

Untersuchungen zum Sortierungsweg  
von Ist2 in  
*Saccharomyces cerevisiae*

Kiran Maaß  
2008

**INAUGURAL - DISSERTATION**

**zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**

**vorgelegt von  
Diplom-Humanbiologin Kiran Maaß  
aus München**

Tag der mündlichen Prüfung: .....

# Untersuchungen zum Sortierungsweg von Ist2 in *Saccharomyces cerevisiae*

Gutachter:

PD Dr. Matthias Sedorf

Prof. Dr. Blanche Schwappach

# Zusammenfassung

Ist2 ist ein integrales Membranprotein in *S. cerevisiae*. Die *IST2*-mRNA wird mit Hilfe der She-Proteine zum kortikalen ER an der Tochterzellspitze transportiert. Ist2-Protein wird unabhängig vom klassischen sekretorischen Weg zu Domänen der Plasmamembran transportiert, die zugänglich für externe Proteasen sind. Für den Transport an die Zellperipherie ist die Sequenz der C-terminalen 69 Aminosäuren von Ist2 erforderlich. In dieser Sequenz befindet sich auch das She2-bindende mRNA-Lokalisationssignal. Vermutlich erfolgt ein direkter Transport von Ist2 vom kortikalen ER zu Domänen der Plasmamembran.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Kopplung von Sec-unabhängigem Transport und lokaler Translation von Ist2 stattfindet. Außerdem sollten die Transportsignale im C-Terminus von Ist2 analysiert werden. Ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit war die Identifikation von Interaktionspartnern von Ist2, die am Transport beteiligt sind.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die lokale Translation der *IST2*-mRNA keine Voraussetzung für den Sec-unabhängigen Transport von Ist2 darstellt. Da Ist2 für einen Zeitraum von wenigen Minuten zusätzlich am perinukleären ER akkumulierte, ist es wahrscheinlich, dass ein Teil der *IST2*-mRNAs am perinukleären ER translatiert wird. Für den Transport von Ist2 vom perinukleären ER zum kortikalen ER ist ein C-terminales Proteinmotiv aus basischen und hydrophoben Aminosäuren essentiell. Ferner ist die Ausbildung einer amphipathischen  $\alpha$ -Helix für den Transport von Ist2 zur Zellperipherie notwendig. Die amphipathische Helix besteht aus den C-terminalen elf Aminosäuren und enthält auf einer Seite einen schmalen Winkel aus hydrophoben Leucinen. Die Leucine konnten nur durch sehr hydrophobe und sperrige Aminosäuren ersetzt werden, ohne den Transport von Ist2 zu beeinträchtigen. Mutation der Leucine bzw. ein Verlust der amphipathischen Anordnung oder der helikalen Struktur führten zu punktförmigen Akkumulationen von mutiertem Ist2 in spezifischen Domänen des perinukleären, kortikalen und tubulären ERs. Bei der Analyse von Interaktionspartnern von Ist2, die am Transport beteiligt sein könnten, wurden die Membranproteine Sac1 und Scs2 identifiziert. Sac1 reguliert die Phosphatidylinositolphosphat-Level der jeweiligen Kompartimente und definiert dadurch deren Membranidentität. Durch ein Zusammenspiel von Sac1 und dem Adaptor Scs2 könnte an ER-Plasmamembran-Kontaktstellen eine Anreicherung von Ist2 stattfinden und eine Membranumgebung geschaffen werden, die einen Transport von Ist2 vom kortikalen ER zu Domänen der Plasmamembran bewirkt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit ein Sortierungssignal identifiziert werden, das die Anreicherung des integralen Membranproteins Ist2 am kortikalen ER bewirkt. Es ist möglich, dass vom kortikalen ER ein weiterführender Transport zu Domänen der Plasmamembran stattfindet.

# Abstract

Ist2 is an integral membrane protein in *S. cerevisiae*. The *IST2*-mRNA is transported to the cortical ER at the bud tip via the She-machinery. Ist2 localises to domains of the plasma membrane which are accessible to external proteases. Trafficking of Ist2 occurs independently of the classical secretory pathway. The sequence encoding the C-terminal 69 amino acids of Ist2 is essential for transport to the cell periphery. This sequence also comprises the mRNA-localisation signal which is recognised by the She2-protein. Presumably a direct transport of Ist2 from the cortical ER to domains of the plasma membrane takes place.

The aim of this study was to analyse if the Sec-independent transport of Ist2 is coupled to local translation of the *IST2*-mRNA. In addition, transport signals located in the C-terminus of Ist2 should be determined. Finally, transport factors, which are necessary for Sec-independent sorting of Ist2 should be identified.

It could be shown that local translation of the *IST2*-mRNA is no prerequisite for Sec-independent trafficking of Ist2. As Ist2 additionally accumulated at the perinuclear ER for a time-frame of a few minutes, some *IST2*-mRNAs are probably translated at the perinuclear ER. A protein motif consisting of several basic and hydrophobic amino acids, located at the Ist2-C-terminus, is necessary and essential for transport of Ist2 from perinuclear to cortical ER. Furthermore the assembly of an amphipathic helix, comprising the C-terminal eleven residues, is needed for transport of Ist2 to the cell periphery. A narrow region of hydrophobic leucines is located on one side of the amphipathic helix. For correct transport of Ist2 to the cell periphery, the leucines could only be replaced by very hydrophobic and bulky residues. Mutation of the leucines and loss of the amphipathic arrangement or the helical structure resulted in dotlike accumulation of mutated Ist2 in specific domains of perinuclear, tubular and cortical ER. Regarding interacting factors, which might be involved in trafficking of Ist2, the membrane proteins Sac1 and Scs2 were identified. The lipid phosphatase Sac1 is a regulator of phosphoinositide levels and thereby determines the membrane identity of organelles. In a concerted action of Sac1 and the adaptor Scs2 an accumulation of Ist2 might occur at plasma membrane-ER-contact sites. This accumulation could create a membrane environment which is capable of transport of Ist2 from cortical ER to domains of the plasma membrane.

In summary, a sorting signal could be identified which mediates accumulation of the integral membrane protein Ist2 at the cortical ER. It is possible that further transport from cortical ER to domains of the plasma membrane takes place.

# Inhaltsverzeichnis

---

|          |                                                                                                              |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Einleitung</b>                                                                                            | <b>1</b>  |
| 1.1      | mRNA-Transport . . . . .                                                                                     | 1         |
| 1.1.1    | mRNA-Lokalisation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .                                               | 2         |
| 1.1.2    | Kopplung von mRNA-Lokalisation und Translation . . . . .                                                     | 5         |
| 1.2      | Morphologie des Endoplasmatischen Retikulums in Hefe . . . . .                                               | 5         |
| 1.3      | Sekretion und intrazelluläre Transportwege . . . . .                                                         | 6         |
| 1.3.1    | Der sekretorische Weg . . . . .                                                                              | 6         |
| 1.3.2    | Sortierungssignale für COPII . . . . .                                                                       | 9         |
| 1.3.3    | Sortierungssignale für COPI . . . . .                                                                        | 10        |
| 1.3.4    | Vesikelknospung . . . . .                                                                                    | 10        |
| 1.3.5    | SNARE-vermittelte Membranfusion . . . . .                                                                    | 12        |
| 1.3.6    | Unkonventionelle Transportwege . . . . .                                                                     | 14        |
| 1.4      | Das integrale Membranprotein Ist2 . . . . .                                                                  | 16        |
| 1.4.1    | Struktur und Funktion von Ist2 . . . . .                                                                     | 16        |
| 1.4.2    | Der Transport der <i>IST2</i> -mRNA ermöglicht die Expression von Ist2<br>in Tochterzellen . . . . .         | 17        |
| 1.4.3    | Transportsignale von Ist2 . . . . .                                                                          | 17        |
| 1.4.4    | Sec-unabhängiger Transport von Ist2 an die Zellperipherie . . . . .                                          | 18        |
| 1.4.5    | Der C-Terminus von Ist2 dirigiert Sec-unabhängig andere Membran-<br>proteine an die Zellperipherie . . . . . | 19        |
| 1.4.6    | Fusionsproteine mit dem C-Terminus von Ist2 durchqueren nicht<br>den <i>trans</i> -Golgi-Apparat . . . . .   | 20        |
| 1.5      | Aufgabenstellung . . . . .                                                                                   | 21        |
| <b>2</b> | <b>Material und Methoden</b>                                                                                 | <b>22</b> |
| 2.1      | Materialien . . . . .                                                                                        | 22        |
| 2.1.1    | Chemikalien . . . . .                                                                                        | 22        |
| 2.1.2    | Standardmedien und -puffer . . . . .                                                                         | 22        |

|          |                                                                                                                                                                          |           |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.1.3    | Enzyme, Kits und andere Reagenzien . . . . .                                                                                                                             | 22        |
| 2.1.4    | Antikörper . . . . .                                                                                                                                                     | 24        |
| 2.1.5    | Oligonukleotide . . . . .                                                                                                                                                | 24        |
| 2.1.6    | Plasmide . . . . .                                                                                                                                                       | 27        |
| 2.1.7    | Sequenzen . . . . .                                                                                                                                                      | 30        |
| 2.2      | Organismen . . . . .                                                                                                                                                     | 30        |
| 2.2.1    | Bakterienstämme ( <i>E. coli</i> ) . . . . .                                                                                                                             | 30        |
| 2.2.2    | Hefestämme ( <i>S. cerevisiae</i> ) . . . . .                                                                                                                            | 31        |
| 2.3      | Methoden . . . . .                                                                                                                                                       | 31        |
| 2.3.1    | Molekularbiologische Methoden . . . . .                                                                                                                                  | 31        |
| 2.3.2    | Mikrobiologische und genetische Methoden . . . . .                                                                                                                       | 35        |
| 2.3.3    | Proteinbiochemische Methoden . . . . .                                                                                                                                   | 39        |
| 2.3.4    | Mikroskopie . . . . .                                                                                                                                                    | 46        |
| <b>3</b> | <b>Ergebnisse</b>                                                                                                                                                        | <b>48</b> |
| 3.1      | Länge und Art des Sortierungssignals von Ist2 . . . . .                                                                                                                  | 48        |
| 3.1.1    | She2- abhängiger mRNA-Transport ist keine Voraussetzung für die Anreicherung von Ist2 im kortikalen ER und den Sec-unabhängigen Transport an die Plasmamembran . . . . . | 48        |
| 3.1.2    | Die <i>IST2</i> -3'UTR wird nicht für die Anreicherung von Ist2 im kortikalen ER und den Sec-unabhängigen Transport benötigt . . . . .                                   | 49        |
| 3.1.3    | Die C-terminalen 69 Aminosäuren von Ist2 beinhalten das Sortierungssignal . . . . .                                                                                      | 50        |
| 3.2      | Transiente Lokalisation von Ist2 am pER . . . . .                                                                                                                        | 52        |
| 3.3      | Multimerisierung beeinflusst die Effizienz des Sec-unabhängigen Transports von Ist2 . . . . .                                                                            | 55        |
| 3.4      | Funktionelle Domänen von Ist2 . . . . .                                                                                                                                  | 56        |
| 3.5      | Charakterisierung des Sortierungssignals von Ist2 . . . . .                                                                                                              | 57        |
| 3.5.1    | Hydrophobe Leucine der K/L-Sequenz sind essentiell für den Transport von Ist2 . . . . .                                                                                  | 57        |
| 3.5.2    | Die <i>IST2</i> -mRNA-Lokalisation von Leucin-Mutanten korreliert nicht mit der Akkumulation von Ist2-Protein . . . . .                                                  | 65        |
| 3.5.3    | Mutiertes Ist2 akkumuliert an spezifischen Domänen des ER . . . . .                                                                                                      | 67        |

|          |                                                                                                                                          |            |
|----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.5.4    | Die Funktion der K/L-Sequenz ist abhängig von der Anordnung der hydrophoben und basischen Aminosäuren in einer $\alpha$ -Helix . . . . . | 71         |
| 3.5.5    | Die Position der Lysine in der K/L-Sequenz beeinflusst ihre Funktion                                                                     | 73         |
| 3.5.6    | Die K/L-Sequenz ist nur in nah verwandten Hefespezies konserviert                                                                        | 79         |
| 3.6      | Identifizierung und Analyse von Interaktionspartnern von Ist2 . . . . .                                                                  | 80         |
| 3.6.1    | Genetischer Screen . . . . .                                                                                                             | 81         |
| 3.6.2    | GST-Pulldown . . . . .                                                                                                                   | 82         |
| 3.6.3    | Ko-Immunpräzipitation . . . . .                                                                                                          | 84         |
| 3.6.4    | Scs2 kolokalisiert mit mutiertem Ist2 . . . . .                                                                                          | 92         |
| 3.6.5    | Scs2 hat keinen direkten Einfluss auf den Transport von Ist2 . . . .                                                                     | 93         |
| <b>4</b> | <b>Diskussion</b>                                                                                                                        | <b>95</b>  |
| 4.1      | <i>IST2</i> -mRNA-Lokalisation, Anreicherung am kortikalen ER und Sec-unabhängiger Transport zur Plasmamembran . . . . .                 | 95         |
| 4.1.1    | Die Anreicherung am kortikalen ER und der Sec-unabhängige Transport von Ist2 erfolgen unabhängig von lokaler Translation . . . . .       | 95         |
| 4.1.2    | Translationsorte von Ist2 . . . . .                                                                                                      | 97         |
| 4.2      | Analyse der Ist2-Lokalisationssignale . . . . .                                                                                          | 99         |
| 4.2.1    | Bedeutung der Multimerisierung für die Anreicherung von Ist2 am kortikalen ER und an Domänen der Plasmamembran . . . . .                 | 99         |
| 4.2.2    | Anreicherung von Ist2 an Domänen des kortikalen ERs . . . . .                                                                            | 100        |
| 4.2.3    | Transport von Ist2 zu Domänen der Plasmamembran . . . . .                                                                                | 104        |
| 4.3      | Konservierung des Ist2-Sortierungssignals . . . . .                                                                                      | 105        |
| 4.4      | Interaktionspartner von Ist2 . . . . .                                                                                                   | 107        |
| 4.5      | Modell des Transports . . . . .                                                                                                          | 111        |
| 4.6      | Ausblick . . . . .                                                                                                                       | 113        |
|          | <b>Literaturverzeichnis</b>                                                                                                              | <b>114</b> |
|          | <b>Abbildungsverzeichnis</b>                                                                                                             | <b>135</b> |
|          | <b>Tabellenverzeichnis</b>                                                                                                               | <b>137</b> |
|          | <b>Abkürzungsverzeichnis</b>                                                                                                             | <b>138</b> |

# 1 Einleitung

---

Eine eukaryotische Zelle enthält vielfältige membranumhüllte Kompartimente. Die Ausbildung dieser Membranstrukturen schafft unterschiedliche Reaktionsräume, in denen Vorgänge mit hoher Effizienz und Selektivität stattfinden können. Durch die Kompartimentierung der Zelle sind für die Übermittlung von Proteinen, Stoffwechselprodukten und Lipiden zielgerichtete Transportsysteme zwischen den einzelnen Organellen erforderlich, während gleichzeitig die Homöostase zwischen den Kompartimenten gewährleistet sein muss. Der Transport der nötigen Faktoren kann zum Teil auf der Ebene der mRNA erfolgen oder erst auf Proteinebene, sei es durch Translokation eines Transmembranproteins vom Cytosol in ein membranumschlossenes Organell, durch Schleusen-Transport vom Cytosol in den Zellkern oder durch vesikulären Transport zwischen den Kompartimenten. Im Folgenden wird zuerst die mRNA-Lokalisation thematisiert, gefolgt von einem Überblick über den Vesikeltransport im sekretorischen Weg. Anschließend wird auf unkonventionelle Sekretionswege und die bisherigen Erkenntnisse über den Sec-unabhängigen Transportweg des Membranproteins Ist2 an die Zellperipherie in *Saccharomyces cerevisiae* eingegangen, welcher im Mittelpunkt dieser Arbeit steht.

## 1.1 mRNA-Transport

Der cytoplasmatische Transport von mRNA-Molekülen ist ein Prozess, der für die spezifische Anreicherung von mRNA-Molekülen an bestimmten subzellulären Regionen sorgt. Der Transport von mRNA ist energetisch wesentlich effizienter als der Transport von Proteinen, da ein einziges mRNA-Molekül mehrfach translatiert werden kann und dadurch eine hohe lokale Proteinkonzentration ermöglicht. mRNA-Lokalisation kann durch aktiven Transport entlang des Zytoskeletts, durch lokale Stabilisierung von mRNA-Molekülen oder erleichterte Diffusion in Kombination mit Verankerung am Zielort geschehen (Wilhelm und Vale, 1993; Ding et al., 1993; Glotzer et al., 1997).

Der mRNA-Transport spielt bei einer Vielzahl von Vorgängen in der Zelle eine große Rolle. Polarisiertes Zellwachstum und asymmetrische Zellteilung setzen eine hohe lokale Konzentration von bestimmten Proteinen voraus (Jansen, 2001; Aronov et al., 2007). Ebenso wird bei der Zelldifferenzierung eine räumlich und zeitlich begrenzte Anreicherung von Proteinen benötigt. Je nach Zellart kann der mRNA-Transport zu den Polen einer Oozyte (*bicoid*, *nanos*, *oskar* in *Drosophila*), zur Tochterzelle in Hefe (*ASH1* und *IST2* in *S. cerevisiae*), zu speziellen Membranen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) oder zu anderen komplexen Strukturen in der Zelle (Basalkörper in Protozoen) erfolgen (Driever und Nüsslein Volhard, 1988; Ephrussi et al., 1991; Gavis und Lehmann, 1992; Long et al., 1997; Takizawa et al., 2000; Singer, 1992; Jansen, 2001; Han et al., 1997).

In neuronalen Zellen spielt der mRNA-Transport möglicherweise auch bei Lernvorgängen und Gedächtnis eine Rolle (Palacios und St Johnston, 2001).

### 1.1.1 mRNA-Lokalisation in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Wichtigkeit des mRNA-Transportes wurde entdeckt, als in *S. cerevisiae* der Paarungstypwechsel von haploiden Hefezellen analysiert wurde. Diploide Hefezellen bilden unter Nährstoffmangel Sporen mit haploidem Chromosomensatz und zwei unterschiedlichen Paarungstypen aus. Mutterzellen können nach der Abknospung einer Tochterzelle den Paarungstyp wechseln, während dies in Tochterzellen nicht möglich ist (Herskowitz, 1988). Vermutlich soll dadurch sichergestellt werden, dass in einer Hefepopulation eine gleiche Anzahl von Zellen mit beiden Paarungstypen vorhanden ist, um anschließend wieder die Bildung einer diploiden Kultur zu ermöglichen.

Bei einem Wechsel des Paarungstyps von MAT a zu MAT  $\alpha$  oder umgekehrt vermittelt die HO-Endonuklease eine genomische Umlagerung am MAT-Lokus und verursacht einen Austausch des gerade aktiven MAT-Lokus durch eine Kopie des vorher inaktiven MAT-Lokus.

Der Transkriptionsfaktor Ash1 wird selektiv in Tochterzellen exprimiert, in deren Zellkern er die Transkription der HO-Endonuklease inhibiert (Bobola et al., 1996; Sil und Herskowitz, 1996). Die asymmetrische Verteilung von Ash1 erfolgt durch Transport der *ASH1*-mRNA an die Tochterzellspitze und anschließender lokale Translation (Long et al., 1997; Takizawa et al., 1997). Bei diesem Transport spielen die Proteine She1-5 eine entscheidende Rolle: Zwei She2-Moleküle binden als Dimer noch im Zellkern an Lokalisationselemente der *ASH1*-mRNA, die beim Transport als *messenger*-Ribonukleoprotein (mRNP)-Komplex vorliegt (Jansen et al., 1996; Niessing et al., 2004). Die *ASH1*-mRNA besitzt vier dieser Lokalisationselemente (E1, E2A, E2B und E3), welche sowohl in der kodierenden Region (E1, E2A und E2B) als auch am Ende des offenen Leserahmens (*ORF*) bis in die nicht translatierte Region (E3) positioniert sind (Chartrand et al., 1999, 2002). Diese sogenannten *zip codes* bilden stabile *stem-loop*-Strukturen und verhindern eine Translation während des Transportes (Böhl et al., 2000; Long et al., 2000; Jansen et al., 1996). Nach dem Transport aus dem Nukleus ins Cytoplasma bindet an diesen mRNP-Komplex das Adaptormolekül She3, welches über eine N-terminale *coiled-coil*-Domäne die Interaktion mit dem Myosin Motorprotein Myo4 vermittelt (Takizawa und Vale, 2000; Böhl et al., 2000).

In Hefe gibt es zwei Typ V Myosine: Myo2 und Myo4. Myo2 ist ein essentielles Protein, das für den Vesikeltransport entlang polarisierter Aktinkabel nötig ist sowie bei der Orientierung der mitotischen Spindel involviert ist. Außerdem ist Myo2 an der Vererbung von Vakuolen, Mitochondrien und dem Golgi-Apparat beteiligt (Schott et al., 2002; Hill et al., 1996; Weisman, 2003; Yin et al., 2000; Itoh et al., 2002; Rossanese et al., 2001). Myo4 (She1) ist ein Typ V Myosin, welches mRNP-Komplexe entlang des Aktinzytoskeletts

an die Tochterzellspitze transportiert. Ferner ist Myo4 bei der Vererbung des kortikalen ERs in die Tochterzelle beteiligt (Reck Peterson et al., 2001; Estrada et al., 2003). In Tabelle 1.1 sind weitere lokalisierte mRNAs aufgelistet, welche auch Bestandteil der mRNP-Komplexe sind.

Für den Transport des mRNP-Komplexes sind zusätzlich die Proteine She4 und She5 nötig. She4 wird für die Lokalisation von Myo4 in die Tochterzelle benötigt und ist vermutlich bei der Regulation der Interaktion von Aktin und Myosin beteiligt (Wesche et al., 2003; Toi et al., 2003). She5 - auch Bni1 genannt - ist ein Formin, das zusammen mit Bud6 die Organisation des Aktinzytoskeletts reguliert (Evangelista et al., 1997). Deletion von entweder She5 oder Bud6 verursachte einen Defekt in der Lokalisation und Verankerung der *ASH1*-mRNA in der Tochterzelle (Long et al., 1997; Takizawa et al., 1997).

Es gibt mehrere Hinweise, dass der Transport des mRNP-Komplexes entlang des Zytoskeletts mit einem Transport von ER in die Tochterzelle koordiniert ist: Sowohl der Transport von mRNPs wie auch von ER-Membranschläuchen ist abhängig von dem Proteinkomplex She3/Myo4. Dabei wird She2 für die Assoziation von *ASH1*-mRNP-Komplexen an ER-Membranschläuche benötigt, nicht jedoch für die Vererbung von ER in Tochterzellen (Schmid et al., 2006; Estrada et al., 2003). Weiterhin wird der Transport von mRNPs nachteilig beeinflusst, wenn der Transport von ER-Membranschläuchen in die Tochterzelle und die anschließende Verankerung durch Mutationen beeinträchtigt ist. Dies ist der Fall bei Deletion von Myo4, Sec3 (Teil des Exozyst-Komplexes) und Srp101 (Komponente des *signal recognition particle* (SRP)-Rezeptors). Außerdem kolokalisierten die mRNAs einiger asymmetrisch verteilter Proteine und Faktoren, die bei der Sekretion wichtig sind, mit kortikalem ER an der Tochterzellspitze (Aronov et al., 2007).

Während des Transportes der *ASH1*-mRNA an die Tochterzellspitze beeinflussen Sekundärstrukturen der Lokalisationselemente der *ASH1*-mRNA die Geschwindigkeit der Translation (Chartrand et al., 2002). Wahrscheinlich soll durch eine Verlangsamung der Translation während des Transportes sichergestellt werden, dass genügend Zeit für die Lokalisation der mRNA vorhanden ist. Sowohl Khd1 (*KH-domain protein*) als auch Puf6 (*Pumilio-homology domain family*) sind Faktoren, die vermutlich bei der Regulation der Translationshemmung eine Rolle spielen. Khd1 bindet an die *ASH1*-mRNA in einem Bereich, der mit dem ersten Lokalisationselement überlappt, während Puf6 mit dem letzten Lokalisationselement der *ASH1*-mRNA interagiert. Sowohl Khd1 wie auch Puf6 kolokalisieren mit *ASH1*-mRNA-Partikeln an der Tochterzellspitze und werden für die korrekte Lokalisation der *ASH1*-mRNA an die Tochterzellspitze benötigt (Irie et al., 2002; Gu et al., 2004). Phosphorylierung von Khd1 an der Tochterzellspitze durch Yck1 beeinflusst die Translationsinhibierung der *ASH1*-mRNA (Paquin et al., 2007). Eine Deletion von Khd1 übte nur einen sehr geringen Effekt auf die asymmetrische Verteilung der *ASH1*-mRNA aus. Dagegen verursachte eine starke Überexpression von Khd1 eine Misslokalisierung der *ASH1*-mRNA und eine schwächere Expression von Ash1. Vermutlich werden die Translation und somit die Verankerung der mRNA an der Tochterzellspitze durch die Überexpression von Khd1 beeinträchtigt (Irie et al., 2002). Puf6 ist an der Biogenese der

**Tabelle 1.1: Lokalisierte mRNAs**

| Gen            | Funktion                   | Lokalisation                    |
|----------------|----------------------------|---------------------------------|
| <i>ASH1</i>    | Transkriptionregulator     | Tochterzellkern                 |
| <i>BRO1</i>    | Signaltransduktion         | Vakuole                         |
| <i>CDC42</i>   | GTPase, Exozytose          | Tochterzelle                    |
| <i>CLB2</i>    | Cyclin B                   | Nukleus                         |
| <i>CPS1</i>    | Carboxypeptidase           | Cytoplasma                      |
| <i>DNM1</i>    | Mitochondrienteilung       | äußere Mitochondrienmembran     |
| <i>EGT2</i>    | Zellulase                  | Zellwand                        |
| <i>ERG2</i>    | Sterol-Isomerase           | ER                              |
| <i>EXO84</i>   | Exozyst-Komponente         | Zellperipherie und Tochterzelle |
| <i>IST2</i>    | osmotischer Stress         | Plasmamembran                   |
| <i>MID2</i>    | Membranrezeptor            | Plasmamembran                   |
| <i>MMR1</i>    | unbekannt                  | Tochterzelle                    |
| <i>RHO3</i>    | GTPase, Exozytose          | Cytoplasma                      |
| <i>SEC1</i>    | SNARE-Regulator            | Plasmamembran und Tochterzelle  |
| <i>SEC3</i>    | Exozyst-Komponente         | Zellperipherie und Tochterzelle |
| <i>SEC4</i>    | GTPase, Exozytose          | Vesikel und Tochterzelle        |
| <i>SRL1</i>    | unbekannt                  | Cytoplasma                      |
| <i>SRO7</i>    | SNARE-Regulator, Exozytose | Cytoplasma und Plasmamembran    |
| <i>SRO77</i>   | SNARE-Regulator, Exozytose | Plasmamembran                   |
| <i>TPO1</i>    | Polyamine-Transport        | Plasmamembran                   |
| <i>WSC2</i>    | Membranrezeptor            | Plasmamembran                   |
| <i>YPT1</i>    | GTPase, sekretorischer Weg | ER und Golgi-Apparat            |
| <i>YGR046W</i> | unbekannt                  | Mitochondrion                   |
| <i>YLR434C</i> | unbekannt                  | unbekannt                       |
| <i>YMR171C</i> | unbekannt                  | Endosom                         |
| <i>YNL087W</i> | unbekannt                  | Plasmamembran                   |

Quelle: Shepard et al. (2003) und Aronov et al. (2007)

Ribosomen beteiligt (Lee et al., 2007), die genaue Rolle bei der Lokalisation der *ASH1*-mRNA ist jedoch noch unklar.

An der asymmetrischen Verteilung der *ASH1*-mRNA ist zusätzlich Loc1 beteiligt (Long et al., 2001). Loc1 erkennt doppelsträngige RNA-Strukturen und bindet an eine Sequenz in der 3'-UTR (nicht translatierte Region) der *ASH1*-mRNA. Eine Deletion von Loc1 resultiert in der symmetrischen Verteilung der *ASH1*-mRNA. Da Loc1 ein nukleäres Protein ist, welches wie Puf6 an der Biogenese der Ribosomen beteiligt ist, wäre es denkbar, dass Loc1 eine eher indirekte Rolle beim Transport der *ASH1*-mRNA spielt, beispielsweise bei der Assemblierung der mRNP-Komplexe (Urbinati et al., 2006).

Neben der *ASH1*-mRNA werden noch andere mRNAs über den She-vermittelten Transport in die Tochterzelle transportiert (siehe Tabelle 1.1). Im Gegensatz zu Ash1 mit einer asymmetrischen Verteilung auf mRNA- und Proteinebene liegt bei Ist2 eine symmetrische Verteilung des Proteins vor, obwohl die *IST2*-mRNA an die Tochterzellspitze transportiert wird (Takizawa et al., 2000). Die Expression von Ist2 in Tochterzellen hängt jedoch

vom mRNA-Transport ab. Dabei erkennt She2 ein Lokalisationselement in der *IST2*-mRNA an Position 2694-2785 nt (Olivier et al., 2005). Dies entspricht auf Proteinebene den Aminosäuren (AS) 898-928.

### 1.1.2 Kopplung von mRNA-Lokalisation und Translation

Bei vielen lokalisierten mRNAs findet eine Kopplung von mRNA-Transport und Translation statt, um eine höhere Effizienz bei der asymmetrischen Verteilung zu erzielen. Dies kann dadurch erreicht werden, dass die Translation während des mRNA-Transportes gehemmt und nach erfolgter Lokalisation der mRNA die Translation initiiert wird (Lipshitz und Smibert, 2000). Ein bekanntes Beispiel für eine Translationshemmung während des mRNA-Transportes ist die *oskar*-mRNA in *Drosophila*. Die Inhibierung der Translation während der mRNA-Lokalisation wird über den Regulator Bruno vermittelt. Dadurch wird sichergestellt, dass Oskar ausschließlich am posterioren Pol der Oozyte exprimiert wird (Snee et al., 2007; Hazelrigg, 2004; Chekulaeva et al., 2006).

Die Effizienz der asymmetrischen Verteilung der *ASH1*-mRNA beruht zum einem auf der Transportgeschwindigkeit des mRNP-Komplexes und zum anderen auf der Translationshemmung während des Transportes. Eine verfrühte Translation der *ASH1*-mRNA verhindert die asymmetrische Verteilung, vermutlich weil bei der Passage durch das Ribosom die Sekundärstrukturen der mRNA aufgelöst werden und dadurch eine Translationshemmung durch RNA-bindende Proteine verhindert wird (Chartrand et al., 2002). Wenn von einer Translationsgeschwindigkeit von 10 AS/s ausgegangen wird, reicht normalerweise die Transportgeschwindigkeit des mRNP-Komplexes aus, um die *ASH1*-mRNA zu lokalisieren, bevor sie vollständig translatiert ist: Eine maximale Geschwindigkeit von 1,1  $\mu\text{m/s}$  wurde *in vitro* bei Myo4-vermitteltem Transport bestimmt (Chartrand et al., 2002; Reck Peterson et al., 2001). Videomikroskopische *in vivo* Messungen des Transports von She1/Myo4-Partikeln ergaben eine Geschwindigkeit von 200-400 nm/s (Bertrand et al., 1998). Nach erfolgter Lokalisation der mRNA ist eine Verankerung der mRNA am kortikalen ER nötig, um eine Diffusion und somit eine Umverteilung der mRNA-Moleküle zu verhindern. Der molekulare Mechanismus der mRNA-Verankerung am kortikalen ER ist jedoch noch nicht bekannt. Bei der *ASH1*-mRNA ist die Translation eine Voraussetzung für die Verankerung der mRNA, da die Einfügung von verfrühten Stop-Kodons und die Mutation des Start-Kodons die Verankerung der *ASH1*-mRNA beeinträchtigte (Gonzalez et al., 1999).

## 1.2 Morphologie des Endoplasmatischen Retikulums in Hefe

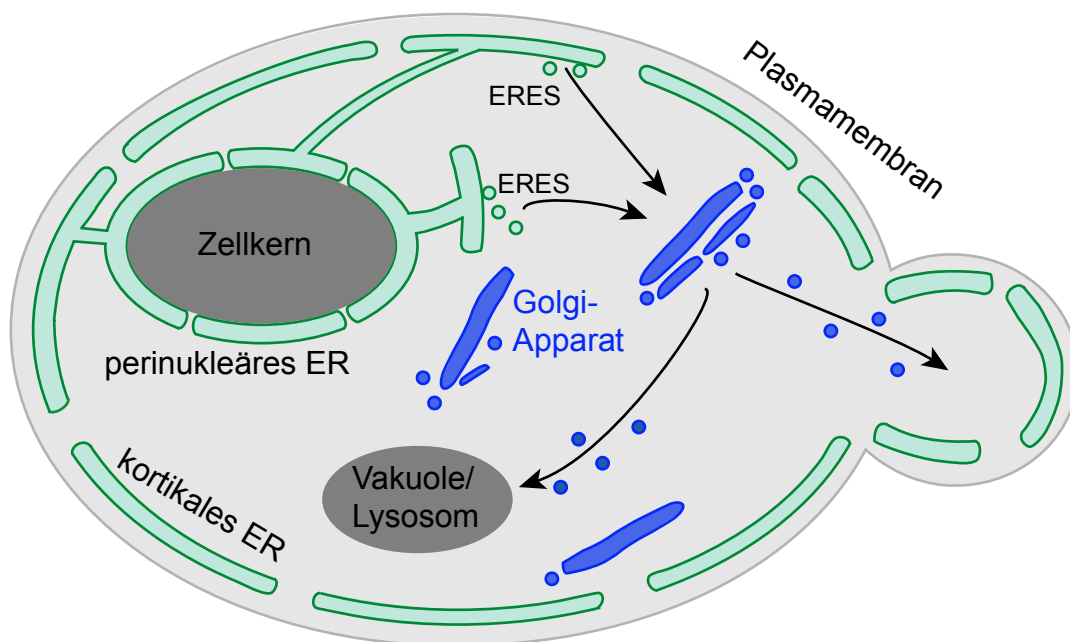
Anders als in Säugerzellen ist das ER in *S. cerevisiae* in zwei Bereiche aufgeteilt: Das perinukleäre ER (pER) umrundet als Kernhülle den Zellkern, während das kortikale ER aus röhrenförmigen Membranen besteht und mit der Plasmamembran assoziiert ist (Prinz

et al., 2000; Preuss et al., 1991). Das pER ist mit dem kortikalen ER durch Membranschläuche verbunden, so dass eine freie Diffusion im gesamten ER möglich ist (Prinz et al., 2000). Die einzige Begrenzung stellt die Septinbarriere zwischen Mutter- und Tochterzelle dar, die die Diffusion von integralen ER-Membranproteinen stark verlangsamt (Luedeke et al., 2005). Kleine und mittelgroße Tochterzellen besitzen nur kortikales ER und kein pER (Prinz et al., 2000). An sogenannten Kontaktstellen berührt das kortikale ER die Plasmamembran. Hier liegen die Plasmamembran und das kortikale ER in einem sehr geringen Abstand (weniger als 30 nm) aneinander (Pichler et al., 2001). Diese geringe Distanz kann nur elektronen-, aber nicht lichtmikroskopisch aufgelöst werden. Die Kontaktstellen unterscheiden sich in ihrer Lipid- und Proteinzusammensetzung von der benachbarten Plasmamembran und dem restlichen ER. Es konnte eine starke Anreicherung von Phosphatidylserin- und Phosphatidylinositolsynthasen sowie von Enzymen der Ergosterol-Biosynthese festgestellt werden (Pichler et al., 2001).

## 1.3 Sekretion und intrazelluläre Transportwege

### 1.3.1 Der sekretorische Weg

Eukaryotische Zellen verwenden den sekretorischen Weg, um Proteine zu sezernieren oder Membranproteine an ihren Bestimmungsort zu transportieren. Der Transport zwischen den verschiedenen Kompartimenten erfolgt über Vesikel, die sich vom Donorkompartiment abschnüren und anschließend mit dem Zielkompartiment verschmelzen, um ihre Fracht im Inneren der Vesikel zu transportieren (Modell siehe Abb. 1.1).



**Abbildung 1.1:** Überblick über den anterograden sekretorischen Weg. ER: endoplasmatisches Retikulum, ERES: *ER-exit sites*. Darstellung modifiziert nach Du et al. (2004).

Die ersten Schritte zur Identifizierung der sogenannten *SEC*-Gene (*secretory*), die für Faktoren kodieren, welche bei verschiedenen Schritten des sekretorischen Wegs essentiell sind, wurden von Peter Novick und Randy Schekman durchgeführt. Bei genetischen Studien mit *S. cerevisiae* wurden temperatursensitive Hefestämme gefunden, die bei restriktiver (erhöhter) Temperatur Defekte bei der Proteinsekretion aufwiesen (Novick et al., 1980; Schekman und Novick, 2004). Mit Hilfe von *sec*-Doppelmutanten konnte die Reihenfolge der Mutationen im sekretorischen Weg bestimmt werden.

In diesem Kapitel wird zuerst die Translokation von Proteinen in das ER beschrieben, gefolgt von einer kurzen Darstellung des Proteintransports durch das ER und den Golgi-Apparat. Anschließend werden einzelne für diese Arbeit wichtige Bereiche (Sortierungssignale und Vesikeltransport/-fusion) ausführlicher thematisiert. Zum Abschluss wird auf unkonventionelle Sekretionswege eingegangen.

## Translokation ins ER

Der sekretorische Weg beginnt mit der ko- oder posttranslationalen Translokation von Proteinen in das ER (Blobel und Dobberstein, 1975; Rapoport, 1992; Rapoport et al., 1999; Pool et al., 2002). Beim kotranslationalen Transport zum ER erkennt das *signal recognition particle* (SRP) eine meist N-terminale Signalsequenz der naszierenden Polypeptidkette, sobald die wachsende Polypeptidkette das Ribosom verlässt. SRP bindet sowohl an diese Signalsequenz sowie an die große Untereinheit des Ribosoms (Pool et al., 2002; Halic et al., 2004; Terzi et al., 2004). Durch die Bindung der Alu-Domäne von SRP an eine Stelle zwischen großer und kleiner Untereinheit des Ribosoms werden die Translation verlangsamt und der *ribosome-nascent chain complex* (RNC) durch GTP-abhängige Bindung des SRP an den SRP-Rezeptor (SR) an das ER dirigiert (Walter und Blobel, 1981; Terzi et al., 2004).

Der SRP-Rezeptor besteht aus einer peripheren ( $SR\alpha$ ) und einer membranverankerten ( $SR\beta$ ) Untereinheit. Letztere besitzt eine GTPase-Aktivität (Powers und Walter, 1995). Nach Assoziation des RNC mit dem Translokonkanal (Sec61-Komplex) dissoziiert der SRP-SR-Komplex vom RNC (Gilmore et al., 1982a,b; Meyer und Dobberstein, 1980; Connolly und Gilmore, 1989). Nach GTP-Hydrolyse trennt sich SRP vom SR, um für einen erneuten Rekrutierungsmechanismus zur Verfügung zu stehen (Connolly et al., 1991; Miller und Walter, 1993).

Nun wird die Translation fortgesetzt, wobei die Polypeptidkette durch den wässrigen Kanal des Sec61-Komplexes in das ER transloziert wird (Simon und Blobel, 1991; Crowley et al., 1993, 1994). Der heterotrimere Sec61-Komplex besteht aus Sec61 ( $Sec61\alpha$  in Säugerzellen), Sbh1 ( $Sec61\beta$ ) und Sss1 ( $Sec61\gamma$ ; Johnson und van Waes (1999)). Die Kristallstruktur des Translokons wurde zwar in *Methanococcus jannaschii* analysiert, aufgrund der hohen Sequenzhomologie kann jedoch davon ausgegangen werden, dass diese Struktur repräsentativ für andere Spezies ist (Van den Berg et al., 2004). Die essentielle  $\alpha$ -Untereinheit bildet den eigentlichen Kanal und besteht aus zwei Hälften mit je fünf

Transmembrandomänen (Görlich et al., 1992; Van den Berg et al., 2004). Eine Schleife zwischen Membransegment fünf und sechs der  $\alpha$ -Untereinheit ermöglicht eine seitliche Öffnung des Kanals. Eine kleine bewegliche Helix der  $\alpha$ -Untereinheit kann wie ein Deckel die Öffnung des Kanals verdecken. Die beiden Hälften der  $\alpha$ -Untereinheit werden durch die  $\gamma$ -Untereinheit zusammengehalten. Die  $\beta$ -Untereinheit ist im Gegensatz zu den  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten nicht essentiell und befindet sich an der Peripherie der  $\alpha$ -Untereinheit (Mothes et al., 1994; Van den Berg et al., 2004).

### Passage der Proteine durch das ER

Während der Translokation der Polypeptidkette in das ER sorgen im ER-Lumen Chaperone für die korrekte Faltung von löslichen Proteinen, während Membranproteine direkt in die ER-Membran transloziert werden. Neben der Faltung von Proteinen finden im ER posttranslational Modifikationen wie N-Glykosylierungen und die Ausbildung von Disulfidbrücken statt (Ruddock und Molinari, 2006; Lee et al., 2004). Wenn Proteine missgefaltet sind oder durch inkorrekte Assemblierung die Qualitätskontrolle des ER nicht passieren, werden sie in das Cytosol zurücktransportiert und dort vom Proteasom degradiert (Brodsky, 2007; Ron und Walter, 2007; Lilley und Ploegh, 2004). Nur Proteine, die korrekt gefaltet und - falls nötig - richtig assembliert sind, werden an speziellen Subdomänen des kortikalen und perinukleären ERs, den sogenannten *ER-exit sites* (ERES), in Vesikel verpackt. Bei diesem Prozess deformieren cytoplasmatische Hüllproteine (*Coatomer*-Proteine) die Membran, um ein Vesikel zu formen. Eine bis zu 50-fache Aufkonzentrierung der Proteine kann über Interaktion der Hüllproteine mit Sortierungssignalen der Proteine erfolgen. Beim anterograden Transport vom ER zum Golgi-Apparat werden die zu transportierenden Proteine in *coat*-Protein Komplex II (COP II)-Vesikel verpackt und zum Golgi-Apparat transportiert [zusammengefasst in Lee et al. (2004)].

### Passage der Proteine durch den Golgi-Apparat

Im Golgi-Apparat modifizieren Glykosyltransferasen sequentiell von der *cis*- bis zur *trans*-Zisterne die vorhandenen N-Glykosylierungen, während Furinproteasen manche Proteine proteolytisch prozessieren. Die dabei benötigten Enzyme werden von einer Zisterne zur nächsten geschleust. Innerhalb des Golgi-Apparates übernehmen *coat*-Protein Komplex I (COPI)-Vesikel den Transport zwischen *cis*-, *medial*- und *trans*-Zisternen des Golgi-Apparates sowie den Transport vom Golgi-Apparat zurück zum ER (retrograder Transport). Vom *trans*-Golgi-Apparat aus gelangen die Proteine über Vesikel an ihren Bestimmungsort: zur Zelloberfläche oder zu anderen Bereichen des Endomembransystems wie Vakuole, Lysosomen und Endosomen [zusammengefasst in Lee et al. (2004)].

### 1.3.2 Sortierungssignale für COPII

Anders als beim sogenannten *bulk flow*, bei dem Proteine ohne Anreicherung aus dem ER transportiert werden, kann durch Interaktion von COPII-Komponenten mit spezifischen cytoplasmatischen Sortierungssignalen der zu transportierenden Proteine eine bis zu 50-fache Konzentrierung erreicht werden. Lösliche sekretorische Proteine wie das Pheromon  $\alpha$ -Faktor besitzen keine cytoplasmatische Sequenz und benötigen daher einen Transportrezeptor mit Membrandomäne, um von den COP-Komponenten erkannt zu werden. Beim Transport des Pro- $\alpha$ -Faktors fungiert Erv29 als Transportrezeptor, bei anderen sezernierten Glykoproteinen wird das Lektin ERGIC-53 (Emp46 und Emp47 in Hefe) benötigt (Sato und Nakano, 2002). Beim Transport von Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten Proteinen findet eine Assoziation mit Detergens-resistenten Membranen (*rafts*) statt. Es ist noch nicht aufgeklärt, ob apikale und basolaterale GPI-verankerte Proteine bereits am TGN in verschiedene Vesikel gelangen oder ob eine Segregation erst an der Plasmamembran erfolgt, bei der apikale GPI-verankerte Proteine anschließend durch Transzytose an die Zielmembran transportiert werden. Beim Transport von apikalen GPI-verankerten Proteinen ist jedoch eine Oligomerisierung, in Kombination mit einer Raft-Assoziation, nötig. Auch eine Beteiligung eines Transportrezeptors kann nicht ausgeschlossen werden (Paladino et al., 2004; Polishchuk et al., 2004). Bei einigen Membranproteinen bedarf es einer Assemblierung von multimeren Proteinkomplexen, bevor ein effizienter ER-Export stattfinden kann: ERGIC-53, welches aufgrund einer Mutation nicht mehr multimerisieren kann, wird nicht zum Golgi-Apparat transportiert (Nufer et al., 2003). Bei Untereinheiten, die kein eigenes ER-Export-Signal tragen, kann durch Ausbildung von Heteromeren ein positives Sortierungssignal der anderen Untereinheit zugänglich gemacht werden, wodurch z.B. bei dem Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanal Kir2.1 ein effizienter Vorwärtstransport ermöglicht werden kann (Ma et al., 2001).

**Tabelle 1.2: ER-Export-Signale**

| Protein  | Bezeichnung                                          | Signal                 |
|----------|------------------------------------------------------|------------------------|
| VSV-G    | Vesikular-Stomatitisvirus Protein G                  | <u>YTDIE</u>           |
| Kir2.1   | Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanal 2.1                | <u>FCYENE</u>          |
| Sys1     | Golgi-Membranprotein in Hefe                         | <u>DLE</u>             |
| ERGIC-53 | Lektin, ER-Golgi-Intermediat-Kompartiment Protein-53 | <u>FF</u>              |
| Emp46    | Lektin, Membranprotein in Hefe                       | <u>YYM</u> , <u>LL</u> |
| Sed5     | Golgi t-SNARE                                        | YNNSNPF, <u>LMLME</u>  |

Quelle: Barlowe (2003); Giraudo und Maccioni (2003)

Wie in Tabelle 1.2 ersichtlich, können Sortierungssignale für die Interaktion mit COPII-Komponenten sehr vielfältig sein: Einige Transmembranproteine wie der Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanal Kir2.1 enthalten ein di-azides Motiv (FCYENE), andere Proteine enthalten di-hydrophobe oder di-aromatische Motive (Barlowe, 2003; Lee et al., 2004).

Die Interaktion dieser Signale geschieht meist über Bindungsstellen von Sec24, welches über mindestens drei Bindungsstellen für Substratproteine verfügt: die gegenüberliegenden A- und B-Bindungsstellen und eine Bindungsstelle bei Arginin 342 (Miller, 2003; Mossessova et al., 2003a). Zusätzlich sind Sar1 sowie die Sec24-Homologen Iss1 und Lst1 an der Erkennung von Substratproteinen beteiligt, wodurch eine hohe Diversität bei der Erkennung von Exportsignalen gewährleistet wird (Giraud und Maccioni, 2003; Barlowe, 2003; Springer und Schekman, 1998).

### 1.3.3 Sortierungssignale für COPI

Über COPI-Vesikel wird sowohl der Transport vom *cis*- zum *trans*-Golgi-Apparat bewerkstelligt sowie der retrograde Transport vom Golgi-Apparat zurück zum ER vermittelt. Es ist bekannt, dass die C-terminale basische KKXX-ER-Rückführungs-(*retrieval*)-Konsensussequenz mit COPI-Proteinen interagiert und so eine Rückführung der ER-Proteine bewirkt, die zum Golgi-Apparat transportiert wurden (Cosson und Letourneur, 1994). Des Weiteren existiert bei einzelnen Untereinheiten von Kanälen und oligomeren Oberflächenrezeptoren ein di-basisches Argininmotiv (RXR), welches eine ER-Lokalisation ermöglicht. Auch hier spielt die korrekte Assemblierung von Membranproteinen eine Rolle: ER-Rückführungssignale von einzelnen Untereinheiten können durch Oligomerisierung des Proteinkomplexes maskiert werden (Zerangue et al., 1999; Margeta Mitrovic et al., 2000). Außerdem können dimere cytosolische 14-3-3 Proteine mit oligomeren K<sup>+</sup>-Kanälen interagieren und auf diese Weise mit COPI-Proteinen um Bindungsstellen an ER-Lokalisationssignalen konkurrieren, da die ER-Lokalisationssignale nur bei falsch assemblierten Proteinkomplexen zugänglich sind (O'Kelly et al., 2002; Yuan et al., 2003). Lösliche ER-luminale Proteine benötigen beim retrograden Transport eine KDEL-Sequenz (HDEL in Hefe), welche mit dem KDEL-Rezeptor (Erd2 in Hefe) über dessen di-Lysin-Motiv interagiert. Zusätzlich wird für die Interaktion dieses Komplexes mit COPI-Proteinen ein phosphoryliertes Serin benötigt (Cabrera et al., 2003). Der molekulare Mechanismus der Interaktion zwischen COPI-Komponenten und den ER-Lokalisationssignalen ist jedoch noch unklar. Es gibt Hinweise, dass verschiedene Bindungsstellen des COPI-Komplexes das gleiche Motiv erkennen (Lee et al., 2004).

### 1.3.4 Vesikelknospung

Proteintransport im sekretorischen Weg geschieht durch Transport von Vesikeln, die sich vom Donorkompartiment abschnüren und mit dem Zielkompartiment verschmelzen. Beim anterograden Transport vom ER zum Golgi-Apparat bilden COPII-Proteine die Hülle des Vesikels, beim retrograden Transport innerhalb des Golgi-Apparats und vom Golgi-Apparat zurück zum ER besteht die Hülle des Vesikels aus COPI-Komplexen. Transport vom *trans*-Golgi-Apparat zu Endosomen bzw. bei der Endozytose von der Plasmamembran zu Endosomen verläuft über Clathrin-Vesikel.

### **COPII-Vesikel (anterograder Transport)**

Initiiert wird die Vesikelbildung bei COP II-Vesikeln durch GTP-Bindung und die Ausbildung einer N-terminalen amphipathischen Helix der GTPase Sar1, welche in die ER-Membran inseriert und eine Membrankrümmung verursacht (Lee et al., 2005). Die Aktivierung von Sar1 erfolgt durch Sec12, ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF), der bei Sar1 das Nukleotid GDP durch GTP ersetzt (Barlowe und Schekman, 1993). Dadurch wird das Heterodimer Sec23/Sec24 an die ER-Membran rekrutiert. Der Komplex aus Sec23/Sec24-Sar1 ist an der Seite, die der ER-Membran zugewandt ist, positiv geladen und bildet eine konkave Oberfläche aus, die mit der Membran und Frachtmolekülen in der ER-Membran interagieren kann (Bi et al., 2002). Durch Interaktion mit Sec23/Sec24 wird die COPII-Hülle mit dem Heterotetramer Sec13/Sec31 vervollständigt. Diese bilden durch Polymerisation eine oktaedrische Hülle, welche die Membran deformiert und zu einer Abschnürung des Vesikels führt (Matsuoka et al., 1998; Stagg et al., 2006; Fath et al., 2007). Sec23, begünstigt durch den Komplex Sec13/Sec31, stimuliert die GTP-Hydrolyse von Sar1, wodurch die Hüllproteine von dem Vesikel abfallen (Yoshihisa et al., 1993; Antonny et al., 2001). Durch die Lokalisation von Sar1-GTP wird somit der Ort der Vesikelknospung determiniert. Zusätzliche regulatorische Proteine sind an der Bildung der COPII-Vesikel beteiligt: Die Stabilität der COPII-Hülle wird vermutlich durch das Gerüstprotein Sec16, welches die Lokalisation der ERES definiert, beeinflusst (Espenshade et al., 1995; Watson et al., 2006). Sed4 ist ein Sec12 Homolog ohne Sar1-GEF-Aktivität, es inhibiert vermutlich die GTP-Hydrolyse von Sar1 (Gimeno et al., 1995; Saito Nakano und Nakano, 2000). Durch die Sec24-Homologen Lst1 und Iss1 wird wahrscheinlich die Erkennung von unterschiedlichen Sortierungssignalen gewährleistet (Roberg et al., 1999; Shimoni et al., 2000).

### **COPI-Vesikel (retrograder Transport)**

Ähnlich wie bei der Ausbildung der COPII-Hülle wird bei der Generierung von COPI-Vesikeln der erste Schritt durch Arf1, eine GTPase der Ras-Familie, initiiert (Rothman und Wieland, 1996; Spang und Schekman, 1998). Gea1, ein Arf-GEF, katalysiert den Austausch von GDP durch GTP. Durch die GTP-Bindung von Arf1 ändert sich die Konformation, und eine N-terminale amphipathische Helix kann in der Membran verankert werden. Arf1 besitzt zusätzlich eine N-terminale Myristoyl-Gruppe, hat jedoch eine kürzere N-terminale Helix, verglichen mit Sar1, welches keinen Lipidanker hat (Antonny et al., 1997; Huang et al., 2001). Nach Aktivierung von Arf1 wird die bereits assemblierte COPI-Hülle rekrutiert (Hara Kuge et al., 1994). Die ca. 700 kDa große COPI-Hülle besteht aus den folgenden sieben Untereinheiten: dem B-COPI-Komplex mit den  $\alpha/\beta'/\varepsilon$ -Untereinheiten (Cop1, Sec27 und Sec28 in Hefe) und dem F-COPI-Komplex mit den  $\beta/\gamma/\delta/\zeta$ -Untereinheiten (Sec26, Sec21, Ret2 und Ret3 in Hefe; Fiedler et al. (1996)).

F-COPI hat strukturelle Ähnlichkeit mit Clathrin-Adaptor-Komplexen (Boehm und Bonifacino, 2001; Watson et al., 2004). Die Hydrolyse von Arf1-GTP ist bei der Ablösung des COPI-Vesikels beteiligt. Der molekulare Mechanismus der Membrandeformation, die Polymerisierung der COPI-Hülle und die Abschnürung des Vesikels von der Membran sind jedoch nicht bekannt. Da genau wie bei Sar1 der Ort der Vesikelknospung durch die Lokalisation von membrangebundenem Arf1 bestimmt wird, wird die Funktion von Arf1 an den verschiedenen Kompartimenten über die cytosolischen Arf1-GEFs und Arf1-GAPs (GTPase aktivierendes Protein) reguliert. Die Arf1-GEFs Gea1 und Gea2 haben eine ähnliche Funktion und sind an der Bildung von retrograden COPI-Vesikeln beteiligt, während Sec7 hauptsächlich am *trans*-Golgi-Apparat agiert (Peyroche et al., 1996; Spang et al., 2001). Manche Proteine der p24-Familie können Arf1 an Golgi-Membranen rekrutieren und auf diese Weise die Aktivität von Arf1 regulieren (Gommel et al., 2001). Die Arf1-GAPs Glo3 und Gcs1 lokalisieren und wirken beide bei der Ablösung der COPI-Hülle mit (Dogic et al., 1999; Poon et al., 1999).

### Clathrin-Vesikel

Initiiert wird die Vesikelknospung von Clathrin-Vesikel durch die GTPase Arf. Bei der Bildung von Clathrin-Vesikeln vernetzen Adaptorprotein-Komplexe die Clathrin-Moleküle zu einer käfigartigen Struktur, um eine stabile Hülle zu formen. Anschließend bilden die Adaptorproteine die innere, Clathrin die äußere Hülle des Vesikels. Nach Abschnürung des Vesikels durch die GTPase Dynamin erfolgt die Ablösung der Clathrin-Hülle und der Transport des Vesikels zum Zielkompartiment (Royle, 2006; Edeling et al., 2006).

#### 1.3.5 SNARE-vermittelte Membranfusion

Die Vesikelknospung wird durch die Polymerisierung der verschiedenen Hüllproteine stimuliert. Gleichzeitig werden in die Vesikelmembran die sogenannten *vesicle-soluble NSF* (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) *attachment protein receptors* (v-SNAREs) eingebaut, die nach Ablösung der cytosolischen Hüllproteine auf dem Vesikel zugänglich werden [zusammengefasst in Bonifacino und Glick (2004); Leabu (2006)]. Durch spezifische Paarung der v-SNAREs mit *target* (t)-SNAREs an der Membran des Zielkompartiments kann das Vesikel mit dem Zielkompartiment fusionieren [SNARE-Hypothese, Rothman (1994)]. Die Spezifität des Transportes wird zum einen durch Rab-GTPasen, zum anderen durch SNAREs gewährleistet. Rab-Proteine liegen entweder löslich im Cytosol durch Interaktion mit Rab-GDP-Dissoziationsinhibitoren (GDIs) vor oder lokalisieren nach Aktivierung als Rab-GTP an Membranen. Durch Interaktion mit spezifischen Rab-Effektoren werden Vesikel zur Ziellmembran rekrutiert. Dort findet eine Anlagerung der v-SNAREs und t-SNAREs statt. Die meisten SNAREs enthalten eine variable cytosolische N-terminale Sequenz, einen C-terminalen Membrananker und eine zentrale SNARE-Domäne aus 60-70 AS, die eine *coiled-coil*-Struktur bilden kann (Bock et al., 2001). Manche SNAREs wie

**Tabelle 1.3: Lokalisation der SNAREs in Hefe**

| ER → Golgi    | Golgi → ER | Golgi → PVC  |
|---------------|------------|--------------|
| Qa: Sed5      | Qa: Ufe1   | Qa: Pep12    |
| Qb: Bos1      | Qb: Sec20  | Qb: Vti1     |
| Qc: Bet1      | Qc: Slt1   | Qc: Syn8     |
| R: Sec22/Ykt6 | R: Snc1/2  | R: Nyv1/Ykt6 |
| PVC → Vakuole | Golgi → PM | PM → Golgi   |
| Qa: Vam3      | Qa: Sso1/2 | Qa: Tlg      |
| Qb: Vti1      | Qb: Sec9   | Qb: Vti1     |
| Qc: Vam7      | Qc: Sec9   | Qc: Tlg1     |
| R: Nyv1/Ykt6  | R: Snc1/2  | R: Snc1/2    |

Die Q-SNAREs können in Qa-, Qb- und Qc-SNAREs eingeteilt werden.

ER: Endoplasmatisches Retikulum, PVC: Prävakuoläres Kompartiment,

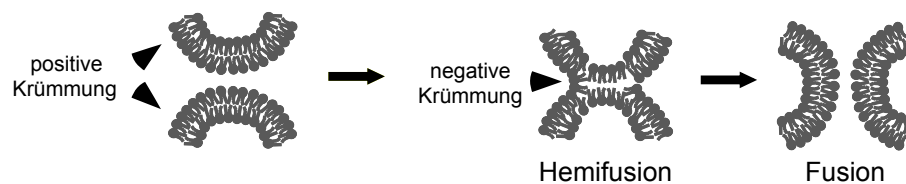
PM: Plasmamembran. Quelle: Burri und Lithgow (2004)

SNAP-25 besitzen zwei SNARE-Domänen und keine Transmembrandomäne, daher wird SNAP-25 über eine Palmitatgruppe in der Membran verankert (Vogel und Roche, 1999). Da bei einer homotypischen Membranfusion eine Unterscheidung in v- und t-SNAREs wenig sinnvoll erscheint, wurde gemäß ihren strukturellen Eigenschaften eine Einteilung in R-SNAREs und Q-SNAREs vorgenommen. Dies beruht auf der Anwesenheit eines Arginins (R) bzw. eines Glutamins (Q) in der zentralen SNARE-Domäne. Im allgemeinen entsprechen die R-SNAREs den v-SNAREs und die Q-SNAREs den t-SNAREs. Die in Hefe vorkommenden SNAREs sind entsprechend ihrer Lokalisation in Tabelle 1.3 aufgeführt.

Bei der Ausbildung des sogenannten *trans*-SNARE-Komplexes (SNAREpin) lagern sich vier parallel angeordnete  $\alpha$ -Helices der SNARE-Domänen zu einem stabilen Bündel aneinander. Der SNAREpin wird meist aus einer  $\alpha$ -Helix eines v-SNAREs und drei  $\alpha$ -Helices eines oligomeren t-SNAREs gebildet. Eine Ausnahme stellt SNAP-25 im synaptischen SNAREpin dar, da es zwei der drei nötigen  $\alpha$ -Helices des t-SNAREs bildet.

Damit Lipide von einer Doppelmembran zur anderen gelangen können, müssen die Membranen sehr nah aneinander liegen. Eine Schicht Wassermoleküle an den Kopfgruppen der Lipide stößt die Membranen ab, wodurch eine spontane Vermischung der Lipide verhindert wird (Leikin et al., 1987). Die alleinige Nähe der Membran reicht jedoch für eine Membranfusion nicht aus: Es konnte gezeigt werden, dass für eine SNARE-vermittelte Fusion v-SNAREs einen Lipidanker benötigen, der durch die Lipid-Doppelschicht hindurchreicht, während bei t-SNAREs eine Transmembrandomäne oder ein hydrophober Lipidanker ausreicht, der nur ein Lipid-Monolayer durchquert (McNew et al., 2000b). Die Strukturänderung der SNAREs bei der Assemblierung des  $\alpha$ -helikalen Bündels liefert freie Energie, die für das Zusammenziehen der Membranen genutzt werden könnte. Alternativ könnte die Kraftübertragung auf die Membrananker der SNAREs nach Assemblierung

des SNAREpins erfolgen. Als erster Schritt für eine Membranfusion wäre eine Hemifusion der Monolayer auf der cytosolischen Seite der Doppelmembranen denkbar, gefolgt von einer Fusion beider Lipidschichten (McNew et al., 2000b; Ungermann und Langosch, 2005; Weber et al., 1998; Chen und Scheller, 2001). Ein Modell mit der Anordnung der Lipidschichten während der Fusion ist in Abb. 1.2 dargestellt. *In vitro* findet eine Liposomenfusion mit aufgereinigten SNAREs jedoch wesentlich langsamer als *in vivo* ab, dies spricht für das Zusammenspiel mehrerer Faktoren bei der Membranfusion (Weber et al., 1998).



