



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus dem Institut für Biologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Enno Hartmann

**Nachweis und Charakterisierung  
des post-translationalen Transports kleiner Proteine  
in das Endoplasmatische Retikulum des Säugers**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

- Aus der Sektion Naturwissenschaften -

vorgelegt von  
Vivica Stokes  
aus Eckernförde

Lübeck 2012

- 
1. Berichterstatter: PD Dr. Kai-Uwe Kalies
  2. Berichterstatter: Prof. Dr. Norbert Tautz

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Mai 2012

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 9. Mai 2012

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
1.1	DIE CO-TRANSLATIONALE PROTEINTRANSLOKATION IN DAS ENDOPLASMATISCHE RETIKULUM .....	5
1.2	DIE POST-TRANSLATIONALE PROTEINTRANSLOKATION IN DAS ENDOPLASMATISCHE RETIKULUM .....	10
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>16</b>
3.1	MATERIAL .....	16
3.1.1	<i>Plasmide</i> .....	16
3.1.2	<i>Oligonukleotide</i> .....	20
3.1.3	<i>Chemikalien, Enzyme und Antikörper</i> .....	21
3.1.4	<i>Puffer und Medien</i> .....	22
3.2	METHODEN .....	24
3.2.1	<i>Klonierungsstrategie</i> .....	24
3.2.2	<i>Polymerasekettenreaktion</i> .....	26
3.2.3	<i>Endonukleaseverdau</i> .....	26
3.2.4	<i>Phosphorylierung</i> .....	26
3.2.5	<i>Ligation</i> .....	26
3.2.6	<i>Transformation und Sequenzierung</i> .....	27
3.2.7	<i>Übernachtulturen, Glycerinstocks, Plasmidpräparation</i> .....	27
3.2.8	<i>Agarosegelelektrophorese</i> .....	27
3.2.9	<i>Transkription, Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung</i> .....	28
3.2.10	<i>Translation, Translokation und Proteaseassay</i> .....	28
3.2.11	<i>Ammoniumsulfat-Fällung</i> .....	29
3.2.12	<i>Präparation von Mikrosomen</i> .....	29
3.2.13	<i>Behandlung von Membranen mit Hochsalz und EDTA (EKRMs)</i> .....	30
3.2.14	<i>ATP-Depletion</i> .....	30
3.2.15	<i>NEM-Behandlung</i> .....	31
3.2.16	<i>Eeyarestatin I-Behandlung</i> .....	31
3.2.17	<i>Western Blot und Immundetektion</i> .....	31
3.2.18	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Auswertung</i> .....	32
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>33</b>
4.1	EXISTENZ EINER POST-TRANSLATIONALEN TRANSPORTMÖGLICHKEIT SEKRETORISCHER PROTEINE IN DAS ER DES SÄUGERS .....	33
4.1.1	<i>Die Substratproteine können transloziert werden</i> .....	33
4.1.2	<i>Die Substratproteine können in Säugermikrosomen post-translational transloziert werden</i> .....	35
4.2	CHARAKTERISIERUNG DES POST-TRANSLATIONALEN TRANSPORTWEGS IM SÄUGER.....	37

---

4.2.1	<i>Der post-translationale Proteintransport im Säuger ist ATP-abhängig.....</i>	37
4.2.2	<i>Der Transport kleiner Proteine erfolgt durch NEM-sensitive Membranproteine .....</i>	39
4.2.3	<i>Der Transport kleiner Proteine ist Sec61-abhängig.....</i>	41
4.3	<b>DIE PROTEINLÄNGE HAT EINFLUSS AUF DAS TRANSPORTVERHALTEN .....</b>	44
4.3.1	<i>Die Verkürzung der Proteine schränkt die Transportmöglichkeiten ein .....</i>	44
4.3.2	<i>Stark verlängerte Substrate können nicht post-translation transportiert werden .....</i>	46
4.4	<b>EINFLUSS DER SIGNALSEQUENZ AUF DAS TRANSPORTVERHALTEN .....</b>	48
4.4.1	<i>Die Signalsequenz von ppL kann post-translation erkannt werden.....</i>	50
4.4.2	<i>Die Signalsequenz von Histatin 3 erzwingt keinen post-translationen Transport.....</i>	51
4.4.3	<i>Die Signalsequenz des pp<math>\alpha</math>-Faktors verhindert den post-translationen Transport von Histatin 3 im Säuger.....</i>	52
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>55</b>
5.1	ENTDECKUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES POST-TRANSLATIONALEN TRANSPORTS IM SÄUGER .....	55
5.2	UNTERSUCHUNG DER TRANSPORTBESTIMMENDEN SUBSTRATEIGENSCHAFTEN .....	62
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>83</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>87</b>

# 1 Einleitung

Die eukaryontische Zelle besitzt eine Vielzahl von Organellen, wie beispielsweise den Zellkern, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder den Golgi-Apparat, welche jeweils unterschiedliche Aufgaben in der Zelle erfüllen. Viele Organellen enthalten membranumschlossene Reaktionsräume (Kompartimente). In diesen befinden sich Proteine, die für die Erfüllung der spezifischen Aufgaben der Organelle notwendig sind.

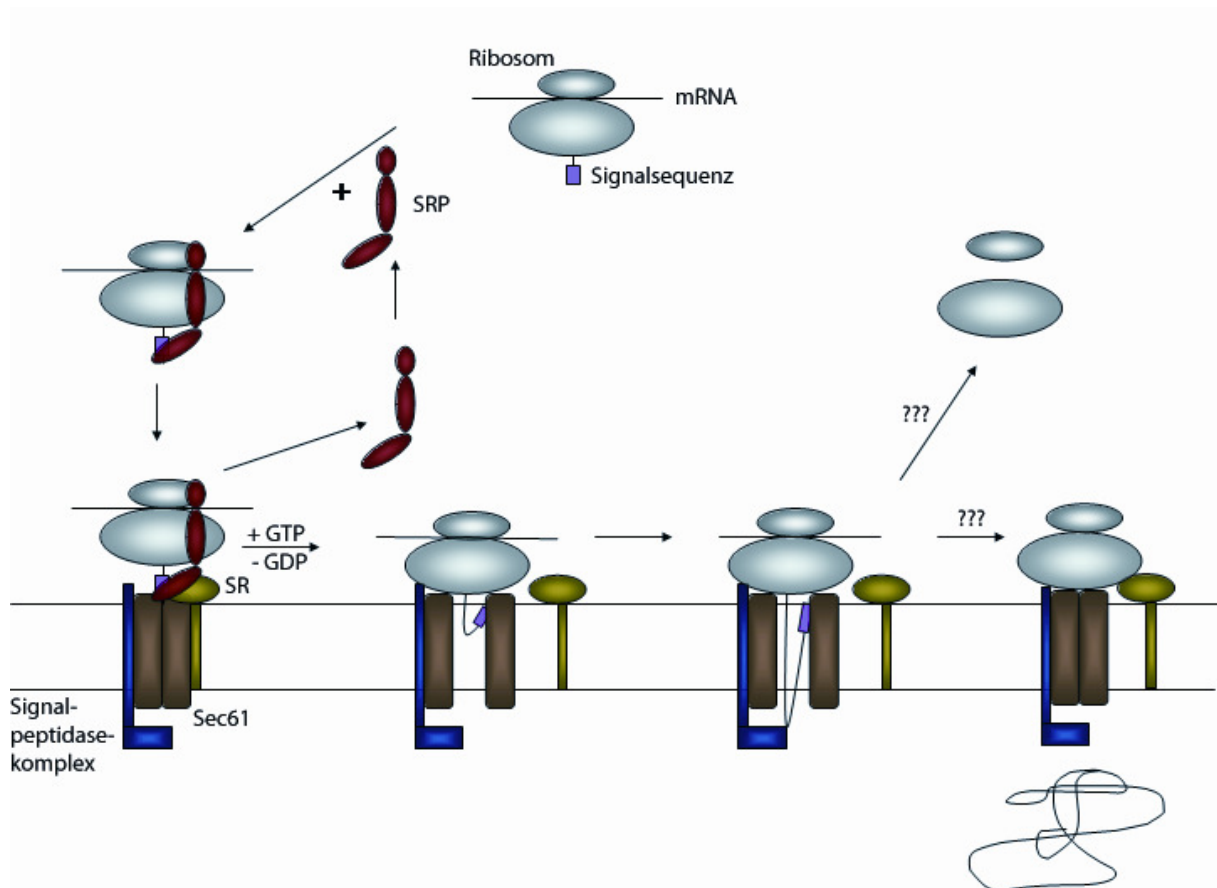
Dennoch beginnt die Translation der meisten Proteine zunächst zentral an freien Ribosomen im Zytosol der Zelle. Dort erfolgt eine erste Sortierung entsprechend des späteren Einsatzortes. Bereits früh wurde beobachtet, dass viele der Proteine, die nicht für den Verbleib im Zytosol bestimmt sind, in das ER gelangen [Porter *et al.*, 1945; Siekevitz & Palade, 1960; Redman *et al.*, 1966]. Dazu gehören neben den sekretorischen Proteinen unter anderem lysosomale Proteine oder Proteine, die sich in der Zytoplasmamembran befinden. Die Markierung der Proteine, die in das ER transportiert werden, erfolgt in der Regel über hydrophobe Bereiche in der Aminosäuresequenz des Proteins, die als „Signalsequenzen“ bezeichnet werden [Blobel & Dobberstein, 1975a]. Im Anschluss werden die Proteine dann gegebenenfalls vom ER über Vesikelabschnürungen und Membranfusionen weiter in den Golgi-Apparat und von dort zu ihren Zielkompartimenten transportiert [Palade, 1975].

## 1.1 Die co-translationale Proteintranslokation in das Endoplasmatische Retikulum

Die co-translationale Translokation von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum ist an die Elongation der Polypeptidkette durch das Ribosom gekoppelt und der bei Säugern übliche und am besten untersuchte Transportweg. Der Transport von Proteinen in das ER lässt sich in drei Phasen unterteilen: Das *Targeting*, bei dem die Polypeptidkette zur Membran gelangt, den eigentlichen Transport durch oder in die Membran und die Prozessierung und Modifizierung des Proteins im Lumen des ERs.

Wenn die Signalsequenz eines co-translationally zu transportierenden Proteins aus dem Ribosomenkanal (*Exit Tunnel*) ausgetreten ist, bindet zunächst das *Signal Recognition Particle* (SRP) an die Signalsequenz (Abb. 1.1). Dieser im Zytosol der Zelle befindliche Ribonukleoproteinkomplex setzt sich aus einer RNA und bis zu sechs Proteinen zusammen. Wenn ein Bereich des SRPs, die sogenannte S-Domäne, an die Signalsequenz des naszierenden Proteins gebunden hat, kommt es zu einer sterischen Umlagerung des SRPs und die Alu-Domäne des

SRPs kann in den Raum zwischen den beiden ribosomalen Untereinheiten gelangen. Da die für diese Interaktion genutzten Bindestellen am Ribosom teilweise identisch mit den Bindestellen für den Elongationsfaktor eEF2 sind, kommt es zu einer Unterbrechung der Proteinverlängerung, dem sogenannten „SRP-Arrest“ [Walter & Blobel, 1980, 1982; Meyer & Dobberstein, 1980a, b; Walter *et al.*, 1981; Nagai *et al.*, 2003; Halic *et al.*, 2004; Bradshaw *et al.*, 2009].



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung des co-translationalen Translokationsmechanismus.** Bei Austritt der Signalsequenz aus dem ribosomalen *Exit Tunnel* bindet das *Signal Recognition Particle* (SRP) an die Signalsequenz und an das Ribosom und erzeugt einen Translationsarrest. Dieser wird durch Bindung des Komplexes aus Ribosom, naszierender Kette und SRP an den SRP-Rezeptor (SR) und das Translokon aufgehoben. Die Kette inseriert nun in den aus dem Sec61-Komplex gebildeten Translokationskanal und wird im weiteren Verlauf der Translation in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert. Ob die Ribosomen nach der Termination an der Membran verbleiben oder ob sie sich ablösen, ist noch Gegenstand von Diskussionen. Während der Translokation erfolgt in den meisten Fällen eine Abspaltung der Signalsequenz durch den Signalpeptidasekomplex. Proteine, die Erkennungssignale für N-Glykosylierungen tragen, werden zudem durch die Oligosaccharyltransferase prozessiert (nicht dargestellt).

Zweck dieser durch die SRP-Bindung hervorgerufenen Pausierung ist es, dem Ribosom und der naszierenden Kette Zeit zu geben um zur ER-Membran zu gelangen. Käme es nicht zu einer Verzögerung der Elongation, so könnte die zwischenzeitlich aus dem ribosomalen *Exit*

*Tunnel* austretende Polypeptidkette eventuell einer unspezifischen Faltung unterworfen werden, die eine erfolgreiche Translokation verhindern würde.

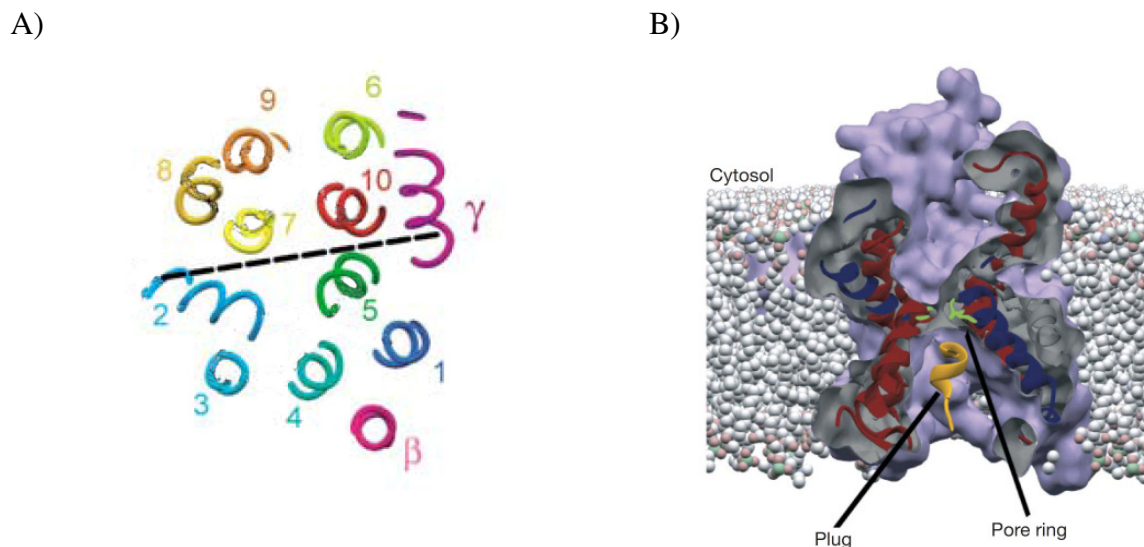
Erreicht das ribosomengebundene SRP die Membran des Endoplasmatischen Retikulums, so kommt es zur Wechselwirkung des SRPs mit seinem SRP-Rezeptor. Beim SRP-Rezeptor handelt es sich um ein heterodimeres Protein. Die  $\beta$ -Untereinheit ist in der ER-Membran verankert und bildet den Assoziationspartner für die nur peripher membrangebundene  $\alpha$ -Untereinheit [Gilmore *et al.*, 1982a, b; Meyer *et al.*, 1982; Tajima *et al.*, 1986; Ogg *et al.*, 1992; Miller *et al.*, 1995]. Über die  $\alpha$ -Untereinheit des SRP-Rezeptors erfolgt die Bindung des Komplexes aus SRP, Ribosom und naszierender Kette an die ER-Membran. Die enzymatische Aktivität der drei GTPasen SRP, SR $\alpha$  und SR $\beta$  führt zur Ablösung des SRPs vom Ribosom und von der Signalsequenz, wodurch der Translationsarrest aufgehoben wird [Connolly & Gilmore, 1989]. Neben SRP wurde ein weiterer ribosomenständiger Proteinkomplex entdeckt, der in der *Targeting*-Phase an naszierende Ketten binden kann. Dieser als NAC (*nascent-chain complex*) bezeichnete Komplex wird durch Homo- oder Heterodimerisierung seiner  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten gebildet. Es wird vermutet, dass NAC vor SRP an die naszierende Kette bindet und so SRP von einer irrtümlichen Bindung an Polypeptidketten ohne Signalsequenzen abhält. Eine Chaperonfunktion von NAC wurde ausgeschlossen [Wiedmann *et al.*, 1994; Beatrix *et al.*, 2000; del Alamo *et al.*, 2011].

Nach der Bindung des SRPs an seinen Rezeptor und der damit verbundenen Ablösung des SRPs vom Ribosom bindet das Ribosom an den Translokationskanal [Borgese *et al.*, 1974; Görlich *et al.*, 1992a; Kalies *et al.*, 1994; Prinz *et al.*, 2000; Raden *et al.*, 2000; Halic *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2010]. Als Kanalbildner, Ribosomenrezeptor und Signalsequenzrezeptor dient der trimere Sec61-Komplex, der sich zu gleichen Anteilen aus seinen  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten zusammensetzt. Während vor allem aufgrund elektronenmikroskopischer Daten zunächst angenommen wurde, dass der Kanal von bis zu vier Sec61-Komplexen gebildet wird, weisen neuere Daten darauf hin, dass ein einzelner trimere Komplex zur Bildung einer Pore ausreicht [Ito *et al.*, 1983; Hartmann *et al.*, 1994; Hanein *et al.*, 1996; Kalies *et al.*, 1998; Mothes *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1999; Bessonneau *et al.*, 2002; Mitra *et al.*, 2005; Yahr & Wickner, 2000; van den Berg *et al.*, 2004; Clemons *et al.*, 2004; Kalies *et al.*, 2008]. Röntgenkristallstrukturen des im Archaeobakterium *Methanococcus janaschii* vorkommenden homologen SecYE $\beta$ -Komplexes zeigen, dass man sich den heterotrimeren Sec61-Komplex wie eine klappbare Muschel vorstellen kann, die an einer Seite zusammengeklammert ist und an der gegenüberliegenden Seite geöffnet werden kann [van den Berg *et al.*, 2004]. Die beiden

„Muschelschalen“ werden dabei von den Transmembrandomänen (TMD) 1-5 bzw. 6-10 des SecY (Sec61 $\alpha$ ) gebildet (Abb. 1.2, A). Als „Scharnier“ dient SecE (Sec61 $\gamma$ ). Die nicht essentielle Sec61 $\beta$ -Untereinheit verläuft parallel zu Sec61 $\alpha$  auf der einen Seite der Klappmuschel und hat wenig Kontakt mit den beiden anderen Bestandteilen des Komplexes.

Die Abdichtung des Kanals erfolgt durch die sogenannte Plug-Domäne der Sec61 $\alpha$ -Untereinheit und einer als „Porenring“ bezeichneten Verjüngung in der Mitte des Kanals (Abb. 1.2, B) sowie eventuell durch Calmodulin [van den Berg *et al.*, 2004; Tam *et al.*, 2005; Junne *et al.*, 2006; Gumbart & Schulten, 2006; Li *et al.*, 2007; Maillard *et al.*, 2007; Erdmann *et al.*, 2011].

In der Literatur wird der trimere Sec61-Komplex oftmals als „Translokon“ bezeichnet. Die vorliegende Arbeit folgt einer alternativen Definition des Begriffs, nach der ein Translokon sämtliche am Proteintransport in das ER beteiligten membranständigen Proteine umfasst.



**Abb. 1.2: Struktur des trimeren Sec61-Komplexes.** A) Aufsicht auf den trimeren Komplex vom Zytosol. Die Transmembrandomänen (TMD) von Sec61 $\alpha$  sind durchnummeriert. Die unterbrochene Linie deutet die laterale Öffnungsebene zwischen den beiden pseudosymmetrischen Hälften an. B) Querschnitt durch die Translokationspore vertikal zur Membranebene. Die hydrophoben Reste des Porenrings sind in grün hervorgehoben, der Plug ist gelb eingefärbt. Abbildung A modifiziert nach van den Berg *et al.*, 2004. Abbildung B modifiziert nach Rapoport *et al.*, 2007.

Nach der Bindung des Ribosoms an das Translokon befindet sich der Ausgang des Ribosomenkanals oberhalb der zytosolischen Öffnung der Translokationspore und die Signalsequenz wird an den Kanal übergeben [Jungnickel & Rapoport, 1995; Beckmann *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 2010].

Neben dem Sec61-Komplex befinden sich in der unmittelbaren Nähe zur naszierenden Kette und zum Ribosom weitere Proteine, deren Funktionen bislang weitestgehend unbekannt sind.

Das Membranprotein TRAM (*translocating chain-associated membrane protein*) erwies sich in Rekonstitutionsexperimenten als essentiell für einige Proteine, während andere auch in Abwesenheit von TRAM transloziert werden können [Görlich *et al.*, 1992b; Görlich & Rapoport, 1993; Voigt *et al.*, 1996; Tamborero *et al.*, 2011]. Der aus vier Untereinheiten gebildete membranständige Proteinkomplex TRAP (*translocon associated protein complex*) ist für die meisten Proteine nicht essentiell. Es wird eine Aufgabe bei der Rekrutierung weiterer Proteine des Translokons vermutet. So wurden neben 1:1 Stöchiometrien von TRAP- und Sec61-Komplexen auch Assemblierungen von zwei TRAP-Komplexen mit vier Sec61-Komplexen gefunden. Eine funktionelle Deutung dieser Oligomerisierung gibt es noch nicht [Hartmann *et al.*, 1993; Ménétret *et al.*, 2005, 2008; van den Berg *et al.*, 2004]. Auch das ribosomenassoziierte Membranprotein RAMP4/Serp1 ist nicht essentiell. Diskutiert wird eine Funktion in der Stabilisierung des Sec61-Komplexes bei ER-Stress, da es an Sec61 $\alpha$  und Sec61 $\beta$  bindet [Görlich & Rapoport, 1993; Yamaguchi *et al.*, 1999; Hori *et al.*, 2006].

Während die Kettenverlängerung wieder aufgenommen wird, kommt es zu einer Einführung der naszierenden Kette in den Kanal und zum Transport des entstehenden Proteins in das ER-Lumen (Abb. 1.1). Als treibende Kraft dient beim co-translationalen Transport nur die GTP-abhängige Elongation der Kette durch das Ribosom [Walter & Blobel, 1981a, b; Jungnickel & Rapoport, 1995]. Befindet sich im Verlauf der Translokation ein hydrophober Bereich eines integralen Membranproteins im Kanal, so öffnet sich der Sec61-Komplex aufgrund der Klappmuschelstruktur lateral und entlässt die zukünftige Transmembrandomäne in die Membran.

Hat die Polypeptidkette das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums erreicht, kommt es zur Prozessierung und Faltung der Proteine. Dabei wird meist die Signalsequenz durch den Signalpeptidasekomplex (SPC) abgetrennt [Evans *et al.*, 1986; Antonin *et al.*, 2000]. Viele Proteine besitzen darüber hinaus in ihrer Primärstruktur Signale zur luminalen N-Glykosylierung durch den Oligosaccharyltransferasekomplex (OST) [Dempski & Imperiali, 2002; Chavan *et al.*, 2005].

Das Schicksal der Ribosomen nach der vollendeten Translation ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Während man früher davon ausging, dass es nach der Termination zu einer Trennung der beiden Untereinheiten und zur vollständigen Ablösung von der Membran kommt, weisen aktuelle Daten darauf hin, dass beide Untereinheiten oder nur die große Untereinheit an der Membran verbleiben. An diesen Ribosomen ist eine erneute Initiation der Translation möglich. Die Ablösung des Ribosoms von der Membran erfolgt nur dann, wenn die austretende naszierende Kette nicht über ein Signal zum ER-Transport verfügt [Schaletzky & Rapoport, 2006; Potter *et al.*, 2001; Potter & Nicchitta, 2002].

Über diesen anerkannten Mechanismus hinaus wurde über einen zusätzlichen Einfluss weiterer Proteine (Sec62, Sec63, Kar2p/BiP) beim co-translationalen Proteintransport spekuliert [Brodsky *et al.*, 1995; Tyedmers *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2000; Müller *et al.*, 2010]. Die Funktionsweise der homologen Proteine in der Hefe ist bislang nur für den post-translationalen Transportweg in der Hefe belegt und wird im folgenden Abschnitt erläutert werden.

## 1.2 Die post-translationale Proteintranslokation in das Endoplasmatische Retikulum

Die post-translationale Translokation findet nach Abschluss der Proteinsynthese und in der Regel unabhängig vom *Signal Recognition Particle* (SRP) oder vom Ribosom statt. Während in Hefe durchgeführte Studien vermuten lassen, dass der Transport löslicher Proteine in das ER-Lumen der Eukaryonten einen Sec61-abhängigen Weg verwendet, wurde gezeigt, dass die post-translationale Insertion von Proteinen mit einem einzelnen C-terminalen Membrananker (*tail-anchored* Proteine) in die eukaryontische ER-Membran über den *Get-Pathway* verläuft.

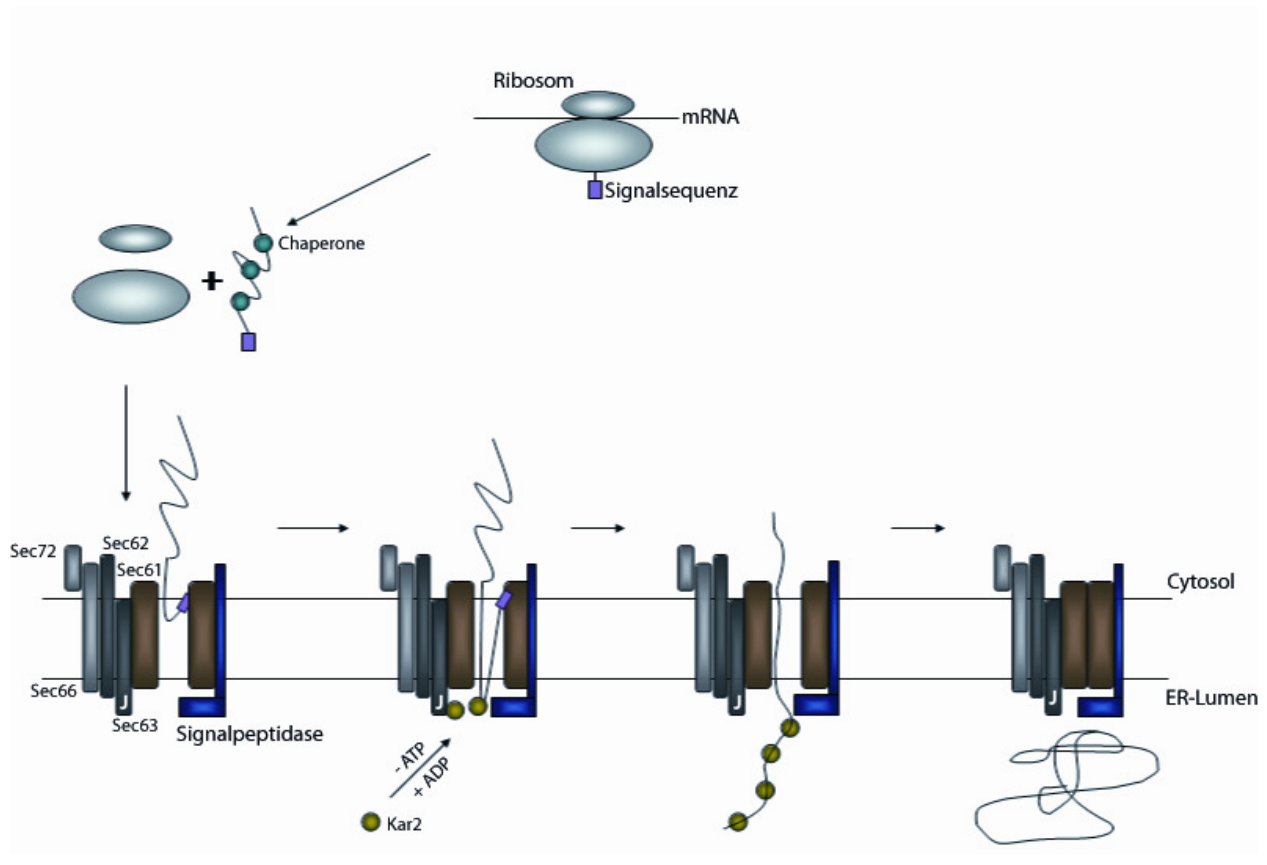
Bei den *tail-anchored* (TA) Proteinen befindet sich der hydrophobe Bereich des Membranankers am C-Terminus der Polypeptidkette, so dass das Insertionssignal erst nach der Termination der Translation und nach dem Zerfall des Ribosoms in seine Untereinheiten erkannt werden kann [Kutay *et al.*, 1993]. Eine co-translationale Insertion ist damit ausgeschlossen. Für die post-translationale Insertion dieser Proteine wurde ein Weg beschrieben, der in der Hefe als „*Get-Pathway*“ („*Guided entry of TA proteins*“) bezeichnet wird und der unabhängig von Sec61 $\alpha$  verläuft. Stattdessen wurde ein Get3 benanntes Protein gefunden, das spezifisch an die Transmembrandomänen von *tail-anchored* Proteinen bindet und diese zur Membran leitet. Unterstützt wird die Substratbindung an Get3 durch Get4 und Get5. An der Membran bindet Get3 im ersten Schritt an das membranständige Protein Get2. Nach der zusätzlichen Rekrutierung des Membranproteins Get1 löst sich Get3 unter ATP-Hydrolyse vom Substrat und vom Rezeptor ab. Unklar ist aber nach wie vor, ob die Insertion der TA-Proteine in die Membran spontan erfolgt oder ob eine proteinhaltige Transportmaschinerie existiert. Im Säuger konnten Homologe zu Get3 (TRC40/Asna-1) und Get1 (WRB) gefunden werden [Auld *et al.*, 2006; Stefanovic & Hegde, 2007; Schuldiner *et al.*, 2008; Rabu *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010; Suloway *et al.*, 2011; Mariappan *et al.*, 2011; Vilaridi *et al.*, 2011; Stefer *et al.*, 2011].

