., 1999). Innerhalb des Ubiquitin-Proteasom Abbauweges scheint Doa4p eine relativ späte Funktion einzunehmen, indem es Ubiquitin von den zum Abbau markierten Substraten recycelt und damit den intrazellulären Pool an freiem Ubiquitin aufrecht erhält (Chung und Baek, 1999). Eine signifikante Fraktion von Doa4p ist mit dem 26S-Proteasom assoziiert (Amerik et al., 2000). In $\Delta doa4$ -Mutanten erfolgt die Degradation einiger Proteine wie z.B. dem Mata2-Repressor der Hefe verlangsamt (Chen et al., 1993). Nach der intrazellulären Expression von K1- bzw. K28-RTA zeigte die $\Delta doa4$ -Deletionsmutante einen resistenten Phänotyp, was eine Beteiligung dieses Enzyms an der Toxizität von RTA ausschließt. In Hefe existieren jedoch 16 weitere DUBs, wobei sehr wenig über deren physiologische Funktion oder natürlichen Substrate bekannt ist (Wilkinson und Hochstrasser, 1998). So unterstützt das deubiquitinierende Enzym Ubp14p die proteasomale Degradation zum Abbau markierter Substrate (Hegde et al., 1997), wobei in einer $\Delta ubp14$ -Mutante die Halbwertszeit einiger Substrate des Ubiquitin-Abbauweges verlängert ist. Auch für die Ubiquitin carboxyterminale Hydrolase Ap-uch konnte nachgewiesen werden, dass sie mit dem

26S-Proteasom assoziiert und für das Recycling von freiem Ubiquitin verantwortlich ist (D'Andrea und Pellman, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit war es gelungen, eine *in vivo* Interaktion zwischen Ubiquitin und K28-RTA mit Hilfe des BiFC-Assays nachzuweisen. Der BiFC-Assay („bimolecular fluorescence complementation“) stellt eine erweiterte Form des „Yeast-Two-Hybrid“-Systems dar und beruht auf der Rekonstitution zweier Fragmente eines Fluorophors zu einem funktionellen, fluoreszierenden Protein (Hu et al., 2002). BiFC wurde bereits eingesetzt, um die Interaktion zwischen einer großen Auswahl von Proteinen in verschiedenen Zelltypen und Organismen zu untersuchen (Kerppola, 2006). Dabei konnten auch verschiedene Substrat-Enzym-Interaktionen von Ubiquitin-Ligasen, Kinasen und Nukleotid-Austauschfaktoren aufgeklärt werden (von der Lehr et al., 2003; de Virgilio et al., 2004; Blondel et al., 2005). Um Ubiquitin-Konjugate *in vivo* visualisieren zu können, wurde ein spezieller Ubiquitin-vermittelter „fluorescence complementation“ Assay (UbFC) entwickelt und eingesetzt. In diesem Assay wurde ein Teil des Fluoreszenzproteins an Ubiquitin fusioniert, während der dazu korrespondierende Teil des Fluorophors an das vermeintlich interagierende Protein angefügt wurde. So konnte eine Ubiquitinierung des Proteins Jun, welches ein Regulatorprotein für die Transkription darstellt, mit Hilfe des UbFC-Assays nachgewiesen werden (Fang und Kerppola, 2004). Ausgehend von dem von Schäuble (2008) etablierten „Split“-mCherry-System wurde in dieser Arbeit die *in vivo* Interaktion zwischen RTA und dem Protein Ubiquitin in Hefezellen untersucht. Dabei wurde wiederum die mutierte RTA-Variante RTA^{E177D} verwendet, um den Zellen genügend Zeit zu geben, eine eventuelle Protein-Protein-Interaktion auszubilden. Damit die Ergebnisse interpretiert werden konnten, musste das Testsystem zunächst mit Hilfe von Kontrollansätzen verifiziert werden. Dazu wurden eine Positiv- und zwei Negativkontrollen entsprechend kotransformiert und analysiert. Als Positivkontrolle wurde das Hsp40 Co-Chaperon Sis1p verwendet, das unter nativen Bedingungen Homodimere ausbildet, indem sich die Monomere über die am C-Terminus befindlichen

Dimerisierungsdomänen zusammenlagern (Sha et al., 2000). In dieser Arbeit wurden die von Schäuble hergestellten Sis1p-Varianten koexprimiert, die jeweils am C-Terminus mit den „split“-mCherry-Fragmenten fusioniert waren (Sis1p-Li-MN + Sis1p-Li-MC). Nach Induktion der Koexpression konnten viele Zellen mit signifikanten Fluoreszenzsignalen im Cytoplasma nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurden zum einen Hefezellen mit den unfusionierten „split“-mCherry-Fragmenten MN und MC transformiert. Da keine Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte, war sicher, dass sich die mCherry-Fragmente weder zufällig noch spezifisch zusammenlagern, um die Fluoreszenz des vollständigen Fluorophors zu rekonstituieren. Als weitere Negativkontrolle wurde das mCherry-Teilstück MN zusammen mit dem „split“-mCherry-RTA^{E177D}-Fusionsprotein koexprimiert. Auch hierbei zeigten die entsprechend cotransformierten Hefezellen keine Fluoreszenzsignale und es konnte letztendlich bestätigt werden, dass die Signale der Positivkontrolle ausschließlich durch Zusammenlagerung der beiden Sis1p-Moleküle zu einem Homodimer zustande kamen. Die bisherigen Ergebnisse lieferten somit eindeutige Hinweise, dass RTA, welches mit Hilfe eines ER-Importsignals in das ER dirigiert wird, Komponenten der ER-assoziierten Degradation nutzt, um in das Cytosol zu gelangen. Dabei scheint die Ubiquitinierung von Ricin A einen entscheidenden Einfluss auf die Retrotranslokation des Toxins zu haben. Mit Hilfe des BiFC wurden zwei verschiedene „split“-mCherry-Fusionsproteine (MC-RTA^{E177D} und pre(K28)-MC-RTA^{E177D}) bezüglich einer Interaktion mit Ubiquitin untersucht. Dabei wurde deutlich, dass lediglich bei Hefezellen, die mit MN-Ubiquitin und pre(K28)-MC-RTA^{E177D} cotransformiert wurden, Fluoreszenzsignale im Cytoplasma nachgewiesen werden konnten. Die mit der „split“-mCherry-RTA-Fusion ohne K28-Signalsequenz cotransformierten Hefen ließen wie erwartet keine Fluoreszenz erkennen. Damit konnte eine direkte Wechselwirkung zwischen der ER-luminalen RTA-Variante und Ubiquitin gezeigt werden und somit die bereits zuvor erhaltenen indirekten Hinweise für eine Ubiquitinierung von retrotransloziertem

RTA bestätigt werden. Auffallend war, dass die Signale nicht bei allen Hefezellen detektiert werden konnten und auch unterschiedlich stark waren. Doch bereits Fang und Kerppola (2004) gaben bei der Anwendung des UbFC-Assays zu bedenken, dass lediglich eine kleine Subpopulation an Ubiquitin-modifizierten Proteinen zu einem gewissen Zeitpunkt in der Zelle vorliegt, während der größte Teil als nicht-modifizierte Population präsent ist. Diese Tatsache stellt sicherlich einen kritischen Punkt für die Untersuchung von Wechselwirkungen bestimmter Proteine mit Ubiquitin dar (Fang und Kerppola, 2004). Da ein biochemischer Nachweis des ER-Importes der beiden SP-RTA-Varianten mittels radioaktiven Markierungsexperimenten in dieser Arbeit nicht gelang, musste vermutet werden, dass nur wenige RTA-Moleküle in das ER eintreten, dieses im Anschluss wieder verlassen, um letztendlich im Cytosol einen toxischen Effekt auszulösen. Aufgrund dieser geringen Menge an Toxin, das in das Cytosol transloziert wurde, wäre eigentlich nicht zu erwarten gewesen, dass die Interaktion der Ricin A Kette mit Ubiquitin Fluoreszenzsignale hervorruft, die für eine Visualisierung stark genug sind. Aufgrund dieser Tatsache und der zuvor erhaltenen Ergebnisse zur Retrotranslokation und Ubiquitinierung von K1-/K28-RTA könnte die Theorie greifen, dass der größte Teil des Toxins noch während der Translokation in das ER als ERAD-Substrat erkannt, ubiquitiniert und schließlich degradiert wird. Lediglich ein geringer Teil des Toxins kann in seine native Konformation zurückfalten und seine Cytotoxizität entfalten. Die wenigen RTA-Moleküle, die für die Auslösung des sensitiven Phänotyps verantwortlich sind, könnten durch den BiFC-Assay jedoch nicht erfasst werden. Ein Ziel weiterer Untersuchungen sollte es daher sein, „split“-mCherry-Fusionen herzustellen, bei denen die Lysinreste sowohl in RTA als auch in der verwendeten prä-Region gegen Arginin ausgetauscht sind, um die Ubiquitinierung von RTA näher untersuchen zu können. Interessant wäre auch die Analyse einer „split“-mCherry-Fusion, die am N-Terminus die Signalsequenz des hefeeigenen ER-Import-Signals von Kar2p enthält, um die Beobachtungen von Li et al. (2009) zur Retrotranslokation von nativem sowie fehlgefaltetem RTA zu

untermauern. Interessant wäre auch, die verschiedenen „split“-mCherry-Fusionsproteine in einer Mutante mit Defekt in der Ubiquitinierung (z.B. $\Delta hrd1$ oder $\Delta doa10$) zu überprüfen. Ein sinnvoller Versuchsansatz könnte zudem der Nachweis von polyubiquitiniertem RTA in einer Mutante mit Defekt in der Deubiquitinierung und proteasomalen Degradation sein, in deren Cytosol die polyubiquitinierten Toxinmoleküle akkumulieren sollten.

Die Annahme, dass Ricin A über einen Retrotranslokationsmechanismus aus dem ER exportiert wird, der eine Polyubiquitinierung des Toxins erfordert, konnte durch viele indirekte Hinweise bestätigt werden. Der genaue Weg des Toxins zum Proteasom konnte jedoch noch nicht vollständig geklärt werden. Ein biochemischer Nachweis der Ubiquitin-Modifikation mittels „Pulse-Labeling“ konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erbracht werden. Es war jedoch gelungen, eine *in vivo* Interaktion zwischen Ubiquitin und K28-RTA mit Hilfe des BiFC-Assays nachzuweisen. Aufgrund des fehlenden biochemischen Nachweises der RTA-Glykosylierung sowie der Ergebnisse der Wachstumstests der $\Delta hrd1$ - und $\Delta doa10$ -Mutanten und den Untersuchungen von Li et al., (2009), muss davon ausgegangen werden, dass K1- bzw. K28-RTA keine „typischen“ ER-luminalen RTA-Derivate wie z.B. Kar2-RTA darstellen. Vielmehr scheint es sich um „klassische“ ERAD-Substrate zu handeln, die mit Hilfe ihrer Signalsequenz zwar zum ER transportiert werden, dort aber nicht vollständig durch den Import-Kanal in das ER-Lumen gelangen. Es erfolgt zwar eine Abspaltung der Signalsequenz, die Toxine werden jedoch noch an oder innerhalb der ER-Membran als ERAD-Substrat erkannt, polyubiquitiniert und degradiert. Dabei scheint die Ubiquitinierung der Substrate sowohl über den ERAD-L als auch ERAD-M Abbauweg zu erfolgen. Es bleibt abzuklären, ob das Fehlen der pro-Region der jeweiligen Killertoxin-Vorläufer K1 und K28 für diesen ineffizienten ER-Import von RTA verantwortlich ist. Desweiteren bleibt zu bedenken, dass das Anfügen „fremder“ Signalsequenzen an Proteine immer zu einer Störung der nativen Konformation

beziehungsweise der ursprünglichen Funktion des Proteins führen kann.

Vergleich der Retrotranslokation von intrazellulär exprimiertem RTA unter Verwendung verschiedener ER-Importsignale

Nach den bisherigen Ergebnissen deutet alles daraufhin, dass die native Ricin A Kette in Abhängigkeit ihrer jeweiligen Signalsequenz unterschiedlichen Wegen folgt, um aus dem ER in das Cytosol zu gelangen. Anhand der Ergebnisse von Li et al. (2009), die die Retrotranslokation einer RTA-Variante mit dem hefeeigenen ER-Importsignal von Kar2p untersuchten sowie der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse werden im Folgenden zwei Modelle vorgestellt, die die Gemeinsamkeiten und Unterschiede beider Retrotranslokationsmechanismen deutlich machen sollen.

1) Retrotranslokation von Kar2-RTA/Kar2-RTA Δ

Li et al. (2009) untersuchten in ihrer Studie den Retrotranslokationsmechanismus einer nativen RTA-Variante (RTA) sowie einer fehlgefalteten RTA-Form (RTA Δ), bei der ein 5 Aminosäuren großer Abschnitt im katalytischen Zentrum deletiert wurde. Ein effizienter ER-Import der beiden RTA-Derivate wurde durch das hefeeigene ER-Import-Signal von Kar2p gewährleistet (Simpson et al., 1999). Zur Identifizierung beteiligter ERAD-Komponenten an der Toxizität von RTA wurden sowohl biochemische Analysen („Pulse Chase“-Experimente) als auch Wachstumstests eingesetzt. Für beide RTA-Varianten konnte eine Beteiligung des Hrd1/Hrd3/Der1-Komplexes nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass RTA auch noch nach Austausch aller Lysinreste gegen Arginin diese ERAD-Komponenten zur Retrotranslokation benötigt. Somit scheint die Ubiquitinierung keine Voraussetzung für die ER/Cytosol-Dislokation von RTA darzustellen.