**Abbildung 1.2: Lipidanordnung bei der (Hemi-)Fusion von Membranen.** Darstellung modifiziert nach Ungermann und Langosch (2005).

Virale Fusionsproteine ähneln strukturell den SNAREs; es wäre möglich, dass sie einen ähnlichen Mechanismus wie SNAREs bei der Membranfusion verwenden: Der hydrophobe N-terminale Teil des Hämagglutinin (HA)-Glykoproteins des Influenzavirus kann nach pH-abhängiger Konformationsänderung oligomerisieren und in Membranen inserieren, wodurch ein Membrankontakt zwischen Virus und Endosom der Wirtszelle hergestellt wird. Durch weitere Konformationsänderungen wird eine Membranfusion verursacht (Söllner, 2004; Jahn et al., 2003; Ungermann und Langosch, 2005).

Nach der Membranfusion muss der SNAREpin getrennt werden, um einen erneuten Fusionszyklus zu ermöglichen. Die nötige Energie für die Regeneration der einzelnen Moleküle wird durch ATP-Hydrolyse der ATPase NSF (N-Ethylmaleimid sensitiver Faktor) geliefert, die einen hexameren Ring bildet und sich mit Hilfe von  $\alpha$ -SNAP (*soluble NSF attachment protein*) an die Membran anlagert (Whiteheart et al., 2001; Clary et al., 1990). NSF ist das Säugerhomolog von Sec18 in *S. cerevisiae* und gehört zur Familie der AAA-ATPasen (*ATPas*es *a*ssociated with *d*iverse *c*ellular *a*ctivities) (Lupas und Martin, 2002).

### 1.3.6 Unkonventionelle Transportwege

Der Großteil der extrazellulären Membranproteine und löslichen Proteine wird über den sekretorischen Weg an die Zelloberfläche transportiert. Es gibt jedoch Ausnahmen: Makromolekulare Lipid- und Proteinkomplexe - wie z.B. Lipoproteine und Prokollagenfasern - passen aufgrund ihrer Größe nicht in 60-80 nm große COPII-Vesikel. Der molekulare Mechanismus der Sekretion von Lipoproteinen oder Kollagen ist bisher nicht genau bekannt.

COPII-Komponenten wie die GTPase Sar1 scheinen jedoch trotzdem bei der Sekretion von Prokollagen und Chylomikronen beteiligt zu sein, da die GTP-Hydrolyse eine Voraussetzung für den ER-Export bzw. für die Vesikel-Fusion mit dem Golgi-Apparat nötig ist (Starkuviene und Pepperkok, 2007; Mironov et al., 2003; Siddiqi et al., 2003; Stephens und Pepperkok, 2002, 2004; Jones et al., 2003).

Einige lösliche extrazelluläre Proteine wie das Zytokin Interleukin  $1\alpha$ , manche Proteine der Galektin-Familie und *Fibroblast growth factor* (FGF)-2 nutzen ebenfalls nicht den sekretorischen Weg, um an die Zelloberfläche zu gelangen (Nickel, 2003; Prudovsky et al., 2003). Die Rekrutierung von FGF-2 an die Plasmamembran erfolgt vermutlich über eine Interaktion von basischen Aminosäuren mit Phosphatidylinositolen der Plasmamembran. Über einen bisher unbekannten Mechanismus diffundiert der gefaltete und glykosylierte FGF-2 durch die Plasmamembran. Essentiell für die Sekretion von FGF-2 ist die Bindung an extrazelluläre Heparansulfat-Proteoglykane, welche FGF-2 im extrazellulären Raum als Komplex mit FGF-2-Rezeptoren festhalten (Nickel, 2007).

Bei Lipiden wiederum ist bekannt, dass ein Transport von Ceramid, Cholesterol und Ergosterol auch auf nicht-vesikulärem Weg zwischen zwei Kompartimenten stattfinden kann. Der Transport wird vermutlich über Lipid-Transfer-Proteine wie Ceramid-Transporter (CERT) und Oxysterol-bindende-Proteine (Osh in Hefe) vermittelt (Funato und Riezman, 2001; Hanada et al., 2003; Ridgway et al., 1992). Die meisten Lipid-Transfer-Proteine besitzen eine N-terminale *pleckstrin homology* (PH)-Domäne für die Bindung an Phosphatidylinositole und eine C-terminale Sequenz, die spezielle Lipide binden und transportieren kann (De Matteis et al., 2007). Es ist denkbar, dass ein solcher Transport an Kontaktstellen zwischen der Plasmamembran und dem ER stattfindet, an denen die Membranen in einem Abstand von ca. 10 nm aneinanderliegen (Levine und Loewen, 2006).

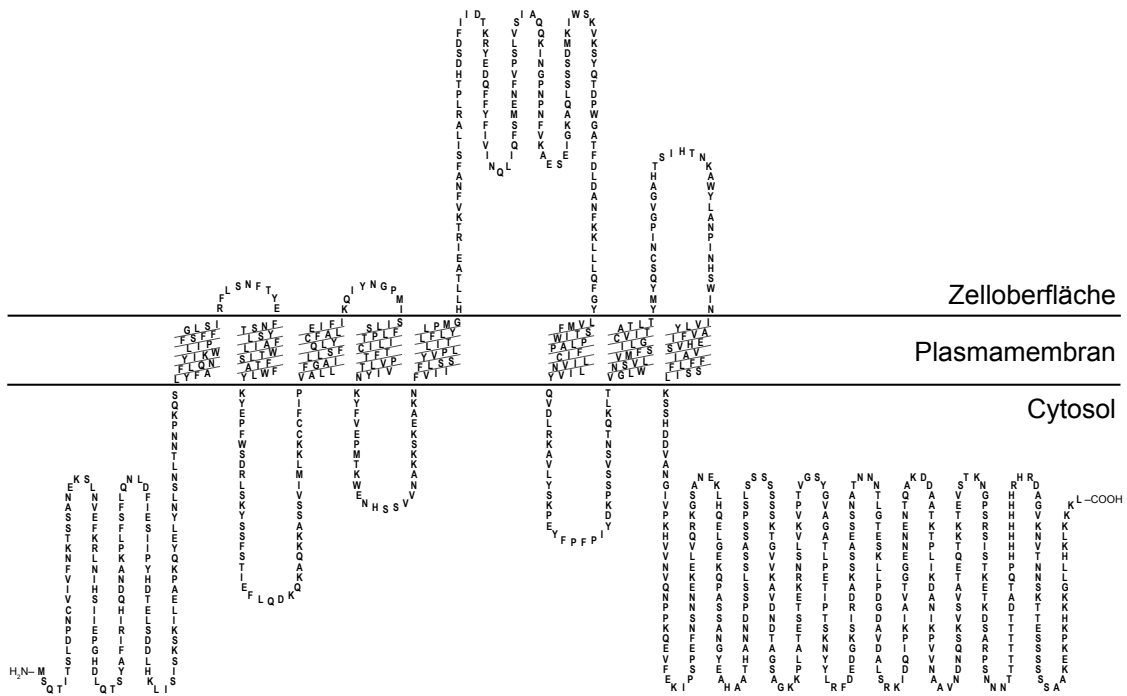
Bezüglich eines Proteintransportes vom ER an die Plasmamembran unter Umgehung des sekretorischen Weges schlagen Studien mit Makrophagen vor, dass ein Membranaustausch zwischen ER und Plasmamembran stattfindet, der den großen Bedarf an Membranen während der Phagozytose ausgleichen kann (Gagnon et al., 2002). Des Weiteren wurde beobachtet, dass *in vitro* das v-SNARE Sec22, welches normalerweise mit dem t-SNARE Sed5/Bos1/Bet1 am Vesikeltransport vom ER zum Golgi-Apparat beteiligt ist (siehe Tabelle 1.3), zusammen mit dem Plasmamembran t-SNARE Sso1/Sec9 eine effiziente Fusion von Liposomen bewirken kann (McNew et al., 2000a). Dadurch wäre eine Umgehung des Golgi-Apparates und eine direkte Verbindung zwischen ER und Plasmamembran gegeben. Die Beteiligung von ER-Membranen an der Phagozytose wird jedoch kontrovers diskutiert (Touret et al., 2005; Becker et al., 2005; Rogers und Foster, 2007).

Eine alternative Hypothese wird von Hidde Ploegh beschrieben: Bei der Bildung von Lipidpartikeln, sogenannten *lipid droplets*, könnten bei der Extraktion von Lipiden am ER bestimmte Proteine diesen Mechanismus ausnutzen und sich vom ER abschnüren, entweder als Teil oder unabhängig von *lipid droplets* (Ploegh, 2007).

## 1.4 Das integrale Membranprotein Ist2

### 1.4.1 Struktur und Funktion von Ist2

Das Membranprotein Ist2 aus *S. cerevisiae* wird vom offenen Leserahmen *YBR086C* kodiert und besteht aus 946 AS mit acht vorhergesagten Transmembrandomänen [TMHMM-Programm, Krogh et al. (2001)]. In Abb. 1.3 ist ein Topologie-Modell von Ist2 dargestellt. Eine schematische Darstellung ist auf Seite 57, Abb. 3.8 zu finden. Sowohl der N- wie auch der C-Terminus von Ist2 ist cytosolisch orientiert (Jüschke et al., 2004, 2005).



**Abbildung 1.3: Topologie-Modell von Ist2.** Darstellung mit Hilfe des Programms TExTopo (Beitz, 2000).

Die genaue Funktion von Ist2 ist bisher unklar, es wurde jedoch bei einer systematischen Analyse von Deletionsmutanten festgestellt, dass die *IST2*-Nullmutante ( $\Delta ist2$ ) - verglichen mit Wildtyp - eine höhere Toleranz gegenüber 1 M Natriumchlorid aufwies. Daher wurde das kodierende Gen *IST2* (*increased sodium tolerance*) genannt (Entian et al., 1999). Des Weiteren zeigt die *IST2*-Sequenz geringe Homologie zu  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalproteinen (Feldmann et al., 1994; Mannhaupt et al., 1994). Bei einer genetischen Analyse des Kohesin-Komplexes, der während der mitotischen Zellteilung die Schwesterchromatiden zusammenhält, wurde außerdem herausgefunden, dass eine Überexpression von Ist2 den Defekt einer konditionellen *irr1*-Kohesin-Mutante ausgleichen kann (Bialkowska und Kurlandzka, 2002). Ob eine Verbindung zwischen der vorhergesagten Rolle

von Ist2 bei der Osmoregulation und bei der Kohäsion von Chromatiden besteht, ist bisher unklar.

Als posttranslationale Modifikationen wurden in Hochdurchsatz-Experimenten eine Ubiquitinierung von Ist2 und bei exponentiellem Wachstum eine Phosphorylierung von Threonin 726 und Serin 729, 924 und 926 nachgewiesen (Peng et al., 2003; Ficarro et al., 2002). Die C-terminalen vier AS von Ist2 enthalten eine KKXX-ER-Rückführungs-Konsensussequenz und sind gemäß dem Vorhersageprogramm AmphipaSeek Teil einer amphipatischen  $\alpha$ -Helix, die von den C-terminalen elf AS von Ist2 gebildet wird (Cosson und Letourneur, 1994; Sapay et al., 2006).

#### 1.4.2 Der Transport der *IST2*-mRNA ermöglicht die Expression von Ist2 in Tochterzellen

Die Expression von Ist2 in Tochterzellen ist abhängig vom Transport der *IST2*-mRNA an die Tochterzellspitze. Analog zum Transport der *ASH1*-mRNA erkennt das RNA-bindende Protein She2 ein Lokalisationselement in der *IST2*-mRNA an Position 2694-2785 nt (Olivier et al., 2005). Dies entspricht auf Proteinebene den AS 898-928. Dadurch kann der Transport der *IST2*-mRNA an die Tochterzellspitze mit Hilfe der She-Proteine erfolgen (Shepard et al., 2003; Takizawa et al., 2000). Deletion von *SHE1* oder *SHE2* führte zu einer peripheren Lokalisation von Ist2 in Mutterzellen und zu einer verminderten Expression von Ist2 in Tochterzellen, da der mRNP-Transport in die Tochterzelle unterbunden war (Jüschke et al., 2004). Eine Diffusion von Ist2-Molekülen von Mutter- in Tochterzellen wird durch die Septinbarriere zwischen Mutter- und Tochterzelle erschwert (Luedeke et al., 2005). Innerhalb der Tochterzelle wurde dagegen mittels *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP) eine hohe Mobilität von GFP-markiertem Ist2 in Membranen festgestellt (Takizawa et al., 2000).

#### 1.4.3 Transportsignale von Ist2

Trotz der KKXX-ER-Rückführungs-Konsensussequenz am C-Terminus von Ist2 lokalisierte GFP- oder YFP-markiertes Ist2 nicht am generellen ER, sondern an der Zellperipherie, was auf eine Lokalisation von Ist2 am kortikalen ER und/oder an der Plasmamembran hindeutet (Takizawa et al., 2000; Jüschke et al., 2004). Untersuchungen mit N- und C-terminalen Deletionen führten zu der Erkenntnis, dass die cytosolischen C-terminalen 355 AS von Ist2 in Kombination mit einer Transmembrandomäne die Lokalisation von Ist2 an der Zellperipherie vermitteln. Dagegen resultierte eine Deletion der C-terminalen 355 AS [Ist2 (1-591)] in einer Akkumulation von Ist2 an Strukturen des perinukleären ERs und an der Zellperipherie. Ebenso reichten die cytosolischen C-terminalen 355 AS von Ist2 ohne Transmembrandomäne nicht aus, um GFP an die Zellperipherie zu rekrutieren, sondern verursachten ein diffuses cytosolisches Signal (Jüschke et al., 2005). Des Weiteren bedarf es der Translation der C-terminalen 355 AS, um Ist2 an die Zellperipherie

zu dirigieren: Nach Einfügung eines prämaternen Stopcodons nach der AS 591 von Ist2 lokalisierte GFP-markiertes Ist2 in Strukturen des perinukleären ERs und der Zellperipherie (Petzinger, 2004).

#### 1.4.4 Sec-unabhängiger Transport von Ist2 an die Zellperipherie

Um zu überprüfen, ob Ist2 wie andere Membranproteine alle Stationen des sekretorischen Wegs passiert, wurde die Lokalisation von Ist2 in verschiedenen *sec*-Mutanten analysiert. Obwohl *IST2* für ein Membranprotein kodiert, konnte der sekretorische Weg an verschiedenen Stellen unterbrochen werden, ohne den Transport von Ist2 zu beeinträchtigen: Ist2 erreichte bei restriktiver Temperatur unabhängig von *SEC1*, *SEC7*, *SEC12*, *SEC18*, *SEC23*, *MYO2* und *MYO4* die Zellperipherie (Jüschke et al., 2004, 2005). Myo2 und Myo4 sind Typ V-Myosine, welche Vesikel und Organellen (Myo2) bzw. mRNP-Komplexe (Myo4) in die Tochterzelle transportieren. Bei Deletion von Myo4 war die Expression von Ist2 in Tochterzellen stark vermindert, da der Transport der *IST2*-mRNA in die Tochterzelle unterbunden war. Mutterzellen zeigten jedoch ein Signal von Ist2 an der Zellperipherie (Jüschke et al., 2004; Takizawa et al., 2000). Die Funktion der analysierten *SEC*-Gene ist in Tabelle 1.4 dargestellt. Hervorzuheben ist *SEC18*, dessen Inaktivierung den Transport von Ist2 an die Zellperipherie nicht beeinträchtigte. *SEC18*, das Homolog von NSF in Hefe, vermittelt alle SNARE-vermittelten Membranfusionen.

**Tabelle 1.4: Funktion der analysierten *SEC*-Gene.**

| Gen          | Funktion                         | Transportschritt         |
|--------------|----------------------------------|--------------------------|
| <i>SEC1</i>  | SNARE bindendes Protein          | Vesikelfusion mit der PM |
| <i>SEC7</i>  | GEF für Arf                      | Vesikelbildung am TGN    |
| <i>SEC12</i> | GEF für Sar1                     | Vesikelbildung am ER     |
| <i>SEC18</i> | NSF, Regenerierung des SNAREpins | Vesikelfusion            |
| <i>SEC23</i> | COPII-Hüllprotein, GAP für Sar1  | Vesikelbildung am ER     |

PM: Plasmamembran, TGN: *trans*-Golgi-Netzwerk, ER: Endoplasmatisches Retikulum.

Quelle: Schekman und Novick (2004)

In Protease-Zugänglichkeits-Experimenten wurde analysiert, ob Ist2 Proteindomänen besitzt, die auf der Zelloberfläche exponiert sind und durch Zugabe von Proteasen zu intakten Hefezellen gespalten werden können. GFP-markiertes Ist2 konnte mittels Pronase oder Trypsin verdaut werden. Wenn die Hefezellen zusätzlich sphäroblastiert wurden, genügte auch die Zugabe von Trypsin, da aufgrund der fehlenden Zellwand die Protease-Zugänglichkeit der Zelloberfläche erhöht war. Somit konnte gezeigt werden, dass Ist2 Sec-unabhängig an Domänen der Zellperipherie lokalisierte, die für externe Proteasen zugänglich sind (Jüschke et al., 2004).

#### 1.4.5 Der C-Terminus von Ist2 dirigiert Sec-unabhängig andere Membranproteine an die Zellperipherie

Die C-terminalen AS von Ist2 enthalten das Signal für den Transport von Ist2 an die Zellperipherie (siehe Kapitel 1.4.3, Seite 17). In einer Reihe von Experimenten konnte gezeigt werden, dass dieses Signal andere Membranproteine an die Zellperipherie umleiten kann und dominant über andere Sortierungssignale wirkt.

Angehängt an den cytosolischen C-Terminus von Sac1 dirigierten die C-terminalen 358 AS von Ist2 (Ist2C) das Protein Sac1, welches normalerweise im ER und Golgi-Apparat lokalisiert ist, an die Zellperipherie. Die Phosphatidylinositol-Phosphatase Sac1 ist ein integrales Membranprotein, welches den Level von Phosphatidylinositol-4-Phosphat am ER und Golgi reguliert (Foti et al., 2001; Faulhammer et al., 2005). Die Lokalisation des GFP-markierten Fusionsproteins Sac1-Ist2C an die Zellperipherie von  $\Delta sac1$ -Zellen erfolgte zu Domänen, die zugänglich für externe Proteasen sind (Jüschke et al., 2005).

Des Weiteren wurde das pheromonregulierte Membranprotein Prm1, dessen C-Terminus im Cytosol vorliegt, durch Ist2C an die Zellperipherie von *sec18-1*-Mutanten umgeleitet. Prm1 wird während der Paarung von zwei Hefezellen exprimiert, übt seine Funktion an der Plasmamembran an Zell-Zellkontakten aus und wird nach Internalisation in der Vakuole abgebaut (Heiman und Walter, 2000). Im Gegensatz zu CFP-markiertem Prm1, welches an Zell-Zellkontakten von sich paarenden Hefezellen und in der Vakuole lokalisiert war, zeigte das GFP-markierte Fusionsprotein Prm1-Ist2C eine fleckartige Verteilung an der Zellperipherie ohne sichtbare Akkumulation in der Vakuole. Die Umleitung von Prm1-GFP-Ist2C erfolgte zu Domänen der Zellperipherie, die zugänglich zu externen Proteasen waren (Jüschke et al., 2005).

Ein drittes Beispiel ist Ste6, ein  $\alpha$ -Faktor Pheromon-Transporter aus der Familie der ATP-Bindungs-Kassetten-Transporter (ABC-Transporter). Eine verkürzte Version des Ste6-Transporters (AS 1-109) enthielt den N-Terminus und die ersten zwei Transmembrandomänen von Ste6 mit einem cytosolischen C-Terminus (Geller et al., 1996). Diese Mutation akkumulierte in Strukturen ähnlich dem ER-assoziierten Kompartiment, in welchem missgefaltete Ste6-Mutanten lokalisieren (Huyer et al., 2004). Wenn an diesen Reporter Ist2C angehängt wurde, wurde YFP-markiertes Ste6-Ist2C in *sec12-4*-Mutanten an die Zellperipherie dirigiert. Diese Umleitung war spezifisch für Ist2C, denn die Sequenz der sekretierten Invertase, gleichermaßen an YFP-Ste6 fusioniert, konnte das Fusionsprotein nicht an die Zellperipherie lokalisieren, sondern zeigte eine intrazelluläre Verteilung an Strukturen des ERs (Jüschke et al., 2005).

Weiterhin vermochte Ist2C das GFP-markierte Kex2 vom Golgi-Apparat an die Zellperipherie von *sec23-1*-Mutanten zu dirigieren (Franz, 2005). Die Furinprotease Kex2 ist ein Typ I-Membranprotein und lokalisiert aufgrund eines Tyrosinsignals im *trans*-Golgi-Apparat (Wilcox et al., 1992).

Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass Membranproteine, die eine oder mehrere Transmembrandomänen und einen cytosolischen C-Terminus enthalten, mittels Ist2C

von verschiedenen intrazellulären Orten Sec-unabhängig zu Protease-sensitiven Domänen der Zellperipherie umgeleitet werden können.

#### **1.4.6 Fusionsproteine mit dem C-Terminus von Ist2 durchqueren nicht den *trans*-Golgi-Apparat**

Um herauszufinden, ob Ist2-Fusionsproteine neben dem ER auch den Golgi-Apparat passieren, wurde das Glykosylierungsmuster von Prm1-GFP-Ist2*C* analysiert. Prm1 wird bei der Passage durch das ER stark glykosyliert (Heiman und Walter, 2000). Ebenso erhielt das Fusionsprotein Prm1-GFP-Ist2*C* N-Glykosylierungen (Jüschke et al., 2005). Modifizierungen der N-Glykosylierungen werden im Golgi-Apparat durch den Transfer eines Mannoserestes an das Kernoligosaccharid mit einer  $\alpha$ 1,6-Verknüpfung initiiert (Nakayama et al., 1992). Nach mehreren Verlängerungen und Verzweigungen der Oligosaccharidkette findet schließlich im *trans*-Golgi-Apparat eine  $\alpha$ 1,3-Verknüpfung der Oligosaccharide statt (Raschke et al., 1973). Das Fusionsprotein Prm1-GFP-Ist2*C* erhielt  $\alpha$ 1,6-verknüpfte Oligosaccharide, wies jedoch kaum  $\alpha$ 1,3-Glykosylierungen auf. Dies bedeutet, dass ein Teil des Prm1-GFP-Ist2*C*-Fusionsproteins den *cis*-Golgi-Apparat, nicht jedoch den *trans*-Golgi-Apparat passiert. Des Weiteren waren die  $\alpha$ 1,6-Glykosylierungen abhängig von *SEC18*. Dies spricht für zwei verschiedene Wege, die Prm1-GFP-Ist2*C* nehmen kann: Entweder erfolgt ein Sec-unabhängiger Transport vom ER an die Zellperipherie oder ein Sec-abhängiger Transport vom ER über den Golgi-Apparat (Jüschke et al., 2005).

Ein weiterer Hinweis, dass Fusionsproteine mit dem C-Terminus von Ist2 nicht den *trans*-Golgi-Apparat erreichen, stammt von Experimenten mit dem Chloridkanal Gef1, der in Endosomen und im prävakuolärem Kompartiment lokalisiert ist und normalerweise im *trans*-Golgi-Apparat von der Furinprotease Kex2 gespalten wird (Gaxiola et al., 1998; Schwappach et al., 1998). Durch Mutation der Schnittstelle kann die Prozessierung von Gef1 durch Kex2 verhindert werden (Wächter und Schwappach, 2005). Wenn Ist2*C* an Gef1 mit funktionsfähiger Kex2-Schnittstelle fusioniert wird, erfolgt trotzdem keine Spaltung durch Kex2. Daher kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass durch Markierung mit Ist2*C* bei dem Fusionsprotein eine Umgehung des *trans*-Golgi-Apparates bewirkt wurde (Jüschke et al., 2005). Zusätzlich bildet Gef1 Homodimere aus (Middleton et al., 1996; Dutzler et al., 2002). Wenn neben der Wildtyp-Version von Gef1 eine zweite koexprimiert wird, die als Fusionsprotein mit Ist2*C* vorliegt, ist die Bildung von Homo- und Heterodimeren möglich. Die Heterodimere aus Gef1 und Gef1-Ist2*C* wurden unter Umgehung des *trans*-Golgi-Apparates an die Zellperipherie dirigiert, so dass bei keiner Gef1-Version eine Spaltung durch Kex2 nachweisbar war. Dies bedeutet, dass das Signal von Ist2*C* dominant wirkte und die nichtmarkierte Version von Gef1 durch Heterodimerbildung umleitete (Jüschke et al., 2005).

## 1.5 Aufgabenstellung

Ausgehend von der Tatsache, dass Ist2 aufgrund der C-terminalen 358 AS Sec-unabhängig zu Protease-sensitiven Domänen der Zellperipherie transportiert wird, ohne den *trans*-Golgi-Apparat zu passieren, sollten in der vorliegenden Doktorarbeit weiterführende Untersuchungen zum Mechanismus des Sec-unabhängigen Transports von Ist2 durchgeführt werden. Dabei wurden zwei verschiedene Hypothesen analysiert: Die Lokalisation der *IST2*-mRNA am kortikalen ER der Tochterzellspitze könnte eine Voraussetzung für den Transfer von Ist2 an die Zellperipherie sein. Dies bedeutet, dass durch die mRNA-Lokalisation der Ort der Translation festgelegt würde, von dem aus anschließend der direkte Transport an die Plasmamembran stattfindet. Alternativ könnte ein posttranslationaler Transport von Ist2 an die Zellperipherie erfolgen. Dabei würde Ist2 - unabhängig von der mRNA-Lokalisation - am generellen ER translatiert werden, um von dort aus anschließend zu Domänen der Plasmamembran zu gelangen, sei es durch Transport vom pER über das kortikale ER zu Domänen der Plasmamembran oder direkt vom pER zur Plasmamembran.

Ein weiterer Gegenstand dieser Doktorarbeit war die genaue Analyse des Sortierungssignals von Ist2, um herauszufinden, inwieweit mRNA- und Proteinsignale für den Transport von Ist2 von Bedeutung sind. Der Transport zu Domänen der Plasmamembran kann entweder ausschließlich von mRNA-Signalen oder nur von Proteinsignalen oder von einer Kombination aus beiden Signalen bestimmt werden. Durch die Analyse der Signale sollte die Voraussetzung geschaffen werden, gezielt die Anforderung an die einzelnen Transportschritte analysieren zu können.

Zusätzlich sollten in dieser Arbeit durch genetische und biochemische Methoden Interaktionspartner von Ist2 identifiziert werden, die den Sec-unabhängigen Transport von Ist2 an die Zellperipherie vermitteln.

# 2 Material und Methoden

---

## 2.1 Materialien

### 2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Invitrogen (Karlsruhe) oder Sigma (München). Sofern spezielle Chemikalien von anderen Firmen verwendet wurden, ist dies an entsprechender Stelle vermerkt.

### 2.1.2 Standardmedien und -puffer

Für die Herstellung von Luria-Bertani- (LB-), Hartwell complete- (HC-), 2YT- und YEAP-Medien wurden Trypton und Hefeextrakt von BD Biosciences (Heidelberg) und Yeast nitrogen base (YNB) von Gibco BRL (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Für die Kultivierung von Hefe- oder Bakterienstämmen auf Platten wurde dem Medium 2% Agar (AppliChem) hinzugefügt. Soweit nicht anders vermerkt, wurde für alle Puffer und Lösungen Reinstwasser (Millipore Reagent Grade Water System, Millipore Corporation) verwendet. PBS wurde aus 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> hergestellt und der pH auf 7,4 eingestellt.

### 2.1.3 Enzyme, Kits und andere Reagenzien

#### Enzyme

|                        |                                   |
|------------------------|-----------------------------------|
| Alkalische Phosphatase | Roche (Mannheim)                  |
| Pfu Polymerase         | Stratagene (La Jolla, CA, USA)    |
| Restriktionsenzyme     | NEB (Frankfurt), Roche (Mannheim) |
| Taq Polymerase         | Roche (Mannheim)                  |
| T4-DNA-Ligase          | Roche (Mannheim)                  |

#### Kits

|                             |                                         |
|-----------------------------|-----------------------------------------|
| Plasmid Minipräparation     | Qiagen (Hilden)                         |
| Plasmid Midipräparation     | Macherey-Nagel (Düren)                  |
| Qiaquick Gel Extraktion/PCR | Qiagen (Hilden)                         |
| Aufreinigung                |                                         |
| Novex Colloidal Blue Stain  | Invitrogen (Karlsruhe)                  |
| T7-Mega-Shortscript         | Ambion (Huntingdon, Cambridgeshire, UK) |

## Einwegartikel

|                                            |                                     |
|--------------------------------------------|-------------------------------------|
| Glassperlen 0,425-0,600 mm                 | Sigma (München)                     |
| Protran Nitrozellulose Transfer Membran    | Schleicher und Schüll (Dassel)      |
| Super RX Röntgenfilme                      | Fujifilm (Düsseldorf)               |
| 3 mm Chromatographie Papier                | Schleicher und Schüll (Dassel)      |
| Mini Quick Spin RNA Säulen                 | Roche (Mannheim)                    |
| MobiCols, Filter mit 35 $\mu$ m Porengröße | Molecular Biotechnology (Göttingen) |
| PD-10 Entsalzungssäulen                    | Amersham Biosciences (Freiburg)     |
| Glutathion-Sepharose 4B                    | Amersham Biosciences (Freiburg)     |
| ProteinA-Sepharose <sup>TM</sup> CL-4B     | Amersham Biosciences (Freiburg)     |

## Reagenzien

|                                                     |                                      |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Aminoethyl-p-Benzensulfonylfluorid (AEBSF)          | Gerbü (Gaiberg)                      |
| BM Chemilumineszenz Detektion Blotting Substrat     | Roche (Mannheim)                     |
| Ni-EDTA-Sepharose                                   | D. Görlich                           |
| Ribonucleosid-Vanadyl-Complex (VRC)                 | NEB (Frankfurt)                      |
| RNasin                                              | Promega (Madison, USA)               |
| Oxalytikase                                         | Enzogenetics (Covallis, USA)         |
| Heparin                                             | Pharmacia (New York, USA)            |
| Diethylpyrocarbonate (DEPC)                         | Roth (Karlsruhe)                     |
| tRNA                                                | Roche (Mannheim)                     |
| Denhardt's                                          | Sigma (München)                      |
| CHAPS                                               | Gerbü (Gaiberg)                      |
| SSC                                                 | Serva (Heidelberg)                   |
| Formamid                                            | Calbiochem (Darmstadt)               |
| Compl. EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (CPIM) | Roche (Mannheim)                     |
| Digoxigenin-11-Uridin-5'-Triphosphat (DIG-UTP)      | Roche (Mannheim)                     |
| Zymolase 20T                                        | Seikagaku Corporation (Tokyo, Japan) |

### 2.1.4 Antikörper

#### Primäre Antikörper

| Antigen     | Organismus | Verdünnung | Herkunft                                |
|-------------|------------|------------|-----------------------------------------|
| Digoxigenin | Maus       | 1:250      | Molecular Probes (Karlsruhe)            |
| Emp47       | Kaninchen  | 1:10 000   | hergestellt nach Schröder et al. (1995) |
| GST-Ist2C*  | Kaninchen  | 1:25 000   | diese Arbeit                            |
| HA          | Maus       | 1:1 000    | Berkeley Antibody Company               |
| Kar2        | Kaninchen  | 1:10 000   | hergestellt nach Rose et al. (1989)     |
| Myc         | Kaninchen  | 1:1 000    | Sigma (München)                         |
| Sac1        | Maus       | 1:100 000  | P. Mayinger                             |
| Scs2        | Kaninchen  | 1:20 000   | hergestellt nach Kagiwada et al. (1998) |
| Sec61       | Kaninchen  | 1:10 000   | hergestellt nach Stirling et al. (1992) |

\* GST-Ist2C bezieht sich auf die C-terminalen 359 AS von Ist2, die rekombinant als GST-Fusionsprotein hergestellt wurden (siehe Kapitel 2.3.3).

#### Sekundäre Antikörper

| Antikörper                                       | Verdünnung | Herkunft                     |
|--------------------------------------------------|------------|------------------------------|
| Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG | 1:10 000   | Sigma (München)              |
| Peroxidase-konjugierter Kaninchen-anti-Maus-IgG  | 1:10 000   | Sigma (München)              |
| Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 488                  | 1:400      | Molecular Probes (Karlsruhe) |
| Ziege-anti-Kaninchen-Alexa Fluor 594             | 1:300      | Molecular Probes (Karlsruhe) |
| Huhn-anti-Maus-Alexa Fluor 488                   | 1:250      | Molecular Probes (Karlsruhe) |
| Esel-anti-Huhn-Alexa Fluor 488                   | 1:2 500    | Molecular Probes (Karlsruhe) |

### 2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech und BioSpring synthetisiert, mit Wasser in einer Konzentration von 50  $\mu$ M gelöst und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Orientierung der Oligonukleotide ist mit *f* für vorwärts bzw. *r* für rückwärts angegeben.

**Tabelle 2.1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete eigene Oligonukleotide**

| Name  | Sequenz 5' $\rightarrow$ 3'                                          | Gen         | Modifikation |
|-------|----------------------------------------------------------------------|-------------|--------------|
| KM8f  | GGATCCAAATCTTCCCATGATGACGTTG                                         | <i>IST2</i> | <i>BamHI</i> |
| KM10r | CTCGAGTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATG                                       | <i>IST2</i> | <i>XhoI</i>  |
| KM25r | GGATCCCAGGTCCTCCTCTGAGATCAGCTTCTGCTCCTCCAT-TCTAGAGTATGCTCAACCGCTTGTG | <i>IST2</i> | <i>BamHI</i> |
| KM31f | GCTAGCCAGCGGTATACTTATTTTTTACTC                                       | <i>NUF2</i> | <i>NheI</i>  |
| KM32r | CTCGAGTGATCAATAGGGATATGGTTAC                                         | <i>NUF2</i> | <i>XhoI</i>  |

Fortsetzung auf nächster Seite...

Fortsetzung von vorheriger Seite...

|        |                                                                         |                |                                     |
|--------|-------------------------------------------------------------------------|----------------|-------------------------------------|
| KM35r  | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTCAGCTTATGCAATAGCGG-CTTTT                          | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , G937P                 |
| KM40f  | CTTTTAAACATACTCTCGCAG                                                   | <i>SHE2</i>    |                                     |
| KM41r  | CATTTTAGGCTATAGTTCCTC                                                   | <i>SHE2</i>    |                                     |
| KM48f  | GTAAACCCTCCTTAATTTTCCTTTTGCATAATACCAGACA-CTTAAACGTACGCTGCAGGTCGAC       | <i>SHE2</i>    |                                     |
| KM49r  | CTATTAAGTGTGCTTATTTGCTCTTTTGTAGCTAAA-AACTGAAGGCCATCGATGAATTCGAGCTCG     | <i>SHE2</i>    |                                     |
| KM62f  | CAATACATTTGAAAAAGATTAAAAACAAGCACAAGCGGT-TGAGCATACTATGCGTACGCTGCAGGTCGAC | <i>KANMX4</i>  | $\Delta ist2$                       |
| KM63r  | ATGTCACCATATTATAAAAATAAAATTTGTTATCGTCCTA-GCTTTTTTTTAATCGATGAATTCGAGCTCG | <i>KANMX4</i>  | $\Delta ist2$                       |
| KM64f  | CCTGGGATCCTCGCAGACAATTAC                                                | <i>IST2</i>    | <i>BamHI</i>                        |
| KM65r  | GAAGTAGTTCTTTTTTCGTTATTCGAAT                                            | <i>IST2</i>    | <i>SpeI</i>                         |
| KM67f  | GGATCCTACCCATACGATGTCCCTGACTATGCGTCGCAG-ACAATTACATCTCTAGATCCG           | <i>HA-IST2</i> | <i>BamHI</i>                        |
| KM69r  | GGATCCTATAGTTTTTCTCCTTGACGTTAAAG                                        | <i>pGAL1</i>   | <i>BamHI</i>                        |
| KM70f  | ACTGGATCCATGTACCCATACGATGTC                                             | <i>HA</i>      | <i>BamHI</i>                        |
| KM71r  | GGCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTCAGCTTATGCAATAGCGCC-TTTTT                        | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , G937A                 |
| KM76r  | GCTAGCTTAAAGCCTTCTTTTTTCAGCTT                                           | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , L946A                 |
| KM78r  | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTGATCTTATGCA                                       | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , L942I                 |
| KM79r  | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTCACCTTATGCA                                       | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , L942V                 |
| KM82f  | GTTAATAGTGTAGCAGAAGGGTATTCTACAATCTCCGCG-AACCTAAGTATGCGTACGCTGCAGGTCGAC  | <i>KANMX4</i>  | $\Delta scs2$                       |
| KM83r  | CATATATAAATATATATTTAGAATACAGCTATATCCTCAAT-CTCCCTATTAATCGATGAATTCGAGCTCG | <i>KANMX4</i>  | $\Delta scs2$                       |
| KM84r  | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTCAGCTTATGCACTACCC-CTT                             | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , L938,939V             |
| KM85r  | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTCAGCTTATGGATTATCCCCTT                             | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , L938,939I             |
| KM89r  | GCTAGCTTAAATCTTCTTTTTTCAGCTTATGCAA                                      | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , L946I                 |
| KM90r  | GCTAGCTTATACCTTCTTTTTTCAGCTTATGCAA                                      | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , L946V                 |
| KM91r  | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTCAGCTTATGCAATATCCCCTTT                            | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , L938I                 |
| KM92r  | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTCAGCTTATGCAATACCCCC                               | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , L938V                 |
| KM93r  | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTCAGCTTATGGATTAGCCCC                               | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , L939I                 |
| KM94r  | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTCAGCTTATGCACTAGCCCC                               | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , L939V                 |
| KM95r  | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTCAGCTTATGCAATAGC-CCCGCTGCAGCTGCTGGTGTCTTCTTT      | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , K931,933,934,935,936A |
| KM96r  | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTCAGCTTATGCAATGCCCCCTT                             | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , L938A                 |
| KM97r  | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTCAGCTTATGCGCTAGCCCC                               | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , L939A                 |
| KM98r  | ATGGATCCCTTGTACAGCTCG                                                   | <i>mCherry</i> | <i>BamHI</i>                        |
| KM99f  | AGGTCGACATGGTGAGCAAGG                                                   | <i>mCherry</i> | <i>SalI</i>                         |
| KM100r | GCTAGCTTATTTTAGCGAGTCAAGTGATTAAAGCTTCTTT-TTCAGC                         | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , +KSLDSLK              |
| KM101r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTCATCTTATGCA                                       | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , L942M                 |
| KM102r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTCCACTTATGCA                                       | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , L942W                 |
| KM103r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTGAAGTATGCA                                        | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , L942F                 |
| KM104r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTCAGCTTATGCAATAGCCCC-TTTTATGTGCTGGTTT              | <i>IST2</i>    | <i>NheI</i> , K933A                 |

Fortsetzung auf nächster Seite...

Fortsetzung von vorheriger Seite...

|        |                                                                            |              |                                            |
|--------|----------------------------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------|
| KM105r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGCAATAGCCCC-<br>TTTGCATGTTTT                  | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> , K935A                        |
| KM106r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGCAATAGCCCC-<br>GCTTTATGT                     | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> , K936A                        |
| KM109r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGCAATAGCCCC-<br>TTTGCAGCTGCTGGTGCTTCCTTT      | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> ,<br>K931,933,934,935A         |
| KM110r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGCAATAGCCCC-<br>TTTTTAGCTGCTGGTTT             | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> ,<br>K933,934A                 |
| KM111r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGCAAAAACCCCT                                  | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> , L938F                        |
| KM112r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGAAATAGC                                      | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> , L939F                        |
| KM113f | ACTAGTATGTCTAAAGGTG                                                        | <i>GFP</i>   | <i>SpeI</i>                                |
| KM115r | GGATCCTTATTTGTACAATTCATC                                                   | <i>GFP</i>   | <i>BamHI</i>                               |
| KM116r | AGCTCGAGCTTGAGTTGCTTCTTGGAAGTTTGGGAG                                       | <i>ERG6</i>  | <i>XhoI</i>                                |
| KM117f | GCACTAGTGAAATCTACAAGTTTTGAAACCGGGTG                                        | <i>ERG6</i>  | <i>SpeI</i>                                |
| KM118r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGCAATAGCCCCT-<br>TTTTATGTTTTGCTTTTTCC         | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> , P932A                        |
| KM119r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGCAATAGCCCCT-<br>TTGCAGCTTTTGGTGCTTCCTT       | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> ,<br>K931,934,935A             |
| KM120r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGCAATAGCCCCT-<br>TTGCATGTGCTGGTGCTTCCTT       | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> ,<br>K931,933,935A             |
| KM121r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGCAATAGCCCCT-<br>TTTTAGCTGCTGGTGCTTCCTT       | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> ,<br>K931,933,934A             |
| KM122r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGCAATAGCCCCT-<br>TTGCAGCTGCTGGTTTTTCC         | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> ,<br>K933,934,935A             |
| KM123r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGCAATAGCCCCG-<br>CTGCAGCTGCTGGTTTTTCC         | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> ,<br>K933,934,935,936A         |
| KM124r | GCTAGCTTAAAGCGCCGCTGCCAGCGCAGCCAATAGCCCC-<br>GCTTTATG                      | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> ,<br>K936,940,941,943,944,945A |
| KM125r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCAACTTATGTAGCCC                                    | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> ,<br>LHK939,940,941HKL         |
| KM126r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGCAATGCTGCTG-<br>CTGCAAGCCCC                  | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> ,<br>L938-4A-L939              |
| KM127r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGCAATAGTGCAG-<br>CTGCTGCCCCCTT                | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> ,<br>G937-4A-L938              |
| KM128r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGTGCCTTATG                                          | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> ,<br>K941-1A-L942              |
| KM133r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGCAATGCTGCTG-<br>CAAGCCCC                     | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> ,<br>L938-3A-L939              |
| KM136f | CTACTAGTTCTGCTTCTGTCAACTCTGTTC                                             | <i>SEC13</i> | <i>SpeI</i>                                |
| KM137r | CTCTCGAGCCTGATGAACCTCACCAGCGGG                                             | <i>SEC13</i> | <i>XhoI</i>                                |
| KM138r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGTGCCTTATGCAAT-<br>AGC                              | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> ,<br>K941-2A-L942              |
| KM139r | GCTAGCTTAATCCTTTTTTCGCCTTTCTCAATAGCTTTTTTA-<br>GTGAATTTTTTTTTTTTTTCTTTGCGG | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i>                                |
| KM142r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGGAATAGCCCCT-<br>TTTTCTCTCGTTTTTCTTTGCGGCGG   | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i>                                |
| KM143r | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTCAGCTTATGCGGTAGCCCC                                   | <i>IST2</i>  | <i>NheI</i> , L939P                        |

Die Oligonukleotide KM139r bzw. KM142r wurden verwendet, um die C-terminale K/L-Sequenz von *IST2* aus *C. guilliermondii* bzw. *S. castelli* zu klonieren. Die folgenden

Oligonukleotide in Tabelle 2.2 wurden für die Klonierung von GST-IST2C, HA-/MYC-tags bzw. die Generierung von PCR-modifizierten Genmodifikationen eingesetzt.

**Tabelle 2.2: Verwendung spezieller Oligonukleotide**

| Verwendung                  | Oligonukleotide |
|-----------------------------|-----------------|
| pGEX-Tev-Ist2               | KM8 und 10      |
| HA                          | KM67 und 70     |
| MYC                         | KM25, 64 und 65 |
| NUF2 3'-UTR                 | KM31 und 32     |
| $\Delta she2$               | KM48 und 49     |
| Verifizierung $\Delta she2$ | KM40 und 41     |
| $\Delta ist2$               | KM62 und 63     |
| $\Delta scs2$               | KM82 und 83     |

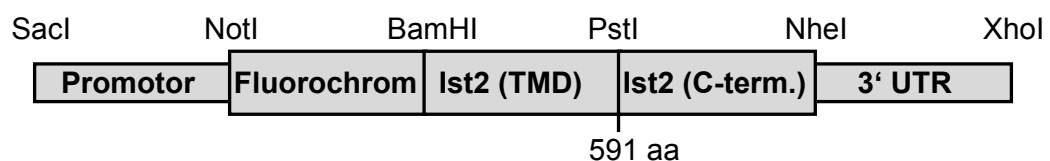
Die Oligonukleotide CJIST1f und JP64r in Tabelle 2.3 wurden für die Herstellung von Ist2-Punktmutationen eingesetzt. Die acht Oligonukleotide von R. Jansen wurden für die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in Hefe verwendet.

**Tabelle 2.3: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete fremde Oligonukleotide**

| Name            | Sequenz 5' → 3'                                  | Herkunft     |
|-----------------|--------------------------------------------------|--------------|
| GAL1_for        | ACGAGCTCGACAGGTTATCAGCAACA                       | C. Jüschke   |
| CJIST1f         | CGGGATCCATGTCGCAGACAATTACATCTC                   | C. Jüschke   |
| JP42r           | GCTAGCTTAAAGCTTCTTTTTTCAGCTTATGCAATAGCT-CCTTTTTT | J. Petzinger |
| JP64r           | GCTAGCTTAAAGCGCCGCTGCCAGCGCAGCCAATAG             | J. Petzinger |
| IST2-1450-f     | GGAAAGCTGTGCTTTATAG                              | R. Jansen    |
| IST2-T7p-1690-r | TAACCTATAGGCCACGAGTGGTTTATTG                     | R. Jansen    |
| IST2-780-f      | CTATACTTATTTGCACG                                | R. Jansen    |
| IST2-T7p-1030-r | TAATACGACTCACTATAGGGGCCAATATTGAAAAGGC            | R. Jansen    |
| IST2-1950-f     | CAGCCTGCCTCTTCTGCC                               | R. Jansen    |
| IST2-T7p-2200-r | TAATACGACTCACTATAGGCCGCAACACCATATGAG             | R. Jansen    |
| IST2-2450-f     | CGATGCTGCCACTAAG                                 | R. Jansen    |
| IST2-T7p-2700-r | TAATACGACTCACTATAGGGTGATGATGATGGTGGGGC           | R. Jansen    |

### 2.1.6 Plasmide

Die meisten der verwendeten Plasmide stammen von den Shuttle Vektoren (*E. coli* / *S. cerevisiae*) der pRS-Reihe von Sikorski und Hieter (1989) ab. Soweit möglich, wurden die in Abb. 2.1 gezeigten Schnittstellen für Konstrukte mit Ist2 verwendet, um die einzelnen Module leicht austauschen zu können.



**Abbildung 2.1: Restriktionsschnittstellen der Ist2-Plasmide**

Tabelle 2.4: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide

| Name   | Konstrukt                                              | Rückgrat  | UTR    | Herkunft                         |
|--------|--------------------------------------------------------|-----------|--------|----------------------------------|
| pCJ15  | p $IST2$ - $IST2$                                      | pRS406    | $IST2$ | C. Jüschke                       |
| pCJ149 | p $GAL1$ - $KEX2$ -y $EGFP3$                           | pRS303    |        | C. Jüschke                       |
| pJP33  | p $IST2$ -y $EGFP3$ - $IST2$                           | pRS305    | $IST2$ | J. Petzinger                     |
| pMS329 | $SEC63$ - $GFP$                                        | pJK59     |        | Prinz et al. (2000)              |
| pMS547 | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2(1-928)$                | pRS306    | $IST2$ | M. Seedorf                       |
| pKM34  | GST-Thrombin-TEV                                       | pGEX-Tev  |        | D. Görlich                       |
| pKM37  | GST-Thrombin-TEV-Ist2(359aa)                           | pGEX-Tev  |        | diese Arbeit                     |
| pKM39  | GST-Thrombin-Hexahistidin-Tag                          | pGEX60HRC |        | D. Görlich (Mingot et al., 2001) |
| pKM48  | p $IST2$ -y $EGFP3$ - $IST2$                           | pRS315    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM50  | p $IST2$ - $IST2$                                      | pRS305    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM53  | p $IST2$ - $IST2$ L942Q                                | pRS305    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM54  | p $IST2$ - $IST2$ L938,939A                            | pRS305    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM56  | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2(1-591)$                | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM57  | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2(1-591+878-946)$        | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM58  | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$                       | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM61  | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$                       | pRS306    | $NUF2$ | diese Arbeit                     |
| pKM63  | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ L942Q                 | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM64  | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ L938,939A             | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM66  | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2(1-591+832-946)$        | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM67  | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ G937P                 | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM75  | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ G937E                 | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM79  | p $IST2$ -MYC- $IST2$                                  | pRS305    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM81  | p $IST2$ - $IST2$                                      | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM83  | p $IST2$ -HA- $IST2$                                   | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM88  | p $IST2$ - $IST2$ L942Q                                | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM90  | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ G937A                 | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM91  | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ L942A                 | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM92  | p $GAPDH$ -HMG1- $GFP$                                 | pRH475    |        | Wilhovsky et al. (2000)          |
| pKM97  | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ L946A                 | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM98  | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ L942I                 | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM99  | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ L942V                 | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM106 | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ L938,939V             | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM107 | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ L938,939I             | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM108 | p $GAL1$ -HA- $IST2$                                   | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM110 | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ L938A                 | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM111 | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ L938I                 | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM112 | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ L938V                 | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM113 | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ L939A                 | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM114 | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ L939I                 | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM115 | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ L939V                 | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM116 | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ L946I                 | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM117 | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ L946V                 | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM118 | p $GAL1$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ K931,933,934,935,936A | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |
| pKM119 | p $GAL$ -y $EmCitrine$ - $IST2$ H940,941,943,944,945A  | pRS306    | $IST2$ | diese Arbeit                     |

Fortsetzung auf nächster Seite...

Fortsetzung von vorheriger Seite...

|        |                                                                    |        |      |                                     |
|--------|--------------------------------------------------------------------|--------|------|-------------------------------------|
| pKM122 | pGAL1-mCherry-Ist2                                                 | pRS305 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM125 | pGAL1-mCherry-Ist2 L938,939V                                       | pRS305 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM127 | pGAL1-mCherry-Ist2 L942Q                                           | pRS305 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM133 | pGAL1-yEmCitrine-IST2(1-946)+ KSLDSLK                              | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM135 | pGAL1-yEmCitrine-IST2 K935A                                        | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM136 | pGAL1-yEmCitrine-IST2 K936A                                        | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM137 | pGAL1-yEmCitrine-IST2 L942M                                        | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM138 | pGAL1-yEmCitrine-IST2 L942W                                        | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM139 | pGAL1-yEmCitrine-IST2 L942F                                        | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM141 | pMET25-GEF1-GFP                                                    | p416   |      | B. Schwappach                       |
| pKM142 | pADH-SED5-GFP                                                      | pRS315 |      | B. Schwappach                       |
| pKM144 | pGAL1-mCherry-Ist2                                                 | pRS315 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM145 | pADH-SED5-GFP                                                      | pUG36  |      | diese Arbeit                        |
| pKM148 | pGAL1-yEmCitrine-IST2 K931,933,934,935A                            | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM149 | pGAL1-yEmCitrine-IST2<br>K931,933,934,935,936,940,941,943,944,945A | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM150 | pGAL1-yEmCitrine-IST2 K933,934A                                    | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM154 | pADH-SEC7-DsRed                                                    | pRS415 |      | Proszynski et al.<br>(2005)         |
| pKM156 | pMET-DPM1-yEGFP3                                                   | pUG34  |      | diese Arbeit                        |
| pKM164 | pGAL1-mCherry-Ist2 L938,939V                                       | pRS315 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM166 | pGAL1-mCherry-Ist2 L942Q                                           | pRS315 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM169 | pGAL1-yEGFP3-Ist2 L938,939V                                        | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM171 | pGAL1-yEGFP3-Ist2 L942Q                                            | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM172 | pERG6-ERG6-sGFP                                                    | pJK67  | NUF2 | diese Arbeit                        |
| pKM173 | pGAL1-yEmCitrine-IST2 P932A                                        | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM174 | pGAL1-yEmCitrine-IST2 K931,934,935A                                | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM175 | pGAL1-yEmCitrine-IST2 K931,933,935A                                | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM176 | pGAL1-yEmCitrine-IST2 K931,933,934A                                | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM177 | pGAL1-yEmCitrine-IST2 K933,934,935A                                | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM179 | pGAL1-yEmCitrine-IST2<br>K936,940,941,943,944,945A                 | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM180 | pGAL1-yEmCitrine-IST2(1-946)<br>LHK939,940,941HKL                  | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM182 | pGAL1-yEmCitrine-IST2(1-950)<br>G937-4A-L938                       | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM183 | pGAL1-yEmCitrine-IST2(1-947)<br>K941-A-L942                        | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM184 | pGAL1-yEmCitrine-IST2(1-948)<br>K941-2A-L942                       | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM188 | pGAL1-yEmCitrine-IST2(1-949)<br>L938-3A-L939                       | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM193 | pSEC13-SEC13-sGFP                                                  | pJK67  | NUF2 | diese Arbeit                        |
| pKM194 | pGAL1-yEmCitrine-IST2(1-931)+<br>C.guilliermondii                  | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM197 | pGAL1-yEmCitrine-IST2(1-931)+ S.castelli                           | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM201 | pPHO5-GFP-Scs2                                                     | pRS406 |      | Loewen et al. (2007)                |
| pKM203 | pGAL1-yEmCitrine-IST2 L939P                                        | pRS306 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM204 | pIST2-mCherry-Ist2                                                 | pRS305 | IST2 | diese Arbeit                        |
| pKM206 | HIS3MX6                                                            | pFA6a  |      | E. Schiebel (Janke<br>et al., 2004) |

pKM194 bzw. pKM197 kodieren für yEmCitrine-Ist2 (1-931), an welches entweder die C-terminalen 15 Aminosäuren (AS) von *C. guilliermondii* oder die C-terminalen 14 AS von *S. castelli* fusioniert sind.

In der folgenden Tabelle sind die Enzyme notiert, mit denen die verschiedenen Plasmide vor der Integration ins Hefegenom linearisiert wurden.

| Plasmid | Linearisierung mit | Integration in |
|---------|--------------------|----------------|
| pRS303  | <i>Bsi</i> WI      | <i>HIS3</i>    |
| pRS305  | <i>Eco</i> RV      | <i>LEU2</i>    |
| pRS306  | <i>Stu</i> I       | <i>URA3</i>    |
| pKM193  | <i>Hpa</i> I       | <i>SEC13</i>   |
| pKM172  | <i>Sal</i> I       | <i>ERG6</i>    |

### 2.1.7 Sequenzen

Die genomischen *IST2*-Sequenzen der verschiedenen Hefespezies (*Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces castelli*, *Ashbya gossypii*, *Candida guilliermondii* und *Kluyveromyces lactis*) beziehen sich auf P38250, Sbay 6.143, Scas 718.21 (Byrne und Wolfe, 2005), Q75B72 und PGUG\_03099.1 (<http://www.broad.mit.edu>). Die graphische Darstellung der Sequenzen erfolgte anhand von ClustalW (Chenna et al., 2003) und wurde manuell in Genedoc Version 2.6.002 editiert.

## 2.2 Organismen

### 2.2.1 Bakterienstämme (*E. coli*)

In dieser Arbeit wurden standardmäßig für die Amplifizierung von Plasmiden DH5 $\alpha$ -Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) und für die Proteinexpression in Bakterien BL21-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Für die Klonierung mit dem TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit wurden TOP10-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet.

| Name         | Genotyp                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DH5 $\alpha$ | F <sup>-</sup> $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 <i>deo</i> R <i>rec</i> A1 <i>end</i> A1<br><i>hsd</i> R17(r <sup>-</sup> <sub>k</sub> , m <sup>+</sup> <sub>k</sub> ) <i>pho</i> A <i>sup</i> E44 <i>thi</i> -1 <i>gyr</i> A96 <i>rel</i> A1                                         |
| TOP10        | F <sup>-</sup> <i>mcr</i> A $\Delta$ ( <i>mrr</i> - <i>hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC) $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 <i>rec</i> A1<br><i>deo</i> R <i>ara</i> D139 $\Delta$ ( <i>ara</i> - <i>leu</i> )7697 <i>gal</i> U <i>gal</i> K <i>rps</i> L (Str <sup>R</sup> ) <i>end</i> A1 <i>nup</i> G |
| BL21(Rep4)   | $\Delta$ ( <i>mcr</i> A)183 $\Delta$ ( <i>mcr</i> CB- <i>hsd</i> SMR- <i>mrr</i> ) 173 <i>end</i> A1 <i>sup</i> E44<br><i>thi</i> -1 <i>rec</i> A1 <i>gyr</i> A96 <i>rel</i> A1 <i>lac</i> (F' <i>pro</i> AB <i>lac</i> <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> ))                              |

### 2.2.2 Hefestämme (*S. cerevisiae*)

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme sind in Tabelle 2.5 aufgelistet. Die genetische Nomenklatur erfolgt nach Sherman (2002). Bei den CJY- und KMY-Stämmen handelt es sich um isogene Derivate von W303 Thomas und Rothstein (1989). Der *sec23-1* (*ts*) Hefestamm wurde ursprünglich von Peter Novick zur Verfügung gestellt. Der Paarungstyp der verwendeten Stämme ist *MAT a*. Für die Analyse der *Ist2*-Deletionsmutanten und *Ist2*-Punktmutanten wurden die Stämme CJY3 und MSY367 verwendet. Wildtyp BY4741 wurde bei der Kolo-kalisation von *Ist2* mit *Dpm1* und *Kex2* verwendet (Brachmann et al., 1998). Extrakt von JY25 wurde für den GST-Pulldown eingesetzt. JY25 ist ein Derivat des BY4741-Stamms.

**Tabelle 2.5: Hefestämme**

| Name              | relevanter Genotyp                                    | Herkunft                                  |
|-------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| CJY3              | <i>MATa ist2::HIS3MX6</i>                             | C. Jüschke                                |
| CJY39             | <i>MATa ist2::HIS3MX6, LEU2::pIST2-GFP-IST2</i>       | C. Jüschke                                |
| MSY363            | <i>MATa ist2::HIS3MX6, LEU2::pIST2-GFP-IST2 L942Q</i> | M. Seedorf                                |
| MSY367            | <i>MATa TRP1::pGAL1-HXT1-CFP sec23-1(ts)</i>          | M. Seedorf                                |
| KMY48             | <i>MATa she2::HIS3MX6 sec23-1(ts)</i>                 | diese Arbeit                              |
| KMY137            | <i>MATa ist2::HIS3MX6, scs2::KANMX4</i>               | diese Arbeit                              |
| JY25              | <i>MATa ist2::URA3 his3-1</i>                         | C. Jüschke                                |
| Hughes Kollektion | <i>MATa URA::CMV-tTA his3-1</i>                       | Hughes et al. (2000), BioCat (Heidelberg) |

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Molekularbiologische Methoden

#### Generelle Klonierungsstrategie

Für Klonierungen wurden die gewünschten DNA-Bereiche entweder direkt - falls vorhanden - aus Plasmiden geschnitten oder mittels Polymerase-Ketten Reaktion (PCR) aus einer auf dem YCp50 Shuttle-Vektor basierenden, chromosomalen *S. cerevisiae*-Genbibliothek (Rose et al., 1987) amplifiziert. Im Falle von PCR-Produkten erfolgte die Subklonierung über TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben. Die über Primer-Mutagenese eingeführten Schnittstellen wurden verwendet, um das gewünschte DNA-Fragment aus dem TOPO-Vektor zu schneiden und in den Ziel-Vektor zu klonieren. Zur Einführung von C-terminalen Punktmutationen in *IST2* wurden normalerweise Vorwärtsprimer mit einer *BamHI*-Schnittstelle und den ersten 22 Nukleotiden von *IST2* sowie ein langer Rückwärtsprimer verwendet, der mindestens 6 Nukleotide vor der eingeführten Mutation und eine *NheI*-Schnittstelle nach dem Stop-Codon von *IST2* enthielt.

## Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um DNA-Bereiche zu amplifizieren, wurden für Klonierungen standardmäßig eine Mischung aus Taq-DNA-Polymerase (Roche) und Pfu-Turbo<sup>®</sup>-DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) verwendet.

Ein Standard-PCR-Ansatz enthielt DNA (10-50 ng Plasmid oder 450 ng genomische Bibliothek), 2,5  $\mu$ l 10 x PCR Puffer, 2,5  $\mu$ l dNTPs (2,5 mM von jedem Nukleotid), 1  $\mu$ l Vorwärtsprimer (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l Rückwärtsprimer (10  $\mu$ M), 1  $\mu$ l Taq-DNA-Polymerase (Roche, 4 U/ $\mu$ l) und 1  $\mu$ l Pfu-Turbo<sup>®</sup>-DNA-Polymerase Turbo<sup>®</sup> (Stratagene, 2,5 U/ $\mu$ l). Mit Wasser wurde auf ein Volumen von 25  $\mu$ l aufgefüllt.