Der post-translationale Transportweg löslicher Proteine in das ER der Eukaryonten ist am besten bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Der in der Abb. 1.3 dargestellte

Mechanismus unterscheidet sich in der *Targeting*- und der Transportphase vom co-translationalen Weg.

Nach der vollendeten Translation werden die Proteine durch faltungshemmende Chaperone translokationskompetent gehalten [Deshaies *et al.*, 1988; Chirico *et al.*, 1988; Chirico, 1992].

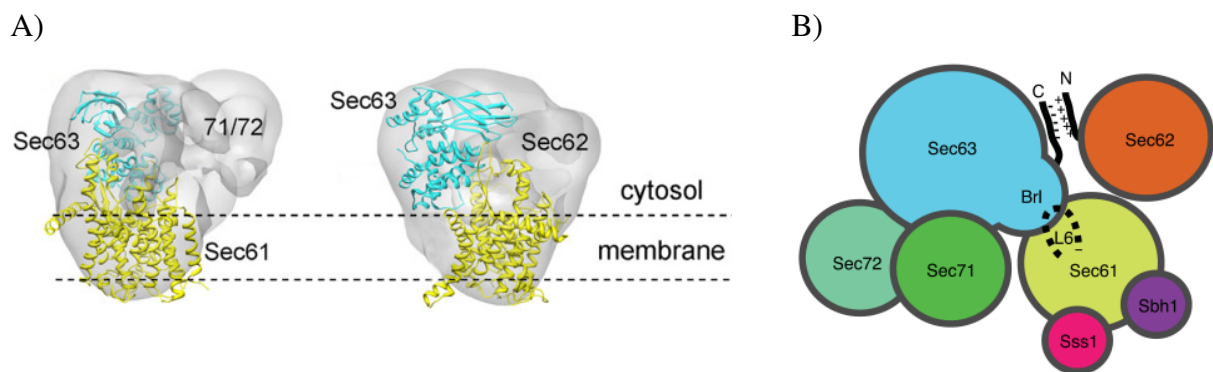
Über den Weg dieses Chaperone-Polypeptid-Komplexes aus dem Zytoplasma zur zytosolischen Seite des Translokons ist wenig bekannt. Die Interaktion der Signalsequenz mit dem Kanal erfolgt in der Hefe über den trimeren Sec61-Komplex und über Bestandteile des heterotetrameren Sec62/63-Komplexes, um den der kanalbildende Sec61-Komplex erweitert wird [Lyman & Schekman, 1997; Willer *et al.*, 2003]. Der entstehende heptamere Komplex wird als Sec-Komplex bezeichnet.



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung des post-translationalen Translokationsmechanismus der Hefe.** Nach der vollständigen Translation gelangt die durch Chaperone translokationskompetent gehaltene Polypeptidkette zum Translokons. Dort bindet sie an die Bestandteile des Sec-Komplexes (hier ist beispielhaft nur die Bindung an Sec61 dargestellt). Aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung gleitet die Polypeptidkette durch den Kanal. Bei Erreichen des Lumens verhindert das durch die J-Domäne von Sec63 rekrutierte Chaperon Kar2p ein Zurückgleiten der Kette. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis sich das Protein auf der luminalen Seite der ER-Membran befindet. Während der Translokation erfolgt in den meisten Fällen eine Abspaltung der Signalsequenz durch die Signalpeptidase. Proteine, die Erkennungssignale für N-Glykosylierungen tragen, werden zudem durch die Oligosaccharyltransferase prozessiert (nicht dargestellt).

Der Sec62/63-Komplex der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* umfasst die integralen Membranproteine Sec62p, Sec63p, Sec66p (ehemals als Sec71p bezeichnet) und das peripher auf der zytoplasmatischen Seite an Sec66p gebundene Sec72p [Deshaies & Schekman, 1987; Rothblatt *et al.*, 1989; Deshaies *et al.*, 1991; Feldheim *et al.*, 1993]. Sec62p durchspannt die ER-Membran zweimal, beide Termini befinden sich im Zytoplasma. Sec63p enthält drei Transmembrandomänen, der N-Terminus liegt im ER-Lumen, der C-Terminus im Zytoplasma. Bei Sec66p, das nur eine Transmembrandomäne besitzt, ist der N-Terminus im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Er ist zudem einfach glykosyliert.

Harada *et al.* [2011] gelang es kürzlich erstmals, die Struktur des heptameren Sec-Komplexes der Hefe kryoelektronenmikroskopisch mit einer Auflösung von 20Å abzubilden (Abb. 1.4, A).



**Abb. 1.4: Architektur des heptameren Sec-Komplexes der Hefe.** A) Die um 90° gegeneinander verdrehten Modelle zeigen den Aufbau des für den post-translationalen Transport benötigten Sec-Komplexes der Hefe bei einer Auflösung von ungefähr 20 Å. In die kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden Teile der Kristallstrukturen von Sec61 (gelb) und Sec63 (türkis) modelliert. B) Hypothetischer Aufbau des Sec-Komplexes. Sec61p bindet über den zytoplasmatischen Loop 6 (L6) an die Brl-Domäne von Sec63. Die Bindung von Sec62 an Sec63 erfolgt durch ionische Wechselwirkungen. Wie Sec66 (Sec71) und Sec72 an den Komplex assoziieren ist noch ungeklärt. Sec61p, Ssb1 und Sss1 sind homolog zu Sec61α, β bzw. γ im Säuger. Beide Abbildungen modifiziert nach Harada *et al.*, 2011.

Sec61p interagiert demnach über seinen sechsten zytoplasmatischen Loop (L6) mit einem als Brl-Domäne bezeichneten Bereich von Sec63p [Jermy *et al.*, 2006]. Dieses bindet wiederum durch ionische Wechselwirkungen mit seinem negativ geladenen C-Terminus an den positiv geladenen N-Terminus von Sec62p [Wittke *et al.*, 2000]. Die Mechanismen zur Assoziation von Sec66 (Sec71) und Sec72p konnten noch nicht geklärt werden.

Die Bindung der Signalsequenz an das Translokon erfolgt simultan durch Sec61α, Sec62p, Sec66p und Sec72p [Lyman & Schekman, 1997; Müsch *et al.*, 1992; Feldheim *et al.*, 1993, 1994]. Durch die Verknüpfung der Signalsequenz mit dem Kanal ist das N-terminale Ende der Polypeptidkette lokal fixiert und die zytoplasmatischen Chaperone lösen sich ab [Plath *et al.*, 1998;

Plath & Rapoport, 2000]. Aufgrund der passiven Brown'schen Molekularbewegung gleitet die Polypeptidkette durch den Translokationskanal. Die Rückwärtsbewegung wird dabei dadurch unterbunden, dass das luminaire Chaperon Kar2p im Abstand von circa 14 Aminosäureresten an die Kette bindet [Vogel *et al.*, 1990; Sanders *et al.*, 1992; Liebermeister *et al.*, 2001]. Auf diese Weise, die als „Molekulare Ratsche“ bezeichnet wird, kann das Protein nach und nach durch den Kanal transportiert werden. Die Rekrutierung und Aktivierung von Kar2p geschieht durch die J-Domäne im luminalen Bereich des Sec63p, die Homologien zum *Escherichia coli*-Chaperon DnaJ aufweist [Sadler *et al.*, 1989]. Im ATP-Zustand ist die Proteinbindetasche des Chaperons geöffnet, im ADP-gebundenen Zustand ist sie geschlossen [Misselwitz *et al.*, 1998, 1999; Matlack *et al.*, 1999].

Rekonstituierungsexperimente in der Hefe, bei denen der trimere und der tetramere Komplex getrennt auf die Fähigkeit zum post-translationalen Transport getestet wurden, zeigten, dass die Komplexe nur gemeinsam als heptamerer Komplex und nur unter Zugabe von ATP und dem luminalen Chaperon Kar2p post-translational zur Translokation fähig sind [Panzner *et al.*, 1995]. Mutationen von Sec66 und Sec72 sind nicht letal, resultieren aber in Wachstumsdefekten. Dies deutet darauf hin, dass Sec66 und Sec72 keine essentiellen Aufgaben besitzen [Fang & Green, 1994].

Ebenso wie im co-translationalen Transport erfahren die Proteine auch beim post-translationalen Transport eine Prozessierung durch die Signalpeptidase (Entfernung der Signalsequenz) und ggf. die Oligosaccharyltransferase (N-Glykosylierungen) im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums.

Im Säuger wurde der post-translational Transport bisher nur an heterologen Substraten aus dem Frosch (GLa), Insekten (Melittin, Cecropin) und der Hefe (pp $\alpha$ -Faktor) untersucht [Zimmermann & Mollay, 1986; Schlenstedt & Zimmermann, 1987; Müller & Zimmermann, 1988; Garcia & Walter, 1988; Zimmermann *et al.*, 1990a; Grau, 2003]. Aus dem Säuger stammende Substratproteine konnten noch nicht nachgewiesen werden. Studien über die für den post-translationalen Transport des Säugers notwendigen Proteine oder Translokationsmaschinerien existieren nicht. Es wurde lediglich gezeigt, dass im Säuger zu Sec62p, Sec63p und Kar2p homologe Proteine (Sec62, Sec63, BiP) vorhanden sind. Allerdings besitzen diese vermutlich eine unterstützende Funktion in der co-translationalen Proteintranslokation in das Endoplasmatische Retikulum, weshalb die Existenz dieser Proteine nicht gleichbedeutend mit der Existenz eines vergleichbaren post-translationalen Transportwegs ist. Die funktionellen Mechanismen von Sec63 und BiP im Säuger gleichen ihren Hefehomologen. Sec62 kann da-

rüber hinaus als zusätzlicher Ribosomenrezeptor dienen, was in der Hefe ausgeschlossen wurde [Rose *et al.*, 1989; Noel & Cartwright, 1994; Brodsky *et al.*, 1995; Daimon *et al.*, 1997; Skowronek, 1999; Meyer *et al.*, 2000; Tyedmers *et al.*, 2000, 2003; Müller *et al.*, 2010]. Zu den nicht-essentiellen Bestandteilen des tetrameren Komplexes, Sec66p und Sec72p, konnten bislang keine Homologe gefunden werden.

## 2 Zielsetzung

Die Translokation von Proteinen über oder in die Membran des Endoplasmatischen Retikulums kann in niederen Eukaryonten wie der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* entweder in Abhängigkeit von der Translation (co-translational) oder unabhängig von der Elongation der naszierenden Polypeptidkette (post-translational) stattfinden. Im Säuger ist hingegen nur der co-translational Transport sekretorischer Proteine in das Endoplasmatische Retikulum hinreichend untersucht worden. Es konnte bislang kein Nachweis erbracht werden, dass auch im Säuger Proteine vorhanden sind, die post-translational in das Lumen des ERs transloziert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte daher die Frage nach der Existenz eines post-translationalen Transportwegs im Säuger durch *in vitro* Experimente beantwortet werden. Dafür sollten Substratproteine aus dem Säuger gefunden werden, da für diese Proteine naheliegt, dass sie auch *in vivo* diesen Weg nehmen oder nehmen können.

Sofern ein post-translationaler Transportweg gezeigt werden kann, sollte dieser charakterisiert werden. Erfolgt die Translokation spontan oder benötigt der Transport ein membranständiges Translokationssystem? Ist er abhängig von Sec61 und ähnelt er damit trotz einiger fehlender Komponenten des heptameren Sec-Komplexes eventuell dem Mechanismus der Hefe?

Neben der Charakterisierung des gegebenenfalls zur post-translationalen Translokation genutzten Wegs sollten die Substratproteine genauer betrachtet werden. Durch welche Eigenschaften sind sie zur post-translationalen Translokation geeignet? Und falls den Proteinen neben dem post-translationalen Transport auch der co-translational Transportweg offen stehen sollte: Wodurch entscheidet sich, welcher der beiden Wege eingeschlagen wird? Welchen Einfluss besitzt die Signalsequenz auf diese Entscheidung?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Plasmide

Alle pGEM4-Plasmide verfügen über eine  $\beta$ -Globin-UTR um die Translation im Retikulozyten-Lysat zu verbessern. Bei der angegebenen Größe handelt es sich um das vollständig translatierte Proteine mit Anhängen und der Signalsequenz.

#### Ausgangsplasmide

Plasmidbezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pGEM4-ppL 229 AS / 25,8 kDa	kodierende Sequenz für bovines präpro-Laktin, Amp <sup>R</sup>	AG Hartmann/ Kalies
pGEM4-pp $\alpha$ F-6His 175 AS / 19,8 kDa	kodierende Sequenz für das Hefehormon präpro- $\alpha$ -Faktor mit 6fach Histidin-Tag, Amp <sup>R</sup>	AG Hartmann/ Kalies
pGEM4-Histatin 1-3Met 60 AS / 7,4 kDa	kodierende Sequenz für humanes Histatin 1 mit 3fach Methionin-Anhang, Amp <sup>R</sup>	AG Hartmann/ Kalies
pGEM4-Histatin 3-3Met 54 AS / 6,5 kDa	kodierende Sequenz für humanes Histatin 3 mit 3fach Methionin-Anhang, Amp <sup>R</sup>	AG Hartmann/ Kalies
pGEM4-Statherin-3Met 65 AS / 7,7 kDa	kodierende Sequenz für humanes Statherin mit 3fach Methionin-Anhang, Amp <sup>R</sup>	AG Hartmann/ Kalies
pGEM4-GLa 64 AS / 6,8 kDa	kodierende Sequenz für GLa aus <i>Xenopus laevis</i> , Amp <sup>R</sup>	AG Hartmann/ Kalies
pGEM4- $\alpha$ D6 100 AS / 11,0 kDa	kodierende Sequenz für humanes $\alpha$ -Defensin 6, Amp <sup>R</sup>	AG Hartmann/ Kalies
pGEM4- $\beta$ D2 64 AS / 7,0 kDa	kodierende Sequenz für humanes $\beta$ -Defensin 2, Amp <sup>R</sup>	AG Hartmann/ Kalies
pGEM4- $\beta$ D6 65 AS / 7,4 kDa	kodierende Sequenz für humanes $\beta$ -Defensin 6, Amp <sup>R</sup>	AG Hartmann/ Kalies

*Verkürzte Proteine*

<b>Plasmidbezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft</b>
pGEM4-His3-34mer-3Met 34 AS / 4,0 kDa	kodierende Sequenz für humanes Histatin 3, das auf die Aminosäuren 1-31 verkürzt wurde, 3fach Methionin-Anhang, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-His3-38mer-3Met 38 AS / 4,5 kDa	kodierende Sequenz für humanes Histatin 3, das auf die Aminosäuren 1-35 verkürzt und mit 3fach Methionin-Anhang versehen wurde, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-His3-42mer-3Met 42 AS / 5,0 kDa	kodierende Sequenz für humanes Histatin 3, das auf die Aminosäuren 1-39 verkürzt und mit 3fach Methionin-Anhang versehen wurde, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-His3-46mer-3Met 46 AS / 5,5 kDa	kodierende Sequenz für humanes Histatin 3, das auf die Aminosäuren 1-43 verkürzt und mit 3fach Methionin-Anhang versehen wurde, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-His3-50mer-3Met 50 AS / 6,0 kDa	kodierende Sequenz für humanes Histatin 3, das auf die Aminosäuren 1-47 verkürzt und mit 3fach Methionin-Anhang versehen wurde, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-Stat-34mer-3Met 34 AS / 3,9 kDa	kodierende Sequenz für humanes Statherin, das auf die Aminosäuren 1-31 verkürzt wurde, 3fach Methionin-Anhang, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-Stat-38mer-3Met 38 AS / 4,3 kDa	kodierende Sequenz für humanes Statherin, das auf die Aminosäuren 1-35 verkürzt wurde, 3fach Methionin-Anhang, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-Stat-42mer-3Met 42 AS / 4,8 kDa	kodierende Sequenz für humanes Statherin, das auf die Aminosäuren 1-39 verkürzt wurde, 3fach Methionin-Anhang, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-Stat-46mer-3Met 46 AS / 5,3 kDa	kodierende Sequenz für humanes Statherin, das auf die Aminosäuren 1-43 verkürzt wurde, 3fach Methionin-Anhang, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-Stat-50mer-3Met 50 AS / 5,8 kDa	kodierende Sequenz für humanes Statherin, das auf die Aminosäuren 1-47 verkürzt wurde, 3fach Methionin-Anhang, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit

<b>Plasmidbezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft</b>
pGEM4-Stat-54mer-3Met 54 AS / 6,2 kDa	kodierende Sequenz für humanes Statherin, das auf die Aminosäuren 1-51 verkürzt wurde, 3fach Methionin-Anhang, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-Stat-57mer-3Met 57 AS / 6,6 kDa	kodierende Sequenz für humanes Statherin, das auf die Aminosäuren 1-54 verkürzt wurde, 3fach Methionin-Anhang, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-Stat-61mer-3Met 61 AS / 7,2 kDa	kodierende Sequenz für humanes Statherin, das auf die Aminosäuren 1-58 verkürzt wurde, 3fach Methionin-Anhang, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit

*Verlängerte Proteine*

<b>Plasmidbezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft</b>
pGEM4-His3-2rT-3Met 86 AS / 10,6 kDa	kodierende Sequenz für humanes Histatin 3 mit einfacher Signalsequenz und doppeltem reifen Proteinteil, 3fach Methionin-Anhang Ct, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-His3-3rT-3Met 118 AS / 14,6 kDa	kodierende Sequenz für humanes Histatin 3 mit einfacher Signalsequenz und dreifachem reifen Proteinteil, 3fach Methionin-Anhang Ct, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-His3-4rT-3Met 150 AS / 18,7 kDa	kodierende Sequenz für humanes Histatin 3 mit einfacher Signalsequenz und vierfachem reifen Proteinteil, 3fach Methionin-Anhang Ct, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-His3-2rT-6Met 89 AS / 11,0 kDa	kodierende Sequenz für humanes Histatin 3 mit einfacher Signalsequenz und doppeltem reifen Proteinteil, mit je 3fach Methionin-Anhang hinter den reifen Proteinteilen, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-His3-3rT-9Met 124 AS / 15,4 kDa	kodierende Sequenz für humanes Histatin 3 mit einfacher Signalsequenz und dreifachem reifen Proteinteil, mit je 3fach Methionin-Anhang hinter den reifen Proteinteilen, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-His3-4rT-12Met 159 AS / 19,9 kDa	kodierende Sequenz für humanes Histatin 3 mit einfacher Signalsequenz und vierfachem reifen Proteinteil, mit je 3fach Methionin-Anhang hinter den reifen Proteinteilen, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit

<b>Plasmidbezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft</b>
pGEM4-Stat-2rT-6Met 110 AS / 13,2 kDa	kodierende Sequenz für humanes Statherin mit einfacher Signalsequenz und doppeltem reifen Proteinteil, mit je 3fach Methionin-Anhang hinter den reifen Proteinteilen, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-Stat-3rT-9Met 155 AS / 18,7 kDa	kodierende Sequenz für humanes Statherin mit einfacher Signalsequenz und dreifachem reifen Proteinteil, mit je 3fach Methionin-Anhang hinter den reifen Proteinteilen, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
pGEM4-Stat-4rT-12Met 200 AS / 24,1 kDa	kodierende Sequenz für humanes Statherin mit einfacher Signalsequenz und vierfachem reifen Proteinteil, mit je 3fach Methionin-Anhang hinter den reifen Proteinteilen, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit

*Austausch von Signalsequenzen und reifen Proteinabschnitten*

<b>Plasmidbezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft</b>
pGEM4-ssHis3_mpppL 218 AS / 24,7 kDa	kodierende Sequenz für ein Konstrukt aus der Signalsequenz von Histatin 3 und dem reifen Proteinteil von präpro-Laktin, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit, Bachelorarbeit Ulrike Königsmark
pGEM4-ssHis3_mp $\alpha$ F-6His 172 AS / 19,7 kDa	kodierende Sequenz für ein Konstrukt aus der Signalsequenz von Histatin 3 und dem reifen Proteinteil von präpro- $\alpha$ -Faktor mit 6fach His-Tag, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit, Bachelorarbeit Ulrike Königsmark
pGEM4-ssppL_mp $\alpha$ F-6His 183 AS / 20,7 kDa	kodierende Sequenz für ein Konstrukt aus der Signalsequenz von präpro-Laktin und dem reifen Proteinteil von präpro- $\alpha$ -Faktor mit 6fach His-Tag, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit, Bachelorarbeit Ulrike Königsmark
pGEM4-ssppL_mpHis3-3Met 65 AS / 7,6 kDa	kodierende Sequenz für ein Konstrukt aus der Signalsequenz von präpro-Laktin und dem reifen Proteinteil von Histatin 3 mit 3fach Methionin-Anhang, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit, Bachelorarbeit Ulrike Königsmark
pGEM4-ss $\alpha$ F_mpppL 221 AS / 24,9 kDa	kodierende Sequenz für ein Konstrukt aus der Signalsequenz von präpro- $\alpha$ -Faktor und dem reifen Proteinteil von präpro-Laktin, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit, Bachelorarbeit Ulrike Königsmark

pGEM4-ss $\alpha$ F_mpHis3-3Met 57 AS / 6,7 kDa	kodierende Sequenz für ein Konstrukt aus der Signalsequenz von präpro- $\alpha$ -Faktor und dem reifen Proteinteil von Histatin 3 mit 3fach Methionin-Anhang, Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit, Bachelorarbeit Ulrike Königsmark
--	--	---

### 3.1.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden durch die Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert und mit dem HPSF-Verfahren gereinigt.

#### *Erzeugung verkürzter Konstrukte*

Oligonukleotidname	Sequenz (5' → 3')
PvuI fw	GTGCTGCCATAACCATGAGTG
His3-34 rev	TCTTTTATACCCATGATGTCTC
His3-38 rev	TTCATGGAATTTTCTTTTATACCC
His3-42 rev	TGAATGATGCTTTTCATGG
His3-46 rev	ATAGCCTCGATGTGAATGATGC
His3-50 rev	ATAATTTGATCTATAGCCTCGATG
Stat-34 rev	TCCAATTCTACGCAAAAATTTCTC
Stat-38 rev	ATAACCGAATCTTCCAATTCTACGC
Stat-42 rev	AGGGCCATACCCATAACCG
Stat-46 rev	AACTGGCTGATAAGGGCCATACCC
Stat-50 rev	TGGTTGTTCTGGAAGTGGC
Stat-54 rev	TTGTGGGTATAGTGGTTGTTCTGG
Stat-57 rev	TTGGTATGGTTGTGGGTATAGTGG
Stat-61 rev	TTGGTATTGTGGTTGGTATGG
3Met fw (TAA-Stop)	ATGATGATGTGATGGTACCGAGC
PvuI rev	TCGGTCCTCCGATCGTTGTC

#### *Erzeugung verlängerter Konstrukte*

Oligonukleotidname	Sequenz (5' → 3')
His3-mp fw	GATTCACATGCAAAGAGACATC
Stat-mp fw	GATTCACATGCAAAGAGACATC
PvuI rev	TCGGTCCTCCGATCGTTGTC
PvuI fw	GTGCTGCCATAACCATGAGTG

His3-Stop rev	ATTGTCATACAGATAATTTG
His3-Stop-3Met rev	CATCATCATATTGTCATACAG
Stat-Stop rev	ATTGTCATACAGATAATTTG
Stat-Stop-3Met rev	CATCATCATAAAGGTATATTGTTGG

*Erzeugung der Konstrukte aus Signalsequenzen und reifem Teil*

<b>Oligonukleotidname</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
mp- $\alpha$ F fw	AACACTACAACAGAAGATGAAAC
mp-His3 fw	GATTCACATGCAAAGAGACATC
mp-ppL fw	ACCCCGTCTGTCCCAATG
PvuI rev	TCGGTCCTCCGATCGTTGTC
PvuI fw	GTGCTGCCATAACCATGAGTG
ss- $\alpha$ F rev	GACTGGAGCAGCTAATG
ss-His3 rev	AGCTCCAGTCATGGAAAG
ss-ppL rev	GGAGACCACACCCTGGCACAAG

### *3.1.3 Chemikalien, Enzyme und Antikörper*

<sup>35</sup> S-Cystein (370 MBq/ml, >37 TBq/mmol)	Hartmann Analytik
<sup>35</sup> S-Methionin (370 MBq/ml, >37 TBq/mmol)	Hartmann Analytik
Antikörper gegen Sec61 $\alpha$ (KEQSEVGSMGALLF) (aus Kaninchen)	AG Hartmann
Bacto-Agar	BD
Bacto-Pepton	BD
BSA	New England Biolabs
dNTPs	Roche
ECL-Reagenzien	PerkinElmer
Eeyarestatin I (ES1)	Stephen High, Faculty of Life Sciences, University of Manchester
GeneRuler™ DNA Ladders 1kb und 100bp plus	Fermentas
Hefeextrakt	BD
PAGE Ruler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase (inkl. Puffer GC und Puffer HF)	New England Biolabs

Polyacrylamid (29:1)	Amresco
Proteinase K	Roche
Restriktionsendonukleasen (PvuI, EcoRI, NheI, PstI)	New England Biolabs
Retikulozytenlysate aus Kaninchenblut (nukleasebehandelt) (inkl. Aminosäure-Mix ohne Methionin bzw. Cystein)	Promega
RNase-Inhibitor RNasin	Promega
T4 DNA Ligase	Fermentas
T4 Polynukleotidkinase (inkl. Phosphorylierungspuffer)	Fermentas
T7 RNA Polymerase (inkl. Transkriptionspuffer)	Promega
Trypton	BD
Tween-20	Merck

Alle übrigen, an dieser Stelle nicht aufgeführten Chemikalien wurden bei Sigma und Roth bestellt.

### ***3.1.4 Puffer und Medien***

#### **Anodenpuffer für die Tricingelektrophorese (10X)**

2,1 M Tris. pH 8,9 (RT)

#### **Blotting Puffer nach Towbin [1979]**

Elektrophoresepuffer für Tris-Glycin-Gele, 20% (v/v) Methanol

#### **DNA-Ladepuffer (5X)**

60% (w/v) Saccharose in 1X TAE-Puffer, Bromphenolblau

#### **Elektrophoresepuffer für Tris-Glycin-Gele nach Lämmli [1970]**

250 mM Tris, 2 M Glycin, 1% (w/v) SDS; der pH-Wert wurde nicht eingestellt.

#### **Glukose**

20% (w/v) Glukose. Die Lösung wurde sterilfiltriert.

#### **Homogenisierungspuffer für Hefemikrosomen (5X)**

250 mM Hepes, 50% (v/v) Glycerin, 125 mM Kaliumacetat, 25 mM Magnesiumacetat, 5 mM EDTA; pH 7,6 (4°C)

#### **Kathodenpuffer für die Tricingelektrophorese (10X)**

1 M Tris, 1 M Tricin, 1% (w/v) SDS; pH 8,25 (RT)

**Kissenpuffer 1 für EKRM (KP1<sub>EKRM</sub>)**

500 mM Saccharose, 25 mM EDTA, 250 mM Saccharose, 50 mM Hepes, 1 mM DTT; pH 7,6 (4°C)

**Kissenpuffer für Säugermikrosomen (KP<sub>RM</sub>)**

50 mM Hepes, 50 mM Kaliumacetat, 6 mM Magnesiumacetat, 1 mM EDTA, 1,6 M Saccharose, 1 mM DTT, 1X PI-Mix, 1 µg/ml Elastatinal; pH 7,6 (4°C); PI-Mix und Elastatinal wurden frisch zugegeben

**Kissenpuffer 2 für EKRM (KP2<sub>EKRM</sub>)**

500 mM Saccharose, 250 mM Saccharose, 50 mM Hepes, 1 mM DTT; pH 7,6 (4°C)

**LB-Agarplatten**

LB-Medium, 2% (w/v) Bacto-Agar; die Lösung wurde autoklaviert.