Vielmehr wird die Annahme gestützt, dass der Hrd1/Hrd3/Der1-Komplex auch den Kern eines Membran-durchspannenden Retrotranslokons ausbilden könnte (Gauss et al., 2006). Für beide RTA-Derivate konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass sie vor ihrer Dislokation in das Cytosol in den Golgi eintreten müssen, wobei das Protein Erp2p, das in COPII-Vesikeln lokalisiert und am ER-Golgi-Transport beteiligt ist (Springer et al., 2000), eine wichtige Rolle für die Toxizität von RTA zu spielen scheint. Obwohl Hsp70/Hsp40-Chaperone sowie Lektin-ähnliche Chaperone am ERAD vieler fehlgefalteter Proteine beteiligt sind (Nishikawa et al., 2001; Denic et al., 2006), konnte kein Beweis für eine Mitwirkung ER-luminaler Chaperone erbracht werden. Auch cytosolische Chaperone scheinen für die Toxizität von RTA keine Rolle zu spielen. Während sich polyubiquitiniertes RTA Δ in den weiteren Schritten wie ein typisches ERAD-Substrat verhält und den Cdc48-Komplex, den Rad23-Png1-Komplex sowie die AAA-ATPase Rpt2p des 19S regulatorischen Partikels benötigt, folgt die native RTA-Variante einem anderen Weg. Dabei sind vor allem die beiden Proteine Rpt4p und Rpt1p der 19S Proteasomen-Kappe, welche ERAD-Substrate direkt aus dem ER extrahieren kann (Mayer et al., 1998; Lipson et al., 2008), beteiligt. Es ist bekannt, dass die Proteasomen-Kappe mit dem Sec61-Translokon assoziiert ist (Mayer et al., 1998; Lee et al., 2004; Kalies et al., 2005) und dadurch den ER-Export von meist nicht polyubiquitinierten ERAD-Substraten steuern kann (Xie und Varshavsky, 2000), so dass dieser Mechanismus auch für natives RTA nicht auszuschließen ist.

2. Retrotranslokation von K1-/K28-RTA

Obwohl es sich bei den beiden Konstrukten, die in dieser Arbeit intrazellulär im ER exprimiert wurden, ebenfalls um natives RTA handelt, zeigten die RTA-Derivate K1- bzw. K28-RTA einen völlig anderen Retrotranslokationsweg als Kar2-RTA. Auch zu der fehlgefalteten RTA Δ -Variante, die sich als typisches ERAD-Substrat verhielt, waren Unterschiede zu erkennen. Leider konnte aufgrund eines fehlenden Glykosylierungs-Nachweises von RTA ein effizienter ER-Import der Ricin A Kette durch Verwendung der beiden Signalsequenzen von K1 bzw. K28 ptox nicht gezeigt werden. Dies lieferte bereits einen ersten Hinweis, dass trotz eines sensitiven Phänotyps in Wildtyp-Hefezellen nach *in vivo* Expression von K1- bzw. K28-RTA, der größte Teil des Toxins nicht in das ER eintritt. Ausgehend von den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen wird ein Modell vorgeschlagen, das den intrazellulären Transport von Ricin A nach Expression im ER beschreibt (Abbildung 40). Durch die *in vivo* Expression der beiden cytotoxischen Konstrukte in Hefe-Deletionsmutanten mit Defekten im posttranslationalen ER-Import sowie im Signalpeptidase-Komplex konnte gezeigt werden, dass die Konstrukte zumindest teilweise in den ER-Importkanal eingeführt werden und die Signalsequenz abgespalten wird. Danach gelangt der größte Teil des Toxins jedoch nicht in das ER-Lumen, sondern wird noch in bzw. an der ER-Membran als ERAD-Substrat erkannt. Dabei scheinen sowohl der Hrd1-Komplex, der die Degradation fehlgefalteter luminaler Proteine (ERAD-L) vermittelt, als auch der Doa10-Komplex, der für den Abbau von Membranproteinen mit fehlgefalteten cytosolischen Domänen (ERAD-C) verantwortlich ist (Carvalho et al., 2006), beteiligt zu sein. Das Toxin muss folglich nicht in den Golgi-Apparat eintreten, denn eine Beteiligung des Proteins Erp2p, das in COPII-Vesikeln lokalisiert und am ER-Golgi-Transport beteiligt ist (Springer et al., 2000), konnte durch Sensitivitätstests ausgeschlossen werden. Durch verschiedene indirekte Hinweise aber auch durch den Nachweis der *in vivo* Interaktion von K28-RTA mit Ubiquitin mittels

BiFC, kann von einer Polyubiquitinierung des Toxins ausgegangen werden. Für den ER-Export spielt der Cdc48-Komplex eine entscheidende Rolle, wobei auch verschiedene ER-luminale und cytosolische Chaperone, die auch am posttranslationalen ER-Import des Toxins beteiligt sind, einen signifikanten Einfluss auf den Export von RTA ausüben könnten. Der genaue Weg des polyubiquitinierten Toxins zum Proteasom konnte noch nicht geklärt werden. Das Toxin kann sowohl über den Cdc48-Komplex und die beiden „Zubringerproteine“ Rad23p/Dsk2p zum Proteasom gelangen, wenngleich auch eine direkte Bindung des Toxins über das Polyubiquitinketten-bindende Protein Rpn10p der 19S-Kappe des Proteasoms an der ER-Membran nicht auszuschließen ist.

V Zusammenfassung

Das Pflanzentoxin Ricin aus *Ricinus communis* gehört zur Gruppe der A/B-Toxine, die aus einer katalytischen A-Kette und einer oder mehreren B-Ketten aufgebaut sind. Das Toxin gelangt über die Bindung der B-Kette an Galaktose-haltige Strukturen auf der Zelloberfläche endozytotisch in die Zielzelle und wird in einem retrograden Prozess bis zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) transportiert. Bislang wird angenommen, dass der eigentliche ER/Cytosol-Export von RTA unter Ausnutzung der ER-assoziierten Degradation (ERAD) erfolgt. Im Cytosol fungiert die katalytische A-Kette als RNA N-Glykosidase und depuriniert ribosomale RNA, was eine Hemmung der Proteinbiosynthese und letztendlich die Apoptose der Zelle bewirkt.

Anhand der intrazellulären Expression verschiedener cytotoxischer RTA-Derivate im ER-Lumen von Hefezellen wurde der molekulare Retrotranslokations-Mechanismus der Ricin A Kette näher untersucht. Durch die Analyse ausgewählter Hefe-Deletionsmutanten konnten zelluläre Komponenten identifiziert werden, die in diesem Prozess sowie für die *in vivo* Toxizität von RTA eine entscheidende Rolle spielen.

Die Expression der beiden ER-luminalen RTA-Varianten K1- bzw. K28-RTA induzierte ein vermindertes Wachstum der transformierten Wildtyp-Hefen, während die *in vivo* Expression der mutierten RTA-Derivate K1- bzw. K28-RTA^{E177D} einen resistenten Phänotyp verursachte. Die *in vivo* Expression der Konstrukte K1-/K28-RTA konnte mittels radioaktiven „Labeling“-Experimenten gezeigt werden, im Gegensatz zu der ER-luminalen Toxin-Variante Kar2-RTA konnte jedoch der Nachweis einer posttranslationalen RTA-Glykosylierung im ER nicht erbracht werden, was einen Hinweis auf einen zumindest deutlich eingeschränkten Import von Ricin A in das ER lieferte.

Für beide Konstrukte konnte ein Eintritt in das Endoplasmatische Retikulum indirekt durch die verminderte *in vivo* Toxizität in Mutanten mit Defekten im posttranslationalen ER-Import, im Signalpeptidase-Komplex sowie in cytosolischen Chaperon-Mutanten bewiesen werden. Das Protein L12 der ribosomalen GTPase-Domäne spielte eine essentielle Rolle für die *in vivo* Toxizität von Ricin A.

Ein Transport des Toxins über den Golgi-Apparat schien für dessen *in vivo* Toxizität nicht ausschlaggebend zu sein. Im Gegensatz zur ER-luminalen Variante Kar2-RTA nutzen die Konstrukte K1-/K28-RTA sowohl Komponenten des Hrd1-Komplexes (ERAD-L), als auch des Doa10-Komplexes (ERAD-C). Die Abwesenheit klassischer ERAD-Komponenten wie Hrd1p, Hrd3p, Der1p, Usa1p, Ubx2p, Ubc7p, Cue1p, Ubc1p, Doa10p und/oder Cne1p führte zu einem drastischen Aktivitätsverlust von RTA. Eine Beteiligung des Cdc48-Komplexes konnte ebenfalls durch indirekte Hinweise bestätigt werden.

Die Polyubiquitinierung scheint eine entscheidende Funktion für die *in vivo* Toxizität und die Retrotranslokation von RTA einzunehmen. Wurde die Polyubiquitinierung der Konstrukte K1-/K28-RTA durch Austausch der internen Lysinreste oder durch Überexpression einer mutierten Ubiquitin-Form, die keine Polyubiquitin-Ketten mehr ausbilden kann, verhindert, so kam es zu einer deutlich verminderten Toxizität. Eine *in vivo* Interaktion von RTA mit Ubiquitin konnte mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC) nachgewiesen werden.

Es konnte zudem eine „Screening“-Methode etabliert werden, mit der es möglich ist, eine Vielzahl von Hefe-„Knock-out“-Mutanten effektiv und in relativ kurzer Zeit auf Sensitivität gegen RTA zu untersuchen, und somit weitere Komponenten zu identifizieren, die am intrazellulären Transport und der *in vivo* Toxizität von RTA beteiligt sind

V Summary

The plant toxin ricin from *Ricinus communis* is a family member of so-called A/B toxin in which a catalytic A subunit is associated with one or more cell-binding B subunits. After binding of the B subunit to galactose-containing cell surface receptors, the holotoxin is taken up by endocytosis and delivered to the endoplasmic reticulum via retrograde transport through the Golgi. For ER-to-cytosol dislocation the toxin probably exploits components of the ER-associated degradation machinery (ERAD). Within the cytosol the A subunit acts as RNA N-glykosidase that depurinates ribosomal RNA inducing inhibition of protein synthesis and apoptosis.

In this study, intracellular expression of different ER luminal RTA variants has been used to characterize toxin retrotranslocation from the ER into the cytosol of intoxicated yeast cells. Selected yeast deletion mutants were screened for toxin sensitivity in order to identify cellular components crucial for the *in vivo* toxicity of ricin A.

In vivo functionality of the different RTA constructs was tested by *in vivo* toxicity assays. Thus it could be demonstrated that chimeric toxin variants with wildtype RTA are significantly more toxic for yeast cells than variants containing mutated RTA^{E177D}. *In vivo* expression of each RTA^{E177D} variant was demonstrated by [³⁵S] labelling experiments. In contrast to the ER luminal variant Kar2-RTA, posttranslational glycosylation of K1- and/or K28-RTA was not detectable, indicating failing or inefficient ER import when driven by either K1 or K28 signal sequence.

Entry of K1-/K28-RTA into the yeast ER lumen could be verified by a significant decrease in toxicity after *in vivo* expression in mutants either defective in posttranslational ER import, in signal peptidase complex components and/or in cytosolic chaperones.

For both RTA constructs access to the Golgi was not essential for toxin dislocation and/or *in vivo* toxicity. In contrast to the ER luminal variant Kar2-RTA, the toxin variants K1-/K28-RTA both required components of the Hrd1- and Doa10-complex for retrotranslocation. Lack of classical ERAD components such as Hrd1p, Hrd3p, Der1p, Usa1p, Ubx2p, Ubc7p, Cue1p, Ubc1p, Doa10p and/or Cne1p as well as Cdc48 complex components was accompanied by a complete loss in RTA toxicity.

Polyubiquitination of RTA was shown to be essential for both *in vivo* toxicity and retrotranslocation. Preventing polyubiquitination of RTA either by substitution of all internal lysine residues or by simultaneous overexpression of mutant ubiquitin (Ub-RR^{48/63}), unable to form polyubiquitin chains, resulted in a significant decrease in the *in vivo* toxicity of ricin A.

To identify new components involved in RTA toxicity and/or intracellular transport, a genetic screen based on GFP fluorescence was established which allows comprehensive identification and analysis of *S. cerevisiae* knock-out mutants defective in ER-to-cytosol retrotranslocation of RTA.

VI Literatur

- Adler, M., Langer, M., Witthohn, K. Eck, J., Blohm, D., Niemeyer, C.M. (2003)** Detection of rViscumin in plasma samples by immuno-PCR. *Biochem Biophys Res Commun*, 300, 757-763
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2001)** *Molecular biology of the cell*. 4th ed., Garland Science, NY
- Allen, S.C.H., Moore, K.A.H., Marsden, C.J., Fülöp, V., Moffat, K.G., Lord, J.M., Ladds, G., Roberts, L.M. (2007)** The isolation and characterization of temperature-dependent ricin A chain molecules in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J*, 274, 5586-5599
- Amerik, A.Y., Nowak, J., Swaminathan, S., Hochstrasser, M. (2000):** The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytotic pathways. *Mol Biol Cell*, 11, 3365-3380
- Antonin, W., Meyer, H.A., Hartmann, E. (2000)** Interactions between Spc2p and other components of the endoplasmic reticulum translocation sites of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 275, 34068-34072
- Arnason, T., Ellison, M.J. (1994)** Stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* is strongly correlated with assembly of a novel type of multiubiquitin chain. *Mol Cell Biol*, 14, 7876-7883
- Audi, J., Belson, M., Patel, M., Schier, J. and Osterloh, J. (2005)** Ricin poisoning: a comprehensive review. *JAMA*, 294, 2342-2351

- Bale, J.M., Bhattachajee, A., Croddy, E., Pilch, R. (2003)** Ricin found in London : an al-Qa`ida connection? Monterey, Calif: Center for Nonproliferation Studies, Chemical and Biological Weapons Nonproliferation Program
- Balint, G.A. (1974)** Ricin: the toxic protein of castor oil seeds. *Toxicology*, 2, 77-102
- Barbieri, L., Valbonesi, P., Bonora ,E., Gorini, P., Bolognesi, A., Stirpe,F. (1997)** Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). *Nucleic Acids Res*, 25, 518-522
- Barbieri, L., Polito, L., Bolognesi, A., Ciani, M., Pelosi, E., Farini, V., Jha, A., Sharma, N., Vivanco, J.M., Chambery, A., Parente, A., Stirpe, F. (2006)** Ribosome-inactivating proteins in edible plants and purification and characterization of a new ribosome-inactivating protein from *Curcubita moschata*. *Biochim Biophys Acta* 1760, 783-792
- Bar-Nun, S., Shneyour, Y., Beckmann, J.S. (1983)** G-418, an elongation inhibitor of 80S ribosomes. *Biochim Biophys Acta*, 741, 123-127
- Bays, N.W., Gardner, R.G., Seelig, L.P., Joazeiro, C.A., Hampton, R.Y. (2001)** Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat Cell Biol*, 3, 24-29
- Bays, N.W., Hampton, R.Y. (2002)** Cdc48-Ufd1-Npl4: stuck in the middle with Ub. *Curr Biol*, 12, R366-R371