**Tabelle 2.6: Reaktionszyklen für T3 Thermocycler (Biometra):**

| Schritt | Vorgang              | Temperatur | Dauer                |
|---------|----------------------|------------|----------------------|
| 1       | Initialdenaturierung | 94°C       | 2 min                |
| 2       | Denaturierung        | 94°C       | 1 min                |
| 3       | Anlagerung           | 54°C       | 1 min                |
| 4       | Elongation           | 72°C       | 1 min/1000 nt        |
| 5       | Finale Elongation    | 72°C       | 4 min                |
| 6       | Kühlung              | 4°C        | bis zur Aufarbeitung |

Je nach benötigter Menge des PCR-Produktes wurden 20 bis 35 Wiederholungen von Schritt 2 bis 4 durchgeführt. Die Anlagerungstemperatur wurde in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide gewählt und lag zwischen 52 und 62°C. Sie wurde nach folgender Formel berechnet:  $T_m = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$ .

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt.

## Restriktionsverdau von DNA-Molekülen

Standardmäßig wurden für präparative und analytische Restriktionsverdaue ein Ansatz mit einem Volumen von 20  $\mu$ l hergestellt, der normalerweise 2  $\mu$ g DNA (ca. 4  $\mu$ l Plasmidlösung), 1  $\mu$ l Restriktionsenzym und den entsprechenden Puffer in Wasser enthielt. Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 37°C verdaut. Es wurden die von den Herstellern der Restriktionsenzyme empfohlenen Puffer verwendet. Sofern eine Kombination von Enzymen verwendet wurde, deren Puffer nicht kompatibel waren, wurde nach dem Verdau mit dem Nidrigsalzpuffer der DNA-Ansatz gefällt und anschließend mit dem zweiten Puffer verdaut. Bei präparativen Restriktionsverdauen wurde das Vektorrückgrat zusätzlich bei 37°C für 10 min mit 1  $\mu$ l alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um die Wahrscheinlichkeit einer Religation des geschnittenen Vektorrückgrats zu minimieren. Die verdauten DNA-Fragmente wurden anschließend mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt.

### **Fällung von DNA-Molekülen**

Zur Aufkonzentrierung von DNA-Molekülen oder zur Entfernung von Puffer- und Salzresten wurden die DNA-Moleküle gefällt. Zu 20  $\mu\text{l}$  wässriger DNA-Lösung wurden 2  $\mu\text{l}$  3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 100  $\mu\text{l}$  eiskaltes 96% Ethanol hinzugefügt. Nach mindestens 30-minütiger Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet einmal mit 100  $\mu\text{l}$  eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in Wasser resuspendiert.

### **Auftrennung von DNA-Molekülen mittels Agarosegel-Elektrophorese**

Die Agarosegel-Elektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach PCR-Reaktionen oder Restriktionsverdauen eingesetzt. Für die Herstellung eines Agarosegels (0,8% (w/v) Agarose) wurden 0,8 g Agarose mit 100 ml 1 x TAE in der Mikrowelle erhitzt um die Agarose vollständig zu lösen, auf ca. 50°C abgekühlt, mit 50  $\mu\text{g}$  Ethidiumbromid/50 ml Gel-Lösung versetzt und in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach Erkalten des Gels wurde der Kamm gezogen und das Gel mit 1 x TAE-Puffer (90 mM Tris-Acetate, pH 8,0 und 2 mM EDTA) überschichtet. Die Proben wurden mit 10 x DNA-Ladepuffer (0,1% Bromphenolblau, 50% Glycerin in TAE-Puffer) versetzt, in die Geltaschen pipettiert und bei 70 V aufgetrennt. Der interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid wurde dem Gel zugesetzt, um die DNA-Fragmente unter einem UV-Transilluminator (366 nm) als leuchtende Banden dokumentieren zu können. Die Größe der DNA-Fragmente konnte näherungsweise anhand eines mitgeführten DNA-Längenstandards (1 kb Leiter, Invitrogen) ermittelt werden.

### **Aufreinigung von DNA-Molekülen aus Agarosegelen**

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraktion/PCR Aufreinigung-Kits nach Angaben des Herstellers.

### **Konzentrationsbestimmung von DNA-Molekülen**

Die Konzentration von DNA-Molekülen erfolgte mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000. Für die Messung wurde 1  $\mu\text{l}$  unverdünnte DNA-Lösung verwendet und die Absorption bei 260 nm gemessen. Der Quotient aus  $A_{260/280}$  betrug etwa 2.

### **Ligation von DNA-Molekülen**

Für die Ligation von DNA-Molekülen wurden je 30 fmol aufgereinigte DNA-Fragmente verwendet. Ein Standardansatz von 10  $\mu\text{l}$  enthielt 1  $\mu\text{l}$  T4-DNA-Ligase (80 U), 1 x T4-Ligasepuffer und je 30 fmol DNA-Fragmente. Ligierte wurde über Nacht bei 16°C oder

für 4 h bei 20°C. Der Ligationsansatz wurde zur Entsalzung auf einer schwimmenden Nitrozellulose-Membran (Millipore, Bedford, MA, USA) mit 25 nm Porengröße für 60 min gegen Wasser dialysiert.

### **Auftrennung von RNA-Molekülen mittels Agarosegel-Elektrophorese**

Um die Qualität und Reinheit der synthetisierten RNA-Sonden für FISH zu überprüfen, wurde die RNA mit Hilfe von Agarosegelen analysiert. Zur Probenvorbereitung wurden 0,5 µl RNA, 3,5 µl DEPC-Wasser, 5 µl 2 x RNA-Ladepuffer und 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) für 10 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte auf einem 2% Agarosegel in TBE bei konstanter Spannung von 100 V. Die Qualität der RNA wurde im UV-Licht überprüft.

2 x RNA-Ladepuffer enthielt 2 x TBE, 30% Glycerin, 0,01% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol und 7 M Urea in DEPC-Wasser.

### **Phenol-Chloroform-Extraktion**

Zu der aufgereinigten RNA-Lösung wurde ein Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:49:1) hinzugefügt, die Probe gevortext und 5 min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumen eiskaltem 96% Ethanol versetzt und bei –20°C über Nacht gefällt. Nach 20 min Zentrifugation bei 4°C und 14000 rpm und Waschen mit 70%igem Ethanol wurde die DNA getrocknet, in DEPC-Wasser gelöst und die Konzentration photometrisch ermittelt.

### **Kultivierung von *E. coli*-Zellen**

Bakterienkulturen, die Plasmide mit Antibiotikaresistenz enthielten, wurden über Nacht in Luria-Bertani (LB) Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt und 1% NaCl) mit dem entsprechenden Antibiotikum (100 µl Ampicillin/ml Kultur bzw. 50 µl Kanamycin/ml Kultur) bei 37°C und 150 rpm zur Anzucht geschüttelt. Zur Proteinaufreinigung aus BL21-Zellen wurde eine *E. coli*-Kultur in 2YT-Medium (1,6% Trypton, 1% Hefeextrakt und 0,5% NaCl) mit zusätzlich 40 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2% Glukose und Antibiotikum bei 30°C und 150 rpm geschüttelt.

### **Herstellung von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen**

Zur Herstellung von elektrokompetenten Zellen wurde eine *E. coli*-Kultur in SOB (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl) bei 37°C und 150 rpm geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,8 erreicht war. Die Kultur wurde in Zentrifugationsbecher gefüllt,

10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 20 min, 3500 rpm und 4°C geerntet. Das Zellpellet wurde zwei- bis dreimal mit sterilem, eiskaltem 1,4% Glycerol (w/v) gewaschen, bis die Zeitkonstante bei einer Standard-Elektroporation 4,6 bis 4,8 ms betrug. Das Zellpellet wurde in 2 Volumen sterilem, eiskaltem 15% Glycerol (w/v) resuspendiert, in 110 µl Aliquots abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

### **Transformation von Bakterien mittels Elektroporation**

DNA wurde in Bakterien durch Elektroporation eingeschleust. Dafür wurden 50 µl elektrokompente *E. coli* in vorgekühlten Elektroporationsküvetten (2 mm Elektrodenabstand, Genetronics, San Diego, CA, USA) mit 2 µl DNA gemischt. Die Elektroporation wurde im Gene Pulser<sup>TM</sup> (Bio-Rad Laboratories, München) bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF durchgeführt und ergab eine Zeitkonstante von 4,6 bis 4,8 ms. Die Bakteriensuspension wurde mit 950 µl LB-Medium gemischt, in einem Eppendorfgefäß bei 37°C für 1 h geschüttelt, auf einer geeigneten Selektionsplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen (Mini- und Midipräparation)**

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden je nach benötigter DNA-Menge Mini- bzw. Midipräparationen durchgeführt. Für eine Ausbeute von < 20 µg wurde die DNA aus einer 5 ml Übernachtskultur unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) gewonnen, für eine Ausbeute von 20–100 µg aus einer 50 ml Übernachtskultur unter Verwendung des Nucleobond Kit von Macherey-Nagel (Düren). Die Anzucht erfolgte aus einer einzelnen *E. coli*-Kultur von einer Platte. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben der Hersteller.

### **Sequenzierung von DNA-Molekülen**

Die Sequenzierung von DNA-Molekülen wurde durch die Firmen MWG-Biotech (München) und 4Base Lab (Reutlingen) durchgeführt.

## **2.3.2 Mikrobiologische und genetische Methoden**

### **Kultivierung von *S. cerevisiae***

Hefe wurde in YEAP-Medium (1% Hefeextrakt, 2% Trypton) mit Zusatz von 2% Glukose oder Raffinose (bei Induktion mit Galaktose) bis zur gewünschten Dichte oder Wachstumsphase bei 25 oder 30°C herangezogen. Temperatursensitive Stämme wurden bei 25°C kultiviert. Die Selektion von Hefestämmen auf verschiedene genetische Marker oder Plasmide fand in Hartwell Complete (HC)-Medium Adams et al. (1997) statt. Zur Anlegung einer Dauerkultur wurde eine frisch auf einer Platte gewachsene Hefekultur in sterilem

87%igem Glycerin resuspendiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur späteren Anzucht aus dieser Dauerkultur wurde eine kleine Menge mit einer Impföse entnommen und auf einer geeigneten Platte ausgestrichen.

### Transformation von Hefe

Die Transformation von Hefe wurde nach der Lithium-Acetat-Methode von Gietz und Woods (2002) durchgeführt. Bei Transformation von temperatursensitiven Hefestämmen wurde der Transformationsansatz zuerst 30 min bei  $25^{\circ}\text{C}$  inkubiert, bevor der Hitzeschock für 10 min bei  $30^{\circ}\text{C}$  durchgeführt wurde. Für die Transformation von Hefestämmen in 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden die verschiedenen Hefestämme von einer frischen Plattenkultur mittels eines Replikators in eine Mikrotiterplatte überstempelt, die  $150\text{ }\mu\text{l}$  steriles Wasser enthielt. Nach Zentrifugation der Mikrotiterplatte für 10 min bei 3600 rpm und Raumtemperatur wurde der Überstand mit einer schnellen Handbewegung abgeschüttet und die Hefezellen mit  $50\text{ }\mu\text{l}$  eiskaltem Transformationsmix (300 mM Lithiumacetat, 0,8 mg/ml ssDNA, 30 ng Plasmid-DNA in Wasser) versetzt. Um die Hefezellen im Transformationsmix zu resuspendieren, wurde die Mikrotiterplatte auf einem Schüttler befestigt und für 2 min bei 400 rpm geschüttelt. Anschließend wurden pro Hefestamm  $100\text{ }\mu\text{l}$  PEG 3350 (50% w/v) hinzugefügt. Nach weiterem 5-minütigem Schütteln bei 400 rpm wurde die Mikrotiterplatte seitlich mit Parafilm verschlossen und 3–4 h bei leichtem Schütteln bei  $42^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach dem Hitzeschock wurden der Transformationsmix für 10 min bei 3600 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert und die Hefezellen in Selektionsmedium resuspendiert. Nach 24 h Inkubation bei  $30^{\circ}\text{C}$  wurden die Kulturen auf Selektionsplatten überstempelt und weiterhin bei  $30^{\circ}\text{C}$  inkubiert, bis transformierte Kolonien erkennbar waren.

### PCR-basierte Genmodifikation

Das genomische Ausschalten von *Scs2* für den Stamm KMY137 wurde mit den Primern KM82 und KM83 nach der Methode von Janke et al. (2004) durchgeführt. Die Überprüfung des Stamms erfolgte mittels Western Blot und spezifischen *Scs2*-Antikörpern. Der Stamm KMY48 ( $\Delta she2 sec23-1$ ) wurde nach dem Protokoll von Baudin et al. (1993) generiert, indem ca.  $1\text{ }\mu\text{g}$  eines PCR-Produkt mittels Standard-PCR in einen *sec23-1* Hefestamm transformiert wurde. Dabei wurden die Primer KM48 und KM49 mit einer Anlagerungstemperatur von  $61^{\circ}\text{C}$  und das Plasmid pFA6a-HIS3MX6 als Matrize verwendet (Janke et al., 2004). Die Überprüfung des Stamms erfolgte mittels Hefe-Kolonie-PCR.

### Hefe-Kolonie-PCR

Zur Überprüfung des Stamms KMY48 ( $\Delta she2 sec23-1$ ) wurde eine Hefe-Kolonie-PCR durchgeführt. Dabei wurde eine kleine Menge einer frischen Hefekultur in  $10\text{ }\mu\text{l}$  Zymolyasepuffer (1,2 M Sorbitol in 100 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) resuspendiert und für 30 min

bei 37°C verdaut. Von diesem Ansatz wurde 1 µl als Matrize in einer Standard-PCR zusammen mit den Primern KM40 und KM41 verwendet.

### **Indirekte Immunfluoreszenz**

#### **verwendete Lösungen:**

- Puffer B: 1,2 M Sorbitol in PBS
- Puffer P: PBS, 1% (w/v) BSA, 0,05% Natriumazid
- Puffer T: PBST (1% Tween in PBS), 1% (w/v) BSA

Hefezellen wurden in raffinosehaltigem Medium bei 25°C bis 0,2 - 0,4 OD<sub>600</sub> kultiviert und anschließend mit Galaktose für 40 min induziert. Anschließend wurden entweder 100 µg/ml Zykloheximid oder 2% Glukose hinzugefügt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit 3,7% (v/v) methanolfreiem Formaldehyd für 1 h bei 25°C fixiert. Nach einem Waschschrift mit eiskaltem Puffer B (2 min 4000 × g bei 4°C) wurden die Hefezellen zuerst für 10 min bei 30°C in 500 µl Puffer B mit 0,3% (v/v) β-Mercaptoethanol, anschließend für 30 min in Puffer B mit 0,9 mg/ml Zymolyase 20T (Seikagaku, Tokyo, Japan) inkubiert. Die Sphäroblasten wurden einmal mit Puffer B gewaschen (2 min 2000 × g bei 4°C), anschließend in geringer Menge Puffer B resuspendiert und auf Objektträger (neolab-Diagnostica, 8 Zählfelder) pipettiert, die vorher mit 0,02% Poly-L-Lysin beschichtet wurden. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C wurde der Objektträger einmal 5 min mit Puffer B gewaschen um ungebundene Hefezellen zu entfernen, mit 70% Ethanol über Nacht bei -20°C dehydriert und einmal 5 min mit Puffer B gewaschen. Zur Permeabilisierung der Hefezellen wurde der Objektträger für 5 min mit 0,5% NP-40 (v/v) inkubiert und dreimal 5 min mit Puffer B gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (anti-HA, 1:3 000) erfolgte für 2 h in Puffer P. Nach zwei Waschschriften (je 5 min) mit Puffer T und einem 5-minütigem Waschschrift mit Puffer P wurden die Hefezellen mit dem sekundären Antikörper (Ziege-anti-Maus-AlexaFluor488, 1:400) in Puffer P für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschriften (je 5 min) mit Puffer P wurden die Zellkerne für 10 min mit 100 ng/ml 496-Diamido-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI) in PBS angefärbt, die Zählfelder einmal 5 min mit Puffer P gewaschen und mit 80% Glycerin in PBS eingedeckt. Um ein Austrocknen der Proben zu verhindern, wurde der Rand des Deckgläschens mit Nagellack abgedichtet.

### **Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und indirekte Immunfluoreszenz (IF) in Hefe**

#### **Verwendete Lösungen:**

Alle Lösungen wurden in DEPC-behandeltem RNase-freiem Wasser angesetzt.

- Oxalytikase: 50 µl Aliquots von 2mg/ml Oxalytikase (in 20mM Kaliumphosphat, pH 7,5) in einer Vakuumzentrifuge trocknen und bei -20°C lagern.
- 1,4 x Puffer B: 1,7 M Sorbitol in 140 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4

- Sphäroblastierpuffer: 720  $\mu$ l 1,4 x Puffer B, 3,5  $\mu$ l AEBSF, 100  $\mu$ l VRC, 3  $\mu$ l RNasin, 2  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol und 171,5  $\mu$ l DEPC-Wasser
- Puffer P: PBS, 1% (w/v) BSA, 0,05% Natriumazid
- Puffer T: PBST (1% Tween in PBS), 1% (w/v) BSA
- HybMix: 20 ml 100% Formamid (Calbiochem), 10 ml 20 x SSC, 400  $\mu$ l 500mM EDTA (pH 8), 400  $\mu$ l 10% Tween, 800  $\mu$ l 50 x Denhardt's, 400  $\mu$ l 10% CHAPS, 400  $\mu$ l tRNA (10mg/ml, Roche), 400  $\mu$ l H. sperm. (10mg/ml), 400  $\mu$ l Heparin (10mg/ml) und 6,8 ml DEPC-Wasser.
- Puffer A: PBS, 10% FCS, 0,1% Triton
- Puffer C: PBS, 0,1% BSA

### Herstellung der RNA-Sonden

Für die *In-vitro*-Transkription mit dem T7-Mega-Shortscript-Kit (Ambion) wurden als Matrize vier verschiedene, ca. 250 nt lange PCR-Fragmente von *Ist2* eingesetzt, die mit den folgenden Primern hergestellt wurden: IST2-1450-F und IST2-T7p-1690-R, IST2-780-F und IST2-T7p-1030-R, IST2-1950-F und IST2-T7p-2200-R, IST2-2450-F und IST2-T7p-2700-R. Die PCR-Fragmente waren so gewählt, dass die Sonden über den kodierenden Bereich von *IST2* verteilt waren. Der GC-Gehalt der Sonden war über 50% und die Schmelztemperatur lag oberhalb von 60°C. Der Reaktionsansatz für die *in-vitro*-Transkription enthielt:

2  $\mu$ l PCR-Produkt; 1,5  $\mu$ l ATP (75 mM); 1,5  $\mu$ l CTP (75 mM); 1,5  $\mu$ l GTP (75 mM); 1,2  $\mu$ l UTP (75m M); 2  $\mu$ l DIG-UTP (10 mM); 2 $\mu$ l 10x Transkriptionspuffer; 2  $\mu$ l T7-Enzym-Mix und 6,3  $\mu$ l DEPC-Wasser. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurde 1  $\mu$ l DNase (2 U/ $\mu$ l) hinzugefügt und dieser Ansatz für 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Auftrennung auf einem RNA-Agarosegel wurden die RNA-Banden mit Hilfe des Mini Quick Spin RNA Columns Kit aufgereinigt, mit Phenol-Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt. Die RNA-Sonden wurden mit DEPC-Wasser auf 100 ng/ $\mu$ l verdünnt.

### FISH und IF

Hefezellen wurden bis ca. 0,3 OD<sub>600</sub> in YEAP-Medium angezogen, 1 h bei 30°C mit 3,7% (v/v) Formaldehyd fixiert und zweimal mit Puffer B gewaschen (2 min 2500 rpm). 1 ml Sphäroblastierpuffer wurde zu einem Aliquot der Oxalyticase pipettiert, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und kurz gevortext. Die Hefezellen wurden in 200  $\mu$ l dieser Oxalytikaselösung resuspendiert, 10 min bei 30°C inkubiert, anschließend einmal mit Puffer B gewaschen (2 min 2500 rpm), in geringer Menge Puffer B resuspendiert und auf Objektträger (neolab-Diagnostica, 8 Zählfelder) pipettiert, die vorher mit 0,02% Poly-L-Lysin beschichtet wurden. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C wurde der Objektträger einmal 2 min mit Puffer B gewaschen, um ungebundene Hefezellen zu entfernen, und mit 70% Ethanol mindestens 45 min bei -20°C dehydriert. Der Objektträger wurde mit 5 x SSC für 5 min rehydriert und 1 h bei Raumtemperatur prähybridisiert. Der RNA-Sondenmix wurde mit HybMix auf eine Endkonzentration von 5 ng/ $\mu$ l verdünnt und ca. 10  $\mu$ l auf jedes Zählfeld des Objektträgers pipettiert. Mit großem Deckglas abgedeckt

fand die Inkubation über Nacht bei 37°C statt. Der Objektträger wurde für 15 min bei 37°C mit warmem 2 x SSC gewaschen, zweimal für 15 min bei Raumtemperatur mit Puffer A gewaschen und mit den ersten Antikörpern (Maus-anti-Digoxigenin) in Puffer A für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 1 min) mit Puffer C wurde der Objektträger für 1 h bei Raumtemperatur mit sekundären Antikörpern (Huhn-anti-Maus-Alexa Fluor 488, Kaninchen-anti-Ist2,) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (je 1 min) mit Puffer C wurde der Objektträger für 1 h bei Raumtemperatur mit tertiären Antikörpern (Esel-anti-Huhn-Alexa Fluor 488, Ziege-anti-Kaninchen-Alexa Fluor 594) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (je 1 min) mit Puffer C wurden die Zellkerne für 10 min mit 100 ng/ml DAPI in PBS angefärbt, die Zähhfelder einmal 1 min mit Puffer C gewaschen und 80% Glycerin in PBS eingedeckt.

### **2.3.3 Proteinbiochemische Methoden**

Arbeiten mit Proteinen wurden - soweit nicht anders angegeben - bei 4°C oder auf Eis durchgeführt.

#### **Hefegesamtzellextrakt mit NaOH-Lyse und TCA-Fällung**

Für die alkalische Membranlyse wurden 1-5 OD<sub>600</sub> mit 150 µl 1,85 M NaOH und 7,5% β-Mercaptoethanol versetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150 µl 55% Trichloressigsäure (TCA) und 1 ml kaltes A. bidest. hinzugefügt. Nach mindestens 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden, um die denaturierten Proteine zu präzipitieren, die Proben 10 min bei 15600 × g bei 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde einmal mit 20 mM Tris (pH7,4) und 80% Aceton gewaschen und anschließend in HU-Puffer (8 M Harnstoff, 5% SDS, 200 mM Tris pH 6,8, 1 mM EDTA, 0,02% Bromphenolblau und 4% β-Mercaptoethanol) resuspendiert und für 10 min bei 50°C erhitzt.

#### **Fällung von Proteinen mit TCA**

Für die Fällung von Proteinextrakten aus Hefezellen wurde der Extrakt mit einem Volumen 20% TCA (bzw. 20% TCA und 80% Aceton, sofern Detergens im Extrakt enthalten war) versetzt. Nach mindestens 10-minütiger Inkubation auf Eis, um die denaturierten Proteine zu präzipitieren, wurden die Proben 10 min bei 15600 × g bei 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde einmal mit 20 mM Tris (pH7,4) und 80% Aceton gewaschen und anschließend in HU-Puffer resuspendiert und für 10 min bei 50°C erhitzt.

#### **Fällung von Proteinen mit Isopropanol**

Für die Fällung von Proteinextrakten aus Hefezellen wurde der Extrakt mit dem 20-fachen Volumen Isopropanol versetzt und mindestens 30 min auf Eis inkubiert, um die Proteine

zu fällen. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei  $15600 \times g$  bei  $4^\circ\text{C}$  wurde das Pellet in HU-Puffer resuspendiert.

### **Membranextrakt von Hefezellen, Zellaufschluss mit Glasperlen**

Alle Arbeiten wurden auf Eis oder bei  $4^\circ\text{C}$  durchgeführt. Für die Herstellung von Membranextrakten für Immunpräzipitation wurden logarithmisch wachsende Hefezellen geerntet. Zu einem Volumen Hefezellen wurden ein Volumen Glasperlen und zwei Volumina Aufschlusspuffer (PBS, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, CPIM, 1 mM PMSF) gegeben. Dies wurde dreimal 1 min gevortext und dazwischen auf Eis inkubiert. Durch 1-minütige Zentrifugation bei  $1200 \times g$  wurden nicht aufgeschlossene Hefezellen abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend 20 min bei  $25000 \times g$  zentrifugiert. Das erhaltene Membranpellet wurde für Immunpräzipitationen oder weitere biochemische Analysen verwendet oder in HU-Puffer (8 M Harnstoff, 5% SDS, 200 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 mM EDTA, 4%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,025% Bromphenolblau) resuspendiert und mittels SDS-PAGE analysiert. Für GST-Pulldown Versuche wurden die Zellen in 50 mM Tris, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, CPIM und 1 mM PMSF aufgeschlossen. Das restliche Verfahren entsprach obigem Protokoll.

### **Carbonatextraktion von Membranproteinen**

Zur Analyse von integralen oder peripheren Membranproteinen wurde ihr unterschiedliches Laufverhalten in Hochsalz- und Carbonat-Puffern genutzt. Membranassoziierte Proteine können in diesen zwei Puffern solubilisiert werden, während integrale Membranproteine erst durch Zusatz von Detergens in Lösung gehen. Zur Analyse wurden Aliquots eines Membranextraktes (siehe Membranextrakt von Hefezellen, Zellaufschluss mit Glasperlen) in Extraktions-Puffer (20 mM HEPES-KOH pH 7,6, 0,1 M Kaliumacetat, 5 mM Magnesiumacetat, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF, CPIM), in Hochsalz-Puffer (Extraktions-Puffer mit 0,6 M Kaliumacetat), in Carbonat-Puffer (Extraktionspuffer mit 0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  pH 10,5) oder in Triton-Puffer (Hochsalz-Puffer mit 2% Triton X-100) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation bei  $100\,000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  in einem TLA100.3 Rotor (Beckman, Fullerton, CA, USA) wurden die Überstände und Pellets mit 20% TCA und 80% Aceton gefällt (siehe Fällung von Proteinen mit TCA) und die Proteinverteilung im Überstand versus Pellet mittels Western Blot analysiert.

### **Proteinexpression und Proteinaufreinigung von rekombinantem GST und GST-Ist2C in BL21-*E. coli***

Um Proteine in Bakterien zu exprimieren und anschließend aufzureinigen, wurden *E. coli*-BL21 mit den Expressionsplasmiden pKM34 bzw. pKM37 transformiert. Eine 1 l-Kultur wurde bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,4 mit 100  $\mu\text{M}$  Isopropylthiogalactosid (IPTG) versetzt, um

die Expression von GST bzw. des Fusionsproteins GST-Ist2C zu induzieren. Die Kultur wurde für weitere 2,5 h bei 30°C geschüttelt. Direkt vor der Ernte der Zellen wurde dem Kulturmedium 0,1 mM PMSF zugegeben, bevor die Kultur bei 8 min und 4500 rpm abzentrifugiert wurde. Das Zellpellet wurde in eiskaltem Lysepuffer (50 mM Tris pH7,5, 250 mM NaCl, 2 mM Imidazol pH7,5, 0,5 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 0,1 mM PMSF) resuspendiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Probe wurde zügig in handwarmem Wasser aufgetaut. Während des Auftauens wurde 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol frisch zugegeben. Die Proben wurden auf Eis gelagert und  $3 \times 2$  min sonifiziert (40% *duty cycle*, 8 *output control*) und bei  $140\,000 \times g$  30 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  in einem TL45-Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde zu bereits mit Lysepuffer äquilibrierter Ni-EDTA-Sepharose (D. Görlich) gegeben (ca. 3 ml Sepharosevolumen) und 1 h bei  $4^{\circ}\text{C}$  unter langsamem Rotieren inkubiert. Nach Zentrifugation für 2 min bei 1000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  wurde der Überstand als Reserve aufgehoben: in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Sepharosematrix wurde in eine Säule transferiert und zweimal mit kaltem Lysepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in 300  $\mu\text{l}$ -Schritten (1/10 des Matrixvolumens) mit Elutionspuffer (3 Volumen Lysepuffer, 1 Volumen Imidazol, Endkonzentration Imidazol von 250 mM, pH7,5). Je 0,5  $\mu\text{l}$  der Aliquots wurden auf eine Nitrozellulosemembran pipettiert und der Proteingehalt mit Amidoschwarz analysiert. Von den Aliquots mit der höchsten Proteinmenge wurden 5  $\mu\text{l}$  mit Probenpuffer (330 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Bromphenolblau und 10% (w/v) Glycerin) versetzt, auf einem SDS-Gel separiert und mit Coomassiefärbung analysiert. Die reinsten Proben mit der höchsten Proteinmenge wurden auf eine PD-10 Entsalzungssäule (Amersham Biosciences, Freiburg) pipettiert, die vorher mit PBS äquilibriert wurde. Gesammelt wurden  $8 \times 500 \mu\text{l}$  Aliquots, deren Proteingehalt wieder mit Amidoschwarz bestimmt wurde. Diejenigen Aliquots mit dem höchsten Proteingehalt wurden vereinigt. Die Proteinkonzentration wurde photometrisch mittels Absorption bei 280 nm und anhand von Protean (DNA Star Software) ermittelt (Gill und von Hippel, 1989). Zur Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  wurden die Proben mit einer Endkonzentration von 250 mM Sucrose versetzt.

### **GST-Pulldown**

Für GST-Pulldown Versuche wurden je 630 pmol GST oder GST-Ist2C mit Glutathion (GSH)-Sepharose und einem cytosolischen Hefeextrakt inkubiert. Der cytosolische Hefeextrakt wurde hergestellt, indem der Überstand einer  $25000 \times g$  Zentrifugation (siehe Membranextrakt von Hefezellen, Zellaufschluss mit Glasperlen) von 700 OD<sub>600</sub> Hefezellen (JY25) verwendet wurde. Nach 60 min Inkubation bei  $4^{\circ}\text{C}$  wurden die Sepharosematrix mit den folgenden Puffern gewaschen und die gebundenen Proteine eluiert:

1. Schritt 10 ml 50 mM Tris, 50 mM NaCl
2. Schritt 500  $\mu$ l 50 mM Tris, 50 mM NaCl, 10 mM ATP
3. Schritt 500  $\mu$ l 50 mM Tris, 500 mM NaCl
4. Schritt 2 x 30  $\mu$ l 50 mM Tris, 5 mM  $MgCl_2$
5. Schritt 10  $\mu$ l Wasser, mit  $MgCl_2$  Eluat vereinigen

Die gesammelten Waschüberstände wurden mit TCA (siehe Fällung von Proteinen mit TCA) und das  $MgCl_2$ -Eluat mit Isopropanol (Fällung von Proteinen mit Isopropanol) gefällt. Anschließend wurden die Proben mit 30  $\mu$ l Probenpuffer (330 mM Tris-HCl, pH6,8, 2% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS, 0,1% (w/v) Bromphenolblau und 10% (w/v) Glycerin) versetzt und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE separiert und mit Coomassiefärbung analysiert.

### **Affinitätschromatographische Aufreinigung von Kaninchenserum**

Das rekombinant hergestellte und aufgereinigte GST-Ist2C Fusionsprotein wurde zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Die Immunisierung wurde von Charles River GmbH (Kißlegg) ausgeführt. Das erhaltene Kaninchenserum wurde anschließend affinitätschromatographisch gereinigt, um die Spezifität der Antikörper zu erhöhen und Kreuzreaktivität zu minimieren. Dabei wurde die spezifische Bindung von Antikörpern an das entsprechende Antigen genutzt. Die Aufreinigung erfolgte über eine GST- und eine GST-Ist2C-gekoppelte Säulenmatrix.

Die Kopplung von rekombinantem GST bzw. GST-Ist2C an SulfoLink (Pierce, Bonn) fand bei Raumtemperatur statt. Die rekombinant hergestellten Proteine wurden zuerst unter Zugabe von 20 mM DTT und 1 mM EDTA in PBS für 60 min reduziert, um die Bindung an SulfoLink zu ermöglichen. Da freie SH-Gruppen die Bindungsreaktion stören, wurden die Proben anschließend über eine PD-10 Entsalzungssäule aufgereinigt. Die Elution von der PD-10 Säule erfolgte mit PBS, 1 mM EDTA. Die 300  $\mu$ l Fraktionen wurden mit Amidoschwarz auf Proteingehalt und mit Ellmanns Reagenz (4 mg/ml Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) in PBS) auf freie SH-Gruppen geprüft. Amidoschwarz-positive und Ellmanns Reagenz-negative Fraktionen wurden auf eine Säule pipettiert, die äquilibrierte SulfoLink Matrix enthielt (2 ml 50% SulfoLink, gewaschen mit 2 x 10 ml Wasser und 1 x 2 ml PBS, 1 mM EDTA). Sowohl reduziertes Protein wie auch das gewaschene Säulenmaterial ist nicht stabil, daher muss die Kopplung des Proteins an die Matrix zügig geschehen. Für die Kopplung wurde die Säule geschlossen und die Matrix mit dem Puffer vorsichtig durch Invertieren vermischt. Daraufhin wurde die Proteinlösung zuerst zweimal auf die Säule appliziert und anschließend 30 min mit der Matrix inkubiert. Die Matrix wurde mehrmals mit den folgenden Lösungen gewaschen: 1 x 20 ml PBS, 1 x 10 ml 0,2 M Glycin/HCl pH2,2 und 1 x 10 ml PBS.

Das Kaninchenserum (50 ml) wurde zuerst zweimal auf die Säulenmatrix der GST-gekoppelten Säule appliziert, um die Anzahl der GST-spezifischen Antikörper zu minimieren.

Dieser Durchfluss wurde anschließend zweimal auf die Säulenmatrix der GST-Ist2C-gekoppelten Säule appliziert, um die Ist2-spezifischen Antikörper zu erhalten. Der Durchfluss wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach Waschen der Säulenmatrix mit  $2 \times 50$  ml PBS wurden die Antikörper der GST-Ist2C-gekoppelten Säule mit  $3 \times 5$  ml 0,1 M Glycin/HCl pH2 in Falcons eluiert, in die vorher zur Neutralisation 2 ml 2 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  vorgelegt worden war. Das Eluat wurde mit einer Endkonzentration von 60% Ammoniumsulfat versetzt, über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  präzipitiert und 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in einer geringen Menge des Überstandes aufgenommen und bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Antikörper der GST-gekoppelten Säule wurden eluiert, die Säule genau wie die GST-Ist2C-gekoppelte Säule mit PBS gewaschen und in einer Lösung aus PBS und 30% igem Ethanol bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Aliquots des jeweiligen Durchflusses und die erhaltenen aufgereinigten Antikörper wurden mittels Western Blot auf Spezifität geprüft.

### **Immunpräzipitation von Ist2**

Immunpräzipitationen von Ist2 wurden nach dem folgenden Standardprotokoll durchgeführt. Variationen sind an den entsprechenden Stellen vermerkt. Alle Arbeiten wurden auf Eis oder bei  $4^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Membranextrakt ( $25000 \times g$  Pellet) von Hefezellen (siehe Membranextrakt von Hefezellen, Zellaufschluss mit Glasperlen) wurde in Puffer S (PBS, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, CPIM, 1 mM PMSF) resuspendiert, der zusätzlich entweder 2% Digitonin oder 1% Triton X-100 und 100 mM NaCl enthielt. Um die Membranen zu solubilisieren, wurden die Proben 30 min auf Eis inkubiert und mehrfach kurz gevortext. Nach 20 min Zentrifugation bei  $25000 \times g$  wurden die solubilisierten Membranen (im Überstand) in Mobicols überführt. Dazu wurden 30  $\mu\text{l}$  mit PBS gewaschene ProteinA-Sepharose (1:2 Puffer-Sepharosegemisch) und 2,5–4  $\mu\text{l}$  Ist2-Antikörper hinzugefügt. Nach 2 h Inkubation bei  $4^{\circ}\text{C}$  wurde die ProteinA-Sepharose dreimal mit Puffer S und Detergens (ohne Proteaseinhibitoren) gewaschen und einmal mit Puffer S ohne Detergens (ohne Proteaseinhibitoren). Anschließend wurde die Sepharose mit HU-Puffer mit 15%  $\beta$ -Mercaptoethanol bei  $50^{\circ}\text{C}$  für 10 min inkubiert. Für die Immunpräzipitation von Myc-Ist2 wurden die Membranen mit Puffer S resuspendiert, der zusätzlich 1% Triton X-100 enthielt. Die solubilisierten Proteine wurden mit 10  $\mu\text{g}$  Myc-Antikörper immunpräzipitiert.

### **SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich Proteine ihrer Größe nach auftrennen. Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass sich negativ geladene SDS-Moleküle in einem konstantem Ladungs- zu Masseverhältnis an die Proteine anlagern und so die Eigenladung der Proteine überdecken. Durch die denaturierende Wirkung von SDS und durch vorherige Reduktion durch  $\beta$ -Mercaptoethanol im HU-Puffer werden Protein-Protein-Wechselwirkungen verhindert. Die

SDS-Protein-Komplexe unterscheiden sich somit nur noch durch ihre Größe. Im elektrischen Feld wandern diese Komplexe durch die poröse Polyacrylamidmatrix zum Pluspol. Es wurden 7,5 und 10%ige denaturierende SDS-Polyacrylamidgele verwendet (Laemmli, 1970). Die Zusammensetzung der Gel-Lösungen sind in Tabelle 2.7 dargestellt. Zur Probenvorbereitung wurde die Proteinlösung mit HU-Puffer (8 M Harnstoff, 5% SDS, 200 mM Tris pH6,8, 1 mM EDTA, 0,025% Bromphenolblau und 4%  $\beta$ -Mercaptoethanol) versetzt und 10 min bei 50°C denaturiert und solubilisiert. Anschließend wurden die Proben in die Geltaschen des Sammelgels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 55 mA und unbegrenzter Voltzahl in Elektrophoresepuffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1% (v/v) SDS). Als Proteinreferenzmarker wurde Sigma *High Molecular Weight* (HMW) Marker verwendet, um die Größe der Proteine abzuschätzen. Sobald die Lauffront die untere Kante des Gels erreicht hatte, wurden die Proteine entweder mit Coomassie oder Silber angefärbt oder mittels Western Blot detektiert.

**Tabelle 2.7: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele**

|                                  | 7,5% Trenngel | 10% Trenngel | 4% Sammelgel |
|----------------------------------|---------------|--------------|--------------|
| H <sub>2</sub> O                 | 13,25 ml      | 11,2 ml      | 9 ml         |
| 0,5 M Tris-HCl pH6,8             | —             | —            | 3,75 ml      |
| 2 M Tris-HCl pH8,8               | 5,00 ml       | 5,00 ml      | —            |
| 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid | 6,25 ml       | 8,3 ml       | 2 ml         |
| 10% SDS                          | 250 $\mu$ l   | 250 $\mu$ l  | 150 $\mu$ l  |
| 10% APS                          | 200 $\mu$ l   | 200 $\mu$ l  | 150 $\mu$ l  |
| TEMED                            | 20 $\mu$ l    | 20 $\mu$ l   | 15 $\mu$ l   |

## Western Blot

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran mit dem halbtrockenen Verfahren Kyhse Andersen (1984) und anschließender Detektion mit Antikörpern.

Neun Stücke Whatmanpapier (GB 002, Schleicher und Schüll, Dassel) und eine Nitrozellulose-Membran (Protran BA85, Porengröße 0,45  $\mu$ m, Schleicher und Schüll) wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Die Nitrozellulose-Membran wurde in Anodenpuffer II (25 mM Tris, 10% Methanol) und das Gel in Kathodenpuffer (25 mM Tris, 40 mM 6-Aminohexansäure, 10% Methanol) äquilibriert. Der Blot wurde wie folgt aufgebaut: Auf die Anode der Blot-Apparatur (BioRad Laboratories, München) wurden drei Lagen Chromatographiepapier gelegt, die in Anodenpuffer I (300 mM Tris, 10% Methanol) eingeweicht waren. Darauf folgten drei Lagen Chromatographiepapier in Anodenpuffer

II, die Nitrozellulose-Membran, das Gel und drei Lagen Chromatographiepapier, welche mit Kathodenpuffer eingeweicht waren. Auf den Blot wurde die Kathode der Blot-Apparatur gelegt. Der Transfer erfolgte bei  $1 \text{ mA/cm}^2$  Membranfläche für 1,5 -2 h. Die Transfereffizienz konnte mit einer reversiblen Färbung durch Ponceau S (0,5% Ponceau S, 2% Essigsäure) abgeschätzt werden (Salinovich und Montelaro, 1986). Nach Entfärben der Membran mit Wasser erfolgte die Immundetektion (Towbin et al., 1979). Dazu wurde die Membran für 30 min in Blockierungslösung (5% Magermilchpulver, 0,5% Tween-20 in PBS) geschwenkt, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Weitere 60 min wurde die Membran mit der entsprechenden Primärantikörperlösung (primärer Antikörper verdünnt mit Blockierungslösung, siehe Tabelle 2.1.4) inkubiert, dreimal 5 min mit PBS gewaschen und für 30 min in Sekundärantikörperlösung (Peroxidase-gekoppelte Antikörper verdünnt mit Blockierungslösung, siehe Tabelle 2.1.4) gelegt. Nach weiteren dreimal 5 min Waschschritten mit PBS erfolgte die Detektion mit *BM Chemiluminescence Blotting System* (Roche) nach Angaben des Herstellers. Die Detektion der Signale erfolgte mit Super RX Röntgenfilmen (Fujifilm, Düsseldorf).

Um anschließend die Membran mit einem anderen Primärantikörper hybridisieren zu können, müssen vorher die alten Antikörper von der Membran entfernt werden. Dafür wurde die Membran einmal mit PBS gewaschen und anschließend in 80°C warmem Strip-Puffer (62,5 mM Tris pH6,8, 2% SDS und 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) für 30 min inkubiert. Nach fünfmal 5 min Waschen mit PBS wurde die Membran mit Blockierungslösung inkubiert. Anschließend erfolgte das restliche Protokoll eines Western Blots wie oben ab Inkubation mit Blockierungslösung beschrieben.

### **Detektion von Proteinen mittels Coomassie-Färbung**

Um Proteinbanden mittels Coomassie-Färbung zu detektieren, wurden die Proben zuerst durch SDS-PAGE separiert. Das Gel wurde anschließend in Coomassie-Färbelösung (0,25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue S250 in 40% (v/v) Ethanol und 10% (v/v) Essigsäure) gelegt. Das Gel wurde in dieser Färbelösung mindestens 30 min inkubiert, bevor es durch mehrmaliges Waschen mit Wasser entfärbt wurde. Für die Detektion der Proben des GST-Pulldown-Versuchs wurde das Gel mit kolloidaler Coomassie-Färbelösung (Novex Elektrophorese, Frankfurt am Main) nach Angaben des Herstellers behandelt.

### **Silberfärbung**

Um Proteinbanden mittels Silberfärbung zu detektieren und anschließend massenspektroskopisch untersuchen zu können, wurden die Proben zuerst durch SDS-PAGE separiert. Das Gel wurde 30 min in Fixierlösung (100 ml Essigsäure, 400 ml vergälltes Ethanol und 400 ml Wasser) inkubiert, zweimal mit Wasser gewaschen und mit Farmer Reducer-Lösung (eine Spatelspitze Kaliumhexacyanoferrat III, eine Spatelspitze Natriumthiosulfat in 250 ml Wasser) sensitiviert. Nach zweimal 5 min Waschen mit Wasser wurde das Gel in

Silberlösung (0,1%  $\text{AgNO}_3$ ) gefärbt, zweimal 30 sec mit Wasser gewaschen, 1 min in Natriumcarbonatlösung (2,5%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) äquilibriert und in Formaldehydlösung (0,1% Formaldehyd (v/v) in Natriumcarbonatlösung) inkubiert, bis Banden erschienen. Die Färbereaktion wurde durch Abschütten der Formaldehydlösung und Zugabe von 5% Essigsäure beendet. Nach ca. 15 min in Essigsäure wurde das Gel in Wasser gelagert.

### 2.3.4 Mikroskopie

Lebende Hefezellen wurden in einer kleinen Menge Medium resuspendiert, wovon ca. 1  $\mu\text{l}$  auf einen Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas vorsichtig bedeckt wurde, um die Zellen nicht mechanisch zu zerstören.

Die Anregungs- und Emissionsspektren der verwendeten fluoreszierenden Proteine sind in Tabelle 2.8 aufgelistet.

**Tabelle 2.8: Fluoreszierende Protein**

| Protein    | Anregungsmaximum | Emissionsmaximum | Referenz                 |
|------------|------------------|------------------|--------------------------|
| yEmCitrine | 516 nm           | 529 nm           | Sheff und Thorn (2004)   |
| yEmCFP     | 433 nm           | 475 nm           | Sheff und Thorn (2004)   |
| yEGFP3     | 488 nm           | 507 nm           | Niedenthal et al. (1996) |
| mCherry    | 587 nm           | 610 nm           | Shaner et al. (2004)     |

Quelle: <http://neuroscience.wustl.edu/nonetlab/ResearchF/AllFPs.htm>

Aufnahmen von YFP- und CFP-exprimierenden Hefezellen sowie von Immunfluoreszenz-Versuchen wurden an einem inversen Mikroskop (Leica DM IRE2, Leica, Bensheim) mit einem Ölimmersionsobjektiv (HCX PL APO CS 100/1,4 0,7, Leica, Bensheim) und einer Digitalkamera (ORCA ER CCD Kamera, Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee) durchgeführt. Als Software wurde Openlab 5.0.2 von Improvision (Heidelberg) verwendet. Aufnahmen von GFP- und mCherry-exprimierenden Hefezellen wurden an einem Weitfeld Epifluoreszenz Mikroskop (Axio Imager.A1, Carl Zeiss MicroImaging, Inc., Jena) mit einem plan-Fluar 100/1,45 Ölimmersionsobjektiv (Carl Zeiss MicroImaging, Inc., Jena) und einer Digitalkamera (Cascade:1K, Photometrics, Ottobrunn) durchgeführt. Als Software wurde MetaMorph 6.3r2 (Universal Imaging Corp., Sunnyvale, CA, USA) verwendet. Aufnahmen für FISH wurden an einem Olympus BX50 Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg) und einem (UPlanAPO 100/1,35, Olympus, Hamburg) Ölimmersionsobjektiv und einer Digitalkamera (ORCA ER CCD Kamera, Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee) durchgeführt. Als Software wurde Openlab 4.0 von Improvision (Heidelberg) verwendet. Die erhaltenen Bilder wurden mit Adobe Photoshop (Unterschleißheim) bearbeitet.

Das Filterset des Leica Mikroskops wurde von der Firma AHF Analysentechnik (Tübingen) bezogen und ist in Tabelle 2.9 dargestellt.

**Tabelle 2.9: Filterset des Leica Mikroskops**

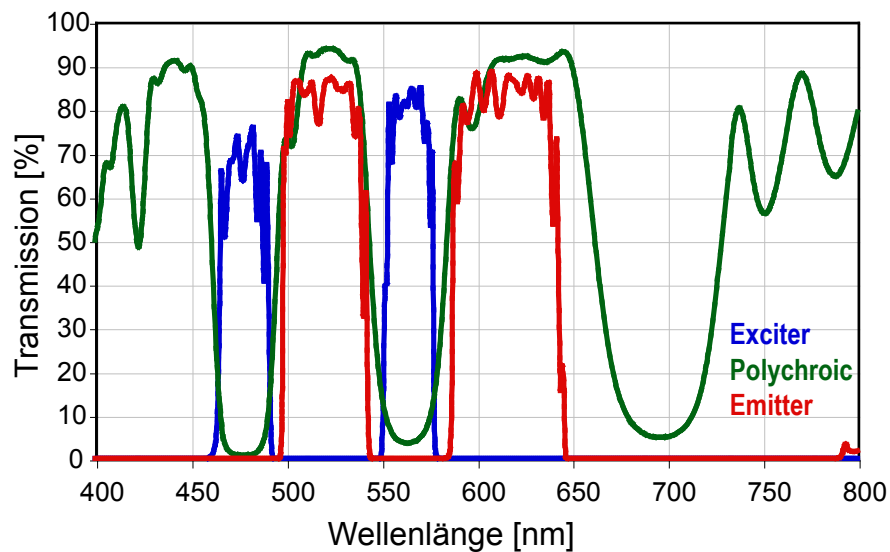
| Filterset | Exciter    | Beamsplitter | Emitter   |
|-----------|------------|--------------|-----------|
| YFP       | BP 510/20  | DCLP 530     | BP 560/40 |
| CFP       | BP 436/20  | DCLP 455     | BP 480/40 |
| EGFP      | BP 470/40  | LP 495       | BP 525/50 |
| DAPI      | BP 340-380 | LP 400       | LP 425    |

Das Axio Imager.A1 Mikroskop enthielt das Filterset aus Tabelle 2.10 von der Firma Chroma Technology Corporation (Rockingham, USA).

**Tabelle 2.10: Filterset des Axio Imager.A1 Mikroskops**

| Filterset   | Exciter   | Beamsplitter      | Emitter     |
|-------------|-----------|-------------------|-------------|
| EGFP        | HQ 470/40 | Dichroic 86012 bs | HQ 515/30 M |
| HcRed, mRFP | S 565/55  | Dichroic 86012 bs | S 650/75 M  |

Das Olympus BX50 Fluoreszenzmikroskop enthielt das Dualband Filterset EGFP/DsRed (AHF Analysentechnik, Tübingen), dessen Spektren in Abb. 2.2 dargestellt sind.


**Abbildung 2.2: Dualband Filterset EGFP/DsRed des Olympus BX60**

# 3 Ergebnisse

---

Aufgrund der Lokalisation der *IST2*-mRNA an die Tochterzellspitze kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Sortierung von Ist2 an Protease-sensitive Domänen der Zellperipherie aufgrund von zwei möglichen Mechanismen stattfindet. Das erste Modell beruht auf der Kopplung von lokaler Translation der *IST2*-mRNA an spezifischen Domänen des kortikalen ERs und anschließendem Proteintransport zu Domänen der Plasmamembran. Der Translationsort würde hierbei die räumliche Nähe zur Plasmamembran bestimmen und den direkten Transfer von Ist2 zu Domänen der Plasmamembran vermitteln. Alternativ könnte der Transport von Ist2 unabhängig von der mRNA-Lokalisation stattfinden. Nach einer Translation am perinukleären ER (pER) der Mutterzelle könnte eine Segregation von klassischen ER-*exit sites* (ERES) und ein Transport von Ist2 an die Zellperipherie - entweder über Vesikel oder über tubuläre ER-Verbindungen zwischen pER und kortikalem ER - erfolgen. Bei einem vesikulären Transport vom pER an die Plasmamembran wäre eine Anreicherung in Ist2-spezifischen *exit sites* denkbar, die einen effizienten Transport ermöglichen würden. Beim Transport innerhalb der ER-Membranen zum kortikalen ER könnte Ist2 an bestimmten Domänen des kortikalen ERs akkumulieren; dafür spricht die hohe Mobilität von Ist2 innerhalb von Membranen (Takizawa et al., 2000). Diese Anreicherung würde zu einer hohen lokalen Konzentration führen, ähnlich wie bei der *IST2*-mRNA-Lokalisation, und einen Transfer an die Plasmamembran ermöglichen. Ausgehend von diesen beiden Hypothesen sollte der Transportweg von Ist2 analysiert werden.

## 3.1 Länge und Art des Sortierungssignals von Ist2

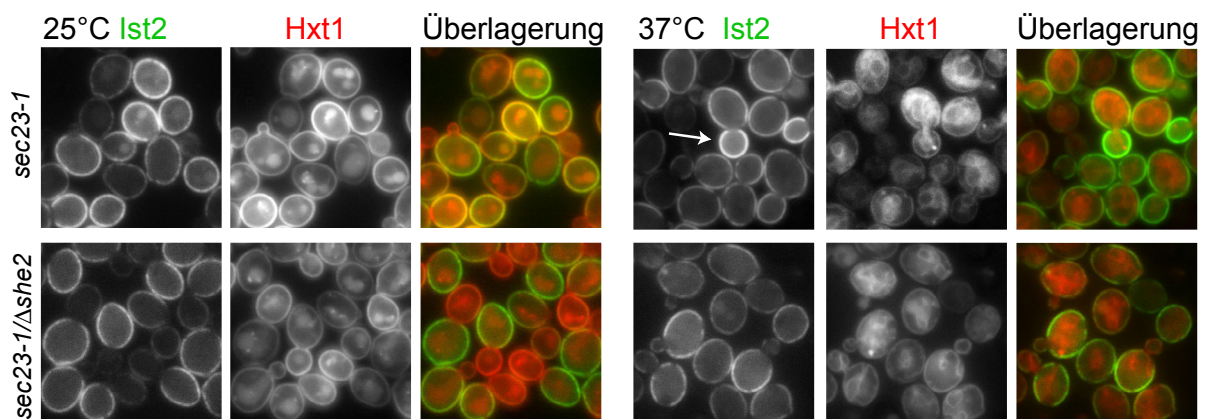
### 3.1.1 She2- abhängiger mRNA-Transport ist keine Voraussetzung für die Anreicherung von Ist2 im kortikalen ER und den Sec-unabhängigen Transport an die Plasmamembran

Um herauszufinden, ob die Lokalisation der *IST2*-mRNA an die Tochterzellspitze eine Voraussetzung ist, dass Ist2 im kortikalen ER angereichert und Sec-unabhängig an Domänen der Plasmamembran transportiert wird, wurde die Expression von YFP-Ist2 in der Doppelmutante *sec23-1/Δshe2* analysiert. Dieser Hefestamm wurde so konstruiert, dass Ist2 mit der endogenen 3'-UTR (nicht translatierte Region) unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors vorliegt.

In der temperatursensitiven *SEC*-Mutante *sec23-1* können unter restriktiven Bedingungen (Erhöhung der Temperatur auf 37°C) am Endoplasmatischen Retikulum (ER) keine COPII-Vesikel gebildet werden. Proteine, die über den klassischen sekretorischen Weg an die Plasmamembran transportiert werden, akkumulieren daher im ER. Dies verursacht eine starke Proliferation von ER-artigen Strukturen und morphologische Veränderungen

des kortikalen ERs (Novick et al., 1980; Hicke und Schekman, 1989; Prinz et al., 2000). YFP-markiertes Ist2, welches in einem *sec23-1* Hefestamm für zwei Stunden mit Galaktose induziert wurde, lokalisierte sowohl bei der permissiven als auch der restriktiven Temperatur ausschließlich an der Zellperipherie (Abb. 3.1). Um den Block des sekretorischen Weges sichtbar zu machen, wurde der CFP-markierte Hexose Transporter 1 (Hxt1) koexprimiert. Hxt1 ist ein Plasmamembranprotein, welches in Vesikeln über den sekretorischen Weg transportiert wird. Bei 25°C gelangt Hxt1 an die Plasmamembran, wird später endozytiert und in der Vakuole abgebaut. Bei 25°C kolokalisierten Hxt1 und Ist2 (Abb. 3.1). Bei einem Block des sekretorischen Weges akkumulierte Hxt1 im Gegensatz zu Ist2 in ER-ähnlichen Strukturen, die das Zellinnere ausfüllten. Der Transport von Ist2 an die Zellperipherie erfolgte somit Sec-unabhängig. Durch die starke Überexpression fand in *sec23-1* Zellen in einigen mittelgroßen Tochterzellen eine Anreicherung von Ist2 in der Tochterzelle statt (weißer Pfeil in Abb. 3.1).

In der Doppelmutante *sec23-1/Δshe2* erreichte Ist2 ebenfalls die Zellperipherie, ohne mit Hxt1 bei restriktiver Temperatur zu kolokalisieren. Demnach benötigt der Sec-unabhängige Transport von Ist2 an die Zellperipherie nicht die vorherige Lokalisation der *IST2*-mRNA an die Tochterzellspitze. Der einzige Unterschied im Vergleich zu *sec23-1* Zellen war die schwächere Expression von Ist2 in Tochterzellen, welche bei *sec23-1/Δshe2* Zellen erkennbar war. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die lokale Translation von Ist2 keinen Einfluss auf den Sec-unabhängigen Transport von Ist2 hat.

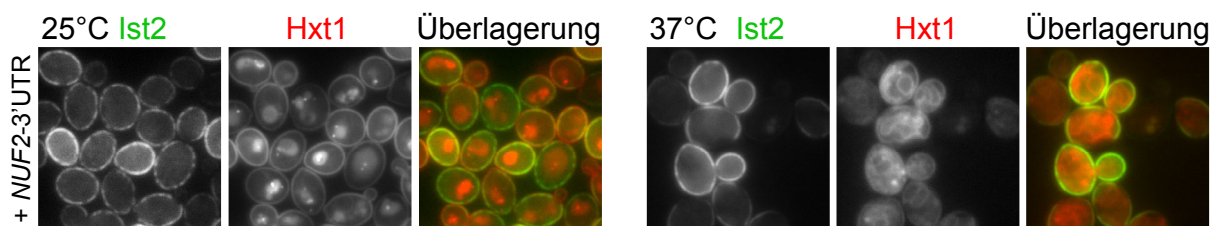


**Abbildung 3.1: Die lokale Translation von Ist2 ist keine Voraussetzung für den Sec-unabhängigen Transport von Ist2.** Lokalisation von YFP-Ist2 (in Grün) und Hxt1-CFP (in Rot) in *sec23-1* bzw. *sec23-1/Δshe2* Zellen unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25 oder 37°C.

### 3.1.2 Die *IST2*-3'UTR wird nicht für die Anreicherung von Ist2 im kortikalen ER und den Sec-unabhängigen Transport benötigt

Alternativ zum She2-vermittelten Transport der *IST2*-mRNA könnte die *IST2*-3'UTR ein Signal für die Anreicherung von Ist2 im kortikalen ER und den Sec-unabhängigen

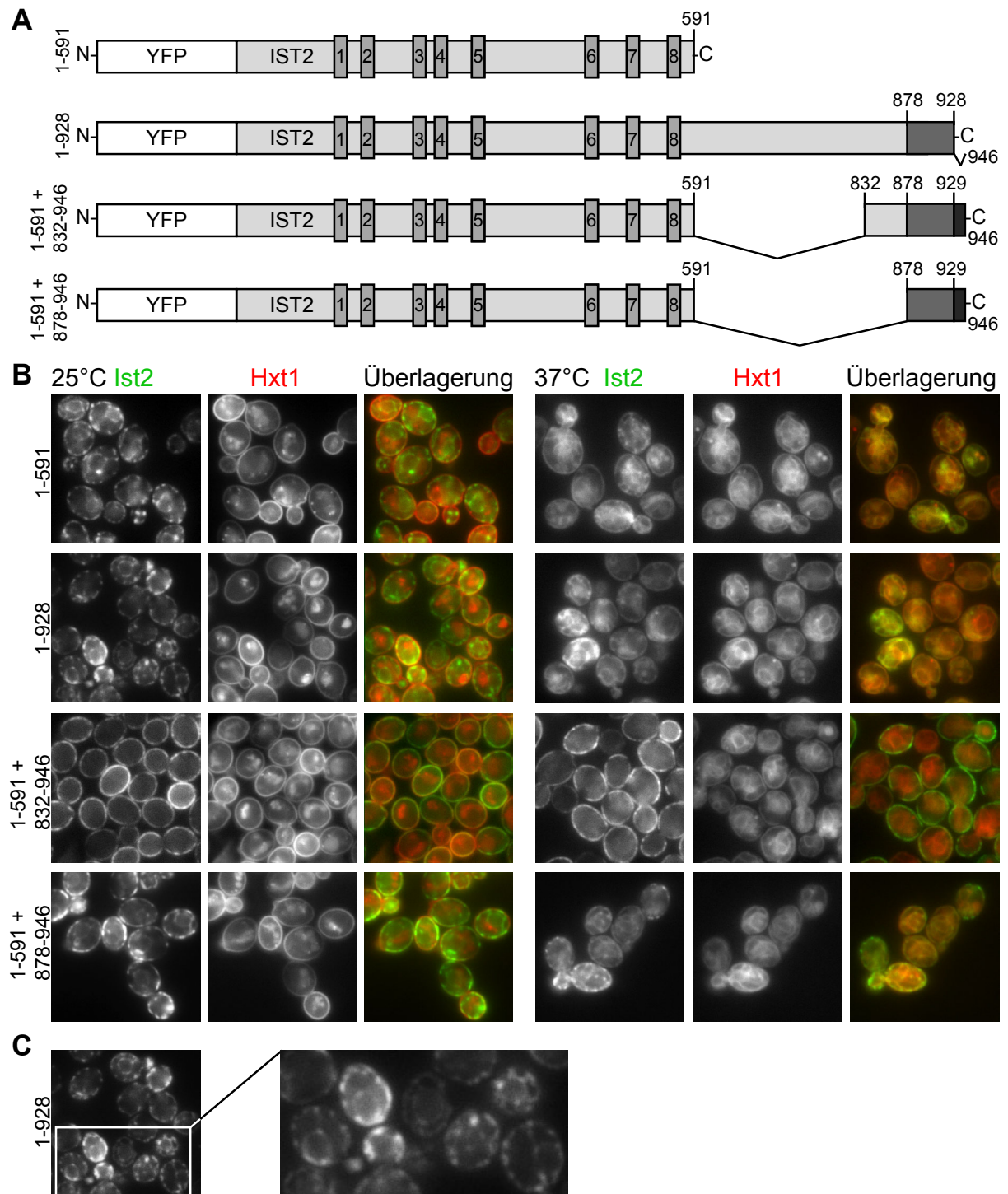
Transport von Ist2 an Domänen der Plasmamembran enthalten. Um dies zu untersuchen, wurde die endogene *IST2*-3'UTR mit derjenigen von *NUF2* ausgetauscht und das entstehende Konstrukt in *sec23-1* Zellen analysiert (Abb.3.2). Die *NUF2*-3'UTR wurde ausgewählt, da es keine Hinweise gibt, dass die mRNA des Kinetochorproteins Nuf2 an die Tochterzellspitze lokalisiert (Westermann et al., 2007). Sowohl bei 25°C als auch bei 37°C wurde *GAL1*-induziertes YFP-Ist2 mit der *NUF2*-3'UTR an die Zellperipherie transportiert. Bei 37°C war keine Kolo­kalisation mit Hxt1 in ER-ähnlichen Strukturen im Zellinneren erkennbar. Dies lässt den Schluss zu, dass weder die *IST2*-3'UTR noch die *IST2*-5'UTR einen alleinigen Beitrag zur Anreicherung von Ist2 im kortikalen ER und zum Sec-unabhängigen Transport von Ist2 an Domänen der Plasmamembran leisten.