**Lysogeny Broth (LB) – Medium**

1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl; das Medium wurde autoklaviert.

**Membranpuffer (MP)**

250 mM Saccharose, 50 mM Hepes, 1 mM DTT; pH 7,6 (4°C)

**Protease-Inhibitoren (PI)-Mix (1000X)**

5 mg/ml Pepstatin, 4 mg/ml Chymostatin, 10 mg/ml Aprotinin, 10 mg/ml Leupeptin; die Verdünnung erfolgte in DMSO

**Proteasepuffer**

50 mM Hepes, 250 mM Saccharose, 140 mM Kaliumacetat, 3 mM Magnesiumacetat; pH 7,6 (4°C)

**Puffer A für Säugermikrosomen (A<sub>RM</sub>)**

50 mM Hepes, 50 mM Kaliumacetat, 6 mM Magnesiumacetat, 1 mM EDTA, 250 mM Saccharose, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 1X PI-Mix, 1 µg/ml Elastatinal; pH 7,6 (4°C); PI-Mix und Elastatinal wurden frisch zugegeben.

**SDS-Probenpuffer (2X)**

120 mM Tris, 4% (w/v) SDS, 20% Glycerin, 100 mM DTT, Bromphenolblau; pH 6,8 (4°C)

**TAE-Puffer (50X)**

2 M Tris, 50 mM EDTA, 5,7% (v/v) Eisessig; pH 8,5 (RT)

**TBT (10X)**

500 mM Tris, 1,5 M Natriumchlorid, 1% (w/v) Tween-20; pH 7,5 (4°C)

**YPD-Agarplatten**

YP-Medium mit 2% (w/v) Bacto-Agar; die Lösung wurde autoklaviert, vor dem Gießen der Platten wurden 2% (w/v) Glukose zugegeben

**YPD-Medium**

YP-Medium, 2% (w/v) Glukose

**YP-Medium**

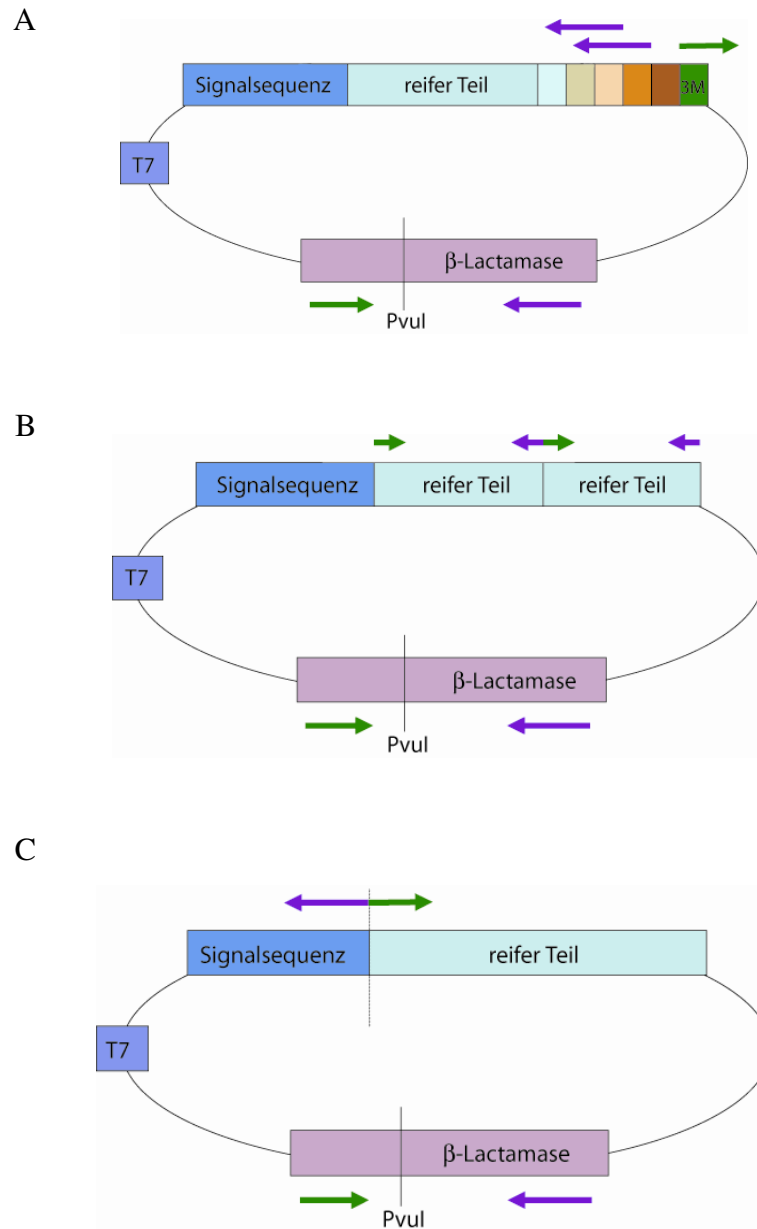
1% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Bacto-Pepton; das Medium wurde autoklaviert

## 3.2 Methoden

Sofern nicht anders angegeben, fand die Durchführung auf Eis statt, Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4°C. Bei dem verwendeten Wasser handelt es sich um vollentsalztes, zweifach destilliertes und autoklaviertes Wasser.

### 3.2.1 Klonierungsstrategie

Die Klonierung zur Veränderung der Ausgangsplasmide erfolgte mit Hilfe einer „Halbvektor-Strategie“. Einen Überblick über die Lage der Oligonukleotide (vgl. 3.1.2) liefert die Abb. 3.1. Die Oligonukleotide (*Primer*, Darstellung als Pfeil) für die PCR wurden so gewählt, dass ein *forward Primer* (grün) an der Seite begann, die von der C-terminalen Seite des kodierten Proteins erhalten bleiben sollte und die DNA in 3'-Richtung vervielfältigte. Der andere *Primer* (*reverse*, violett) bestimmte, welche Bestandteile des Proteins auf der N-terminalen Seite erhalten bleiben sollten, die Vervielfältigung erfolgte in Richtung des 5'-Endes der kodierten Sequenz. Die beiden anderen *Primer* wurden so gewählt, dass sich die entstehenden PCR-Fragmente im Bereich der  $\beta$ -Lactamasesequenz überlagerten (jeweils farblich gleiche Pfeile). Zur Vervielfältigung wurde eine modifizierte *Pfu*-Polymerase verwendet, die glatte Enden liefert. Beide Fragmente wurden mit *PvuI* verdaut, einem Enzym, dessen Restriktionsschnittstelle sich in der  $\beta$ -Lactamasesequenz befindet. Dadurch entstand eine Seite des PCR-Fragments mit einem überstehenden Ende im Bereich der  $\beta$ -Lactamase, während die andere Seite durch die PCR ein glattes Ende hat.



**Abb. 3.1: Schema der „Halbvektorstrategie“ zur Klonierung.** Die Grafik zeigt die Lage der verwendeten *Primer* (Pfeile) an, es wurden jeweils die Oligonukleotide gleicher Farbe kombiniert. A) zeigt die Verkürzung des Proteins, ein *Primer* wurde in Schritten zu je 4 Aminosäuren in Richtung des N-Terminus verschoben. Durch den grünen Kasten sind die drei zusätzlichen Methioninreste (3M) dargestellt. Die in B) gezeigte Klonierung wurde zur Vervielfältigung des reifen Teils eines Proteins verwendet. Der Ausgangsvektor diente als Ausgangspunkt für die Verdopplung des reifen Teils. Die verdoppelte Variante wurde als Grundlage für die Erzeugung von Varianten mit drei bzw. vier reifen Teilen verwendet. Mit der in C) gezeigten Lage der Oligonukleotide konnten die Signalsequenz (violetter Pfeil) und der reife Teil eines Proteins (grüner Pfeil) getrennt vervielfältigt werden. Da alle Proteine im gleichen Vektor kodiert vorlagen, können die erzeugten „Halbvektoren“ untereinander vertauscht werden. „T7“ bezeichnet den zur *in vitro* Transkription verwendeten Promotor.

Durch diese unterschiedlichen Endabschnitte ist die korrekte Orientierung bei der Ligation beider Halbvektoren erleichtert. Ligationsprodukte mit falscher Orientierung verfügen außer-

dem nicht über eine vollständige  $\beta$ -Lactamasesequenz, die für die Ampicillinresistenz notwendig ist. Daher können nach einer Selektion auf Ampicillinplatten nur Klone wachsen, die in der Ligation korrekt orientiert waren.

### ***3.2.2 Polymerasekettenreaktion***

Polymerasekettenreaktionen (PCR) wurden in Anlehnung an das Herstellerprotokoll mit der Phusion<sup>TM</sup> High Fidelity DNA Polymerase im Puffer GC des Herstellers durchgeführt. Es wurden 4 ng/ $\mu$ l Plasmid-DNA eingesetzt, die *Annealing*-Temperatur, bei der die Oligonukleotide an die DNA binden, lag zwischen 50 und 55°C. Zur Vervielfältigung des PCR-Produkts mit dem *PCR Sprint Thermal Cycler* (Thermo) wurden 25-32 Zyklen durchlaufen.

Die Kontrolle und Quantifizierung der entstandenen Produkte erfolgte durch Auftrennung im Agarosegel und dem Vergleich mit einem Größenstandard. Danach wurden die Reaktionen mit dem NucleoSpin Extract II Kit nach Herstellerangaben aus der Lösung aufgereinigt, die Elution erfolgte mit Wasser. Abschließend wurden die Produkte mit PvuI verdaut und mit dem NucleoSpin Extract II Kit aus dem Agarosegel aufgereinigt.

### ***3.2.3 Endonukleaseverdau***

Für den Restriktionsverdau mit Endonukleasen wurden die Enzyme mit einer Konzentration von ca. 8 U/ $\mu$ g DNA eingesetzt. Zusätzlich wurde mitgelieferter Puffer und BSA nach Herstellerangaben zugefügt. Die Inkubation dauerte mindestens zwei Stunden bei 37°C.

### ***3.2.4 Phosphorylierung***

Da die in der PCR mit der Phusion<sup>TM</sup> High Fidelity DNA Polymerase entstehenden Fragmente kein freies 5'-Phosphat besitzen, wurde dieses in einer Reaktion mit der T4 Polynukleotidkinase hinzugefügt. Dabei wurden in einem 20  $\mu$ l Ansatz 10 U des Enzyms und ca. 100 ng der geschnittenen DNA zugegeben. Die DNA-Konzentration wurde zuvor anhand von Agarosegelen abgeschätzt. Die Verwendung der Kinase erfolgte im Puffer A des Herstellers unter Zugabe von 1 mM ATP. Nach einer Inkubation von 20 min bei 37°C wurde das Enzym für 10 min bei 75°C inaktiviert.

### ***3.2.5 Ligation***

Je 6  $\mu$ l der Phosphorylierungsansätze (entspricht ungefähr 60 ng DNA je Halbvektor) wurden gemischt und mit 500 CEU *Units* T4 DNA Ligase versetzt. Die Reaktion erfolgte im Phosphorylierungspuffer über Nacht bei 16°C und 800 rpm im Schüttler.

### ***3.2.6 Transformation und Sequenzierung***

Die Transformation erfolgte in 100 µl chemokompetenter *E. coli* Zellen (XL1-Blue) mittels eines Temperaturschocks von 42°C für eine Minute, der von zwei Phasen von jeweils einer Minute Dauer auf Eis eingefasst wurde. Es wurden 5 µl des Ligationsansatzes eingesetzt. Zunächst wurde das Reaktionsgefäß mit 900 µl LB-Medium aufgefüllt und für eine Stunde bei 37°C und 800 rpm im Schüttler vorinkubiert, dann wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten mit 0,1 mg/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

Nach der Klonierung wurde die Plasmid-DNA einzelner Klone aufgereinigt und durch einen Doppelverdau mit EcoRI und XhoI auf das korrekte Produkt kontrolliert. Die abschließende Kontrolle erfolgte mit Hilfe der Sequenzierung durch die GATC Biotech AG.

### ***3.2.7 Übernachtskulturen, Glycerinstocks, Plasmidpräparation***

Für Flüssigkulturen wurde mit 0,1 mg/ml Ampicillin versetztes LB-Medium mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte oder einer sehr geringen Menge (ca. 3µl) eines Glycerinstocks angeimpft und die Kultur über Nacht im Schüttelinkubator bei 180 rpm und 37°C wachsen gelassen. Zur Konservierung von Kulturen wurde etwa 1 ml der Kultur mit Glycerinlösung vermischt, so dass die Endkonzentration 15% (w/v) Glycerin betrug. Die *Stocks* wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Gewinnung von Plasmiden erfolgte maßstabsabhängig über das NucleoSpin Plasmid Kit (Mini) von Macherey-Nagel oder das JetStar Plasmid Purification Kit (Midi) von Genomed nach Herstellerangaben. Die Elution bei Mini-Präparationen erfolgte in Wasser. Midi-Präparationen wurden mit 0,7 Volumen Propanol gefällt und die *Pellets* nach der Sedimentation in Wasser aufgenommen. Quantifiziert wurden die Plasmide durch eine Messung der optischen Dichte bei 260nm. Eine OD<sub>260</sub> von 1 bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht 50 µg/ml DNA.

### ***3.2.8 Agarosegelelektrophorese***

DNA- und RNA-Proben wurden in Agarosegelen mit verschiedenen Agarosekonzentrationen (0,8-3%, w/v, in 1X TAE-Puffer) und einer Ethidiumbromidkonzentration von 1 µg/ml aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1X TAE-Puffer, die angelegte Spannung lag zwischen 80 V und 120 V. Die Visualisierung der durch Ethidiumbromid gefärbten Nukleinsäuren erfolgte im UV-Licht bei 312 nm mit dem Gel Imager der Firma INTAS.

### ***3.2.9 Transkription, Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung***

Vor der Transkription wurden die Plasmide zum Zweck der erleichterten Transkriptionsreaktion mit EcoRI, NheI oder PstI linearisiert.

Der *in vitro* Transkriptionsansatz umfasste 1 µg linearisierte Plasmid-DNA, 1X Transkriptionspuffer (mitgeliefert), 0,2 mg/ml BSA, 100 U RNasin, je 0,5 mM rNTPs, 19 U T7 RNA Polymerase und 10 mM DTT. Die absoluten Mengenangaben beziehen sich auf einen 50 µl Ansatz. Die Inkubation erfolgte für 4 Stunden bei 37°C, anderthalb Stunden nach Beginn wurden weitere 19 U RNA Polymerase und je 0,5 mM rNTPs hinzugefügt.

Die erhaltene mRNA wurde anschließend durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Hierzu wurde der Transkriptionsansatz mit Wasser auf 200 µl aufgefüllt. Im ersten Schritt wurde 1 Volumen (200 µl) Phenol zugegeben, sanft gemischt und die Phasen für 5 min bei 14.000 rpm bei RT in der Eppendorf-Tischzentrifuge 5415C getrennt. Die untere (organische) Schicht wurde verworfen und der Vorgang mit einem Gemisch aus ½ Volumen Phenol und ½ Volumen Chloroform wiederholt. Anschließend wurde die Lösung mit 1 Volumen Chloroform extrahiert und die obere (wässrige) Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Abschließend wurde die mRNA präzipitiert. Dazu wurden 0,1 Volumen Natriumacetat (3M, pH 5,1) zugesetzt und mit insgesamt 3,3 Volumen kaltem Ethanol (96%) auf Eis gefällt. Nach der Sedimentation der mRNA für 45 min bei 14.000 rpm in der Eppendorf-Kühlzentrifuge 5417R wurde das *Pellet* in Wasser resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### ***3.2.10 Translation, Translokation und Proteaseassay***

Ein *in vitro* Translationsansatz (10 µl) enthielt 6 µl Retikulozyten-Lysat aus Kaninchen, 0,2 µl des mitgelieferten Aminosäure-Mixes ohne Methionin (je 1 mM Ausgangskonzentration) und 0,3 µl <sup>35</sup>S-Methionin. Anstelle von Methionin-freiem Aminosäure-Mix und <sup>35</sup>S-Methionin wurden für die Defensine Cystein-freier Mix (mitgeliefert) und <sup>35</sup>S-Cystein verwendet. Die benötigte mRNA-Konzentration wurde für jedes Transkript experimentell bestimmt und lag zwischen 0,5 und 1 µl.

Das Retikulozyten-Lysat wurde vor Verwendung für 10 min bei 14.000 rpm in der Eppendorf-Kühlzentrifuge 5417R geklärt. Bei co-translationalen Translokationsansätzen wurde zusätzlich 1 µl Mikrosomen (0,3 eq/µl in MP) zugegeben. Ein Äquivalent (eq) Mikrosomen ist definiert als die Membranmenge, die bei 280 nm eine optische Dichte von 50 besitzt [Walter *et al.*, 1981]. Die Ansätze wurden bei 25°C für 45 min inkubiert.

Zur Erzielung post-translationaler Bedingungen für die Translokation wurde dem Translationsansatz nach der Inkubation 1 mM Cycloheximid zugesetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Teilweise wurden nach der Inhibition zusätzlich die Ribosomen abzentrifugiert (20-30 min/70.000 rpm/4°C/TLA100 mit Adaptoren für 1,5 ml Reaktionsgefäße). Zur post-translationalen Translokation wurden 3-5 eq Mikrosomen zu je 10 µl des inhibierten Translationsansatzes gegeben. Die Inkubation erfolgte durch zwei 20-minütige Inkubationsschritte auf Eis und bei 25°C.

Im Anschluss an die Translation und Translokation wurde ein Proteaseverdau durchgeführt. Dazu wurde ein Teil des Ansatzes mit einem Volumen Proteinase K (0,5 mg/ml in Proteasepuffer) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) gestoppt. Der zweite Teil des Ansatzes erhielt zur Kontrolle enzymfreien Proteasepuffer. Proben, die eine Proteasebehandlung durchlaufen haben, wurden vor der Lagerung bei -20° C im Probenpuffer für 10 min bei 80°C denaturiert.

### ***3.2.11 Ammoniumsulfat-Fällung***

Das im Retikulozytenlysat enthaltene Globin führt bei hoher Konzentration in der Gelelektrophorese zu einer ausgeprägten Bande im unteren Drittel des Gels. Um das Globin zu entfernen und so ein größeres Probenvolumen auftragen zu können, wurden vor allem Proben kleiner Proteine mit Ammoniumsulfat präzipitiert. Dem Ansatz wurde ein zehnfacher Überschuss an 60%iger Ammoniumsulfat-Lösung (60% einer gesättigten Lösung) zugegeben und die Proteine nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis in der Eppendorf-Kühlzentrifuge 5415R sedimentiert (13.200 rpm/45 min). Der globinhaltige Überstand wurde verworfen, das Präzipitat in 60%iger Ammoniumsulfat-Lösung aufgenommen und erneut pelletiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das *Pellet* in SDS-Probenpuffer (2X) resuspendiert.

### ***3.2.12 Präparation von Mikrosomen***

Die Säugermikrosomen wurden nach Walter & Blobel [1983] aus dem frischen Pankreasgewebe der jeweiligen Tiere präpariert. Der gesäuberte Pankreas wurden breiartig zerkleinert, gewogen und in 3 Volumenteilen Puffer  $A_{RM}$  unter ständiger Kühlung mit einem motorbetriebenen Dounce-Homogenisator homogenisiert. Zwei Zentrifugationsschritte (10 min/3000 rpm/JA-14 und 10 min/8100 rpm/JA-14) trennten die Mikrosomen (im Überstand) von den restlichen Zellbestandteilen. Der durch ein Sieb geklärte Überstand wurde durch den Kissenpuffer  $KP_{RM}$  hindurch sedimentiert (3,5 h/45.000 rpm/Ti-45). Die Mikrosomen im *Pellet* wurden in

Membranpuffer unter Zusatz von 10 µg/ml Leupeptin und 1 µg/ml Chymostatin resuspendiert und homogenisiert.

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefemikrosomen stammen aus dem Wildtyp-Hefestamm YTX69. Die Hefe wurde in 6 Litern YPD-Medium angezogen und bei einer optischen Dichte von 0,2-0,4 bei 600 nm Wellenlänge geerntet. Das *Pellet* wurde in 1,25X Homogenisierungspuffer aufgenommen und die Zellen unter Kühlung durch das kräftige Vermischen mit sehr kleinen Glaskugeln (BioRad) aufgebrochen. Über zwei Zentrifugationsschritte (10 min/3000 rpm/JA-18 und 15 min/8.000 rpm/TI-45) wurde jeweils der mikrosomenhaltige Überstand von den restlichen Zellbestandteilen getrennt. Anschließend wurden die Mikrosomen durch einen Sedimentationsschritt (35 min/25.000 rpm/TI-45) pelletiert, in Membranpuffer mit 1X PI-Mix aufgenommen und homogenisiert.

Für die Quantifizierung der Membranen wurden einige µL der Mikrosomen in 2%iger SDS-Lösung verdünnt. Im Photometer wurde danach die Absorption bei 280 nm gemessen. Eine OD<sub>280</sub> von 50 entspricht 1 eq/µl [Walter *et al.*, 1981]. Alle Mikrosomen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### ***3.2.13 Behandlung von Membranen mit Hochsalz und EDTA (EKRMs)***

Mit Membranpuffer verdünnte Mikrosomen (1 eq/µl) wurden in Anwesenheit von 1X PI-Mix mit 25 mM EDTA versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß folgte ein Sedimentationsschritt durch den Kissenpuffer 1 für EKRM. Die *Pellets* wurden in Membranpuffer resuspendiert und mit 500 mM Kaliumacetat und 1X PI-Mix behandelt. Nun wurde der Kissenpuffer 2 für EKRM vorgelegt, mit dem Ansatz überschichtet und zentrifugiert. Das entstehende *Pellet* wurde mindestens zweimal in Membranpuffer aufgenommen und erneut sedimentiert und abschließend in Membranpuffer resuspendiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten für 8-10 min bei 70.000 rpm im TLA100.3-Rotor mit Adaptoren für 1,5 ml Reaktionsgefäße (*Microfuge Tube*, Beckmann Coulter). Eine Quantifizierung der mit EDTA und Hochsalz behandelten Membranen (EKRMs) wurde durch einen Western Blot gegen einen Standard aus unbehandelten Membranen erreicht.

### ***3.2.14 ATP-Depletion***

Die Depletion von ATP erfolgte auf zwei Arten. Für die Depletion mit Apyrase wurden sowohl die Membranen als auch der Translationsansatz für 15 min bei 25°C mit Apyrase behandelt. Rindermembranen wurden mit 0,01 U/eq, Hefemikrosomen mit 0,03 U/eq inkubiert. Der

Translationsansatz wurde nach der Inhibition der Translation mit Cycloheximid (1 mM) und der Sedimentation der Ribosomen separat mit 0,05 U Apyrase je  $\mu$ l Ansatzvolumen behandelt. Für die Behandlung mit Hexokinase wurden den Rindermikrosomen 0,02 U Hexokinase/eq, den Hefemikrosomen 0,04 U/eq und dem post-ribosomalen Überstand 0,1 U Hexokinase je  $\mu$ l Reaktionsansatz zugegeben sowie jeweils 20 mM Glukose. Die Inkubation erfolgte für 15 min bei 25°C.

### ***3.2.15 NEM-Behandlung***

Für die Behandlung mit N-Ethylmaleimid (NEM) wurden die Mikrosomen sedimentiert und in DTT-freiem Puffer aufgenommen ohne die Membrankonzentration zu verändern. Rindermembranen erhielten 1 nmol NEM/eq, Hundemembranen 0,6 nmol/eq NEM. Die Endkonzentration von NEM im Ansatz entsprach damit 5 mM. Die Reaktion wurde nach 30 min bei 25°C durch Zugabe von 20 mM DTT und nachfolgender Inkubation für 10 min bei 0°C gestoppt. Der Translationsansatz blieb unbehandelt.

### ***3.2.16 Eeyarestatin I-Behandlung***

DTT-freie Membranen wurden für eine Stunde auf Eis mit 0,8 mM Eeyarestatin I (ES1) behandelt, das in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst vorlag. Auf die Konzentration der Mikrosomen berechnet, entspricht dies für EKRMs aus dem Hund ca. 4,4 nmol/eq und für die Rindermikrosomen 0,3-0,35 nmol/eq. Eine Behandlung des Überstands fand nicht statt.

### ***3.2.17 Western Blot und Immundetektion***

Die Proben wurden auf Gelen nach Lämmli [1970] aufgetrennt und mit dem „Panther“ *Semidry Electrobloetter* (Owl) im Halbtrockenverfahren auf die Immuno-Blot<sup>TM</sup> PVDF-Membranen (BioRad) übertragen. Der Transfer erfolgte mit Puffer nach Towbin [1979].

Nach dem Blotten wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit 5% (w/v) Milchpulver in 1X TBT geblockt. Über Nacht wurde die Membran mit primärem Antikörper (in Blockpuffer) auf der Wippe bei 4°C inkubiert. Als Sekundärantikörper (Inkubation 1h/RT) wurde ein mit Meerrettich-Peroxidase markierter Antikörper eingesetzt und nach Herstellerangaben in Blockpuffer verdünnt. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-System unter Verwendung der Kamera LAS-1000 und der Intelligent Dark Box II (Raytest).

### ***3.2.18 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Auswertung***

Die Analyse der Translation, Translokation bzw. des Proteaseverdaus erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE). Aufgetragen wurden 20% des Translationsansatzes bei gefällten Proben (vgl. 3.2.11) bzw. 2,5% des Ansatzes bei ungefällten Proben. Die Angaben beziehen sich auf den ursprünglichen Translationsansatz, Verdünnungsschritte (zum Beispiel durch die Proteasebehandlung) wurden berücksichtigt. Vor der Elektrophorese wurden die Proben für 10 min bei 80°C denaturiert.

Für Proteine, die kleiner als 15 kDa sind, wurden Tricingele nach Schägger & Jagow [1987] verwendet. Größere Proteine wurden wahlweise auf Tricingelen oder auf Tris-Glycin-Gelen nach Lämmli [1970] aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 50-60 mA.

Anschließend wurden die Gele in 15% (v/v) Essigsäure für 20 min fixiert, gefolgt von wiederholten Waschschritten mit Wasser für rund 30 min. Die im Gel Dryer (Modell 583 von Bio-Rad) getrockneten Gele wurden für mindestens 14 Stunden auf *Imaging Plates* (Fuji/Raytest) exponiert und mit dem *Fluorescence & Radioluminography Laser Scanner* FLA-3000 (Raytest) eingelesen.

Die Auswertung erfolgte mit dem AIDA (*Advanced Image Data Analyzer*) Programm von Raytest.

## 4 Ergebnisse

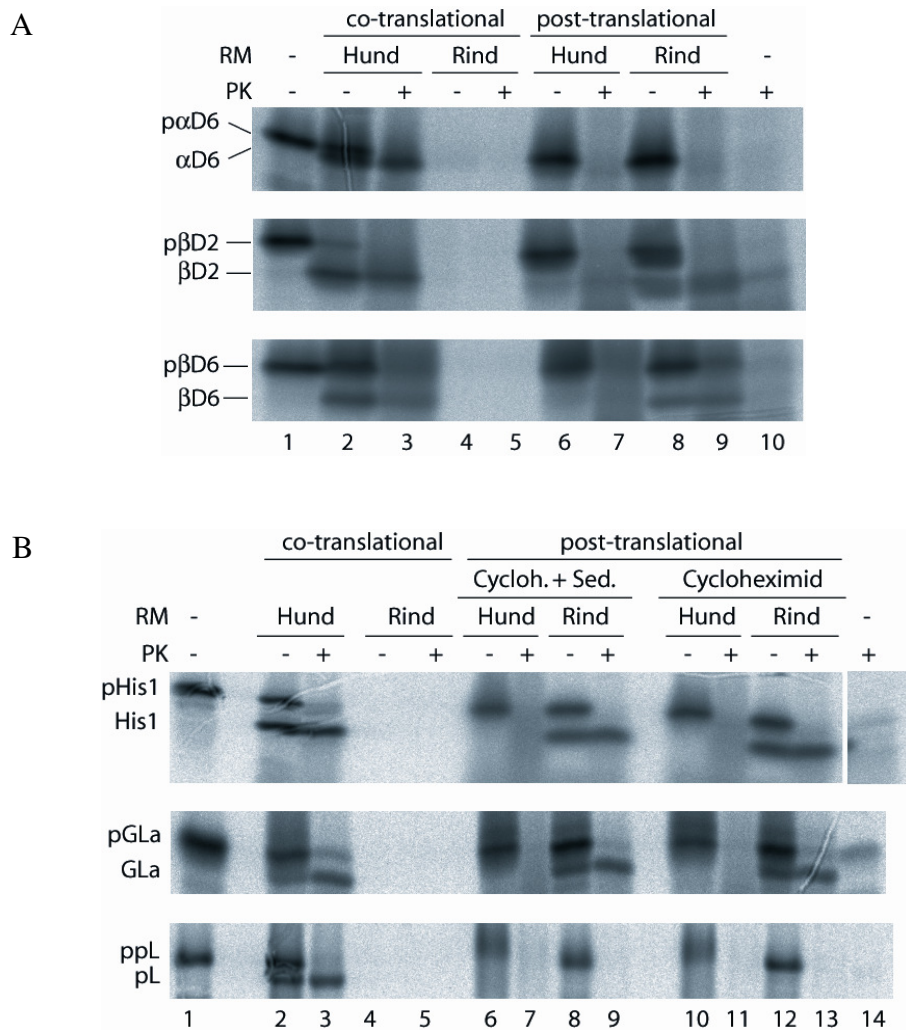
### 4.1 Existenz einer post-translationalen Transportmöglichkeit sekretorischer Proteine in das ER des Säugers

Am Beginn der vorliegenden Arbeit stand die Frage nach dem Vorhandensein eines post-translationalen Transportwegs in das Endoplasmatische Retikulum des Säugers. Zunächst mussten daher für einen solchen Transportweg geeignete Substratproteine gefunden werden sowie ER-Membranen, die in *in vitro* Experimenten verwendet werden können.