- Becker, J., Walter, W., Yan, W., Craig, E.A. (1996)** Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation *in vivo*. *Mol Cell Biol*, 16, 4378-4386
- Bertram, S., Gassen, H. G. (1991)** *Gentechnische Methoden*: Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York
- Bhamidipati, A., Denic, V., Quan, E.M., Weissman, J.S. (2005)** Exploration of the topological requirements of ERAD identifies Yos9p as a lectin sensor of misfolded glycoproteins in the ER lumen. *Mol Cell Biol*, 19, 741-751
- Biederer, T., Volkwein, C., Sommer, T. (1997)** Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science*, 278, 1806-1809
- Birnboim, H. C., Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-1523
- Birnboim, H. C. (1983)** A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol*, 100, 243-255
- Blobel, G., Dobberstein, B. (1975)** Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. *J Cell Biol*, 67, 852-862
- Blom, D., Hirsch, C., Stern, P., Tortorella, D., Ploegh, H.L. (2004)** A glycosylated type I membrane protein becomes cytosolic when peptide:N-glycanase is compromised. *EMBO J*, 23, 650-658

- Blondel, M., Bach, S., Bamps, S., Dobbelaere, J., Wiget, P., Longaretti, C., Barral, Y., Meijer, L., Peter, M. (2005)** Degradation of Hof1 by SCF (Grr1) is important for actomyosin contraction during cytokinesis in yeast. *EMBO J*, 24, 1440-1452
- Blythman, H.E., Casellas, P. Gros, O., Gros, P. Jansen, F.K., Paolucci, F., Vidal, H. (1981)** Immunotoxins: hybrid molecules of monoclonal antibodies and a toxin subunit specifically kill tumor cells. *Nature*, 290, 145-146
- Bohni, P.C., Deshaies, R.J., Schekman, R.W. (1988)** Sec11p is required for signal peptide processing and yeast cell growth. *J Cell Biol*, 106, 1035-1042
- Bolognesi, A., Polito, L. (2004)** Immunotoxins and other conjugates: pre-clinical studies. *Mini Rev Med Chem*, 4, 563-583
- Bordallo, J., Plemper, R.K., Finger, A., Wolf, D.H. (1998)** Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of a misfolded luminal and integral membrane protein. *Mol Biol Cell*, 9, 209-222
- Bostian, K.A., Hopper, J.E., Rogers, D.T., Tipper, D.J. (1980a)** Translational analysis of the killer-associated virus-like particle dsRNA genome of *S. cerevisiae*: M dsRNA encodes toxin. *Cell*, 19, 403-414
- Bostian, K.A., Jayachandran, S., Tipper, D.J. (1983)** A glycosylated protoxin in killer yeast : models for its structure and maturation. *Cell*, 32, 169-180

- Bostian, K.A., Elliott, Q., Bussey, H., Burn, V., Smith, A., Tipper, D.J. (1984)** Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast: multiple processing events produce a two-component toxin. *Cell*, 36, 741-751
- Bradberry, S.M., Dickers, K.J., Rice, P., Griffiths, G.D., Vale, J.A. (2003)** Ricin poisoning. *Toxicol Rev*, 22, 65-70
- Breinig, F., Sendzik, T., Einfeld, K., Schmitt, M.J. (2006)** Dissecting toxin immunity in virus-infected killer yeast uncovers an intrinsic strategy of self-protection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 3810-3815
- Breitschopf, K., Bengal, E., Ziv, T., Admin, A., Chiechanover, A. (1998)** 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*, 17, 5964-5973
- Brigotti, M., Alfieri, R., Sestili, P., Bonelli, M., Petronini, P.G., Guidarelli, A., Barbieri, L., Stirpe, F., Sperti, S. (2002)** Damage to nuclear DNA induced by Shiga toxin 1 and ricin in human endothelial cells. *FASEB J*, 16, 365-372
- Briones, E., Briones, C., Remacha, M., Ballesta, J. P. G. (1998)** The GTPase center protein L12 is required for correct ribosomal stalk assembly but not for *Saccharomyces cerevisiae* viability. *J Biol Chem*, 273, 31956-31961
- Brodsky, J.L., McCracken, A.A. (1997)** ER-associated and proteasome-mediated protein degradation: how two topologically restricted events come together. *Trends Cell Biol*, 7, 151-157

- Brodsky, J. L., McCracken, A. A. (1999)** ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol*, 10, 507-513
- Brodsky, J.L., Werner, E.D., Dubas, M.E., Goeckeler, J.L., Kruse, K. B., McCracken, A.A. (1999)** The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J Biol Chem*, 274, 3453-3460
- Brugsch, H.G. (1960)** Toxic hazards: the castor bean. *N Engl J Med.*, 262, 1039-1040
- Bukau, B., Horwich, A.L. (1998)** The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92, 351-366
- Burrows, W.D., Renner, S.E. (1999)** Biological warfare agents as threats to potable water. *Environ Health Perspect.*, 107, 975-984
- Buschhorn, B.A., Kostova, Z., Medicherla, B., Wolf, D.H. (2004)** A genome-wide screen identifies Yos9p as essential for ER-associated degradation of glycoproteins. *FEBS Lett*, 577, 422-426
- Bussey, H., Boone, C., Zhu, H., Vernet, T., Whiteway, M., Thomas, D.Y. (1990)** Genetic and molecular approaches to synthesis and action of the yeast killer toxin. *Experienta*, 46, 193-200
- Butterworth, A.G., Lord, J.M. (1983)** Ricin and *Ricinus communis* agglutinin subunits are all derived from a single size polypeptide precursor. *Eur J Biochem*, 137, 57-65

- Caldwell, S.R., Hill, K.J., Cooper, A.A. (2001)** Degradation of endoplasmic reticulum (ER) quality control substrates requires transport between the ER and Golgi. *J Biol Chem*, 276, 23296-23303
- Calvin, N. M., Hannawalt, P. C. (1988)** High-efficiency transformation of bacterial cells by Electroporation. *J Bacteriol*, 170, 2796-2801
- Caplan, A.J., Tsai, J., Casey, P.J. Douglas, M.G. (1992)** Farnesylation of YDJ1p is required for function at elevated growth temperatures in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 267, 18890-18895
- Carlson, E.J., Pitonzo, D., Skach, W.R. (2006)** p97 functions as an auxiliary factor to facilitate TM domain extraction during CFTR ER-associated degradation. *EMBO J*, 25, 4557-4566
- Carnicelli, D., Brigotti, M., Alvergnà, P., Pallanca, A., Sperti, S. and Montanaro, L. (1997)** Cofactor requirement of ribosome-inactivating proteins from plants. *J Exp Bot*, 48, 1519-1523
- Carvalho, P., Goder, V., Rapoport, T.A. (2006)** Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell*, 126, 361-373
- Cawley, D. B., Hedbolm, M. L., Hoffmann, E. J., Houston, L.L. (1977)** Differential sensitivity of rat liver and wheat germ ribosomes to inhibition of polyuridylic acid translation by ricin A chain. *Arch Biochem Biophys*, 182, 690-695
- Centers for Disease Prevention and Control (CDC) (2003)** Investigation of a ricin-containing envelope at a postal facility-South Carolina. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 52, 1129-1131

- Chaddock, J.A., Roberts, L.M. (1993)** Mutagenesis and kinetic analysis of the active site Glu177 of ricin A-chain. *Protein Eng*, 6, 425-431
- Chan, D.S., Chu, L.O., Lee, K.M., Too, P.H., Ma, K.W., Sze, K.H. et al. (2007)** Interaction between trichosanthin, a ribosome-inactivating protein, and the ribosomal stalk protein P2 by chemical shift perturbation and mutagenesis analyses. *Nucleic Acids Res*, 35, 1660-1672
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., Varshavsky, A. (1989)** A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*, 243, 1576-1583
- Cheetham, M.E., Caplan, A.J. (1998)** Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaption of chaperone function. *Cell Stress Chaperones*, 3, 28-36
- Chen, P., Johnson, P., Sommer, T., Jentsch, S., Hochstrasser, M. (1993)** Multiple ubiquitin-conjugating enzymes participate in the in vivo degradation of the yeast Mat α 2 repressor. *Cell*, 74, 357-369
- Chen, A., Hu, T., Mikoryak ,C., Draper, R.K. (2002)** Retrograde transport of protein toxins under conditions of COPI dysfunction. *Biochem Biophys Acta*, 1589, 124-139
- Chen, L., Madura, K. (2002)** Rad23 promotes the targeting of proteolytic substrates to the proteasome. *Mol Cell Biol*, 22, 4902-4913

- Chen, Y., Peumans, W.J., Van Damme, E.J. (2002)** The *Sambucus nigra* type-2 ribosome-inactivating protein SNA-I exhibits in planta antiviral activity in transgenic tobacco. FEBS Lett, 516, 27-30
- Chen, Z.J., Sun, L.J. (2009)** Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling. Mol Cell Rev, 33, 275-286
- Chiechanover, A. (1998)** The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. EMBO J, 17, 7151-7160
- Chillaron, J., Haas, I.G. (2000)** Dissociation from BiP and retrotranslocation of unassembled immunoglobulin light chains are tightly coupled to proteasome activity. Mol Biol Cell, 11, 217-226
- Chiou, J.-C., Li, X.-P., Remacha, M., Ballesta, J.P.G., Tumer, N.E. (2008)** The ribosomal stalk is required for ribosome binding, depurination of the rRNA and cytotoxicity of ricin A chain in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol, 70, 1441-1452
- Chirico, W.J., Waters, M.G., Blobel, G. (1988)** 70K heat shock-related proteins stimulate protein translocation into microsomes. Nature, 332, 805-810
- Cieplak, W. Jr., Messer, R.J., Konkel, M.E., Grant, C.C. (1995)** Role of a potential endoplasmic reticulum retention sequence (RDEL) and the Golgi complex in the cytotoxic activity of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Mol Microbiol, 16, 789-800
- Clark, D.S., Emery, J.M., Munsell, M. F. (1998)** Inhibition of posterior capsule opacification with an immunotoxin specific for lens epithelial cells: 24 month clinical results. J Cataract Refract, 24, 1614-1620

- Cope, A.C., Dee, J., Cannan, R.K. (1945)** Chemical Warfare Agents and Related Chemical Problems-Part I: Summary Technical Report of Division 9 Washington, DC. National Defense Research Committee, 179-203
- Cosson, P., Letourneur, F. (1997)** Coatomer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr Opin Cell Biol*, 7, 484-487
- Cosson, P., Letouneur, F. (1994)** Coatomer interaction with di-lysineendoplasmic reticulum retention motifs. *Science*, 263, 1629-1631
- Cundliffe, E., Dixon, P., Stark, M., Stöffler, G., Ehrlich, R., Stöffler-Meilicke, M., Cannon, M. (1979)** Ribosomes in thiostreptone-resistant mutants of *Bacillus megaterium* lacking a single 50S subunit protein. *J Mol Biol*, 132, 235-252
- Cyr, D.M., Lu, X., Douglas, M.G. (1992)** Regulation of Hsp70 function by a eukaryotic DnaJ homolog. *J Biol Chem*, 267, 20927-20931
- Damke, H., Baba, T., van der Bliek, A.M., Schmid, S.L. (1995)** Clathrin-independent pinocytosis is induced in cells overexpressing a temperature-sensitive mutant of dynamin. *J Cell Biol*, 131, 69-81
- D`Andrea, A., Pellman, D. (1998)** Deubiquitinating enzymes: a new class of biological regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 33, 337-352
- Day, P.J., Owens, S.R., Wesche, J., Olsnes, S., Roberts, L.M., Lord, J.M. (2001)** An interaction between ricin and calreticulin that may have implications for toxin trafficking. *J Biol Chem*, 276, 7201-7208

- Deeks, E.D., Cook ,J.P., Day ,P.J., Roberts ,L.M., Lord ,J.M. (2002)**
The low lysine content of ricin A chain reduces the risk of proteolytic degradation after translocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Biochemistry*, 41, 3405-3413
- Denic, V., Quan, E.M., Weissman, J.S. (2006)** A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Cell*, 126, 349-359
- Deshaies, R.J., Schekman, R. (1987)** A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 105, 633-645
- Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Feldheim, D.A., Schekman, R. (1991)**
Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature*, 349, 806-807
- De Virgilio, M., Kiosses, W.B., Shattil, S.J. (2004)** Proximal, selective and dynamic interactions between integrin alpha II beta 3 and protein tyrosine kinases in living cells. *J Cell Biol*, 165, 305-311
- Di Cola, A., Frigerio, L., Lord ,J., Ceriotti, A., Roberts, L.M. (2001)**
Ricin A chain without its partner B chain is degraded after retrotranslocation from the endoplasmic reticulum to the cytosol in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 14726-14731
- Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W. (1988)** High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, 135, 1763-1774
- Ehrlich, P. (1891)** Experimentelle Untersuchungen ueber Immunitaet. I.Ueber Ricin. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, Berlin, 17, 976-979

- Eiklid, K., Olsnes, S., Pihl, A. (1980)** Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells. *Exp Cell Res*, 126, 321-326
- Eisfeld, K. (2001)** Endozytose und retrograder Proteintransport am Beispiel des viralen K28-Toxins der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Universität des Saarlandes
- Ellgard, L., Helenius, A. (2003)** Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 181-191
- Elsasser, S., Chandler-Millitello, D., Müller, B., Hanna, J., Finley, D. (2004)** Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *J Biol Chem*, 279, 26817-26822
- Elsasser, S., Finley, D. (2005)** Delivery of ubiquitinated substrates to protein-unfolding machines. *Nat Cell Biol*, 7, 742-749
- Emery, G., Grünberg, J., Rojo, M. (1999)** The p24 family of transmembrane proteins at the interface between endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Protoplasma*, 207, 24-30
- Endo, Y., Tsurugi, K. (1987)** RNA N-glycosidase activity of ricin A chain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *J Biol Chem*, 262, 8128-8130
- Endo, Y., Tsurugi, K. (1988)** The RNA N-glycosidase activity of ricin A chain. The characteristics of the enzymatic activity of ricin A chain with ribosomes and with rRNA. *J Biol Chem*, 263, 8735-8739