**Abbildung 3.2:** Die 3'UTR wird nicht für den Sec-unabhängigen Transport von Ist2 benötigt. Lokalisation von YFP-Ist2 (in Grün) mit *NUF-2* 3'UTR unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors in *sec23-1* Zellen nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25 oder 37°C. Als Kontrollprotein wurde Hxt1-CFP (in Rot) mit *NUF-2* 3'UTR unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors koexprimiert.

### 3.1.3 Die C-terminalen 69 Aminosäuren von Ist2 beinhalten das Sortierungssignal

Weder die mRNA-Lokalisation noch die *IST2*-UTRs spielen eine Rolle bei der Anreicherung von Ist2 am kortikalen ER und beim Sec-unabhängigen Transport von Ist2 an Domänen der Plasmamembran. Da die C-terminalen 355 Aminosäuren von Ist2 notwendig und ausreichend sind für den Transport von Ist2 bzw. Ist2-Fusionsproteinen an die Zellperipherie (Jüschke et al., 2005), wurden mit Hilfe von verschiedenen C-terminalen Verkürzungen die Länge und Position des Sortierungssignals eingegrenzt. Deletion des gesamten Ist2 C-Terminus [YFP-Ist2 (1-591)] resultierte bei 25°C in einer Proteinakkumulation von Ist2 am perinukleären ER (pER) mit zusätzlichen Punkten direkt am pER und in der Peripherie. Bei 37°C kolo­kalisierte der Großteil von YFP-Ist2 (1-591) mit Hxt1-CFP in Strukturen des ERs (Abb. 3.3 und Jüschke et al. (2005)). Deletion der C-terminalen 18 Aminosäuren von Ist2 [YFP-Ist2 (1-928)] zeigte den gleichen Phänotyp wie YFP-Ist2 (1-591): Eine Vergrößerung eines Ausschnitts von YFP-Ist2 (1-928) ist in Abb. 3.3 C dargestellt, um die Lokalisation am pER mit zusätzlichen Punkten direkt am pER und in der Peripherie bei 25°C deutlich zu machen. Somit sind die C-terminalen Aminosäuren von Ist2 essentiell für die Sortierung an der Zellperipherie.



**Abbildung 3.3: Der extreme C-Terminus von Ist2 enthält das Sortierungssignal.** A) Schematische Darstellung der in B) verwendeten Konstrukte. Die acht Transmembrandomänen von Ist2 sind als durchnummerierte Kästen dargestellt. B) Lokalisation von Hxt1-CFP (in Rot) und verschiedenen Deletionen von YFP-Ist2 (in Grün) in *sec23-1* Zellen nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25 und 37°C. Alle Konstrukte enthielten den *GAL1*-Promotor. C) Vergrößerung eines Ausschnitts aus B) von YFP-Ist2 (1-928) bei 25°C.

Die C-terminalen 69 Aminosäuren von Ist2 sind in der Lage, das GFP-markierte Reporterprotein Kex2 Sec-unabhängig an die Zellperipherie zu dirigieren (Franz et al., 2007). Die Serinprotease Kex2 ist ein Typ I-Membranprotein, das bei der Prozessierung von Proproteinen im *trans*-Golgi-Apparat beteiligt ist. Im Gegensatz zu YFP tritt bei GFP aufgrund eines Alanins an Position 206 eine Dimerisierung des Fluorochroms auf (Shaner et al., 2005). Diese Multimerisierung könnte durch Erhöhung der lokalen Konzentration von Ist2 den Transport positiv beeinflussen (siehe Kapitel 3.3, Seite 55). Daher sollte untersucht werden, ob die C-terminalen 69 Aminosäuren von Ist2 auch im Kontext einer YFP-Markierung Ist2 an die Zellperipherie zu transportieren vermögen. Ein Vergleich der zwei internen Verkürzungen YFP-Ist2 (1-591+832-946) und YFP-Ist2 (1-591+878-946) zeigte, dass im Kontext einer YFP-Markierung die C-terminalen 69 Aminosäuren [YFP-Ist2 (1-591+878-946)] für den Transport an die Zellperipherie nicht ausreichen. Dagegen vermittelten die C-terminalen 115 Aminosäuren [YFP-Ist2 (1-591+832-946)] den Sec-unabhängigen Transport an die Zellperipherie.

Um herauszufinden, ob die mRNA- oder die Proteinsequenz der C-terminalen 69 Aminosäuren den Sec-unabhängigen Transport von Ist2 bewerkstelligen, wurde die Codonverwendung in dieser Sequenz so geändert, dass die Proteinsequenz beibehalten, die dreidimensionale Struktur der mRNA jedoch grundlegend verändert war. Diese Sequenz von Ist2 wurde C-terminal an das GFP-markierte Reporterprotein Kex2 angefügt und als Fusionsprotein in einem Konstrukt exprimiert, welches die bereits erwähnte *NUF2*-3'UTR enthält. Da die C-terminalen 69 Aminosäuren von Ist2 trotz der veränderten Codonverwendung den Sec-unabhängigen Transport von Kex2 zur Zellperipherie gewährleisteten, ergibt sich daraus, dass die Sortierungssignale von Ist2 auf Proteinebene und nicht auf mRNA-Ebene determiniert sind (Franz et al., 2007).

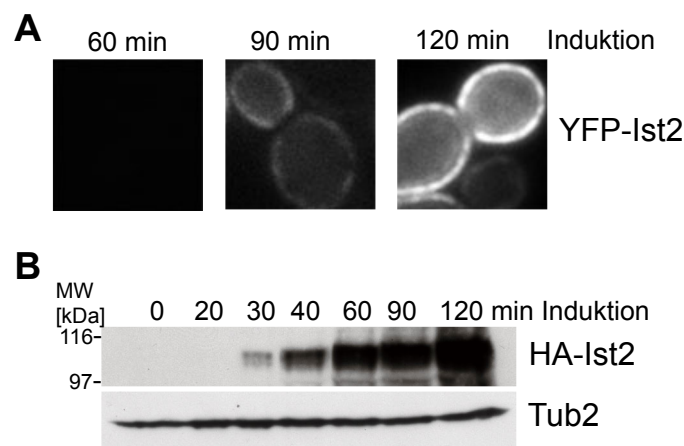
### 3.2 Transiente Lokalisation von Ist2 am pER

Da die *IST2*-mRNA an die Tochterzellspitze transportiert wird, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Ist2 zum kortikalen ER der Tochterzelle gelangt, ohne in Kontakt mit dem pER der Mutterzelle zu kommen. Diese Hypothese beruht auf der Annahme, dass die Affinität der *IST2*-mRNA-Moleküle an She2 ausreicht, um alle *IST2*-mRNA Moleküle an die Tochterzellspitze zu transportieren. Die Affinität für die *IST2*-mRNA an She2 ist nicht bekannt, jedoch wurde bei der *ASH1*-mRNA die Affinität eines der vier Lokalisationselemente an She2 mit 210 nM determiniert; es ist daher wahrscheinlich, dass bei Expression unter endogenem Promotor alle *ASH1*-mRNA Moleküle an die Tochterzellspitze transportiert werden (Niessing et al., 2004).

Neu synthetisiertes YFP-Ist2 ist nur an der Zellperipherie sichtbar: 90 bis 120 min nach Induktion mit Galaktose akkumulierte YFP-Ist2 ausschließlich an der Peripherie von Mutter- und Tochterzellen. Im pER konnte kein YFP-Ist2-Signal detektiert werden (Abb.

3.4 A). C-terminal verkürzte Ist2-Konstrukte verblieben dagegen in Strukturen des kortikalen und perinukleären ERs ohne weitergehenden Transport an die Zellperipherie (Abb. 3.3).

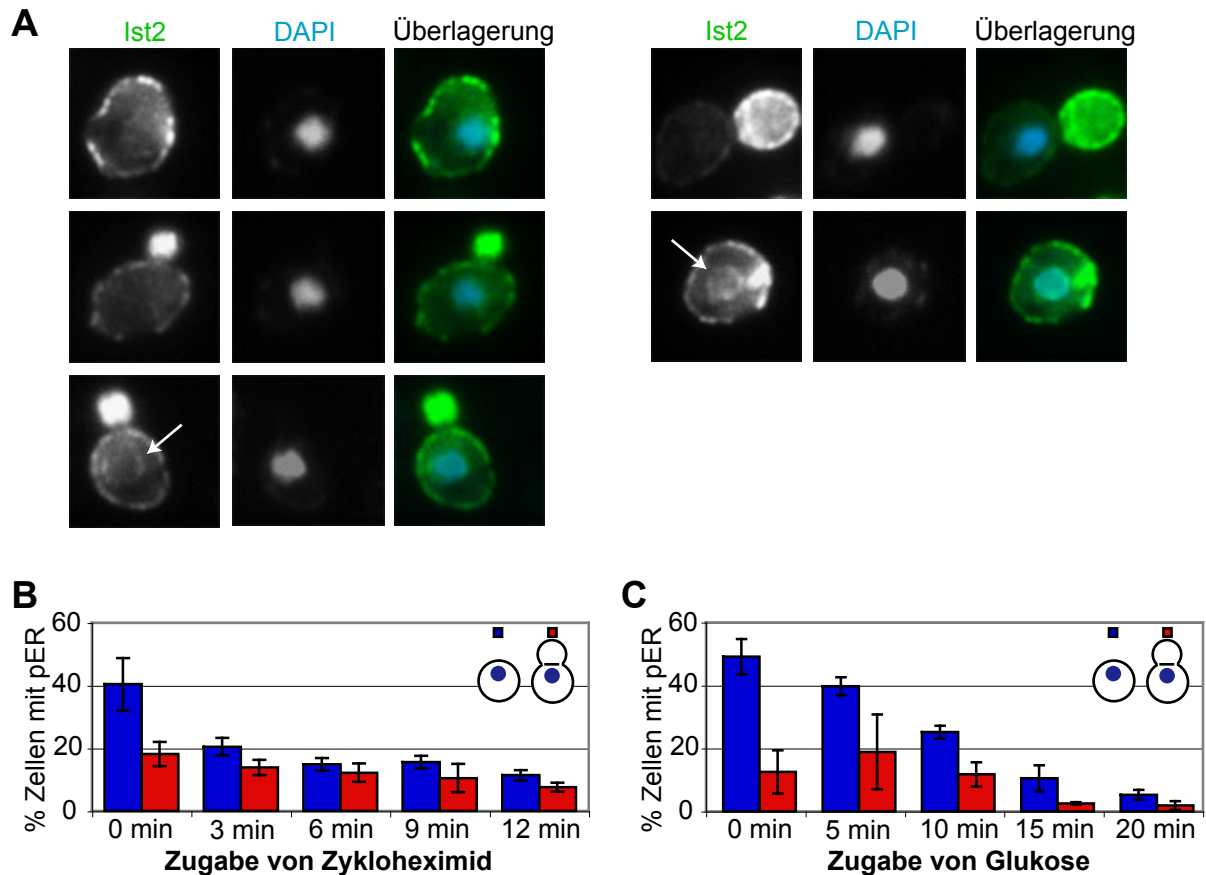
Verglichen mit YFP-Ist2, welches nach einer Induktion von 60 min kaum detektierbar war (Abb. 3.4 A), lieferte N-terminal Hämagglutinin (HA)-markiertes Ist2 bereits nach 30 min im Western Blot ein Signal (Abb. 3.4 B). Somit ergibt sich eine Differenz von mindestens 30 min zwischen Synthese und Detektion von Ist2 in lebenden Zellen. Messungen der Fluoreszenzintensität von YFP-Ist2 ergaben, dass die Signalstärke von YFP-Ist2 nach 40 min Induktion nur 3% der Intensität, verglichen mit einer zweistündigen Induktion, betrug (Daten nicht gezeigt). Dies stimmt überein mit der langsamen Reifung eines Fluorochroms (Griesbeck et al., 2001; Shaner et al., 2005).



**Abbildung 3.4: Detektion von neu synthetisiertem YFP-Ist2 und HA-Ist2.** A) Fluoreszenz von YFP-Ist2 unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors in lebenden  $\Delta ist2$  Zellen 60, 90 bzw. 120 min nach Induktion mit Galaktose bei 25°C. B) Western Blot von Gesamtzellextrakt von 0,2 OD<sub>600</sub>  $\Delta ist2$  Zellen, die HA-markiertes Ist2 unter *GAL1*-Kontrolle exprimierten und für die angegebene Zeit induziert wurden. Die Detektion von HA-Ist2 erfolgte mit HA-spezifischen Antikörpern. Tubulin (Tub2) wurde mit Tub2-spezifischen Antikörpern detektiert.

Um festzustellen, ob Ist2 im Verlauf des Transports zur Zellperipherie zusätzlich auch das pER durchläuft, wurde HA-Ist2 mittels indirekter Immunfluoreszenz (IF) mit HA-spezifischen Antikörpern (AK) detektiert. 40 min nach Induktion mit Galaktose war in den meisten Mutter- und Tochterzellen ein peripheres Signal von HA-Ist2 erkennbar (Abb. 3.5 A). Bei sehr kleinen Tochterzellen füllte das Signal die ganze Tochterzelle aus. Zusätzlich zum peripheren Signal war bei einigen Zellen mit oder ohne Tochterzelle ein perinukleäres Signal von HA-Ist2 erkennbar (weiße Pfeile in Abb. 3.5 A). Dies war bei 40% der Mutterzellen ohne Tochterzelle und bei 18% der Mutterzellen mit Tochterzelle der Fall. Ist2, welches am pER der Mutterzelle lokalisiert ist, kann verschiedenen Schicksalen folgen: Es kann abgebaut werden oder es erfolgt ein Abtransport an die Zellperipherie entweder über Vesikel oder über ER-Tubuli, die perinukleäres und kortikales ER verbinden. Um zu prüfen, wie schnell Ist2 vom pER verschwindet, wurde 40 min nach Induktion mit

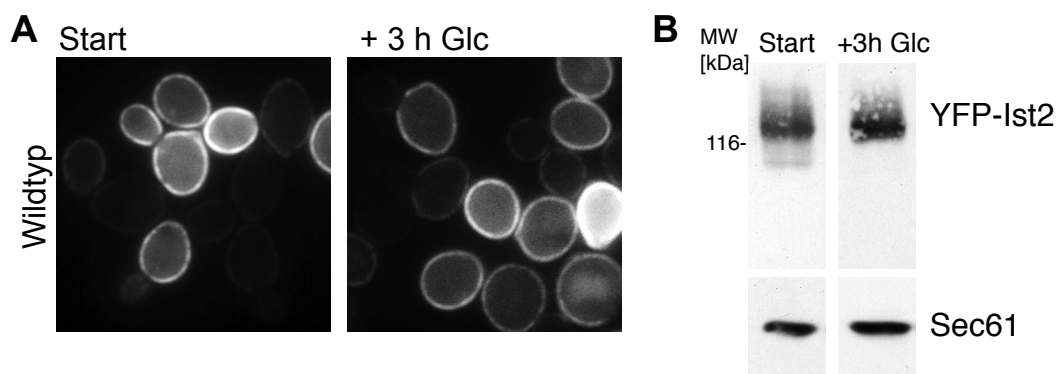
Galaktose Zyklheximid zu den Kulturen hinzugefügt, um die Translation zu stoppen, anschließend wurden alle 3 min Proben mit Formaldehyd fixiert und mittels IF untersucht. Die Anzahl der Zellen mit einem Signal am pER wurde quantifiziert: Nach 3 min mit Zyklheximid war nur noch in 21% der Mutterzellen ohne Tochterzelle ein HA-Ist2-Signal am pER erkennbar (Abb. 3.5 B).



**Abbildung 3.5: Transiente Lokalisation von HA-Ist2 am pER und in der Zellperipherie.** A) IF von HA-Ist2 (in Grün) exprimierenden Zellen ( $\Delta ist2$  Zellhintergrund) in verschiedenen Stadien des Zellzyklus nach 40 min Induktion mit Galaktose bei 25°C. Das HA-Ist2-Konstrukt enthielt den *GAL1*-Promotor. Die Zellkerne wurden mit DAPI (in blau) angefärbt. Die weißen Pfeile weisen auf ein pER-Signal von Ist2 hin. B) Quantifizierung der indirekten Immunfluoreszenz. Dargestellt ist der Prozentsatz der Zellen, die ein perinukleäres HA-Ist2-Signal zeigen. Für die angegebene Zeitdauer wurden 100  $\mu\text{g/ml}$  Zyklheximid zu den für 40 min mit Galaktose induzierten Kulturen hinzugefügt, bevor mit Formaldehyd fixiert wurde. Mutterzellen ohne Tochterzelle sind blau gekennzeichnet, Mutterzellen mit Tochterzelle in Rot. C) Quantifizierung der indirekten Immunfluoreszenz. Dargestellt ist der Prozentsatz der Zellen, die ein perinukleäres HA-Ist2-Signal zeigen. Für die angegebene Zeitdauer wurde 2% Glukose zu den für 40 min mit Galaktose induzierten Kulturen hinzugefügt, bevor mit Formaldehyd fixiert wurde. Mutterzellen ohne Tochterzelle sind blau gekennzeichnet, Mutterzellen mit Tochterzelle in Rot. Für die Quantifizierungen wurden pro Zeitpunkt mindestens 100 Zellen von jeweils drei unabhängigen Experimenten ausgewertet. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Wenn Glukose statt Zyloheximid zu den Kulturen hinzugefügt wurde, um die Transkription von neuer *IST2*-mRNA zu inhibieren, wurde ein ähnliches Resultat erzielt: Nach zehn min war nur noch in 26% der Mutterzellen ohne Tochterzelle (statt anfangs 50%) ein HA-Ist2-Signal am pER zu erkennen (Quantifizierung in Abb. 3.5 C).

Um einen möglichen Abbau von Ist2 zu überprüfen, wurde die Stabilität von Ist2 analysiert. Wenn YFP-Ist2 für zwei Stunden mit Galaktose induziert und anschließend für weitere drei Stunden mit Glukose inkubiert wurde, um die Transkription zu inhibieren, konnte in fast allen Zellen noch ein starkes Signal detektiert werden (Abb. 3.6 A). Ebenso war im Western Blot weder die Proteinmenge vermindert noch waren Abbaubanden erkennbar (Abb. 3.6 B).

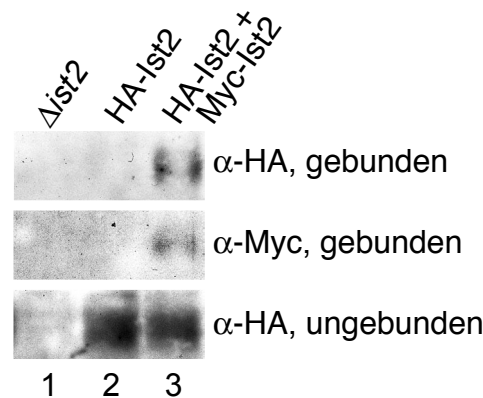


**Abbildung 3.6: YFP-Ist2 ist ein sehr stabiles Protein.** Lokalisation und Detektion der Expression von YFP-Ist2 unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors in  $\Delta ist2$  Zellen. Nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25°C wurde die Kultur anschließend drei Stunden mit Glukose (Glc) inkubiert. A) Detektion der YFP-Fluoreszenz B) Western Blot von Gesamtzellextrakt von 0,1 OD<sub>600</sub> Zellen. Detektion von YFP-Ist2 und Sec61 mit Ist2- bzw. Sec61-Antikörpern.

### 3.3 Multimerisierung beeinflusst die Effizienz des Sec-unabhängigen Transports von Ist2

Die Effizienz des Sec-unabhängigen Transports wurde erhöht, wenn die Ist2-Sequenz 878–927 durch die Tetramerisierungsdomäne eines Gcn4 Leucin-Zippers ersetzt wurde. Dies wurde im Kontext des GFP-markierten Reporterproteins Kex2 untersucht, an welches die C-terminalen 69 Aminosäuren von Ist2 fusioniert wurden (Franz et al., 2007). Daher stellte sich die Frage, ob eine hohe lokale Konzentration von Ist2 - z.B. durch Multimerisierung von Ist2 - die Effizienz des Sec-unabhängigen Transports positiv beeinflusst. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde nach Solubilisierung von Hefemembranen mit Triton X-100 eine Immunpräzipitation (IP) von Ist2 mit Myc-Antikörpern in einem Hefestamm durchgeführt, der Myc-Ist2 sowie zusätzlich HA-Ist2 exprimiert. Beide Konstrukte enthielten den endogenen *IST2*-Promotor und wurden in das Genom integriert. In Abb. 3.7 ist das Ergebnis der Immunpräzipitation von Ist2 dargestellt. In der ersten

Spur wurde Extrakt von  $\Delta ist2$ -Zellen aufgetragen, in der zweiten Spur Extrakt eines Hefestamms, der nur HA-Ist2 exprimierte, sowie in der dritten Spur Extrakt eines Hefestammes, der sowohl HA-Ist2 wie auch Myc-Ist2 exprimierte. In Spur 3 (Abb. 3.7,  $\alpha$ -HA, gebunden) ist zu erkennen, dass HA-Ist2 mit Myc-Ist2 ko-immunpräzipitierte. Immunpräzipitiertes Ist2 im Hefestamm, der Myc-Ist2 exprimierte, ist im mittleren Blot dargestellt ( $\alpha$ -Myc, gebunden, Spur 3). Der Extrakt der beiden Hefestämme, die kein bzw. nur HA-Ist2 exprimierten, lieferte kein Signal bei der (Ko-)Immunpräzipitation mit Myc-Antikörpern (Abb. 3.7,  $\alpha$ -HA, gebunden und  $\alpha$ -Myc, gebunden, Spur 1 und 2). Dies unterstreicht die Spezifität der Immunpräzipitation. Des Weiteren wurden als Kontrolle 10 OD<sub>600</sub> der ungebundenen Fraktionen der drei verwendeten Hefestämme mit HA-Antikörpern detektiert (Abb. 3.7,  $\alpha$ -HA, ungebunden). Diese Ergebnisse zeigen, dass HA-markiertes Ist2 nach Solubilisierung mit Triton X-100 als Komplex mit Myc-Ist2 vorliegt.



**Abbildung 3.7: Multimerisierung von Ist2 unter Wildtyp-Bedingungen.** Triton X-100-solubilisierter Membranextrakt von 600 OD<sub>600</sub> Hefezellen, die entweder kein Ist2 (Spur 1), HA-Ist2 (Spur 2) oder HA-Ist2 und Myc-Ist2 (Spur 3) exprimierten, wurde mit HA-Antikörpern und ProteinA-Sepharose inkubiert. Die immunpräzipitierten Proteine wurden in zwei gleich große Fraktionen aufgeteilt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit HA- und Myc-Antikörpern detektiert. Als Kontrolle wurden 10 OD<sub>600</sub> des ungebundenen Membranextraktes ( $\alpha$ -HA, ungebunden) mit HA-Antikörpern detektiert.

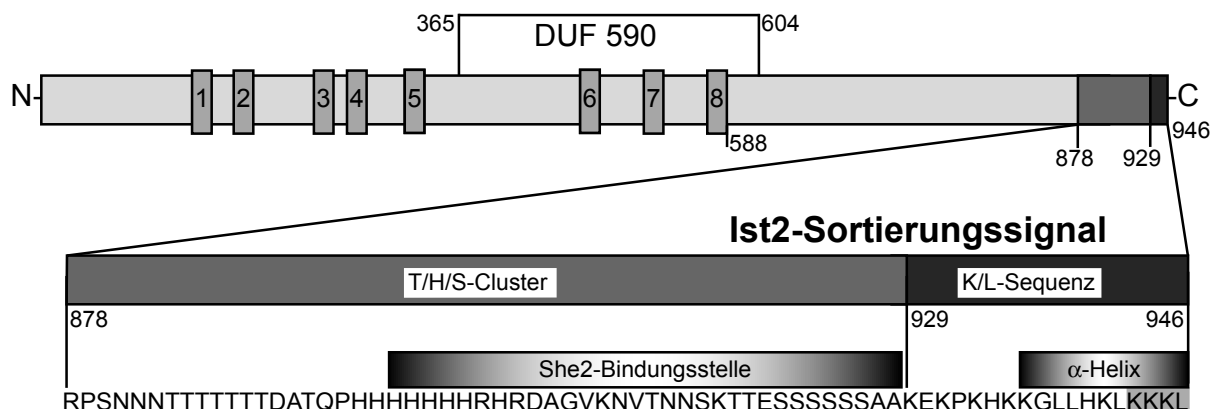
### 3.4 Funktionelle Domänen von Ist2

In Abb. 3.8 ist eine schematische Darstellung der verschiedenen Domänen von Ist2 aus *Saccharomyces cerevisiae* dargestellt. Die Transmembrandomänen sechs bis acht von Ist2 sind Teil der DUF590 Domäne. Die DUF590 Domäne (*Domain of Unknown Function*) ist eine Domäne mit unbekannter Funktion, die in vielen Eukaryoten von *Fungi* bis hin zu *Mammalia* konserviert ist.

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse kann das Sortierungssignal im C-Terminus von Ist2 in zwei funktionelle Bereiche eingeteilt werden: das T/H/S-Cluster, welches durch eine Tetramerisierungsdomäne ersetzt werden kann [siehe Kapitel 3.3 und Franz et al. (2007)],

und die K/L-Sequenz, welche für einen Transport von Ist2 an die Zellperipherie essentiell ist (Abb. 3.3, Seite 51). Die K/L-Sequenz benötigt jedoch einen Abstand von mindestens 50 Aminosäuren zur Plasmamembran, um einen effizienten Transport von Ist2 zur Zellperipherie zu gewährleisten; dies beruht auf Versuchen mit dem Pheromontransporter Ste6 (Franz, 2005).

Namensgebend für das T/H/S-Cluster waren die auffälligen Anhäufungen von mehreren gleichen Aminosäuren (sieben Threonine, acht Histidine, sechs Serine), während die K/L-Sequenz reich an hydrophoben Leucinen und basischen Aminosäuren ist. Die She2-Bindedomäne ist Teil des T/H/S-Clusters (Olivier et al., 2005) und wurde in Abb. 3.8 eingezeichnet. Gemäß dem Vorhersageprogramm AmphipathSeek bilden die C-terminalen elf Aminosäuren der K/L-Sequenz von Ist2 eine amphipathische  $\alpha$ -Helix (Sapay et al., 2006). Die C-terminalen vier Aminosäuren sind Teil einer di-basischen KKXX-ER-Rückführungs- (*retrieval*) Konsensussequenz (Cosson und Letourneur, 1994). Die Sequenz des ER-*retrieval*-Konsensus ist jedoch nicht nötig für den Sec-unabhängigen Transport von Ist2. Mutation der C-terminalen vier Aminosäuren -KKKL entweder zu -RRRL oder zu -LLLL hatte keinen Einfluss auf den Transport von Ist2 (Petzinger, 2004).



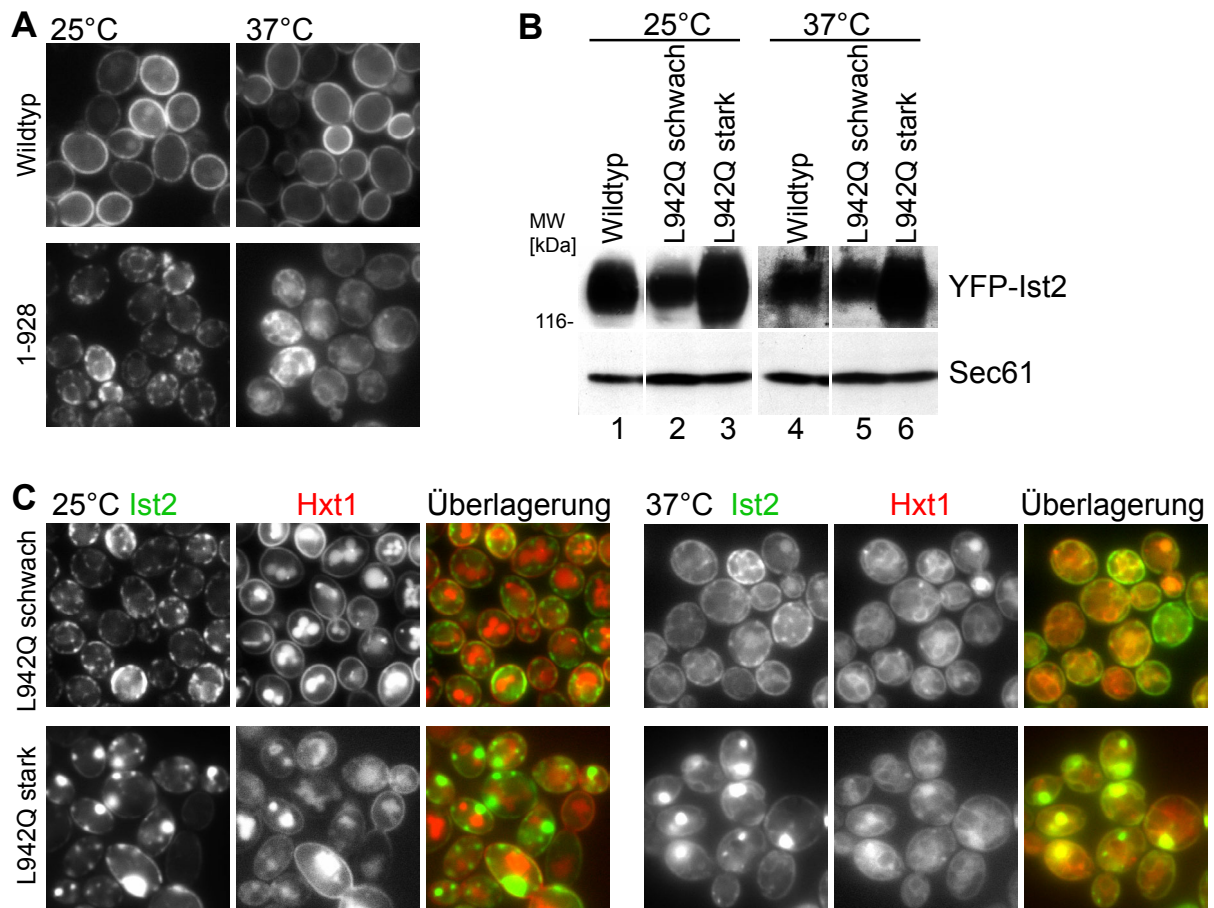
**Abbildung 3.8: Schematische Darstellung von Ist2.** Die acht vorhergesagten Transmembrandomänen von Ist2 sind als durchnummerierte graue Kästen dargestellt. Die DUF590-Domäne beinhaltet die Transmembrandomänen sechs bis acht. Die Aminosäuresequenz des Ist2-Sortierungssignals mit dem T/H/S-Cluster (AS 878-928) und der K/L-Sequenz (AS 929-946) ist vermerkt. Die Bereiche der She2-Bindungsstelle sowie der vorhergesagten amphipathischen  $\alpha$ -Helix sind eingezeichnet. Die C-terminalen vier Aminosäuren der K/L-Sequenz (grau unterlegt) stellen die di-basische KKXX-ER-*retrieval* Konsensussequenz dar.

## 3.5 Charakterisierung des Sortierungssignals von Ist2

### 3.5.1 Hydrophobe Leucine der K/L-Sequenz sind essentiell für den Transport von Ist2

Ein Vergleich der Ist2 Sequenz von *S. cerevisiae* mit Ist2-Homologen von anderen Hefespezies zeigte, dass besonders die K/L-Sequenz des Sortierungssignals stark konserviert ist

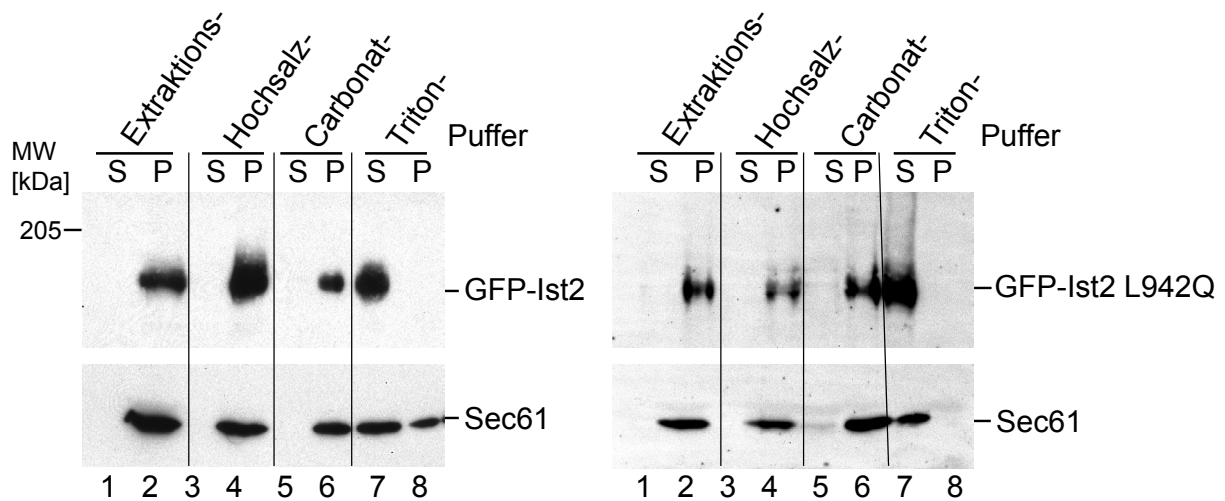




**Abbildung 3.10: Das hydrophobe Leucin an Position 942 ist essentiell für den Transport von Ist2.** A) Lokalisation von YFP-Ist2 und der C-terminal verkürzten Mutante YFP-Ist2 (1-928) (in Grün) unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors in *sec23-1* Zellen bei 25 und 37°C nach zweistündiger Induktion mit Galaktose. B) Expression von YFP-Ist2 (Spur 1) und zwei verschieden stark exprimierenden YFP-Ist2 L942Q Klonen (Spur 2 und 3) unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors in *sec23-1* Zellen nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25 oder 37°C. Gesamtextrakt von 0,1 OD<sub>600</sub> Zellen wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit Ist2- und Sec61-Antikörpern detektiert. C) Lokalisation von Hxt1-CFP (in Rot) und zwei verschieden stark exprimierenden YFP-Ist2 L942Q Klonen (in Grün) in *sec23-1* Zellen nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25 oder 37°C. Alle Konstrukte enthielten den *GAL1*-Promotor.

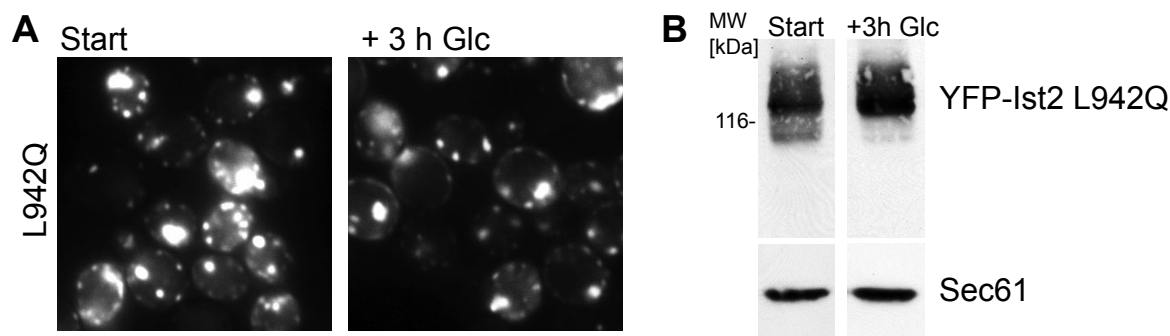
pER detektiert. Bei 37°C verblieben beide Ist2 L942Q Klone in ER-ähnlichen Strukturen und kolokalisierten mit Hxt1 (Abb. 3.10 C). Die L942Q Mutation verursachte eine Misslokalisierung von Ist2, ähnlich der des verkürzten Ist2 (1-928). Dies deutet darauf hin, dass das Leucin an Position 942 essentiell für den Transport von Ist2 ist. Weiterhin beruht das Ausmaß der Proteinakkumulation in kleinen oder großen Punkten auf der Menge des synthetisierten Ist2. Ein Vergleich der beiden unterschiedlich stark exprimierenden Klone Ist2 L942Q (schwach und stark) zeigte im Western Blot einen eindeutigen Mengenunterschied (siehe Abb. 3.10 B). Im Gegensatz dazu wurde bei Wildtyp Ist2 nie eine Proteinakkumulation in Punkten oder Flecken beobachtet, wenn es unter den gleichen Bedingungen induziert wurde. Zur Untersuchung, ob Ist2 L942Q ein cytoplasmatisches

Aggregat oder ein Membranprotein wie Wildtyp Ist2 ist, wurde die Löslichkeit von GFP-Ist2 L942Q in verschiedenen Puffern analysiert und mit den biochemischen Eigenschaften von GFP-markiertem Wildtyp Ist2 verglichen. Integrale Membranproteine zeichnen sich dadurch aus, dass sie sich nur durch Zugabe von Detergenzien solubilisieren lassen. Dagegen können membranassoziierte Proteine bei Behandlung mit Hochsalz- oder Carbonatpuffer in Lösung gehen. GFP-Ist2 L942Q konnte genau wie GFP-Ist2 und Sec61 nur durch Tritonpuffer solubilisiert werden und verhielt sich somit wie ein integrales Membranprotein (Abb. 3.11). Bei der Solubilisierung von GFP-Ist2 wurde in Spur 8 Sec61 nur teilweise solubilisiert, daher war ein Signal von Sec61 sowohl in der pelletierbaren wie auch in der solubilisierten Fraktion erkennbar.



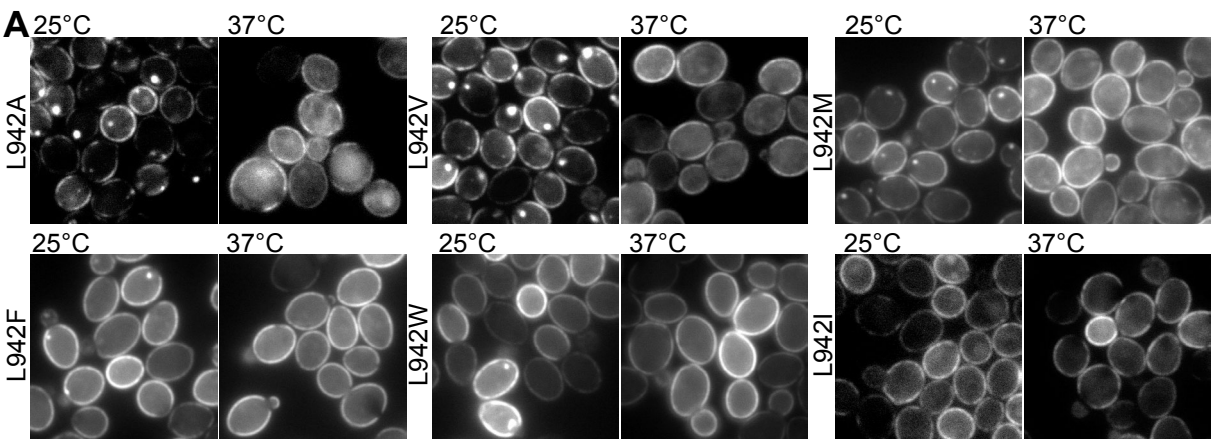
**Abbildung 3.11: Solubilisierung von Membrankomplexen.** Membranextrakt von 15 OD<sub>600</sub> Hefezellen, die GFP-Ist2 bzw. GFP-Ist2 L942Q unter Kontrolle des *IST2*-Promotors exprimierten, wurden mit Extraktionspuffer (0,1 M Kaliumacetat), Hochsalzpuffer (0,6 M Kaliumacetat), Carbonatpuffer (Extraktionspuffer mit 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH10,5) oder Tritonpuffer (Hochsalzpuffer mit 2% Triton X-100) behandelt und in solubilisierter (S) und pelletierbarer (P) Fraktionen aufgetrennt.

Da missgefaltete Proteine zumeist sehr schnell abgebaut werden, wurde die Stabilität des Ist2 L942Q Proteins analysiert: Die Expression von YFP-Ist2 L942Q in Wildtypzellen wurde analog zu Abb. 3.6 (Seite 55) für zwei Stunden mit Galaktose induziert. Anschließend wurden die Hefezellen für weitere drei Stunden mit Glukose inkubiert, um die Transkription zu inhibieren. Nach drei Stunden war die Lokalisation von YFP-Ist2 L942Q in großen Punkten an der Peripherie und im Zellinneren unverändert. Im Western Blot waren nach drei Stunden das YFP-Ist2 L942Q-Signal unverändert und keine Abbaubanden erkennbar (Abb. 3.12).



**Abbildung 3.12: YFP-Ist2 L942Q ist ein sehr stabiles Protein.** Expression von YFP-Ist2 L942Q unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors in  $\Delta ist2$  Zellen. Nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25°C wurde die Kultur anschließend drei Stunden mit Glukose (Glc) inkubiert. A) Detektion der Fluoreszenz B) Western Blot von Gesamtzellextrakt von 0,1 OD<sub>600</sub> Zellen. Detektion mit Ist2- und Sec61-Antikörpern.

Als Nächstes wurde überprüft, ob das Leucin an Position 942 durch eine andere hydrophobe Aminosäure funktionell ersetzt werden kann. Dabei wurden Leucin 942 durch Alanin (A), Valin (V), Methionin (M), Tryptophan (W), Phenylalanin (F) oder Isoleucin (I) ausgetauscht und der Transport von mutiertem Ist2 in *sec23-1* Zellen analysiert.



**B Lokalisation von Ist2-Protein bei 25°C [%]**

| Allel | 1-2 Punkte/Zelle | peripher |
|-------|------------------|----------|
| WT    | 0                | 100      |
| L942A | 82               | 18       |
| L942V | 89               | 11       |
| L942M | 72               | 28       |
| L942F | 25               | 75       |
| L942W | 12               | 88       |
| L942I | 0                | 100      |

**Abbildung 3.13: Hydrophobizität und Sperrigkeit der Aminosäure an Position 942 beeinflussen den Transport von Ist2.** A) Lokalisation der angegebenen YFP-Ist2-Mutanten unter *GAL1*-Promotor in *sec23-1* Zellen nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25 oder 37°C. B) Die angegebenen Allele (unter *GAL1*-Promotor) wurden für zwei Stunden mit Galaktose bei 25°C induziert. Für den Prozentsatz der Zellen mit 1-2 Punkten/Zelle oder ein peripheres Signal wurden mindestens 100 Zellen gezählt.

Mutation von Leucin 942 zu Alanin, Valin oder Methionin verursachte bei 25°C in fast allen Zellen zusätzlich zu einem peripheren Signal eine Akkumulation von Ist2 in Punkten (Abb. 3.13 A, Quantifizierung in B). Bei Austausch zu Alanin (L942A) traten in 82% der Zellen, bei Valin (L942V) in 89% und bei Austausch zu Methionin (L942M) in 72% der Zellen Punkte auf. Bei 37°C verschwand bei diesen Mutationen die Akkumulation in Punkten, mutiertes Ist2 wurde jedoch in ER-ähnlichen Strukturen im Zellinneren zurückgehalten. Mutation des Leucins 942 zu Phenylalanin oder Tryptophan beeinträchtigte den Transport weniger stark: Bei Austausch des Leucins durch Phenylalanin (L942F) waren nur in 25% der Zellen und bei Tryptophan (L942W) in 12 % der Zellen Punkte erkennbar. Nach Blockierung des sekretorischen Weges bei 37°C wurden Ist2 L942F und Ist2 L942W genau wie Wildtyp Ist2 an die Zellperipherie transportiert.

Aufgrund ihrer unterschiedlichen chemischen Eigenschaften lassen sich Aminosäuren u.a. nach Sperrigkeit (Zimmerman et al., 1968) und Hydrophobizität (Abraham und Leo, 1987) einteilen (siehe Tabelle 3.1). Die Mutationsanalyse an Position 942 lässt den Schluss zu, dass an dieser Position eine sehr sperrige Aminosäure (z.B. Tryptophan) oder eine sehr hydrophobe Aminosäure entscheidend für einen funktionellen Transport von Ist2 an die Zellperipherie ist.

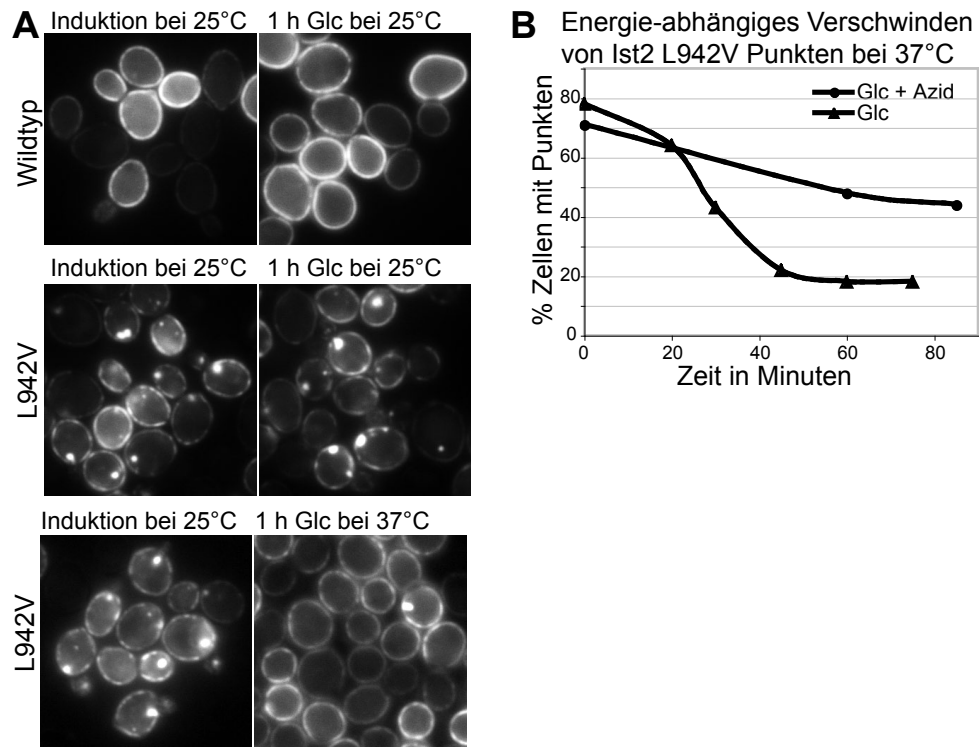
**Tabelle 3.1: Hydrophobizität und Sperrigkeit der Aminosäuren.**

| Aminosäure | Hydrophobizität<br>(Abraham und Leo, 1987) | Sperrigkeit<br>(Zimmerman et al., 1968) |
|------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------|
| A          | 0,44                                       | 11,5                                    |
| V          | 1,73                                       | 21,57                                   |
| M          | 1,10                                       | 16,25                                   |
| F          | 2,54                                       | 19,8                                    |
| W          | 2,56                                       | 21,67                                   |
| I          | 2,46                                       | 21,4                                    |
| L          | 2,46                                       | 21,4                                    |

Da in der K/L-Sequenz von Ist2 noch drei weitere Leucine vorhanden sind (Abb. 3.8, Seite 57), wurde anschließend untersucht, ob das Kriterium Hydrophobizität auch an diesen Positionen wichtig ist. Eine Mutation der Leucine an Position 938 oder 939 zu Alanin, Valin oder Isoleucin zeigte den gleichen Effekt wie eine Mutation des Leucins 942: eine Mutation zu Alanin oder Valin verursachte eine Akkumulation in Punkten bei 25°C und Zurückhaltung des Ist2 in ER-ähnlichen Strukturen bei 37°C (Abb. 3.14). Keinen Einfluss auf den Transport von Ist2 hatte die Mutation von einem der vier Leucine der K/L-Sequenz zu Isoleucin: Verglichen mit der Lokalisation von YFP-Ist2 war kein Unterschied erkennbar. Es konnte festgestellt werden, dass Mutation des Leucins 939 zu Alanin oder Valin den Transport von YFP-Ist2 geringfügig stärker beeinträchtigte als Mutation des Leucins 938. Die Doppelmutation der Leucine an Position 938 und 939 zu zwei Alaninen oder Valinen verursachte sogar eine Verstärkung des Phänotyps: Die Akkumulation in Punkten bzw. die Zurückhaltung in ER-ähnlichen Strukturen waren bei beiden Temperaturen ausgeprägter als bei den Einzelmutationen (Abb. 3.14). Das Leucin an Position



anschließend mit Glukose bei 37°C inkubiert wurde, verschwanden fast die gesamten Ist2 L942V Punkte, so dass sich Ist2 L942V hauptsächlich an der Zellperipherie befand (Abb. 3.15 A).



**Abbildung 3.15: Die Proteinakkumulation von Ist2 L942V in Punkten ist abhängig von Temperatur und Energie.** A) Expression von YFP-Ist2 und YFP-Ist2 L942V in  $\Delta ist2$  Zellen. Nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25°C wurden die Kulturen anschließend entweder bei 25°C oder bei 37°C für eine weitere Stunde mit Glukose (Glc) inkubiert. B) Für die Quantifizierung wurde die Expression von YFP-Ist2 L942V für 2 h mit Galaktose bei 25°C induziert und die Kultur anschließend bei 37°C entweder mit Glukose (Glc, Dreiecke) oder Glukose und Natriumazid (Glc + Azid, Kreise) inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden über 100 Zellen ausgewertet und die Anzahl der Zellen mit Ist2 L942V Punkten bestimmt.

Das Verschwinden von Ist2 L942V Punkten bei erhöhter Temperatur war abhängig von Energie. Dies war erkennbar, wenn die Expression von Ist2 L942V für 2 h mit Galaktose bei 25°C induziert und die Kultur anschließend bei 37°C entweder mit Glukose oder Glukose und Natriumazid inkubiert wurde, um eine ATP-Depletierung in den Zellen zu erreichen (Quantifizierung in Abb. 3.15 B). Das Verschwinden von Proteinpunkten bei erhöhter Temperatur wurde jedoch nicht bei Ist2-Mutanten mit besonders stark ausgeprägten Proteinakkumulationen wie bei Ist2 L942Q beobachtet (vgl. Abb. 3.10).

Zusammenfassend zeigt die Analyse der K/L-Sequenz, dass die Leucine für den Transport von Ist2 essentiell sind. Die Leucine der K/L-Sequenz können funktionell nur durch sehr hydrophobe oder sperrige Aminosäuren ersetzt werden, andernfalls verursacht die Mutation eine Akkumulationen von Ist2 in Punkten. Die Mutante YFP-Ist2 L942Q ist

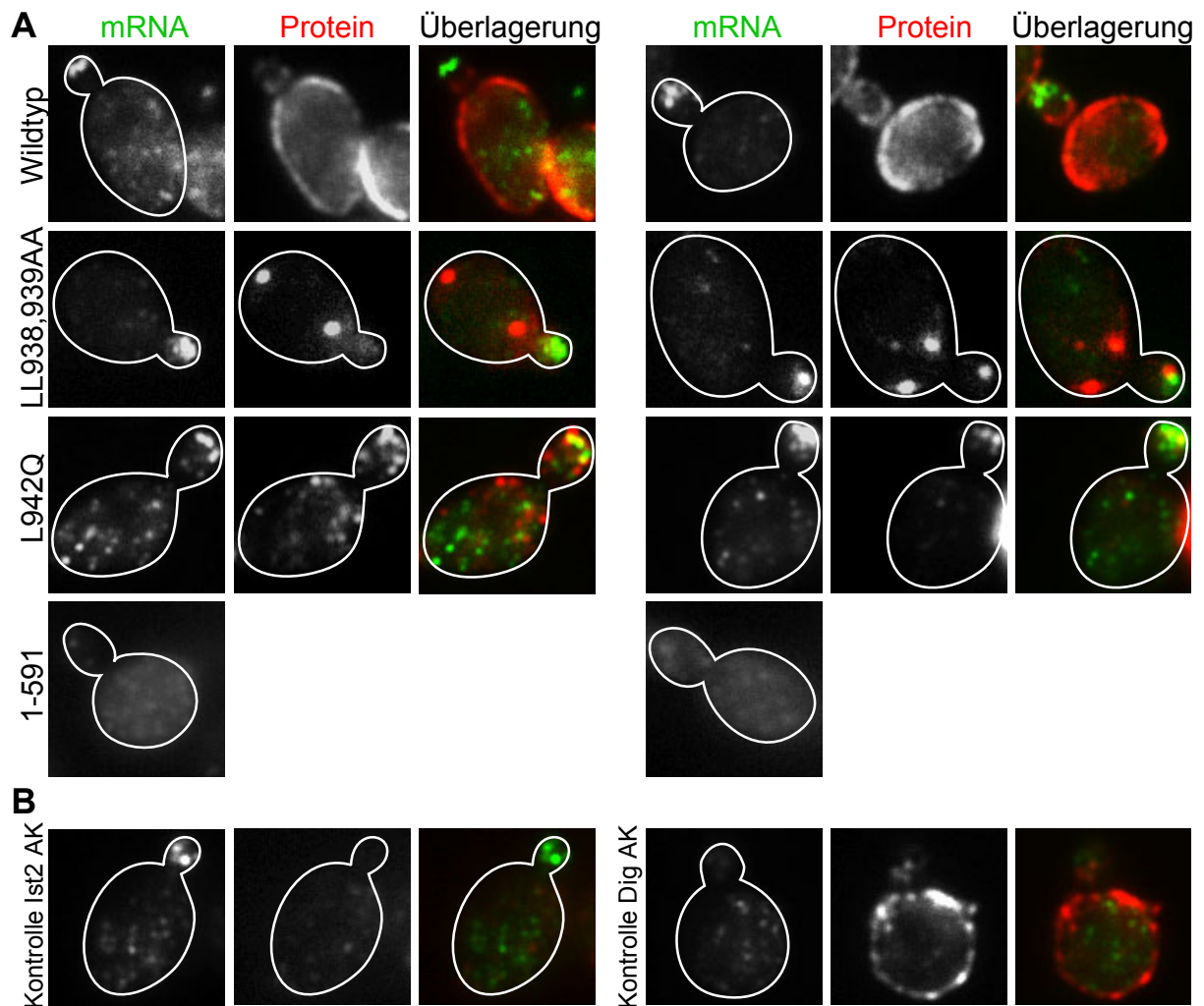
ein integrales Membranprotein, welches über einen Zeitraum von 3 h hinweg stabil bleibt. Des Weiteren korreliert das Ausmaß der Akkumulation in Punkten mit der Menge des synthetisierten Proteins, wobei die Akkumulation bei Ist2-Mutanten mit einem niedrigen Expressionslevel abhängig von Temperatur und Energie ist.

### 3.5.2 Die *IST2*-mRNA-Lokalisation von Leucin-Mutanten korreliert nicht mit der Akkumulation von Ist2-Protein

Da die Expression von Ist2 in Tochterzellen von der Lokalisation der *IST2*-mRNA an die Tochterzellspitze abhängig ist, ergab sich die Frage, ob der Transport des Ist2-Proteins an die Zellperipherie ein Prozess ist, der an die lokale Translation gekoppelt ist. In diesem Fall würde sich - wenn der Proteintransport durch eine Ist2-Punktmutation beeinträchtigt wäre - das frisch synthetisierte Protein aufgrund des Transportdefekts am Translationsort ansammeln und die beobachtete Akkumulation in Punkten hervorrufen.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die Lokalisation sowohl von *IST2*-mRNA als auch von Ist2-Protein in Hefestämmen analysiert, die unter endogenem Promotor entweder Ist2 oder mutierte Ist2-Allele (LL938,939AA und L942Q) oder die C-terminal verkürzte Ist2-Mutante Ist2 (1-591) exprimierten. Die Detektion der *IST2*-mRNA wurde mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) durchgeführt, wobei eine Mischung aus vier verschiedenen Digoxigenin-markierten mRNA Sonden verwendet wurde, die jeweils 200-300 nt lang waren und über den kodierenden Bereich von *IST2* verteilt waren. Parallel dazu wurde in denselben Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz (IF) Ist2-Protein mit spezifischen Ist2-Antikörpern (siehe Kapitel 3.6.3, Seite 84), die den C-Terminus von Ist2 erkennen, sichtbar gemacht.

In Abb. 3.16 sind pro verwendetem Konstrukt zwei repräsentative Beispiele gezeigt. In Zellen, die Wildtyp Ist2 exprimierten, war ein klares Signal der *IST2*-mRNA (in Grün) an der Tochterzellspitze und Ist2-Protein (in Rot) an der Zellperipherie erkennbar. Bei sehr kleinen Tochterzellen (linke Spalte) befand sich direkt an der Spitze noch kein Ist2-Protein, obwohl die *IST2*-mRNA schon detektierbar war. Dies ist in Einklang mit einer Arbeit von Aronov et al.: Bei der Analyse von polarisierten mRNAs und dem entsprechenden Protein wurde herausgefunden, dass die untersuchten mRNAs mindestens 20 min vor Detektion des Proteins schon sichtbar waren (Aronov et al., 2007). Ebenso wurde bei der Ist2-Mutante LL938,939AA in kleinen Tochterzellen (linke Spalte) nur die mRNA, aber noch kein mutiertes Protein detektiert, stattdessen befand sich Ist2 LL938,939AA nur in der Mutterzelle in zwei großen Proteinakkumulationen. In größeren Tochterzellen (rechte Spalte) überlappten die mRNA- und Proteinsignale minimal, so dass sich das Ist2 LL938,939AA Protein direkt neben der *IST2*-mRNA befand. Bei der zweiten untersuchten Mutante Ist2 L942Q waren die Proteinsignale weniger deutlich ausgeprägt als bei Ist2 LL938,939AA. Die Signale von Ist2 L942Q Protein und mRNA überlappten in den Tochterzellen teilweise, aber nicht vollständig.



**Abbildung 3.16: Lokalisation von *IST2*-mRNA und Ist2-Protein.** A) Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) und indirekte Immunfluoreszenz (IF) von *IST2*-mRNA (in Grün) und Ist2-Protein (in Rot) in  $\Delta ist2$  Zellen, die entweder Wildtyp Ist2, Ist2 LL938,939AA, Ist2 L942Q oder C-terminal verkürztes Ist2 (1-591) unter endogenem Promotor exprimierten. Detektiert wurde die *IST2*-mRNA mit einer Mischung aus vier Ist2-spezifischen Digoxigenin-markierten Sonden und Ist2-Protein mit spezifischen Ist2-Antikörpern. Die Digoxigenin-markierten Sonden wurden in Kollaboration mit Ralf-Peter Jansen hergestellt. Zur erleichterten Darstellung wurden die Zellgrenzen mit einer weißen Linie nachgezeichnet. B) Die Ist2- und Digoxigenin-Antikörper sind spezifisch: Bei Detektion der *IST2*-mRNA mittels FISH und zusätzlicher Inkubation mit Ist2-Antikörpern (Kontrolle Ist2 AK) und Detektion des Ist2-Proteins mittels IF und zusätzlicher Inkubation mit Digoxigenin-Antikörpern (Kontrolle Dig AK) war nur das Signal der *IST2*-mRNA bzw. des Ist2-Proteins erkennbar.