#### 4.1.1 Die Substratproteine können transloziert werden

Als mögliche Substrate für den post-translationalen Transport wurden gezielt sekretorische Proteine ausgesucht, die bestehend aus 54-100 Aminosäuren recht kurz sind. Ausgehend von der Annahme, dass 30-40 Aminosäuren während der Translation im ribosomalen *Exit Tunnel* verborgen sind, so findet ein vollständiger Austritt der rund 20 Aminosäuren langen Signalsequenz aus dem Ribosom frühestens bei einer Gesamtlänge der naszierenden Kette von 50-60 Aminosäuren – das heißt sehr kurz vor der Translationstermination – statt [Matlack *et al.*, 1995]. Aus kinetischen Gründen ist es denkbar, dass die Elongation bereits beendet ist, bevor eine Bindung der ausgetretenen Signalsequenz an das *Signal Recognition Particle* (SRP) oder die Bindung des Ribosoms an das Translokton erfolgen kann. Für kleine Proteine ist daher die Wahrscheinlichkeit deutlich erhöht, dass sie notwendigerweise über eine post-translationalen Transportoption verfügen.

Basierend auf diesen Überlegungen wurden kurze humane sekretorische Proteine als Substrate ausgewählt. Getestet wurden Histatin 1 (His1), Histatin 3 (His3),  $\alpha$ -Defensin 6 ( $\alpha$ D6),  $\beta$ -Defensin 2 ( $\beta$ D2),  $\beta$ -Defensin 6 ( $\beta$ D6) und Statherin (Stat). Alle Proteine konnten kloniert, *in vitro* transkribiert und im Retikulozytenlysatsystem aus Kaninchenblut translatiert werden. Die *in vitro* Translation erfolgte in Anwesenheit einer mit Schwefel-35 radioaktiv markierten Aminosäure, die in das Protein eingebaut wurde. Die Radioaktivität wurde anschließend zur Detektion des Proteins nach der Auftrennung der Proben auf einem Polyacrylamidgel genutzt (Abb. 4.1, A und B, Bahn 1).



**Abb. 4.1: Transportverhalten verschiedener Proteine unter co- und post-translationalen Bedingungen.** Für den co-translationalen Transport wurden 0,3 eq der angegebenen Membranen zu einem mit radioaktivem Methionin versetzten *in vitro* Translationsansatz gegeben. A) Um post-translationale Bedingungen zu schaffen wurde ein membranfreier Translationsansatz mit 1 mM Cycloheximid versetzt, gefolgt von der Sedimentation der Ribosomen. Anschließend fand die Vermischung und Inkubation des post-ribosomalen Überstands mit 3 eq der Hunde- bzw. 5 eq der Rindermembranen statt. Abschließend wurde die erfolgte Translokation in die Mikrosomen durch den Verdau mit Proteinase K (PK) überprüft und die gefällten Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Die mit 15%iger Essigsäure fixierten Gele wurden getrocknet und das Autoradiogramm mit einem Phosphoimager ausgelesen. Die obere Bande zeigt das Translationsprodukt, die untere Bande das prozessierte Translokationsprodukt. B) Abweichend von dem in A) beschriebenen Versuchsablauf wurde ein Teil des Ansatzes nach der Cycloheximidzugabe nicht zentrifugiert (Bahnen 10-13), die translationsinhibitierten Ribosomen waren daher während der nachfolgenden Schritte anwesend. RM: raue Membranen/Mikrosomen, PK: Proteinase K, Cyclohex.: Cycloheximid, Sed.: Sedimentation,  $\alpha$ D:  $\alpha$ -Defensin,  $\beta$ D:  $\beta$ -Defensin, His1: Histatin 1, ppL: Präprolaktin

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Substrate generell in Säugermikrosomen (gereinigte ER-Membranvesikel) transloziert werden konnten. Der *in vitro* Translation (10 $\mu$ l) wurden zu diesem Zweck von Beginn an 0,3 eq Membranvesikel zugesetzt, die entweder aus dem Pankreasgewebe vom Hund oder vom Rind präpariert wurden. Durch die Verwendung

zweier unterschiedlicher Säugermembranen sollte herausgefunden werden, ob sich eines der Systeme anders verhält und ob Unterschiede in der Transporteffizienz bestehen.

Es gelang bei der co-translationalen Membranzugabe alle betrachteten Proteine in die als Standard geltenden Hundemikrosomen zu transportieren. Ein erfolgreicher Transport der Proteine in die Mikrosomen wurde anhand der Prozessierung nachgewiesen. Dabei wird die Signalsequenz durch den Signalpeptidasekomplex entfernt, das Protein läuft bei der Elektrophorese im Polyacrylamidgel niedriger als das Translationsprodukt (vgl. Abb. 4.1, Bahn 1 und 2). In den Abbildungen ist das nicht transportierte Protein durch ein zusätzliches „p“ markiert (z.B. p $\alpha$ D6). Der Transport wurde zudem durch den Verdau untransportierter Proteine mit Proteinase K (PK) verifiziert. Die in das Lumen der mikrosomalen Vesikel translozierten Proteine sind vor dem Verdau geschützt, während die nicht transportierten Proteine abgedaut werden (vgl. Abb. 4.1 A, Bahn 3 und 10 bzw. B, Bahn 3 und 14).

Für alle getesteten Proteine wurde durch die Prozessierung in Hundemikrosomen nachgewiesen, dass sie grundsätzlich in das ER des Säugers transportiert werden können. Erstaunlicherweise verhinderten Rindermikrosomen aus unbekanntem Gründen bei co-translationaler Zugabe bereits die Translation (Abb. 4.1, Bahn 4 und 5).

#### ***4.1.2 Die Substratproteine können in Säugermikrosomen post-translational transloziert werden***

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Substrate grundsätzlich transportfähig sind, sollte untersucht werden, ob der Transport in Säugermembranen post-translational stattfinden kann. Im Gegensatz zur co-translationalen Membranzugabe, bei der nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Proteine trotz der Anwesenheit von Membranen im Translationsansatz erst nach der abgeschlossenen Translation (post-translational) in die vorhandenen Mikrosomen transloziert werden, ist es möglich den translationsabhängigen Transport zu unterbinden und nur den post-translationalen Transport zuzulassen.

Dazu wurde einem membranfreien Translationsansatz nach einer Inkubationszeit von 45 min bei 25°C Cycloheximid zugesetzt, welches die Elongation der Polypeptidkette inhibiert. Darüber hinaus wurden die Ribosomen durch einen Sedimentationsschritt in der Ultrazentrifuge entfernt. Der translationsinhibierte Ansatz wurde anschließend mit Hundemembranen (3 eq/10  $\mu$ l) oder Rindermikrosomen (5eq /10  $\mu$ l) versetzt und zunächst für 20 min auf Eis inkubiert, bevor die Transportreaktion durch eine ebenfalls zwanzigminütige Inkubation bei

25°C abgeschlossen wurde. Anschließend erfolgte die Überprüfung der Translokation durch einen Proteaseverdau mit Proteinase K.

Wie in Abb. 4.1 ersichtlich, konnten fast alle Proteine unabhängig von der Translation und von freien Ribosomen in die Rindermikrosomen transportiert werden (Bahn 8). Eine Ausnahme stellt nur  $\alpha$ -Defensin 6 dar, das sich lediglich in Spuren post-translational translozieren lässt (Abb. 4.1, A). Die als Kontrollen verwendeten Proteine GLa und ppL verhielten sich erwartungsgemäß: Das Froschprotein GLa, das bereits in früheren Arbeiten post-translational transloziert werden konnte, ließ sich in den Rindermembranen ebenfalls mit guter Effizienz translozieren, während das Rinderprotein Präprolaktin (ppL), das als ausschließlich co-translational translozierbar gilt, nicht in Rindermikrosomen transportiert wurde (Abb. 4.1, B).

Setzte man hingegen die Mikrosomen aus Hundepankreas unter post-translationalen Bedingungen ein, so konnte für die meisten Substrate kein Transport gezeigt werden (Abb. 4.1, Bahn 6). Auch die Kontrollproteine GLa und ppL wurden nicht in das ER-Lumen transloziert (Abb. 4.1, B). Nur das  $\beta$ -Defensin 2 konnte mit einer geringen Effizienz transportiert werden (Abb. 4.1, A, Mitte, Bahn 6 und 7). Relativiert wird diese Bande aber dadurch, dass die Proteasekontrolle ohne Membranzugabe (Bahn 10) ebenfalls eine Bande mit vergleichbarer Intensität zeigt, so dass es sich eventuell um ein Artefakt handeln könnte. Das Fehlen eines Transports bei post-translationaler Zugabe der Hundemembranen lässt darauf schließen, dass die zuvor unter co-translationalen Bedingungen beobachtete Translokation translationsabhängig ist und keinen versteckten post-translationalen Transport zeigt. Zusätzlich bestätigt dieses Ergebnis, dass die Translation durch Cycloheximid vollständig inhibiert ist und wirklich post-translationalen Bedingungen vorliegen.

Dieses Resultat bedeutet nicht nur, dass ein post-translationaler Transport im Säuger vorhanden ist, sondern auch, dass die kleinen Proteine auf zwei Wegen translozierbar sind: In Hundemembranen ist nur ein co-translationaler Transport möglich, in Rindermembranen hingegen nur eine post-translational Translokation.

Um die Anzahl der verwendeten Substratproteine aus praktischen Gründen zu verringern, wurden die weiteren Experimente nur mit Histatin 1, Histatin 3 und Statherin als humane Substrate durchgeführt. Diese Proteine zeigten in den Versuchen eine höhere Reproduzierbarkeit als die Defensine sowie durchschnittlich höhere Translations- und Translokationsraten.

Im nächsten Schritt wurde gefragt, ob die Ribosomen beim post-translationalen Transport eine unterstützende oder hemmende Funktion einnehmen oder ob auf den Sedimentationsschritt verzichtet werden kann. Um dies zu überprüfen, wurde die Transporteffizienz von Ansätzen ver-

glichen, bei denen die Ribosomen entweder absedimentiert wurden oder bei denen nur eine Hemmung der Translation durch Cycloheximid erzielt wurde. Alle sonstigen Schritte des post-translationalen Translokationsexperiments und die eingesetzten Membrankonzentrationen blieben bei beiden Ansätzen gleich.

Das Ergebnis zeigt, dass sich die Transporteffizienz sowohl bei Histatin 1 als auch bei der Kontrolle (GLa) nicht signifikant zwischen beiden Translationsansätzen unterscheidet (Abb. 4.1, B, Bahn 8 bzw. 12). Die Signalstärke des radioaktiv markierten Substratproteins wurde durch die Sedimentation nicht verringert. Das heißt, dass sich die Ribosomen nach der Translation von den Polypeptidketten lösen. Die Anwesenheit von translationsinhibierten Ribosomen während der Translokation besitzt keinen Effekt auf die post-translationale Translokation der ausgewählten Substratproteine im Säuger.

Zusammengefasst weisen die Versuche mit verschiedenen Substratproteinen, Membranen und Translokationsbedingungen nach, dass im Säuger Proteine existieren, die sowohl co- als auch post-translationally transloziert werden können. Die aus verschiedenen Tieren stammenden Mikrosomen besitzen *in vitro* unterschiedliche Transportfähigkeiten: Hundemembranen eignen sich fast ausschließlich für die co-translationale Translokation, während Rindermembranen nur für post-translationale Transportexperimente eingesetzt werden können. Der post-translationale Transport der humanen Substratproteine ist unabhängig von der Anwesenheit zytosolischer Ribosomen.

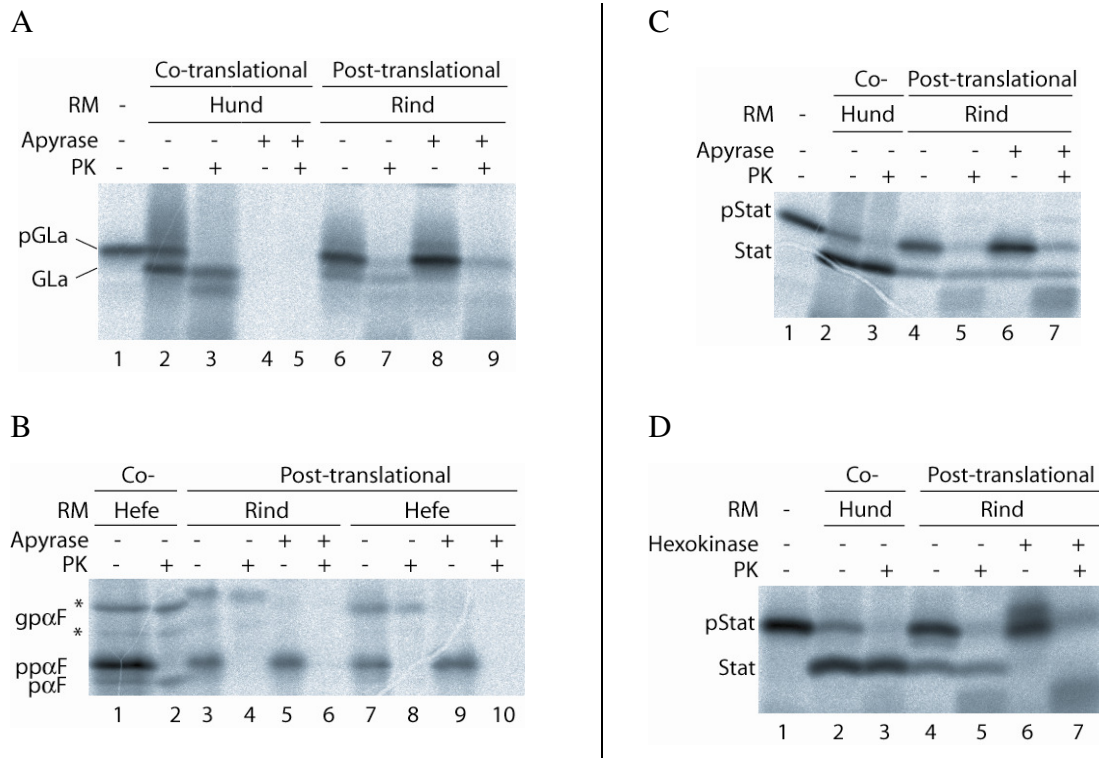
## 4.2 Charakterisierung des post-translationalen Transportwegs im Säuger

### 4.2.1 *Der post-translationale Proteintransport im Säuger ist ATP-abhängig*

Im nächsten Schritt wurde die Abhängigkeit des post-translationalen Transports vom Energieträger ATP untersucht. Dieses wird vermutlich durch zytosolische und lumenale Chaperone verbraucht.

Hierzu wurde der nach der vollendeten Translation mit Cycloheximid inhibierte und von Ribosomen befreite Translationsansatz für 15 min mit Apyrase behandelt um das vorhandene ATP zu depletieren. Parallel dazu erfuhren die Mikrosomen eine Apyrasebehandlung, bevor der ATP-freie Translationsansatz mit den Membranen inkubiert wurde. Da durch die enzymatische Reaktion auch GTP abgebaut wird, das für die Elongation der Polypeptidkette während der

Translation sowie für den SRP-abhängigen Transport notwendig ist, wurde nur die Auswirkung der Depletion auf den post-translationalen Transport betrachtet. Die fehlende Translation im co-translationalen Ansatz mit ATP-depletierten Komponenten wurde als Kontrolle verwendet.



**Abb. 4.2: ATP-Depletion führt zum Verlust des post-translationalen Transports.** Translationsprodukte und Membranen wurden vor der post-translationalen Transportreaktion entweder mit Apyrase (A-C) oder Hexokinase (D) behandelt. Der Transport erfolgte entweder co-translational in Hundemembranen oder post-translational in Rindermembranen. Der Transport des zur Kontrolle verwendeten Hefeproteins pp $\alpha$ -Faktor (pp $\alpha$ F) wurde zudem in Hefemikrosomen betrachtet. Nach der erfolgten Inkubation zur Translokation wurde eine Proteasebehandlung mit Proteinase K (PK) durchgeführt. Im Anschluss wurden die gefällten Proben auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. GLa und der pp $\alpha$ -Faktor dienten als Kontrolle. Statherin (Stat) ist ein Vertreter der humanen Substratproteine. Stellvertretend für alle Proteine erfolgte für GLa zusätzlich die Kontrolle, dass die Translation durch die Depletion von ATP und GTP gehemmt wird.

Als Kontrollproteine für die ATP-Abhängigkeit im post-translationalen Transport dienten das Froschprotein GLa und das Hefehormon pp $\alpha$ -Faktor, für die in der Vergangenheit eine ATP-Abhängigkeit des Transports in Säuger- beziehungsweise Hefemembranen beschrieben wurde [Rothblatt & Meyer, 1986; Waters & Blobel, 1986; Schlenstedt & Zimmermann, 1987; Grau, 2003]. Der pp $\alpha$ -Faktor besitzt drei Glykosylierungsstellen, an die im ER-Lumen durch den Oligosaccharyltransferasekomplex Zuckerreste geknüpft werden. Resultierend aus dieser N-Glykosylierung weisen die transportierten Formen daher ein höheres Molekulargewicht auf (Abb. 4.2, B, Bahn 1). Die Beschriftung der Glykosylierungsbanden erfolgt durch die Markie-

rung mit einem Stern (\*) und dem Zusatz „g“ (gp $\alpha$ F). Bei einem Vergleich der Bahnen 3 und 7 in Abb. 4.2 fällt auf, dass die Höhe der Glykosylierungsbanden bei der Verwendung verschiedener Mikrosomen variiert. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die verwendeten Zuckerstrukturen in verschiedenen Organismen voneinander abweichen.

Die Aktivität der Apyrase wird dadurch bestätigt, dass die Translation vollständig inhibiert wird, wenn der Translationsansatz und die zugefügten Mikrosomen zuvor mit Apyrase behandelt wurden (Abb. 4.2, A, Bahn 4 und 5). Erstaunlicherweise wurde der post-translationale Transport von Statherin (Abb. 4.2, C), Histatin 1 und Histatin 3 (nicht gezeigt) dennoch nicht gehemmt und wies nicht einmal Einbußen bei der Translokationseffizienz auf. Die Kontrollproteine GLa und pp $\alpha$ -Faktor konnten unter denselben Bedingungen wie erwartet nicht post-translationally transloziert werden (Abb. 4.2, A, B). Dies lässt zwei mögliche Rückschlüsse zu: Entweder handelt es sich beim translationsunabhängigen Transport der humanen Substratproteine in Rindermembranen im Gegensatz zu heterologen Substraten um einen energieunabhängigen Transportprozess oder aber die Depletion von ATP oder GTP erfolgte nicht vollständig, so dass eine für den Transport ausreichende Restkonzentration dieser Energieträger verblieb.

Um die zweite mögliche Ursache zu überprüfen, wurde ein weiterer Depletionsversuch mit einem anderen Enzym durchgeführt. Anstelle von Apyrase erfolgte die Entfernung von ATP und GTP durch Hexokinase unter vergleichbaren Bedingungen. Dieses Enzym entfernt die Phosphatreste vom ATP und GTP und überträgt sie auf die gleichzeitig zugegebene Glukose. Bei der Depletion mit Hexokinase wurde der post-translationale Transport der kleinen Proteine im Gegensatz zu den mit Apyrase erzielten Ergebnissen vollständig unterbunden (Abb. 4.2, D). Auch die Kontrollen ließen sich erwartungsgemäß nicht translozieren (nicht gezeigt). Geht man davon aus, dass Hexokinase ATP effektiver entfernt als Apyrase, lässt dies darauf schließen, dass die kleinen Säugerproteine einen im Vergleich zu den heterologen Kontrollproteinen geringeren Bedarf an ATP während des post-translationalen Transports haben. Grundsätzlich verläuft der Transport jedoch energieabhängig.

#### ***4.2.2 Der Transport kleiner Proteine erfolgt durch NEM-sensitive Membranproteine***

Die Abhängigkeit der Translokation von Energie deutet darauf hin, dass für den post-translationalen Transport der Substrate energieverbrauchende Proteine nötig sind. Diese könnten aber auch lediglich direkt nach der Translation eine Rolle spielen, beispielsweise für die Aufrechter-

haltung eines translokationskompetenten Zustands, während der eigentliche Transport, das heißt der Durchtritt durch die ER-Membran, spontan verläuft. Die Option eines spontanen Transports auszuschließen ist besonders für die gewählten Substratproteine wichtig, da die Wirkungsweise einiger antimikrobieller Peptide, zu denen auch die Histatine gezählt werden, auf einer Zerstörung der Membranintaktheit basiert. Daher sollte die Abhängigkeit der post-translationalen Translokation von membranständigen Proteinen durch die Verwendung von Inhibitoren untersucht und gegebenenfalls genauer eingegrenzt werden.

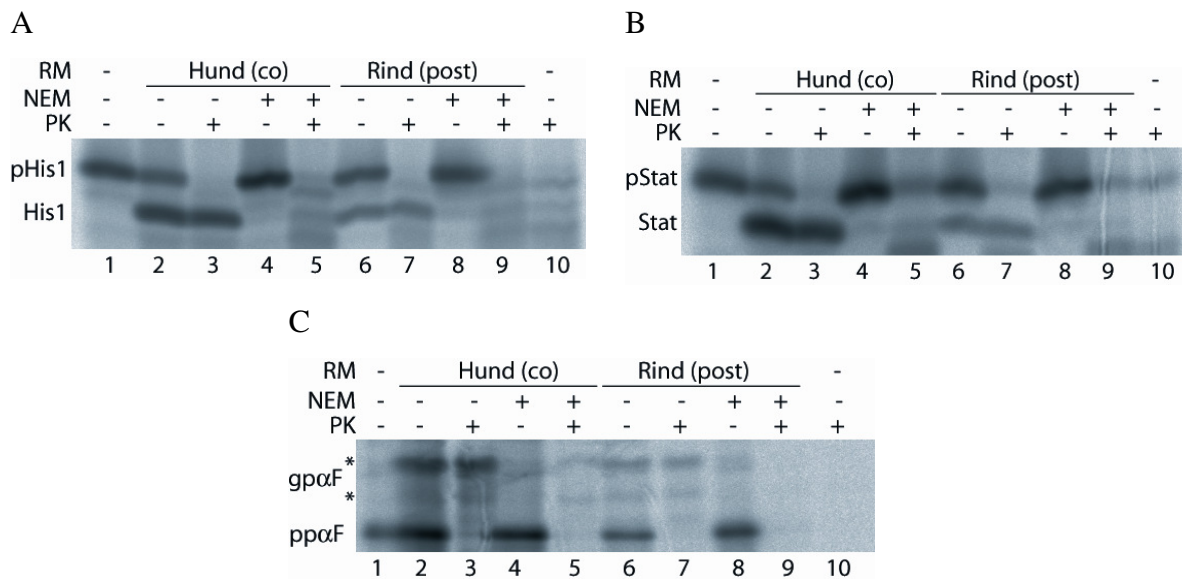
Zunächst wurde dazu N-Ethylmaleimid (NEM) eingesetzt, ein Sulfhydrylgruppen alkylierendes Reagenz, das ein breites Spektrum an Proteinen modifizieren kann, darunter SRP, den SRP-Rezeptor und Sec61 $\alpha$  (imp34) [Walter *et al.*, 1981a; Kellaris *et al.*, 1991; Klappa *et al.*, 1994]. Eine fehlende Sensitivität des Transports gegenüber NEM könnte deshalb als Hinweis auf einen spontanen, vom Translokator oder anderen Membranproteinen unabhängigen Transport der Substratproteine verstanden werden.

Vor der Behandlung der Mikrosomen mit NEM mussten diese zunächst sedimentiert und in DTT-freiem Membranpuffer aufgenommen werden, da DTT ebenfalls ein Substrat für NEM ist. Die Mikrosomen wurden anschließend bei 25°C mit NEM inkubiert. Nach einer halben Stunde erfolgte die Inaktivierung von unverbrauchtem Reagenz durch die Zugabe von DTT. Die so vorbehandelten Hundemikrosomen wurden im co-translationalen Transport zu Beginn der Translation zugesetzt. Für die Betrachtung des post-translationalen Transports wurden die NEM-vorbehandelten Rindermembranen mit ribosomenfreiem, translationsinhibiertem Translationsansatz versetzt und nacheinander auf Eis und bei 25°C inkubiert. Die Translationsansätze blieben unbehandelt.

Die Ergebnisse der Transportversuche zeigen, dass der post-translationale Proteintransport durch die Behandlung der Rindermembranen mit NEM fast vollständig zum Erliegen kommt (Abb. 4.3, Bahn 8 und 9). Es verbleiben lediglich Spuren des transportierten Proteins. Die bei Statherin (B) am unteren Bildrand sichtbaren Banden in Bahn 9 und 10 sind Artefakte, da diese erst durch den Verdau entstehen und in der unverdauten Probe (Bahn 8) nicht vorhanden sind. Auch der als Kontrolle verwendete pp $\alpha$ -Faktor (C) weist ein Artefakt in der Bahn 8 auf. Diese Bande ist jedoch nicht vor dem proteolytischen Abbau geschützt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der post-translationale Transport aller Substrate NEM-sensitiv verläuft.

Da für den elongationsabhängigen Transportweg eine inhibierende Wirkung von NEM bekannt ist, wurde die Hemmung des co-translationalen Transports der Substrate als Kontrolle eingesetzt. Das sich dabei zeigende Bild war mit dem Ergebnis des post-translationalen Transports vergleichbar. Die Transportreaktion konnte zwar nicht komplett inhibiert werden, wie die

schwachen Banden beim Statherin und pp $\alpha$ -Faktor zeigen (Bahn 4 und 5). Der fast vollständige Rückgang des Transportprodukts lässt aber darauf schließen, dass die Hemmung erfolgreich war. Die bei Histatin 1 (A) in Bahn 5 sichtbare Bande auf Höhe des transportierten Proteins stellt wahrscheinlich ein durch den Proteaseabbau entstandenes Artefakt dar, da diese Bande auch in der Kontrolle ohne Membranen zu sehen ist (Abb. 4.3, A, Bahn 10), jedoch nicht in der unverdauten Probe (Bahn 4).