- Fan, J.Y., Cui, Z.Q., Wei, H.P., Zhang, Z.P., Zhou, Y.F., Wang, Y.P., Zhang, X.E. (2008)** Split mCherry as a new red bimolecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 367, 47-53
- Fang, H., Green, N. (1994)** Nonlethal *sec71-1* and *sec72-1* mutations eliminate proteins associated with the Sec63p-BiP complex from *S. cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 5, 933-942
- Fang, H., Panzner, S., Mullins, C., Hartmann, E., Green, N. (1996)** The homolog of mammalian SPC12 is important for efficient signal peptidase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 271, 16460-16465
- Fang, H., Mullins, C., Green, N. (1997)** In addition to Sec11, a newly identified gene, SPC3, is essential for signal peptidase activity in the yeast endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 272, 13152-13158
- Fang, D., Kerppola, T.K. (2004)** Ubiquitin mediated fluorescence complementation reveals that Jun ubiquitinated by Itch/AIP4 is localized to lysosomes. *Proc Natl Acad Sci*, 101, 14782-14787
- Fashena, S.J., Serebriiskii, I., Golemis, E.A. (2000)** The continued evolution of two-hybrid screening approaches in yeast: how to outwit different preys with different baits. *Gene*, 250, 1-14
- Feldheim, D., Yoshimura, A., Admon, A., Schekman, R. (1993)** Structural and functional characterization of Sec66p, a new subunit of the polypeptide translocation apparatus in the yeast endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, 4, 931-939

- Feldheim, D., Schekman, R. (1994)** Sec72p contributes to the selective recognition of signal peptides by the secretory polypeptide translocation complex. *J Cell Biol*, 126, 935-943
- Feng, Y., Jadhav, A.P., Rodighiero, C., Fujinaga, Y., Kirchhausen, T., Lencer, W.I. (2004)** Retrograde transport of cholera toxin from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum requires the trans-Golgi network but not the Golgi apparatus in Exo2-treated cells. *EMBO Rep*, 5, 596-601
- Ferreras, J.M., Barbieri, L., Girbes, T., Batelli, M.G., Rojo, M.A., Arias, F.J., Rocher, M.A., Soriano, F., Mendez, E., Stirpe, F. (1993)** Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis*, L. (Caryophyllaceae). *Biochim Biophys Acta*, 1216, 31-42
- Ferrini, J.B., Martin, M., Taupiac, M.P., Beaumelle, B. (1995)** Expression of functional ricin B chain using the baculovirus system. *Eur J Biochem*, 233, 772-777
- Fewell, S. W., Travers, K.J., Weissman, J.S., Brodsky, J.L. (2001)** The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet*, 35, 149-191
- Finke, K., Plath, K., Panzner, S., Prehn, S., Rapoport, T.A., Hartmann, E., Sommer, T. (1996)** A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *EMBO J*, 15, 1482-1494

- Firestone, G.L., Winguth, S.D. (1990)** Immunoprecipitation of proteins. *Methods Enzymol*, 182, 688-700
- Flaherty, K.M., DeLuca-Flaherty, C., McKay, D.B. (1990)** Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*, 346, 623-628
- Fracasso, G., Bellisola, G., Castelletti, D., Tridente, G., Colombatti, M. (2004)** Immunotoxins and other conjugates : preparation and general characteristics. *Mini Rev Med Chem*, 4, 545-561
- Frankel, A.E., Neville, D.M., Bugge, T.A., Kreitmann, R.J. and Leppla, S.H. (2003)** Immunotoxin therapy of hematologic malignancies. *Semin Oncol*, 30, 545-557
- Fredriksson, S.A., Hulst, A.G., Artursson, E., de Jong, A.L., Nilsson, C., van Baar, B.L. (2005)** Forensic identification of neat ricin and of ricin from crude castor bean extracts by mass spectrometry. *Anal Chem*, 77, 1545-1555
- Frigerio, L., Vitale, A., Lord ,J.M., Ceriotti, A., Roberts, L.M .(1998)** Free ricin A chain, proricin, and native toxin have different cellular fates when expressed in tobacco protoplasts. *J Biol Chem*, 273, 14194-14199
- Frigerio, L., Jolliffe, N.A., Di Cola, A., Felipe, D.H., Paris, N., Neuhaus, J.M., Lord, J.M., Ceriotti, A., Roberts, L.M. (2001)** The internal propeptide of the ricin precursor carries a sequence-specific determinant for vacuolar sorting. *Plant Physiol*, 126, 167-175

- Frydman, J. (2001)** Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem*, 70, 603-647
- Fu, H., Sadis, S., Rubin, D.M., Glickmann, M., van Nocker, S., Finley, D., Vierstra, R.D. (1998)** Multiubiquitin chain binding and protein degradation are mediated by distinct domains within the 26S proteasome subunit Mcb1. *J Biol Chem*, 273, 1970-1981
- Funakoshi, M., Sasaki, T., Nishimoto, T., Kobayashi, H. (2002)** Budding yeast Dsk2p is a polyubiquitin-binding protein that can interact with the proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 745-750
- Funatsu, G., Yoshitake, S., Funatsu, M. (1978)** Primat structure of the Ile chain of ricin D. *Agric Biol Chem*, 42, 501-503
- Funatsu, G., Kimura, M., Funatsu, M.(1979)** Primary structure of the Ala chain of ricin D. *Agric Biol Chem*, 42, 2221-2224
- Garcia, P.A., Bredesen, D.E., Winters, H.V., von Einsiedel, R.G., Williams, R.L., Kahn, J.O., Byers, V.S., Levin, A.S., Waltes, L.A., Messing, R.O. (1993)** Neurological reactions in HIV-infected patients treated with trichosanthin. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 19, 402- 405
- Gardner, R.G., Swarbrick, G.M., Bays, N.W., Cronin, S.R., Wilhovsky, S., Seelig, L., Kim, C., Hampton, R.Y. (2000)** Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosolic signaling. Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p. *J Cell Biol*, 151, 69-82

- Gardner, R.G., Shearer, A.G., Hampton, R.Y. (2001)** *In vivo* action of the HRD ubiquitin ligase complex: mechanisms of endoplasmic reticulum quality control and sterol regulation. *Mol Cell Biol*, 21, 4276-4291
- Gassler, C.S., Buchberger, T., Laufen, M.P., Mayer, H., Schroder et al. (1998)** Mutations in the DnaK chaperone affecting interaction with DnaJ cochaperone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 15229-15234
- Gauss, R., Sommer, T., Jarosch, E. (2006)** The Hrd1p ligase complex forms a lynchpin between ER luminal substrate selection and Cdc48p recruitment. *EMBO J*, 25, 1827-1835
- Gautschi, M., Mun, A., Ross, S., Rospert, S. (2002)** A functional chaperone triad on the yeast ribosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 4209-4214
- Gavin, A.C., Aloy, P., Grandi, P., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B. et al. (2006)** Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*, 440, 631-636
- Gemmill, T.R., Trimble, R.B. (1999)** Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochem Biophys Acta*, 1426, 227-237
- Gething, M. J. (1999)** Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol*, 10, 465-472
- Ghosh, I., Hamilton, A. D., Regan, L. (2000)** Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: application to the green fluorescent protein. *J Am Chem Soc*, 122, 5658-5659

- Gillece, P., Luz, J.M., Lennarz, W.J., de la Cruz, F.J., Römisch, K. (1999)** Export of a cysteine-free misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum for degradation requires interaction with protein disulfide isomerase. *J Cell Biol*, 147, 1443-1456
- Girod, A., Storrie, B., Simpson, J.C., Johannes, L., Goud, B., Roberts, L.M., Lord, J.M., Nilsson, T., Pepperkok, R. (1999)** Evidence for a COPI- independent transport route from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Nat Cell Biol*, 1, 423-430
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., Finley, D. (1998)** A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*, 94, 615-623
- Gonzalo, P., Reboud, J.P. (2003)** The puzzling laterale flexible stalk of the ribosome. *Biol Cell*, 95, 179-193
- Green, N., Fang, H., Walter, P. (1992)** Mutants in three novel complementation groups inhibit membrane protein insertion into and soluble protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 116, 597-604
- Griffiths, G.D., Rice, P., Allenby, A.C., Bailey, S.C. and Upshall, D.G. (1995)** Inhalation toxicology and histopathology of ricin and abrin toxins. *Inhal. Toxicol.*, 7, 269-288
- Grimmer, S., van Deurs, B., Sandvig, K. (2002)** Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. *J Cell Sci*, 115, 2953-2962

- Guarinos, E. Remacha, M., Ballesta, J.P.G. (2001)** Asymmetric interactions between the acidic P1 and P2 proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 276, 32474-32479
- Guarinos, E., Santos, C., Sanchez, A., Qui, D.-Y., Remacha, M., Ballesta, J.P.G. (2003)** Tag-mediated fractionation of yeast ribosome populations proves the monomeric organization of the eukaryotic ribosomal stalk structure. *Mol Microbiol*, 50, 703-712
- Guo, J.W., Shen, B.F., Feng, J.N., Sun, Y.X., Yu, M., Hu, M.R. (2005)** A novel neutralizing monoclonal antibody against cell-binding polypeptide of ricin. *Hybridoma (Larchmt)*, 24, 263-266
- Hammond, C., Helenius, A. (1994)** Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol*, 126, 41-52
- Hampton, R.Y. (2002)** Proteolysis and sterol regulation. *Annu Rev Cell*, 18, 345-378
- Han, W., Christen, P. (2003)** Mechanism of the targeting action of DnaJ in the DnaK molecular chaperone system. *J Biol Chem*, 278, 19038-19043
- Han, S., Liu, Y., Chang, A. (2007)** Cytoplasmic Hsp70 promotes ubiquitination for endoplasmic reticulum-associated degradation of a misfolded mutant of the yeast plasma membrane ATPase, PMA1*. *J Biol Chem*, 282, 26140-26149
- Hara-Nishimura, I., Shimada, T., Hatano, K., Takeuchi, Y., Nishimura, M. (1998)** Transport of storage proteins to protein storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell*, 10, 825-836

- Harley, S.M., Beevers, H .(1982)** Ricin inhibition of *in vivo* protein synthesis by plant ribosomes. Proc Natl Acad Sci USA , 79,5935-5938
- Harley, S.M., Lord, J.M. (1985)** *In vitro* endoproteolytic cleavage of castor bean lectin precursor. Plant Sci, 41:,111-116
- Harrison, A.R., Skladzien, S., Christiansen, S.P., McLoon, L.K. (2004)** Myotoxic effects of the skeletal muscle-specific immunotoxin, ricin-mAb35, on orbicularis oculi muscle after eyelid injections in rabbits. Ophthalmol Plast Reconstr Surg, 20, 312-316
- Hartmann-Petersen, R., Seeger, M., Gordon, C. (2003)** Transferring substrates to the 26S proteasome. Trends Biochem Sci, 28, 26-31
- Hazes, B., Read, R.J. (1997)** Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmatic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. Biochemistry, 36, 11051-11054
- Hebert, D.N., Molinari, M. (2007)** In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. Physiol Rev, 87, 1377-1408
- Hegde, A.N., Inokuchi, K., Pei, W., Casadio, A., Ghirardi, M., Chain, D.G., Martin, K.C., Kandel, E.R., Schwartz, J.H. (1997)** Ubiquitin C-terminal hydrolase is an immediate-early gene essential for long-term facilitation in Aplysia. Cell, 89, 115-126

- Helenius, A., Aebi, M. (2004)** Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*, 73, 1019-1049
- Hennessy, F., Nicoll, W.S., Zimmermann, R., Cheetham, M.E., Blatch, G.L. (2005)** Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Protein Sci*, 14, 1697-1709
- Hill, K., Cooper, A.A. (2000)** Degradation of unassembled Vph1p reveals novel aspects of the yeast ER quality control system. *EMBO J*, 19, 550-561
- Hirsch, C., Blom, D., Poegh, H.L. (2003)** A role for N-glycanase in the cytosolic turnover of glycoproteins. *EMBO J*, 22, 1036-1046
- Hitchcock, A.L., Krebber, H., Fietze, S., Lin, A., Latterich, M., Silver, P.A. (2001)** The conserved npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation. *Mol Biol Cell*, 12, 3226-3241
- Hiyama, H., Yokoi, M., Masutani, C., Sugasawa, K., Maekawa, T., Tanaka, K., Hoeijmakers, J.H.J., Hanaoka, F. (1999)** Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26S proteasome. *J Biol Chem*, 274, 28019-28025
- Hochstrasser, M., Johnsson, P.R., Arendt, C.S., Amerik, A., Swaminathan, S., Swanson, R., Li, S.J., Laney, J., Pals-Rylaarsdam, R., Nowak, J., Connerly, P.L. (1999)** The *Saccharomyces cerevisiae* ubiquitin-proteasome system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 354, 667-676

- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., Pease, L.R. (1989)**
Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*, 77, 61-68
- Hovde, C., Calderwood, S., Mekalanos, J., Collier, R. (1988)**
Evidence that glutamic acid 167 is an active site residue of Shiga-like toxin I. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85, 2568-2572
- Hu, C. D., Chinenov, Y., Kerppola, T. K. (2002)** Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*, 9, 789-798
- Huang, P., Gautschi, M., Walter, M., Rospert, S., Craig, E.A. (2005)**
The Hsp70 Ssz1 modulates the function of the ribosome-associated J-protein Zuo1. *Nat Struct Mol Biol*, 12, 497-504
- Hudak, K.A., Dinman, J.D., Tumer, N.E. (1999)** Pokeweed antiviral protein accesses ribosomes by binding to L3, *J Biol Chem*, 274, 3859-3864
- Hundley, H., Eisenman, H., Walter, W., Evans, T., Hotokezaka, Y., Wiedmann, M., Craig, E.A. (2002)** The *in vivo* function of the ribosome-associated Hsp70, Ssz1, does not require its putative peptide-binding domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 4203-4208
- Huyer, G., Piluek, W.F., Fansler, Z., Kreft, S.G., Hochstrasser, M., Brodsky, J.L., Michaelis, S. (2004)** Distinct machinery is required in *Saccharomyces cerevisiae* for the endoplasmic reticulum-associated degradation of a multispinning membrane protein and a soluble luminal protein. *J Biol Chem*, 279, 38369-38378