Bei dem C-terminal verkürzten Ist2 (1-591) fehlt die Bindungsstelle für She2-Protein an Position AS 898-928 (Olivier et al., 2005). Dadurch kann die mRNA nicht an die Tochterzellspitze transportiert werden und verbleibt in der Mutterzelle. Wenn - wie in diesem Fall - ein endogener Promotor vorhanden ist, werden nur ca. 3-5 Kopien der mRNA transkribiert. Diese äußerst geringe Anzahl kann nur detektiert werden, wenn die mRNAs an einem einzelnen Punkt akkumulieren, ansonsten kann das Signal einer einzelnen mRNA in

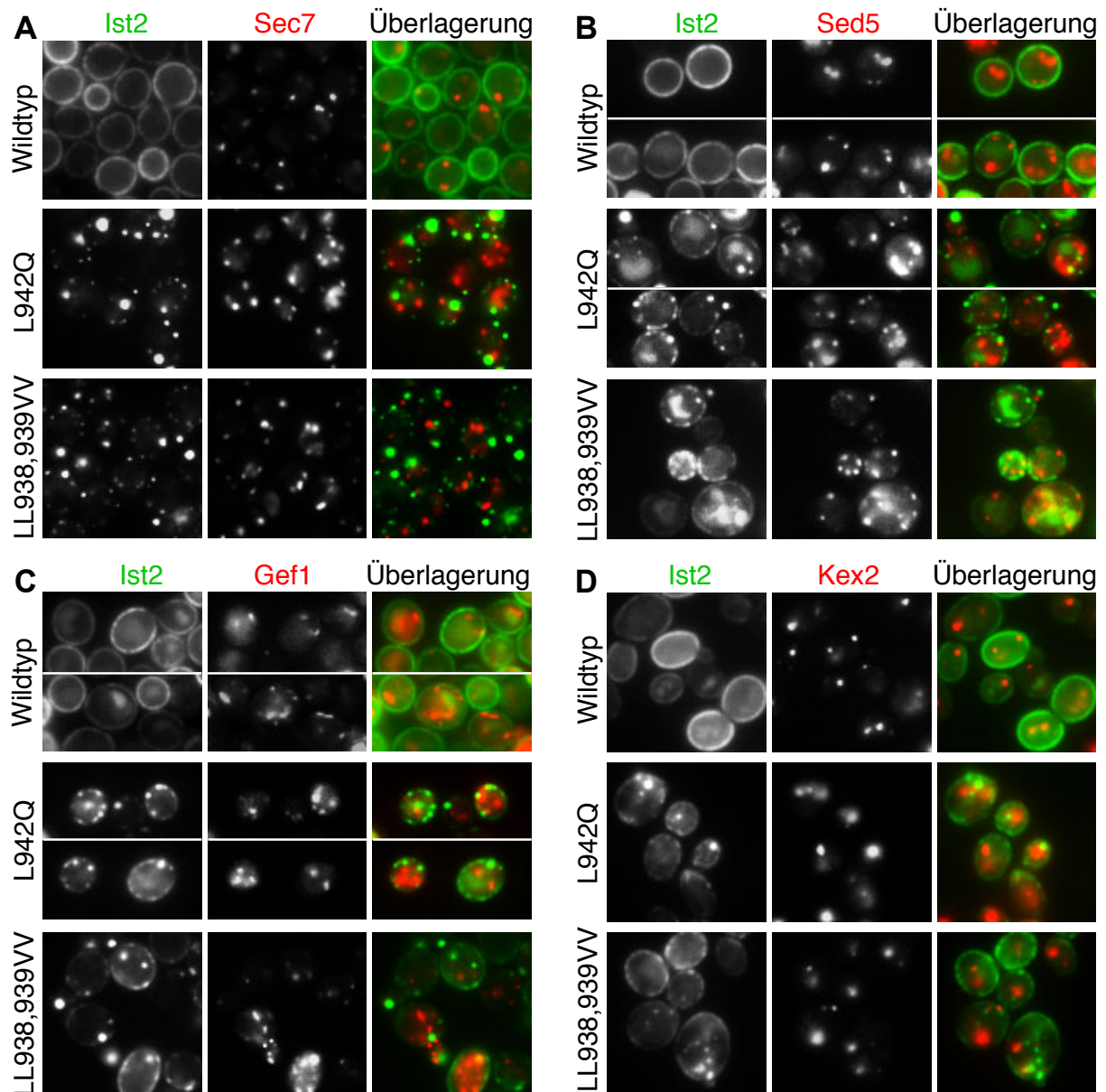
diesem Versuchsaufbau nicht aufgelöst werden. Deswegen konnte bei der mRNA von Ist2 (1-591) nur ein schwaches Hintergrundsignal detektiert werden. Da die Ist2-Antikörper gegen den C-Terminus von Ist2 gerichtet sind, welcher bei dem Konstrukt Ist2 (1-591) fehlt, wurde bei diesem Hefestamm nur die mRNA analysiert.

Aufgrund technischer Schwierigkeiten war als Kontrolle ein  $\Delta ist2$  Hefestamm leider nicht verfügbar. Daher wurden zwei Spezifitätskontrollen der verwendeten Antikörper durchgeführt: Um die Spezifität der Ist2-Antikörper zu überprüfen, wurde die *IST2*-mRNA mittels FISH detektiert, wobei die Probe zusätzlich mit Ist2-Antikörpern inkubiert wurde (Kontrolle Ist2 AK, Abb. 3.16 B). Umgekehrt wurde das Ist2-Protein mittels IF detektiert, wobei die Probe zusätzlich mit Digoxigenin-Antikörpern inkubiert wurde (Kontrolle Dig AK). Die verwendeten Antikörper waren spezifisch, da bei dem FISH-Experiment (Kontrolle Ist2 AK) nur die *IST2*-mRNA an der Spitze der Tochterzelle und bei dem IF-Experiment (Kontrolle Dig AK) nur Ist2-Protein an der Zellperipherie nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass der Proteintransport von Ist2 nicht direkt an die mRNA-Lokalisation gekoppelt ist. Dies beruht auf der Beobachtung, dass mutiertes Ist2 zum Teil in der Nähe der dazugehörigen mRNA nach der Translation akkumulierte, jedoch keine vollständige Kolo-kalisation detektiert werden konnte.

### 3.5.3 Mutiertes Ist2 akkumuliert an spezifischen Domänen des ER

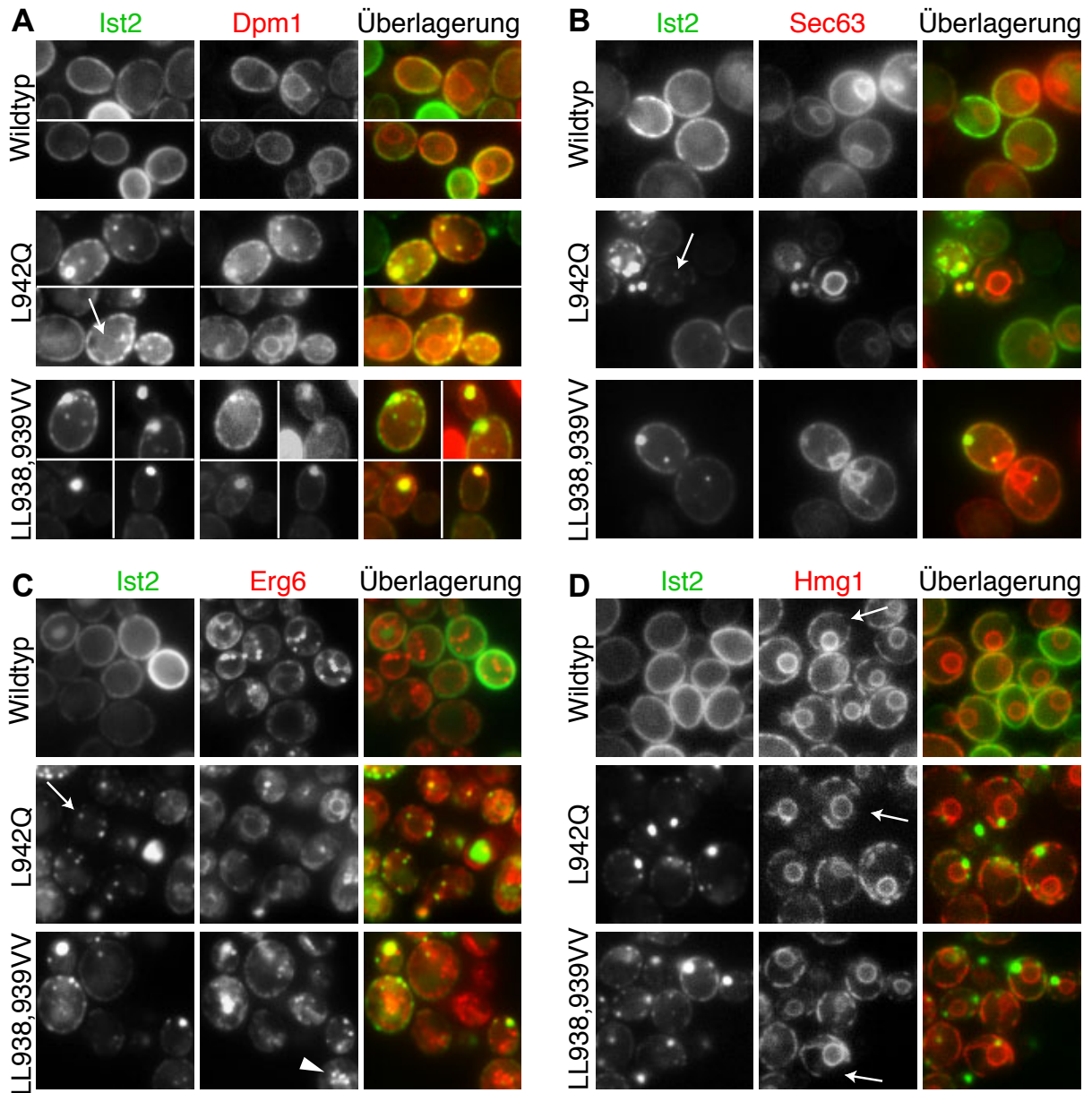
Um herauszufinden, in welchen Strukturen sich die Proteinakkumulationen der Leucin-Mutanten befinden, wurden Kolo-kalisationsstudien durchgeführt. Neben mutiertem Ist2 (L942Q und LL938,939VV) wurden in demselben Hefestamm verschiedene Markerproteine exprimiert, die jeweils spezifisch für ein bestimmtes Organell sind. Sed5 ist als t-SNARE beim Vesikeltransport innerhalb *cis*-Golgi-Apparat beteiligt, und Sec7 ist ein Guaninnukleotid Austauschfaktor (GEF) für ADP-Ribosylierungsfaktoren im Golgi-Apparat (Mosesso et al., 2003a; Sata et al., 1998). Sowohl der Chloridkanal Gef1 wie auch die Serinprotease Kex2 sind Markerproteine vom *trans*-Golgi-Apparat bis hin zu Endosomen (Schwappach et al., 1998; Gaxiola et al., 1999; Fuller et al., 1989a,b). Weder Wildtyp Ist2 noch mutiertes Ist2 kolo-kalisierte mit Sec7, Sed5, Gef1 und Kex2 (Abb. 3.17 A-D). Dies zeigt, dass mutiertes Ist2 weder im Golgi-Apparat (Sec7, Sed5, Gef1 und Kex2) noch in Endosomen (Gef1 und Kex2) zurückgehalten wurde.



**Abbildung 3.17: Weder Wildtyp Ist2 noch mutiertes Ist2 kolokalisieren mit dem Golgi-Apparat oder Endosomen.** A) Lokalisation von GFP-Ist2, GFP-Ist2 L942Q und GFP-Ist2 LL938,939VV nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25°C in  $\Delta ist2$  Zellen, die Sec7-dsRed koexprimierten. B-D) Lokalisation von mCherry-Ist2, mCherry-Ist2 L942Q und mCherry-Ist2 LL938,939VV nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25°C in  $\Delta ist2$  Zellen, die Sed5-GFP (B), Gef1-GFP (C) koexprimierten bzw. in Wildtypzellen, die Kex2-GFP (D) koexprimierten. Alle Konstrukte, die für Ist2 bzw. mutiertes Ist2 kodierte, enthielten den *GAL1*-Promotor und wurden in Grün dargestellt. Die Lokalisation der restlichen Proteine erfolgte mit einer roten Kennzeichnung.

Dagegen kolokalisierte mutiertes Ist2 mit den ER-Markern Dpm1 und Sec63 (Abb. 3.18 A und B). Dpm1 ist ein integrales ER-Membranprotein und synthetisiert Dolichol-Phosphat-Mannose, das für Glykosylierungen im ER-Lumen benötigt wird (Orlean et al., 1988; Faulhammer et al., 2005). Sec63 ist Teil des Translokation-Apparates im ER (Lyman und

Schekman, 1997). Eine deutliche Überlappung der Signale war erkennbar bei Dpm1 und Ist2 L942Q an zwei Punkten in der Mutterzelle und einem Punkt an der Spitze der Tochterzelle (Abb. 3.18 A, oberes Bild). Schwach erkennbar war in einigen Zellen auch eine Kolokalisation beim perinukleären ER (weißer Pfeil in Abb. 3.18 A). Ist2 LL938,939VV

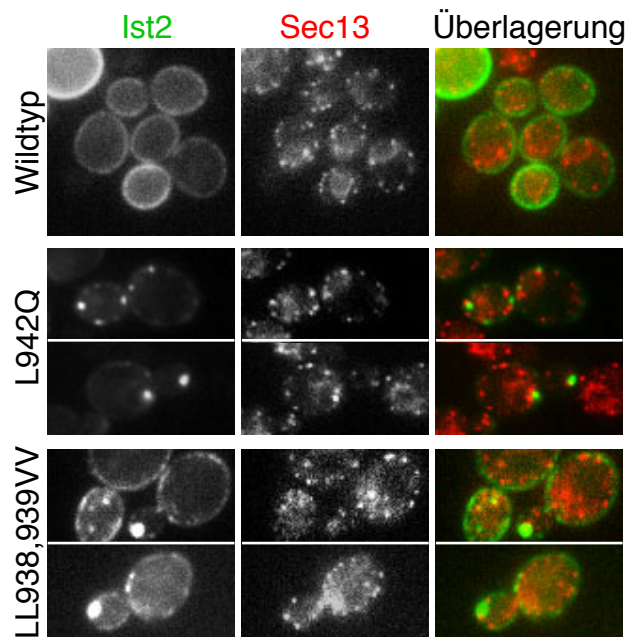


**Abbildung 3.18: Ist2 kolokalisiert mit speziellen Domänen des ER.** Lokalisation von mCherry-Ist2, mCherry-Ist2 L942Q und mCherry-Ist2 LL938,939VV nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25°C in Wildtypzellen, die Dpm1-GFP (A) koexprimierten bzw. in  $\Delta ist2$  Zellen, die Sec63-GFP (B), Erg6-GFP (C) oder Hmg1-GFP (D) koexprimierten. Alle Konstrukte, die für Ist2 bzw. mutiertes Ist2 kodierten, enthielten den *GAL1*-Promotor und wurden in Grün dargestellt. Die Darstellung der restlichen Proteine erfolgte mit einer roten Kennzeichnung.

kolokalisierte mit Dpm1 bei Akkumulation von Ist2 in Punkten an der Tochterzellspitze sowie zwischen Tochter- und Mutterzelle. Ebenso überlappten die Signale von Sec63 und Ist2 L942Q bei einzelnen distinkten Punkten in der Tochterzelle sowie am pER (weißer Pfeil in Abb. 3.18 B). Sec63 und Ist2 LL938,939VV kolokalisierten in Punkten am pER. Sowohl bei Dpm1 wie auch bei Sec63 war eine Veränderung des ERs (punktartige Strukturen oder kleine Ausstülpungen des ERs) erkennbar, wenn mutiertes Ist2 koexprimiert wurde. Dies war nicht bei Koexpression von YFP-markiertem Wildtyp Ist2 zu erkennen. Erg6 wird bei der Ergosterolsynthese benötigt und ist Bestandteil von Lipidpartikeln, sogenannten *lipid droplets*, die sich vom ER abschnüren (Koffel et al., 2005). Eine Kolokalisation von Erg6 mit mutiertem Ist2 war meist nur erkennbar, solange Erg6 sich noch am pER befand (weißer Pfeil in Abb. 3.18). Bei den meisten Erg6-positiven Lipidpartikeln konnte keine Kolokalisation mit mutiertem Ist2 beobachtet werden (weiße Pfeilspitze in Abb. 3.18). Bei Hmg1, der HMG-CoA-Reduktase im ER, welche bei der Sterolsynthese beteiligt ist, war keine Kolokalisation mit mutiertem Ist2 erkennbar. Proteinakkumulationen von mutiertem Ist2 befanden sich dagegen sehr oft direkt neben dem pER, welches durch Hmg1-GFP sichtbar gemacht wurde; eine direkte Überlappung der Signale war jedoch im Gegensatz zu Dpm1 und Sec63 nicht erkennbar. Die fleckartige Verteilung von Hmg1 am kortikalen ER, welche oft unterbrochen war (siehe weiße Pfeile in Abb. 3.18 D), lag nicht an der Koexpression von mutiertem Ist2, da diese Strukturen auch bei Koexpression von mCherry-markiertem Wildtyp Ist2 auftraten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mutiertes Ist2 mit den ER-Markern Dpm1, Sec63 und Erg6 kolokalisiert, jedoch nicht mit dem ER-Marker Hmg1. Des Weiteren veränderte mutiertes Ist2 die Lokalisation von Dpm1 und Sec63, jedoch nicht von Hmg1. Es bleibt offen, ob mutierte Ist2-Moleküle Dpm1 bzw. Sec63 zu den Ist2-Akkumulationen in Punkten rekrutierte und dadurch die beobachtete Veränderung des ERs verursachte. Diese Ergebnisse zeigen, dass mutiertes Ist2 sich an speziellen ER-Domänen aufhält, an denen nur eine bestimmte Sorte von Proteinen lokalisiert ist.

Obwohl Wildtyp Ist2 nicht über den klassischen sekretorischen Weg transportiert wird, wäre es möglich, dass mutiertes Ist2 aufgrund der Punktmutation zu einem Substrat für den klassischen sekretorischen Weg wird. Um herauszufinden, ob mutiertes Ist2 an Transportstellen des klassischen sekretorischen Weges akkumuliert, wurde Ist2 mit Sec13 koexprimiert. Sec13 ist ein Bestandteil der COPII-Hüllproteine und markiert die klassischen ER-*exit sites* (ERES). ERES sind die ER-Strukturen, an denen *Cargo* vom ER kommend in Vesikel verpackt und zum Golgi-Apparat transportiert wird (Connerly et al., 2005; Barlowe et al., 1994). Mutiertes Ist2 segregiert deutlich von den klassischen ERES, welche durch Sec13 sichtbar gemacht wurden (Abb. 3.19).

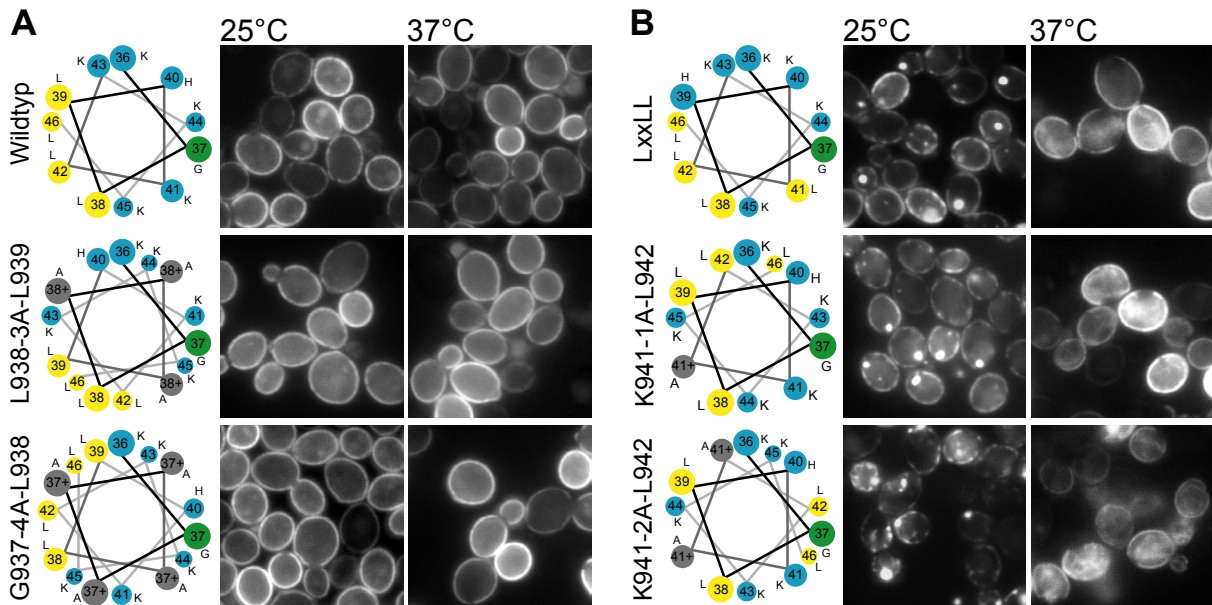


**Abbildung 3.19: Ist2 kolokalisiert nicht mit klassischen COPII-ER *exit sites*.** Lokalisation von mCherry-Ist2, mCherry-Ist2 L942Q und mCherry-Ist2 LL938,939VV nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25°C in  $\Delta ist2$  Zellen, die Sec13-GFP koexprimierten.

#### 3.5.4 Die Funktion der K/L-Sequenz ist abhängig von der Anordnung der hydrophoben und basischen Aminosäuren in einer $\alpha$ -Helix

Ähnlich wie bei Sar1 könnte bei Ist2 die Ausbildung einer amphipathischen Helix (siehe Kapitel 3.4, Seite 56) eine Membrankrümmung initiieren und dadurch beim Transport von Ist2 an die Zellperipherie eine wichtige Rolle spielen. Die Analyse der Leucine in der K/L-Sequenz ergab, dass bis auf L946 alle Leucine in gleichem Ausmaß wichtig für den Transport von Ist2 an die Zellperipherie sind (siehe Kapitel 3.5.1, Seite 57). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob die  $\alpha$ -helikale Struktur der C-terminalen elf Aminosäuren von Ist2 für die Funktion des Ist2-Sortierungssignals notwendig ist.

Wenn die C-terminalen elf Aminosäuren von Ist2 in einer Projektion als helikales Rad dargestellt werden (Abb. 3.20), sind bei Wildtyp Ist2 die hydrophoben Leucine (in Gelb gekennzeichnet) alle auf einer Seite der Helix in einem kleinen Winkel lokalisiert. Wenn der Querschnitt der Helix als zweidimensionaler Kreis betrachtet wird, bildet der Bereich der Leucine in diesem Kreis einen Winkel von 120 Grad. Falls die C-terminalen elf Aminosäuren von Ist2 eine amphipathische Helix ausbilden müssen, um den funktionellen Transport von Ist2 zu gewährleisten, sollte der Transport an die Zellperipherie beeinträchtigt werden, sobald die Leucine nicht mehr in dem engen Winkel von 120 Grad vorliegen, sondern über die ganze Helix verteilt sind. Um dies zu überprüfen, wurden an verschiedenen Stellen ein bis vier Alanine inseriert, bzw. wurde die Reihenfolge der Leucine geändert, um die Verteilung der Leucine über die Helix so zu ändern, dass dadurch der Winkel der Leucine erweitert oder verkleinert wurde.

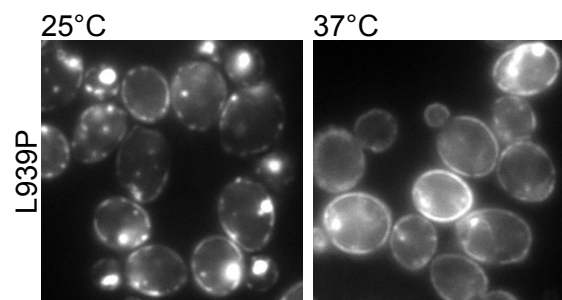


**Abbildung 3.20: Die Funktion der hydrophoben Leucine der K/L-Sequenz ist abhängig von ihrer Position in einer amphipathischen  $\alpha$ -Helix.** Lokalisation von Wildtyp YFP-Ist2 und den angegebenen YFP-Ist2-Mutanten nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25 oder 37°C in *sec23-1* Zellen. Hydrophobe Leucine sind in Gelb gekennzeichnet, basische Aminosäuren in Blau, inserierte Alanine in Grau und Glycin in Grün. Zur Vereinfachung wurden nur die letzten zwei Positionen bei der Nummerierung der Aminosäuren dargestellt: Lysin 36 ist somit Lysin an Position 936.

Durch Insertion von drei Alaninen wurde eine zusätzliche Helixwindung hinzugefügt, wodurch die Leucine sogar in einem engeren Winkel angeordnet waren als beim Wildtyp, nämlich in einem Winkel von 80 Grad (L938-3A-L939, Abb. 3.20 A). Bei dieser Mutation wurde Ist2 in *sec23-1* Zellen an die Zellperipherie transportiert. Ebenso wurde bei Insertion von vier Alaninen (G937-4A-L938) keine Beeinträchtigung des Transports beobachtet (Abb. 3.20 A). Bei dieser Mutation waren die Leucine wie bei Wildtyp Ist2 in einem Winkel von 120 Grad angeordnet.

Wenn nun der Winkel der Leucine auf 160, 200 oder sogar 240 Grad erweitert wurde, war eine zunehmende Akkumulation von Ist2 im ER erkennbar (Abb. 3.20 B). Wenn die Reihenfolge der Leucine so geändert wurde, dass das Leucin an Position 939 um zwei Positionen in Richtung des C-Terminus verschoben ist, ergibt sich daraus die Mutation LxxLL (statt LLxxL beim Wildtyp), bei der die Leucine in einem Winkel von 160 Grad angeordnet sind und der Winkel der basischen Aminosäuren, verglichen mit Wildtyp Ist2, verkleinert ist. Bei 25°C wurde zusätzlich zum peripheren Ist2-Signal eine Akkumulation in großen Punkten sowohl an der Zellperipherie als auch im Zellinneren beobachtet. Nach Block des sekretorischen Weges bei 37°C wurde - verglichen mit Wildtyp Ist2 - ein geringer Teil des mutierten Ist2 in ER-ähnlichen Strukturen zurückgehalten. Durch Insertion eines Alanins nach dem Lysin an Position 941 (K941-1A-L942) verteilten sich die Leucine in einem Winkel von 200 Grad bzw. durch Insertion von zwei Alaninen an derselben Stelle

(K941-2A-L942) in einem Winkel von 240 Grad. Der amphipathische Charakter der Helix war bei diesen Mutationen fast nicht mehr vorhanden, da die hydrophoben Leucine auch auf der basischen Seite der Helix verteilt wurden und somit weder ein vorwiegend hydrophober noch ein vorwiegend basischer Teil der Helix existierte. Je breiter der Winkel der Leucine in der Helix gewählt wurde, desto stärker wurde der Transport von Ist2 an die Zellperipherie beeinträchtigt. Bei 25°C war eine Akkumulation von Ist2 K941-1A-L942 in Punkten an der Zellperipherie und im Zellinneren erkennbar. Bei der Mutationen K941-2A-L942 akkumulierte Ist2 bei 25°C häufiger und in größeren Punkten als bei der Mutation Ist2 K941-1A-L942. Bei 37°C nahm - verglichen mit Ist2 LxxLL - die Ansammlung von Ist2 K941-1A-L942 und Ist2 K941-2A-L942 in ER-ähnlichen Strukturen zu. Des Weiteren führte die Insertion eines Prolins in die vorhergesagte amphipathische Helix zu einer starken Beeinträchtigung des Ist2-Transports an die Zellperipherie. Die Punktmutation Ist2 L939P wurde ursprünglich bei der zufallsbedingten Mutagenese (siehe Kapitel 3.9, Seite 58) gefunden. Dieses Allel wurde daraufhin in *sec23-1* Zellen analysiert (Abb. 3.21). Sowohl bei 25°C und 37°C wurde der Transport von Ist2 an die Zellperipherie gestört und Ist2 L939P akkumulierte im Zellinneren.



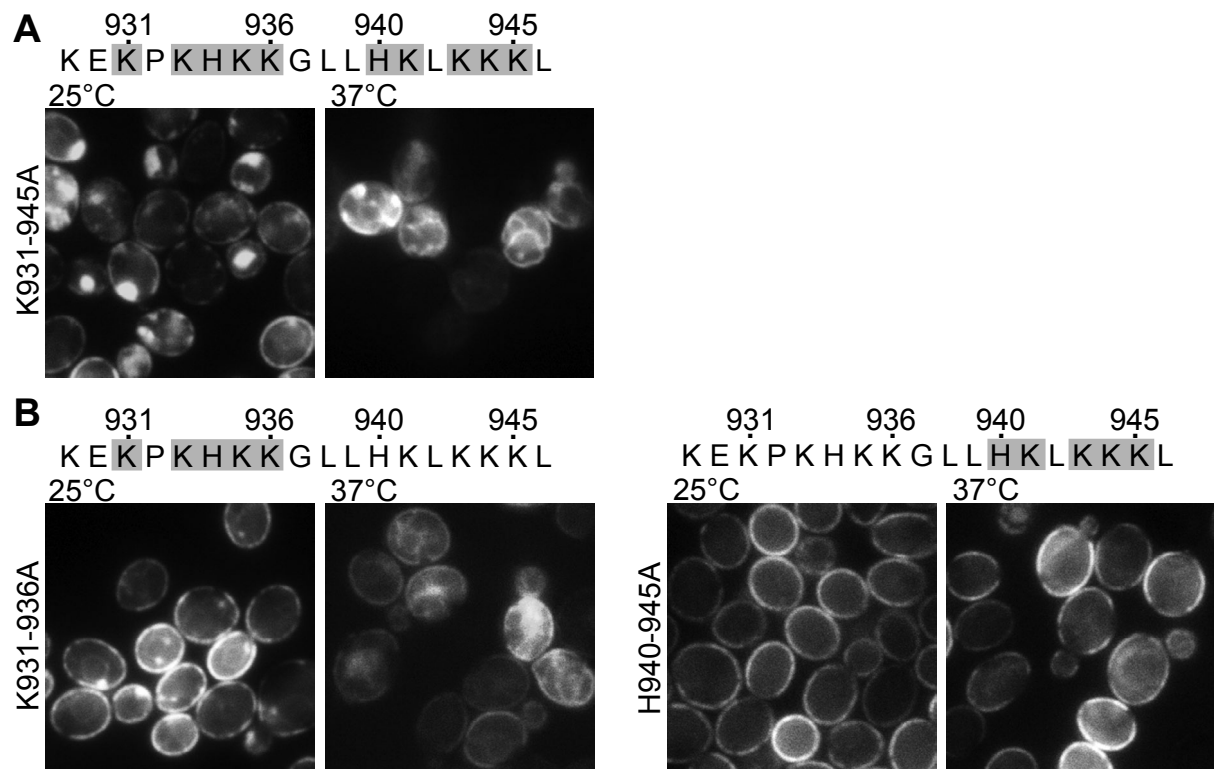
**Abbildung 3.21:** Die Insertion eines Prolins in die K/L-Sequenz beeinträchtigt den Transport von Ist2. Lokalisation von YFP-Ist2 L939P nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25 oder 37°C in *sec23-1* Zellen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die hydrophoben Leucine der K/L-Sequenz in einem engen Winkel auf einer Seite einer amphipathischen Helix angeordnet sein müssen, um den Sec-unabhängigen Transport von Ist2 zur Zellperipherie zu gewährleisten.

### 3.5.5 Die Position der Lysine in der K/L-Sequenz beeinflusst ihre Funktion

Viele kleine G-Proteine wie z.B. Rho-Proteine werden über polybasische Cluster, die an negativ geladene Phospholipide binden, an die Plasmamembran rekrutiert (Heo et al., 2006). Die K/L-Sequenz enthält neben den in Kapitel 3.5.1 beschriebenen Leucinen auch ungewöhnlich viele basische Aminosäuren. Diese neun Lysine und zwei Histidine der K/L-Sequenz könnten am zielgerichteten Transport von Ist2 an Domänen der Zellperipherie über eine Bindung an Lipide wie z.B. Phosphatidylinositol beteiligt sein. Daher wurde

durch eine Mutationsanalyse die Notwendigkeit der basischen Aminosäuren der K/L-Sequenz untersucht.

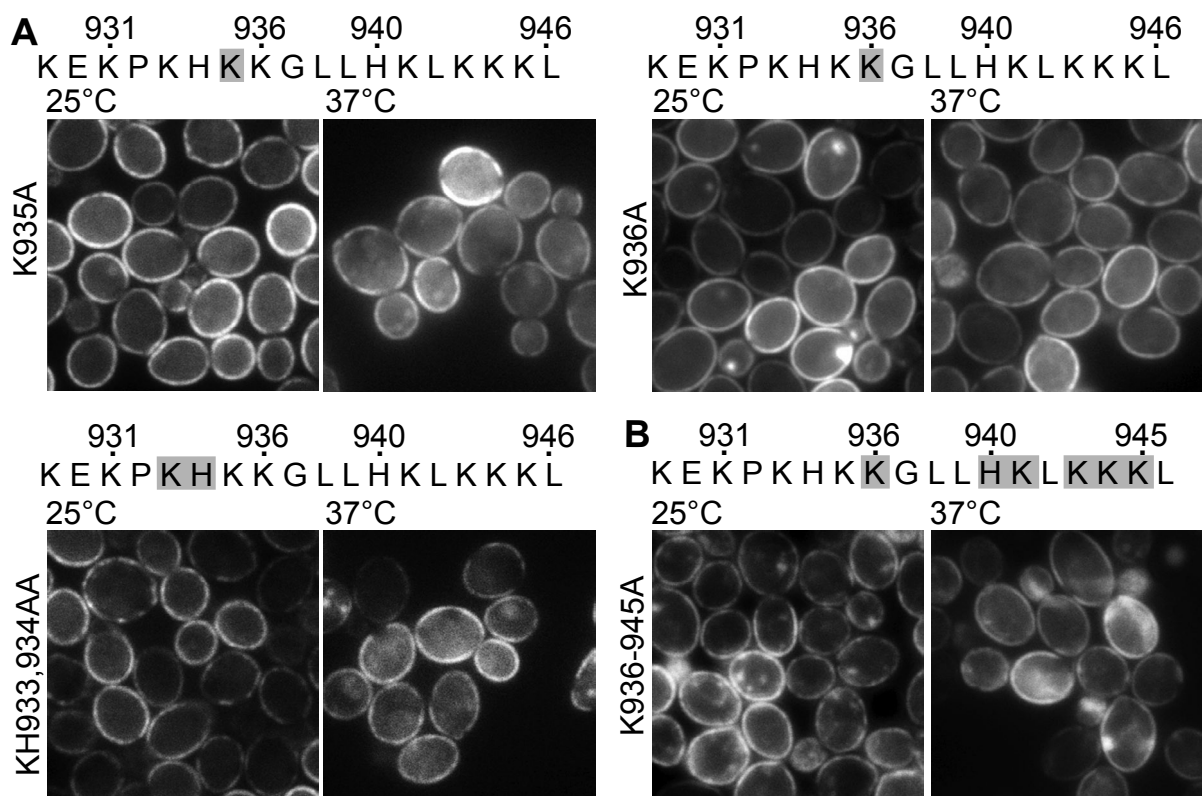


**Abbildung 3.22: Die Position der Lysine in der K/L-Sequenz beeinflusst ihre Funktion.** Lokalisation der angegebenen YFP-Ist2-Mutanten in *sec23-1* Zellen nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25 oder 37°C. Die grau schattierten Positionen wurden zu Alanin mutiert.

Mutation aller basischen Aminosäuren im Bereich 931-945 AS (acht Lysine und zwei Histidine) zu Alanin resultierte bei 25°C in einer starken Akkumulation von Ist2 K931-945A in intrazellulären Flecken und großen peripheren Punkten (Abb. 3.22 A). Bei 37°C akkumulierte Ist2 K931-945A in ER-ähnlichen Strukturen. Wenn die Lysine und Histidine der K/L-Sequenz in einen N- und einen C-terminalen Bereich eingeteilt wurden, die einzeln zu Alanin mutiert wurden, ergab sich ein positionsabhängiger Effekt. Die Mutation der basischen Aminosäuren des N-terminalen Bereichs (K931-936A, vier Lysine und ein Histidin) bewirkte bei 25°C eine Ansammlung des Proteins im pER mit zusätzlichen kleinen Punkten am pER. Bei 37°C verblieb der überwiegende Teil von Ist2 in ER-ähnlichen Strukturen (Abb. 3.22 B). Währenddessen wurde der Transport von Ist2 durch die Mutation des C-terminalen Bereichs (H940-945A, vier Lysine und ein Histidin) nicht beeinträchtigt: sowohl bei 25 wie auch bei 37°C lokalisierte Ist2 H940-945A an der Zellperipherie (Abb. 3.22 B).

Um anschließend herauszufinden, ob alle oder nur einzelne basische Aminosäuren in Ist2 K931-936A die Akkumulation im ER verursachten, wurden anschließend einzelne Aminosäuren in Ist2 K931-936 zu Alanin mutiert. In Abb. 3.23 A sind drei repräsentative

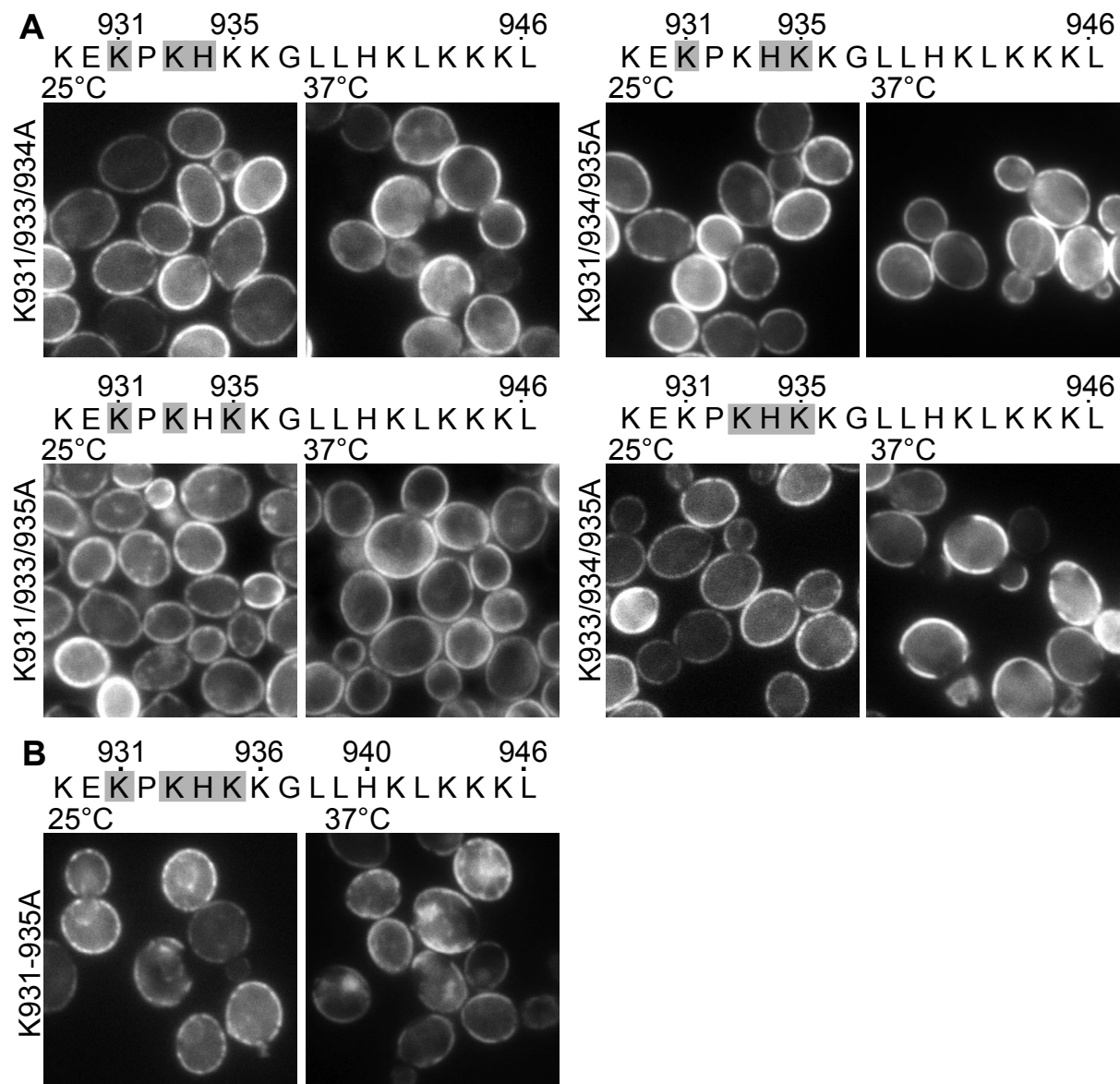
Mutanten gezeigt. Diese Analyse ergab, dass Lysin 936 eine spezielle Rolle spielt, da es die einzige basische Aminosäure war, die - sofern alleine mutiert - bei 25°C eine Proteinakkumulation von Ist2 und bei 37°C eine Zurückhaltung einer geringen Menge Ist2 K936A im ER hervorrief. Mutation von Ist2 K935 zu Alanin oder die Doppelmutante Ist2 K933,934A wiesen dagegen - verglichen mit Wildtyp Ist2 - fast keinen Transportdefekt auf: Ist2 war überwiegend an der Zellperipherie lokalisiert. Wenn Lysin 936 in Kombination mit dem C-terminalen Bereich (H940-945A) zu Alanin mutiert wurde (K936-945A, Abb. 3.23 B), ergab sich eine stärkere Beeinträchtigung des Transports von Ist2 bei 25 und 37°C als bei ausschließlicher Mutation des C-terminalen Bereichs (H940-945A, Abb. 3.22 B).



**Abbildung 3.23: Lysin 936 in der K/L-Sequenz hat eine spezielle Rolle beim Transport von Ist2.** A) Lokalisation von YFP-Ist2 K935A, K936A und KH933,934AA in *sec23-1* Zellen. B) Lokalisation von YFP-Ist2 K936-945A in *sec23-1* Zellen. Alle Konstrukte wurden für 120 min mit Galaktose bei 25 oder 37°C induziert. Die grau schattierten Positionen wurden zu Alanin mutiert.

Nachdem die Mutation einzelner basischer Aminosäuren im N-terminalen Bereich (K931-936A) kaum Einfluss auf den Transport von Ist2 ausübte, wurde daraufhin analysiert, wieviele basische Positionen in Ist2 K931-936A nötig sind für einen Transport von Ist2 an die Zellperipherie. Wenn verschiedene Kombinationen von jeweils drei positiven Resten im N-terminalen Bereich zu Alanin mutiert wurden, wurde nur ein äußerst geringer Teil von Ist2 im Zellinneren zurückgehalten (Abb. 3.24 A). Erst die Mutation von vier basischen

Aminosäuren (K931-935A, Abb. 3.24 B) bewirkte ein Zurückhalten von mutiertem Ist2 im Zellinneren, erkennbar durch ein Signal am pER bei 25°C und in ER-ähnlichen Strukturen bei 37°C.

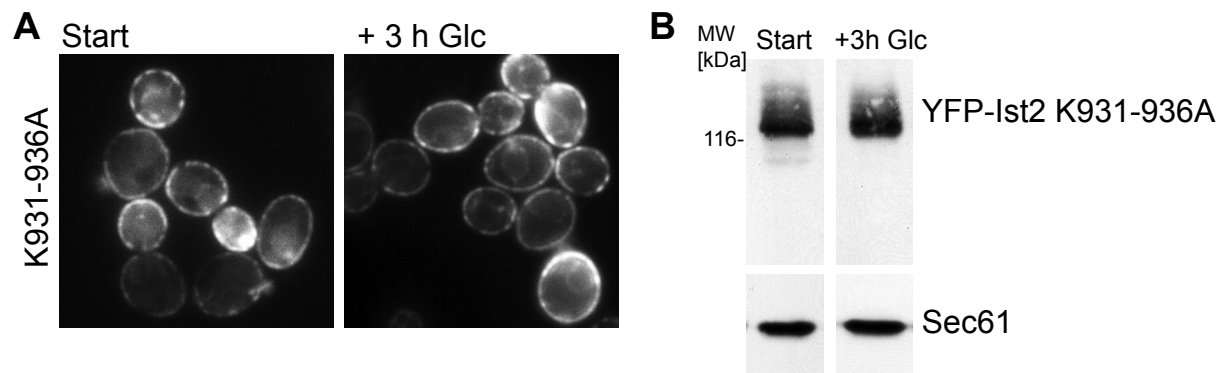


**Abbildung 3.24: Die Lysine N-terminal von K936 wirken in Kombination mit anderen Aminosäuren.** A) Lokalisation von YFP-Ist2 K931/933/934A, K931/933/935A, K931/934/935A und K933/934/935A in *sec23-1* Zellen. B) Lokalisation von YFP-Ist2 K931-935A (drei Lysine und ein Histidin) in *sec23-1* Zellen. Alle Konstrukte wurden für 120 min mit Galaktose bei 25 oder 37°C induziert. Die grau schattierten Positionen wurden zu Alanin mutiert.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass Lysin 936 eine additive Wirkung in Kombination mit dem C-terminalen Bereich hat (Abb. 3.23 B) und ferner die Lysine einen positionsabhängigen Effekt aufweisen: Für den Transport von Ist2 an die Zellperipherie werden mindestens zwei Lysine oder ein Lysin und ein Histidin im N-terminalen Bereich

in Kombination mit mehreren Lysinen im C-terminalen Bereich (Abb. 3.23 A und Abb. 3.24 A) benötigt. Alternativ können mindestens drei Lysine nur im N-terminalen Bereich der K/L-Sequenz den Transport von Ist2 an die Zellperipherie vermitteln (Abb. 3.22 B, 3.23 B).

Es wurde in dieser Arbeit in Abb. 3.5, Seite 54, gezeigt, dass HA-markiertes Wildtyp Ist2 unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors auch am pER detektiert werden kann. Der Transport von Wildtyp Ist2 durch das pER bis an die Peripherie verläuft jedoch sehr schnell. Da die meisten Lysin-Mutanten ebenfalls am pER detektiert wurden, stellte sich die Frage, ob sie sich auch nur für wenige Minuten am pER befinden. Daher wurde Ist2 K931-936A nach zweistündiger Induktion mit Galaktose für weitere drei Stunden mit Glukose inkubiert, um die weitere Transkription von *IST2*-mRNA zu inhibieren. Die Lokalisation von Ist2 K931-936A war nach den drei Stunden Inkubation mit Glukose unverändert: Das mutierte Ist2 verblieb in Strukturen des pER und zeigte im Western Blot weder Abbaubanden noch eine Abnahme der Proteinmenge (Abb. 3.25 A und B).

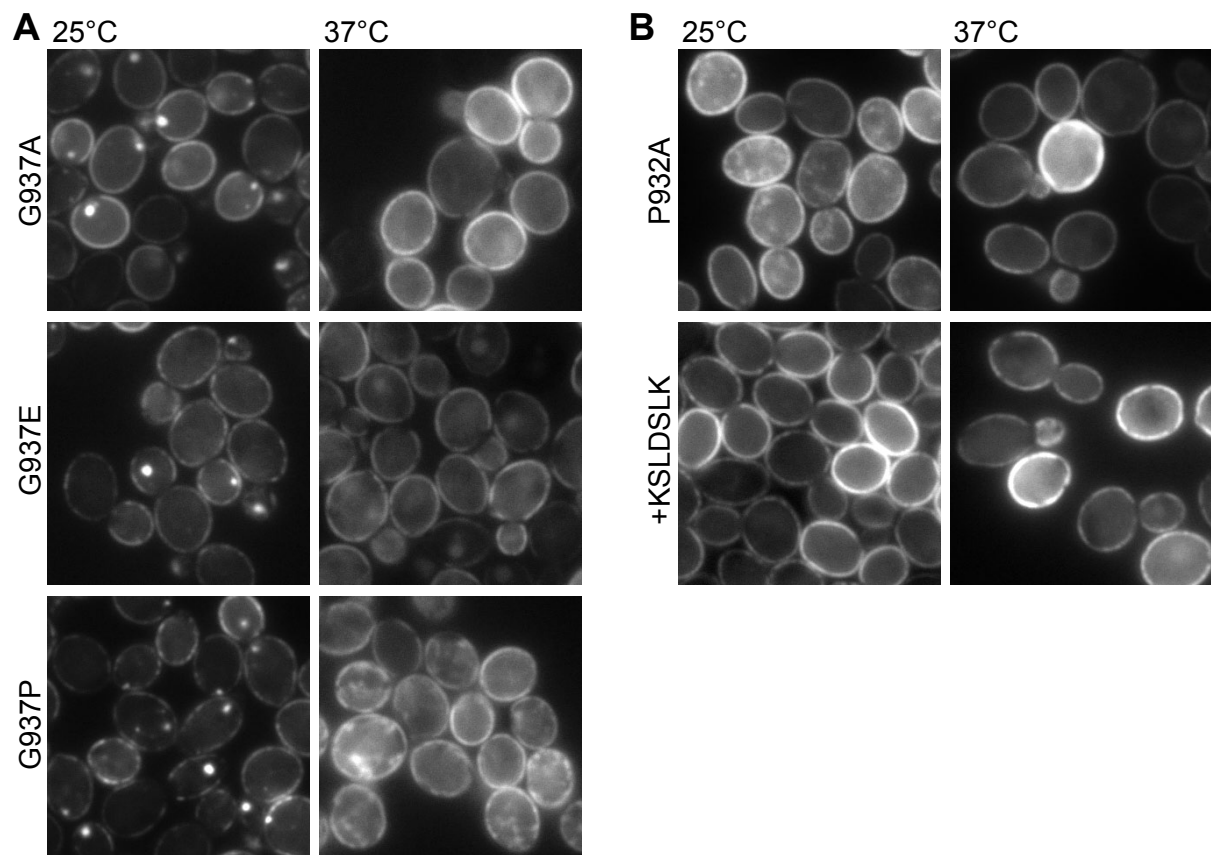


**Abbildung 3.25: YFP-Ist2 K931-936A ist ein sehr stabiles Protein.** Expression von YFP-Ist2 K931-936A in  $\Delta ist2$  Zellen. Nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25°C wurde die Kultur anschließend drei Stunden mit Glukose (Glc) inkubiert. A) Detektion der Fluoreszenz B) Western Blot von Gesamtzellextrakt von 0,1 OD<sub>600</sub> Zellen. Detektion mit Ist2- und Sec61-Antikörpern.

Abgesehen von den analysierten hydrophoben und basischen Aminosäuren enthält die K/L-Sequenz von Ist2 noch zwei weitere Aminosäuren: Prolin an Position 932 und Glycin an Position 937. Diese beiden Aminosäuren könnten durch ihre charakteristischen Seitenketten die Ausbildung der amphipathischen  $\alpha$ -Helix und dadurch den Transport von Ist2 beeinflussen. Proline sind aufgrund ihrer starren Seitenkette oft in Schleifen und nicht in  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblättern positioniert (Berg et al., 2002). Durch Mutation des Prolins findet laut Vorhersageprogramm AmphipaSeek (Sapay et al., 2006) eine Verlängerung der  $\alpha$ -Helix um elf Aminosäuren verglichen mit Wildtyp Ist2 statt. Glycin als Aminosäuren mit der kleinsten Seitenkette ruft keine Beschränkung der flankierenden Aminosäuren hervor. Da Glycin die zweite Aminosäure der amphipathischen Helix darstellt, kann durch einen Aminosäureaustausch die Ausbildung der Helix und somit der Transport von Ist2

an die Zellperipherie gestört werden.

Um dies zu untersuchen, wurde Glycin 937 zu Alanin (A), Glutaminsäure (E) oder Prolin (P) bzw. Prolin 932 zu Alanin mutiert. Mutation von Glycin 937 resultierte in allen drei Fällen bei 25°C in einer Akkumulation von Ist2 in kleinen Punkten in der Zellperipherie oder intrazellulär (Abb. 3.26 A). Bei G937P war in wenigen Zellen zusätzlich ein schwaches Signal am pER erkennbar. Bei 37°C zeigten die Mutationen G937A und G937E eine Lokalisation wie YFP-markiertes Wildtyp Ist2, nur bei der Mutation G937P verblieb ein geringer Teil des Ist2 in ER-ähnlichen Strukturen. Mutation des Prolins an Position 932 zu Alanin verursachte bei 25°C eine geringfügige Ansammlung von Ist2 in intrazellulären Flecken, die jedoch bei 37°C vollständig verschwanden (Abb. 3.26 B).



**Abbildung 3.26: Glycin 937, aber nicht Prolin 932, beeinflusst den Transport von Ist2.** A) Lokalisation von YFP-Ist2 G937A, G937E und G937P unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors in *sec23-1* Zellen nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25 und 37°C. B) Lokalisation von YFP-Ist2 P932A und YFP-Ist2 mit der C-terminalen Extension KSLDSLK unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors in *sec23-1* Zellen nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25 und 37°C.

Des Weiteren wurde analysiert, ob die Position des Ist2-Sortierungssignals am C-Terminus des Proteins am Sec-unabhängigen Transport beteiligt ist. Es wäre möglich, dass die C-terminalen Aminosäuren von Ist2 frei zugänglich für interagierende Transportfaktoren sein müssen. Daher wurde der Ist2-C-Terminus durch sieben weitere Aminosäuren mit

der Sequenz -KSLDSLK verlängert. Die Sequenz dieser Extension stammt vom Hefeprotein Snl1, dessen C-Terminus gewisse Sequenzhomologien zur Ist2-Sequenz 936-946 AS von *S. cerevisiae* zeigt. Die genaue Funktion von Snl1 ist unbekannt. Diese C-terminale Extension verursachte weder bei 25 noch bei 37°C eine Beeinträchtigung der peripheren Lokalisation von Ist2 (Abb. 3.26 B). Dieses Ergebnis ist in Einklang mit unveröffentlichten Ergebnissen von C. Jüschke und M. Seedorf: Ist2 lokalisierte in Wildtypzellen unter endogenem Promotor an der Zellperipherie, wenn es am C-Terminus mit YFP markiert wurde.

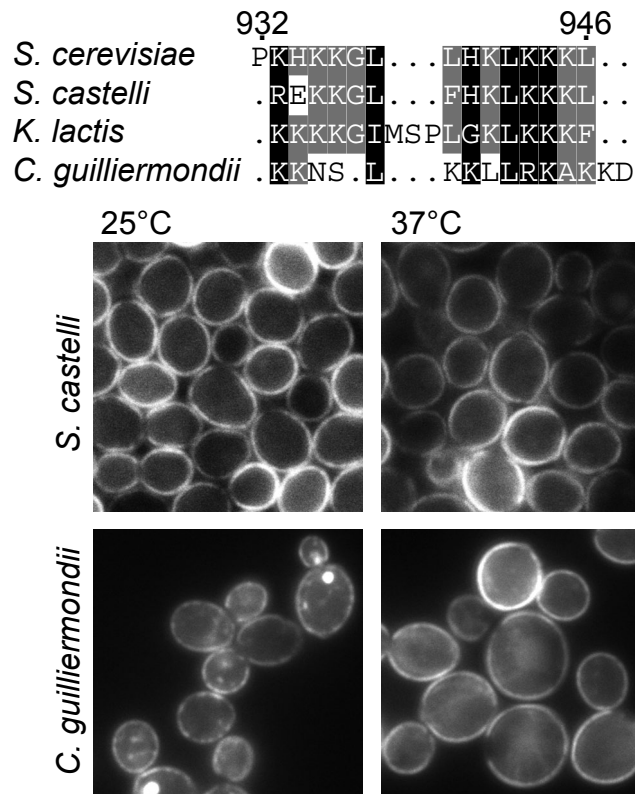
### 3.5.6 Die K/L-Sequenz ist nur in nah verwandten Hefespezies konserviert

Sofern der Sec-unabhängige Transport von Ist2 in anderen Hefespezies konserviert ist, sollte es durch einen Sequenzvergleich mit anderen Hefespezies möglich sein, eine Konsensussequenz für das Ist2-Sortierungssignal zu bestimmen. Die extensive Mutationsanalyse der K/L-Sequenz von *S. cerevisiae* ergab, dass die Position und Anzahl der hydrophoben und positiven Aminosäuren in der K/L-Sequenz sehr genau festgelegt ist. Wenn man bei verschiedenen Hefespezies die Ist2-Sequenz vergleicht, fällt auf, dass nur nah verwandte Hefespezies von *S. cerevisiae* einen ähnlichen C-Terminus von Ist2 aufweisen (siehe Abb. 3.8, Seite 57). Auffällig war, dass die Ähnlichkeiten hauptsächlich die K/L-Sequenz mit der amphipathischen Helix betreffen. Um herauszufinden, welche der Variationen in der K/L-Sequenz noch einen Sec-unabhängigen Transport erlauben, wurden die C-terminalen 15 Aminosäuren von Ist2 aus *S. cerevisiae* entweder durch die C-terminalen 14 Aminosäuren von Ist2 aus *S. castelli* oder durch die C-terminalen 15 Aminosäuren von Ist2 aus *C. guilliermondii* ersetzt.

Im Vergleich zu *S. cerevisiae* weist die K/L-Sequenz von *S. castelli* vier Unterschiede auf. Zum einen fehlt das Prolin an Position 932, des Weiteren sind vier Aminosäuren verändert: K933R, H934E, L939F. Diese Unterschiede wurden jedoch toleriert: Sowohl bei 25 wie bei 37°C war der Transport von Ist2 in *sec23-1* Zellen unbeeinträchtigt (Abb. 3.27). Dagegen lokalisierte ein Teil des Ist2 in intrazellulären ER-Strukturen, wenn die C-terminalen 15 Aminosäuren von Ist2 aus *C. guilliermondii* an K931 von Ist2 aus *S. cerevisiae* angehängt wurden. Bei *C. guilliermondii* sind wesentlich drastischere Differenzen - verglichen mit der Ist2-Sequenz von *S. cerevisiae* - erkennbar. Abgesehen von sieben mutierten Aminosäuren fehlen Prolin 932 und Glycin 937. Zusätzlich ist die Sequenz C-terminal um zwei Aminosäuren verlängert. Des Weiteren ist die Reihenfolge der Leucine zu LxxLL (statt LLxxL) verändert.

Ferner sollte die Ist2-Sequenz von *K. lactis* analysiert werden, deren C-terminalen 17 Aminosäuren in Abb. 3.27 dargestellt sind. Bei dieser Variante ist verglichen mit *S. cerevisiae* eine zusätzliche Helixwindung mit der Sequenz -MSP- enthalten. Viele Positionen von *S. cerevisiae* sind bei der Sequenz von *K. lactis* durch Aminosäuren mit ähnlicher Hydrophobizität ersetzt (H934 zu K, L938 zu I, L946 zu F). Diese Sequenz hätte somit verglichen mit *S. cerevisiae* mehr Änderungen als bei *S. castelli*, jedoch weniger als bei

*C. guilliermondii*. Aufgrund technischer Schwierigkeiten bei der DNA-Synthese konnte ein Oligonukleotid mit dieser Sequenz nicht synthetisiert werden.



**Abbildung 3.27: Homologe von Ist2 aus anderen Hefespezies.** Lokalisation der angegebenen Chimären in *sec23-1* Zellen nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25 oder 37°C. Die C-terminalen 15 Aminosäuren von YFP-Ist2 aus *S. cerevisiae* wurden entweder durch die C-terminalen 14 Aminosäuren von Ist2 aus *S. castelli* oder durch die C-terminalen 15 Aminosäuren von Ist2 aus *C. guilliermondii* ersetzt.

### 3.6 Identifizierung und Analyse von Interaktionspartnern von Ist2

Es ist bekannt, dass Ist2 unabhängig von Faktoren des sekretorischen Weges an die Zellperipherie gelangt. Unklar ist jedoch, welche Faktoren in der Zelle für den Transport von Ist2 innerhalb von verschiedenen ER-Domänen, vom pER zum kortikalen ER oder vom kortikalen ER zu Protease-sensitiven Domänen der Plasmamembran nötig sind. Des Weiteren stellt sich die Frage, ob an diesen Transportwegen Proteine oder Lipide beteiligt sind - oder eine Kombination von beiden. Es existieren verschiedene Herangehensweisen, um Interaktionspartner von Ist2 zu identifizieren. Eine erste Möglichkeit ist ein genetischer Screen, bei dem die Lokalisation von GFP-Ist2 in verschiedenen Hefestämmen analysiert wird. Sofern der Sec-unabhängige Transport von Ist2 von einem einzelnen nicht redundanten Faktor abhängig wäre, würde die Lokalisation von Ist2 beeinträchtigt werden, sobald dieser Faktor ausgeschaltet wurde. Dies wäre daran erkennbar, dass GFP-Ist2 nicht

mehr alleinig an der Zellperipherie detektiert würde, sondern in intrazellulären Strukturen. Durch einen genetischen Screen können sowohl Lipid- wie auch Proteinfaktoren erfasst werden, die am Transportweg von Ist2 beteiligt sein könnten.

Andere Möglichkeiten, um Proteinfaktoren zu identifizieren, die mit Ist2 interagieren und somit potentielle Transportkomponenten darstellen, sind biochemischer Art. In dieser Arbeit wurden zwei dieser biochemischen Ansätze verfolgt. Bei dem ersten Ansatz - für den Rest dieser Arbeit mit GST-Pulldown bezeichnet - wurden die C-terminalen 359 Aminosäuren von Ist2 als GST-Fusionsprotein exprimiert, aufgereinigt und an einer Affinitätsmatrix immobilisiert, während eine Inkubation mit cytosolischem Hefelysat (Überstand einer  $25000 \times g$  Zentrifugation, siehe Kapitel 2.3.3, GST-Pulldown) stattfand. Genau wie bei dem zweiten biochemischen Ansatz, der Ko-Immunpräzipitation mit spezifischen Ist2-Antikörpern, wurde beim GST-Pulldown nach Komplexen gesucht, die Ist2 enthalten, welches gebunden an einen Interaktionspartner vorliegt. Die Komplexe können anschließend aus dem Hefeextrakt isoliert und analysiert werden.

### 3.6.1 Genetischer Screen

Mittels eines genetischen Screens wurde nach Faktoren gesucht, die am Transport von Ist2 an die Zellperipherie beteiligt sind und die von essentiellen Genen kodiert werden. Bei dieser Herangehensweise wurde der Einfluss von Proteinfaktoren und bestimmten Lipiden auf die Lokalisation von Ist2 überprüft. Vorausgesetzt, dass der Transport von Ist2 von einem einzelnen nicht redundanten Faktor abhängt, so wäre dies in einer veränderten Lokalisation von Ist2 in intrazellulären Strukturen erkennbar, sobald der betreffende Faktor ausgeschaltet wurde.

Für die Lokalisationsstudie wurde die Hughes Kollektion verwendet (Hughes et al., 2000). Diese Bibliothek umfasst über 800 Hefestämme, bei denen der endogene Promotor eines essentiellen Gens durch einen heptameren Tet-regulierbaren Promotor ausgetauscht wurde. Des Weiteren enthielten die Hefestämme einen Transaktivator unter einem Cytomegalievirus-(CMV)Promotor. Wenn kein Doxizylin im Kulturmedium vorhanden war, konnte der Transaktivator an den Tet-regulierbaren Promotor des betreffenden Gens binden und die Expression des betreffenden Gens ermöglichen. Durch Zugabe von Doxizylin ins Hefemedium konnte die Expression des gewünschten Gens dosisabhängig herunterreguliert bzw. vollkommen ausgeschaltet werden, da der Transaktivator in Gegenwart von Doxizylin vom Tet-regulierbaren Promotor dissoziierte und somit das Gen nicht transkribiert wurde. Die noch vorhandenen Proteine werden je nach Stabilität schneller oder langsamer abgebaut.