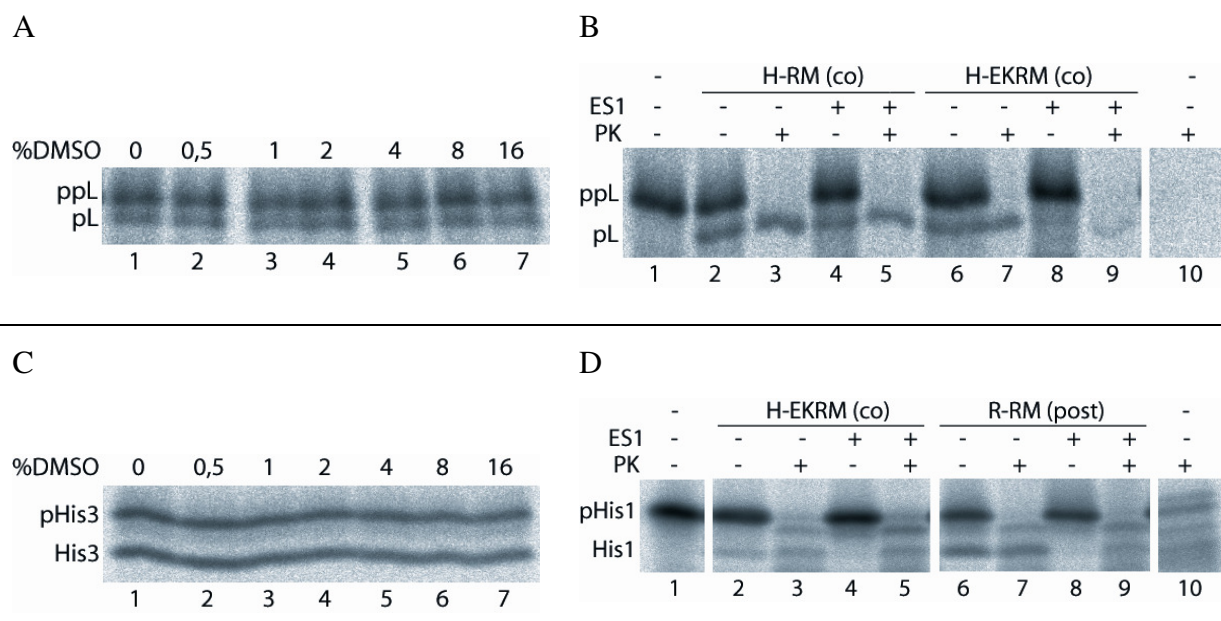
**Abb. 4.3: NEM-Sensitivität des Transports in Säugermikrosomen.** Die in DTT-freiem Puffer befindlichen Mikrosomen wurden mit N-Ethylmaleimid (NEM) behandelt, die Reaktion wurde durch Zugabe von DTT gestoppt. Anschließend wurden die Membranen für den co- bzw. post-translationalen Transport eingesetzt. Die Proben wurden nach der Transportreaktion geteilt und eine Hälfte mit Proteinase K (PK) verdaut. Die Auswertung erfolgte durch SDS-PAGE und Autoradiografie.

Da neben der co-translationalen Translokation auch der post-translationaler Transport durch die Anwendung von NEM eindeutig eingeschränkt wird, ist ein durch membranständige Proteine des Endoplasmatischen Retikulums vermittelter Transport der Testproteine anzunehmen. Eine Abhängigkeit von Sec61 $\alpha$ , dem SRP-Rezeptor oder anderen konkreten Proteinen lässt sich aus diesem Versuch aufgrund der geringen Spezifität der Alkylierung durch NEM nicht ableiten.

#### 4.2.3 Der Transport kleiner Proteine ist Sec61-abhängig

Nachdem die Möglichkeit einer spontanen Translokation durch die vorhandene NEM-Sensitivität ausgeschlossen werden konnte, sollte durch die Verwendung von Eeyarestatin I (ES1) die Abhängigkeit des Transports von Sec61 überprüft werden. Cross *et al.* [2009] haben gezeigt, dass Eeyarestatin I den Sec61-vermittelten Transport sowohl *in vivo* als auch *in vitro* inhibiert.

Zunächst sollte anhand des co-translationalen Kontrollproteins ppL überprüft werden, ob grundsätzlich eine Hemmung des Sec61-abhängigen Transports erzielt werden kann. Dafür wurden DTT-freie Hundemembranen für eine Stunde in der Kälte mit ES1 inkubiert und anschließend in co-translationalen Transportversuchen eingesetzt. Da ES1 in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst vorliegt, musste vorher ein Einfluss von DMSO auf die Translation oder Translokation ausgeschlossen werden. Eine Beeinflussung war nicht gegeben, wenn die Membranen mit einer DMSO-Konzentration bis zu 16% inkubiert und anschließend für die Translokation um Faktor 10 verdünnt wurden (Abb. 4.4, A). Die DMSO-Konzentration während der Membranbehandlung mit ES1 lag bei 10%.



**Abb. 4.4: Der post-translationale Proteintransport erfolgt Sec61-abhängig.** Rindermembranen (R-RM), Hundemembranen (H-RM) bzw. mit EDTA/Hochsalz gewaschene Hundemembranen (H-EKRM) wurden teilweise mit ES1 behandelt und co- oder post-translational für Transportexperimente eingesetzt. An den Transport anschließend wurde ein Teil der Proben mit Proteinase K (PK) inkubiert (B, D). Da ES1 in DMSO gelöst ist, wurde in Vorversuchen der Einfluss verschiedener DMSO-Konzentrationen auf den Transport betrachtet. Der Transport von ppL fand co-translational in Hundemembranen statt (A), der Transport von Histatinen post-translational in Rindermikrosomen (C). Die in (A) und (C) angegebenen DMSO-Konzentrationen beziehen sich auf den Zeitpunkt der Vorinkubation mit den Mikrosomen, die anschließend 1:10 (Hundemikrosomen) bzw. 1:6 (Rindermikrosomen) verdünnt zur Translokation verwendet wurden. Die DMSO-Konzentration bei den ES1-Behandlungen der Mikrosomen betrug 10%.

In den Versuchen mit ppL stellte sich heraus, dass ES1 nicht auf raue Hundemembranen wirkt (Abb. 4.4, B, Bahn 4). Als Ursache wurde eine sterische Behinderung durch Ribosomen vermutet, die sich bei rauen Mikrosomen auf den Sec61-Kanälen befinden. Um diese Ribosomen sowie periphere Proteine zu entfernen, wurden die Hundemembranen mit EDTA und hohen Salzkonzentrationen behandelt, bevor ihnen ES1 zugegeben wurde. Dieser zusätzliche Schritt

erwies sich als hinreichend um eine Wirkung von Eeyarestatin I auf den co-translationalen Transport zu erzielen. Während ppL in den EDTA/Hochsalz-behandelten Hundemembranen (H-EKRM) ohne ES1 mit guter Effizienz transloziert wird, unterbindet die vorhergehende Inkubation der H-EKRMs mit ES1 den Transport (Abb. 4.4, B, Bahn 6 bzw. 8).

Setzt man die EKRM aus Hundemembranen zur co-translationalen Translokation von Histatin 1 ein, so ist ein schwacher Transport erkennbar (Abb. 4.4, D, Bahn 2). Die Vorbehandlung der Hunde-EKRMs mit ES1 verhindert diesen co-translationalen Transport auch bei Histatin 1 vollständig (Abb. 4.4, D, Bahn 4). Die in Bahn 5 sichtbaren Banden entstehen erst durch den Proteaseabbau.

Da durch diese Versuche zum co-translationalen Transport die Wirksamkeit von ES1 auf den Sec61-abhängigen Transportweg bestätigt wurde, erfolgte nun die Untersuchung, ob die post-translational Translokation Sec61-abhängig erfolgt. Hierzu wurden DTT-freie raue Rindermembranen mit ES1 behandelt. Anschließend wurden die vorbehandelten Mikrosomen mit einem post-ribosomalen, translationsinhibierten Translationsansatz inkubiert.

Auch der post-translational Transport der humanen Substratproteine konnte durch ES1 vollständig unterbunden werden (Abb. 4.4, D, Bahn 8). Die Bande in Bahn 9 stellt ein Verdauungsartefakt dar. Da ES1 auf raue Rindermembranen wirkt, konnte auf die Entfernung der Ribosomen durch EDTA und hohe Kaliumsalzkonzentrationen verzichtet werden. Wie die Kontrolle zeigt, ist die Inhibition des Transports in Rindermikrosomen nicht auf den Einfluss des in der Reaktion vorliegenden DMSOs zurückzuführen, sondern von der Zugabe des Sec61-Inhibitors ES1 abhängig (Abb. 4.4, C).

Eeyarestatin I führte damit sowohl im co-translationalen Ansatz als auch unter post-translationalen Bedingungen zu einer Inhibition der Translokation (Abb. 4.4, B, D). Daher ist anzunehmen, dass die kleinen Proteine auf beiden Transportwegen Sec61-abhängig transloziert werden.

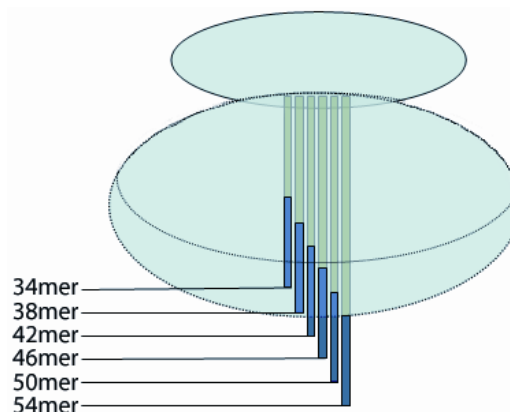
Nach diesen Experimenten kann zusammenfassend festgestellt werden, dass ein post-translationaler Transport im Säuger vorhanden ist. Die Charakterisierung dieses Transportwegs hat gezeigt, dass dieser Prozess energieabhängig verläuft, eine spontane Translokation in das Lumen des ERs kann ausgeschlossen werden. Experimente mit Translokationsinhibitoren legen nahe, dass der Transport durch den Sec61-Komplex vermittelt wird.

### 4.3 Die Proteinlänge hat Einfluss auf das Transportverhalten

Wie in Abschnitt 4.2.1 gezeigt werden konnte, sind die verwendeten Substratproteine in der Lage, sowohl co-translational in Hundemikrosomen als auch post-translational in Rindermembranen transloziert zu werden. Da die Hundemikrosomen keinen post-translationalen Transport vermitteln können, ist eine Unterscheidung der beiden Transportwege experimentell möglich. Dies sollte dazu verwendet werden um herauszufinden, welche Voraussetzungen ein Protein erfüllen muss, damit es co- oder post-translational transportiert werden kann.

#### 4.3.1 Die Verkürzung der Proteine schränkt die Transportmöglichkeiten ein

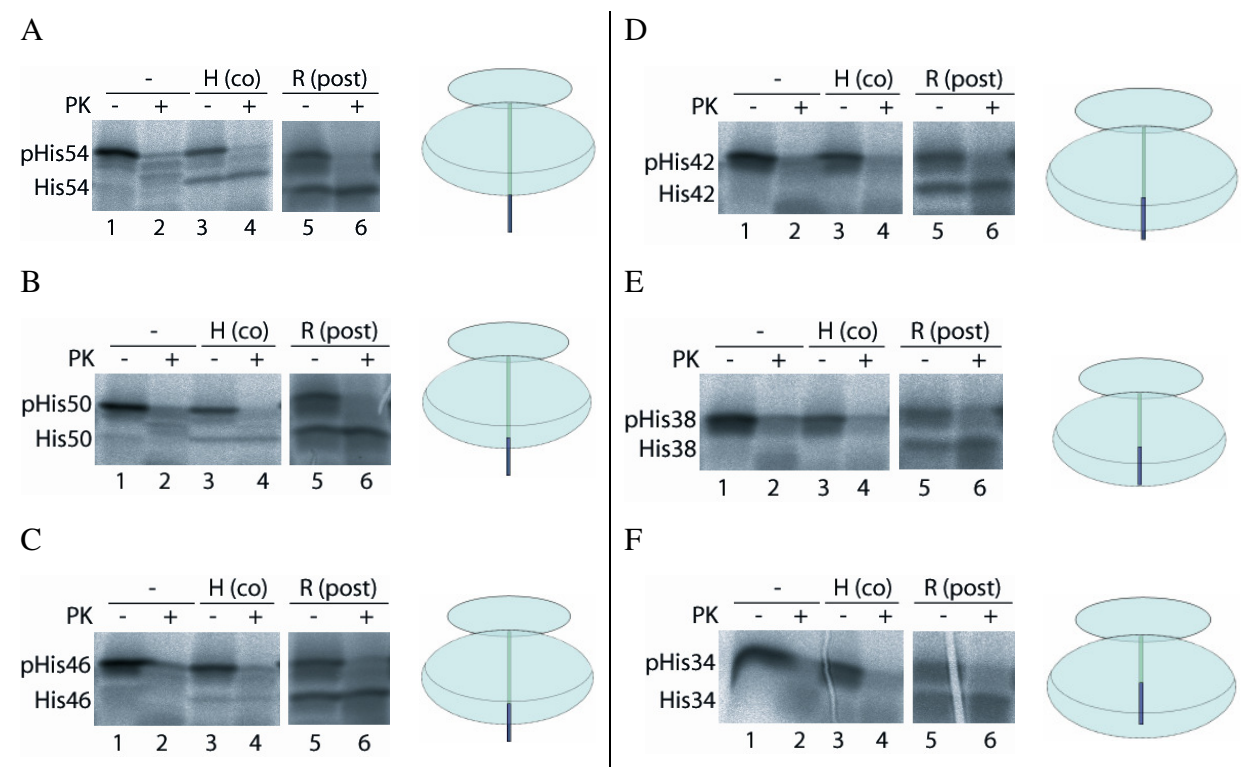
Bei der Auswahl der Substratproteine wurde angenommen, dass die kleinen Proteine aufgrund ihrer geringen Länge nur post-translational transloziert werden können, da rund 30-40 Aminosäuren im ribosomalen *Exit Tunnel* verborgen sind und die etwa 20 Aminosäuren lange Signalsequenz daher erst bei einer Länge von 50-60 Aminosäureresten vollständig aus dem Ribosom austritt. Bei den in Abschnitt 4.1 vorgestellten Ergebnissen zeigte sich, dass Histatin 3 noch translationsabhängig transportiert werden kann, die Untergrenze für den elongationsabhängigen Transportweg muss daher unterhalb von 54 Aminosäuren liegen.



**Abb. 4.5 Schematische Übersicht über die verkürzten Proteinvarianten.** Histatin 3 und Statherin wurden in Schritten von je 4 Aminosäuren C-terminal verkürzt. Das Schema zeigt die Lage der kurzen Histatin 3-Varianten im Ribosom bei der Termination der Translation, die Signalsequenz ist in blau hervorgehoben. Der Ribosomenkanal fasst ca. 30-40 Aminosäuren. Die untere Linie des Ribosoms im Bild markiert 40 Aminosäuren, die darüber liegende 30 Aminosäuren.

Um die Frage nach der Minimalgröße näher zu untersuchen, wurden Histatin 3 (54 AS) und Statherin (65 AS) in Schritten von je 4 Aminosäuren C-terminal bis auf eine Länge von 34 Aminosäuren verkürzt. Eine Übersicht über die ungefähre Lage der Varianten im Ribosom

bei abgeschlossener Translation liefert Abb. 4.5. Die bereits am C-Terminus des Ausgangsplas-  
mids angefügten drei Methioninreste wurden zur Verbesserung der radioaktiven Markierung  
beibehalten. Anschließend wurden die *in vitro* erzeugten Transkripte in Anwesenheit oder Ab-  
wesenheit von Hundemikrosomen translatiert. Die Translationseffizienz war für alle klonierten  
Varianten gut. Lediglich die Auftrennung auf den Acrylamidgelen wird aufgrund der mit 4 kDa  
sehr geringen Größe deutlich erschwert, die Banden laufen sehr breit (Abb. 4.6). Versuche mit  
anderen Gelen zur besseren Fokussierung der Bande oder eine veränderte Fixierung nach der  
Elektrophorese konnten das Problem nicht beheben.



**Abb. 4.6: Die minimale Länge für den co-translationalen Transport liegt bei 46 Aminosäuren.** Das ur-  
sprünglich 54 Aminosäuren umfassende Histatin 3 wurde mit molekularbiologischen Methoden in Schritten von  
4 Aminosäuren am C-Terminus gekürzt. Anschließend wurden Translokationsexperimente unter post-translationalen  
Bedingungen in Rindermikrosomen (R) durchgeführt sowie unter co-translationalen Bedingungen in  
Hundemikrosomen (H), die in früheren Experimenten keinen post-translationalen Transport gezeigt haben. Nach  
dem Transport wurde jeweils die Hälfte der Ansätze mit Proteinase K verdaut, translozierte Proteine (untere  
Bande) blieben dabei geschützt.

Die Beschriftung „pHis50“ (B) bedeutet in der Abbildung beispielhaft, dass dieses Konstrukt in seiner unpro-  
zessierten Form 50 Aminosäuren lang ist, für die übrigen Konstrukte gilt dies entsprechend. Zur Verdeutlichung  
der Größe des Proteins und seiner Lage im Ribosom wird das Schema der Abb. 4.5 hier noch einmal wiederholt.

Wie in Abb. 4.6, Bahn 3 und 4, zu sehen ist, wird die co-translationalen Transportrate der ver-  
kürzten Proteine in Hundemikrosomen bei abnehmender Proteinnlänge deutlich schlechter. Bei  
den Varianten mit 42, 38 oder 34 Aminosäuren (D-F) ist kein co-translationaler Transport mehr

erkennbar (Bahn 3). In einzelnen Versuchen ist auch bei der Variante mit 46 Aminosäuren Länge kein co-translationaler Transport mehr detektierbar (nicht gezeigt). Die vor allem in den Bildern D-F sichtbaren diffusen Banden in der Bahn 4 sind auch in der Proteasekontrolle (Bahn 2) vorhanden und deuten nicht auf einen Transport hin. Die Grenze, ab der ein Protein nicht mehr translationsabhängig translozierbar ist, verläuft somit bei einer Länge zwischen 46 und 42 Aminosäuren. Dieses Ergebnis bestätigte sich in den Versuchen mit Statherin (nicht gezeigt).

Für die Betrachtung der post-translationalen Translokation wurden die membranfreien Translationsansätze mit Cycloheximid gehemmt, bevor Rindermembranen zugegeben und mit den Translationsprodukten inkubiert wurden. Beim post-translationalen Transport bewegte sich die Transportrate innerhalb der normalen Schwankungsbreite, auch die mit 34 Aminosäuren kleinste Variante konnte transportiert werden. Alle Transportprodukte sind vor dem proteolytischen Abbau geschützt (Abb. 4.6, Bahn 5 und 6). Auch das Ergebnis der post-translationalen Translokationsversuche mit verkürzten Statherinvarianten zeigt die Translokationsfähigkeit aller Längen (nicht gezeigt). Ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt vor der Membranzugabe, durch den die Ribosomen entfernt wurden, beeinflusste das Ergebnis nicht (nicht gezeigt).

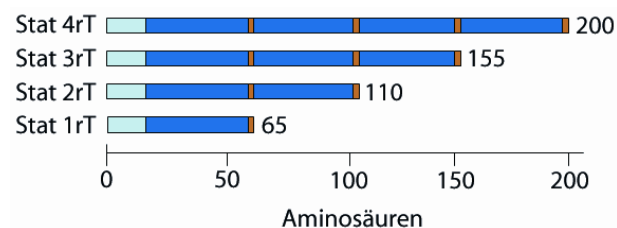
Ein Transport von verkürztem Histatin 3 und Statherin war unter co-translationalen Bedingungen in die gewählten Hundemikrosomen unterhalb einer Länge von 46 Aminosäuren nicht möglich. Proteine, die kürzer sind, können zwar grundsätzlich transportiert werden, jedoch nur in Membranen, die für die post-translationale Translokation geeignet sind. Diese Ergebnisse bestätigen außerdem, dass die verwendeten Hundemikrosomen nicht in der Lage sind post-translationalen Transport zu vermitteln.

### ***4.3.2 Stark verlängerte Substrate können nicht post-translational transportiert werden***

Nachdem untersucht wurde, welche Auswirkungen eine Verkürzung der Substrate auf den co- bzw. post-translationalen Transport hat, sollte getestet werden, ob eine Obergrenze für die Proteingröße existiert, ab der ein erfolgreicher post-translationaler Transport im Säuger nicht mehr möglich ist. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Histatin 3 und Statherin künstlich verlängert.

Dafür wurden die Plasmide so verändert, dass die kodierende Sequenz des reifen Proteinteils (rT) hinter der Signalsequenz vervielfacht wurde. Die am C-terminalen Ende des reifen Teils befindlichen Methioninreste wurden zur besseren radioaktiven Markierung zwischen die einzelnen reifen Teile gesetzt (Abb. 4.7). Außerdem wurden Varianten kloniert, die diese

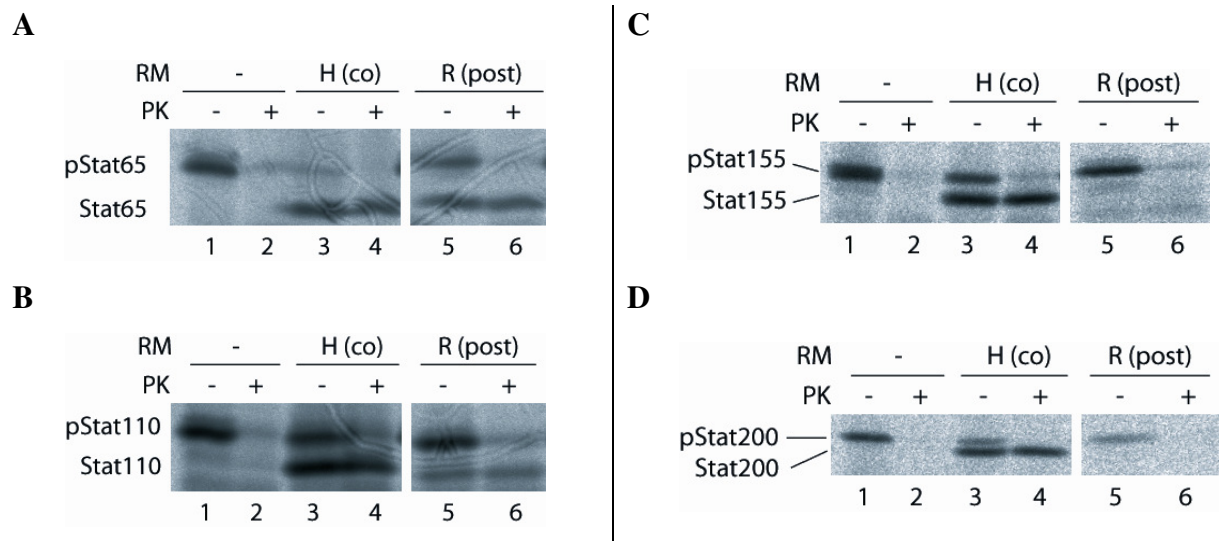
Methioninreste nur einmalig am C-Terminus des verlängerten Proteins besaßen, um durch die parallele Verwendung beider Varianten einen Einfluss der Methioninreste auf das Transportergebnis auszuschließen. Die Plasmide wurden anschließend *in vitro* transkribiert und die erhaltene mRNA in Translokationsstudien zum co- und post-translationalen Transport in Hunde- bzw. Rindermikrosomen verwendet.



**Abb. 4.7: Schematische Übersicht der verlängerten Varianten.** Die Signalsequenz des Translationsprodukts ist hell abgehoben, die in blau eingefärbten reifen Teile (rT) des Statherins werden von jeweils drei Methioninresten (orange) abgeschlossen.

Während das Ursprungprotein (65 AS, 1rT) mit sehr guter Effizienz post-translational in den Rindermembranen transportiert werden kann, nimmt die Translokationsrate bei einer Verdopplung des reifen Teils (110 AS, 2rT) leicht ab, bleibt aber auf einem hohen Niveau (Abb. 4.8, A, B). Verdreifacht man den reifen Teil (155 AS, 3rT), so lässt sich eine Transportbande nur noch schattenhaft erahnen (C), sie ist jedoch nicht vor dem proteolytischen Abbau geschützt. Das auf 200 Aminosäuren (4rT) verlängerte Protein kann nicht mehr post-translational in Rindermembranen transportiert werden (D). Die Varianten, die nur am C-Terminus des Proteins über drei zusätzliche Methioninreste verfügten, wiesen das gleiche Transportverhalten auf (nicht gezeigt). Wie aus Abb. 4.8, Bahn 3 ersichtlich, konnten alle verlängerten Formen in den Hundemikrosomen unter co-translationalen Voraussetzungen transportiert werden. Diese Kontrolle zeigt, dass es keine grundsätzliche Einschränkung der Transportfähigkeit durch die Verlängerung gab. Die Prozessierung des Proteins und der Schutz vor der Proteinase K sind demzufolge unabhängig von der Proteinelänge möglich, wenn die Polypeptidkette durch einen erfolgreichen Transport das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums erreicht hat.

Die Resultate der Histatin 3-Verlängerung gleichen denen der Statherin-Verlängerung. Auch hier können nur die Varianten mit 54 (1rT) bzw. 69 (2rT) Aminosäuren sowohl post-translational in Rindermembranen als auch co-translational in Hundemikrosomen transportiert werden. Die Histatin-3-Varianten mit verdreifachtem (124 AS) oder vervierfachtem (159 AS) reifen Teil konnten nur co-translational transportiert werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.8: Post-translationaler Proteintransport mit verlängerten Säugersubstraten ist oberhalb von 154 Aminosäuren Länge nicht möglich.** Die Verlängerung wurde durch die Kombination mehrerer gleicher reifer Proteinteile mit der Signalsequenz erzielt. Die Proteine enthalten (A) einen reifen Proteinteil (65 AA), (B) zwei reife Teile (110 AA), (C) drei reife Teile (155 AA) oder (D) vier reife Teile (200 AA). Die Zugabe von Mikrosomen erfolgte entweder zu Beginn der Translation (Hund, H, co) oder nach Inhibition der vollzogenen Translation (Rind, R, post). Die Ansätze wurden geteilt und jeweils eine Hälfte vor der gelelektrophoretischen Auftrennung mit Proteinase K (PK) verdaut.

Die Ergebnisse zeigen, dass artifiziell verlängerte Substrate des post-translationalen Transportwegs ab einer Länge zwischen 111 und 124 Aminosäureresten ihre translationsunabhängige Transportfähigkeit verlieren können.

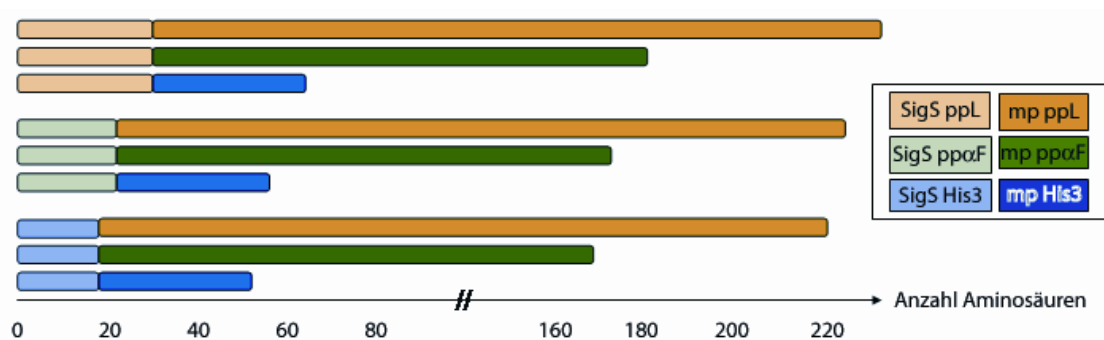
#### 4.4 Einfluss der Signalsequenz auf das Transportverhalten

Wie die Ergebnisse in Abschnitt 4.3 gezeigt haben, beeinflusst die Länge des Proteins die Wahl des Transportwegs. Proteine, die kürzer als 46 Aminosäurereste sind, können nur noch post-translationale transportiert werden, während Proteine, die artifiziell auf mehr als 110 Aminosäuren verlängert wurden, nur noch in Abhängigkeit der Elongation in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums gelangen können. Wie aber wird die Entscheidung für Proteine getroffen, denen beide Wege offenstehen? Bestimmt die Signalsequenz eventuell nicht nur grundsätzlich darüber, ob ein Protein in das Endoplasmatische Retikulum gelangt, sondern auch welchen Weg dorthin es bevorzugt?

Um diese Frage zu beantworten wurden die Signalsequenzen dreier Translokationssubstrate mit unterschiedlichen Transporteigenschaften vertauscht. Histatin 3 (His3) diente als Vertreter der post-translationale translozierbaren Säugerproteine und der kurzen Proteine. Das Rinder-

protein Präprolaktin (ppL) ist ein rein co-translational transportierbares Protein und mit 229 Aminosäuren das längste der Substrate. Das Hefehormon pp $\alpha$ -Faktor (pp $\alpha$ F) stellt im Säuger ein heterologes Substrat dar. Dennoch kann es sowohl co-translational in Hundemikrosomen als auch post-translational in Rindermikrosomen transportiert werden. Erstaunlich ist dabei vor allem die Möglichkeit zur post-translationalen Translokation in Säugermikrosomen, da es mit 175 Aminosäuren deutlich oberhalb der in Abschnitt 4.3 entdeckten Grenze von 111-123 Aminosäuren liegt. In diesen Austauschexperimenten sollte daher außerdem herausgefunden werden, ob die Fähigkeit des pp $\alpha$ -Faktors zur post-translationalen Translokation in der Signalsequenz oder in der Sequenz des reifen Proteinteils begründet ist.

Die Klonierung zum Signalsequenzaustausch erfolgte ohne weitere Veränderungen in den verwendeten Abschnitten der Ursprungproteine. Die in der Ausgangssequenz von Histatin 3 enthaltenen zusätzlichen Methioninreste am C-Terminus wurden beibehalten. Eine Übersicht über die Größen der Konstrukte liefert Abb. 4.9.