- Ikeda, F., Dikic, I. (2008)** Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. "Protein modifications: Beyond the usual suspects" review series. *EMBO Rep*, 9, 536-542
- Ishizaki, T., Megumi, C., Komai, F., Masuda, K. and Oosawa, K. (2002)** Accumulation of a 31-kDa glycoprotein in association with the expression of embryogenic potential by spinach callus in culture. *Physiol. Plant.*, 114, 109-115
- Ismael, N., Ng, D.T. (2006)** Have you HRD? Understanding ERAD is DOAble. *Cell*, 126, 237-239
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. And Kimura, A. (1983)** Transformation of yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, 153, 163-168
- Iversen, T.G., Skretting, G., Llorente, A., Nicoziani, P., van Deurs, B., Sandvig, K. (2001)** Endosome to Golgi transport of ricin is independent of clathrin and of the Rab9- and Rab11-GTPases. *Mol Biol Cell*, 12, 2099-2107
- Jacob, C.A., Bodmer, D., Spirig, U., Battig, P., Marcil, A., Dignard, D., Bergeron, J.J., Thomas, D.Y., Aebi, M. (2001)** Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep*, 2, 423-430
- James, P., Pfund, C., Craig, E.A. (1997)** Functional specificity among Hsp70 molecular chaperones. *Science*, 275, 387-389
- Jarosch, E., Geiss-Friedlander, R., Meusser, B., Walter, J., Sommer, T. (2002)** Protein dislocation from the endoplasmic reticulum—pulling out the suspect. *Traffic*, 3, 530-536

- JO, K., Albring, J., Huter, E., Bulbuc, N., Spee, P., Neefjes, J., Hammerling, G., Momburg, F. (2000)** Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity*, 13, 117-127
- Johnson, A. E., van Maes, M. A. (1999)** The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Develop Biol*, 15, 799-842
- Joliffe, N.A., Di Cola, A., Marsden, C.J., Lord, J.M., Ceriotti, A., Frigerio, L., Roberts, L.M. (2006)** The N-terminal ricin propeptide influences the fate of ricin A-chain in tobacco protoplasts. *J Biol Chem*, 18, 23377-23383
- Joseph, K.C., Kim, S.U., Stieber, A., Gonatas, N.K. (1978)** Endocytosis of Cholera toxin into neuronal GERL. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75, 2815-2819
- Kabani, M., Beckerich, J.M., Brodsky, J.L. (2002)** Nucleotide exchange factor for the yeast Hsp70 molecular chaperone Ssa1p. *Mol Cell Biol*, 22, 4677-4689
- Kabani, M., Kelley, S.S., Morrow, M.W., Montgomery, D.L., Sivendran, R., Rose, M.D., Gierasch, L.M., Brodsky, J.L. (2003)** Dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation on the peptide binding domain and concentration of BiP. *Mol Biol Cell*, 14, 3437-3448
- Kahn, J.O., Gorelick, K.J., Arri, C.J., Lifson, J.D., Gambertoglio, J.G., Bostrom, A. and Williams, R.L. (1994)** Safety and pharmacokinetics of GLQ223 in subjects with AIDS and AIDS-related complex. *Antimicrob Agents Chemother*, 38, 260-267

- Kalies, K.U., Allan, S., Sergeyenko, T., Kroger H., Romisch, K. (2005)** The protein translocation channel binds proteasomes to the endoplasmic reticulum membrane. *EMBO J*, 24, 2284-2293
- Katzin, B.J., Collins, E.J., Robertus ,J.D. (1991)** Structure of ricin A chain at 2.5 Å. *Proteins*, 10, 251-259
- Kaufmann, R.J., Scheuner, D., Schroder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C.Y., Arnold, S.M. (2002)** The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 411-421
- Kelkel, M. (2009)** Untersuchungen zum zellulären Mechanismus der ER/Cytosol-Retrotranslokation einer cytotoxischen α -Variante des viralen A/B-Toxins K28 der Hefe. Dissertation, Universität des Saarlandes
- Kim, I., Mi, K., Rao, H. (2004)** Multiple interactions of rad23 suggest a mechanism for ubiquitylated substrate delivery important in proteolysis. *Mol Biol Cell*, 15, 3357-3365
- Kim, W., Spear, E.D., Ng, D.T. (2005)** Yos9p detects and targets misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Mol Cell*, 19, 753-764
- Kim, I., Ahn, J., Liu, C., Tanabe, K., Apodaca, J., Suzuki, T., Rao, H. (2006)** The Png1-Rad23 complex regulates glycoprotein turnover. *J Cell Biol*, 172, 211-219
- Knight, B. (1979)** Ricin-a potent homicidal poison. *BMJ* i, 350-351

- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U., Jentsch, S. (1999)** A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, 96, 635-644
- Kominami, K., Okura, N., Kawamura, G.N., DeMartino, G.N., Slaughter, C.A., Shimbara, N., Chung, C.H., Fujimuro, M., Yokosawa, H., Shimizu, Y., Tanahashi, N., Tanaka, K., Toh-e, A. (1997)** Yeast counterparts of subunits S5a and p58 (S3) of the human 26S proteasome are encoded by two multicopy suppressors of *nin1-1*. *Mol Biol Cell*, 8, 171-187
- Koopman, J., Albring, J., Huter, E., Bulbuc, N., Spee, P., Neefjes, J., Hammerling, G., Momburg, F. (2000)** Export of antigenic peptides from the endoplasmic reticulum intersects with retrograde protein translocation through the Sec61p channel. *Immunity*, 13, 117-127
- Kostova, Z., Wolf, D. H. (2003)** For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J*, 22, 2309-2317
- Kostova, Z., Tsai, Y.C., Weissman, A.M. (2007)** Ubiquitin ligases, critical mediators of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Semin Cell Dev Biol*, 18, 770-779
- Kostova, Z., Mariano, J., Scholz, S., Koenig, C., Weissman, A.M. (2009)** A Ubc7p-binding domain in Cue1p activates ER-associated protein degradation. *J Cell Sci*, 122, 1374-1381
- Krieg, P.A., Melton, D.A. (1987)** *In vitro* RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods Enzymol*, 155, 397-415

- Kumar, M.A., Timms, D.E., Neet, K.E., Owen, W.G., Peumans, P.J., Rao, A.G. (1993)** Characterization of the lectin from the bulbs of *Eranthis hyemalis* (winter aconite) as an inhibitor of protein synthesis J Biol Chem, 268, 25176-25183
- Kurihara, T., Silver, P. (1993)** Suppression of a *sec63* mutation identifies a novel component of the yeast endoplasmic reticulum translocation apparatus. Mol Biol Cell, 4, 919-930
- Lamb, F., Roberts, L.M., Lord, J.M. (1985)** Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for preproricin. Eur J Biochem , 148, 265-270
- Lambert, J.M., Goldmacher, V.S., Collinson, A.R., Nadler, L.M., Blättler, W.A. (1991)** An immunotoxin prepared with blocked ricin: a natural plant toxin adapted for therapeutic use. Cancer Res, 51, 6236-6242
- Lambertson, D., Chen, L., Madura, K. (1999)** Pleiotropic defects caused by the loss of proteasome-interacting factors Rad23 and Rpn10 of *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 153, 69-79
- Langer, T.C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M.K. et al. (1992)** Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. Nature, 356, 683-689
- Lee, G.J., Roseman, A.M., Saibil, H.R., Vierling, E. (1997)** A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. EMBO J, 16, 659-671

- Lee, R.J., Liu, C., Harty, C., McCracken, A.A., Latterich, M., Romisch, K., DeMartino, G.N., Thomas, P.J., Brodsky, J.L. (2004)** Uncoupling retro-translocation and degradation in the ER-associated degradation of a soluble protein. *EMBO J*, 23, 2206-2215
- Lee-Huang, S., Huang, P.L., Kung, H.-f., Li, B.-Q., Huang, P.L., Huang, P., Huang, H.I., Chen, H.-C. (1991)** TAP 29: an anti-human immunodeficiency virus protein from *Trichosanthes kirilowii* that is nontoxic to intact cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 6570-6574
- Lendaro, E., Ippoliti, R., Bellelli, A., Brunori, M., Evangelista, V., Guidarini, D., Benedetti, P.A. (1994)** Intracellular dynamics of ricin followed by fluorescence microscopy on living cells reveals a rapid accumulation of the dimeric toxin in the Golgi apparatus. *FEBS Lett*, 9, 99-104
- Lesage, G., Guimond, J., Boileau, G. (2003)** Trans-complementation assay establishes the role of proregion hydrophobic amino acid residues in the biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* Kex2p endoprotease. *Yeast*, 20, 397-406
- Lewis, M.S., Youle, R.J. (1986)** Ricin subunit association. Thermodynamics and the role of the disulfide bond in toxicity. *J Biol Chem*, 261, 11571-11577
- Li, X.-P., Chiou, J.-C., Remacha, M., Ballesta, J.P.G., Tumer, N.E. (2009)** A two-step binding model proposed for the electrostatic interactions of ricin A chain with ribosomes. *Biochemistry*, 48, 3853-3863

- Li, S., Spooner, R.A., Allen, S.C.H., Guise, C.P., Ladds, G., Schnöder, T., Schmitt, M.J., Lord, J.M., Roberts, L.M. (2009)** Cytosolic ERAD pathways components can discriminate between different forms of the same substrate. *J Biol Chem*, submitted
- Lilley, B.N., Ploegh, H.L. (2004)** A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature*, 429, 834-840
- Ling, J., Liu, W.-y., Wang, T.P. (1995)** Simultaneous existence of two types of ribosome-inactivating proteins in the seeds of *Cinnamomum camphora*: characterization of the enzymatic activities of these cytotoxic proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1252, 15-22
- Lipson, C., Alalouf, G., Bajorek, M., Rabinovich, E., Atir-Lande, A., Glickman, M., Bar-Nun, S. (2008)** A proteasomal ATPase contributes to dislocation of endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) substrates. *J Biol Chem*, 283, 7166-7175
- Llorente, A., Lauvrak, S. U., van Deurs, B., Sandvig, K. (2003)** Induction of direct endosome to endoplasmic reticulum transport in Chinese hamster ovary (CHO) cells (LdIF) with a temperature-sensitive defect in {epsilon}-coatamer protein ({epsilon}-COP). *J Biol Chem*, 278, 35850-35855
- Lolle, S.J., Bussey, H. (1984)** *In vivo* evidence for posttranslational translocation and signal cleavage of the killer preprotoxin of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 6, 4274-4280

- Lombardi, D., Soldati, T., Riederer, M.A., Goda, Y., Zerial, M., Pfeffer, S.R. (1993)** Rab9 functions in transport between late endosomes and the trans Golgi network. *EMBO J*, 12, 677-682
- London, E., Luongo, C.L. (1989)** Domain-specific bias in arginine/lysine usage by protein toxins. *Biochem Biophys Res Commun*, 160, 333-339
- Lord, J. M. (1985a)** Precursors of ricin and *Ricinus communis* agglutinin. Glycosylation and processing during synthesis and intracellular transport. *Eur J Biochem*, 146, 411-416
- Lord, J. M. (1985b)** Synthesis and intracellular transport of lectin and storage protein precursors in endosperm from castor bean. *Eur J Biochem*, 146, 403-409
- Lord, J. M. (1996)** Go outside and see the proteasome. Protein degradation. *Curr Biol*, 6, 1067-1069
- Lord, J.M., Harley, S.M. (1985)** *Ricinus communis* agglutinin B chain contains a fucosylated oligosaccharide side chain not present on ricin B chain. *FEBS Lett*,189, 72-76
- Lord, J. M., Roberts, L. M., Robertus, J. D. (1994)** Ricin: structure, mode of action and some current applications. *FASEB J*, 8, 201-208
- Lord, M.J., Jolliffe, N.A., Marsden, C.J., Pateman, C.S., Smith, D.C., Spooner, R.A., Watson, P.D., Roberts, L.M. (2003)** Ricin. Mechanisms of cytotoxicity. *Toxicol Rev*, 22, 53-64
- Lord, J.M., Roberts, L. M. (2005)** aus "Microbial Protein Toxins" Schmitt, M.J., Schaffrath, R. (Eds.). Springer –Verlag, Berlin, Heidelberg 2005

- Lyman, S.K., Schekman, R. (1997)** Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell*, 10, 85-96
- MacMillan-Crow, L.A., Thompson, J.A. (1999)** Immunoprecipitation of nitrotyrosine-containing proteins. *Methods Enzymol*, 301, 135-145
- Magnusson, S., Kjekens, R., Berg, T. (1993)** Characterization of two distinct pathways of endocytosis of ricin by rat liver endothelial cells. *Expl Cell Res*, 205, 118-125
- Mantis, N.J. (2005)** Vaccines against the category B toxins: staphylococcal enterotoxin B, epsilon toxin and ricin. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 1424-1439
- Matlack, N.J., Plath, K., Misselwitz, B., Rapoport, T.A. (1997)** Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science*, 15, 938-941
- Matlak, K. E. S., Mothes, W., Rapoport, T. A. (1998)** Protein translocation: tunnel vision. *Cell*, 92, 381-390
- Matlack, K.E., Misselwitz, B., Plath, K., Rapoport, T.A. (1999)** BiP acts as a molecular ratchet during post-translational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell*, 97, 553-564
- Mayer, T.U., Braun, T., Jentsch, S. (1998)** Role of the proteasome in membrane extraction of a short-lived ER-transmembrane protein. *EMBO J*, 17, 3251-3257
- Mayer, M.P., Bukau, B. (2005)** Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 62, 670-684