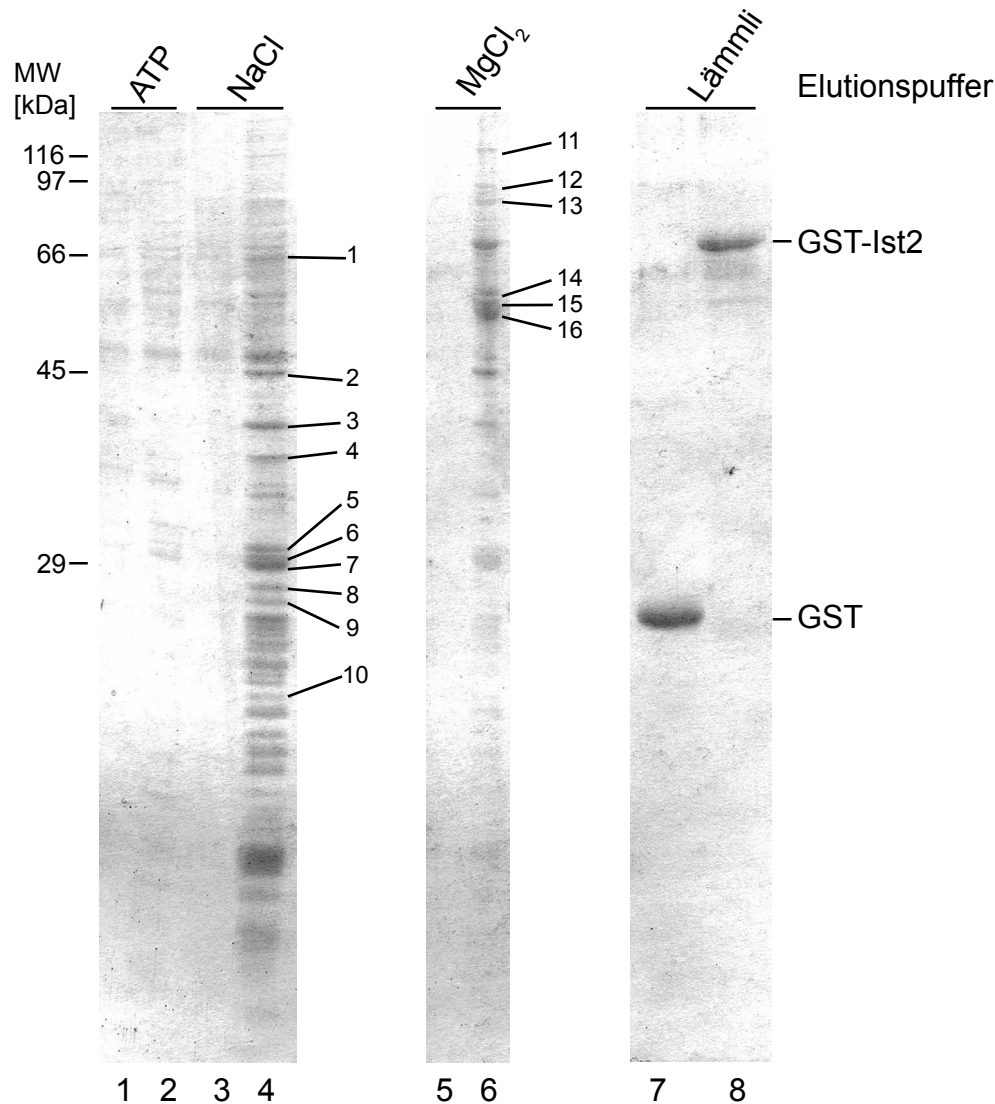
Um die Handhabung zu erleichtern, fand die Transformation und Kultivierung dieser Hefestämme in 96-Loch Mikrotiterplatten statt. Doxizylin wurde in einer Endkonzentration von  $40 \mu\text{g/ml}$  über Nacht zum Hefemedium hinzugefügt, um einerseits zu gewährleisten, dass das betreffende Protein nahezu vollständig abgebaut war, und andererseits noch ein

Überleben der Hefezellen zu ermöglichen. Am nächsten Morgen wurde die Lokalisation von GFP-Ist2, welches unter endogenem Promotor synthetisiert wurde, mikroskopisch überprüft. Bei allen analysierten Hefestämmen war ausschließlich eine Lokalisation von GFP-markiertem Ist2 in der Zellperipherie feststellbar, eine Lokalisation von GFP-Ist2 in intrazellulären Strukturen konnte dagegen nicht detektiert werden.

### 3.6.2 GST-Pulldown

Als nächstes wurde eine biochemische Herangehensweise angewandt, um Interaktionspartner von Ist2 zu identifizieren. Die C-terminalen 359 Aminosäuren von Ist2 wurden in Form eines GST-Fusionsproteins (GST-Ist2C) an einer Affinitätsmatrix immobilisiert und mit cytosolischem Hefelysat (Überstand einer  $25000 \times g$  Zentrifugation, siehe Kapitel 2.3.3, GST-Pulldown) inkubiert. Es wurde nach Proteinen gesucht, die spezifisch an die C-terminalen 359 Aminosäuren von Ist2 und nicht an GST binden.

Für die Herstellung von rekombinantem GST-Ist2C wurden die C-terminalen 359 Aminosäuren von Ist2 (ohne Transmembrandomäne) als GST-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert und über zwei verschiedene Affinitätsmatrices aufgereinigt. Die erste Aufreinigung nutzte eine interne Sequenz, bestehend aus acht Histidinen im C-terminalen Bereich von Ist2. Durch Bindung der Histidine an Ni-EDTA-Sepharose konnte das Fusionsprotein isoliert werden. Die anschließende Inkubation mit cytosolischem Hefelysat erfolgte in Gegenwart von Glutathion (GSH)-Sepharose, an die das N-terminale GST des GST-Ist2C binden konnte. Faktoren aus dem Hefelysat, die an GST-Ist2C gebunden waren, wurden auf diese Weise aus der Lösung präzipitiert, konsekutiv durch verschiedene Puffer von der Sepharose eluiert und mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert. Parallel dazu wurde GST-Protein über ein Hexa-Histidin-Epitop aufgereinigt. GST diente als Kontrolle, um Faktoren ausschließen zu können, die an GST und nicht an Ist2 gebunden waren. Die Coomassiefärbung der ermittelten Proteine ist in Abb. 3.28 dargestellt. Proteinbanden, die nur an GST-Ist2C und nicht an GST gebunden waren, sind in Abb. 3.28 von eins bis 16 durchnummeriert und wurden massenspektrometrisch identifiziert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.



**Abbildung 3.28: GST-Pulldown mit rekombinant hergestelltem GST-Ist2C.** Nach Zentrifugation bei 25000 g wurden lösliche cytosolische Proteine von 720 OD<sub>600</sub> eines  $\Delta ist2$  Hefestamms mit je 630 pmol GST bzw. GST-Ist2C und GSH-Sepharose inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden schrittweise mit 10 mM ATP, Hochsalz (500 mM NaCl), 5 mM MgCl<sub>2</sub> und Lämmli-Puffer eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit kolloidaler Coomassiefärbung detektiert. Als Köder diente GST in den Spuren 1, 3, 5 und 7, während in den Spuren 2, 4, 6 und 8 die Bindungspartner von GST-Ist2C analysiert wurden. Die nummerierten Proteinbanden (1-16) wurden massenspektrometrisch analysiert und sind in Tabelle 3.2 aufgelistet.

In Tabelle 3.2 sind die einzelnen Scores der MALDI-TOF Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) angegeben. Bei MALDI-TOF MS werden nicht die Aminosäuresequenzen, sondern nur Peptidmassen ermittelt. Das erhaltene Fragmentmuster wird mit Datenbanken abgeglichen. Bei einem Score größer als 74 ist die Zuordnung der Proteine mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,01$  signifikant. Dies ist bei allen identifizierten Proteinen bis auf Fpr3 (von Bande 14) der Fall.

| Bande | Protein | ORF       | Funktionelle Klasse                                                          | Score |
|-------|---------|-----------|------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 1     | Pab1    | YER165w   | Proteinsynthese, Translationskontrolle, RNA Transport                        | 115   |
|       | Ssb2    | YNL209w   | Proteinsynthese, ER Qualitätskontrolle                                       | 83    |
| 2     | Rpl3    | YOR063w   | Proteinsynthese, ribosomales Protein                                         | 100   |
| 3     | Rpl4B   | YDR012w   | Proteinsynthese, ribosomales Protein                                         | 102   |
| 4     | Stm1    | YLR150w   | Signaltransduktion, DNA bindend                                              | 86    |
| 5     | Rps6A   | YPL090c   | Proteinsynthese, ribosomales Protein                                         | 97    |
| 5     | Rps3    | YNL178w   | Proteinsynthese, ribosomales Protein                                         | 152   |
| 6     | Rpl2A   | YFR031c-a | Proteinsynthese, ribosomales Protein                                         | 97    |
| 7     | Rps1B   | YML063w   | Proteinsynthese, ribosomales Protein                                         | 115   |
| 8     | Rps2    | YGL123w   | Proteinsynthese, Translationskontrolle, ribosomales Protein                  | 120   |
| 9     | Rps5    | YJR123w   | Proteinsynthese, ribosomales Protein                                         | 112   |
| 10    | Rpl18A  | YOL120c   | Proteinsynthese, ribosomales Protein                                         | 105   |
| 11    | Rpg1    | YBR079c   | Proteinsynthese, Translationsinitiation                                      | 100   |
| 12    | Nip1    | YMR309c   | Proteinsynthese, Translationsinitiation                                      | 119   |
| 13    | Prt1    | YOR361c   | Proteinsynthese, Translationsinitiation                                      | 234   |
| 14    | Fpr3    | YML074c   | Proteinfaltung                                                               | 67    |
| 15    | Sro9    | YCL037c   | Proteinsynthese, Transkription                                               | 101   |
| 16    | Nsr1    | YGR159c   | Proteinsynthese, Ribosomenbiogenese, rRNA Prozessierung, ribosomales Protein | 172   |

**Tabelle 3.2: Massenspektrometrische Analyse der detektierten Proteine des GST-Pulldowns.** Die Peptide wurden mit MALDI-TOF (Gotthardt et al., 2006) massenspektrometrisch analysiert. Bei einem Score größer als 74 ist die Zuordnung der Proteine mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,01$  signifikant. Der offene Leserahmen (ORF) der Gene und die relevantesten der funktionellen Klassen laut MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences*) sind vermerkt.

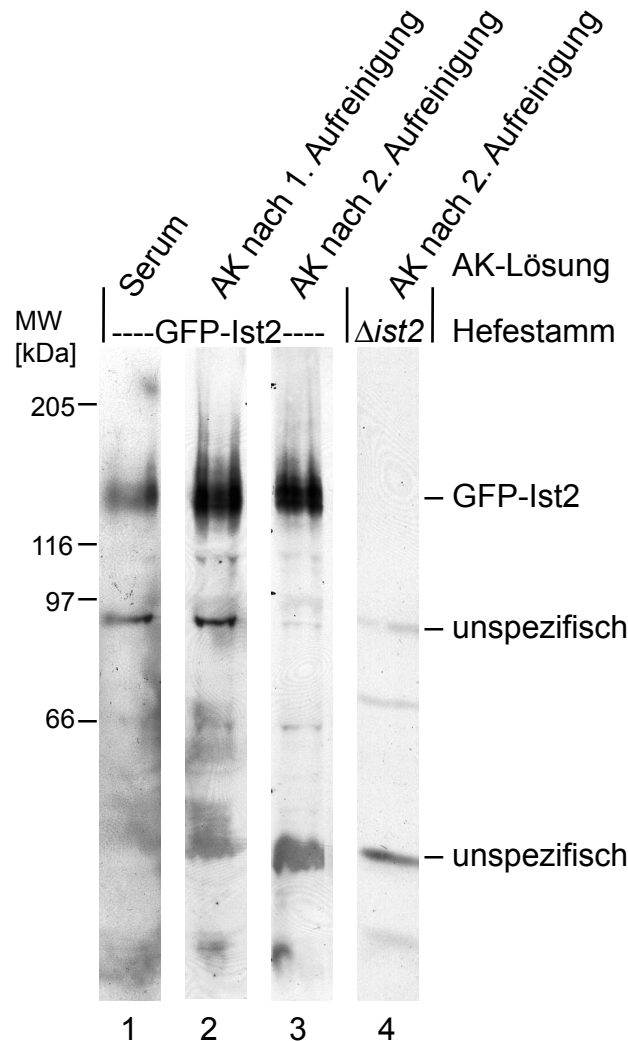
Das Chaperon Ssb2 und hauptsächlich Faktoren der Proteinsynthese, vor allem ribosomale Proteine, wurden von rekombinantem GST-Ist2C gebunden. Da diese Proteine im Zell-extrakt sehr abundant sind, ist es möglich, dass die Bindung an GST-Ist2C unspezifisch ist.

### 3.6.3 Ko-Immunpräzipitation

#### Herstellung und Aufreinigung von Ist2-spezifischen Antikörpern

Für Ko-Immunpräzipitationsstudien wurden Ist2-spezifische Antikörper (AK) in Kaninchen hergestellt. Als Immunogen wurde das bereits erwähnte rekombinant hergestellte GST-Ist2C verwendet. Das resultierende Kaninchenserum wurde auf Spezifität überprüft

und aufgrund von kreuzreaktiven Banden im Western Blot immunoaffinitätsgereinigt.



**Abbildung 3.29: Analyse der Spezifität der Ist2-Antikörper.** Western Blot von 0,4 OD<sub>600</sub> Gesamtzellextrakt von Hefezellen, die entweder GFP-Ist2 in einem  $\Delta ist2$ -Zellhintergrund (Spur 1-3) oder kein Ist2 (Spur 4) exprimierten. Das Serum bzw. die aufgereinigten Antikörper wurden in einer Verdünnung von 1:25 000 eingesetzt.

Zur Aufreinigung wurde das Kaninchenserum zuerst auf eine GST-gekoppelte Säulenmatrix appliziert. Antikörper, die unspezifisch an die Sepharosematrix oder an GST banden, wurden dadurch minimiert. Der Durchfluss wurde anschließend auf eine GST-Ist2C-gekoppelte Säulenmatrix appliziert und eluiert. Dadurch wurden Ist2-spezifische Antikörper angereichert und von denjenigen Antikörpern separiert, die nur gegen GST gerichtet waren. Nach dieser ersten Aufreinigung war im Western Blot ein deutliches Signal für Ist2 erkennbar, die kreuzreaktiven Banden jedoch immer noch vorhanden (Spur 2, Abb. 3.29). Die stärkste kreuzreaktive Bande bei ca. 90 kDa wurde von Antikörpern verursacht, die von der GST-gekoppelten Säule eluiert werden konnten (nicht gezeigt).

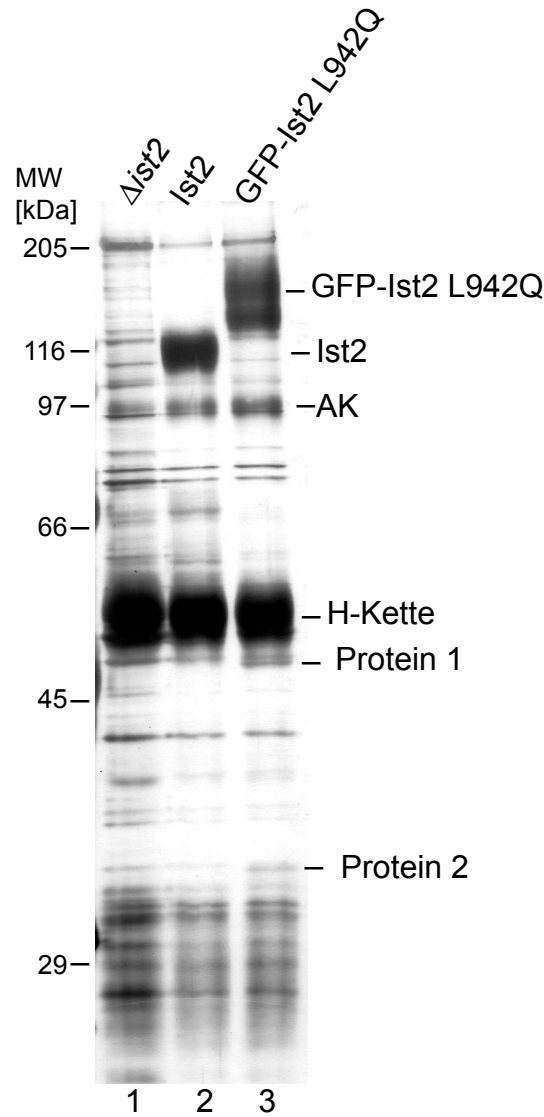
Daher wurde der Durchfluss der ersten Aufreinigung noch einmal unter Verwendung einer zusätzlichen neuen GST-Säulenmatrix aufgereinigt, so dass bei der zweiten Aufreinigung insgesamt zwei GST-Säulenmatrices und eine GST-Ist2C-Säulenmatrix Anwendung fanden. Die unspezifische Bande bei ca. 90 kDa war nach der zweiten Aufreinigung fast ganz verschwunden und das spezifische Ist2-Signal sehr eindeutig zu erkennen (Spur 3 und 4, Abb. 3.29).

### **Immunpräzipitation von Ist2 aus solubilisierten Membrankomplexen**

Die im vorherigen Absatz beschriebenen aufgereinigten Ist2-Antikörper wurden für Ko-Immunpräzipitationsstudien verwendet, um Faktoren zu identifizieren, die mit Ist2 interagieren und am Transport von Ist2 zur Zellperipherie beteiligt sein könnten. Im oben beschriebenen GST-Pulldown-Versuch wurde eine cytosolische Zellfraktion eingesetzt. Da die meisten Proteinfaktoren vermutlich aufgrund unspezifischer Bindung detektiert wurden, wurde bei der Immunpräzipitation von Ist2 nach Membranproteinen gesucht, die mit Ist2 interagieren. Es wurden Membranextrakte hergestellt, deren Proteine mit verschiedenen Methoden solubilisiert wurden. Für die Immunpräzipitation (IP) wurden drei verschiedene Hefestämme verwendet: Diese exprimierten entweder kein Ist2, Wildtyp Ist2 oder die Punktmutation Ist2 L942Q, welche bereits in Abb. 3.10 (Seite 59) beschrieben wurde. Die Ist2 L942Q-Mutante wurde verwendet, da die Möglichkeit besteht, dass Ist2 L942Q zwar nicht mehr an die Zellperipherie transportiert werden kann, etwaige Interaktionspartner von Ist2 jedoch trotzdem gebunden werden bzw. sogar eine stabilere Bindung als bei Wildtyp Ist2 auftritt. Wenn die Bindung von Ist2 L942Q an Interaktionspartner eine höhere Affinität aufweisen sollte als Wildtyp Ist2, wäre die Detektion der Interaktionspartner erleichtert.

Bei Solubilisierung von Hefemembranen mit 1% Triton X-100 konnten neben einigen unspezifischen Banden, die auch in der Kontrollfraktion (Spur 1) erkennbar waren, zwei verschiedene Proteine mit Ist2 L942Q ko-immunpräzipitiert werden (Abb. 3.30). Die beiden Proteinbanden wurden mit nanoHPLC-ESI-QTOF (Colasante et al., 2006) massenspektrometrisch analysiert und sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

In Tabelle 3.3 ist der Gesamtscore für Emp47 und Ssp120 angegeben. Wenn der individuelle Score der einzelnen Peptide größer als 54 (Emp47) bzw. 55 (Ssp120) war, wies dies mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  auf identische Proteine bzw. extensive Homologie hin. Für das Protein Emp47 waren 4 von 13 gefundenen Peptiden oberhalb dieses Schwellenwertes, und für das Protein Ssp120 war dies bei allen drei gefundenen Peptiden der Fall. Somit war in beiden Fällen die Zuordnung der Proteine signifikant.



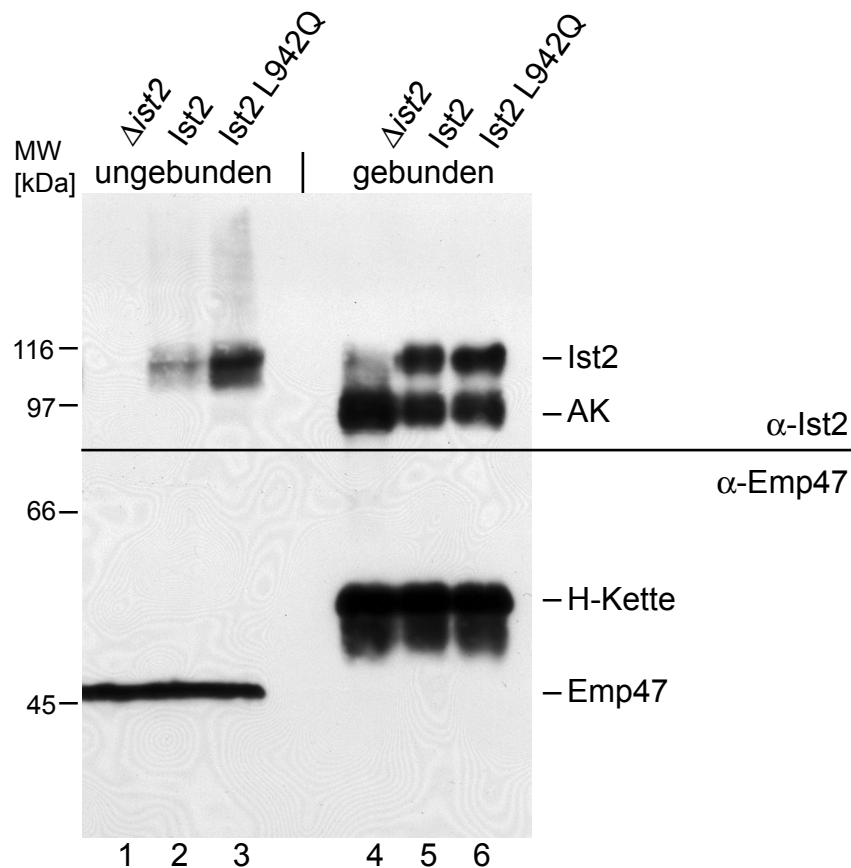
**Abbildung 3.30: Immunpräzipitation von Triton X-100-solubilisierten Ist2-Komplexen, Silberfärbung.** Membranextrakt von 300 OD<sub>600</sub> Hefezellen, die entweder kein Ist2 (Spur 1), Wildtyp Ist2 (Spur 2) oder GFP-Ist2 L942Q (Spur 3) exprimierten, wurde mit spezifischen Ist2-Antikörpern und ProteinA-Sepharose inkubiert. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einer Silberfärbung detektiert. Die schwere Kette der dissoziierten Ist2-Antikörper (H-Kette) ist zwischen 66 und 45 kDa erkennbar. Die nummerierten Proteinbanden 1 und 2 wurden massenspektrometrisch analysiert und sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

| Bande | Protein | Funktionelle Klasse             | Score |
|-------|---------|---------------------------------|-------|
| 1     | Emp47   | Transport von ER zu Golgi       | 726   |
| 2     | Ssp120  | zellulärer Export und Sekretion | 222   |

**Tabelle 3.3: Massenspektrometrische Analyse der mit Triton X-100-solubilisierten IP-Proben.** Die Peptide wurden mit nanoHPLC-ESI-QTOF (Colasante et al., 2006) massenspektrometrisch analysiert. Die relevantesten der funktionellen Klassen laut MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences*) sind vermerkt sowie der Gesamtscore der einzelnen Peptide.

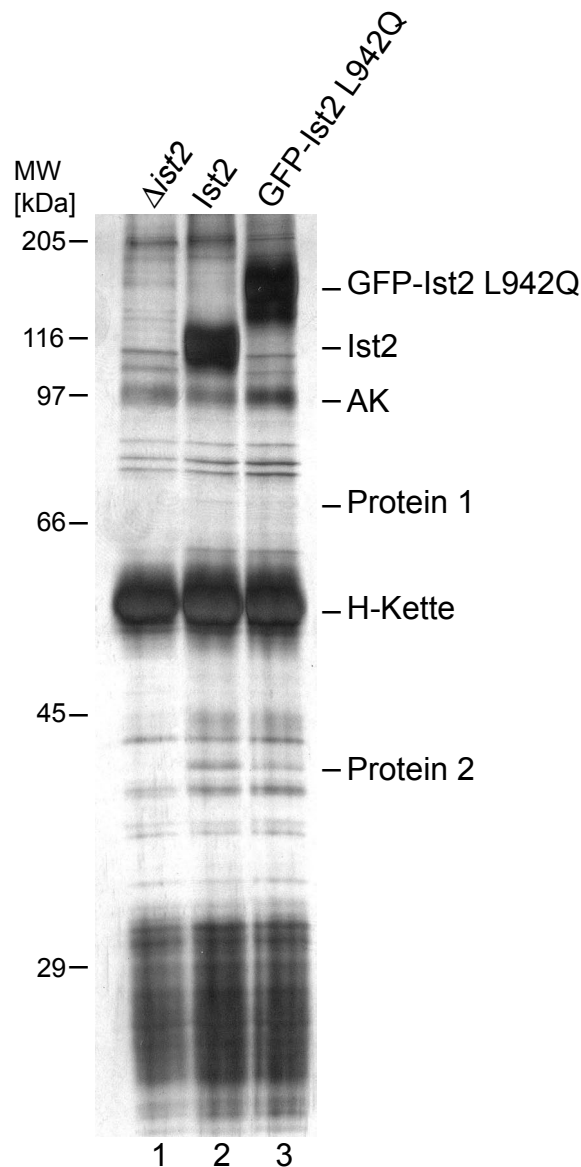
Sowohl Emp47 wie auch Ssp120 sind nicht essentielle Gene in Hefe. Emp47 ist ein Typ I-Transmembranprotein mit Sequenzhomologie zu Lektinen wie ERGIC-53. Die Sequenz von Emp47 ist zu 45% identisch mit Emp46. Wenn sowohl Emp46 wie auch Emp47 genetisch ausgeschaltet sind, ist die Sekretion von einigen Glykoproteinen beeinträchtigt. Trotz des C-terminalen Di-Lysin-Motivs lokalisiert Emp47 nicht am ER, sondern am Golgi-Apparat (Schröder et al., 1995; Sato und Nakano, 2002).

Um die Bindung von Emp47 an Ist2 L942Q zu überprüfen, wurde erneut eine Immunpräzipitation von Ist2 bzw. Ist2 L942Q durchgeführt und mittels Western Blot und spezifischen Emp47-Antikörpern analysiert (Abb. 3.31). Spur 5+6 zeigt immunpräzipitiertes Ist2 aus den beiden Stämmen, die Wildtyp Ist2 oder die Punktmutation von Ist2 exprimierten. Emp47 ist nur in der ungebundenen Fraktion (Spur 1-3, Membranextrakt von 10 OD<sub>600</sub>) erkennbar und nicht als ko-immunpräzipitiertes Protein in Spur 5+6. Die Bindung von Emp47 an Ist2 konnte somit mittels Western Blot nicht verifiziert werden.



**Abbildung 3.31: Immunpräzipitation von Triton-solubilisierten Ist2-Komplexen, Western Blot mit Emp47-AK.** Membranextrakt von 650 OD<sub>600</sub> Hefezellen, die entweder kein Ist2 (Spur 1+4), Wildtyp Ist2 (Spur 2+5) oder Ist2 L942Q (Spur 3+6) exprimierten, wurde mit spezifischen Ist2-Antikörpern und ProteinA-Sepharose inkubiert. 10 OD<sub>600</sub> des ungebundenen Membranextraktes (Spur 1-3) sowie die gesamten gebundenen Proteine (Spur 4-6) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit spezifischen Ist2- und Emp47-Antikörpern detektiert. Die schwere Kette der dissoziierten Ist2-Antikörper (H-Kette) ist zwischen 66 und 45 kDa erkennbar.

Das zweite Protein, welches bei der Immunpräzipitation von Ist2 nach Triton X-100-Solubilisierung von Hefemembranen gefunden wurde, war Ssp120. Über dieses Protein liegen nur wenige Informationen vor. Ssp120 lokalisiert am Golgi-Apparat, wird über den sekretorischen Weg transportiert und ist beteiligt am zellulären Export und Sekretion. Es besitzt geringe Ähnlichkeit mit einem Protein aus dem Huhn, welches an glykosylierte Proteine bindet (Huh et al., 2003; Sidhu et al., 1991). Die Verifizierung der Interaktion zwischen Ist2 und Ssp120 wurde aus technischen Gründen nicht durchgeführt.



**Abbildung 3.32: Immunpräzipitation von Digitonin-solubilierten Ist2-Komplexen, Silberfärbung.** Membranextrakt von 600 OD<sub>600</sub> Hefezellen, die entweder kein Ist2 (Spur 1), Wildtyp Ist2 (Spur 2) oder GFP-Ist2 L942Q (Spur 3) exprimierten, wurde mit spezifischen Ist2-Antikörpern und ProteinA-Sepharose inkubiert. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einer Silberfärbung detektiert. Die schwere Kette der dissoziierten Ist2-Antikörper (H-Kette) ist zwischen 66 und 45 kDa erkennbar. Die nummerierten Proteinbanden 1 und 2 wurden massenspektrometrisch analysiert und sind in Tabelle 3.4 aufgelistet.

Manche Protein-Protein-Interaktionen finden nur transient statt und können leicht beeinträchtigt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass Triton X-100 bei schwachen Verbindungen zwischen Proteinen interferiert, daher wurde für die zweite Solubilisierungsmethode das mildere Detergens Digitonin verwendet.

Bei der Immunpräzipitation von Ist2 aus 2% Digitonin-solubilisierten Membranextrakten wurden zwei verschiedene Proteinbanden detektiert, die sowohl mit Ist2 wie auch mit Ist2 L942Q ko-immunpräzipitiert wurden. Die Silberfärbung der mittels SDS-PAGE separierten Proben ist in Abb. 3.32 dargestellt. Die Analyse der ermittelten Proteinbanden erfolgte durch nanoHPLC-ESI-QTOF Massenspektrometrie (Colasante et al., 2006); das Ergebnis ist in Tabelle 3.4 gezeigt.

| Bande | Protein | Funktionelle Klasse             | Score |
|-------|---------|---------------------------------|-------|
| 1     | Sac1    | zellulärer Export und Sekretion | 239   |
| 2     | Scs2    | Proteintransport                | 33    |

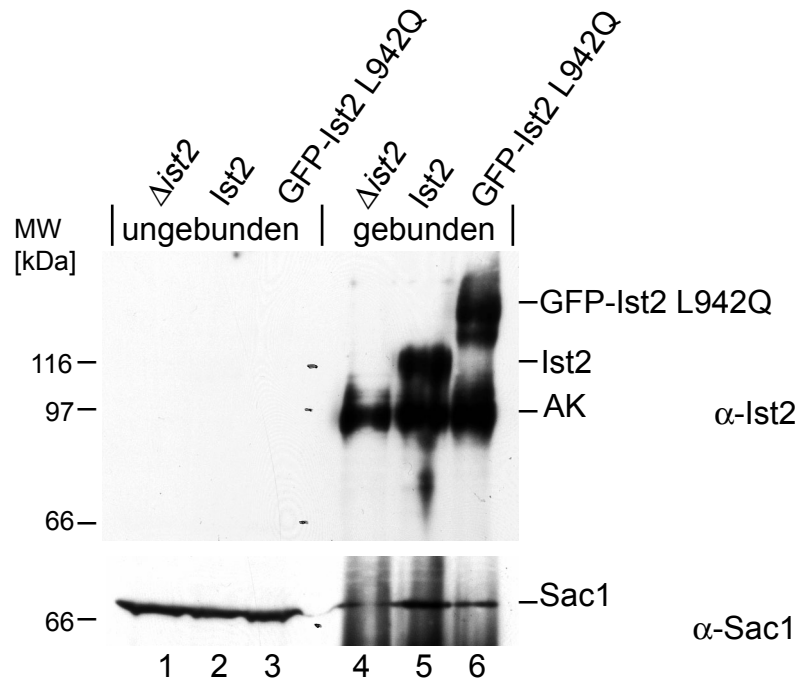
**Tabelle 3.4: Massenspektrometrische Analyse der mit Digitonin-solubilisierten IP-Proben.** Die Peptide wurden mit nanoHPLC-ESI-QTOF (Colasante et al., 2006) massenspektrometrisch analysiert. Die relevantesten der funktionellen Klassen laut MIPS (*Munich Information Center for Protein Sequences*) sowie der Gesamtscore der einzelnen Peptide sind vermerkt.

In Tabelle 3.4 ist der Gesamtscore für die Membranproteine Sac1 und Scs2 angegeben. Wenn bei Proteinbande 1 (Sac1) der individuelle Score der einzelnen Peptide oberhalb von 43 lag, wies dies mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  auf identische Proteine bzw. eine extensive Homologie der Peptide zu Sac1 hin. Bei Sac1 lagen fünf von 28 gefundenen Peptiden über diesem Schwellenwert. Mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,1$  war eines der zwei analysierten Peptide von Bande 2 homolog zum Protein Scs2. Der Schwellenwert für Homologie lag hier bei einem individuellen Score von 19.

Sac1 ist eine Phosphatidylinositol (PI)-Phosphatase, welche den Level von PI(4)-Phosphat am ER und Golgi reguliert. Sac1 ist an multiplen Vorgängen der Zelle wie z.B. dem Transport von Chitinsynthasen beteiligt, da es die Phosphatidylinositollevel an den jeweiligen Membrankompartimenten reguliert, wodurch die Identität der jeweiligen Kompartimente bestimmt wird (Schorr et al., 2001; Foti et al., 2001; Faulhammer et al., 2005).

Um die Bindung von Sac1 an Wildtyp Ist2 und Ist2 L942Q zu überprüfen, wurde erneut eine Immunpräzipitation von Ist2 durchgeführt und mittels Western Blot und spezifischen Sac1-Antikörpern analysiert (Abb. 3.33). Spur 5+6 zeigt immunpräzipitiertes Ist2 aus den beiden Stämmen, die Wildtyp Ist2 oder die Punktmutation von Ist2 exprimierten. Sac1 ist sowohl in der ungebundenen Fraktion (Membranextrakt von 10 OD<sub>600</sub>) erkennbar als auch bei den ko-immunpräzipitierten Ist2- bzw. Ist2 L942Q-Proben. Zusätzlich wurde eine schwache unspezifische Bindung von Sac1 an die Sepharosematrix detektiert (Spur 4), das Signal der Bindung von Sac1 an Ist2 bzw. Ist2 L942Q war jedoch stärker als die unspezifische Bindung an die Sepharosematrix. Ein geringer Teil des Sac1 löste sich durch die Inkubation mit Waschpuffer von den Proben (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse

weisen darauf hin, dass die Bindung von Sac1 an Ist2 bzw. Ist2 L942Q aufgrund einer schwachen Affinität transient sein könnte.

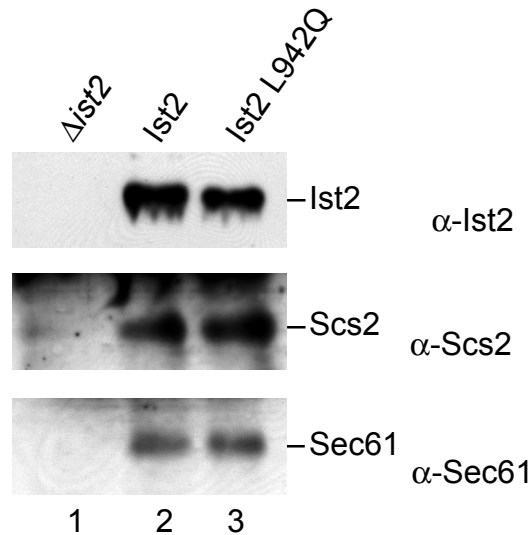


**Abbildung 3.33: Immunpräzipitation von Digitonin-solubilisierten Ist2-Komplexen, Western Blot mit Sac1-AK.** Membranextrakt von 350 OD<sub>600</sub> Hefezellen, die entweder kein Ist2 (Spur 1), Wildtyp Ist2 (Spur 2) oder GFP-Ist2 L942Q (Spur 3) exprimierten, wurde mit spezifischen Ist2-Antikörpern und ProteinA-Sepharose inkubiert. 10 OD<sub>600</sub> des ungebundenen Membranextraktes (Spur 1-3) sowie die gesamten gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit spezifischen Ist2- und Sac1-Antikörpern detektiert.

Bei der Immunpräzipitation von Digitonin solubilisierten Ist2-Komplexen wurde des Weiteren das Typ II-ER-Membranprotein Scs2 gefunden. Scs2 besitzt Ähnlichkeit mit VAP-33 (*Vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein-33*) und reguliert den Phospholipidmetabolismus. Dies geschieht u.a. über Interaktion mit den Sterol-transportierenden Proteinen Osh1-3 und dem Transkriptionsfaktor Opi1 (Loewen et al., 2003; Loewen und Levine, 2005). Ferner ist Scs2 ein wichtiger Faktor bei der Vererbung und dem Transport des kortikalen ERs in die Tochterzellen (Loewen et al., 2007).

Um die Bindung von Scs2 an Ist2 zu überprüfen, wurde die Immunpräzipitation mit Digitonin-solubilisierten Hefemembranen wiederholt und mittels Western Blot und spezifischen Scs2-Antikörpern analysiert (Abb. 3.34). In Spur 2 und 3 ist immunpräzipitiertes Ist2 bzw. Ist2 L942Q (oberer Blot, α-Ist2) sowie ko-immunpräzipitiertes Scs2 (mittlerer Blot, α-Scs2) erkennbar. Da Digitonin ein sehr mildes Detergens ist, ist es möglich, dass ganze Membrankomplexe aufgereinigt wurden, in denen noch andere Proteine vertreten sind außer Ist2 und Scs2. Um dies zu untersuchen, wurden die IP-Proben zusätzlich mit

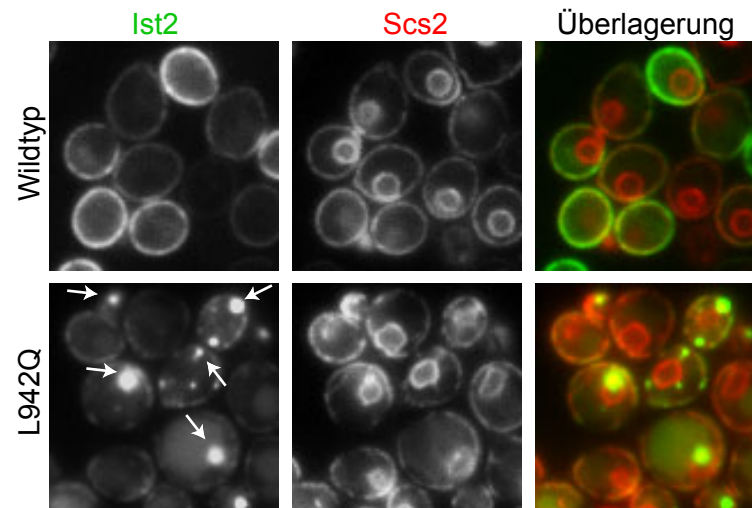
Sec61 spezifischen Antikörpern analysiert (Abb. 3.34, unterer Blot,  $\alpha$ -Sec61). Ein schwaches Signal von Sec61 konnte sowohl bei der IP von Ist2 wie auch bei Ist2 L942Q detektiert werden. Dies weist darauf hin, dass die Interaktion zwischen Ist2 und Scs2 indirekter Art sein könnte.



**Abbildung 3.34: Immunpräzipitation von Digitonin-solubilisierten Ist2-Komplexen, Western Blot mit Scs2-AK.** Membranextrakt von 550 OD<sub>600</sub> Hefezellen, die entweder kein Ist2 (Spur 1), Wildtyp Ist2 (Spur 2) oder Ist2 L942Q (Spur 3) exprimierten, wurde mit spezifischen Ist2-Antikörpern und ProteinA-Sepharose inkubiert. Gebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Western Blot mit spezifischen Ist2-, Scs2- und Sec61-Antikörpern detektiert.

### 3.6.4 Scs2 kolokalisiert mit mutiertem Ist2

Da die Bindung von Scs2 an Ist2 per Western Blot bestätigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob auch im Fluoreszenzmikroskop eine Kolokalisation von Ist2 bzw. Ist2 L942Q Proteinakkumulationen und Scs2 detektiert werden konnte. Wie in Abb. 3.18 (Seite 69) gezeigt, veränderte sich die zelluläre Lokalisation der ER-Proteine Dpm1 und Sec63, wenn Punktmutationen von Ist2 koexprimiert wurden. Direkt bei den Proteinakkumulationen von Ist2 war ein stärkeres Signal von Dpm1 bzw. Sec63 erkennbar. Um zu untersuchen, ob sich Scs2 gleichermaßen verhielt, wurden in  $\Delta ist2$  Zellen GFP-Scs2 und mCherry-Ist2 bzw. mCherry-Ist2 L942Q koexprimiert und die Lokalisation der Proteine analysiert. Wie in Abb. 3.35 ersichtlich, kolokalisierte Scs2 mit Proteinakkumulationen von mutiertem Ist2 (weiße Pfeile). Genau wie bei der Expression von Dpm1 oder Sec63 war eine leichte Veränderung der ERs (punktartige Strukturen oder kleine Ausstülpungen des ERs) erkennbar, wenn Scs2 mit mutiertem Ist2 koexprimiert wurde.

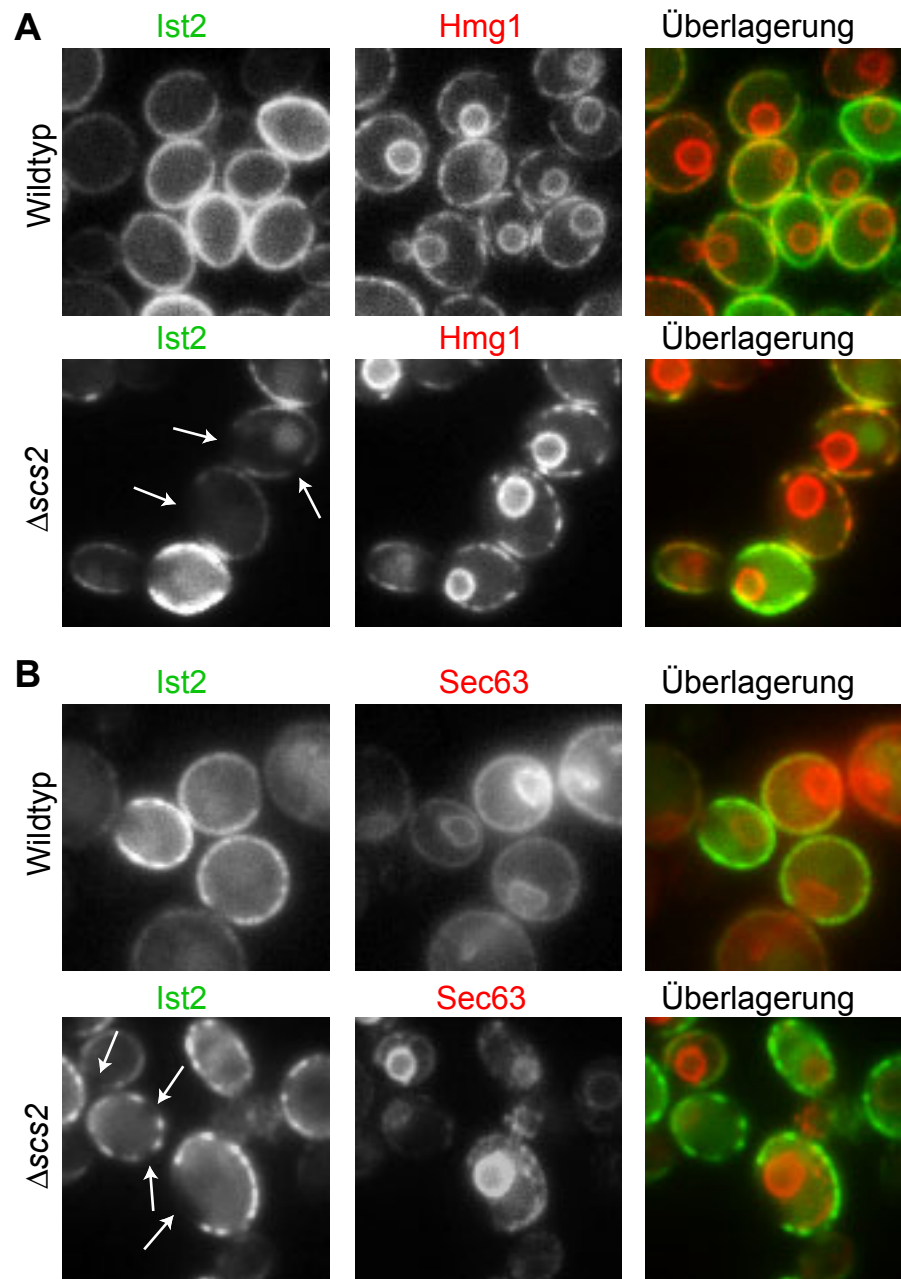


**Abbildung 3.35: Mutiertes Ist2 kolokalisiert mit Scs2.** Lokalisation von mCherry Ist2 und mCherry-Ist2 L942Q (in Grün) unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors nach zweistündiger Induktion mit Galaktose bei 25°C in  $\Delta ist2$  Zellen, die GFP-Scs2 (in Rot) koexprimierten.

### 3.6.5 Scs2 hat keinen direkten Einfluss auf den Transport von Ist2

Als Nächstes wurde untersucht, ob Scs2 am Transport von Ist2 an die Zellperipherie beteiligt ist. Dazu wurde die Lokalisation von GFP-Ist2 in einem  $\Delta scs2$  Hefestamm untersucht. In einigen Zellen war die periphere Verteilung von GFP-Ist2 leicht verändert: An mehreren Stellen war das periphere Signal von GFP-Ist2 unterbrochen (weiße Pfeile in Abb. 3.36).

Normalerweise ist die Lokalisation von Ist2 an der Zellperipherie auf Bereiche beschränkt, an denen direkter Kontakt zum kortikalen ER besteht. Dies ist besonders gut in *sec23-1*-Zellen bei restriktiver Temperatur erkennbar, wenn sich das kortikale ER von der Plasmamembran ablöst: An Stellen der Zellperipherie mit fehlendem kortikalem ER ist das Signal von Ist2 nicht vorhanden (Jüschke, 2005). Um genauer zu analysieren, ob das unterbrochene periphere Signal von Ist2 in  $\Delta scs2$ -Zellen durch fehlendes kortikales ER an diesen Stellen bedingt ist, wurden in  $\Delta scs2$ -Zellen neben mCherry Ist2 entweder Hmg1-GFP oder GFP-Sec63 koexprimiert. Alternativ könnte aufgrund des Mangels von Scs2 die Verankerung des kortikalen ERs an der Peripherie und damit indirekt die Lokalisation von Ist2 beeinträchtigt werden (Loewen et al., 2007). Wie in Abb. 3.36 ersichtlich, korreliert die periphere Verteilung von Ist2 mit dem Vorhandensein von kortikalem ER, welches durch die ER-Marker Hmg1 und Sec63 sichtbar gemacht wurde. An Stellen mit fehlendem Ist2 wurde kein kortikales ER detektiert.



**Abbildung 3.36: Lokalisation von mCherry-Ist2 in  $\Delta Scs2$  Zellen.** Lokalisation von mCherry Ist2 (in Grün) unter Kontrolle des *IST2*-Promotors bei 25°C in Wildtyp- bzw.  $\Delta scs2$ -Zellen. A) Koexpression von Hmg1-GFP (in Rot). B) Koexpression von Sec63-GFP (in Rot).

# 4 Diskussion

---

*IST2* aus *S. cerevisiae* kodiert für ein integrales Membranprotein und befindet sich im kortikalen ER oder Domänen der Plasmamembran. Bisher konnte gezeigt werden, dass die *IST2*-mRNA-Lokalisation an die Tochterzellspitze nur für die Expression von Ist2 in Tochterzellen und nicht in Mutterzellen nötig ist (Takizawa et al., 2000; Jüschke et al., 2004). Der C-Terminus von Ist2 konnte andere Membranproteine mit einem cytosolischen C-Terminus an die Zellperipherie (kortikales ER oder Domänen der Plasmamembran) dirigieren (Jüschke et al., 2005; Franz et al., 2007). Mittels Fluoreszenzmikroskopie kann keine Unterscheidung zwischen einer Lokalisation von Ist2 am kortikalen ER und an der Plasmamembran getroffen werden. Dies ist nur durch eine Detektion von Ist2 an der Zelloberfläche, z.B. durch Protease-Zugänglichkeitsexperimente möglich. Das Lokalisationssignal von Ist2 wirkte dominant gegenüber anderen Lokalisationssignalen und resultierte in einem Sec-unabhängigen Transfer an Domänen der Zellperipherie, die zugänglich für externe Proteasen waren (Jüschke et al., 2004, 2005). Da bei diesem Transport der *trans*-Golgi-Apparat umgangen wurde, ist ein direkter Transfer vom ER zur Plasmamembran wahrscheinlich (Jüschke et al., 2005).

In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass der Sec-unabhängige Transport von Ist2 keine Kopplung von lokaler Translation und anschließendem Proteintransfer an die Zellperipherie benötigt. Da ein Teil von Ist2 kurz nach Synthese für wenige Minuten am perinukleären (pER) der Mutterzelle detektiert werden konnte, werden vermutlich nicht alle *IST2*-mRNA-Moleküle von den She-Proteinen in die Tochterzellspitze transportiert. Für den Transport von Ist2 vom pER zum kortikalen ER sind mehrere basische Aminosäuren und die Ausbildung einer amphipathischen  $\alpha$ -Helix mit einem schmalen Bereich aus hydrophoben und sperrigen Aminosäuren notwendig. Ferner könnte eine Interaktion von Ist2 mit den Proteinen Sac1 und Scs2 am Transport von Ist2 beteiligt sein. Ist2 könnte dadurch in Subdomänen des kortikalen ERs positioniert werden, die sich in geringer Distanz zur Plasmamembran befinden und einen Transport von Ist2 an Domänen der Plasmamembran ermöglichen.

## 4.1 *IST2*-mRNA-Lokalisation, Anreicherung am kortikalen ER und Sec-unabhängiger Transport zur Plasmamembran

### 4.1.1 Die Anreicherung am kortikalen ER und der Sec-unabhängige Transport von Ist2 erfolgen unabhängig von lokaler Translation

Die *IST2*-mRNA ist eine von 26 mRNAs in *S. cerevisiae*, die mit Hilfe der She-Proteine an die Tochterzellspitze lokalisiert werden (Shepard et al., 2003; Aronov et al., 2007). Vermutlich erfolgt anschließend eine Translation am kortikalen ER der Tochterzelle, da

kleine bis mittelgroße Tochterzellen nur kortikales und kein pER besitzen (Prinz et al., 2000). Für den Transport der *IST2*-mRNA und die Expression von Ist2 in Tochterzellen wird das RNA-bindende Protein She2 benötigt, welches ein Lokalisationselement in der *IST2*-mRNA erkennt (Olivier et al., 2005). Durch Deletion von *SHE2* wird der mRNA-Transport in die Tochterzelle unterbunden und die *IST2*-mRNA ist gleichmäßig auf Mutter- und Tochterzellen verteilt (Takizawa et al., 2000).

Um zu untersuchen, ob die Lokalisation der *IST2*-mRNA eine direkte Voraussetzung für die Anreicherung am kortikalen ER und den Sec-unabhängigen Transfer von Ist2 zu Domänen der Plasmamembran ist, wurde der Transport von Ist2 in der Doppelmutante *sec23-1/Δshe2* analysiert. Sowohl in *sec23-1*-Zellen wie auch in der Doppelmutante *sec23-1/Δshe2* lokalisierte Galaktose induziertes YFP-Ist2 an der Zellperipherie (Abb. 3.1). Somit ist die *IST2*-mRNA-Lokalisation keine Voraussetzung für die Anreicherung am kortikalen ER und den Sec-unabhängigen Transport von Ist2 zu Domänen der Plasmamembran.

Während in *sec23-1*-Zellen zum Teil sogar eine verstärkte Expression von YFP-Ist2 in Tochterzellen beobachtet wurde, war in der Doppelmutante *sec23-1/Δshe2* die Expression von YFP-Ist2 in Tochterzellen stark vermindert. Auch wenn der mRNA-Transport in die Tochterzelle unterbunden ist, besteht die Möglichkeit, dass bei einer starken Überexpression durch den *GAL1*-Promotor einige Kopien der *IST2*-mRNA in die Tochterzelle diffundieren und dort eine schwache Expression von Ist2 verursachen. Eine Detektion von einzelnen mRNA-Molekülen mittels FISH ist technisch nur möglich, wenn mehrere mRNA-Moleküle an einem einzelnen Punkt akkumulieren. Abgesehen von einer Diffusion der *IST2*-mRNA kann auch Ist2-Protein innerhalb der Membranen von der Mutter in die Tochterzelle diffundieren. Eine hohe Mobilität von GFP-markiertem Ist2 in Membranen wurde mittels *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP)-Experimenten festgestellt (Takizawa et al., 2000).

Ein weiterer Hinweis, dass die lokale Translation nicht direkt an den Sec-unabhängigen Transport von Ist2 an die Plasmamembran gekoppelt ist, stammt von der Kolo-kalisation der *IST2*-mRNA mit Ist2-Protein (Abb. 3.16 A). Mutiertes Ist2, das nicht mehr wie Wildtyp an die Zellperipherie transportiert wurde, zeigte punktförmige Akkumulationen in Tochterzellen. Diese Proteinpunkte wurden oft in der Nähe der *IST2*-mRNA detektiert ohne jedoch vollständig zu kolo-kalisieren. Teilweise waren Punkte von mutiertem Ist2-Protein auch in Mutterzellen erkennbar, obwohl das Signal der *IST2*-mRNA nur in Tochterzellen sichtbar war (Abb. 3.16 A). Da die Synthese von Ist2 unter Kontrolle des endogenen Promotors stattfand, stellen diese Proteinsignale wahrscheinlich altes Ist2 dar, welches beim vorherigen Zellzyklus translatiert wurde. Alternativ ist es möglich, dass sie von einer Translation von nicht lokalisierten mRNA-Molekülen in der Mutterzelle stammen. Die Detektion von Wildtyp und mutiertem Ist2 ist über einen langen Zeitraum möglich: Wenn die Expression von Wildtyp Ist2 oder mutiertem Ist2 für zwei Stunden induziert wurde und anschließend die erneute Translation der *IST2*-mRNA durch Zugabe von Glukose inhibiert wurde, konnten nach drei Stunden keine Abbauprodukte im Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 3.6 und 3.12).

#### 4.1.2 Translationsorte von Ist2

Es konnte gezeigt werden, dass trotz Lokalisation der *IST2*-mRNA an die Tochterzellspitze ein Teil von Wildtyp Ist2 kurz nach Synthese am pER der Mutterzelle und an der Zellperipherie der Mutter- und Tochterzelle akkumuliert (Abb. 3.5 A). Das beobachtete Ist2-Signal am pER und an der Zellperipherie der Mutterzelle wird vermutlich von einer kotranslationalen Translokation von Ist2 am perinukleären ER verursacht. Die erste Transmembrandomäne kann als Signal für die Translokation ins pER dienen. Da die *IST2*-mRNA nur ein einziges Lokalisationselement enthält, dessen *Stem-loop*-Struktur von She2 erkannt wird, ist es möglich, dass der Transport der *IST2*-mRNA nicht so effizient wie bei *ASH1* ist, dessen mRNA vier Lokalisationselemente besitzt (Olivier et al., 2005; Chartrand et al., 1999, 2002). Um die Effizienz des mRNA-Transports bestimmen zu können, müsste einerseits die genaue Konzentration der *IST2*-mRNA-Moleküle nach 40-minütiger starker Induktion mit Galaktose ermittelt werden und andererseits wäre die genaue Bindungsstärke von She2, dem RNA-bindenden Protein, an das *IST2*-Lokalisationselement nötig. Die Affinität von She2 ist jedoch nur bei der Bindung an eins der vier Lokalisationselemente der *ASH1*-mRNA bekannt. Bei Expression von Ash1 unter schwachem endogenem Promotor wird vermutet, dass alle mRNA-Kopien an die Tochterzellspitze transportiert werden (Niessing et al., 2004).

Eine Translation der *IST2*-mRNA am pER der Mutterzelle ist zwar wahrscheinlicher, jedoch kann eine Translation am kortikalen ER der Mutterzelle nicht ausgeschlossen werden, da *IST2*-mRNA-Moleküle über Diffusion an das kortikale ER der Mutterzelle gelangen können. Technisch ist eine Detektion von einzelnen mRNA-Molekülen, die nicht an einem Ort angereichert sind, mittels FISH schwer möglich.

In Mutterzellen ohne Tochterzelle war häufiger ein Ist2-Signal am pER detektierbar als in Mutterzellen mit Tochterzelle. Dieser Unterschied kann im Zeitpunkt der Polarisierung des Aktinzytoskeletts und der Ausbildung einer Tochterzelle begründet liegen. Ist2 wurde unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors mit Galaktose für den sehr kurzen Zeitraum von 40 min induziert. Da eine nicht synchronisierte Hefe-Kultur verwendet wurde, war in den Hefezellen je nach Stadium des Zellzyklus zum Teil schon ein polarisiertes Aktinzytoskelett vorhanden (Moseley und Goode, 2006). Sofern die Transkription der *IST2*-mRNA induziert wurde, nachdem schon eine Tochterzelle vorhanden war, wurde die mRNA vermutlich direkt von den She-Proteinen entlang des polarisierten Aktinzytoskeletts an die Tochterzellspitze transportiert. Dadurch würden weniger Zellen in diesem Zellzyklusstadium ein Ist2-Signal am pER aufweisen. Wenn dagegen die *IST2*-mRNA synthetisiert wurde, bevor das polarisierte Aktinzytoskelett und eine Tochterzelle ausgebildet waren, würde die *IST2*-mRNA am pER vorliegen.

Abgesehen vom She2-bindenden Lokalisationselement im kodierenden Bereich der *IST2*-mRNA (Olivier et al., 2005) könnte ein weiteres mRNA-Transportsignal in den nicht translatierten Regionen (UTRs) vorliegen, das den Translationsort bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass weder die *IST2*-5'UTR noch die *IST2*-3'UTR ein alleiniges Signal

für den Transport an die Zellperipherie enthielten (Abb. 3.2). Ein zusätzliches mRNA-Transportsignal in den C-terminalen 69 Aminosäuren von Ist2, die den Sec-unabhängigen Transport an die Zellperipherie vermitteln, konnte ebenfalls ausgeschlossen werden: Die Codonverwendung der C-terminalen 69 Aminosäuren von Ist2 wurde so geändert, dass die Proteinsequenz zwar beibehalten, aber die *stem-loop*-Struktur des She2-bindenden Lokalisationselements laut Vorhersageprogramm Mfold (Zuker, 2003) nicht mehr ausgebildet wurde. Diese Sequenz wurde im Kontext des GFP-markierten Reporterproteins Kex2 analysiert. Kex2 ist eine Furinprotease und übt seine Funktion am späten Golgi-Apparat und an Endosomen aus (Fuller et al., 1989a). Nach Anfügung der veränderten Ist2-Sequenz erfolgte ein Sec-unabhängiger Transport des Fusionsproteins an die Zellperipherie (Franz et al., 2007). Durch die Summe dieser Versuche konnte eine Beteiligung eines mRNA-Transportsignals beim Sec-unabhängigen Transport von Ist2 ausgeschlossen werden.

Ist2, welches kurz nach Synthese am pER akkumulierte, verschwand innerhalb weniger Minuten vom pER (Abb. 3.5 B und C). Die geringe zeitliche Differenz zwischen den beiden Versuchsansätzen mit Zykloheximid und Glukose ergab sich vermutlich daraus, dass im Gegensatz zu Zykloheximid die Zugabe von Glukose nur die Transkription der *IST2*-mRNA stoppt und nicht die Translation der bereits vorhandenen mRNA. Es ist unwahrscheinlich, dass das Ist2-Signal am pER aufgrund eines Proteinabbaus verschwand, da Ist2 nach Abschalten des *GAL1*-Promotors über mindestens drei Stunden hinweg sehr stabil blieb und keine Abbauprodukte aufwies (Abb. 3.6). Ein direkter Transport vom pER zu Domänen der Plasmamembran über Vesikel erscheint unwahrscheinlich, da der Transport von Ist2 zur Zellperipherie unabhängig von *SEC18* (NSF) verlief (Jüschke et al., 2005). Eine andere Möglichkeit ist ein Transport vom pER zum kortikalen ER über ER-Membranschläuche, die perinukleäres und kortikales ER verbinden. Bei *photobleaching*-Studien mit dem integralen ER-Protein Sec61 wurde gezeigt, dass die Diffusion von Membranproteinen innerhalb des ERs sehr schnell ist (Luedeke et al., 2005). Wenn das kortikale ER der Mutterzelle gebleicht wurde, wurde ein sehr schneller Verlust der Fluoreszenz innerhalb der Mutterzelle gemessen:  $t_{1/2} = 19 \pm 8$  s beim pER und  $t_{1/2} = 14 \pm 2$  s beim kortikalen ER der Mutterzelle. Das kortikale ER der Tochterzelle blieb dagegen wesentlich langsamer aus, da die Septinbarriere zwischen Mutter- und Tochterzelle die Diffusion verlangsamt [ $t_{1/2} = 119 \pm 36$  s, Luedeke et al. (2005)].