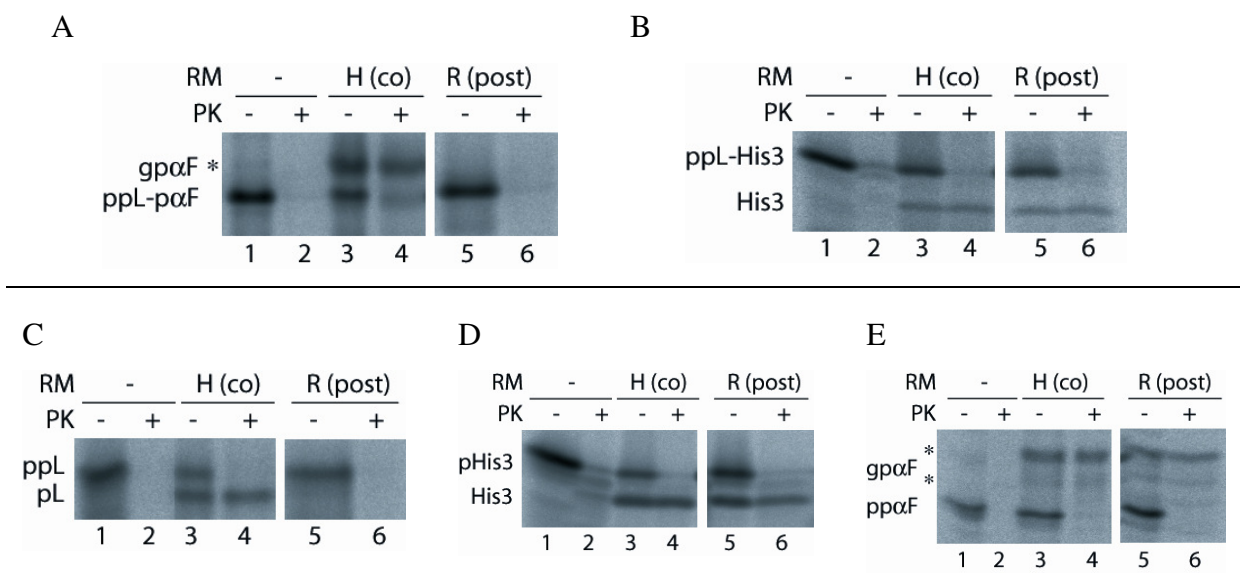


**Abb. 4.9: Schematische Darstellung der Proteinelänge nach Austausch der Signalsequenz.** Die Abbildung zeigt eine Übersicht der bei einem Austausch der Signalsequenzen entstehenden Proteingrößen. Orangefarbene Balken stellen Präprolaktin (ppL) dar, grüne Balken den pp $\alpha$ -Faktor (pp $\alpha$ F), blaue Balken Histatin 3 (His3). Die Signalsequenzen sind jeweils heller.

Alle Konstrukte ließen sich *in vitro* transkribieren und translatieren. Die Transkripte wurden anschließend in co-translationalen Transportversuchen in Anwesenheit von Hundemembranen translatiert. Alternativ wurden die Proteine zunächst ohne Membranzugabe im Retikulozytenlysat gebildet, bevor die Elongation durch Zugabe von Cycloheximid gestoppt wurde und nach kurzer Inkubationszeit Rindermikrosomen zugefügt wurden. Die Transportversuche wurden mehrfach durchgeführt. In einigen dieser Wiederholungen wurden vor der Membranzugabe zusätzlich die Ribosomen entfernt, ohne dass es zu einer Auswirkung auf das post-translationalen Transportverhalten kam.

#### 4.4.1 Die Signalsequenz von ppL kann post-translational erkannt werden

Tauscht man die Signalsequenz des post-translational translozierbaren pp $\alpha$ -Faktors gegen die Signalsequenz des co-translationalen Transportsubstrats ppL aus (ppL-p $\alpha$ F, Abb. 4.10, A), so wird ein post-translationaler Transport in Rindermikrosomen unterbunden (Bahn 5). Ein co-translationaler Transport in Hundemikrosomen ist hingegen möglich (Bahn 3). Dies entspricht der Erwartung, da auch das ursprüngliche ppL translationsabhängig in Hundemembranen transloziert werden kann (C). Darüber hinaus bedeutet der co-translationaler Transport des Mischproteins auch, dass das künstlich erzeugte Protein grundsätzlich translokationsfähig ist und modifiziert werden kann. Auffällig ist aber, dass die glykosylierte Form des p $\alpha$ -Faktors (gp $\alpha$ F) ein vergleichsweise geringes Molekulargewicht hat, wenn eine andere Signalsequenz den Transport in das ER dirigiert. Die Glykosylierungsbande verläuft bei rund 25 kDa, während die beiden Glykosylierungsbanden des ursprünglichen pp $\alpha$ -Faktors bei etwa 28 kDa (zweifach glykosyliert) und 38 kDa (dreifach glykosyliert) liegen (E).



**Abb. 4.10: Einfluss der ppL-Signalsequenz auf das Transportverhalten.** Die Signalsequenzen von pp $\alpha$ -Faktor (A) und Histatin 3 (B) wurden gegen die Signalsequenz von ppL ausgetauscht. Es wurde versucht, die dadurch entstandenen Proteine co-translational in Hundemembranen (H) und post-translational in Rindermembranen (R) zu transportieren. Die Doppelschreibweise des unprozessierten Proteins gibt dabei im ersten Teil den Ursprung der Signalsequenz an und im zweiten Namensbestandteil den Ursprung des reifen Teils. Die Bilder C-E zeigen die als Kontrolle verwendeten Ursprungsproteine zum Vergleich.

Wird die Signalsequenz von ppL stattdessen vor den reifen Teil des post-translationalen Translokationssubstrats Histatin 3 gesetzt, so ist neben dem co-translationalen Transport zusätzlich

ein effizienter post-translationaler Transport in Rindermembranen möglich (ppL-His3, B, Bahn 5). Die Transportrate ist dabei aber geringer als beim unveränderten Histatin 3 (D).

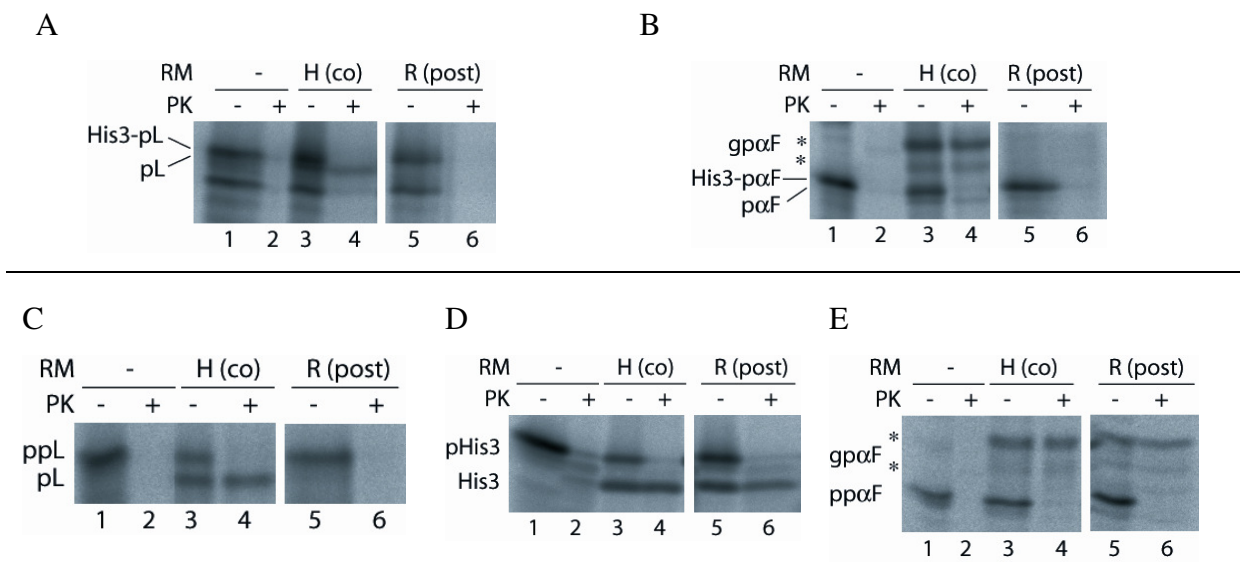
Dieses Ergebnis bedeutet daher, dass die Signalsequenz von ppL nicht in der Lage ist, die elongationsunabhängige Translokation eines Proteins zu verhindern. Stattdessen kann sie auch post-translational erkannt werden. Der Erfolg des translationsunabhängigen Transports wird dabei vom reifen Teil bestimmt.

#### ***4.4.2 Die Signalsequenz von Histatin 3 erzwingt keinen post-translationalen Transport***

Nachdem gezeigt wurde, dass ein Fusionsprotein der Signalsequenz von ppL mit dem reifen Teil von Histatin 3 post-translational transportiert werden kann, wurde als nächstes getestet, ob umgekehrt auch die Signalsequenz von Histatin 3 den reifen Teil von ppL dazu zwingen kann post-translational transloziert zu werden. Wie in Abb. 4.11, A (His3-pL) gezeigt wird, kann die Signalsequenz von Histatin 3 nicht den post-translationalen Transport eines co-translationalen Transportsubstrats ermöglichen (Bahn 5), das Mischprotein kann ausschließlich co-translational transportiert werden (Bahn 3). Die im unteren Bereich des Gels sichtbare Bande ist nur ein während der Translation entstehendes Artefakt, das nicht proteasegeschützt ist.

Erstaunlicherweise vermittelt die Signalsequenz von Histatin 3 den post-translationalen Transport jedoch auch dann nicht, wenn sie mit dem reifen Teil eines Proteins kombiniert wird, das post-translational translozierbar ist (His3-p $\alpha$ F). So ist in der Bahn 5 der Abb. 4.11 (B) keine glykosylierte Form des  $\alpha$ -Faktors erkennbar. Die schwache Bande unterhalb des Translationsproduktes, die auf eine Entfernung der Signalsequenz hinweisen könnte, ist nicht proteasegeschützt. Gegen einen zumindest partiellen Transport des Proteins spricht auch, dass diese Bande in vergleichbarer Intensität bereits bei der membranfreien Translationskontrolle vorliegt. Der co-translationalen Transport des aus der Signalsequenz von Histatin 3 und dem reifen Teil von pp $\alpha$ -Faktor gebildeten Proteins ist möglich. Die Transportrate ist mit dem ursprünglichen pp $\alpha$ -Faktor vergleichbar. Die glykosylierten Banden des Fusionsproteins befinden sich anscheinend in geringerem Abstand zum untransportierten Protein als beim Ursprungprotein (E), so dass angenommen werden könnte, dass auch hier eine andere Zuckerstruktur angeheftet wurde. Dieser Effekt entsteht jedoch vermutlich erst dadurch, dass beide Proben nicht gemeinsam auf einem Gel aufgetrennt werden konnten und sich die Trennungsstrecke daher unterschied. Vergleicht man die mit Hilfe eines Proteinstandards berechneten Molekulargewichte, so liegt auch die obere Bande des Mischproteins bei etwa 38 kDa.

Um das Ergebnis besser mit dem Transportverhalten der Ursprungsproteine vergleichen zu können, sind diese in der Abbildung erneut dargestellt (C-E).



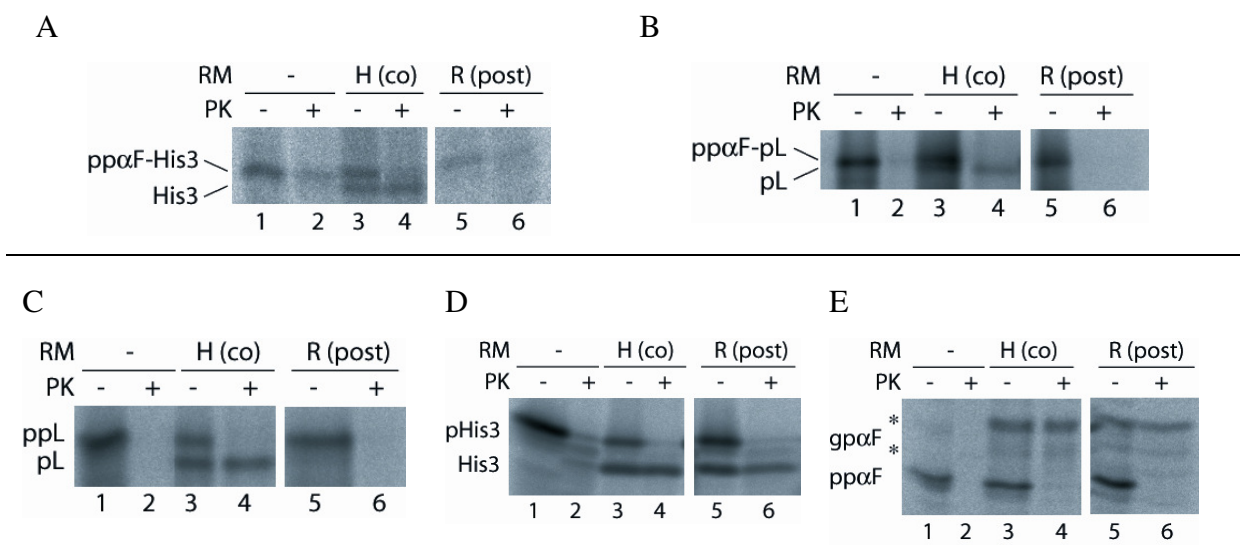
**Abb. 4.11: Austausch der Signalsequenzen gegen die Histatin 3-Signalsequenz.** Die Signalsequenzen von ppL (A) und ppα-Faktor (B) wurden gegen die Signalsequenz von Histatin 3 ausgetauscht. Die dadurch entstandenen Proteine wurden co-translational mit Hundemembranen (H) und post-translational mit Rindermembranen (R) inkubiert. Die Bilder C-E zeigen die Ursprungsproteine zum Vergleich.

#### 4.4.3 Die Signalsequenz des ppα-Faktors verhindert den post-translationalen Transport von Histatin 3 im Säuger

Die Signalsequenz des Säugersubstrats Histatin 3 kann anscheinend nicht über den Transportweg bestimmen und die reifen Teile anderer Proteine zum translationsunabhängigen Transport befähigen. Ob dies auch für die Signalsequenzen anderer post-translationaler Substratproteine zutrifft, sollte durch die Verwendung der Signalsequenz des ppα-Faktors getestet werden.

Dabei erstaunte es, dass der reife Teil des Histatin 3 in Kombination mit der Signalsequenz des ppα-Faktors nicht elongationsunabhängig transportiert werden konnte (ppαF-His3, Abb. 4.12, A, Bahn 5), obwohl der post-translationale Transport in Rindermembranen bei beiden Substraten in ihrer Ursprungsform mit hohen Translokationsraten möglich ist (Abb. 4.12, D, E). Außerdem handelt es sich bei dem ppα-Faktor/Histatin 3 Mischprotein um ein mit 57 Aminosäuren sehr kurzes Protein, das aufgrund seiner geringen Länge eine größere Wahrscheinlichkeit besitzt post-translationale transportiert werden zu können. Besonders verwunderlich ist die fehlende post-translationale Transportoption des ppα-Faktor/Histatin 3-Fusionsproteins, da

Histatin 3 trotz eines Signalsequenzaustausches gegen die Signalsequenz des co-translationalen Transportsubstrats ppL translationsunabhängig transportiert werden kann (vgl. Abb. 4.10, B). Eine geringfügige Veränderung der Proteinlänge oder das reine Fehlen der proteineigenen Signalsequenz verhindern den post-translationalen Transport demnach nicht zwangsläufig. Allerdings ist das Mischprotein aus pp $\alpha$ -Faktor und Histatin 3 auch das einzige, das sich nur sehr schlecht translatieren ließ, schwache Banden eines translozierten Proteins könnten daher unterhalb der Detektionsgrenze liegen. Hinzu kommt, dass das Ergebnis aufgrund der schwachen Translationseffizienz im Gegensatz zu den anderen Varianten nur auf einem einzelnen Transportversuch basiert.



**Abb. 4.12: Einfluss der pp $\alpha$ F-Signalsequenz auf den Transport von ppL und Histatin 3.** Die Signalsequenzen von pp $\alpha$ -Faktor (A) und Histatin 3 (B) wurden gegen die Signalsequenz von pp $\alpha$ F ausgetauscht. Die dadurch entstandenen Proteine wurden in co-translationalen und post-translationalen Transportversuchen mit Hunde- (H) bzw. Rindermembranen (R) eingesetzt. Die Bilder C-E zeigen zum Vergleich die Transporteigenschaften der Ursprungproteine.

Da sich der reife Teil von ppL nicht durch die Signalsequenz des post-translationalen Transportsubstrats Histatin 3 elongationsunabhängig transportieren ließ (vgl. Abb. 4.11, A), war bereits anzunehmen, dass auch die Signalsequenz des pp $\alpha$ -Faktors keinen Einfluss auf das Transportverhalten von ppL hat (pp $\alpha$ F-pL, Abb. 4.12, B). Die Signalsequenz des Hefeproteins pp $\alpha$ -Faktor kann jedoch unabhängig vom reifen Teil mit der co-translationalen Transportmaschinerie des Säugers interagieren, da alle Proteine mit dieser Signalsequenz translationsabhängig transloziert werden konnten (Abb. 4.12, A, B, E, jeweils Bahn 3). Als Orientierungs-

hilfe sind in der Abb. 4.12 erneut die Transportergebnisse für die Ursprungssubstrate abgebildet.

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Daten, dass die Signalsequenz nicht die alleinige Entscheidungsgewalt über den Transportweg hat. Neben dem Einfluss der Signalsequenz wurde eine erhöhte Wahrscheinlichkeit dafür vermutet, dass der reife Teil des Histatin 3 aufgrund seiner geringen Länge unabhängig von der verwendeten Signalsequenz translationsunabhängig transportiert werden konnte. Diese Vermutung hat sich nicht bestätigt, auch der reife Teil von Histatin 3 kann nur dann post-translational transloziert werden, wenn das Zusammenspiel mit der Signalsequenz stimmt. Dies setzt jedoch nicht voraus, dass es sich um die Signalsequenz eines post-translationalen Transportsubstrats handelt. Der pp $\alpha$ -Faktor konnte hingegen nur in seiner ursprünglichen Zusammensetzung post-translational transportiert werden. Weder die Signalsequenz noch der reife Teil sind unabhängig voneinander ausreichend, um ein Protein translationsunabhängig in Säugermembranen zu transportieren. Die co-translationale Translokation hingegen steht allen getesteten Proteinkombinationen offen.

## 5 Diskussion

Der co-translationale Transport sekretorischer Proteine in das Endoplasmatische Retikulum (ER) des Säugers ist seit einigen Jahrzehnten bekannt und weitreichend erforscht. Auch der post-translationale Transportweg in der Hefe und der dafür benötigte Sec62/63-Komplex wurden ausführlich betrachtet. Hingegen ist über die Möglichkeit des post-translationalen Transports im Säuger trotz der Entdeckung homologer Proteine zu Sec62 und Sec63 durch Meyer *et al.* [2000] und Tyedmers *et al.* [2000] nur wenig bekannt. In Ermangelung geeigneter Substratproteine wurden bisher nur post-translationale Translokationsstudien publiziert, die mit Frosch-, Hefe- und Insektenproteinen durchgeführt wurden [Zimmermann & Mollay, 1986; Schlenstedt & Zimmermann, 1987; Müller & Zimmermann, 1988; Garcia & Walter, 1988; Zimmermann *et al.*, 1990a; Grau, 2003]. Ob auch Säugerproteine die Möglichkeit zur post-translationalen Translokation besitzen, konnte bislang nicht gezeigt werden. Ziel dieser Arbeit war daher, auf Basis geeigneter Substratproteine des Säugers festzustellen, ob ein post-translationaler Transportweg im Säuger vorhanden ist und diesen sowie seine Substrate gegebenenfalls zu charakterisieren.

### 5.1 Entdeckung und Charakterisierung des post-translationalen Transports im Säuger

Als experimentelle Grundlage zur Untersuchung des post-translationalen Proteintransports in das ER des Säugers wurde ein *in vitro* Translokationssystem entwickelt, bei dem humane Proteine (Histatin 1, Histatin 3, Statherin) in Membranvesikel (Mikrosomen) transportiert werden, welche aus dem ER verschiedener Säuger präpariert wurden. Dabei gelang es zu zeigen, dass die humanen Substratproteine unabhängig von der Translation und von Ribosomen in das Endoplasmatische Retikulum gelangen können und dass die Proteine im Lumen des ERs modifiziert werden können. Durch die geschickte Auswahl der verwendeten Mikrosomen war es darüber hinaus möglich, den co- und den post-translationalen Transport getrennt voneinander zu betrachten. Dies ist nicht selbstverständlich, da experimentell nicht unterschieden werden kann, ob ein Protein bei der co-translationalen Zugabe von Membranvesikeln wirklich translationsabhängig in diese hineintransportiert wird oder erst nach Abschluss der Translation. Durch die Verwendung von Hundemembranen, die ausschließlich einen co-translationalen Transport vermitteln konnten, gelang es nachzuweisen, dass die Substratproteine neben dem post-translationalen Transportweg auch co-translational transloziert werden können. Die Einschränkung auf

die co-translationale Transportoption bei Hundemikrosomen gilt jedoch nicht grundsätzlich, da eine andere Präparation zum post-translationalen Transport befähigt ist (Daten nicht gezeigt). Die Ursache wird daher in der schwankenden Qualität der verschiedenen Präparationen gesehen. Die für den post-translationalen Transport verwendeten Rindermikrosomen hingegen verhinderten ebenso wie Mikrosomen aus dem Schafpankreas (Daten nicht gezeigt) bereits in sehr niedrigen Konzentrationen vollständig die Translation. Eine hemmende Wirkung von Mikrosomen auf die *in vitro* Translation ist seit langem bekannt, sie tritt auch bei Hundemikrosomen auf, wenn diese in zu hoher Konzentration zugesetzt werden. Der oder die an der Inhibition beteiligten Faktoren wurden bislang nicht identifiziert. Die zusätzliche intrinsische Hemmung der Rindermembranen sorgte bei den im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Experimenten neben dem Einsatz des Elongationsinhibitors Cycloheximid dafür, dass ein co-translationaler Transport bei post-translationaler Membranzugabe vollständig ausgeschlossen werden kann.

Zur Charakterisierung des Transportwegs wurde zunächst die Abhängigkeit des Transports von Energie untersucht. Grundsätzlich konnte eine ATP-Abhängigkeit der Translokation gezeigt werden. Auffällig bei den Ergebnissen ist aber, dass der Transport von Statherin und den Histatinen durch die ATP-Abreicherung mit Apyrase nicht beeinflusst wurde, während sowohl die Translokation von pp $\alpha$ F als auch die des kleinen Froschproteins GLa inhibiert wurde. Für beide Kontrollproteine wurde in der Vergangenheit eine ATP-Abhängigkeit gezeigt [Rothblatt & Meyer, 1986; Waters & Blobel, 1986; Schlenstedt & Zimmermann, 1987]. Da jedoch die ATP-Depletion mit Hexokinase, die im Vergleich zu Apyrase effektiver ist, den Transport der kleinen Säugerproteine verhindert, ist davon auszugehen, dass der ATP-Bedarf zur post-translationalen Translokation der kleinen Säugerproteine lediglich reduziert ist.

Die Depletion des ATPs erfolgt wahrscheinlich sowohl auf der zytosolischen als auch auf der luminalen Seite des ERs. Zwar sind weder Apyrase noch Hexokinase in der Lage, durch die ER-Membran in das Lumen zu gelangen, dafür existiert aber ein noch nicht genauer identifizierter ATP-Transporter in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums. Dieser Transporter funktioniert vermutlich nach dem Antiporter-Prinzip, das heißt die Einschleusung von ATP ist an die gleichzeitige Ausschleusung von ADP oder AMP gekoppelt [Clairmont *et al.*, 1992; Mayinger & Meyer, 1993; Kochendörfer *et al.*, 1999; Leroch *et al.*, 2008]. Für den ATP-Haushalt im Lumen des ERs bedeutet dies, dass bei einer zytosolischen ATP-Depletion kein ATP nachgeliefert werden kann und dass das luminal ATP eventuell aufgrund von Gleichge-

wichtsreaktionen gegen zytosolisches ADP/AMP ausgetauscht wird, so dass nach und nach auf beiden Seite der Membran kaum noch ATP vorhanden ist.

Die Verbraucher des ATPs sind vermutlich vornehmlich Chaperone. Die Chaperone auf der zytosolischen Seite halten die translatierten Substratproteine in einem translokationskompetenten Zustand [Chirico *et al.*, 1988; Deshaies *et al.*, 1988; Dierks *et al.*, 1996; Hartl *et al.*, 2011]. Bei der Bindung von Chaperonen handelt es sich, wie bei biochemischen Reaktionen üblich, nicht um eine kovalente Bindung beider Partner, sondern um eine Gleichgewichtsreaktion zwischen Bindung und Ablösung der Partner voneinander. Die Bindungstasche ist im ATP-gebundenen Zustand offen. Durch ATP-Hydrolyse zu ADP schließt sich die Tasche, die Affinität für das Substrat steigt [Bukau & Horwich, 1998]. Während vor der Translokation ein transportkompatibler Zustand notwendig ist, müssen sich die zytosolischen Chaperone direkt vor dem Transport durch den Kanal wieder ablösen, da sie sonst wie ein Stöpsel wirken können und den Zugang zum Kanal verwehren [Dorner *et al.*, 1990]. Zur Öffnung der Bindungstasche und der damit verbundenen Freigabe des Substrats ist der Austausch von ADP zu ATP nötig. Dafür muss freies ATP in der Umgebung verfügbar sein.

Die benötigte Zahl funktionsfähiger Chaperone zur Aufrechterhaltung eines transportkompatiblen Zustands hängt dabei nicht ausschließlich von der Substratgröße ab, da sich Statherin und GLa nur um eine Aminosäure in der Länge unterscheiden (65 bzw. 64 Aminosäuren), aber einen unterschiedlichen ATP-Bedarf für die post-translationale Translokation aufweisen. Vergleicht man beide Proteine hinsichtlich ihrer Hydrophobizität, so fällt auf, dass Statherin ebenso wie Histatin 1 und 3 C-terminal von der Signalsequenz nur vereinzelt hydrophobe Reste besitzt. Bei GLa handelt es sich bei rund 45% der Aminosäuren des reifen Proteinabschnitts um hydrophobe Seitenketten (Tabelle 5.1). Es ist anzunehmen, dass GLa in Abwesenheit einer ausreichenden Zahl funktionsfähiger Chaperone sehr schnell eine zufällige Faltungsstruktur einnimmt um seine hydrophoben Aminosäureseitenketten in der wässrigen, polaren Umgebung des Retikulozytenlysats abzuschirmen und damit nicht mehr translokationskompetent ist. Eventuell wird außerdem die Signalsequenz im Rahmen dieser Aggregation durch andere Bereiche des Proteins abgeschirmt, so dass kein *Targeting* an die Membran mehr stattfinden kann.

Im Gegensatz dazu ist es denkbar, dass der relativ hydrophile reife Proteinteil von Statherin und den Histatinen weniger leicht aggregiert und dass diese Substratproteine deshalb weniger Chaperone brauchen als GLa. Nutzt man *online* verfügbare Methoden zur Sekundärstrukturvoraussage (JPred Software der Universität Dundee), so weist GLa deutlich mehr Bereiche auf, für die eine Faltung vorhergesagt wird, als die Histatine oder Statherin. Dies unterstützt die

Vermutung eines vergleichsweise geringeren Chaperonbedarfs der Histatine und des Statherins zur Aufrechterhaltung eines transportkompatiblen Zustands.

Die für den post-translationalen Transport des pp $\alpha$ -Faktors benötigte ATP-Konzentration wird neben der relativen Hydrophobizität seines reifen Proteinteils zusätzlich durch die Länge beeinflusst, da bei 175 Aminosäuren wahrscheinlich eine entsprechend größere Zahl von Chaperonen benötigt wird.

### GLa

MYKQIFLCLIIAALCATIMA EASAFADADE DDDKRYVRGM ASKAGAIAIGK IAKVALKALG

### Statherin

MKFLVFAFIL ALMVSMIGAD SSEEKFLRRI GRFGYGYGPY QPVPEQPLYP QPYQPQYQQY

### Histatin 1

MKFFVFALVL ALMISMISAD SHEKRHHGYR RKFHEKHSH REFPPFYGDYD SNLYDN

### Histatin 3

MKFFVFALIL ALMLSMTGAD SHAKRHHGYK RKFHEKHSH RGYRSNLYD N

### pp $\alpha$ -Faktor

MRFPSIFTAV LFAASSALAA PVNTTTEDET AQIPAEAVIG YLDLEGDFDV AVL PFSNSTN  
 NGLLFINTTI ASIAAKEEGV SLDKREAEAW HWLQLKPGQP MYKREAEAEA WHWLQLKPGQ  
 PMYKREADAE AHWLQLKPG QPMYKREADA EAWHWLQLKP GQPMY

---

**Tabelle 5.1: Übersicht zur Hydrophobizität post-translationaler Substratproteine.** Die hydrophoben Aminosäuren wurden in dick und grün gedruckt, die Signalsequenzen sind unterstrichen.