- Mayor, S. (2003)** UK doctors warned after ricin poison found in police raid. *BMJ*, 326, 126
- McCarty, J.S., Buchberger, A., Reinstein, J., Bukau, B. (1995)** The role of ATP in the functional cycle of the Dnak chaperone system. *J Mol Biol*, 249, 126-137
- McClellan, A.J., Brodsky, J.L. (2000)** Mutation of the ATP-binding pocket of *SSA1* indicates that a functional interaction between Ssa1p and Ydj1p is required for post-translational translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Genetics*, 156, 501-512
- McCluskey, A.J., Poon, G.M., Bolewska-Pedyczak, E., Srikumar, T., Jeram, S.M., Raught, B., Gariepy, J. (2008)** The catalytic subunit of Shiga-like toxin 1 interacts with ribosomal stalk proteins and is inhibited by their conserved C-terminal domain. *J Mol Biol*, 378, 375-386
- McCracken, A.A., Brodsky, J.L. (1996)** Assembly of ER-associated protein degradation *in vitro*: dependence on cytosol, calnexin and ATP. *J Cell Biol*, 132, 291-298
- McCracken, A.A., Brodsky, J.L. (2003)** Evolving questions and paradigm shifts in endoplasmic-reticulum-associated degradation (ERAD). *Bioassays*, 25, 868-877
- Medicherla, B., Kostova, Z., Schaefer, A., Wolf, D. H. (2004)** A genomic screen identifies Dsk2p and Rad23p as essential components of ER-associated degradation. *EMBO J*, 5, 692-697
- Meusser, B., Hirsch, C., Jarosch, E., Sommer, T. (2005)** ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol*, 7, 766-772

- Meyer, H.A., Hartmann, E. (1997)** The yeast *SPC22/23* homolog Spc3p is essential for signal peptidase activity. *J Biol Chem*, 272, 13159-13164
- Middlebrook, J.L. (2005)** Production of vaccines against leading biowarfare toxins can utilize DNA scientific technology. *Adv Drug Deliv Rev*, 57, 1415-1423
- Mlsna, D., Monzingo, A. F., Katzin, B. J., Ernst, S., Robertus, J. D.(1993)** Structure of recombinant ricin A chain at 2.3 Å. *Protein Sci*, 2, 429-435
- Moazed, D., Robertson, J.M., Noller, H.F. (1988)** Interaction of elongation factors EF-G and EF-Tu with a conserved loop in 23S RNA. *Nature*, 334, 362-364
- Möller, W., Maassen, J.A. (1986)** On the structure, function and dynamics of L7/12 from *Escherichia coli* ribosomes. In *Structure, Function and Genetics of Ribosomes*. Hardesty, B., Kramer, G (eds). New York: Springer-Verlag, pp.309-325
- Montfort, W., Villafranca, J.E., Monzingo, A.F., Ernst, S.R., Katzin,B., Rutenber, E., Xuong ,N.H., Hamlin, R., Robertus, J.D. (1987)** The three-dimensional structure of ricin at 2.8 Å. *J Biol Chem*, 262, 5398-5403
- Moya, M., Dautry-Varsat, A., Goud, B., Louvard, D., Boquet, P.(1985)** Inhibition of coated pit formation in Hep2 cells blocks the cytotoxicityof diphtheria toxin but not that of ricin toxin. *J Cell Biol*, 101, 548-559
- Mullins, C., Meyer, H.-A., Hartmann, E., Green, N., Fang, H. (1996)** Structurally related Spc1p and Spc2p of yeast signal peptidase complex are functionally distinct. *J Biol Chem*, 271, 29094-29099

- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Schäfer-Korting, M. (2001)** Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- Nakatsukasa, K., Nishikawa, S., Hosokawa, N., Nagata, K., Endo, T. (2001)** Mnl1p, an alpha-mannosidase-like protein in yeast *Saccharomyces cerevisiae*, is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins. *J Biol Chem*, 276, 8635-8638
- Nakatsukasa, K., Brodsky, J.L. (2008)** The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic*, 9, 861-870
- Neuber, O., Jarosch, E., Volkwein, C., Walter, J., Sommer, T. (2005)** Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol*, 7, 993-998
- Newton, C.H., Shimmin, L.C., Yee, J., Dennis, P.P. (1990)** A family of genes encode the multiple forms of the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal proteins equivalent to the *Escherichia coli* L12 protein and a single form of the L10-equivalent ribosomal protein. *J Bacteriol*, 172, 579-588
- Ng, D.T.W., Brown, J.D., Walter, P. (1996)** Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*, 134, 269-278
- Nichols, B.J., Lippincott-Schwartz, J. (2001)** Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol*, 11, 406-412

- Nilsson, L., Nygard, O. (1986)** The mechanism of the protein synthesis elongation cycle in eukaryotes: the effects of ricin on the ribosome interaction with elongation factors. *Eur J Biochem*, 161, 111-117
- Nishikawa, S., Fewell, S.W., Kato, Y., Brodsky, J.L., Endo, T. (2001)** Molecular chaperones in the yeast endoplasmic reticulum maintain the solubility of proteins for retrotranslocation and degradation. *J Cell Biol*, 153, 1061-1069
- Nishikawa, S., Brodsky, J.L., Nakatsukasa, K. (2005)** Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J Biochem*, 137, 551-555
- Oldfield, E.H. and Youle, R.J. (1998)** Immunotoxins for brain tumor therapy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 234, 97-114
- Olsnes, S. and Pihl, A. (1973)** Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochem*, 35, 3121-3126
- Olsnes, S. and Pihl, A. (1973)** Isolation and properties of abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis: evidence for different biological functions of its constituents-peptide chains. *Eur J Biochem*, 35, 179-185
- Olsnes, S. (1978)** Ricin and ricinus agglutinin, toxic lectins from castor bean. *Methods Enzymol*, 50, 330-335
- Olsnes, S., Pihl, A. (1982)** Toxic lectins and related proteins. In Cochen P., van Heyningen S., editors. *Molecular action of toxins and viruses*. Amsterdam, Elsevier, pp. 51-105

- Otte, S., Belden, W.J., Heidtmann, M., Liu, J., Jensen, O.N., Barlowe, C. (2001)** Erv41p and Erv46p: new components of COP II vesicles involved in transport between ER and Golgi complex. *J Cell Biol*, 152, 503-518
- Panchal, C.J., Whitney, G.K., Stewart, G.G. (1984)** Susceptibility of *Saccharomyces* spp. and *Schwanniomyces* spp. to the aminoglycoside antibiotic G418. *App Environ Microbiol*, 47, 1164-1166
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., Rapoport, T.A. (1995)** Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*, 81, 561-570
- Papa, F., Hochstrasser, M. (1993)** The yeast *DOA4* gene encodes a deubiquitination enzyme related to a product of the human *tre-2* oncogene. *Nature*, 366, 313-319
- Papa, F.R., Amerik, A.Y., Hochstrasser, M. (1999)** Interaction of the Doa4 deubiquitinating enzyme with the yeast 26S proteasome. *Mol Biol Cell*, 10, 741-756
- Papaloucas, M., Papaloucas, C. and Stergioulas, A. (2008)** Ricin and the assassination of Georgi Markov. *Pak. J. Biol. Sci.*, 11, 2370-2371
- Parikh, B.A. and Tumer, N.E. (2004)** Antiviral activity of ribosome inactivating proteins in medicine. *Mini Rev. Med. Chem.*, 4, 523-543
- Parikh, B.A., Tortora, A., Li, X.P., Tumer, N.E. (2008)** Ricin inhibits activation of the unfolded protein response by preventing splicing of the *HAC1* mRNA. *J Biol Chem*, 7, 6145-6153

- Parker, D.T., Parker, A.C., Ramachandran, C.K. (1996)** Joint Technical Data Source Book, Vol 6 Part 3, 1-38
- Pelham, H. R. B., Roberts, L. M., Lord, J. M. (1992)** Toxin entry: how reversible is the secretory pathway?. *Trends Cell Biol*, 2, 183-185
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Helenius, A. (2001)** Caveolarendocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*, 3, 473-483
- Perlman, D., Halvorson, H.O. (1983)** A putative signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J Mol Biol*, 167, 391-409
- Peumans, W.J., Hao, Q., Van Damme, E.J.M. (2001)** Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases?. *FASEB J*, 15, 1493-1506
- Pfund, C., Lopez-Hoyo, N., Ziegelhoffer, T., Schilke, B.A., Lopez-Buesa, P., Walter, W.A., Wiedmann, M., Craig, E.A. (1998)** The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex. *EMBO J*, 17, 3981-3989
- Pfund, C., Huang, P., Lopez-Hoyo, N., Craig, E.A. (2001)** Divergent functional properties of the ribosome-associated molecular chaperone Ssb compared with other Hsp70s. *Mol Biol Cell*, 12, 3773-3782
- Pickart, C.M., Eddins, M.J. (2004)** Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1695, 55-72

- Pilon, M., Schekman, R., Romisch, K. (1997)** Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J*, 16, 4540-4548
- Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B.M., Stirling, C.J., Rapoport, T.A. (1998)** Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell*, 94, 795-807
- Prestle, J., Schönfelder, M., Adam, G. and Mundry, K.-W. (1992)** Type 1 ribosome-inactivating protein depurinate plant 25S rRNA without species specificity. *Nucleic Acids Res*, 20, 3179-3182
- Prinz, A., Hartmann, E., Kalies, K.U. (2000)** Sec61p ist the main ribosome receptor in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem*, 381, 1025-1029
- Prydz, K., Hansen, S. H., Sandvig, K., van Beurs, B. (1992)** Effects of Brefeldin A on endocytosis, transcytosis and transport to the Golgi complex in polarized MDCK cells. *J Cell Biol*, 119, 259-272
- Pucciarelli, M.G., Remacha, M., Vilella, M.D., Ballesta, J.P.G. (1990)** The 26S rRNA binding ribosomal protein equivalent to bacterial protein L11 is encoded by unspliced duplicated genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Rev*, 18, 4409-4416
- Raasi, S., Wolf, D.H. (2007)** Ubiquitin receptors and ERAD: a network of pathways to the proteasome. *Semin Cell Dev Biol*, 18, 780-791
- Ralston, H.J. III (2005)** Pain and the primate thalamus. *Prog Brain Res*, 149, 1-10

- Rao, H., Sastry, A. (2002)** Recognition of specific ubiquitin conjugates is important for the proteolytic functions of the ubiquitin-associated domain proteins Dsk2p and Rad23p. *J Biol Chem*, 277, 11691-11695
- Rape, M., Hoppe, T., Gorr, I., Kalocay, M., Richly, H., Jentsch, S. (2001)** Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), a ubiquitin-selective chaperone. *Cell*, 107, 667-677
- Rapoport, T.A., Rolls, M.M., Jungnickel, B. (1996)** Approaching the mechanism of protein transport across the ER membrane. *Curr Opin Cell Biol*, 8, 499-504
- Ravid, T., Kreft, S.G., Hochstrasser, M. (2006)** Membrane and soluble substrates of the Doa10 ubiquitin ligase are degraded by distinct pathways. *EMBO J*, 25, 533-543
- Ready, M., Katzin, B., Robertus, J. (1988)** Ribosome-inhibiting proteins, retroviral reverse transcriptases, and Rnase H share common structural elements. *Proteins*, 3, 53-59
- Reinbothe, S., Reinbothe, C., Lehmann, J., Becker, W., Apel, K., Parthier, B. (1994)** JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 7012-7016
- Richardson, P. T., Westby, M., Roberts, L. M., Gould, J. H., Colman, A., Lord, J. M. (1989)** Recombinant proricin binds galactose but does not depurinate 28 S ribosomal RNA. *FEBS Lett*, 255, 15-20

- Richly, H., Rape, M., Braun, S., Rumpf, S., Hoege, C., Jentsch, S. (2005)** A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell*, 120, 73-84
- Riederer, M.A., Soldati, T., Shapiro, A.D., Goda, Y., Pfeffer, S. (1994)** Lysosome biogenesis requires Rab9 function and receptor recycling from late endosomes to the trans Golgi network. *J Cell Biol*, 125, 573-582
- Rivett, A.J. (1993)** Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem J*, 291, 1-10
- Roberts, L.M., Lord, J.M. (1981)** The synthesis of *Ricinus communis* agglutinin, cotranslational and posttranslational modification of agglutinin polypeptides. *Eur J Biochem*, 119, 31-41
- Robertus, J. (1988)** Toxin structure, p. 11-24. In Frankel, A. (ed), *Immunotoxins*. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Mass.
- Rodal, S. K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Beurs, B., Sandvig, K. (1999)** Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytotic vesicles. *Mol Biol Cell*, 10, 961-974
- Rodan, A.R., Simons, J.F., Trombetta, E.S., Helenius, A. (1996)** N-linked oligosaccharides are necessary and sufficient for association of glycosylated forms of bovine Rnase with calnexin and calreticulin. *EMBO J*, 15, 6921-6930
- Rodighiero, C., Tsai, B., Rapoport, T.A., Lencer, W.I. (2002)** Role of ubiquitination in retrotranslocation of cholera toxin and escape of cytosolic degradation. *EMBO Rep*, 3, 1222-1227

- Roux, E., Yersin A. (1888)** « Contribution a l'étude de la diphtherie. »
Ann Inst Pasteur 2: 629-661. 3: 273.
- Rubina, A.Y., Dyukova, V.I., Grishin, E.V., Zasedatelev, A.S. (2005)**
Quantitative immunoassay of biotoxins and hydrogel- based
protein microchips. Anal Biochem, 340, 317-329
- Rudiger, S., Schneider-Mergener, J., Bukau, B. (2001)** Its substrate
specificity characterizes the DnaJ co-chaperone as a scanning
factor for the DnaK chaperone. EMBO J, 20, 1042-1050
- Rumpf, S., Jentsch, S. (2006)** Functional division of substrate
processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone.
Mol Cell, 21, 261-269
- Russ, G., Esquivel, F., Yewdell, J. W., Cresswell, P., Spies,
T., Bannink, J. R. (1995)** Assembly, intracellular location and
nucleotide binding properties of the human peptide transporters
TAP1 and TAP2 expressed by recombinant vaccinia viruses. J
Biol Chem, 270, 21312-21318
- Russel, R., Wali Karzei, A., Mehl, A.F., McCracken, R. (1999)** DnaJ
dramatically stimulates ATP hydrolysis by DnaK: insight into
targeting of Hsp70 proteins to polypeptide substrates.
Biochemistry, 38, 4165-4176
- Saeki, Y., Toh-e, H., Yokosawa, H. (2000)** Rapid isolation and
characterization of the yeast proteasome regulatory complex.
Biochem Biophys Res Commun, 273, 509-515
- Saeki, Y., Saitoh, A., Toh-e, A., Yokosawa, H. (2002)** Ubiquitin-like
proteins and Rpn10 play cooperative roles in ubiquitin-dependent
proteolysis. Biochem Biophys Res Commun, 293, 986-992