Die sehr kurze Lokalisation von Ist2 am pER erklärt, warum nach Markierung mit einem Fluorochrom Wildtyp Ist2 nie am pER detektiert werden konnte (Abb. 3.4): Die Reifungszeit eines Fluorochroms ist wesentlich länger als der hier analysierte Zeitraum von wenigen Minuten. Wenn in Hefezellen die Fluoreszenzintensität von YFP-markiertem Ist2 am Spektrofluorophotometer analysiert wurde, konnte frühestens 60 min nach Induktion mit Galaktose ein schwaches Fluoreszenzsignal detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

## 4.2 Analyse der Ist2-Lokalisationssignale

Da die C-terminalen 69 Aminosäuren von Ist2 ein Proteinsignal für die Anreicherung am kortikalen ER und den Sec-unabhängigen Transport an die Plasmamembran enthalten, stellt sich die Frage, welche biochemischen oder strukturellen Eigenschaften des Ist2-Sortierungssignals essentiell sind. Es ist möglich, dass eine Interaktion mit anderen Proteinen oder Lipiden nötig ist oder dass während des Transports eine Strukturänderung des Ist2-Sortierungssignals stattfindet. Laut Vorhersageprogramm AmphipaSeek bilden die C-terminalen elf Aminosäuren von Ist2 eine amphipathische Helix aus, während der Großteil des C-Terminus als unstrukturierte Sequenz vorliegt (Sapay et al., 2006). Die C-terminalen vier Aminosäuren enthalten eine di-basische KKXX-ER-*retrieval* Konsensussequenz [Abb. 3.8 und Cosson und Letourneur (1994)]. Diese Konsensussequenz ist jedoch nicht nötig für den Sec-unabhängigen Transport, da eine Mutation der C-terminalen vier Aminosäuren -KKKL entweder zu -RRRL oder zu -LLLL keinen Einfluss auf den Transport von Ist2 hatte (Petzinger, 2004).

### 4.2.1 Bedeutung der Multimerisierung für die Anreicherung von Ist2 am kortikalen ER und an Domänen der Plasmamembran

Um einen effizienten Transport von Ist2 an die Zellperipherie zu erreichen, könnte eine hohe lokale Konzentration von Ist2 in bestimmten ER-Domänen eine Rolle spielen. Es gibt drei Hinweise, dass eine Multimerisierung von Ist2 die Anreicherung im kortikalen ER und den Sec-unabhängigen Transport von Ist2 an Domänen der Plasmamembran positiv beeinflusst. In einem Hefestamm, der sowohl HA-markiertes wie auch Myc-markiertes Wildtyp Ist2 exprimiert, konnte Myc-Ist2 mit HA-Ist2 ko-immunpräzipitiert werden (Abb. 3.7). Ob die beobachtete Multimerisierung von Ist2 für den Transport oder erst für die Lokalisation an der Zellperipherie wichtig ist, kann zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig festgestellt werden. Einen zweiten Hinweis lieferte ein Versuch mit dem Reporterprotein Kex2 und einer Tetramerisierungsdomäne. Die Furinprotease Kex2 lokalisiert am späten Golgi-Apparat und an Endosomen (Fuller et al., 1989a). Durch Anfügung des Ist2-Sortierungssignals (69 Aminosäuren, bestehend aus T/H/S-Cluster und K/L-Sequenz, Abb. 3.8) wurde der Großteil des GFP-markierten Kex2 an die Zellperipherie umgeleitet (Franz et al., 2007). Wenn statt der C-terminalen 69 Aminosäuren von Ist2 nur die K/L-Sequenz angefügt wurde, konnte lediglich ein kleiner Teil des GFP-markierten Kex2 an die Zellperipherie dirigiert werden, der Großteil des GFP-markierten Fusionsproteins verblieb im ER, Golgi-Apparat oder Endosomen. Wenn zusätzlich zur K/L-Sequenz die Tetramerisierungsdomäne eines Gcn4 Leucin-Zippers angefügt wurde, lokalisierte das Fusionsprotein an der Zellperipherie (Franz et al., 2007). Dies zeigt, dass die Effizienz des Transports an die Zellperipherie durch eine Multimerisierung erhöht wurde. Ein weiterer Hinweis, dass eine Multimerisierung von Ist2-Molekülen einen positiven Einfluss auf den Transport ausübt, lieferte ein Vergleich der Transporteffizienz bei der Markierung von Ist2-Mutanten mit verschiedenen Fluorochromen. Im Kontext einer GFP-Markierung

genügten die C-terminalen 69 Aminosäuren von Ist2 für einen Transport an die Zellperipherie (Franz et al., 2007). Bei einer Markierung mit YFP wurde dagegen ein längerer Bereich - nämlich die C-terminalen 115 Aminosäuren - benötigt (Abb. 3.3). Dies liegt vermutlich an der Dimerisierung des Fluorochroms GFP: Im Gegensatz zu YFP dimerisiert GFP aufgrund eines Alanins an Position 206 (Shaner et al., 2005).

#### 4.2.2 Anreicherung von Ist2 an Domänen des kortikalen ERs

##### **Einfluss der basischen Aminosäuren auf die Anreicherung von Ist2 am kortikalen ER**

Durch gezielte Mutagenese konnte gezeigt werden, dass mehrere hydrophobe und basische Aminosäuren der K/L-Sequenz für eine Anreicherung von Ist2 an der Zellperipherie nötig sind (siehe Kapitel 3.5.1 und 3.5.5). Mutation der basischen Aminosäuren rief in den meisten Fällen eine gleichmäßige Akkumulation in Strukturen des pER und der Zellperipherie hervor. Die Lokalisation am pER war nicht transient wie bei Wildtyp Ist2, welches nur in einem Zeitfenster von wenigen Minuten am pER detektiert werden konnte: Nach Mutation der basischen Aminosäuren des N-terminalen Bereichs der K/L-Sequenz war mutiertes Ist2 über drei Stunden hinweg im pER sichtbar und wurde nicht abgebaut (Abb. 3.25). Außerdem wiesen die Lysine der K/L-Sequenz einen positionsabhängigen Effekt auf: Mutationen der fünf basischen Aminosäuren im C-terminalen Bereich beeinträchtigten im Gegensatz zu Mutationen des N-terminalen Bereichs nicht den Transport von Ist2 (Abb. 3.22). Lysin an Position 936 stellt die erste Aminosäure der amphipathischen Helix dar und war die einzige basische Aminosäure, die - sofern alleine mutiert - eine punktförmige Akkumulation von Ist2 zeigte (Abb. 3.23). Es ist denkbar, dass die basischen Aminosäuren im C-terminalen Bereich der K/L-Sequenz in einer amphipathischen Helix angeordnet sein müssen, um mit anderen Faktoren - z.B. Lipiden - interagieren zu können, während die basischen Aminosäuren im N-terminalen Bereich der K/L-Sequenz auch unstrukturiert vorliegen können. Ferner verstärkte eine Mutation von Lysin 936 den Transportdefekt, der bei einer Mutation der basischen Aminosäuren des C-terminalen Bereichs auftrat (Abb. 3.23 B). Daher ist anzunehmen, dass Lysin 936 als Beginn der amphipathischen Helix eine besondere Rolle einnimmt. Als Mindestvoraussetzung genügten zwei N-terminal gelegene basische Aminosäuren der K/L-Sequenz, zusammen mit den C-terminalen fünf basischen Aminosäuren, um Ist2 an die Zellperipherie zu dirigieren (Abb. 3.23 A und 3.24 A). Dies bedeutet, dass entweder andere Lysine oder Histidine ober- oder unterhalb des N-terminalen Bereichs die Funktion der mutierten Lysine übernehmen können oder dass Lysine eines anderen Ist2-Moleküls in *trans* wirken und so den Verlust der positiven Ladung ausgleichen können.

Ist2, welches kurz nach Synthese am pER akkumuliert, kann das pER entweder über Vesikel verlassen oder über ER-Membranschläuche zur Zellperipherie gelangen. Sowohl bei Wildtyp Ist2 als auch bei mutiertem Ist2 wurde eine Segregation von klassischen ER-*exit*

*sites* (ERES) des sekretorischen Weges beobachtet (Abb. 3.19). Ein Transport über Vesikel müsste unabhängig von Sec18 geschehen, welches essentiell für SNARE-vermittelte Membranfusionen ist (Jüschke et al., 2005). Wahrscheinlicher ist daher ein Transport zur Zellperipherie innerhalb der ER-Membranen. Nach Diffusion innerhalb der ER-Membran könnten Ist2-Moleküle, sobald sie in der Zellperipherie angelangt sind, von einem bestimmten Protein oder Lipid am kortikalen ER oder der Plasmamembran festgehalten werden, um eine Diffusion zurück in das Zellinnere zu verhindern. An den sogenannten Kontaktstellen liegen das kortikale ER und die Plasmamembran in einem sehr geringen Abstand (weniger als 30 nm) voneinander entfernt (Pichler et al., 2001; Perktold et al., 2007). Bei einer Lokalisation von Ist2 im kortikalen ER reicht die Länge des Ist2-C-Terminus aus, um eine Interaktion des Ist2-Sortierungssignals mit der Plasmamembran zu ermöglichen. Die Kontaktstellen unterscheiden sich in ihrer Protein- und Lipidzusammensetzung von der benachbarten Plasmamembran und dem restlichen ER. Es wurde eine Anreicherung von Enzymen beobachtet, die wichtig für die Lipidsynthese sind (Pichler et al., 2001). Die räumliche Nähe der beiden Membranen kann einen Austausch von Molekülen ermöglichen: Durch Rekrutierung von Lipidtransferproteinen kann an diesen Stellen ein nicht-vesikulärer Lipidtransport erfolgen (Lehto et al., 2005; Loewen et al., 2003).

Sehr viele kleine GTPasen, die ihre Funktion an der Plasmamembran ausüben, werden in Säugetierzellen durch ein Motiv, bestehend aus einem polybasisches Cluster und hydrophoben Aminosäuren oder einem Lipidanker, zur Zellperipherie rekrutiert (Heo et al., 2006). Dabei vermitteln die hydrophoben Aminosäuren bzw. der Lipidanker die unspezifische Interaktion mit Membranen, während das polybasische Cluster an Phosphatidylinositolphosphate (PIPs) bindet. Dabei spielen sowohl Phosphatidylinositol-4,5-Phosphat [PI(4,5)P<sub>2</sub>] als auch PI(3,4,5)P<sub>3</sub> eine wichtige Rolle.

Auch bei der Rekrutierung von Ist2 könnten PIPs beteiligt sein. An der Plasmamembran von *S. cerevisiae* befindet sich PI(4)P, welches von der Phosphatidylinositol-4-Kinase Stt4 hergestellt wird (Flanagan et al., 1993; Yoshida et al., 1994). PI(4)P wird sehr schnell von der PI(4)P-5-Kinase Mss4 zu PI(4,5)P<sub>2</sub> phosphoryliert (Homma et al., 1998; Desrivieres et al., 1998). Im ER ist dagegen PI(4)P das vorherrschende Glycerophospholipid (Strahl und Thorner, 2007; De Matteis et al., 2002). Bindungsstudien mit den C-terminalen, GFP-markierten 69 Aminosäuren von Ist2 [GFP-Ist2 (69 AS)] ergaben, dass Wildtyp Ist2 an PI(4,5)P<sub>2</sub>-haltige Liposomen binden kann [Hecht (2007) und M. Fischer, persönliche Mitteilung]. Eine wesentlich schwächere Bindung von GFP-Ist2 (69 AS) wurde bei Liposomen beobachtet, die PI(4)P an Stelle von PI(4,5)P<sub>2</sub> enthielten. Wenn dagegen die basischen Aminosäuren des N-terminalen Bereichs der K/L-Sequenz mutiert wurden, so wurde die Bindung von GFP-Ist2 (69 AS) an PI(4,5)P<sub>2</sub>-haltige Liposomen stark beeinträchtigt.

Es kann daher angenommen werden, dass die basischen Aminosäuren der K/L-Sequenz am Transport von Ist2 zur Zellperipherie durch Interaktion mit negativ geladenen Phospholipiden des kortikalen ERs oder der Plasmamembran beteiligt sind.

### **Einfluss der amphipathischen Helix auf die Anreicherung von Ist2 am kortikalen ER**

Neben einer Beteiligung der basischen Aminosäuren an der Rekrutierung von Ist2 zum kortikalen ER könnte auch die Interaktion einer amphipathischen Helix mit Membranen eine Rolle spielen. Da laut Vorhersageprogramm AmphipaSeek die C-terminalen elf Aminosäuren von Ist2 eine amphipathische  $\alpha$ -Helix ausbilden (Sapay et al., 2006), wurde die Ausbildung der amphipathischen Helix überprüft und der Einfluss der amphipathischen Helix auf den Transport von Ist2 bestimmt. Mit Hilfe von Zirkular-Dichroismus wurde die Sekundärstruktur von einem Peptid mit den C-terminalen 14 Aminosäuren von Ist2 (K933-L946) analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Peptid K933-L946 in wässriger Lösung (Kaliumphosphat-Puffer) unstrukturiert vorlag, während sich die Konformation in einem Trifluorethanol (TFE)-haltigen Puffer änderte. Nach Zugabe von steigenden Konzentrationen TFE (20-50%) wurde zum Teil eine  $\alpha$ -helikale Struktur ausgebildet. Wenn in dieser Peptidsequenz ein Leucin durch ein Prolin (L939P) ersetzt wurde, fand keine Konformationsänderung zu einer  $\alpha$ -helikalen Struktur statt (M. Fischer, unveröffentlichte Daten). Ebenso interferierte die Mutation Ist2 L939P mit der Anreicherung von Ist2 an der Zellperipherie: Bei dieser Mutation traten punktförmige Akkumulationen von Ist2 im Zellinneren auf (Abb. 3.21). Die Ausbildung der  $\alpha$ -helikalen Struktur scheint somit essentiell für die Anreicherung von Ist2 am kortikalen ER zu sein.

Eine Mutation der hydrophoben Leucine in der amphipathischen Helix von Ist2 verursachte meist eine Akkumulation von Ist2 in großen oder kleinen Punkten im Zellinneren oder in der Peripherie (Abb. 3.10 und 3.14). Eine gleichmäßige Verteilung in Strukturen des pER - wie durch Mutation der basischen Aminosäuren hervorgerufen - war nicht erkennbar. Die Punkte der Leucin-Mutanten kolokalisiert weder mit dem Golgi-Apparat (Kolokalisation mit Sec7, Sed5, Gef1 und Kex2; Abb. 3.17) noch mit Endosomen (Kolokalisation mit Gef1 und Kex2; Abb. 3.17). Stattdessen war eine Überlagerung der Leucin-Mutanten mit Strukturen des ERs erkennbar, welche durch Expression von Dpm1, Sec63, Erg6 und Scs2 sichtbar gemacht wurden (Abb. 3.18 und Abb. 3.35). Teilweise waren die punktförmigen Akkumulationen von Ist2 direkt bei Abzweigungen von tubulärem ER und pER erkennbar (Abb. 3.35). Wenn mutiertes Ist2 exprimiert wurde, war eine Veränderung des ERs (punktartige Strukturen oder kleine Ausstülpungen des ERs), sichtbar gemacht durch Dpm1 oder Sec63, erkennbar. Bei Koexpression von Wildtyp Ist2 war keine Veränderung des ERs zu erkennen. Es ist bislang unklar, ob mutierte Ist2-Moleküle eine Proliferation der ER-Membranen verursachten und außerdem Dpm1 bzw. Sec63 zu den Ist2-Punkten rekrutierten oder ob Dpm1 und Sec63 unabhängig von mutiertem Ist2 über Diffusion zu den Ist2-Akkumulationen im ER gelangte. Ob an diesen Stellen eine Proliferation der ER-Membranen - z.B. durch eine Interaktion des Ist2-Sortierungssignals mit ER-Membranen - stattfindet, könnte nur durch Elektronenmikroskopie, nicht jedoch durch Fluoreszenzmikroskopie geklärt werden. Ferner akkumulierten die Leucin-Mutanten nicht in klassischen ERES des sekretorischen Weges, da eine Segregation von mutiertem Ist2 und Sec13 stattfand (Abb. 3.19). Auch bei dem ER-Marker Hmg1 konnte keine Kolokalisation festgestellt

werden, die Punkte der Leucin-Mutanten wurden jedoch oft in unmittelbarer Nähe zum pER detektiert (Abb. 3.18). Dies spricht für eine Lokalisation von mutiertem Ist2 an bestimmten Domänen des ERs.

Eine Interaktion mit Membranen wird bei vielen Proteinen - wie z.B. kleinen G-Proteinen (Sar1, Arf1), Epsin und Proteinen mit BAR-Domäne - durch die Ausbildung einer amphipathischen Helix vermittelt (Antonny et al., 1997; Mossessova et al., 2003b; McMahon und Gallop, 2005). Als erster Schritt der Membranbindung erfolgt eine elektrostatische Interaktion von basischen Aminosäuren an eine negativ geladene Membranoberfläche (Wieprecht et al., 1999). Wichtig ist außerdem eine hohe lokale Proteinkonzentration, um eine Membrankrümmung zu induzieren. Die anfangs unstrukturierte Proteinsequenz ändert durch Membranbindung ihre Konformation und bildet eine amphipathische Helix aus, die sich parallel zur Membranoberfläche anordnet. Zuerst schieben sich hydrophobe Seitenketten der Aminosäuren in die Lipidschicht auf der zytosolischen Seite der Membran, woraufhin die entstehende Membrankrümmung durch andere Proteine stabilisiert werden kann (Hristova et al., 1999; McMahon und Gallop, 2005).

Ein ähnlicher Mechanismus wie bei den oben genannten kleinen G-Proteinen könnte bei der Anreicherung von Ist2 am kortikalen ER eine Rolle spielen. Die postulierte elektrostatische Interaktion von positiven Aminosäuren mit einer negativ geladenen Membranoberfläche könnte durch basische Aminosäuren im C-Terminus von Ist2 erfolgen. Der zweite Schritt wäre die Ausbildung und Membraninsertion einer amphipathischen Helix. Wenn der Querschnitt der Helix als zweidimensionaler Kreis betrachtet wird, bildet der Bereich der Leucine in diesem Kreis einen Winkel von 120 Grad. Der schmale Winkel aus hydrophoben Leucinen konnte - durch Insertion einer zusätzlichen Helixwindung - verschmälert werden, ohne die Anreicherung von Ist2 an der Zellperipherie zu beeinträchtigen (Abb. 3.20 A). Sobald jedoch der Winkel der Leucine erweitert und dadurch der amphipathische Charakter der Helix zerstört wurde, fand eine punktförmige Akkumulation von mutiertem Ist2 im Zellinneren statt (Abb. 3.20 B). Wenn die Reihenfolge der Leucine so geändert wurde, dass zum einen der Winkel der Leucine geringfügig verbreitert war und zum anderen ein positives Lysin zwischen den hydrophoben Leucinen positioniert war (LxxLL), könnte die Membraninsertion der amphipathischen Helix beeinträchtigt sein. Ferner spricht für eine Beteiligung der Leucine bei der Interaktion mit Membranen, dass die hydrophoben Leucine der K/L-Sequenz von Ist2 nur durch sehr hydrophobe und sperrige Aminosäuren ersetzt werden konnten (Abb. 3.13 und 3.14).

Anstelle einer direkten Membranbindung könnten die hydrophoben Leucine der K/L-Sequenz auch durch die Ausbildung einer bestimmten Sekundärstruktur - ähnlich einer *coiled-coil*-Struktur - an der Anreicherung von Ist2 an der Zellperipherie beteiligt sein. *Coiled-coil*-Strukturen können sich durch Zusammenlagerung von mehreren  $\alpha$ -Helices bilden, die ein Heptadmuster enthalten. Ein Heptadmuster ist die Periodizität von sieben Aminosäuren, wobei die erste und vierte Aminosäuren in diesem Muster präferentiell eine hydrophobe Aminosäuren ist (Parry et al., 2008). Die treibende Kraft für die Ausbildung einer *coiled-coil*-Struktur ist die Hydrophobizität der Aminosäuren im Heptadmuster (Gruber und Lupas, 2003). Die Leucine der K/L-Sequenz von Ist2 sind in einem Heptad-

muster angeordnet, jedoch ist keine Periodizität des Heptadmusters gegeben. Es besteht die Möglichkeit, dass sich mehrere Ist2-Moleküle - ohne Ausbildung einer *coiled-coil*-Struktur - mit der hydrophoben Seite der C-terminalen amphipathischen Helix aneinanderlagern. Dadurch würde eine Interaktion der basischen Außenseiten mit negativ geladenen Phospholipiden der Plasmamembran begünstigt.

#### 4.2.3 Transport von Ist2 zu Domänen der Plasmamembran

Es ist möglich, dass der Transport von Ist2 aus dem ER mit einer lokalen Anreicherung des Proteins in der Zellperipherie - vermutlich über die basischen Aminosäuren der K/L-Sequenz - gekoppelt ist. Die Anreicherung könnte durch eine Interaktion von Ist2 mit Proteinen oder Lipiden am kortikalen ER oder der Plasmamembran geschehen, die ein Zurückhalten der Ist2-Moleküle an Domänen des kortikalen ERs bewirkt. Wenn diese Interaktion durch eine Mutation der Leucine blockiert wäre, könnten die Ist2-Moleküle nicht länger an den *exit sites* festgehalten werden und würden über Diffusion an das pER gelangen. Ein ähnlicher Mechanismus existiert bei FGF-2, bei dem eine Bindung an extrazelluläre Heparansulfat-Moleküle essentiell für eine Sekretion von FGF-2 ist (Nickel, 2007).

Missgefaltete Proteine werden normalerweise durch das Ubiquitin/Proteasom-System abgebaut (Römis, 1999). Wenn jedoch die Menge der synthetisierten missgefalteten Proteine die Kapazität des Proteinabbaus überschreitet, kann es vorkommen, dass missgefaltete Proteine im ER in sogenannten *Russell bodies* akkumulieren (Umebayashi et al., 1997; Kopito und Sitia, 2000). Die Leucin-Mutante Ist2 L942V zeigte eine Akkumulation in Punkten, die temperaturabhängig war (Abb. 3.15). Bei erhöhter Temperatur löste sich der Großteil der Ist2 L942V-Punkte durch einen energieabhängigen Mechanismus auf. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass die Membranfluidität bei erhöhter Temperatur verändert ist. Andererseits deutet ein energieabhängiger Mechanismus auf einen Proteinabbau durch das Ubiquitin/Proteasom-System oder eine Chaperon-assistierte Faltung der Proteine hin. Ein Abbau erscheint unwahrscheinlich, da mutiertes Ist2 über mindestens drei Stunden hinweg sehr stabil blieb: Es konnten mittels Western Blot keine Abbauprodukte nachgewiesen werden, wenn die Expression von mutiertem Ist2 für zwei Stunden induziert wurde und die Probe anschließend für drei Stunden mit Glukose inkubiert wurde, um die erneute Translation von *IST2*-mRNA zu inhibieren (Abb. 3.12 und 3.25). Eine Chaperon-assistierte Faltung kann dagegen nicht ausgeschlossen werden. Allerdings gibt es mehrere Hinweise, dass mutiertes Ist2 nicht vollständig missgefaltet vorliegt. Ist2 L942Q konnte genau wie Wildtyp Ist2 mit Hilfe von Digitonin oder Triton X-100 aus Membranextrakten solubilisiert werden (Abb. 3.11, 3.30 und 3.32). Des Weiteren wurde bei der Immunpräzipitation von Ist2 keine Anreicherung von Chaperonen oder von Proteinen des Ubiquitin/Proteasom-Systems beobachtet (Abb. 3.30 und 3.32). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Akkumulation in Punkten bei den Leucin-Mutanten durch einen funktionellen Verlust des Ist2-Sortierungssignals verursacht wurde. Nachdem bei den

Leucin-Mutanten die basischen Aminosäuren unverändert waren, kann angenommen werden, dass zusätzlich zu einer Anreicherung von Ist2 in der Zellperipherie - vermutlich durch die basischen Aminosäuren vermittelt - ein zweiter Schritt mit Beteiligung der hydrophoben Leucine nötig ist, um Ist2-Moleküle aus dem ER an Domänen der Plasmamembran zu transportieren.

### 4.3 Konservierung des Ist2-Sortierungssignals

Unter der Annahme, dass Ist2-Homologe in anderen Spezies einen ähnlichen Transportweg wie in *S. cerevisiae* verwenden, wurde nach konservierten Positionen gesucht, um ein essentielles Sortierungsmotiv zu identifizieren. Ist2-Homologe in Säugetieren beschränken sich jedoch auf Proteine, die genau wie Ist2 eine DUF590-Domäne enthalten. Dazu gehören die Proteine der TMEM16-Familie, zu denen Ist2 nur eine geringe Homologie von 22-25% aufzeigt. TMEM16E (GDD1) besitzt die höchste Homologie zu Ist2 und zeigte in COS1- bzw. COS7-Zellen eine Lokalisation am ER [eigene Beobachtung und Tsutsumi et al. (2004)]. Es wird vermutet, dass TMEM16E an der Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase beteiligt ist und dadurch vielfältige Funktionen bei der Entwicklung der Skelettmuskeln ausübt (Mizuta et al., 2007; Tsutsumi et al., 2004). Nachdem TMEM16E weder an der Plasmamembran lokalisiert ist noch eine Sequenzhomologie im C-Terminus des Proteins festgestellt werden konnte, kann angenommen werden, dass TMEM16E einem anderen Transportweg als Ist2 folgt.

Eine Homologie des C-Terminus von Ist2, der das Sortierungssignal enthält, ist nur bei nah verwandten Hefespezies zu finden. Die Ähnlichkeiten beschränken sich im Wesentlichen auf die K/L-Sequenz. Bei der Mutationsanalyse wurden die C-terminalen 15 Aminosäuren von Ist2 aus *S. cerevisiae* entweder durch die C-terminalen 14 Aminosäuren von Ist2 aus *S. castelli* oder durch die C-terminalen 15 Aminosäuren von Ist2 aus *C. guilliermondii* ersetzt. Das chimäre Konstrukt mit der Sequenz aus *S. castelli* zeigte keine Beeinträchtigung des Sec-unabhängigen Transports von Ist2 (Abb. 3.27). Die Mutation des Prolins 932 sowohl bei *S. castelli* als auch bei *C. guilliermondii* hat vermutlich keinen Einfluss auf den Transport von Ist2, da eine Mutation des Prolins 932 zu Alanin bei *S. cerevisiae* auch keine Beeinträchtigung des Transports aufwies (Abb. 3.26). Bei *S. castelli* sind die restlichen veränderten Positionen meist durch Aminosäuren mit gleicher Ladung oder ähnlicher Hydrophobizität ersetzt (Tabelle 3.1). Eine Ausnahme ist der Austausch von Histidin 934 zu Glutaminsäure; diese Tolerierung steht jedoch in Einklang mit der Mutationsanalyse von Ist2 in *S. cerevisiae*, da im N-terminalen Bereich der K/L-Sequenz weniger als die fünf vorhandenen basischen Aminosäuren benötigt werden (Abb. 3.24 A). Bei dem chimären Konstrukt mit der Sequenz aus *C. guilliermondii* sollten die meisten Sequenzveränderung toleriert werden: Der Verlust von zwei basischen Aminosäuren im N-terminalen Bereich der K/L-Sequenz übte bei *S. cerevisiae* keinen negativen Einfluss auf den Transport von Ist2 aus, ebensowenig sollte die C-terminale Extension um zwei Aminosäuren eine Beeinträchtigung hervorrufen. Bei *S. cerevisiae* wurde auch eine Ist2-Mutante mit C-terminaler

YFP-Markierung (unveröffentlichte Ergebnisse von C. Jüschke und M. Seedorf) oder mit einer C-terminalen Extension von sieben Aminosäuren an die Zellperipherie transportiert (Abb. 3.26). Allerdings wurde bei *S. cerevisiae* die Änderung der Reihenfolge der Leucine zu LxxLL, wie sie bei *C. guilliermondii* auftritt, nicht toleriert (Abb. 3.20). Daher ist es wahrscheinlich, dass die Beeinträchtigung des Transportes von Ist2 an die Zellperipherie hauptsächlich aufgrund der LxxLL-Mutation beruht. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die restlichen Sequenzveränderungen einen zusätzlichen Effekt bewirken können.

Als Ergänzung zur Analyse der Konservierung des Ist2-Sortierungssignals wäre ein Ist2-Homolog aus einer Hefespezies wie z.B. *K. lactis* wichtig, dessen Ist2-Sequenz mehr Änderungen als bei *S. castelli*, jedoch weniger als bei *C. guilliermondii* aufweist. Aufgrund technischer Schwierigkeiten bei der DNA-Synthese konnte ein Oligonukleotid mit dieser Sequenz nicht synthetisiert werden. Eine Möglichkeit wäre, entweder die Codonverwendung der gewünschten Sequenz zu verändern oder ein Ist2-Homolog aus einer anderen Hefespezies zu analysieren.

Insgesamt muss bei der Herangehensweise mit chimären Konstrukten berücksichtigt werden, dass Ist2-Homologe aus anderen Hefespezies über redundante Signale in der nicht analysierten Sequenz verfügen können. Daher ist ein Vergleich mit der Mutationsanalyse in *S. cerevisiae* nur bedingt aussagekräftig. Trotz dieser Limitation kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Hefespezies für Ist2-Homologe einen ähnlichen Transportweg wie bei *S. cerevisiae* verwenden. Ausgehend von den Ergebnissen der extensiven Mutationsanalyse in *S. cerevisiae*, *S. castelli* und *C. guilliermondii* kann das essentielle Sortierungsmotiv K x [LIWF] [LIWF] x x [LIWF] vorgeschlagen werden. Ein ähnliches Proteinmotiv ist beim  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor STIM2 aus *Mammalia* zu finden. STIM2 reguliert die basale  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol und im ER über Interaktion mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal ORAI1 an der Plasmamembran. Genau wie das Homolog STIM1 wird STIM2 nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletion vom generellen ER zu ER-Plasmamembran-Kontaktstellen transportiert (Brandman et al., 2007). Es wird kontrovers diskutiert, ob STIM1 ausschließlich an ER-Plasmamembran-Kontaktstellen oder auch an der Plasmamembran lokalisiert ist (Hauser und Tsien, 2007; Zhang et al., 2005; Hewavitharana et al., 2007). Genau wie Ist2 bildet STIM2 eine C-terminale amphipathische Helix aus und enthält in einer C-terminalen Lysin-reichen Sequenz ein ähnliches Proteinmotiv wie in der K/L-Sequenz von Ist2. Die Anordnung der hydrophoben Aminosäuren ist jedoch invers (IxxLF bei STIM2 statt LLxxL bei Ist2), diese Inversion ist auch bei nah verwandten Hefespezies von *S. cerevisiae* zu finden, beispielsweise bei *C. guilliermondii*. Es ist möglich, dass STIM2 einen ähnlichen Transportweg wie Ist2 in *S. cerevisiae* nutzt.

Das Ist2-Sortierungssignal bestehend aus den C-terminalen 69 Aminosäuren scheint auch in Säugerzellen einen Transport an die Zellperipherie zu bewirken: Das GFP-markierte Ist2-Sortierungssignal lokalisierte an der Zellperipherie von U2OS-Zellen (E. Ercan und M. Fischer, persönliche Mitteilung). Außerdem konnte der GFP-markierte TAP1-Transporter in U2OS- und NIH3T3-Zellen durch Anfügung des Ist2-Sortierungssignals an peripheres

ER dirigiert werden (E. Ercan, persönliche Mitteilung). Durch Ausbildung eines Heterodimers wurde auch TAP2 umgeleitet, obwohl es nicht mit der Ist2-Sequenz markiert war. Die Peptidtransporter TAP1 und TAP2 spielen eine Rolle bei der Beladung von MHC I-Molekülen (Abele und Tampe, 2004). Ein weiterer Hinweis für eine Konservierung des Sortierungssignals stammt von Versuchen mit dem Membranprotein UNC93B1, das am Transport von *Toll-like*-Rezeptoren zu Endolysosomen beteiligt ist (Kim et al., 2008). Es konnte durch Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass UNC93B1 durch Anfügung des Ist2-Sortierungssignals an die Zellperipherie von HEK-293T-Zellen dirigiert wurde. Es wurde jedoch nicht überprüft, ob das Fusionsprotein an die Zelloberfläche transportiert wird. Durch Interaktion mit UNC93B1 wurde auch der koexprimierte *Toll-like*-Rezeptor TLR9 zur Zellperipherie umgeleitet (Kim et al., 2008). Es ist möglich, dass auch in Säugerzellen eine Anreicherung von Ist2-Fusionsproteinen an der Zellperipherie über bestimmte Lipide geschehen kann.

#### 4.4 Interaktionspartner von Ist2

Um Interaktionspartner von Ist2 zu identifizieren, wurden biochemische Herangehensweisen angewandt und ein genetischer Screen durchgeführt. Eine Übersicht der Interaktionspartner von Ist2 - zusammengestellt aus Ergebnissen dieser Arbeit und von anderen Arbeitsgruppen - ist in Abb. 4.1 dargestellt. Zu beachten ist, dass Interaktionen mit Protein- oder Lipidfaktoren durch direkte oder indirekte Bindung stattfinden können. Interaktionspartner können aufgrund der Funktion von Ist2 binden oder beim Transport von Ist2 an die Zellperipherie beteiligt sein.

Bei dem genetischen Screen mit Hilfe der Hughes Kollektion (Tet-regulierbarer Promoter) wurde die Lokalisation von GFP-markiertem Ist2 in über 800 Hefestämmen analysiert, bei denen durch Zugabe von Doxizyklin die Expression des jeweiligen essentiellen Gens ausgeschaltet werden konnte. Bei einem Transportdefekt von Ist2 wäre eine Lokalisation von GFP-Ist2 im pER oder in anderen intrazellulären Strukturen (Golgi-Apparat, Endosomen, Vakuole) erkennbar gewesen. Bei dem genetischen Screen wurden keine Protein- oder Lipidfaktoren gefunden, die mit Ist2 interagierten. Es ist möglich, dass manche der analysierten Gene trotzdem einen Einfluss auf den Transport von Ist2 haben. Sobald zusätzlich andere essentielle oder nichtessentielle Gene am Transportweg von Ist2 beteiligt sind, kann der Transportdefekt umgangen werden und Ist2 wird an die Zellperipherie transportiert. Eine weitere Limitation war die unterschiedliche Halbwertszeit der essentiellen Proteine. Die Depletion der Proteine wurde nicht einzeln überprüft. Die Zugabe von Doxizyklin erfolgte jedoch über Nacht in einer Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$ , um einerseits sicherzustellen, dass das betreffende Protein nahezu vollständig abgebaut war, und andererseits ein Überleben der Zellen zu gewährleisten. Bei den Hefestämmen, die die lange Inkubation mit einer Doxizyklin-Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  nicht überlebten, wurde der Versuch mit einer niedrigen Doxizyklin-Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  (laut Herstellerangaben) wiederholt.

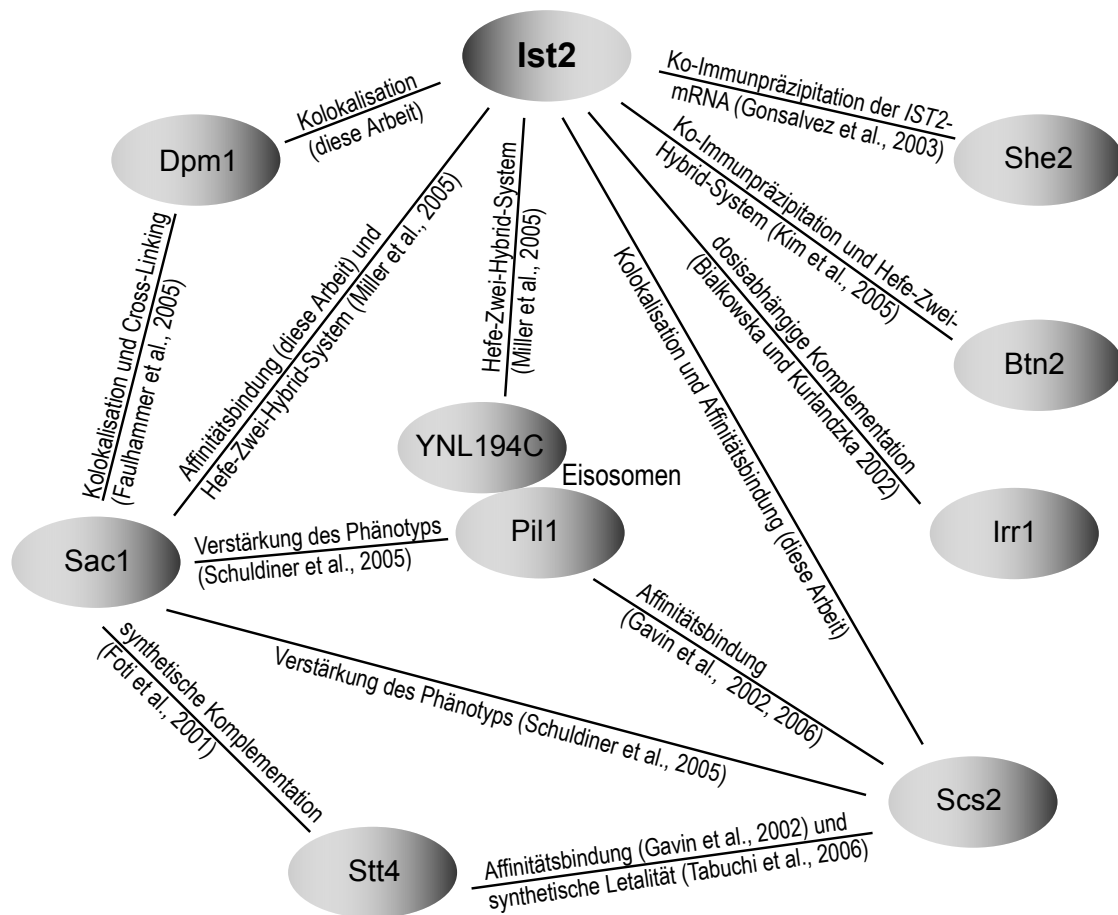


Abbildung 4.1: Interaktionspartner von Ist2

Bei Ko-Immünpräzipitationsstudien wurde eine Bindung der ER-Membranproteine Sac1 und Scs2 an Ist2 detektiert (Tab. 3.4). Die Identität der ko-immunpräzipitierten Proteine wurde mittels Western Blot bestätigt (Abb. 3.33 und 3.34). Für eine spezifische Anreicherung von Sac1 und Scs2 spricht, dass keine abundanten Chaperone wie Ssa1, Sse1 oder Kar2 ko-immunpräzipitiert wurden, sondern Proteine, die in geringer Kopienzahl in der Zelle vorliegen. In einer logarithmisch wachsenden Zelle sind etwa  $3,5 \times 10^3$  Scs2-Moleküle und etwa  $4,8 \times 10^4$  Sac1-Moleküle vorhanden. Im Vergleich dazu liegen die Hsp70-Proteine Kar2, Ssa1 und Sse1 in logarithmisch wachsenden Zellen in einer abundanteren Kopienzahl von etwa  $3,37 \times 10^5$ ,  $2,69 \times 10^5$  bzw.  $7,17 \times 10^4$  Molekülen pro Zelle vor (Ghaemmaghami et al., 2003).

Die Interaktion zwischen Ist2 und Scs2 könnte sowohl direkt als auch indirekt stattfinden, da die beiden Proteine in solubilisierten Membrankomplexen vorlagen, die auch eine geringe Menge Sec61 enthielten (Abb. 3.34). Eine unspezifische Interaktion bei den Ko-Immünpräzipitationen z.B. aufgrund der KKXX-ER-*retrieval*-Konsensussequenz erscheint unwahrscheinlich, da weder die beiden 14-3-3-Moleküle in Hefe (Bmh1 und Bmh2) noch Komponenten der COPI-Proteinhülle mit Ist2 ko-immunpräzipitiert wurden (Daten nicht gezeigt).

Die Bindung von Ist2 an Scs2 könnte Ist2 in einer spezifischen Membranumgebung positionieren, die einen Transport von Ist2 vom kortikalen ER an die Plasmamembran begünstigt. Scs2 ist ein integrales Membranprotein, das gleichmäßig im ER verteilt ist (Loewen et al., 2007). Es ist ein Homolog von VAP (*Vesicle-associated membrane protein-associated protein*) und interagiert u.a. mit den Sterol-transportierenden Proteinen Osh2 und Osh3, die an der Plasmamembran lokalisiert sind (Loewen et al., 2003). Es wird vermutet, dass Scs2 als Adaptor einen Kontakt zwischen kortikalem ER und der Plasmamembran in Tochterzellen herstellt. Diese Interaktion spielt bei der Vererbung des kortikalen ERs, insbesondere bei der Anheftung des kortikalen ERs an die Plasmamembran, eine Rolle (Loewen et al., 2007). Vermutlich begrenzt Scs2 die Lokalisation von Sterol-transportierenden Proteinen auf ER-Plasmamembran-Kontaktstellen, an denen die beiden Membranen weniger als 30 nm voneinander entfernt sind (Loewen et al., 2003; Olkkonen und Levine, 2004; Lehto et al., 2005; Levine und Loewen, 2006). Die Rekrutierung von Sterol-transportierenden Proteinen zu diesen Kontaktstellen erfolgt über zwei verschiedene Domänen: Die PH-Domäne kann an membranständige PIPs binden, während das FFAT-Motiv mit Scs2 interagiert (Levine und Loewen, 2006; Lehto et al., 2005). Scs2 selbst bindet über eine N-terminale Domäne, die mehrere Lysine enthält, *in vitro* hauptsächlich an PIPs, die monophosphoryliert sind (Kagiwada und Hashimoto, 2007). Die Interaktion von Scs2 mit PIPs ist jedoch nicht für die Lokalisation am ER nötig, sondern nur für die funktionelle Aktivität von Scs2 (Kagiwada und Hashimoto, 2007). Daher könnte Scs2 sowohl durch direkte Interaktion mit PIPs als auch indirekt über Bindung an Sterol-transportierende Proteine in einer spezifischen Membranumgebung positioniert werden.

Mit Hilfe von epistatischen Mini-Genchip-Profilen (*epistatic miniarray profiles*, E-MAPs) wurde eine schwache Korrelation der Phänotypen von Scs2 und Sac1 festgestellt [Verstärkung des Phänotyps, Schuldiner et al. (2005)]. Außerdem wurde von Miller et al. eine Protein-Protein-Interaktion von Sac1 an Ist2 bei einem Hefe-Zwei-Hybrid-System (*Yeast Two-Hybrid*) detektiert (Miller et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde eine vermutlich transiente Bindung von Sac1 an Ist2 beobachtet, da Sac1 bei der Ko-Immunpräzipitation eine niedrige Affinität für Ist2 bzw. Ist2 L942Q zeigte. Die Phosphatidylinositol-Phosphatase Sac1 reguliert am ER und Golgi-Apparat den Level von PI(4)P (Foti et al., 2001). Abhängig von der Wachstumsphase der Zelle befindet sich Sac1 am ER oder am Golgi-Apparat (Faulhammer et al., 2005). Bei exponentiell wachsenden Zellen wird Sac1 über COPI-Vesikel vom Golgi-Apparat zum ER transportiert (Faulhammer et al., 2005, 2007). Die Lokalisation am ER wird über eine Interaktion zwischen dem C-Terminus von Sac1 und Dpm1 vermittelt (Faulhammer et al., 2005). Bei niedrigem metabolischem Umsatz wird Sac1 über COPII-Vesikel zum Golgi-Apparat transportiert (Faulhammer et al., 2007). Sac1 definiert somit über Regulation der PIP-Level die Membranidentität der jeweiligen Kompartimente. Durch ein Zusammenspiel von Sac1 und Scs2 könnte eine Anreicherung von Ist2 an ER-Plasmamembran-Kontaktstellen geschehen. Es ist möglich, dass an solchen Domänen des kortikalen ERs eine Membranumgebung geschaffen wird,

die kompetent ist, einen Transport von Ist2 vom kortikalen ER an die Plasmamembran zu bewerkstelligen. Wenn Sac1 unter nährstoffarmen Bedingungen zum Golgi-Apparat transportiert wurde, steigt der Level an PI(4)P am ER, mit denen z.B. Scs2 interagieren kann (Kagiwada und Hashimoto, 2007). An ER-Plasmamembran-Kontaktstellen, an denen Scs2 mit Sterol-transportierenden Proteinen interagiert, könnte die räumliche Nähe der Membranen den Transport von Ist2 vom kortikalen ER zu Domänen der Plasmamembran begünstigen.

Sac1 und Scs2 bilden auch über die Phosphatidylinositol-4-Kinase Stt4 ein Netzwerk: Sac1 dephosphoryliert am Golgi-Apparat PI(4)P, welches hauptsächlich von Stt4 gebildet wurde. Sac1 und Stt4 zeigen laut Foti et al. (2001) eine synthetische Komplementation. Ferner wurde eine synthetische Letalität und über eine Affinitätsbindung eine Interaktion von Scs2 und Stt4 detektiert (Tabuchi et al., 2006; Gavin et al., 2002).

Weitere Proteine, die mit Ist2 interagieren (siehe Abb. 4.1), sind das mRNA-bindende Protein She2, das cytosolische Btn2 (ein v-SNARE bindendes Protein) und ein eisosomal Protein (kodiert von *YNL194C*), welches bei der Endozytose beteiligt ist. Ferner besteht zwischen *IRR1* und *IST2* eine dosisabhängige Komplementation [siehe Kapitel 1.4.1 und Bialkowska und Kurlandzka (2002)]. Die *IST2*-mRNA wurde mit She2-Partikeln koimmunpräzipitiert (Gonsalvez et al., 2003). Dies steht in Einklang mit dem She2-abhängigen mRNA-Transport an die Tochterzellspitze, der für die *IST2*-mRNA postuliert ist (Shepard et al., 2003; Olivier et al., 2005). Laut Kim et al. (2005) ist Btn2 wichtig für den Transport von Ist2, da GFP-markiertes Ist2 in einem  $\Delta ist2\Delta btn2$ -Hefestamm eine Lokalisation im Cytosol und an der Vakuolenmembran zeigte. Dieses Ergebnis konnte jedoch nicht bestätigt werden (unveröffentlichte Daten von C. Jüschke). Die Interaktion von Ist2 mit einem eisosomal Protein, welches von *YNL194C* kodiert wird, wurde mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid-Systems detektiert (Miller et al., 2005). Eisosomen markieren Stellen der Zellperipherie, an denen Endozytose stattfindet; sie bestehen hauptsächlich aus den Proteinen Pil1 und Lsp1, die durch die Genprodukte von *SUR7*, *FMP45* und *YNL194C* vervollständigt werden (Walther et al., 2006). Daraus ergibt sich ein Netzwerk, das auch Scs2 und Sac1 mit einbezieht: Zwischen Scs2 und einem weiteren eisosomal Protein (Pil1) wurde eine Protein-Protein-Interaktion festgestellt (Gavin et al., 2002, 2006). Sac1 und Pil1 wiederum zeigten eine Korrelation der Phänotypen [Verstärkung des Phänotyps, Schuldiner et al. (2005)].

Bei Ist2-Mutanten konnte in der vorliegenden Arbeit eine Kolokalisation mit dem ER-Protein Dpm1 detektiert werden (Abb. 3.18). Dpm1 kolokalisierte laut Faulhammer et al. (2005) mit Sac1 und konnte mit Sac1 durch Cross-Linking-Reagenzien vernetzt werden.

In Anbetracht der starken Vernetzung der Interaktionspartner von Ist2 untereinander ist es sehr wahrscheinlich, dass die Domänen des ERs, in denen Ist2 während des Transports lokalisiert ist, auf dynamische Weise gebildet werden und vielfältige Verbindungen bei ihrer Entstehung genutzt werden.

## 4.5 Modell des Transports

Es ist bislang unklar, ob Ist2 vom kortikalen ER bis an Domänen der Plasmamembran transportiert wird oder ob lediglich eine Anreicherung von Ist2 in speziellen Domänen des kortikalen ERs erfolgt, die Zugang zu externen Proteasen besitzen. Manche Lipide wie z.B. Phosphatidylethanolamin können aufgrund ihrer Struktur keine stabile Lipid-Doppelschicht ausbilden (van den Brink-van der Laan et al., 2004). Wenn solche Lipide an einer Membrandomäne akkumulieren, wird die gleichmäßige Lipidanordnung gestört (van den Brink-van der Laan et al., 2004; van Meer et al., 2008). Die lokale Destabilisierung der Membran kann einen Lipidaustausch zwischen zwei Membranen ermöglichen und in einer lokalen Zugänglichkeit für externen Proteasen resultieren. Im folgenden Modell wird davon ausgegangen, dass sich Ist2 an Domänen der Plasmamembran befindet.

Um ein Modell des Transportwegs von Ist2 an Domänen der Plasmamembran zu skizzieren, muss anfangs zwischen She2-abhängigem und She2-unabhängigem Transport von Ist2 differenziert werden (siehe Abb. 4.2). Der She2-abhängige Transport der *IST2*-mRNA an die Tochterzellspitze erfolgt durch ein einziges mRNA-Lokalisationselement, das eine stabile *stem-loop*-Struktur an Position 2694-2785 nt bildet (Olivier et al., 2005). Bei der *ASH1*-mRNA wird dagegen ein effizienter Transport an die Tochterzellspitze durch vier mRNA-Lokalisationselemente vermittelt (Chartrand et al., 2002; Niessing et al., 2004). Es ist daher wahrscheinlich, dass die Effizienz des She2-abhängigen Transports der *IST2*-mRNA nicht ausreicht, um alle *IST2*-mRNA-Moleküle an die Tochterzellspitze zu transportieren. In diesem Fall würde ein Teil der *IST2*-mRNA am pER der Mutterzelle translatiert und in der beobachteten Lokalisation von Ist2 am pER resultieren.

Während beim She2-abhängigen Transport ein mRNA-Lokalisationssignal benötigt wird, erfolgt beim She2-unabhängigen Transport die Anreicherung von Ist2 am kortikalen ER wahrscheinlich nur durch ein Proteinsignal. Da Sec18 (NSF) nicht für den Transport von Ist2 an die Zellperipherie benötigt wird, ist ein vesikulärer Transport vom pER der Mutterzelle an Domänen der Plasmamembran unwahrscheinlich (Jüschke et al., 2005). Dagegen ist aufgrund der schnellen Kinetik ein Transport von Ist2 innerhalb der ER-Membranschläuche, die pER und kortikales ER verbinden, sehr wahrscheinlich. Für den letzteren Transportweg spricht außerdem die beobachtete Kolo-kalisation der Leucin- und Lysinmutanten mit mehreren ER-Proteinen. Hierbei ist entweder ein zielgerichteter Transport innerhalb der ER-Membranen an die Zellperipherie oder eine Diffusion, kombiniert mit einem spezifischen Festhalten des Ist2-Proteins an der Zellperipherie, denkbar. Eine Anreicherung von Ist2 am kortikalen ER erfolgt vermutlich über eine Interaktion zwischen den positiv geladenen Aminosäuren (Lysine und Histidine) des Ist2-C-Terminus mit einer negativ geladenen Membranoberfläche. An ER-Plasmamembran-Kontaktstellen ist eine sehr geringe Distanz der beiden Membranen gegeben, die die Ausbildung der C-terminalen amphipathischen  $\alpha$ -Helix von Ist2 in einer hydrophoben Membranumgebung begünstigen kann. Eine direkte Interaktion des Ist2-Sortierungssignals mit der Plasmamembran wäre an diesen Stellen aufgrund des langen unstrukturierten Ist2-C-Terminus möglich.

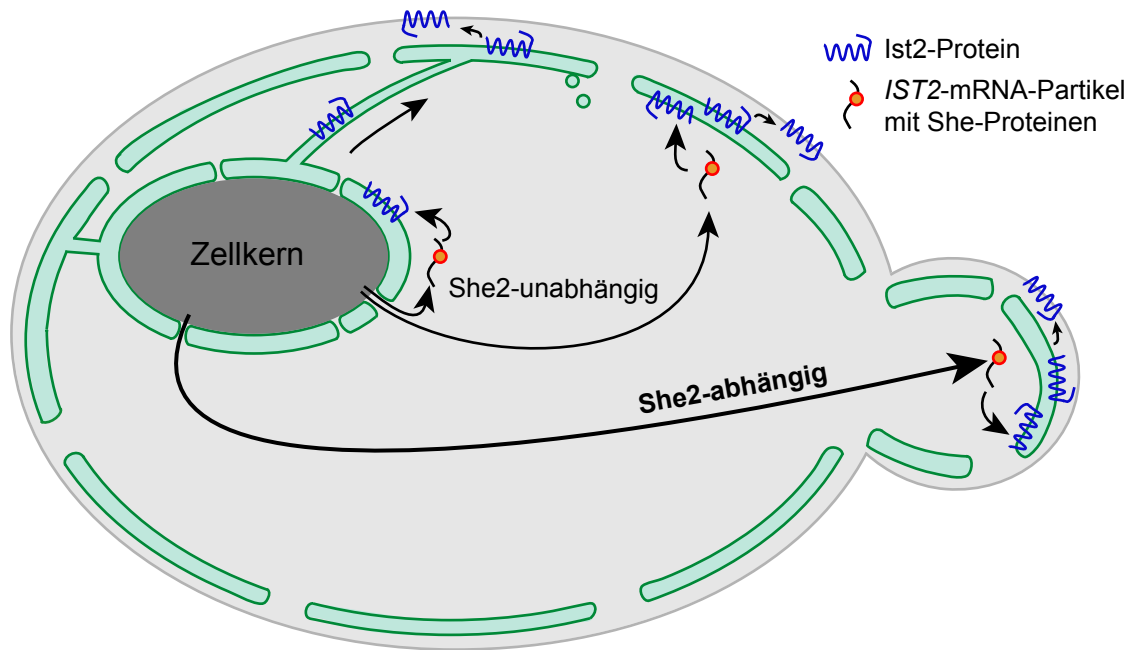


Abbildung 4.2: Modell des Ist2-Transportwegs

Bei der Rekrutierung von Ist2 zu Domänen des kortikalen ERs, die kompetent für einen Transport an die Plasmamembran sind, können eine spezifische Lipidumgebung [PI(4)P und PI(4,5)P<sub>2</sub>] und der Adaptor Scs2 beteiligt sein. Membranständiges PI(4,5)P<sub>2</sub> bzw. PI(4)P könnten als Interaktionspartner für Ist2 bzw. für Scs2 fungieren. Ein möglicher Ablauf der Reaktionen soll im Folgenden skizziert werden: PI(4)P an der Plasmamembran wird von der Phosphatidylinositol-4-Kinase Stt4 generiert und von der PI(4)P-5-Kinase Mss4 phosphoryliert, so dass PI(4,5)P<sub>2</sub> entsteht [zusammengefasst in Strahl und Thorner (2007)]. Scs2 könnte an PI(4)P an der Plasmamembran oder am ER binden (Kagiwada und Hashimoto, 2007; Strahl und Thorner, 2007). Als Regulator des PI(4)P sowohl an der Plasmamembran und am ER käme die Phosphatidylinositol-Phosphatase Sac1 ins Spiel, die zwischen den beiden Kompartimenten ER und Golgi-Apparat wechseln kann (Foti et al., 2001; Tahirovic et al., 2005; Faulhammer et al., 2005, 2007). Sac1 könnte durch die Nähe der Membranen an ER-Plasmamembran-Kontaktstellen auch Zugang zu PIPs der Plasmamembran erhalten und dadurch die Bindung von Ist2 und Scs2 an PI(4)P bzw. PI(4,5)P<sub>2</sub> am ER und an der Plasmamembran regulieren. Sowohl Sac1 wie auch Scs2 sind keine essentiellen Faktoren für den Transport von Ist2 an die Zellperipherie, da weder in einem  $\Delta sac1$ -Hefestamm noch in einem  $\Delta scs2$ -Hefestamm eine veränderte Lokalisation von Ist2 z.B. am pER erkennbar war. Eine regulatorische Funktion von Sac1 und Scs2 kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Es ist wahrscheinlich, dass eine bestimmte Konformation der hydrophoben Leucine in der amphipathischen  $\alpha$ -Helix beim Transport vom kortikalen ER zu Domänen der Plasmamembran beteiligt ist, da hydrophobe Aminosäuren einer amphipathischen Helix in ein

Monolayer der Lipiddoppelschicht inserieren können. Abgesehen von einer Vesikelknospung, initiiert durch die Insertion einer amphipathischen Helix in eine Membran, ist auch eine direkte, transiente Fusion zwischen kortikalem ER und Plasmamembran denkbar, um Ist2 vom kortikalen ER an Domänen der Plasmamembran zu transferieren. Außerdem besteht - ähnlich wie bei der Bildung von *lipid droplets* - die Möglichkeit, eine Art Lipidextraktion aus dem ER auszunutzen, um Proteine in kleine Vesikel zu integrieren: ein Mechanismus, der von H. Ploegh thematisiert wurde (Ploegh, 2007). Nach Transfer zur Plasmamembran muss Ist2 ein Signal enthalten, welches die charakteristische fleckartige Verteilung in Domänen der Plasmamembran bewirkt. Dies kann entweder durch Interaktion mit Lipid- oder Proteinfaktoren geschehen.

## 4.6 Ausblick

Jede Erkenntnis zum Sortierungsweg von Ist2 zieht naturgemäß viele neue Fragen nach sich. Durch die Analyse der Signale der K/L-Sequenz wurde die Voraussetzung geschaffen, gezielt die Anforderung an die einzelnen Transportschritte analysieren zu können. Außerdem kann das identifizierte essentielle Sortierungsmotiv  $K \times [LIWF] [LIWF] \times \times [LIWF]$  für eine Datenbanksuche verwendet werden, um weitere Proteine in anderen Spezies zu finden, die einen ähnlichen Transportmechanismus wie Ist2 verwenden.

Die Entwicklung eines zuverlässigen Versuchsaufbaus, bei dem eindeutig zwischen einer Lokalisation von Ist2 am kortikalen ER und an der Zelloberfläche unterschieden werden kann, wäre sehr hilfreich.

Da Wildtyp Ist2 multimerisiert und eine hohe lokale Konzentration von Ist2 sich positiv auf den Transport von Ist2 auswirkt, stellt sich die Frage, welche Domänen und Aminosäuren von Ist2 an der Multimerisierung beteiligt sind. Wird das T/H/S-Cluster einzig als Multimerisierungsdomäne benötigt oder enthält es genau wie die K/L-Sequenz einzelne Aminosäuren, die essentiell für den Transport sind?

Eine zentrale Frage ist auch die Natur der punktförmigen Akkumulationen von Ist2; um die Ultrastruktur zu bestimmen, wären elektronenmikroskopische Daten von großem Nutzen.

Welche spezielle Rolle übt Scs2 beim Transport von Ist2 aus? Wie weit reicht der Einfluss der Lipide auf den Transport von Ist2? Ist die Bindung an Lipide nur bei Lysinmutanten beeinträchtigt oder wirken sich auch Mutationen in der amphipathischen Helix auf die Membranbindung aus? Mittels vielfältiger biochemischer und genetischer Herangehensweisen können diese Fragen sowohl im Modellorganismus *S. cerevisiae* als auch in Säugetierzellen untersucht werden.

# Literaturverzeichnis

---

- Abele, R., Tampe, R., 2004. The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. *Physiology* 19, 216–224.
- Abraham, D. J., Leo, A. J., 1987. Extension of the fragment method to calculate amino acid zwitterion and side chain partition coefficients. *Proteins* 2, 130–52.
- Adams, A., Gottschling, D., Kaiser, C., Stearns, T., 1997. *Methods in Yeast Genetics, 1997: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1997 Auflage.
- Antonny, B., Huber, I., Paris, S., Chabre, M., Cassel, D., 1997. Activation of ADP-ribosylation factor 1 GTPase-activating protein by phosphatidylcholine-derived diacylglycerols. *J Biol Chem* 272, 30848–30851.
- Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L., Schekman, R., 2001. Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol* 3, 531–537.
- Aronov, S., Gelin Licht, R., Zipor, G., Haim, L., Safran, E., Gerst, J. E., 2007. mRNAs encoding polarity and exocytosis factors are co-transported with cortical ER to the incipient bud in yeast. *Mol Cell Biol* 27, 3441–55.
- Barlowe, C., 2003. Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol* 13, 295–300.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M. F., Ravazzola, M., Amherdt, M., Schekman, R., 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* 77, 895–907.
- Barlowe, C., Schekman, R., 1993. SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature* 365, 347–9.
- Baudin, A., Ozier Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F., Cullin, C., 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 21, 3329–3330.
- Becker, T., Volchuk, A., Rothman, J., 2005. Differential use of endoplasmic reticulum membrane for phagocytosis in J774 macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 4022–4026.
- Beitz, E., 2000. TEXtopo: shaded membrane protein topology plots in LATEX2 $\epsilon$ . *Bioinformatics* 16, 1050–1051.
- Berg, J., Tymoczko, J., Stryer, L., 2002. *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company.

- Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S. M., Singer, R. H., Long, R. M., 1998. Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol Cell* 2, 437–45.
- Bi, X., Corpina, R., Goldberg, J., 2002. Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* 419, 271–277.
- Bialkowska, A., Kurlandzka, A., 2002. Additional copies of the NOG2 and IST2 genes suppress the deficiency of cohesin Irr1p/Scc3p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Biochim Pol* 49, 421–425.
- Blobel, G., Dobberstein, B., 1975. Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* 67, 835–851.
- Bobola, N., Jansen, R. P., Shin, T. H., Nasmyth, K., 1996. Asymmetric accumulation of Ash1p in postanaphase nuclei depends on a myosin and restricts yeast mating-type switching to mother cells. *Cell* 84, 699–709.
- Bock, J. B., Matern, H. T., Peden, A. A., Scheller, R. H., 2001. A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409, 839–841.
- Boehm, M., Bonifacino, J., 2001. Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* 12, 2907–2920.
- Böhl, F., Kruse, C., Frank, A., Ferring, D., Jansen, R. P., 2000. She2p, a novel RNA-binding protein tethers ASH1 mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *Embo J* 19, 5514–24.
- Bonifacino, J., Glick, B., 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116, 153–166.
- Brachmann, C. B., Davies, A., Cost, G. J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J. D., 1998. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14, 115–132.
- Brandman, O., Liou, J., Park, W. S., Meyer, T., 2007. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  levels. *Cell* 131, 1327–1339.
- Brodsky, J., 2007. The protective and destructive roles played by molecular chaperones during ERAD (endoplasmic-reticulum-associated degradation). *Biochem J* 404, 353–363.
- Burri, L., Lithgow, T., 2004. A complete set of SNAREs in yeast. *Traffic* 5, 45–52.
- Byrne, K., Wolfe, K., 2005. The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species. *Genome Res* 15, 1456–1461.
- Cabrera, M., Muniz, M., Hidalgo, J., Vega, L., Martin, M. E., Velasco, A., 2003. The retrieval function of the KDEL receptor requires PKA phosphorylation of its C-terminus. *Mol Biol Cell* 14, 4114–4125.