---

Ein ausgeprägt hydrophober Bereich, den alle Substratproteine besitzen, ist die Signalsequenz. Da diese jedoch schon im Ribosomenkanal eine stabilisierende  $\alpha$ -Helixstruktur einnehmen kann, ist es denkbar, dass keine zytosolischen Chaperone benötigt werden, um eine unkontrollierte Faltung dieses Bereichs zu verhindern [Knoops *et al.* 2011]. Alternativ ist es möglich, dass eine niedrige ATP-Konzentration, wie sie nach der Depletion mit Apyrase verbleibt, bereits ausreichend ist um die Signalsequenz mit Hilfe einer geringen Anzahl funktionsfähiger Chaperone translokationskompetent zu halten. Die Proteine, deren reifer Proteinteil ohne unterstützende Chaperone translokationskompetent bleibt, könnten dann auch bei niedrigen ATP-Konzentrationen transportiert werden, während der Transport von Proteinen mit einem hohen Chaperonbedarf wie beispielsweise GLa inhibiert ist. Kommt es hingegen durch den Einsatz von Hexokinase zur vollständigen Depletion, so dass gegebenenfalls auch eine Stabilisierung der hydrophoben Signalsequenz ausgeschlossen wird, dann können auch Statherin und die

Histatine nicht mehr post-translational transportiert werden, da die Signalsequenz aufgrund von zufälligen Faltungsstrukturen nicht mehr erkannt werden kann.

Aber auch auf der luminalen Seite des Endoplasmatischen Retikulums können Chaperone am Transport beteiligt sein. So ist das luminale Chaperon Kar2p im post-translationalen Transport der Hefe für den Ratschenmechanismus verantwortlich, indem es den Rücktransport bei der Brown'schen Molekularbewegung unterbindet [Vogel *et al.*, 1990; Sanders *et al.*, 1992; Dierks *et al.*, 1996; Liebermeister *et al.*, 2001]. Tyedmers *et al.* [2003] zeigten für den Säuger, dass BiP, ein zu Kar2p homologes Protein, zumindest im co-translationalen Transport eine unterstützende Funktion besitzt, indem es an die Polypeptidketten bindet, die das Lumen erreicht haben. Es liegt infolgedessen nahe, auch beim post-translationalen Transport des Säugers einen solchen Ratschenmechanismus zu vermuten. Daher könnte die Ursache des unterschiedlichen ATP-Bedarfs verschiedener Substrate auch darin liegen, dass das zytosolische ATP sowohl durch Apyrase als auch durch Hexokinase effektiv depletiert wurde, während das luminal vorliegende ATP erst durch Hexokinase vollständig verbraucht wird. Dies wäre beispielsweise der Fall, wenn sich das Konzentrationsgleichgewicht für ATP auf beiden Seiten der Membran nur langsam einstellt. Verläuft die Depletion mit Apyrase ebenfalls langsam, so reicht die Zeit zur Einstellung des Gleichgewichts nicht aus, der ATP-Anteil im Lumen ist höher. Dies würde bedeuten, dass zytosolische Chaperone inaktiviert sind, im Lumen des ERs aber noch geringe ATP-Konzentrationen verbleiben, die für die Funktionsfähigkeit der luminalen Chaperone ausreichend sind. Ein translokationskompetentes Protein könnte folglich auch bei einer geringen Restkonzentration von ATP mit Hilfe des Ratschenmechanismus transportiert werden. Verläuft die Depletion mit Hexokinase hingegen schneller als mit Apyrase, so ist im Anschluss an die Verschiebung des Gleichgewichts durch die zytosolische ATP-Depletion mehr Zeit für die „Ausschleusung“ des luminalen ATPs vorhanden. Das hätte zur Folge, dass sich auch die ATP-Konzentration im Lumen unterhalb der Schwelle befindet, ab der Chaperone aktiv sind. Der post-translationalen Transport nach dem Ratschenmodell könnte dann, auch unabhängig vom zytosolischen Chaperonbedarf des Substrats, nicht mehr stattfinden.

Neben ATP wird durch beide verwendeten Enzyme auch GTP depletiert. Die wichtigsten bekannten GTP-Verbraucher während des ER-Transports sind die im Inneren der Ribosomen stattfindende Translokation der naszierenden Kette von der A- zur P-Stelle während der Elongation und die Ablösung des *Signal Recognition Particle* vom SRP-Rezeptor nach der Übergabe der Signalsequenz an das Translokon. Der hier betrachtete post-translationalen Proteintransport ist jedoch unabhängig von der Elongation und vom SRP, weshalb diese Schritte zur Erklärung der unterschiedlichen Energieabhängigkeit keine Rolle spielen.

Die als Substrat eingesetzten Histatine weisen gegenüber Prokaryonten eine membranaktive Wirkung auf, deren Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist [Naglik *et al.*, 2003; Raj *et al.*, 1994; Helmerhorst *et al.*, 1999; Raj *et al.*, 1998; Edgerton *et al.*, 1998; Mochon & Liu, 2008]. Zwar besitzen Säugermembranen *in vivo* Schutzmechanismen, die einen Angriff auf das ER des Säugers ausschließen. Allerdings könnten diese Schutzmechanismen *in vitro* durch veränderte pH-Werte oder Salzkonzentrationen außer Kraft gesetzt werden. Daher musste zunächst ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem beobachteten Transport in die Membranvesikel um eine spontane Translokation handelt.

Die Feststellung, dass der Transport der Substratproteine energieabhängig ist, ist dabei nur ein kleines Indiz dafür, dass er nicht spontan verläuft. Da es sich bei den wahrscheinlichsten ATP-Verbrauchern jedoch um lösliche Chaperone handelt, konnte durch dieses Experiment nicht eindeutig nachgewiesen werden, dass ein Transportsystem in der ER-Membran an der Translokation beteiligt ist. Daher sollte im nächsten Schritt die Abhängigkeit von membranständigen Proteinen untersucht werden.

Hierzu wurden chemische Inhibitoren des ER-Transports eingesetzt. N-Ethylmaleimid (NEM) ist ein Sulfhydrylgruppen alkylierendes Reagenz, das auf verschiedene Bestandteile der Translokationsmaschinerie, wie beispielsweise den SRP-Rezeptor oder den Kanalbildner Sec61 $\alpha$  (imp34), wirkt [Walter *et al.*, 1981; Kellaris *et al.*, 1991; Klappa *et al.*, 1994]. Die nachgewiesene Sensitivität beider Wege gegenüber einer NEM-Behandlung der Mikrosomen beim Transport kleiner Proteine zeigt, dass offensichtlich in der Membranpräparation enthaltene Proteine benötigt werden. Rückschlüsse auf die Abhängigkeit des gerichteten Substrattransports von konkreten Bestandteilen des Translokationsapparates sollten jedoch aufgrund der geringen Substratspezifität der Alkylierung durch NEM nicht gezogen werden.

Eine Benutzung des Sec61-Komplexes war aufgrund der NEM-Experimente naheliegend, diese Annahme musste jedoch durch einen weiteren Versuch abgesichert werden. Um die Sec61-Abhängigkeit des Transports zu bestätigen, wurden beide Transportwege mit Eeyarestatin I (ES1) gehemmt. Laut der Veröffentlichung durch Cross *et al.* [2009] unterbindet ES1 die Interaktion der Signalsequenz mit dem Kanal. Die Assoziation der Signalsequenz mit dem Translokon stellt einen Ankerpunkt dar, durch den das „Einfädeln“ der naszierenden Kette in den Kanal erleichtert und das dafür zur Verfügung stehende zeitliche Fenster vergrößert wird [Plath *et al.*, 2004]. Dies ist bei der post-translationalen Translokation besonders wichtig, da der Transport in das Innere des Kanals im Gegensatz zum translationsgesteuerten Transport nur durch die weitestgehend ungeordnet stattfindende Brown'sche Molekularbewegung erzielt wird. Wäre die Polypeptidkette nicht zumindest zeitweise punktuell mit dem Kanal verbunden, wäre eine

Translokation nur erschwert möglich, da sich das Protein wahllos im Zytoplasma bewegen würde.

Während Cross *et al.* [2009] klar zeigen konnten, dass durch ES1 die Bindung der naszierenden Kette an den Kanal unterbrochen wird und beispielsweise nicht nur die Wechselwirkung mit SRP beeinträchtigt ist, stellt die Eingrenzung auf den Sec61-Komplex als Interaktionspartner lediglich eine auf den damals bekannten Daten basierende Vermutung dar. Ein Jahr später wurde gezeigt, dass Sec62 im Säuger aufgrund eines evolutionären Funktionszugewinns (*Gain-of-function*) auch im co-translationalen Transport als Ribosomenrezeptor in Frage kommt [Panzner *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 2010]. Da das Sec62 der Hefe eine Funktion als Signalsequenzrezeptor besitzt, liegt es nahe, eine solche Funktion auch für Sec62 des Säugers zu postulieren [Müsch *et al.*, 1992; Lyman & Schekman, 1997; Dünwald *et al.*, 1999; Wittke *et al.*, 2000; Plath *et al.*, 2004]. Daher sollte bei der Betrachtung des post-translationalen Transports Sec62 als mögliches Angriffsziel für Eeyarestatin I nicht außer Acht gelassen werden. Allerdings ist die Bindung der Signalsequenz an Sec62 zumindest für den SRP-abhängigen Transportweg nicht essentiell. Ein co-translatonaler Transport benötigt in den meisten Fällen lediglich den trimeren Sec61-Komplex und den SRP-Rezeptor [Görllich & Rapoport, 1993]. Ein ausschließlicher Effekt von ES1 auf Sec62 würde daher den co-translationalen Transport nicht vollständig inhibieren, folglich muss Sec61 betroffen sein.

Neben Sec61 wird auch p97/VCP durch Eeyarestatin I gehemmt. Dabei handelt es sich um ein zytosolisches Protein, das am Abbau falsch gefalteter Proteine durch das Proteasom beteiligt ist. Die Inhibition erfolgt durch eine Änderung der Konformation von p97 [Wang *et al.*, 2010]. Da im Versuch nur die Membranen mit ES1 behandelt wurden, während der Translationsansatz unbehandelt blieb, kann aber ausgeschlossen werden, dass p97 in diesem Experiment durch Eeyarestatin I gehemmt wird.

Ob daneben weitere Proteine mit Eeyarestatin I reagieren können und welchen Einfluss diese potentiellen Reaktionen auf die Inhibition des Proteintransports in das Endoplasmatische Retikulum haben, lässt sich nicht mit Sicherheit feststellen. Versuche von Cross *et al.* [2009] mit chemisch verwandten Substanzen ohne inhibierende Wirkung auf den Transport in das ER weisen aber darauf hin, dass es sich um eine relativ spezifische Reaktion handelt.

Obwohl Experimente mit chemischen Inhibitoren immer nur Hinweise auf mögliche Mechanismen liefern können, da nur sehr selten unbemerkte Reaktionen mit anderen, unbekanntem Reaktionspartnern vollständig ausgeschlossen werden können, lassen sich durch die Kombination verschiedener Inhibitoren mit gleichen bekannten Wirkungszielen Rückschlüsse auf das Trans-

portverhalten ziehen. Sowohl für N-Ethylmaleimid als auch für Eeyarestatin I wurde eine Reaktion mit Sec61 $\alpha$  beschrieben. Da beide Inhibitoren den post-translationalen Transport der kleinen Substratproteine ebenso hemmten wie die co-translationale Translokation dieser und anderer Substrate, ist davon auszugehen, dass die Histatine und Statherin Sec61-abhängig in das ER-Lumen transloziert werden.

## 5.2 Untersuchung der transportbestimmenden Substrateigenschaften

Wie in den anfänglichen Experimenten gezeigt wurde, können die ausgewählten Substratproteine sowohl co- als auch post-translational transportiert werden. Um zu identifizieren, ab welcher Länge die Proteine tatsächlich zur post-translationalen Translokation gezwungen sind bzw. wo die Minimallänge für den co-translationalen Transport liegt, wurden die Substrate durch Klonierungen vom C-Terminus ausgehend zunächst gekürzt. Die zur verbesserten radioaktiven Markierung angefügten Methioninreste wurden beibehalten. Ausgenutzt wurde bei den Transportexperimenten, dass die verwendeten Membranen aus dem Hundepankreas nicht in der Lage sind, Proteine unter strikt post-translationalen Bedingungen zu translozieren, während unter co-translationalen Bedingungen ein effizienter Transport stattfindet. Ein post-translationaler Transport der Substratproteine konnte in Rindermembranen beobachtet werden. Die experimentellen Ergebnisse weisen auf eine Minimallänge für den translationsabhängigen Transport zwischen 42 und 46 Aminosäureresten hin, da sich die auf 42 Aminosäuren verkürzte Variante ebenso wie kürzere Proteine bis zur minimal getesteten Länge von 34 Aminosäuren nur noch in Rindermikrosomen, aber nicht mehr in Hundemembranen translozieren lässt.

Der Wert von 46 Aminosäuren liegt deutlich unterhalb der Grenze von ca. 70 Aminosäuren, die ein Protein besitzt, wenn es aufgrund von SRP in seiner Elongation arretiert wurde [Walter & Blobel, 1981b; Zimmermann *et al.*, 1990b]. Mindestens 30 der jeweils zuletzt synthetisierten Aminosäuren liegen im ribosomalen *Exit Tunnel* verborgen, sie können dabei bereits  $\alpha$ -Helix- oder  $\beta$ -Faltblattstrukturen einnehmen [Knoops *et al.* 2011]. Damit ist ein vollständiger Austritt der rund 20 Aminosäuren langen Signalsequenz bei einer Gesamtlänge von 46 Aminosäuren bis zur Termination der Translation nicht möglich. Dies setzt mindestens zwei Dinge für den SRP-abhängigen Transport voraus: Zum einen muss eine Bindung von SRP schon an eine partielle Signalsequenz stattfinden, zum anderen muss sich SRP bereits in unmittelbarer Nähe des Ribosoms befinden. Flanagan *et al.* [2003] wiesen eine Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von 8 nM für SRP mit Komplexen aus Ribosomen und naszierenden Ketten

(RNCs) nach, bei denen sich die Signalsequenz noch vollständig im Ribosomentunnel befindet. Das in der Veröffentlichung verwendete Konstrukt umfasste 35 Aminosäuren. Dieser  $K_D$ -Wert gleicht der Affinität von SRP für Ribosomen, deren Translationsprodukt keine Signalsequenz besitzt und unterscheidet sich signifikant von der Dissoziationskonstante zwischen SRP und nicht-translatierenden Ribosomen (71 nM). Dies zeigt eine deutliche Anziehungskraft auf SRP durch die Translation, hervorgerufen durch eine noch nicht näher bestimmte strukturelle Veränderung des Ribosoms. Ist eine Signalsequenz aus dem *Exit Tunnel* ausgetreten, so verbessert sich die Affinität proteinabhängig auf eine Dissoziationskonstante zwischen 0,05 nM und 0,38 nM. Laut Goder *et al.* [2000] reicht eine aus dem Ribosom ausgetretene Signalsequenzlänge von 10 Aminosäuren zur Erkennung durch SRP aus. Aufgrund der räumlichen Nähe zwischen SRP und dem *Exit Tunnel* ist es daher denkbar, dass eine Bindung von SRP an ein 46 Aminosäuren langes Peptid stattfindet.

Unklar ist, ob es zu einer Auflösung der helikalen Struktur der Signalsequenz kommt, wodurch die SRP-Bindung an kurze Substrate unterstützt werden würde. So konnten Wilson & Beckmann [2011] zeigen, dass sich  $\alpha$ -Helices, die im ribosomalen *Exit Tunnel* gebildet wurden, auch wieder auflösen können, bevor sie aus dem Ribosom austreten. Bringt man eine  $\alpha$ -Helix auf die ausgestreckte Länge, so verdoppelt sich die Proteinelänge in dem betroffenen Bereich ungefähr, ein größerer Abschnitt der Signalsequenz würde zur SRP-Bindung zur Verfügung stehen. Allerdings ist fraglich, ob eine gestreckte Signalsequenz zur Bindung an SRP geeignet ist. Diese Frage wurde noch nicht gezielt untersucht. Strukturdaten, die zur Aufklärung der SRP-Bindung an die Signalsequenz verwendet werden, weisen aber immer eine helikale Struktur der Signalsequenz auf [Clemons *et al.*, 1999; Frauenfeld *et al.*, 2011]. Gefaltete Bereiche im reifen Teil von Statherin oder Histatin 3 sind nicht durch Programme zur Strukturvorhersage prognostiziert. Die „Entstauchung“ leicht komprimierter Bereiche würde keinen signifikanten Längenzugewinn bedeuten. Eventuell könnte dies aber erklären, warum Walter & Blobel [1981b] erst bei 70 Aminosäuren einen SRP-vermittelten Translationsarrest nachweisen konnten: Da sich jedes Protein im Ribosomenkanal anders verhält, wird das in der Veröffentlichung verwendete ppL möglicherweise stärker gestaucht und gefaltet als andere Proteine. Daher müssen gegebenenfalls mehr Aminosäuren synthetisiert werden, bis eine zur SRP-Bindung ausreichende Anzahl aus dem *Exit Tunnel* austritt. Die Sekundärstrukturvorhersage unterstützt diese Vermutung, da für ppL neben der  $\alpha$ -Helix im Bereich der Signalsequenz (Aminosäuren 10-25) eine ausgeprägte helikale Struktur zwischen den Aminosäuren 45 und 74

prognostiziert wird. Dadurch ist bei ppL ein vergleichsweise großer Längenunterschied zwischen der helikalen und der gestreckten Form möglich.

Neben dem klassischen co-translationalen Transportweg existiert bei co-translationaler Membranzugabe möglicherweise eine Transportmöglichkeit, die unabhängig vom SRP-abhängigen *Targeting* ist. Dabei wird ausgenutzt, dass nicht-translatierende Ribosomen, die an der ER-Membran gebunden sind, zur Initiation der Translation fähig sind [Schaletzky & Rapoport, 2006; Potter *et al.*, 2001; Potter & Nicchitta, 2002]. Das Ribosom löst sich erst dann von der Membran, wenn aus dem *Exit Tunnel* eine Polypeptidkette austritt, die keine Signalsequenz besitzt. Ist die Signalsequenz der naszierenden Kette jedoch aufgrund der geringen Proteidlänge zu großen Teilen im Ribosomenkanal verborgen, wie dies bei den verkürzten Varianten der Fall ist, so ist ab einer zu geringen Länge auch die Interaktion mit dem Kanal verhindert. Die Polypeptidkette würde dann vermutlich bei der Termination der Translation durch eine Trennung der ribosomalen Untereinheiten in das Zytosol entlassen. Diese Argumentation wird durch Vernetzungsexperimente mit Konstrukturen ohne Stoppkodon unterstützt, bei denen es erst bei einer minimalen Kettenlänge zwischen 43 und 51 Aminosäuren zu einer Verknüpfung zwischen Signalsequenz und Sec61 kam [Jungnickel & Rapoport, 1995]. Berücksichtigt man, dass Vernetzungsreagenzien über einen Abstandshalter (*Spacer*) verfügen und Verknüpfungen nur zu definierten Aminosäuren möglich sind, so befindet sich dieser Wert im Bereich der im Rahmen der vorliegenden Arbeit detektierten Untergrenze von 46 Aminosäuren, die für einen co-translationalen Transport benötigt werden.

Auch im post-translationalen Transport kommt es zu Beginn der Translokation zu einer Interaktion der Signalsequenz mit dem Translokon. Da die Signalsequenz nach der Termination der Translation und der damit verbundenen Ablösung der Ribosomen aber nicht mehr versteckt ist, kann diese unabhängig von der Länge des Proteins an das Translokon binden. Im Anschluss erfolgt der elongationsunabhängige Transport über die ER-Membran.

Bei der Suche nach geeigneten Substraten für den post-translationalen Transport wurden gezielt kurze Proteine ausgewählt, da diese aufgrund ihrer geringen Länge unter Umständen nicht mehr mit SRP wechselwirken oder translationsabhängig transportiert werden können und so gezwungen sind, den post-translationalen Weg zu verwenden. Nachdem eine Längenuntergrenze für den co-translationalen Weg gefunden werden konnte, stellte sich umgekehrt die Frage, ob es eine Obergrenze für die Länge gibt, ab der ein post-translationaler Transportweg nicht mehr genutzt werden kann, obwohl ein co-translationaler Transport noch möglich ist. Hierzu wurden die Hundemikrosomen verwendet, die nur co-translational translozieren

können, sowie die ausschließlich post-translational einsetzbaren Rindermembranen. Alle verlängerten Proteine wurden co-translational transportiert, das heißt ein translationsgesteuerter Transport ist grundsätzlich möglich und damit einhergehend auch eine Prozessierung der Signalsequenz und der Schutz durch das Vesikel vor proteolytischem Abbau. Post-translational endet die Möglichkeit zur Translokation zwischen 111 und 124 Aminosäuren Länge. Das Hefeprotein pp $\alpha$ -Faktor hingegen kann trotz seiner Länge von 175 Aminosäuren sowohl in Hefe- als auch in Rindermembranen translationsunabhängig transportiert werden. Die bloße Länge der verlängerten Proteine scheint daher nicht alleine ausschlaggebend zu sein, um den post-translationalen Weg zu verhindern.

Die fehlende post-translational Transportoption der verlängerten Säugerproteine kann mehrere Ursachen haben. So muss vor dem post-translationalen Transport eine unspezifische Faltung verhindert werden, um das Protein translokationskompetent zu halten. Erfüllt wird diese Aufgabe in der Regel durch zytosolische Chaperone. Eine unzureichende Faltungshemmung kann vorliegen, wenn die Konzentration funktionsfähiger Chaperone nicht ausreichend (vgl. Abschnitt 5.1) oder die spezifische Aktivität für das Substrat nicht hoch genug ist.

Da die Verlängerung mit einer proteineigenen Sequenz stattgefunden hat, erscheint eine mangelnde spezifische Aktivität auf den ersten Blick unwahrscheinlich. So ist beispielsweise auch der pp $\alpha$ -Faktor aus Wiederholungen einer rund 20 Aminosäuren langen Kasette aufgebaut und kann trotz seiner Länge post-translational transloziert werden. Eine direkte Wirkung der bei der Klonierung eingefügten Methionine auf die Reaktion mit Chaperonen wird ausgeschlossen, da auch Verlängerungen ohne diese signalverstärkenden Aminosäuren dasselbe Transportverhalten aufweisen. Unbekannt ist aber, wie viele Chaperone nötig sind, um die Ursprungsform in einem ungefalteten Zustand zu halten. Wie bereits zuvor dargestellt, enthält die Sequenz des reifen Proteinteils von Histatinen oder Statherin nur wenige hydrophobe Aminosäurereste. Es ist daher hypothetisch denkbar, dass der reife Teil weitestgehend ohne den Einsatz von Chaperonen translokationskompetent bleibt und nur eine sehr geringe Affinität gegenüber Chaperonen aufweist. Verlängert man das Protein mit sich selbst, entsteht die Möglichkeit zusätzlicher Faltungsoptionen durch neue intra- und intermolekulare Wechselwirkungen, ohne dass die Chaperonaffinität zunimmt. Dadurch nimmt das Konstrukt möglicherweise translokationsinkompetente Sekundär- oder Tertiärstrukturen ein. Im co-translationalen Transport entstehen diese translokationsinhibierenden Strukturen nicht, da die Translation an die Translokation gekoppelt ist und aus dem Ribosom austretende Aminosäurereste zeitnah transloziert werden.

Wäre ungeachtet der Substrataffinität die Konzentration aktiver Chaperone grundsätzlich limitiert, so dürfte auch der deutlich längere pp $\alpha$ -Faktor nicht transloziert werden. Es ist daher davon auszugehen, dass die spezifischen Eigenschaften der Substrate für den Erfolg des Transports entscheidend sind.

Um dies näher zu untersuchen und den Einfluss der Signalsequenz bei der Wahl des Transportweges zu testen, wurden Austauschexperimente zwischen Proteinen mit unterschiedlichen Eigenschaften durchgeführt. Es wurden jeweils die Signalsequenz und der reife Proteinteil zweier Proteine neu zusammengefügt.

Das 229 Aminosäuren lange Rinderprotein Präprolaktin (ppL) gilt als Standard für eine rein co-translationale Translokation in Hundemikrosomen, ein post-translationaler Transport ist nicht möglich. Das Hefeprotein pp $\alpha$ -Faktor ist das einzige der verwendeten Proteine, das sowohl in Säuger- als auch in Hefemembranen auf beiden Transportwegen transloziert werden kann. Dies ist besonders erstaunlich, weil es sich um ein verhältnismäßig langes Substratprotein handelt. Histatin 3, mit 54 Aminosäuren ein Vertreter der kleinen Proteine, kann sowohl post-translationale als auch co-translationale in Säugermikrosomen transportiert werden. Kombiniert man die reifen Teile der Proteine mit anderen Signalsequenzen, so kann lediglich das aus der Signalsequenz von ppL und dem reifen Teil von Histatin 3 zusammengesetzte Protein sowohl post- als auch co-translationale transloziert werden, obwohl die Signalsequenz von einem co-translationalen Transportsubstrat stammt. Allen anderen Mischproteinen steht ausschließlich der translationsabhängige Transportweg zur Verfügung. Selbst die durch den gegenseitigen Signalsequenzaustausch der beiden post-translationalen Translokationssubstrate erzeugten Proteine waren nicht in der Lage translationsunabhängig über die Membran des Endoplasmatischen Retikulums transportiert zu werden.

Dies widerspricht der von Ng *et al.* [1996] aufgestellten Hypothese, wonach nur die Signalsequenz über den Transportweg entscheidet. Allerdings wurden für die veröffentlichten Versuche Hefestämme verwendet, bei denen durch Mutationen entweder die für den post-translationalen Weg wichtigen Proteine Sec62p und Sec63p oder die für den co-translationalen Weg benötigte SRP-Untereinheit Sec65p fehlten. Die als Substrat verwendeten Hefeproteine wurden aufgrund ihres *in vivo* Transportverhaltens in den deletierten Stämmen in drei Gruppen eingeteilt: Eine SRP-unabhängige Gruppe, eine Sec62/63-unabhängige Gruppe und eine Gruppe, bei der jede Deletion zum Fehltransport führt, das heißt die auf Teile beider Transportwege angewiesen ist. Eine rein SRP-abhängige Gruppe gab es nicht. Durch Betrachtungen der Hydrophobizität der Signalsequenzen postulierte die Arbeitsgruppe, dass die Werte der Hydrophobizitätsplots von

SRP-unabhängigen Substraten auf der Kyte-Doolittle-Skala nicht oberhalb von +2,0 liegen, während SRP-abhängige Proteine Hydrophobizitätswerte bis +3,5 erreichen können [Ng *et al.*, 1996; Kyte & Doolittle, 1982].

Betrachtet man die Signalsequenzen der zum Austausch verwendeten Proteine mit dem „ProtScale Analysis“ Programm ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) bei der von Ng *et al.* [1996] benutzten Fenstergröße von 11, so fällt auf, dass zwar der pp $\alpha$ -Faktor ein Hydrophobizitätsmaximum bei +2,0 hat. Die Maxima von Histatin 3 und ppL liegen mit rund +3,2 bzw. +2,8 aber beide oberhalb von +2,0 und sollten damit laut des Postulats von Ng *et al.* nur SRP-abhängig transloziert werden. Im Versuch differieren die Proteine in ihrer Fähigkeit zum post-translationalen Transport aber deutlich, ppL kann nur co-translational transloziert werden. Allerdings ist die Signalsequenz von ppL trotzdem dazu geeignet, den post-translationalen Transport zu vermitteln, wenn sich ein geeigneter reifer Proteinteil anschließt. Eine Erklärung dafür könnte die Ähnlichkeit des Hydrophobizitätsmaximums von ppL mit dem des post-translationalen Transportsubstrat Histatin 3 darstellen. Den geeigneten Proteinteil könnte in diesem Fall Histatin 3 deshalb darstellen, weil der reife Teil verhältnismäßig kurz ist und vermutlich von luminalen Chaperonen erkannt wird, wenn diese benötigt werden. Die reifen Teile hingegen unterscheiden sich vor allem in der Länge sehr deutlich, das 229 Aminosäuren lange ppL liegt oberhalb der zuvor definierten Grenze von 110 Aminosäuren für Säugersubstrate. Daher ist es sehr unwahrscheinlich, dass der reife Teil von ppL translationsunabhängig transportiert werden kann, selbst wenn die Signalsequenzen von ppL oder Histatin 3 dazu geeignet sind.