- Saenz-Robles, M.T., Vilella, M.D., Pucciarelli, G., Polo, G., Remacha, M., Ortiz, B.L., Vidales, F., Ballesta, J.P.G. (1988)** Ribosomal proteins interactions in yeast. protein L15 forms a complex with the acidic proteins. *Eur J Biochem*, 177, 531-537
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989)** *Molecular cloning: Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Sandvig, K., Olsnes, S., Pihl, A. (1976)** Kinetics of binding of the toxic lectins abrin and ricin to surface receptors of human cells. *J Biol Chem*, 251, 3977-3984
- Sandvig, K., Prydz, K., Hansen, S., van Deurs, B. (1991)** Ricin transport in Brefeldin A-treated cells: correlation between Golgi structure and toxic effect. *J Cell Biol*, 115,971-981
- Sandvig, K., van Deurs, B. (1996)** Endocytosis, intracellular transport and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin. *Physiol Rev*, 76, 949-966
- Sandvig, K. (2001)** Shiga toxin. *Toxicon* 39, 1629-1635
- Sandvig, K., van Deurs, B. (2002)** Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, Cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett*, 529, 49-53
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 5463-5467
- Sayeed, A. Ng, D.T. (2005)** Search and destroy: ER quality control and the ER-associated protein degradation. *Crit Rev Mol Biol*, 40, 75-91

- Schäuble, N. (2008)** Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) zur Identifizierung von *in vivo* Interaktionspartnern des viralen K28 Toxins in Hefe, Diplomarbeit, Universität des Saarlandes
- Schauber, C., Chen, L., Tongaonkar, P., Vega, I., Lambertson, D., Potts, W., Madura, K. (1998)** Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway, *Nature*, 391, 715-718
- Schekman, R., Orci, L. (1996)** Coat proteins and vesicle budding. *Science*, 271, 1526-1533
- Schenborn, E.T., Mierendorf, R.C. Jr. (1985)** A novel transcription property of *SP6* and *T7* RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acids Res.*, 13, 6223-6236
- Schiestl, R. H. And Gietz, R. D. (1989)** High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Gent*, 16, 339-346
- Schlossmann, D., Withers, D., Welsh, P., Alexander, A., Robertus, J., Frankel, A. (1989)** Role of glutamic acid 177 of the ricin toxin A chain in enzymatic inactivation of ribosomes. *Mol Cell Biol*, 9, 5012-5021
- Schmidt, M., Hanna, J., Elsasser, S., Finley, D. (2005)** Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. *Biol Chem*, 386, 725-737
- Schmitt, M.J., Breinig, F. (2002)** The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol Rev*, 26, 257-276

- Schmitz, A., Herrgen, H., Winkeler, A., Herzog, V. (2000)** Cholera toxin is exported from microsomes by the Sec61p complex. *J Cell Biol*, 148, 1203-1212
- Schnöder, T. (2005)** Untersuchungen zum Mechanismus der ER/Cytosol-Dislokation von Ricin A in Hefezellen, Diplomarbeit, Universität des Saarlandes
- Schuberth, C., Buchberger, A. (2005)** Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol*, 7, 999-1006
- Sha, B., Lee, S., Cyr, D.M. (2000)** The crystal structure of the polypeptide-binding fragment from the yeast Hsp40 protein Sis1. *Structure*, 8, 799-807
- Shapiro, A. L., Vinuela, E. And Maizel, J. V., Jr. (1967)** Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun*, 28, 815-820
- Shaw, P.C., Lee, K.M. and Wong, K.-B. (2005)** Recent advances in trichosanthin, a ribosome-inactivating protein with multiple pharmacological properties. *Toxicon*, 45, 683-689
- Shearer, A.G., Hampton, R.Y. (2004)** Structural control of endoplasmic reticulum-associated degradation: effect of chemical chaperones on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *J Biol Chem*, 279, 188-196
- Shearer, A.G., Hampton, R.Y. (2004)** Lipid-mediated, reversible misfolding of a sterol-sensing domain protein. *EMBO J*, 24, 149-159

- Simmons, B.M., Stahl, P.D., Russell, J.H. (1986)** Mannose-receptor-mediated uptake of ricin toxin and ricin A chain by macrophages. Multiple intracellular pathways for A chain translocation. *J Biol Chem*, 261, 7912-7920
- Simpson, J. C., Dascher, C., Roberts, L. M., Lord, J. M., Balch, W.E. (1995)** Ricin cytotoxicity is sensitive to recycling between the endoplasmic reticulum and the Golgi complex. *J Biol Chem*, 270, 20078-20083
- Simpson, J. C., Roberts, L. M., Römisch, K., Davey, J., Wolf, D. H., Lord, J. M. (1999)** Ricin A utilises the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter the cytosol of yeast. *FEBS Lett*, 459, 80-84
- Singer, J.D., Manning, B.M., Formosa, T. (1996)** Coordinating DNA replication to produce one copy of the genome requires genes that act in ubiquitin metabolism. *Mol Cell Biol*, 16, 1356-1366
- Slominska-Wojewodzka, M., Gregers, T.F., Wälchli, S., Sandvig, K. (2006)** *EDEM* is involved in retrotranslocation of ricin in the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Mol Biol Cell*, 17, 1664-1675
- Smith, D. C., Gallimore, A., Jones, E., Roberts, B., Lord, J. M., Deeks, E., Cerundolo, V., Roberts, L. M. (2002)** Exogenous peptides delivered by ricin require processing by signal peptidase for transporter associated with antigen processing-independent MHC class I-restricted presentation. *J Immunol*, 169, 99-107
- Sommer, T., Wolf, D. H. (1997)** Endoplasmic reticulum degradation: reverse protein flow of no return. *FASEB J*, 11, 1227-1233

- Spilsberg, B., Van Meer, G., Sandvig, K. (2003)** Role of lipids in the retrograde pathway of ricin intoxication. *Traffic*, 4, 544-552
- Spooner, R.A., Smith, D.C., Easton, A.J., Roberts, L.M., Lord, J.M. (2006)** Retrograde transport pathways utilised by viruses and protein toxins. *Virology*, 3, 26
- Springer, S., Chen, E., Duden, R., Marzioch, M., Rowley, A., Hammamoto, S., Merchant, S., Schekman, R. (2000)** The p24 proteins are not essential for vesicular transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 4034-4039
- Stillmark, H. (1888)** Über Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von *Ricinus communis* L. und anderen Euphorbiacen. Doctoral Thesis, University of Estonia
- Stirpe, F. (2004)** Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon* 44, 371-383
- Stöffler, G, Cundliffe, E., Stöffler-Meilicke, M., Dabbs, E.R. (1980)** Mutants of *Escherichia coli* lacking ribosomal protein L11. *J Biol Chem*, 255, 10517-10522
- Suh, W.C., Burkholder, W.F., Lu, C.Z., Zhao, X., Gottesman, M.E., et al. (1998)** Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its co-chaperones DnaJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 15223-15228
- Suzuki, T., Park, H., Hollingsworth, N.M., Sternglanz, R., Lennarz, W.J. (2000)** PNG1, a yeast gene encoding a highly conserved peptide: N-glycanase. *J Cell Biol*, 149, 1039-1052

- Suzuki, T., Park, H., Kwofie, M.A., Lennarz, W.J. (2001)** Rad23 provides a link between the Png1 deglycosylating enzyme and the 26S proteasome in yeast. *J Biol Chem*, 276, 21601-21607
- Swaminathan, S., Amerik, A.Y., Hochstrasser, M. (1999)** The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol Biol Cell*, 10, 2583-2594
- Swanson, R., Locher, M., Hochstrasser, M. (2001)** A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation. *Genes Dev*, 15, 2660-2674
- Szabo, A., Korszun, R., Hartl, F.U., Flanagan, J. (1996)** A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J*, 15, 408-417
- Szathmary, R., Biemann, R., Nita-Lazar, M., Burda, P., Jakob, C.A. (2005)** Yos9 protein is essential for degradation of misfolded glycoproteins and may function as lectin in ERAD. *Mol Cell*, 19, 765-775
- Szewczak, A.A., Moore, P.B., Chang, Y.L., Wool, I.G. (1993)** The conformation of the sarcin/ricin loop from 28S ribosomal RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 9581-9585
- Taxis, C., Hitt, R., Park, S.H., Deak, P.M., Kostova, Z., Wolf, D.H. (2003)** Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD. *J Biol Chem*, 278, 35903-35913

- Taylor, S., Massiah, A., Lomonossoff, G., Roberts, L. M., Lord, J. M., Hartley, M. (1994)** Correlation between the activities of five ribosome-inactivating proteins in depurination of tobacco ribosomes and inhibition of tobacco mosaic virus infection. *Plant J*, 5, 827-835
- Tchorzewski, M., Krokowski, D., Boguszewska, A., Liljas, A., Grankowski, N. (2003)** Structural characterization of yeast acidic ribosomal P proteins forming the P1A-P2B heterocomplex. *Biochemistry*, 42, 3399-3408
- Teter, K., Holmes, R. K. (2002)** Inhibition of endoplasmic reticulum-associated degradation in CHO cells resistant to Cholera toxin, *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A and ricin. *Infect Immun*, 70, 6172-6179
- Theuer, C.P. and Pastan, I. (1993)** Immunotoxins and recombinant toxins in the treatment of solid carcinomas. *Am. J. Surg.*, 166, 284-288
- Trombetta, E.S., Parodi, A.J. (2003)** Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19, 649-676
- Tsai, B., Ye, Y., Rapoport, T.A. (2002)** Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 246-255
- Tsien, R.Y. (1998)** The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 67, 509-567
- Tulley, R. E., Beevers, H. (1976)** Protein bodies of castor bean endosperm. Isolation, fractionation and characterization of protein components. *Plant Physiol*, 58, 710-716

- Tumer, N.E., Hwang, D.-J. and Bonness, M. (1997)** C-terminal deletion of pokeweed antiviral protein inhibits viral infection but does not depurinate host ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 3866-3871
- Unger, C. (2000)** Analyse funktioneller Domänen von *SEC71* und *SEC72* im posttranslationalen Translokationsprozess von *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin
- Van Damme, E.J.M., Hao, Q., Barre, A., Vandebussche, F., Desmyter, S., Rouge, P., Peumans, W.J. (2001)** Ribosome-inactivating proteins: a family of plant proteins that do more than inactivate ribosomes. *Crit Rev Plant Sci*, 20, 395-465
- Van Deurs, B., Sandvig, K., Petersen, O. W., Olsnes, S., Simons, K., Griffiths, G. (1988)** Estimation of the amount of internalized ricin that reaches the trans- Golgi network. *J Cell Biol*, 106, 253-267
- Vashist, S.W., Kim, W.J., Belden, E.D., Barlowe, C., Ng, D.T.W. (2001)** Distinct retrieval and retention mechanisms are required for the quality control of endoplasmic reticulum protein folding. *J Cell Biol*, 155, 355-368
- Vashist, S., Ng, D.T.W. (2004)** Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J Cell Biol*, 165, 41-52
- Vembar, S.S., Brodsky, J.L. (2008)** One step at time: endoplasmic reticulum associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 944-957

- Villafranca, J.E., Robertus, J.D. (1981)** Ricin B chain is a product of gene duplication. *J Biol Chem*, 256, 554-556
- Vitale, A., Raikhel, N. (1999)** What do proteins need to reach different vacuoles?. *Trends Plant Sci*, 4, 149-155
- Von der Lehr, N et al. (2003)** The F-box protein Skp2 participates in c-Myc proteasomal degradation and acts as a cofactor for c-Myc-regulated transcription. *Mol Cell*, 11, 1189-1200
- Von Heijne, G. (1983)** How signal sequences maintain cleavage specificity. *J Mol Biol*, 173, 243-251
- Von Heijne, G. (1984)** Analysis of the distribution of charged residues in the N-terminal region of signal sequences: implications for protein export in prokaryotic and eukaryotic cells. *EMBO J*, 3, 2315-2318
- Von Heijne, G. (1994)** In *Signal Peptidases* (von Heijne G., ed), pp. 1-3, R.G. Landes Company, Austin, Texas
- Wagman, G.H., Testa, R.T., Marquez, J.A., Weinstein, M.J. (1974)** Antibiotic G-418, a new *Micromonospora*-produced aminoglycoside with activity against protozoa and helminths: fermentation, isolation, and preliminary characterization. *Antimicrob Agents Chemother*, 6, 144-149
- Walker, D., Chaddock, A.M., Chaddock, J.A., Roberts, L.M., Lord, J.M., Robinson, C. (1996)** Ricin A chain fused to a chloroplast-targeting signal is unfolded on the chloroplast surface prior to import across the envelope membranes. *J Biol Chem*, 271, 4082-4085

- Walsh, T.A., Morgan, A.E., Hey, T.D. (1991)** Characterization and molecular cloning of a proenzyme form of a ribosome-inactivating protein from maize: novel mechanism of proenzyme activation by proteolytic removal of a 2.8-kilo-dalton internal peptide segment. *J Biol Chem*, 266, 23422-23427
- Walsh, P., Bursac, D., Law, Y.C., Cyr, D., Lithgow, T. (2004)** The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO*, 5, 567-571
- Wang, T.F., Chang, J.H., Wang, C. (1993)** Identification of the peptide binding domain of hsc70 18-Kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding. *J Biol Chem*, 268, 26049-26051
- Wang, J.-H., Nie, H.-J., Huang, H., Tam, S.-C., Zheng, Y.-T. (2003)** Independency of anti-HIV-1 activity from ribosome-inactivating activity of trichosanthin. *Biochem Biophys Res Commun*, 302, 89-94
- Wang, P., Tumer, N.E. (2000)** Virus resistance mediated by ribosome inactivating proteins. *Adv Virus Res*, 55, 325-355
- Werner-Washburne, M., Stone, D.E., Craig, E.A. (1987)** Complex interactions among members of an essential subfamily of Hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 7, 2568-2577
- Wesche, J., Rapak, A., Olsnes, S. (1999)** Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *J Biol Chem*, 274, 34443-34449
- Weston, S.A., Tucker, A., Thacher, D.R., Derbyshire, D.J., Paupit, R.A. (1994)** X-ray structure of recombinant ricin A chain at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol*, 244, 410-422