- Chartrand, P., Meng, X. H., Hüttelmaier, S., Donato, D., Singer, R., 2002. Asymmetric sorting of *ash1p* in yeast results from inhibition of translation by localization elements in the mRNA. *Mol Cell* 10, 1319–1330.
- Chartrand, P., Meng, X. H., Singer, R. H., Long, R. M., 1999. Structural elements required for the localization of *ASH1* mRNA and of a green fluorescent protein reporter particle in vivo. *Curr Biol* 9, 333–6.
- Chekulaeva, M., Hentze, M. W., Ephrussi, A., 2006. Bruno Acts as a Dual Repressor of *oskar* Translation, Promoting mRNA Oligomerization and Formation of Silencing Particles. *Cell* 124, 521–33.
- Chen, Y. A., Scheller, R. H., 2001. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 98–106.
- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T., Higgins, D., Thompson, J., 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31, 3497–3500.
- Clary, D., Griff, I., Rothman, J., 1990. SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61, 709–721.
- Colasante, C., Ellis, M., Ruppert, T., Voncken, F., 2006. Comparative proteomics of glycosomes from bloodstream form and procyclic culture form *Trypanosoma brucei*. *Proteomics* 6, 3275–3293.
- Connerly, P., Esaki, M., Montegna, E., Strongin, D., Levi, S., Soderholm, J., Glick, B., 2005. Sec16 is a determinant of transitional ER organization. *Curr Biol* 15, 1439–47.
- Connolly, T., Gilmore, R., 1989. The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. *Cell* 57, 599–610.
- Connolly, T., Pj Rapiejko, Gilmore, R., 1991. Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. *Science* 252, 1171–1173.
- Cosson, P., Letourneur, F., 1994. Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science* 263, 1629–31.
- Crowley, K. S., Liao, S., Worrell, V. E., Reinhart, G. D., Johnson, A. E., 1994. Secretory proteins move through the endoplasmic reticulum membrane via an aqueous, gated pore. *Cell* 78, 461–471.
- Crowley, K. S., Reinhart, G. D., Johnson, A. E., 1993. The signal sequence moves through a ribosomal tunnel into a noncytoplasmic aqueous environment at the ER membrane early in translocation. *Cell* 73, 1101–1115.
- De Matteis, M., Godi, A., Corda, D., 2002. Phosphoinositides and the golgi complex. *Curr Opin Cell Biol* 14, 434–47.

- De Matteis, M. A., Di Campli, A., D'Angelo, G., 2007. Lipid-transfer proteins in membrane trafficking at the Golgi complex. *Biochim Biophys Acta*.
- Desrivieres, S., Cooke, F. T., Parker, P. J., Hall, M. N., 1998. MSS4, a phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase required for organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 15787–15793.
- Ding, D., Parkhurst, S., Halsell, S., Lipshitz, H., 1993. Dynamic Hsp83 RNA localization during *Drosophila* oogenesis and embryogenesis. *Mol Cell Biol* 13, 3773–3781.
- Dogic, D., de Chasse, B., Pick, E., Cassel, D., Lefkir, Y., Hennecke, S., Cosson, P., Letourneur, F., 1999. The ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein Glo3p is involved in ER retrieval. *Eur J Cell Biol* 78, 305–310.
- Driever, W., Nüsslein Volhard, C., 1988. The bicoid protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. *Cell* 54, 95–104.
- Du, Y., Ferro Novick, S., Novick, P., 2004. Dynamics and inheritance of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 117, 2871–2878.
- Dutzler, R., Campbell, E., Cadene, M., Chait, B., MacKinnon, R., 2002. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415, 287–294.
- Edeling, M., Smith, C., Owen, D., 2006. Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 32–44.
- Entian, K. D., Schuster, T., Hegemann, J. H., Becher, D., Feldmann, H., Güldener, U., Götz, R., Hansen, M., Hollenberg, C. P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kötter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R. K., Rad, M. R., Röhmer, A., Römer, A., Hinnen, A., 1999. Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet* 262, 683–702.
- Ephrussi, A., Dickinson, L. K., Lehmann, R., 1991. Oskar organizes the germ plasm and directs localization of the posterior determinant nanos. *Cell* 66, 37–50.
- Espenshade, P., Gimeno, R. E., Holzmacher, E., Teung, P., Kaiser, C. A., 1995. Yeast SEC16 gene encodes a multidomain vesicle coat protein that interacts with Sec23p. *J Cell Biol* 131, 311–324.
- Estrada, P., Kim, J., Coleman, J., Walker, L., Dunn, B., Takizawa, P., Novick, P., Ferro Novick, S., 2003. Myo4p and She3p are required for cortical ER inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 163, 1255–66.
- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M. S., Chow, C. J., Adames, N., Pringle, J. R., Peter, M., Boone, C., 1997. Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* 276, 118–122.

- Fath, S., Mancias, J., Bi, X., Goldberg, J., 2007. Structure and organization of coat proteins in the COPII cage. *Cell* 129, 1325–1336.
- Faulhammer, F., Kanjilal Kolar, S., Knödler, A., Lo, J., Lee, Y., Konrad, G., Mayinger, P., 2007. Growth control of Golgi phosphoinositides by reciprocal localization of *sac1* lipid phosphatase and *pik1* 4-kinase. *Traffic* 8, 1554–1567.
- Faulhammer, F., Konrad, G., Brankatschk, B., Tahirovic, S., Knödler, A., Mayinger, P., 2005. Cell growth-dependent coordination of lipid signaling and glycosylation is mediated by interactions between *Sac1p* and *Dpm1p*. *J Cell Biol* 168, 185–91.
- Feldmann, H., Aigle, M., Aljinovic, G., Andre, B., Baclet, M. C., Barthe, C., Baur, A., Becam, A. M., Biteau, N., Boles, E., 1994. Complete DNA sequence of yeast chromosome II. *EMBO J* 13, 5795–5809.
- Ficarro, S., McClelland, M., Stukenberg, P., Burke, D., Ross, M., Shabanowitz, J., Hunt, D., White, F. M., 2002. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* 20, 301–305.
- Fiedler, K., Veit, M., Stamnes, M. A., Rothman, J. E., 1996. Bimodal interaction of coatomer with the p24 family of putative cargo receptors. *Science* 273, 1396–1399.
- Flanagan, C. A., Schnieders, E. A., Emerick, A. W., Kunisawa, R., Admon, A., Thorner, J., 1993. Phosphatidylinositol 4-kinase: gene structure and requirement for yeast cell viability. *Science* 262, 1444–1448.
- Foti, M., Audhya, A., Emr, S. D., 2001. *Sac1* lipid phosphatase and *Stt4* phosphatidylinositol 4-kinase regulate a pool of phosphatidylinositol 4-phosphate that functions in the control of the actin cytoskeleton and vacuole morphology. *Mol Biol Cell* 12, 2396–411.
- Franz, A., 2005. Analyse der Cis-Elemente im C-Terminus von *Ist2* für den SEC-unabhängigen Transport in die Plasmamembran. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Franz, A., Maass, K., Seedorf, M., 2007. A complex peptide-sorting signal, but no mRNA signal, is required for the Sec-independent transport of *Ist2* from the yeast ER to the plasma membrane. *FEBS Lett* 581, 401–405.
- Fuller, R. S., Brake, A., Thorner, J., 1989a. Yeast prohormone processing enzyme (*KEX2* gene product) is a  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent serine protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1434–8.
- Fuller, R. S., Brake, A. J., Thorner, J., 1989b. Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* 246, 482–6.
- Funato, K., Riezman, H., 2001. Vesicular and nonvesicular transport of ceramide from ER to the Golgi apparatus in yeast. *J Cell Biol* 155, 949–959.

- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P. H., Steele Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J. J., Desjardins, M., 2002. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110, 119–31.
- Gavin, A., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L., Bastuck, S., Dimpelfeld, B., Edelmann, A., Heurtier, M., Hoffman, V., Hoefert, C., Klein, K., Hudak, M., Michon, A., Schelder, M., Schirle, M., Remor, M., Rudi, T., Hooper, S., Bauer, A., Bouwmeester, T., Casari, G., Drewes, G., Neubauer, G., Rick, J., Kuster, B., Bork, P., Russell, R., Superti Furga, G., 2006. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* 440, 631–636.
- Gavin, A., Bösche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J., Michon, A., Cruciat, C., Remor, M., Höfert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M., Copley, R., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G., Superti Furga, G., 2002. Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature* 415, 141–147.
- Gavis, E. R., Lehmann, R., 1992. Localization of nanos RNA controls embryonic polarity. *Cell* 71, 301–313.
- Gaxiola, R. A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S. L., Fink, G. R., 1999. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1480–5.
- Gaxiola, R. A., Yuan, D. S., Klausner, R. D., Fink, G. R., 1998. The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4046–4050.
- Geller, D., Taglicht, D., Edgar, R., Tam, A., Pines, O., Michaelis, S., Bibi, E., 1996. Comparative topology studies in *Saccharomyces cerevisiae* and in *Escherichia coli*. The N-terminal half of the yeast ABC protein Ste6. *J Biol Chem* 271, 13746–13753.
- Ghaemmighami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O’Shea, E. K., Weissman, J. S., 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737–741.
- Gietz, R., Woods, R., 2002. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350, 87–96.
- Gill, S., von Hippel, P., 1989. Calculation of protein extinction coefficient from amino acid sequence data. *Anal Biochem* 182, 319–326.
- Gilmore, R., Blobel, G., Walter, P., 1982a. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *J Cell Biol* 95, 463–469.

- Gilmore, R., Walter, P., Blobel, G., 1982b. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. II. Isolation and characterization of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* 95, 470–477.
- Gimeno, R., Espenshade, P., Kaiser, C., 1995. SED4 encodes a yeast endoplasmic reticulum protein that binds Sec16p and participates in vesicle formation. *J Cell Biol* 131, 325–338.
- Giraud, C., Maccioni, H., 2003. Endoplasmic reticulum export of glycosyltransferases depends on interaction of a cytoplasmic dibasic motif with Sar1. *MBC* 14, 3753–3766.
- Glotzer, J. B., Saffrich, R., Glotzer, M., Ephrussi, A., 1997. Cytoplasmic flows localize injected oskar RNA in *Drosophila* oocytes. *Curr Biol* 7, 326–337.
- Gommel, D., Memon, A., Heiss, A., Lottspeich, F., Pfannstiel, J., Lechner, J., Reinhard, C., Helms, J., Nickel, W., Wieland, F., 2001. Recruitment to Golgi membranes of ADP-ribosylation factor 1 is mediated by the cytoplasmic domain of p23. *EMBO J* 20, 6751–6760.
- Gonsalvez, G. B., Lehmann, K. A., Ho, D. K., Stanitsa, E. S., Williamson, J. R., Long, R. M., 2003. RNA-protein interactions promote asymmetric sorting of the ASH1 mRNA ribonucleoprotein complex. *RNA* 9, 1383–99.
- Gonzalez, I., Buonomo, S. B., Nasmyth, K., von Ahsen, U., 1999. ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation. *Curr Biol* 9, 337–40.
- Görlich, D., Prehn, S., Hartmann, E., Kalies, K. U., Rapoport, T. A., 1992. A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 71, 489–503.
- Gotthardt, D., Blancheteau, V., Bosserhoff, A., Ruppert, T., Delorenzi, M., Soldati, T., 2006. Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of a Galpha during uptake. *Mol Cell Proteomics* 5, 2228–2243.
- Griesbeck, O., Baird, G. S., Campbell, R. E., Zacharias, D. A., Tsien, R. Y., 2001. Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J Biol Chem* 276, 29188–29194.
- Gruber, M., Lupas, A. N., 2003. Historical review: another 50th anniversary—new periodicities in coiled coils. *Trends Biochem Sci* 28, 679–685.
- Gu, W., Deng, Y., Zenklusen, D., Singer, R., 2004. A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev* 18, 1452–1465.
- Halic, M., Becker, T., Pool, M. R., Spahn, C. M., Grassucci, R. A., Frank, J., Beckmann, R., 2004. Structure of the signal recognition particle interacting with the elongation-arrested ribosome. *Nature* 427, 808–14.

- Han, J., Park, J., Kim, M., Lee, J., 1997. mRNAs for microtubule proteins are specifically colocalized during the sequential formation of basal body, flagella, and cytoskeletal microtubules in the differentiation of *Naegleria gruberi*. *J Cell Biol* 137, 871–879.
- Hanada, K., Kumagai, K., Yasuda, S., Miura, Y., Kawano, M., Fukasawa, M., Nishijima, M., 2003. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 426, 803–809.
- Hara Kuge, S., Kuge, O., Orci, L., Amherdt, M., Ravazzola, M., Wieland, F. T., Rothman, J. E., 1994. En bloc incorporation of coatamer subunits during the assembly of COP-coated vesicles. *J Cell Biol* 124, 883–892.
- Hauser, C., Tsien, R., 2007. A hexahistidine-Zn<sup>2+</sup>-dye label reveals STIM1 surface exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3693–3697.
- Hazlrigg, T., 2004. Lost in translation gets an oskar. *Dev Cell* 6, 611–3.
- Hecht, J., 2007. Binding of the C-terminus of Ist2 to membranes and artificial liposomes. Bachelor Thesis, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Heiman, M., Walter, P., 2000. Prm1p, a pheromone-regulated multispinning membrane protein, facilitates plasma membrane fusion during yeast mating. *J Cell Biol* 151, 719–30.
- Heo, W. D., Inoue, T., Park, W. S., Kim, M. L., Park, B. O., Wandless, T. J., Meyer, T., 2006. PI(3,4,5)P<sub>3</sub> and PI(4,5)P<sub>2</sub> lipids target proteins with polybasic clusters to the plasma membrane. *Science* 314, 1458–61.
- Herskowitz, I., 1988. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* 52, 536–53.
- Hewavitharana, T., Deng, X., Soboloff, J., Gill, D., 2007. Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway. *Cell Calcium* 42, 173–182.
- Hicke, L., Schekman, R., 1989. Yeast Sec23p acts in the cytoplasm to promote protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex in vivo and in vitro. *EMBO J* 8, 1677–1684.
- Hill, K., Catlett, N., Weisman, L., 1996. Actin and myosin function in directed vacuole movement during cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 135, 1535–1549.
- Homma, K., Terui, S., Minemura, M., Qadota, H., Anraku, Y., Kanaho, Y., Ohya, Y., 1998. Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase localized on the plasma membrane is essential for yeast cell morphogenesis. *J Biol Chem* 273, 15779–15786.
- Hristova, K., Wimley, W. C., Mishra, V. K., Anantharamiah, G. M., Segrest, J. P., White, S. H., 1999. An amphipathic alpha-helix at a membrane interface: a structural study using a novel X-ray diffraction method. *J Mol Biol* 290, 99–117.

- Huang, M., Weissman, J. T., Beraud Dufour, S., Luan, P., Wang, C., Chen, W., Aridor, M., Wilson, I. A., Balch, W. E., 2001. Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 Å resolution and the role of the NH2 terminus in ER export. *J Cell Biol* 155, 937–948.
- Hughes, T. R., Marton, M. J., Jones, A. R., Roberts, C. J., Stoughton, R., Armour, C. D., Bennett, H. A., Coffey, E., Dai, H., He, Y. D., Kidd, M. J., King, A. M., Meyer, M. R., Slade, D., Lum, P. Y., Stepaniants, S. B., Shoemaker, D. D., Gachotte, D., Chakraburttty, K., Simon, J., Bard, M., Friend, S. H., 2000. Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* 102, 109–26.
- Huh, W., Falvo, J., Gerke, L., Carroll, A., Howson, R. W., Weissman, J. S., O’Shea, E., 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* 425, 686–691.
- Huyer, G., Longsworth, G., Mason, D., Mallampalli, M., McCaffery, J., Wright, R., Michaelis, S., 2004. A striking quality control subcompartment in *Saccharomyces cerevisiae*: the endoplasmic reticulum-associated compartment. *Mol Biol Cell* 15, 908–921.
- Irie, K., Tadauchi, T., Takizawa, P., Vale, R., Matsumoto, K., Herskowitz, I., 2002. The Khd1 protein, which has three KH RNA-binding motifs, is required for proper localization of ASH1 mRNA in yeast. *EMBO J* 21, 1158–1167.
- Itoh, T., Watabe, A., Toh E, A., Matsui, Y., 2002. Complex formation with Ypt11p, a rab-type small GTPase, is essential to facilitate the function of Myo2p, a class V myosin, in mitochondrial distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 22, 7744–7757.
- Jahn, R., Lang, T., Südhof, T., 2003. Membrane fusion. *Cell* 112, 519–533.
- Janke, C., Magiera, M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Al. Moreno Borchart, Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., Knop, M., 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947–962.
- Jansen, R. P., 2001. mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 247–256.
- Jansen, R. P., Dowzer, C., Michaelis, C., Galova, M., Nasmyth, K., 1996. Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell* 84, 687–697.
- Johnson, A. E., van Waes, M. A., 1999. The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 799–842.
- Jones, B., Jones, E., Bonney, S. A., Patel, H., Mensenkamp, A., Eichenbaum Voline, S., Rudling, M., Myrdal, U., Annesi, G., Naik, S., Meadows, N., Quattrone, A., Islam, S., Naoumova, R., Angelin, B., Infante, R., Levy, E., Roy, C., Freemont, P., Scott, J., Shoulders, C., 2003. Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat Genet* 34, 29–31.

- Jüschke, C., 2005. Charakterisierung des Transportweges von Ist2p zur Plasmamembran in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Jüschke, C., Ferring, D., Jansen, R.-P., Seedorf, M., 2004. A novel transport pathway for a yeast plasma membrane protein encoded by a localized mRNA. *Curr Biol* 14, 406–411.
- Jüschke, C., Wächter, A., Schwappach, B., Seedorf, M., 2005. SEC18/NSF-independent, protein-sorting pathway from the yeast cortical ER to the plasma membrane. *J Cell Biol* 169, 613–622.
- Kagiwada, S., Hashimoto, M., 2007. The yeast VAP homolog Scs2p has a phosphoinositide-binding ability that is correlated with its activity. *Biochem Biophys Res Commun* 364, 870–876.
- Kagiwada, S., Hosaka, K., Murata, M., Nikawa, J., Takatsuki, A., 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* SCS2 gene product, a homolog of a synaptobrevin-associated protein, is an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum and is required for inositol metabolism. *J Bacteriol* 180, 1700–8.
- Kim, Y., Chattopadhyay, S., Locke, S., Pearce, D. A., 2005. Interaction among Btn1p, Btn2p, and Ist2p reveals potential interplay among the vacuole, amino acid levels, and ion homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4, 281–8.
- Kim, Y.-M., Brinkmann, M. M., Paquet, M.-E., Ploegh, H. L., 2008. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* 452, 234–238.
- Koffel, R., Tiwari, R., Falquet, L., Schneider, R., 2005. The *Saccharomyces cerevisiae* YLL012/YEH1, YLR020/YEH2, and TGL1 genes encode a novel family of membrane-anchored lipases that are required for sterol ester hydrolysis. *Mol Cell Biol* 25, 1655–68.
- Kopito, R. R., Sitia, R., 2000. Aggresomes and Russell bodies. Symptoms of cellular indigestion? *EMBO Rep* 1, 225–231.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E. L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305, 567–80.
- Kyhse Andersen, J., 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203–209.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Leabu, M., 2006. Membrane fusion in cells: molecular machinery and mechanisms. *J Cell Mol Med* 10, 423–427.
- Lee, I., Li, Z., Marcotte, E., 2007. An Improved, Bias-Reduced Probabilistic Functional Gene Network of Baker's Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE* 2, e988.

- Lee, M. C., Miller, E. A., Goldberg, J., Orci, L., Schekman, R., 2004. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 87–123.
- Lee, M. C., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M., Schekman, R., 2005. Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell* 122, 605–17.
- Lehto, M., Hynynen, R., Karjalainen, K., Kuismanen, E., Hyvärinen, K., Olkkonen, V., 2005. Targeting of OSBP-related protein 3 (ORP3) to endoplasmic reticulum and plasma membrane is controlled by multiple determinants. *Exp Cell Res* 310, 445–462.
- Leikin, S. L., Kozlov, M. M., Chernomordik, L. V., Markin, V. S., Chizmadzhev, Y. A., 1987. Membrane fusion: overcoming of the hydration barrier and local restructuring. *J Theor Biol* 129, 411–425.
- Levine, T., Loewen, C., 2006. Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly. *Curr Opin Cell Biol* 18, 371–8.
- Lilley, B., Ploegh, H., 2004. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429, 834–840.
- Lipshitz, H. D., Smibert, C. A., 2000. Mechanisms of RNA localization and translational regulation. *Curr Opin Genet Dev* 10, 476–488.
- Loewen, C., Young, B., Tavassoli, S., Levine, T., 2007. Inheritance of cortical ER in yeast is required for normal septin organization. *J Cell Biol* 179, 467–483.
- Loewen, C. J., Levine, T. P., 2005. A highly conserved binding site in vesicle-associated membrane protein-associated protein (VAP) for the FFAT motif of lipid-binding proteins. *J Biol Chem* 280, 14097–104.
- Loewen, C. J., Roy, A., Levine, T. P., 2003. A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *Embo J* 22, 2025–35.
- Long, R., Gu, W., Meng, X., Gonsalvez, G., Singer, R., Chartrand, P., 2001. An exclusively nuclear RNA-binding protein affects asymmetric localization of ASH1 mRNA and Ash1p in yeast. *J Cell Biol* 153, 307–318.
- Long, R. M., Gu, W., Lorimer, E., Singer, R. H., Chartrand, P., 2000. She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to ASH1 mRNA. *EMBO J* 19, 6592–6601.
- Long, R. M., Singer, R. H., Meng, X., Gonzalez, I., Nasmyth, K., Jansen, R. P., 1997. Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of ASH1 mRNA. *Science* 277, 383–387.
- Luedeke, C., Frei, S. B., Sbalzarini, I., Schwarz, H., Spang, A., Barral, Y., 2005. Septin-dependent compartmentalization of the endoplasmic reticulum during yeast polarized growth. *J Cell Biol* 169, 897–908.

- Lupas, A., Martin, J., 2002. AAA proteins. *Curr Opin Struct Biol* 12, 746–753.
- Lyman, S. K., Schekman, R., 1997. Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell* 88, 85–96.
- Ma, D., Zerangue, N., Lin, Y., Collins, A., Yu, M., Jan, Y., Jan, L., 2001. Role of ER export signals in controlling surface potassium channel numbers. *Science* 291, 316–9.
- Mannhaupt, G., Stucka, R., Ehnle, S., Vetter, I., Feldmann, H., 1994. Analysis of a 70 kb region on the right arm of yeast chromosome II. *Yeast* 10, 1363–1381.
- Margeta Mitrovic, M., Jan, Y. N., Jan, L. Y., 2000. A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization. *Neuron* 27, 97–106.
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R., Yeung, T., 1998. COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell* 93, 263–275.
- McMahon, H., Gallop, J., 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* 438, 590–596.
- McNew, J. A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R. J., Paz, K., Paumet, F., Söllner, T. H., Rothman, J. E., 2000a. Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 407, 153–159.
- McNew, J. A., Weber, T., Parlati, F., Johnston, R. J., Melia, T. J., Söllner, T. H., Rothman, J. E., 2000b. Close is not enough: SNARE-dependent membrane fusion requires an active mechanism that transduces force to membrane anchors. *J Cell Biol* 150, 105–117.
- Meyer, D. I., Dobberstein, B., 1980. Identification and characterization of a membrane component essential for the translocation of nascent proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 87, 503–508.
- Middleton, R. E., Pheasant, D. J., Miller, C., 1996. Homodimeric architecture of a ClC-type chloride ion channel. *Nature* 383, 337–340.
- Miller, C., 2003. ClC channels: reading eukaryotic function through prokaryotic spectacles. *J Gen Physiol* 122, 129–31.
- Miller, J., Lo, R., Ben Hur, A., Desmarais, C., Stagljar, I., Stafford Noble, W., Fields, S., 2005. Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12123–12128.
- Miller, J. D., Walter, P., 1993. A GTPase cycle in initiation of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. *Ciba Found Symp* 176, 147–59.
- Mingot, J. M., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E., Görlich, D., 2001. Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J* 20, 3685–3694.

- Mironov, A., Mironov, A., Beznoussenko, G., Trucco, A., Lupetti, P., Smith, J., Geerts, W., Koster, A., Burger, K. J., Martone, M., Deerinck, T., Ellisman, M., Luini, A., 2003. ER-to-Golgi carriers arise through direct en bloc protrusion and multistage maturation of specialized ER exit domains. *Dev Cell* 5, 583–594.
- Mizuta, K., Tsutsumi, S., Inoue, H., Sakamoto, Y., Miyatake, K., Miyawaki, K., Noji, S., Kamata, N., Itakura, M., 2007. Molecular characterization of GDD1/TMEM16E, the gene product responsible for autosomal dominant gnathodiaphyseal dysplasia. *Biochem Biophys Res Commun* 357, 126–132.
- Moseley, J. B., Goode, B. L., 2006. The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 605–45.
- Mossessova, E., Bickford, L., Goldberg, J., 2003a. SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell* 114, 483–495.
- Mossessova, E., Corpina, R., Goldberg, J., 2003b. Crystal structure of ARF1\*Sec7 complexed with Brefeldin A and its implications for the guanine nucleotide exchange mechanism. *Mol Cell* 12, 1403–1411.
- Mothes, W., Prehn, S., Rapoport, T. A., 1994. Systematic probing of the environment of a translocating secretory protein during translocation through the ER membrane. *EMBO J* 13, 3973–3982.
- Nakayama, K., Nagasu, T., Shimma, Y., Kuromitsu, J., Jigami, Y., 1992. OCH1 encodes a novel membrane bound mannosyltransferase: outer chain elongation of asparagine-linked oligosaccharides. *EMBO J* 11, 2511–2519.
- Nickel, W., 2003. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur J Biochem* 270, 2109–19.
- Nickel, W., 2007. Unconventional secretion: an extracellular trap for export of fibroblast growth factor 2. *J Cell Sci* 120, 2295–9.
- Niedenthal, R. K., Riles, L., Johnston, M., Hegemann, J. H., 1996. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* 12, 773–786.
- Niessing, D., Hüttelmaier, S., Zenklusen, D., Singer, R., Burley, S., 2004. She2p is a novel RNA binding protein with a basic helical hairpin motif. *Cell* 119, 491–502.
- Novick, P., Field, C., Schekman, R., 1980. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21, 205–215.
- Nufer, O., Kappeler, F., Guldbrandsen, S., Hauri, H.-P., 2003. ER export of ERGIC-53 is controlled by cooperation of targeting determinants in all three of its domains. *J Cell Sci* 116, 4429–4440.

- O'Kelly, I., Butler, M., Zilberberg, N., Goldstein, S., 2002. Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* 111, 577–588.
- Olivier, C., Poirier, G., Gendron, P., Boisgontier, A., Major, F., Chartrand, P., 2005. Identification of a conserved RNA motif essential for she2p recognition and mRNA localization to the yeast bud. *Mol Cell Biol* 25, 4752–66.
- Olkkonen, V., Levine, T., 2004. Oxysterol binding proteins: in more than one place at one time? *Biochem Cell Biol* 82, 87–98.
- Orlean, P., Albright, C., Robbins, P., 1988. Cloning and sequencing of the yeast gene for dolichol phosphate mannose synthase, an essential protein. *J Biol Chem* 263, 17499–17507.
- Palacios, I. M., St Johnston, D., 2001. Getting the message across: the intracellular localization of mRNAs in higher eukaryotes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 569–614.
- Paladino, S., Sarnataro, D., Pillich, R., Tivodar, S., Nitsch, L., Zurzolo, C., 2004. Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J Cell Biol* 167, 699–709.
- Paquin, N., Menade, M., Poirier, G., Donato, D., Drouet, E., Chartrand, P., 2007. Local Activation of Yeast ASH1 mRNA Translation through Phosphorylation of Khdlp by the Casein Kinase Yck1p. *Mol Cell* 26, 795–809.
- Parry, D., Fraser, R., Squire, J., 2008. Fifty years of coiled-coils and alpha-helical bundles: A close relationship between sequence and structure. *J Struct Biol*.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J., Thoreen, C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., Gygi, S., 2003. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 21, 921–926.
- Perktold, A., Zechmann, B., Daum, G., Zellnig, G., 2007. Organelle association visualized by three-dimensional ultrastructural imaging of the yeast cell. *FEMS Yeast Res*.
- Petzinger, J., 2004. Sortierungssignale im C-terminalen Fragment von Ist2p. Diplomarbeit, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
- Peyroche, A., Paris, S., Jackson, C. L., 1996. Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature* 384, 479–481.
- Pichler, H., Gaigg, B., Hrastnik, C., Achleitner, G., Kohlwein, S., Zellnig, G., Perktold, A., Daum, G., 2001. A subfraction of the yeast endoplasmic reticulum associates with the plasma membrane and has a high capacity to synthesize lipids. *Eur J Biochem* 268, 2351–61.
- Ploegh, H., 2007. A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* 448, 435–438.

- Polishchuk, R., Di Pentima, A., Lippincott Schwartz, J., 2004. Delivery of raft-associated, GPI-anchored proteins to the apical surface of polarized MDCK cells by a transcytotic pathway. *Nat Cell Biol* 6, 297–307.
- Pool, M. R., Stumm, J., Fulga, T. A., Sinning, I., Dobberstein, B., 2002. Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome. *Science* 297, 1345–8.
- Poon, P. P., Cassel, D., Spang, A., Rotman, M., Pick, E., Singer, R. A., Johnston, G. C., 1999. Retrograde transport from the yeast Golgi is mediated by two ARF GAP proteins with overlapping function. *EMBO J* 18, 555–564.
- Powers, T., Walter, P., 1995. Reciprocal stimulation of GTP hydrolysis by two directly interacting GTPases. *Science* 269, 1422–1424.
- Preuss, D., Mulholland, J., Kaiser, C., Orlean, P., Albright, C., Rose, M., Robbins, P., Botstein, D., 1991. Structure of the yeast endoplasmic reticulum: localization of ER proteins using immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Yeast* 7, 891–911.
- Prinz, W. A., Grzyb, L., Veenhuis, M., Kahana, J. A., Silver, P. A., Rapoport, T. A., 2000. Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 150, 461–474.
- Proszynski, T. J., Klemm, R. W., Gravert, M., Hsu, P. P., Gloor, Y., Wagner, J., Kozak, K., Grabner, H., Walzer, K., Bagnat, M., Simons, K., Walch Solimena, C., 2005. A genome-wide visual screen reveals a role for sphingolipids and ergosterol in cell surface delivery in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17981–6.
- Prudovsky, I., Mandinova, A., Soldi, R., Bagala, C., Graziani, I., Landriscina, M., Taranini, F., Duarte, M., Bellum, S., Doherty, H., Maciag, T., 2003. The non-classical export routes: FGF1 and IL-1 $\alpha$  point the way. *J Cell Sci* 116, 4871–4881.
- Rapoport, T. A., 1992. Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* 258, 931–6.
- Rapoport, T. A., Matlack, K. E., Plath, K., Misselwitz, B., Staeck, O., 1999. Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biol Chem* 380, 1143–1150.
- Raschke, W., Kern, K., Antalis, C., Ballou, C., 1973. Genetic control of yeast mannan structure. Isolation and characterization of mannan mutants. *J Biol Chem* 248, 4660–4666.
- Reck Peterson, S., Tyska, M., Novick, P., Mooseker, M., 2001. The yeast class V myosins, Myo2p and Myo4p, are nonprocessive actin-based motors. *J Cell Biol* 153, 1121–1126.
- Ridgway, N. D., Dawson, P. A., Ho, Y. K., Brown, M. S., Goldstein, J. L., 1992. Translocation of oxysterol binding protein to Golgi apparatus triggered by ligand binding. *J Cell Biol* 116, 307–319.

- Roberg, K. J., Crotwell, M., Espenshade, P., Gimeno, R., Kaiser, C. A., 1999. LST1 is a SEC24 homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 145, 659–672.
- Rogers, L., Foster, L., 2007. The dynamic phagosomal proteome and the contribution of the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18520–18525.
- Römisch, K., 1999. Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J Cell Sci* 112, 4185–91.
- Ron, D., Walter, P., 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519–529.
- Rose, M. D., Misra, L. M., Vogel, J. P., 1989. KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell* 57, 1211–1221.
- Rose, M. D., Novick, P., Thomas, J. H., Botstein, D., Fink, G. R., 1987. A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene* 60, 237–243.
- Rossanese, O. W., Reinke, C. A., Bevis, B. J., Hammond, A. T., Sears, I. B., O'Connor, J., Glick, B. S., 2001. A role for actin, Cdc1p, and Myo2p in the inheritance of late Golgi elements in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 153, 47–62.
- Rothman, J., 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55–63.
- Rothman, J., Wieland, F., 1996. Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272, 227–34.
- Royle, S. J., 2006. The cellular functions of clathrin. *Cell Mol Life Sci* 63, 1823–1832.
- Ruddock, L., Molinari, M., 2006. N-glycan processing in ER quality control. *J Cell Sci* 119, 4373–4380.
- Saito Nakano, Y., Nakano, A., 2000. Sed4p functions as a positive regulator of Sar1p probably through inhibition of the GTPase activation by Sec23p. *Genes Cells* 5, 1039–1048.
- Salinovich, O., Montelaro, R. C., 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 156, 341–347.
- Sapay, N., Guermeur, Y., Deleage, G., 2006. Prediction of amphipathic in-plane membrane anchors in monotopic proteins using a SVM classifier. *BMC Bioinformatics* 7, 255.
- Sata, M., Donaldson, J. G., Moss, J., Vaughan, M., 1998. Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange activity of Sec7 domain from yeast Sec7 with yeast and mammalian ADP ribosylation factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4204–4208.

- Sato, K., Nakano, A., 2002. Emp47p and its close homolog Emp46p have a tyrosine-containing endoplasmic reticulum exit signal and function in glycoprotein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 13, 2518–32.
- Schekman, R., Novick, P., 2004. 23 genes, 23 years later. *Cell* 116, S13–5.
- Schmid, M., Jaedicke, A., Du, T. G., Jansen, R. P., 2006. Coordination of endoplasmic reticulum and mRNA localization to the yeast bud. *Curr Biol* 16, 1538–43.
- Schorr, M., Then, A., Tahirovic, S., Hug, N., Mayinger, P., 2001. The phosphoinositide phosphatase Sac1p controls trafficking of the yeast Chs3p chitin synthase. *Curr Biol* 11, 1421–1426.
- Schott, D., Collins, R., Bretscher, A., 2002. Secretory vesicle transport velocity in living cells depends on the myosin-V lever arm length. *J Cell Biol* 156, 35–39.
- Schröder, S., Schimmöller, F., Singer Kruger, B., Riezman, H., 1995. The Golgi-localization of yeast Emp47p depends on its di-lysine motif but is not affected by the ret1-1 mutation in alpha-COP. *J Cell Biol* 131, 895–912.
- Schuldiner, M., Collins, S., Thompson, N., Denic, V., Bhamidipati, A., Punna, T., Ihmels, J., Andrews, B., Boone, C., Greenblatt, J., Weissman, J., Krogan, N., 2005. Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* 123, 507–519.
- Schwappach, B., Stobrawa, S., Hechenberger, M., Steinmeyer, K., Jentsch, T. J., 1998. Golgi localization and functionally important domains in the NH2 and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel Gef1p. *J Biol Chem* 273, 15110–8.
- Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E., Tsien, R. Y., 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22, 1567–72.
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A., Tsien, R. Y., 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2, 905–9.
- Sheff, M., Thorn, K., 2004. Optimized cassettes for fluorescent protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 21, 661–670.
- Shepard, K., Gerber, A., Jambhekar, A., Takizawa, P., Brown, P., Herschlag, D., DeRisi, J., Vale, R., 2003. Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 11429–34.
- Sherman, F., 2002. Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 350, 3–41.
- Shimoni, Y., Kurihara, T., Ravazzola, M., Amherdt, M., Orci, L., Schekman, R., 2000. Lst1p and Sec24p cooperate in sorting of the plasma membrane ATPase into COPII vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 151, 973–984.

- Siddiqi, S., Gorelick, F., Mahan, J., Mansbach, C., 2003. COPII proteins are required for Golgi fusion but not for endoplasmic reticulum budding of the pre-chylomicron transport vesicle. *J Cell Sci* 116, 415–427.
- Sidhu, R. S., Mathewes, S., Bollon, A. P., 1991. Selection of secretory protein-encoding genes by fusion with PHO5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 107, 111–118.
- Sikorski, R. S., Hieter, P., 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19–27.
- Sil, A., Herskowitz, I., 1996. Identification of asymmetrically localized determinant, Ash1p, required for lineage-specific transcription of the yeast HO gene. *Cell* 84, 711–722.
- Simon, S. M., Blobel, G., 1991. A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* 65, 371–380.
- Singer, R., 1992. The cytoskeleton and mRNA localization. *Curr Opin Cell Biol* 4, 15–19.
- Snee, M. J., Harrison, D., Yan, N., Macdonald, P., 2007. A late phase of Oskar accumulation is crucial for posterior patterning of the *Drosophila* embryo, and is blocked by ectopic expression of Bruno. *Differentiation* 75, 246–255.
- Söllner, T. H., 2004. Intracellular and viral membrane fusion: a uniting mechanism. *Curr Opin Cell Biol* 16, 429–435.
- Spang, A., Herrmann, J. M., Hamamoto, S., Schekman, R., 2001. The ADP ribosylation factor-nucleotide exchange factors Gea1p and Gea2p have overlapping, but not redundant functions in retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 12, 1035–1045.
- Spang, A., Schekman, R., 1998. Reconstitution of retrograde transport from the Golgi to the ER in vitro. *J Cell Biol* 143, 589–599.
- Springer, S., Schekman, R., 1998. Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs. *Science* 281, 698–700.
- Stagg, S., Gürkan, C., Fowler, D., LaPointe, P., Foss, T., Potter, C., Carragher, B., Balch, W., 2006. Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature* 439, 234–238.
- Starkuviene, V., Pepperkok, R., 2007. Differential requirements for ts-O45-G and procollagen biosynthetic transport. *Traffic* 8, 1035–1051.
- Stephens, D., Pepperkok, R., 2002. Imaging of procollagen transport reveals COPI-dependent cargo sorting during ER-to-Golgi transport in mammalian cells. *J Cell Sci* 115, 1149–1160.
- Stephens, D., Pepperkok, R., 2004. Differential effects of a GTP-restricted mutant of Sar1p on segregation of cargo during export from the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci* 117, 3635–3644.

- Stirling, C. J., Rothblatt, J., Hosobuchi, M., Deshaies, R., Schekman, R., 1992. Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* 3, 129–142.
- Strahl, T., Thorner, J., 2007. Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1771, 353–404.
- Tabuchi, M., Audhya, A., Parsons, A., Boone, C., Emr, S. D., 2006. The phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and TORC2 binding proteins Slm1 and Slm2 function in sphingolipid regulation. *Mol Cell Biol* 26, 5861–5875.
- Tahirovic, S., Schorr, M., Mayinger, P., 2005. Regulation of intracellular phosphatidylinositol-4-phosphate by the Sac1 lipid phosphatase. *Traffic* 6, 116–130.
- Takizawa, P., DeRisi, J., Wilhelm, J., Vale, R., 2000. Plasma membrane compartmentalization in yeast by messenger RNA transport and a septin diffusion barrier. *Science* 290, 341–4.
- Takizawa, P. A., Sil, A., Swedlow, J. R., Herskowitz, I., Vale, R. D., 1997. Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* 389, 90–3.
- Takizawa, P. A., Vale, R. D., 2000. The myosin motor, Myo4p, binds Ash1 mRNA via the adapter protein, She3p. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 5273–8.
- Terzi, L., Pool, M. R., Dobberstein, B., Strub, K., 2004. Signal recognition particle Alu domain occupies a defined site at the ribosomal subunit interface upon signal sequence recognition. *Biochemistry* 43, 107–17.
- Thomas, B. J., Rothstein, R., 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* 56, 619–630.
- Toi, H., Fujimura Kamada, K., Irie, K., Takai, Y., Todo, S., Tanaka, K., 2003. She4p/Dim1p interacts with the motor domain of unconventional myosins in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 14, 2237–2249.
- Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R., Trombetta, S., Pypaert, M., Chow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., Moore, H., van der Wel, N., Houben, D., Peters, P., de Chastellier, C., Mellman, I., Grinstein, S., 2005. Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* 123, 157–170.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350–4354.
- Tsutsumi, S., Kamata, N., Vokes, T. J., Maruoka, Y., Nakakuki, K., Enomoto, S., Omura, K., Amagasa, T., Nagayama, M., Saito Ohara, F., Inazawa, J., Moritani, M., Yamaoka, T., Inoue, H., Itakura, M., 2004. The novel gene encoding a putative transmembrane protein is mutated in gnathodiaphyseal dysplasia (GDD). *Am J Hum Genet* 74, 1255–61.

- Umebayashi, K., Hirata, A., Fukuda, R., Horiuchi, H., Ohta, A., Takagi, M., 1997. Accumulation of misfolded protein aggregates leads to the formation of russell body-like dilated endoplasmic reticulum in yeast. *Yeast* 13, 1009–1020.
- Ungermann, C., Langosch, D., 2005. Functions of SNAREs in intracellular membrane fusion and lipid bilayer mixing. *J Cell Sci* 118, 3819–3828.
- Urbinati, C., Gonsalvez, G., Aris, J., Long, R., 2006. Loc1p is required for efficient assembly and nuclear export of the 60S ribosomal subunit. *Mol Genet Genomics* 276, 369–377.
- Van den Berg, B., Clemons, W., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S., Rapoport, T., 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427, 36–44.
- van den Brink-van der Laan, E., Killian, J., de Kruijff, B., 2004. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile. *Biochim Biophys Acta* 1666, 275–288.
- van Meer, G., Voelker, D., Feigenson, G., 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 112–124.
- Vogel, K., Roche, P. A., 1999. SNAP-23 and SNAP-25 are palmitoylated in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 258, 407–410.
- Wächter, A., Schwappach, B., 2005. The yeast CLC chloride channel is proteolytically processed by the furin-like protease Kex2p in the first extracellular loop. *FEBS Lett* 579, 1149–53.
- Walter, P., Blobel, G., 1981. Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol* 91, 557–561.
- Walther, T. C., Brickner, J. H., Aguilar, P. S., Bernales, S., Pantoja, C., Walter, P., 2006. Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature* 439, 998–1003.
- Watson, P., Frigerio, G., Collins, B., Duden, R., Owen, D., 2004. Gamma-COP appendage domain - structure and function. *Traffic* 5, 79–88.
- Watson, P., Townley, A. K., Koka, P., Palmer, K. J., Stephens, D. J., 2006. Sec16 Defines Endoplasmic Reticulum Exit Sites and is Required for Secretory Cargo Export in Mammalian Cells. *Traffic* 7, 1678–87.
- Weber, T., Zemelman, B. V., McNew, J. A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T. H., Rothman, J. E., 1998. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759–772.
- Weisman, L., 2003. Yeast vacuole inheritance and dynamics. *Annu Rev Genet* 37, 435–460.

- Wesche, S., Arnold, M., Jansen, R. P., 2003. The UCS domain protein She4p binds to myosin motor domains and is essential for class I and class V myosin function. *Curr Biol* 13, 715–24.
- Westermann, S., Drubin, D. G., Barnes, G., 2007. Structures and functions of yeast kinetochore complexes. *Annu Rev Biochem* 76, 563–91.
- Whiteheart, S. W., Schraw, T., Matveeva, E. A., 2001. N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) structure and function. *Int Rev Cytol* 207, 71–112.
- Wieprecht, T., Apostolov, O., Beyermann, M., Seelig, J., 1999. Thermodynamics of the alpha-helix-coil transition of amphipathic peptides in a membrane environment: implications for the peptide-membrane binding equilibrium. *J Mol Biol* 294, 785–794.
- Wilcox, C. A., Redding, K., Wright, R., Fuller, R. S., 1992. Mutation of a tyrosine localization signal in the cytosolic tail of yeast Kex2 protease disrupts Golgi retention and results in default transport to the vacuole. *Mol Biol Cell* 3, 1353–1371.
- Wilhelm, J., Vale, R., 1993. RNA on the move: the mRNA localization pathway. *JCB* 123, 269–274.
- Wilhovsky, S., Gardner, R., Hampton, R., 2000. HRD gene dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation. *Mol Biol Cell* 11, 1697–1708.
- Yin, H., Pruyne, D., Huffaker, T. C., Bretscher, A., 2000. Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature* 406, 1013–1015.
- Yoshida, S., Ohya, Y., Goebel, M., Nakano, A., Anraku, Y., 1994. A novel gene, STT4, encodes a phosphatidylinositol 4-kinase in the PKC1 protein kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269, 1166–1172.
- Yoshihisa, T., Barlowe, C., Schekman, R., 1993. Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science* 259, 1466–1468.
- Yuan, H., Michelsen, K., Schwappach, B., 2003. 14-3-3 dimers probe the assembly status of multimeric membrane proteins. *Curr Biol* 13, 638–46.
- Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y. N., Jan, L. Y., 1999. A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 22, 537–48.
- Zhang, S., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Stauderman, K. A., Cahalan, M., 2005. STIM1 is a Ca<sup>2+</sup> sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane. *Nature* 437, 902–905.
- Zimmerman, J. M., Eliezer, N., Simha, R., 1968. The characterization of amino acid sequences in proteins by statistical methods. *J Theor Biol* 21, 200.
- Zuker, M., 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 3406–3415.

# Abbildungsverzeichnis

---

|      |                                                                                                               |    |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1  | Überblick über den anterograden sekretorischen Weg . . . . .                                                  | 6  |
| 1.2  | Lipidanordnung bei der (Hemi-)Fusion von Membranen . . . . .                                                  | 14 |
| 1.3  | Topologie-Modell von Ist2 . . . . .                                                                           | 16 |
| 2.1  | Restriktionsschnittstellen der Ist2-Plasmide . . . . .                                                        | 27 |
| 2.2  | Dualband Filterset EGFP/DsRed des Olympus BX60 . . . . .                                                      | 47 |
| 3.1  | Die lokale Translation von Ist2 ist keine Voraussetzung für den Sec-unabhängigen Transport von Ist2 . . . . . | 49 |
| 3.2  | Die 3'UTR wird nicht für den Sec-unabhängigen Transport von Ist2 benötigt                                     | 50 |
| 3.3  | Der extreme C-Terminus von Ist2 enthält das Sortierungssignal . . . . .                                       | 51 |
| 3.4  | Detektion von neu synthetisiertem YFP-Ist2 und HA-Ist2 . . . . .                                              | 53 |
| 3.5  | Transiente Lokalisation von HA-Ist2 am pER und in der Zellperipherie . .                                      | 54 |
| 3.6  | YFP-Ist2 ist ein sehr stabiles Protein . . . . .                                                              | 55 |
| 3.7  | Multimerisierung von Ist2 unter Wildtyp-Bedingungen . . . . .                                                 | 56 |
| 3.8  | Schematische Darstellung von Ist2 . . . . .                                                                   | 57 |
| 3.9  | Konservierung des Ist2-Sortierungssignales . . . . .                                                          | 58 |
| 3.10 | Das hydrophobe Leucin an Position 942 ist essentiell für den Transport von Ist2 . . . . .                     | 59 |
| 3.11 | Solubilisierung von Membrankomplexen . . . . .                                                                | 60 |
| 3.12 | YFP-Ist2 L942Q ist ein sehr stabiles Protein . . . . .                                                        | 61 |
| 3.13 | Hydrophobizität und Sperrigkeit der Aminosäure an Position 942 beeinflussen den Transport . . . . .           | 61 |
| 3.14 | Die Hydrophobizität der Aminosäure an Position 938, 939 und 946 beeinflusst den Transport von Ist2 . . . . .  | 63 |
| 3.15 | Die Proteinakkumulation von Ist2 L942V in Punkten ist abhängig von Temperatur und Energie . . . . .           | 64 |
| 3.16 | Lokalisation von <i>IST2</i> -mRNA und Ist2-Protein . . . . .                                                 | 66 |
| 3.17 | Weder Wildtyp Ist2 noch mutiertes Ist2 kolokalisieren mit dem Golgi-Apparat oder Endosomen . . . . .          | 68 |

---

|      |                                                                                                                                            |     |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.18 | Ist2 kolokalisiert mit speziellen Domänen des ER . . . . .                                                                                 | 69  |
| 3.19 | Ist2 kolokalisiert nicht mit klassischen COPII-ER <i>exit sites</i> . . . . .                                                              | 71  |
| 3.20 | Die Funktion der hydrophoben Leucine der K/L-Sequenz ist abhängig von<br>ihrer Position in einer amphipathischen $\alpha$ -Helix . . . . . | 72  |
| 3.21 | Die Insertion eines Prolins in die K/L-Sequenz beeinträchtigt den Transport<br>von Ist2 . . . . .                                          | 73  |
| 3.22 | Die Position der Lysine in der K/L-Sequenz beeinflusst ihre Funktion . . .                                                                 | 74  |
| 3.23 | Lysin 936 in der K/L-Sequenz hat eine spezielle Rolle beim Transport von<br>Ist2 . . . . .                                                 | 75  |
| 3.24 | Die Lysine N-terminal von K936 wirken in Kombination mit anderen Ami-<br>nosäuren . . . . .                                                | 76  |
| 3.25 | YFP-Ist2 K931-936A ist ein sehr stabiles Protein . . . . .                                                                                 | 77  |
| 3.26 | Glycin 937, aber nicht Prolin 932, beeinflusst den Transport von Ist2 . . .                                                                | 78  |
| 3.27 | Homologe von Ist2 aus anderen Hefespezies . . . . .                                                                                        | 80  |
| 3.28 | GST-Pulldown mit rekombinant hergestelltem GST-Ist2C . . . . .                                                                             | 83  |
| 3.29 | Analyse der Spezifität der Ist2-Antikörper . . . . .                                                                                       | 85  |
| 3.30 | Immunpräzipitation von Triton X-100-solubilisierten Ist2-Komplexen, Sil-<br>berfärbung . . . . .                                           | 87  |
| 3.31 | Immunpräzipitation von Triton-solubilisierten Ist2-Komplexen, Western Blot<br>mit Emp47-AK . . . . .                                       | 88  |
| 3.32 | Immunpräzipitation von Digitonin-solubilisierten Ist2-Komplexen, Silber-<br>färbung . . . . .                                              | 89  |
| 3.33 | Immunpräzipitation von Digitonin-solubilisierten Ist2-Komplexen, Western<br>Blot mit Sac1-AK . . . . .                                     | 91  |
| 3.34 | Immunpräzipitation von Digitonin-solubilisierten Ist2-Komplexen, Western<br>Blot mit Scs2-AK . . . . .                                     | 92  |
| 3.35 | Mutiertes Ist2 kolokalisiert mit Scs2 . . . . .                                                                                            | 93  |
| 3.36 | Lokalisation von mCherry-Ist2 in $\Delta ist2 \Delta Scs2$ Zellen . . . . .                                                                | 94  |
| 4.1  | Interaktionspartner von Ist2 . . . . .                                                                                                     | 108 |
| 4.2  | Modell des Ist2-Transportwegs . . . . .                                                                                                    | 112 |

---

# Tabellenverzeichnis

---

|      |                                                                                         |    |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.1  | Lokalisierte mRNAs . . . . .                                                            | 4  |
| 1.2  | ER-Export-Signale . . . . .                                                             | 9  |
| 1.3  | Lokalisation der SNAREs in Hefe . . . . .                                               | 13 |
| 1.4  | Funktion der analysierten <i>SEC</i> -Gene . . . . .                                    | 18 |
| 2.1  | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete eigene Oligonukleotide . . . . .                     | 24 |
| 2.2  | Verwendung spezieller Oligonukleotide . . . . .                                         | 27 |
| 2.3  | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete fremde Oligonukleotide . . . . .                     | 27 |
| 2.4  | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide . . . . .                                   | 28 |
| 2.5  | Hefestämme . . . . .                                                                    | 31 |
| 2.6  | Reaktionszyklen für T3 Thermocycler . . . . .                                           | 32 |
| 2.7  | Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele . . . . .                                             | 44 |
| 2.8  | Fluoreszierende Protein . . . . .                                                       | 46 |
| 2.9  | Filterset des Leica Mikroskops . . . . .                                                | 47 |
| 2.10 | Filterset des Axio Imager.A1 Mikroskops . . . . .                                       | 47 |
| 3.1  | Hydrophobizität und Sperrigkeit der Aminosäuren . . . . .                               | 62 |
| 3.2  | Massenspektrometrische Analyse der detektierten Proteine des GST-Pull-downs . . . . .   | 84 |
| 3.3  | Massenspektrometrische Analyse der mit Triton X-100-solubilisierten IP-Proben . . . . . | 87 |
| 3.4  | Massenspektrometrische Analyse der mit Digitonin-solubilisierten IP-Proben . . . . .    | 90 |

# Akürzungsverzeichnis

---

|                 |                                                                          |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------------|
| A <sub>x</sub>  | Absorption bei einer Wellenlänge von x nm                                |
| Abb.            | Abbildung                                                                |
| A. dest.        | destilliertes Wasser                                                     |
| ADP             | Adenosin-5'-diphosphat                                                   |
| AK              | Antikörper                                                               |
| APS             | Ammoniumpersulfat                                                        |
| Arf             | ADP-Ribosylierungs-Faktor                                                |
| AS              | Aminosäure                                                               |
| ATP             | Adenosin-5'-triphosphat                                                  |
| ATPase          | Adenosin-5'-triphosphatase                                               |
| bp              | Basenpaar(e)                                                             |
| BSA             | Rinderserumalbumin                                                       |
| bzw.            | beziehungsweise                                                          |
| CMV             | Cytomegalie-Virus                                                        |
| CPIM            | Protease-Inhibitoren Mischung ( <i>Complete Protease Inhibitor Mix</i> ) |
| Da              | Molekulargewicht in Dalton                                               |
| DAPI            | diamidinophenylindol                                                     |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure ( <i>desoxyribonucleic acid</i> )                 |
| dNTP            | Desoxyribonukleosidtriphosphat                                           |
| DTT             | Dithiothreitol                                                           |
| CFP             | <i>cyan fluorescent protein</i>                                          |
| COPI bzw. COPII | Coatomer Protein I bzw. II                                               |
| C-Terminus      | Carboxy-Terminus                                                         |
| <i>E. coli</i>  | <i>Escherichia coli</i>                                                  |
| EDTA            | Ethylendiamintetraacetat                                                 |
| ER              | Endoplasmatisches Retikulum                                              |
| ERES            | <i>ER-exit site</i>                                                      |
| ERGIC           | ER-Golgi-intermediär-Kompartiment                                        |
| <i>et al.</i>   | <i>et alii</i>                                                           |
| FISH            | Fluoreszenz in situ Hybridisierung                                       |
| f               | vorwärts ( <i>forward</i> )                                              |
| FRAP            | <i>fluorescence recovery after photobleaching</i>                        |
| g               | Gramm bzw. Erdbeschleunigung, g = 9,81 m/s <sup>2</sup>                  |
| GAP             | GTPase aktivierendes Protein                                             |
| GDI             | GDP-Dissoziations-Inhibitor                                              |
| GDP             | Guanosin-5'-diphosphat                                                   |

---

|                 |                                                                               |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| GEF             | Guaninnukleotid-Austauschfaktor ( <i>guanine nucleotide exchange factor</i> ) |
| GFP             | grün fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )            |
| Glc             | Glucose                                                                       |
| GPI             | Glykosylphosphatidylinositol                                                  |
| GTP             | Guanosin-5'-triphosphat                                                       |
| GTPase          | Guanosin-5'-triphosphatase                                                    |
| h               | Stunde ( <i>hour</i> )                                                        |
| HA              | Hämagglutinin                                                                 |
| HEPES           | N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure                            |
| H-Kette         | schwere Kette eines Antikörpers                                               |
| H. sperm.       | DNA von Heringssperma                                                         |
| IF              | indirekte Immunfluoreszenz                                                    |
| IgG             | Immunglobulin G                                                               |
| IPTG            | Isopropylthiogalactosid                                                       |
| kb              | Kilo-Base                                                                     |
| kDa             | Molekulargewicht in Kilodalton                                                |
| KH              | hnRNPK Homologie                                                              |
| l + L           | Liter                                                                         |
| LB              | Luria-Bertani                                                                 |
| m               | milli                                                                         |
| M               | molar                                                                         |
| MALDI-TOF       | <i>Matrix assisted laser desorption and ionisation-time of flight</i>         |
| MAT             | Paarungstyp ( <i>mating type</i> )                                            |
| mCherry         | rot fluoreszierendes Protein ( <i>monomeric cherry</i> )                      |
| min             | Minute(n)                                                                     |
| mRNA            | Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )                                            |
| $\mu$           | mikro                                                                         |
| nm              | Nanometer (Wellenlänge)                                                       |
| NEM             | N-Ethylmaleimid                                                               |
| NSF             | NEM-sensitiver Faktor/Fusionsprotein                                          |
| nt              | Nukleotid(e)                                                                  |
| N-Terminus      | Amino-Terminus                                                                |
| OD <sub>x</sub> | optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm                                |
| ORF             | offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )                              |
| p               | pico                                                                          |
| PAGE            | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                                               |
| PBS             | phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )            |
| PCR             | Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )                |
| pER             | perinukleäres ER                                                              |
| Pfu             | <i>Pyrococcus furiosus</i>                                                    |

---

|                      |                                                                 |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------|
| PI                   | Phosphatidylinositol                                            |
| PIP                  | Phosphatidylinositolphosphat                                    |
| PM                   | Plasmamembran                                                   |
| PMSF                 | Phenylmethylsulfonylfluorid                                     |
| PUF                  | <i>Pumilio-homology domain family</i>                           |
| PVC                  | prävakuläres Kompartiment                                       |
| r                    | rückwärts ( <i>reverse</i> )                                    |
| RNA                  | Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )                    |
| RNC                  | <i>ribosome-nascent chain complex</i>                           |
| RNP                  | Ribonukleoprotein                                               |
| rpm                  | Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )          |
| s                    | Sekunde(n)                                                      |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                                 |
| SDS                  | Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )          |
| SNAP                 | <i>soluble NSF attachment protein</i>                           |
| SNAP-25              | Synaptosomen-assoziiertes Protein mit 25 kDa                    |
| SNARE                | SNAP-Rezeptor                                                   |
| SR                   | SRP-Rezeptor                                                    |
| SRP                  | Signalerkennungsteilchen ( <i>signal recognition particle</i> ) |
| Taq                  | <i>Thermus aquaticus</i>                                        |
| TCA                  | Trichloressigsäure                                              |
| TEMED                | <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyldiamin                             |
| TGN                  | <i>trans</i> -Golgi-Netzwerk                                    |
| TMD                  | Transmembrandomäne                                              |
| Tris                 | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                                  |
| ts                   | hitzesensitiv ( <i>temperature sensitive</i> )                  |
| t-SNARE              | <i>target</i> -SNARE                                            |
| U                    | Einheit der Enzymaktivität ( <i>unit</i> )                      |
| UTR                  | nicht translatierte Region ( <i>untranslated region</i> )       |
| v-SNARE              | Vesikel-SNARE                                                   |
| VSV                  | Vesikulärer Stomatitisvirus                                     |
| VSV G-Protein        | Vesikulärer Stomatitisvirus Glykoprotein                        |
| v/v                  | Volumenprozent ( <i>volume per volume</i> )                     |
| WT                   | Wildtyp                                                         |
| w/v                  | Gewichtsprozent ( <i>weight per volume</i> )                    |
| YFP                  | <i>yellow fluorescent protein</i>                               |
| YNB                  | <i>Yeast Nitrogen Base</i>                                      |

# Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich herzlich bei PD Dr. Matthias Seedorf für die Vergabe des Themas, die umfassende wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit, die jederzeit möglichen fachlichen Diskussion und die hilfsbereite Beantwortung vieler Fragen.

Prof. Dr. Blanche Schwappach danke ich für die vielen kleinen und großen Ratschläge, Hinweise und aufmunternden Worte. Sehr erfreut hat mich, dass sie trotz des Umzugs nach Manchester bereit war, meine Arbeit als Zweitgutachterin zu bewerten und sie vor der Fakultät zu vertreten.

Prof. Dr. Bernhard Dobberstein möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der benötigten Materialien, für ein immer offenes Ohr und fachliche Ratschläge danken.

Bei Prof. Dr. Ralf-Peter Jansen bedanke ich mich für die gute Kooperation und die Möglichkeit in seinem Labor Experimente durchzuführen.

Ein besonderer Dank gilt Steffen Frey für die Einarbeitung in Proteinaufreinigungen.

Meinen Kollegen danke ich herzlich für die Unterstützung und die freundschaftliche Laboratmosphäre.