- Wickner, S., Hoskins, J., McKenney, K. (1991)** Function of DnaJ and Dank as chaperones in origin-specific DNA binding by RepA. *Nature*, 350, 165-167
- Wiertz, E.J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A., Ploegh, H.L. (1996)** Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*, 5, 432-438
- Wilkinson, K.D., Hochstrasser, M. (1998)** The deubiquitinating enzymes. In: *Ubiquitin and the Biology of the Cell*, ed. J.M. Peters, J.R. Harris, D. Finley, New York: Plenum Press, 99-125
- Wilkinson, C.R.M., Ferrell, K., Penney, M., Wallace, M., Dubiel, W., Gordon, C. (2000)** Analysis of a gene encoding Rpn10 of the fission yeast proteasome reveals that polyubiquitin-binding site of this subunit is essential when Rpn12/Mts3 activity is compromised. *J Biol Chem*, 275, 15182-15192
- Wilkinson, C.R., Seeger, M., Hartmann-Petersen, R., Stone, M., Wallace, M., Semple, C., Gordon, C. (2001)** Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol*, 3, 939-943
- Wittke, S., Lewke, N., Müller, S., Johnsson, N. (1997)** Probing the molecular environment of membrane proteins *in vivo*. *Mol Biol Cell*, 10, 2519-2530
- Wittke, S., Dünwald, M., Albertsen, M., Johnsson, N. (2002)** Recognition of a subset of signal sequences by Ssh1p, a Sec61p-related protein in the membrane of endoplasmic reticulum of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 13, 2223-2232

- Wool, I.G., Gluck, A., Endo, Y. (1992)** Ribotoxin recognition of ribosomal RNA and a proposal for the mechanism of translocation. *Trends Biochem Sci*, 17, 266-269
- Woolford, J.J. (1991)** The structure and biogenesis of ribosomes. *Adv Genet*, 29, 63-118
- Wright, H.T., Robertus, J.D. (1987)** The intersubunit disulfide bridge of ricin is essential for cytotoxicity. *Arch Biochem Biophys*, 256, 280-284
- Xie, Y., Varshavsky, A. (2000)** Physical association of ubiquitin ligases and the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 2497-2502
- Xu, X., Kanbara, K., Azakami, H., Kato, A. (2004)** Expression and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Cne1p, a calnexin homologue. *J Biochem*, 135, 615-618
- YaDeau, J.T., Klein, C., Blobel, G. (1991)** Yeast signal peptidase contains a glycoprotein and the Sec11 gene product. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 517-521
- Yamamoto, K.R., Fujii, Y., Toyofuku, T., Saito, H., Koseki, V.W.Hsu, Aoe, T. (2001)** The KDEL receptor mediates a retrieval mechanism that contributes to quality control at the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, 20, 3082-3091
- Ye, Y., Meyer, H.H., Rapoport, T.A. (2003)** Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains. *J Cell Biol*, 162, 71-84

- Ye, Y. Shibata, Y., Yun, C., Ron, D., Rapoport, T.A. (2004)** A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature*, 429, 841-847
- Yoshida, R. J., Chen, C. C., Zhang, M. S., Wu, H. C. (1991)** Disruption of the Golgi apparatus by Brefeldin A inhibits the cytotoxicity of ricin, modeccin and *Pseudomonas* toxin. *Expl Cell Res*, 192, 389-395
- Yoshida, Y. et al. (2003)** Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. *J Biol Chem*, 278, 43877-43884
- Yoshida, H. (2007)** ER stress and diseases. *FEBS J*, 274, 630-658
- Youker, R.T., Walsh, P., Beilharz, T., Lithgow, T., Brodsky, J.L. (2004)** Distinct roles for the Hsp40 and Hsp90 molecular chaperones during cystic fibrosis transmembrane conductance regulator degradation in yeast. *Mol Biol Cell*, 15, 4787-4797
- Youle, R. J., Huang, A. H. C. (1976)** Protein bodies from castor bean endosperm. Subfractionation, protein components, lectins and changes during germination. *Plant Physiol*, 58, 703-709
- Zapun, A., Darby, N.J., Tessier, D.C., Michalak, M., Bergeron, J.J.M., Thomas, D.Y. (1998)** Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with Erp57. *J Biol Chem*, 273, 6009-6012
- Zhang, Y., Nijbroek, G., Sullivan, M.L., McCracken, A.A., Watkins, S.C. et al. (2001)** Hsp70 molecular chaperones facilitates endoplasmic reticulum-associated protein degradation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in yeast. *Mol Biol Cell*, 12, 1303-1314

Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W.F., Gragerov, A., Ogata, C.M. et al. (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK, *Science*, 272, 1606-1614

Zoubenko, O., Hudak, K., Tumer, N.E. (2000) A non-toxic pokeweed antiviral protein mutant inhibits pathogen infection via a novel salicylic acid-independent pathway. *Plant Mol Biol*, 44, 219-229

Internet:

www.labor-spiez.ch/d/aktuelles/fact_sheet/ricin

www.gifte.de/B.%20und%20C-Waffen/ricin.htm

www.aerztezeitung.de/docs/2001/20/31/196a1202.asp

www.bildarchiv-hamburg.de/stadtpark_hamburg/flora/flora_08

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, August 2009

(Tina Schnöder)

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Manfred J. Schmitt für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas. Seine ständige Hilfsbereitschaft, die zahlreichen nützlichen Diskussionen sowie die vielen Tipps und Anregungen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich danke ihm aber auch für die unzähligen aufmunternden Worte, wenn mal wieder gar nichts klappen wollte.

Ein herzlicher Dank geht auch an Prof. Dr. Richard Zimmermann für die Übernahme des Koreferates sowie für die freundliche und hilfsbereite Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die finanzielle und fachliche Förderung im Rahmen des Graduiertenkollegs (GRK845). Besonders Frau Dr. Gabriele Amoroso danke ich für die nette Zusammenarbeit, für ihre Geduld und Unterstützung bei Problemen jeglicher Art sowie für die perfekt organisierten Kolloquien und Symposien.

Meinen ehemaligen Hiwis, F-Praktikanten und Diplomanden Stefan Schorr, Judith Maas, Selina Riplinger und Norman Sander danke ich für ihr Engagement, ihr Interesse und ihre Hilfsbereitschaft. Es war immer ein Erlebnis mit euch im Labor!

Der Arbeitsgruppe von Prof. Mike J. Lord und Prof. Lynne M. Roberts danke ich für die Bereitstellung des anti-RTA Antikörpers. Prof. Lynne M. Roberts danke ich außerdem ganz herzlich für die Möglichkeit, sechs Wochen in ihrem Labor an der University of Warwick forschen zu dürfen, für ihr großes Interesse an meiner Arbeit sowie für viele hilfreiche Diskussionen und Anregungen. Ich danke Dr. Shuyu Li, Dr. Robert Spooner und Dr. J.C. Cook für ihre Hilfsbereitschaft und fachliche Unterstützung bei der Durchführung der radioaktiven Markierungsexperimente. Ein zusätzlicher Dank geht an Dr. Paola Pietroni, für die gemeinsamen Unternehmungen, um Land und Leute besser kennen zu lernen.

Den Arbeitsgruppen von Prof. I. Bernhardt und Prof. R. Bernhardt danke ich für die Unterstützung bei der Lagerung und Auswertung der radioaktiven Experimente. Besonders Dr. Tarek Hakki danke ich für seine Hilfe bei der Nutzung des Phosphoimagers.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Schmitt für viele schöne und ereignisreiche Tage im Labor, für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei Problemen jeglicher Art. Insbesondere Danke ich Nicole Jundel für ihre Unterstützung bei allen verwaltungstechnischen Problemen und für die netten, kleinen Gespräche im Büro oder Flur.

Ganz besonders danke ich Frau Roswitha Schepp, die in den letzten Wochen meiner Arbeit mit vollem Einsatz und viel Geduld noch versucht hat, fehlende Konstrukte zu klonieren. Aber auch für die vielen netten privaten Gespräche, deine Herzlichkeit und deinen Humor möchte ich dir danken. Ein extra Dankeschön geht an Sebastian Klein für seine Hilfe bei der Rettung meines Literatur- und Inhaltsverzeichnisses.

Weiterhin möchte ich Dr. Frank Breinig für seine Ideen und Unterstützung zum Fluoreszenzreader-System danken, aber auch für die witzigen Momente im Labor, beim Kaffee trinken oder Eis essen. Obwohl wir nicht immer einer Meinung waren und einige hitzige Diskussionen führten, danke ich dir ganz herzlich für deinen Humor, deine Toleranz und deine Gelassenheit.

Meinem „Adoptiv“-Diplomanden Stefan Schorr danke ich ganz herzlich für seine nette und hilfsbereite Art, die fachlichen Diskussionen über Ricin, die mich immer wieder zum Nachdenken anregten, seine Geduld, wenn ich mal wieder auf dem Schlauch stand (MCnLI, MNnLI oder wie jetzt?), für seine Hilfe am Fluoreszenzmikroskop und für viele witzige Kaffee-Sessions.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei „meinen“ Mädels Julia Dausend, Mareike Kelkel und Barbara Walch für eine unvergessliche und aufregende Zeit bedanken. Ihr habt jeden Tag im Labor zu einem Erlebnis gemacht! Ich danke euch aber auch für die vielen Aktivitäten und Unternehmungen außerhalb des Labors, die mir immer wieder eine nette Abwechslung waren. Bei Julia bedanke ich mich ganz lieb für ihre fachliche Unterstützung bei PC-, Primer- oder Methodik-Problemen und für ihre Hilfe, wenn ich mal wieder völlig planlos war. Ganz lieben Dank auch für deine Hilfe am LSM! Ich danke dir aber auch für die netten Gespräche zwischendurch und für deine aufmunternden Worte und die gemeinsamen Momente, in denen wir uns mal wieder „Luft machen“ mussten. Barbara danke ich dafür, dass sie es drei Jahre mit mir an einer Bank ausgehalten hat und für die vielen Gespräche über unsere lieben „Vierbeiner“. Ich danke dir für deine liebe und hilfsbereite Art, deine tröstenden Worte, wenn es mir mal nicht so gut ging und deine Gabe zuzuhören. Dir, liebe Mareike, danke ich ganz lieb dafür, dass du immer für mich da warst, mich immer wieder aufgemuntert hast, wenn gar nichts mehr ging. Ich danke dir für die netten Kaffeepausen nach dem Essen im Mensa-Café, gerade in den letzten stressigen Monaten, und für die entspannenden Gespräche. Ich danke dir aber auch für dein Interesse an meiner Arbeit, die vielen fachlichen Diskussionen, deine Anregungen und deine Geduld. Vor allem aber danke ich dir für eine unvergessliche, aufregende Diplomarbeits- und Promotionszeit und für eine tolle Freundschaft.

Jenny Piecuch, Stefan Wic, Tanja Mushak, Christof Störger und Linda Müller danke ich für die vielen witzigen Momente und die gemütlichen Wein-Abende während der Grako-Treffen.

Zum Schluss möchte ich den wichtigsten Menschen in meinem Leben danken, ohne deren Hilfe diese Arbeit nie entstanden wäre: ich danke ganz herzlich meinen Eltern, die mich seit Beginn des Studiums immer unterstützt, nie an mir gezweifelt und mich nach jedem Rückschlag wieder aufgefangen haben. Ohne euch hätte ich es bestimmt nicht so weit geschafft. Für euer Verständnis, euren Glauben an mich und eure Liebe danke ich euch von Herzen. Meiner Schwester danke ich ganz lieb dafür, dass sie so großes Interesse an meiner Arbeit gezeigt hat, mich immer wieder aufs Neue motiviert hat und immer da war, wenn ich sie gebraucht habe. Ich danke dir für das immer-wieder-Zuhören, für die vielen kleinen Ablenkungen zwischendurch, die Freitag-Kino-Abende, die gemütlichen Sonntags-Essen und natürlich die vielen witzigen Momente in der Pfalz (gell, Örna!?). Ich danke dir und Björn für „ein Stück heile Welt“.

Mein letzter Dank geht an einen lieben Freund, der das Ende dieser Arbeit nicht mehr miterleben durfte. Danke für dein großes Herz.

Lebenslauf

Name: Tina Schnöder
Geburtsdatum: 03. April 2009
Geburtsort: Blieskastel
Familienstand: unverheiratet

Wissenschaftlicher Werdegang

Seit Januar 2006 Promotion am Lehrstuhl für Molekular- und Zellbiologie an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Prof. Dr. M.J. Schmitt

Mai 2006- April 2009 Assoziiertes Mitglied des von der DFG geförderten Graduiertenkollegs „Molekulare, physiologische und pharmakologische Analyse von zellulärem Membrantransport“ (GRK 845) der Technischen Universität Kaiserslautern, der Uniklinik Homburg und der Universität des Saarlandes Saarbrücken

Januar-Februar 2008 Forschungsaufenthalt im Labor von Prof. Lynne M. Roberts an der University of Warwick, UK

Januar-
November 2005 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Molekular- und Zellbiologie, Prof. Dr. M.J. Schmitt
Thema: „Untersuchungen zum Mechanismus der ER/Cytosol-Dislokation von Ricin A in Hefezellen“

Oktober 2000-
Dezember 2004 Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken
Hauptfach: Zellbiologie
Nebenfächer: Virologie und Pharmakologie

Beruflicher Werdegang

Oktober 1995- September 1998	Ausbildung zur Physiotherapeutin an der Krankengymnastik-Schule in Illingen Abschluss: Staatsexamen
Oktober 1998- September 1999	Anstellung als Physiotherapeutin in der Klinik am Eichert, Göppingen
Oktober 1999- Dezember 1999	Anstellung als Physiotherapeutin in der Praxis M. Wiehn, Rodalben
Dezember 1999- September 2000	Anstellung als Physiotherapeutin in der Klinik für Orthopädie, Unikliniken des Saarlandes, Homburg

Schulische Ausbildung

1986-1995	Hofenfels-Gymnasium Zweibrücken Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 2,3)
-----------	---