Vergleicht man die Signalsequenzen der drei Ausgangsproteine hingegen bezüglich Länge und Ladung miteinander, so fällt auf, dass sich Histatin 3 und der pp $\alpha$ -Faktor ähnlicher sind als Histatin 3 und ppL (Tabelle 5.2). Trotzdem kann die Signalsequenz des pp $\alpha$ -Faktors nur mit dem dazugehörigen reifen Teil post-translational transloziert werden, selbst in Kombination mit dem kurzen reifen Teil des Histatin 3 ist ein post-translationaler Transport ausgeschlossen. Die Ursache könnte sein, dass die Chaperone des Säugers eventuell auf die Erkennung von Säugerproteinen spezialisiert sind. Bei heterologen Substraten könnte bei der Erkennung des Gesamtproteins die Toleranzbreite der Chaperone gegenüber unterschiedlichen Proteinstrukturen geringer sein. Damit ein langes, heterologes Substrat überhaupt post-translational im Säuger transportiert werden kann, könnte eine Optimierung der Gesamtstruktur vorausgesetzt sein. Eine solche Ausnahme mit einer optimierten Struktur könnte der pp $\alpha$ -Faktor eventuell darstellen. Im diesem Fall würden bereits relativ geringfügige Veränderungen in der Primärse-

quenz, die das Zusammenspiel aus Signalsequenz und reifem Teil beeinflussen, zu einer vollständigen Inhibition des Transports führen.

### Histatin 3

MKFFVFALIL ALMLSMTGAD SHAKRHHGYK RK**FHEK**HHSR GY**RS**NYLY**D** NMMM

### pp $\alpha$ F

MRFPSIFTAV LFAASSALAA PVNTT**TEDE**T AQIPAEAVIG YSD**LEGD****FDV** AVLPPFSNSTN NGLL (...)

### ppL

MDSKGSSQKG SRLLLLLVVS NLLLCQGVVS TPVCPNGPGN CQVSL**RD****LF**D RAVMVSHYIH **DL** (...)

---

**Tabelle 5.2: Ladungsverteilung im N-Terminus der Substratproteine.** Rote, dickgedruckte Buchstaben markieren negativ geladene (saure) Aminosäurereste, blaue, dicke Schrift zeigt positive (basische) Reste. Die Signalsequenz ist unterstrichen, hydrophobe Aminosäuren in der Signalsequenz sind grün und kursiv gedruckt. Die Primärsequenzen von pp $\alpha$ -Faktor und ppL sind nicht vollständig.

---

Auffällig in den von Ng *et al.* [1996] gezeigten Daten ist außerdem, dass es bei den vorrangig co-translational translozierten Substraten zu einer Verschiebung des Hydrophobizitätsmaximums in C-terminaler Richtung kommt. Eine derartige Verschiebung weist auch das co-translational transportierte Substrat ppL auf. Die Verschiebung des Maximums bedeutet, dass der Beginn der Signalsequenz bei post-translational transportierten Substraten hydrophober ist als bei co-translational transportierten Proteinen. Dennoch kann die Signalsequenz von ppL post-translational erkannt werden. Die Verschiebung deutet daher ebenso wenig wie die Höhe des Hydrophobizitätsmaximums auf ein exklusives Kriterium zur Wahl des Transportwegs hin.

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass die von Ng *et al.* [1996] aufgestellte These nach der alleinigen Entscheidungsgewalt der Signalsequenz für einen Transportweg nicht für Substrate des Säugers gültig ist. Dies könnte daran liegen, dass sich das Hefesystem, für das die Theorie aufgestellt worden war, und das Säugersystem in ihrer Komplexität unterscheiden. Ein eindeutiges Kriterium, aufgrund dessen der Transportweg gewählt wird, ist in den Versuchen zum Transport von Säugerproteinen nicht zu erkennen. Anstelle eines einzelnen Kriteriums wie in der Hefe handelt es sich beim Säuger vielmehr um ein Zusammenspiel vieler Faktoren wie der Hydrophobizität, der Ladung, der Proteinlänge oder der Affinität für zytosolische und luminale Chaperone.

## 6 Zusammenfassung

Der Proteintransport über biologische Membranen ist ein essentieller Prozess in Eukaryonten. Da die meisten Proteine im Zytosol der Zelle translatiert werden, viele dort jedoch nicht ihren endgültigen Einsatzort besitzen, werden einige der Proteine zunächst in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, um von dort aus gegebenenfalls an ihren Bestimmungsort innerhalb oder außerhalb der Zelle zu gelangen.

Während in höheren Eukaryonten wie dem Säuger nur der translationsgekoppelte („co-translational“) Proteintransport in das Endoplasmatische Retikulum gut erforscht ist, existiert in niederen Eukaryonten wie der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* darüber hinaus ein alternativer Transportweg, der elongationsunabhängig („post-translational“) ist. Für den Säuger wurden bislang noch keine säugereigenen Substratproteine nachgewiesen, die eine vergleichbare post-translational Translokation durchführen können, obwohl für einige Bestandteile der post-translationalen Transportmaschinerie der Hefe Entsprechungen im Säuger existieren. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation aufgeklärt werden, ob im Säuger natürliche Proteine existieren, die post-translational in das ER translozieren können und welche besonderen oder gemeinsamen Eigenschaften diese Proteine aufweisen.

Es konnte für mehrere Proteine des Säugers nachgewiesen werden, dass diese *in vitro* translations- und ribosomenunabhängig – das heißt der Definition des post-translationalen Transports entsprechend – in ER-Membranvesikel aus dem Rind transportiert werden können. Der Transport erfolgt energieabhängig und in Abhängigkeit von membranständigen Proteinen, darunter mit großer Wahrscheinlichkeit das kanalbildende Sec61 $\alpha$ . Überraschenderweise waren die eingesetzten Proteine neben der post-translationalen Translokation auch in der Lage den co-translationalen Transportweg zu verwenden, das heißt sie können sich für einen der Wege entscheiden. Die co-translational Transportoption endete jedoch, wenn die Proteinlänge unterhalb von 46 Aminosäuren lag. Es konnte gezeigt werden, dass die Entscheidung über den Transportweg nicht allein durch die Signalsequenz getroffen wird, sondern erst die Kombination verschiedener Eigenschaften, wie beispielsweise der Länge, Hydrophobizität oder Ladung darüber bestimmt, ob ein Protein co- oder post-translational transportiert werden kann.

## 7 Literaturverzeichnis

ANTONIN, W., MEYER, H.A., HARTMANN, E. (2000): Interactions between Spc2p and other components of the endoplasmic reticulum translocation sites of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **275**, 44, 34068-34072

AULD, K.L., HITCHCOCK, A.L., DOHERTY, H.K., FRIETZE, S., HUANG, L.S., SILVER, P.A. (2006): The Conserved ATPase Get3/Arr4 Modulates the Activity of Membrane-Associated Proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **174**, 1, 215-227

BEATRIX, B., SAKAI, H., WIEDMANN, M. (2000): The alpha and beta subunit of the nascent chain polypeptide-associated complex have distinct functions. *J Biol Chem*, **275**, 48, 37838-37845

BECKMANN, R., BUBECK, D., GRASSUCCI, R., PENCZEK, P., VERSCHOOR, A., BLOBEL, G., FRANK, J. (1997): Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science*, **278**, 5346, 2123-2126

BESSONNEAU, P., BESSON, V., COLLINSON, I., DUONG, F. (2002): The SecYEG preprotein translocation channel is a conformationally dynamic and dimeric structure. *EMBO J*, **21**, 5, 995-1003

BLOBEL, W., DOBBERSTEIN, B. (1975a): 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

BORGESE, N., MOK, W., KREIBICH, G., SABATINI, D.D. (1974): Ribosomal-membrane interaction: In vitro binding of ribosomes to microsomal membranes. *J Mol Biol*, **88**, 3, 559-580

BRADSHAW, N., NEHER, S.B., BOOTH, D.S., WALTER, P. (2009): Signal sequences activate the catalytic switch of SRP RNA. *Science*, **323**, 5910, 127-130

BRODSKY, J.L., GOECKELER, J., SCHEKMAN, R. (1995): BiP and Sec63p are required for both co- and post-translational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *PNAS USA*, **92**, 9643-9646

BUKAU, B., HORWICH, A.L. (1998): The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, **92**, 3, 351-366

CHANG, Y.W., CHUANG, Y.C., HO, Y.C., CHENG, M.Y., SUN, Y.J., HSIAO, C.D., WANG, C. (2010): Crystal structure of Get4-Get5 complex and its interactions with Sgt2, Get3, and Ydj1. *J Biol Chem*, **285**, 13, 9962-9970

CHAVAN, M., YAN, A., LENNARZ, W.J. (2005): Subunits of the translocon interact with components of the oligosaccharyl transferase complex. *J Biol Chem*, **280**, 24, 22917-22924

- CHIRICO, W.J. (1992): Dissociation of complexes between 70 kDa stress proteins and presecretory proteins is facilitated by a cytosolic factor. *Biochem Biophys Res Commun*, **189**, 2, 1150-1156
- CHIRICO, W.J., WATERS, M.G., BLOBEL, G. (1988): 70k heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, **332**, 805-810
- CLAIRMONT, C.A., DE MAIO, A., HIRSCHBERG, C.B. (1992): Translocation of ATP into the lumen of rough endoplasmic reticulum-derived vesicles and its binding to luminal proteins including BiP (Grp 78) and GRP 94. *J Biol Chem*, **267**, 6, 3983-3990
- CLEMONS JR., W.M., GOWDA, K., BLACK, S.D., ZWIEB, C., RAMAKRISHNAN, V. (1999): Crystal structure of the conserved subdomain of human protein SRP54M at 2.1 Å resolution: evidence for the mechanism of signal peptide binding. *J Mol Biol*, **292**, 3, 697-705
- CLEMONS JR., W.M., MÉNÉTRÉ, J.F., AKEY, C.W., RAPOPORT, T.A. (2004): Structural inside into the protein translocation channel. *Curr Opin Struct Biol*, **14**, 4, 390-396
- 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**, 4, 599-610
- CROSS, B.C., MCKIBBIN, C., CALLAN, A.C., ROBOTI, P., PIACENTI, M., RABU, C., WILSON, C.M., WHITEHEAD, R., FLITSCH, S.L., POOL, M.R., HIGH, S., SWANTON, E. (2009): Eeyarestatin I inhibits Sec61-mediated protein translocation at the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*, **122**, Pt 23, 4393-4400
- DAIMON, M., SUSAKI, S., SUZUKI, K., KATO, T., YAMATANI, K., SASAKI, H. (1997): Identification of a human cDNA homologue to the Drosophila translocation protein 1 (Dtrp1). *Biochem Biophys Res Commun*, **230**, 1, 100-104
- DEL ALAMO, M., HOGAN, D.J., PECHMANN, S., ALBANESE, V., BROWN, P.O., FRYDMAN, J. (2011): Defining the specificity of cotranslationally acting chaperones by systematic analysis of mRNAs associated with ribosome-nascent chain complexes. *PLoS Biol*, **9**, 7, e1001103
- DEMPSKI JR., R.E., IMPERIALI, B. (2002): Oligosaccharyl transferase: gatekeeper to the secretory pathway. *Curr Opin Chem Biol*, **6**, 6, 844-850
- DESHAIES, R.J., KOCH, B.D., WERNER-WASHBURNE, M., CRAIG, E.A., SCHEKMAN, R. (1988): A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature*, **332**, 800-805
- DESHAIES, R.J., SANDERS, S.L., FELDHEIM, D.A., SCHEKMAN, R. (1991): Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature*, **349**, 6312, 806-808
- DESHAIES, R.J., SCHEKMAN, R. (1987): A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **105**, 2, 633-645

- DIERKS, T., VOLKMER, J., SCHLENSTEDT, G., JUNG, C., SANDHOLZER, U., ZACHMANN, K., SCHLOTTERHOSE, P., NEIFER, K., SCHMIDT, B., ZIMMERMANN, R. (1996): A microsomal ATP-binding protein involved in efficient protein transport into the mammalian endoplasmic reticulum. *EMBO J*, **15**, 24, 6931-6942
- DORNER, A.J., WASLEY, L.C., KAUFMAN, R.J. (1990): Protein dissociation from GRP78 and secretion are blocked by depletion of cellular ATP levels. *PNAS USA*, **87**, 19, 7429-7432
- DÜNNWALD, M., VARSHAVSKY, A., JOHNSON, N. (1999): Detection of transient *in vivo* interactions between substrate and transporter during protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, **10**, 2, 329-344
- EDGERTON, M., KOSHLUKOVA, S.E., LO, T.E., CHRZAN, B.G., STRAUBINGER, R.M., RAJ, P.A. (1998): Candidacidal activity of salivary histatins. Identification of a histatin 5-binding protein on *Candida albicans*. *J Biol Chem*, **273**, 32, 20438-20447
- ERDMANN, F., SCHÄUBLE, N., LANG, S., JUNG, M., HONIGMANN, A., AHMAD, M., DUDEK, J., BENEDIX, J., HARSMAN, A., KOPP, A., HELMS, V., CAVALIÉ, A., WAGNER, R., ZIMMERMANN, R. (2011): Interaction of calmodulin with Sec61 $\alpha$  limits Ca<sup>2+</sup> leakage from the endoplasmic reticulum. *EMBO J*, **30**, 1, 17-31
- EVANS, E.A., GILMORE, R., BLOBEL, G. (1986): Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *PNAS USA*, **83**, 3, 581-585
- FANG, H., GREEN, N. (1994): Nonlethal sec71-1 and sec72-1 mutations eliminate proteins associated with the Sec63p-BiP complex from *S. cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **5**, 9, 933-942
- FELDHEIM, D., SCHEKMAN, R. (1994): Sec72p contributes to the selective recognition of signal peptides by the secretory polypeptide translocation complex. *J Cell Biol*, **126**, 4, 935-945
- FELDHEIM, D., YOSHIMURA, K., ADMON, A., SCHEKMAN, R. (1993): Structural and functional characterization of Sec66p, a new subunit of the polypeptide translocation apparatus in the yeast endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, **4**, 9, 931-939
- FLANAGAN, J.J., CHEN, J.C., MIAO, Y., SHAO, Y., LIN, J., BOCK, P.E., JOHNSON, A.E. (2003): Signal recognition particle binds to ribosome-bound signal sequences with fluorescence-detected subnanomolar affinity that does not diminish as the nascent chain lengthens. *J Biol Chem*, **278**, 20, 18628-18637
- FRAUENFELD, J., GUMBART, J., SLUIS, E.O., FUNES, S., GARTMANN, M., BEATRIX, B., MIELKE, T., BERNINGHAUSEN, O., BECKER, T., SCHULTEN, K., BECKMANN, R. (2011): Cryo-EM structure of the ribosome-SecYE complex in the membrane environment. *Nat Struct Mol Biol*, **18**, 5, 614-621
- GARCIA, P.D., WALTER, P. (1988): Full-length prepro-alpha-factor can be translocated across the mammalian microsomal membrane only if translation has not terminated. *J Cell Biol*, **106**, 4, 1043-1048

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**, 2, 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**, 2, 470-477

GODER, V., CROTTET, P., SPIESS, M. (2000): *In vivo* kinetics of protein targeting to the endoplasmic reticulum determined by site-specific phosphorylation. *EMBO J*, **19**, 24, 6704-6712

GÖRLICH, D., HARTMANN, E., PREHN, S., RAPOPORT, T.A. (1992b): A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature*, **357**, 6373, 47-52

GÖRLICH, D., PREHN, S., HARTMANN, E., KALIES, K-U., RAPOPORT, T. (1992a): A mammalian homolog of Sec61p and SecY is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell*, **71**, 489-503

GÖRLICH, D., RAPOPORT, T. (1993): Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, **75**, 615-630

GRAU, H. (2003): Charakterisierung des post-translationalen Proteintransports im Säuger. Dissertationsschrift

GUMBART, J., SCHULTEN, K. (2006): Molecular dynamics studies of the archaeal translocon. *Biophys J*, **90**, 7, 2356-2367

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**, 6977, 808-814

HANEIN, D., MATLACK, K.E., JUNGNIKEL, B., PLATH, K., KALIES, K.U., MILLER, K.R., RAPOPORT, T.A., AKEY, C.W. (1996): Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell*, **87**, 4, 721-732

HARADA, Y., LI, H., WALL, J.S., LENNARZ, W.J. (2011): Structural studies and the assembly of the heptameric post-translational translocon complex. *J Biol Chem*, **286**, 4, 2956-2965

HARTL, F.U., BRACHER, A., HAYER-HARTL, M. (2011): Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, **475**, 324-332

HARTMANN, E., GÖRLICH, D., KOSTKA, S., OTTO, A., KRAFT, R., KNESPEL, S., BÜRGER, E., RAPOPORT, T.A., PREHN, S. (1993): A tetrameric complex of membrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Eur J Biochem*, **214**, 2, 375-381

HARTMANN, E., SOMMER, T., PREHN, S., GÖRLICH, D., JENTSCH, S., RAPOPORT, T.A. (1994): Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature*, **367**, 654-657

- HELMERHORST, E.J., BREEUWER, P., VAN'T HOF, W., WALGREEN-WETERINGS, E., OOMEN, L.C., VEERMAN, E.C., AMERONGEN, A.V., ABEE, T. (1999): The cellular target of histatin 5 on *Candida albicans* is the energized mitochondrion. *J Biol Chem*, **274**, 11, 7286-7291
- HORI, O., MIYAZAKI, M., TAMATANI, T., OZAWA, K., TAKANO, K., OKABE, M., IKAWA, M., HARTMANN, E., MAI, P., STERN, D.M., KITAO, Y., OGAWA, S. (2006): Deletion of SERP1/RAMP4, a component of the endoplasmic reticulum (ER) translocation sites, leads to ER stress. *Mol Cell Biol*, **26**, 11, 4257-4267
- ITO, K., WITTEKIND, M., NOMURA, M., SHIBA, K., YURA, T., MIURA, A., NASHIMOTO, H. (1983): A temperature-sensitive mutant of *E. coli* exhibiting slow processing of exported proteins. *Cell*, **32**, 3, 789-797
- ITO, K., WITTEKIND, M., NOMURA, M., SHIBA, K., YURA, T., MIURA, A., NASHIMOTO, H. (1983): A temperature-sensitive mutant of *E. coli* exhibiting slow processing of exported proteins. *Cell*, **32**, 789-797
- JERMY, A.J., WILLER, M., DAVIS, E., WILKINSON, B.M., STIRLING, C.J. (2006): The Brl domain in Sec63p is required for assembly of functional endoplasmic reticulum translocons. *J Biol Chem*, **281**, 12, 7899-7906
- JUNGNICKEL, B., RAPOPORT, T.A. (1995): A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, **82**, 2, 267-270
- JUNNE, T., SCHWEDE, T., GODER, V., SPIESS, M. (2006): The plug domain of yeast Sec61p is important for efficient protein translocation, but is not essential for cell viability. *Mol Biol Cell*, **17**, 9, 4063-4068
- KALIES, K.U., GÖRLICH, D., RAPOPORT, T.A. (1994): Binding of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum mediated by the Sec61p-complex. *J Cell Biol*, **126**, 4, 925-934
- KALIES, K.U., RAPOPORT, T.A., HARTMANN, E. (1998): The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J Cell Biol*, **141**, 4, 887-894
- KALIES, K.U., STOKES, V., HARTMANN, E. (2008): A single Sec61-complex functions as a protein-conducting channel. *Biochim Biophys Acta*, **1783**, 12, 2375-2383
- KELLARIS, K.V., BOWEN, S., GILMORE, R. (1991): ER translocation intermediates are adjacent to a nonglycosylated 34-kD integral membrane protein. *J Cell Biol*, **114**, 1, 21-33
- KLAPPA, P., ZIMMERMANN, M., ZIMMERMANN, R. (1994): The membrane proteins TRAMP and sec61 alpha p may be involved in post-translational transport of presecretory proteins into mammalian microsomes. *FEBS Lett*, **341**, 2-3, 281-287
- KNOOPS, K., SCHOEHN, G., SCHAFFITZEL, C. (2011): Cryo-electron microscopy of ribosomal complexes in cotranslational folding, targeting, and translocation. Wiley Interdiscip Rev RNA, Online-Vorabveröffentlichung

- KOCHENDÖRFER, K.U., THEN, A.R., KEARNS, B.G., BANKAITIS, V.A., MAYINGER, P. (1999): Sac1p plays a crucial role in microsomal ATP transport, which is distinct from its function in Golgi phospholipid metabolism. *EMBO J*, **18**, 6, 1506-1515
- KUTAY, U., HARTMANN, E., RAPOPORT, T.A. (1993): A class of membrane proteins with a C-terminal anchor. *Trends Cell Biol*, **3**, 3, 72-75
- KYTE, J., DOOLITTLE, R.F. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, **157**, 1, 105-132
- LAEMMLI, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 5259, 680-685
- LEROCH, M., NEUHAUS, H.E., KIRCHBERGER, S., ZIMMERMANN, S., MELZER, M., GERHOLD, J., TJADEN, J. (2008): Identification of a novel adenosine nucleotide transporter in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, **20**, 438-451
- LI, W., SCHULMAN, S., BOYD, D., ERLANDSON, K., BECKWITH, J., RAPOPORT, T.A. (2007): The plug domain of the SecY protein stabilizes the closed state of the translocation channel and maintains a membrane seal. *Mol Cell*, **26**, 4, 511-521
- LIEBERMEISTER, W., RAPOPORT, T.A., HEINRICH, R. (2001): Ratcheting in post-translational protein translocation: a mathematical model. *J Mol Biol*, **305**, 643-656
- LYMAN, S.K., SCHEKMAN, R. (1997): Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex is regulated by BiP. *Cell*, **88**, 1, 85-96
- MAILLARD, A.P., LALANI, S., SILVA, F., BELIN, D., DUONG, F. (2007): Deregulation of the SecYEG translocation channel upon removal of the plug domain. *J Biol Chem*, **282**, 2, 1281-1287
- MARIAPPAN, M., MATEJA, A., DOBOSZ, M., BOVE, E., HEGDE, R.S., KEENAN, R.J. (2011): The mechanism of membrane-associated steps in tail-anchored protein insertion. *Nature*, **477**, 7362, 61-66
- MATLACK, K.E., MISSELWITZ, B., PLATH, K., RAPOPORT, T.A. (1999): BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro- $\alpha$  factor across the ER membrane. *Cell*, **97**, 5, 553-564
- MATLACK, K.E., WALTER, P. (1995): The 70 carboxyl-terminal amino acids of nascent secretory proteins are protected from proteolysis by the ribosome and the protein translocation apparatus of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*, **270**, 11, 6170-6180
- MAYINGER, P., MEYER, D.I. (1993): An ATP transporter is required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *EMBO J*, **12**, 2, 659-666

- MÉNÉTRET, J.F., HEGDE, R.S., AGUIAR, M., GYGI, S.P., PARK, E., RAPOPORT, T.A., AKEY, C.W. (2008): Single copies of Sec61 and TRAP associate with a nontranslating mammalian ribosome. *Structure*, **16**, 7, 1126-1137
- MÉNÉTRET, J.F., HEGDE, R.S., HEINRICH, S.U., CHANDRAMOULI, P., LUDTKE, S.J., RAPOPORT, T.A., AKEY, C.W. (2005): Architecture of the ribosome-channel complex derived from native membranes. *J Mol Biol*, **348**, 2, 445-457
- MEYER, D.I., DOBBERSTEIN, B. (1980a): A membrane component essential for vectorial translocation of nascent proteins across the endoplasmic reticulum: requirements for its extraction and reassociation with the membrane. *J Cell Biol*, **87**, 2, 498-502
- MEYER, D.I., DOBBERSTEIN, B. (1980b): 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**, 2, 503-508
- MEYER, D.I., KRAUSE, E., DOBBERSTEIN, B. (1982): Secretory protein translocation across membranes-the role of the 'docking protein'. *Nature*, **297** (5868), 647-650
- MEYER, H.A., GRAU, H., KRAFT, R., KOSTKA, S., PREHN, S., KALIES, K.U., HARTMANN, E. (2000): Mammalian Sec61 is associated with Sec62 and Sec63. *J Biol Chem*, **275**, 19, 14550-14557
- MEYER, T.H., MÉNÉTRET, J.F., BREITLING, R., MILLER, K.R., AKEY, C.W., RAPOPORT, T.A. (1999): The bacterial SecY/E translocation complex forms channel-like structures similar to those of the eukaryotic Sec61p complex. *J Mol Biol*, **285**, 4, 1789-1800
- MILLER, J.D., TAJIMA, S., LAUFFER, L., WALTER, P. (1995): The beta subunit of the signal recognition particle receptor is a transmembrane GTPase that anchors the alpha subunit, a peripheral membrane GTPase, to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*, **128**, 3, 273-282
- MISSELWITZ, B., STAECK, O., MATLACK, K.E., RAPOPORT, T.A. (1999): Interaction of BiP with the J-domain of the Sec63p component of the endoplasmic reticulum protein translocation complex. *J Biol Chem*, **274**, 29, 20110-20115
- MISSELWITZ, B., STAECK, O., RAPOPORT, T.A. (1998): J proteins catalytically activate Hsp70 molecules to trap a wide range of peptide sequences. *Mol Cell*, **2**, 5, 593-603
- MITRA, K., SCHAFFITZEL, C., SHAIKH, T., TAMA, F., JENNI, S., BROOKS, C.L. 3RD, BAN, N., FRANK, J. (2005): Structure of the *E. coli* protein-conducting channel bound to a translating ribosome. *Nature*, **438**, 7066, 318-324
- MOCHON, A.B., LIU, H. (2008): The antimicrobial peptide histatin-5 causes a spatially restricted disruption on the *Candida albicans* surface, allowing rapid entry of the peptide into the cytoplasm. *PLoS Pathog*, **4**, 10

- MOTHES, W., JUNGnickel, B., BRUNNER, J., RAPOPORT, T.A. (1998): Signal sequence recognition in cotranslational translocation by protein components of the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*, **142**, 2, 355-364
- MÜLLER, G., ZIMMERMANN, R. (1988): Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: energy requirements for membrane insertion. *EMBO J*, **7**, 3, 639-648
- MÜLLER, L., DE ESCAURIAZA, M.D., LAJOIE, P., THEIS, M., JUNG, M., MÜLLER, A., BURGARD, C., GREINER, M., SNAPP, E.L., DUDEK, J., ZIMMERMANN, R. (2010): Evolutionary gain of function for the ER membrane protein Sec62 from yeast to humans. *Mol Biol Cell*, **21**, 5, 691-703
- MÜSCH, A., WIEDMANN, M., RAPOPORT, T.A. (1992): Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane. *Cell*, **69**, 2, 343-352
- NAGAI, K., OUBRIDGE, C., KUGLSTATTER, A., MENICHELLI, E., ISEL, C., JOVINE, L. (2003): Structure, function and evolution of the signal recognition particle. *EMBO J*, **22**, 14, 3479-3485
- NAGLIK, J.R., CHALLACOMBE, S.J., HUBE, B. (2003): *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*, **67**, 3, 400-428
- NG, D.T., BROWN, J.D., WALTER, P. (1996): Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **134**, 2, 269-278
- NOEL, P., CARTWRIGHT, I.L. (1994): A Sec62p-related component of the secretory protein translocon from *Drosophila* displays developmentally complex behavior. *EMBO J*, **13**, 22, 5253-5261
- OGG, S.C., PORITZ, M.A., WALTER, P. (1992): Signal recognition particle receptor is important for cell growth and protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **3**, 8, 895-911
- PALADE, G.E. (1975): Intracellular aspects of the process of protein synthesis (secretion). *Science*, **189**, 4200, 347-358
- PANZNER, S., DREIER, L., HARTMANN, E., KOSTKA, S., RAPOPORT, T.A. (1995): Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*, **84**, 4, 561-570
- PLATH, K., MOTHES, W., WILKINSON, B.M., STIRLING, C.J., RAPOPORT, T.A. (1998): Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell*, **94**, 6, 795-807
- PLATH, K., RAPOPORT, T.A. (2000): Spontaneous release of cytosolic proteins from posttranslational substrates before their transport into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **151**, 1, 167-178

- PLATH, K., WILKINSON, B.M., STIRLING, C.J., RAPOPORT, T.A. (2004): Interactions between Sec complex and prepro-alpha-factor during posttranslational protein transport into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, **15**, 1, 1-10
- PORTER, K.R., CLAUDE, A., FULLAM, E.F. (1945): A study of tissue culture cells by electron microscopy: Methods and preliminary observations. *J Exp Med*, **81**, 3, 233-246
- POTTER, M.D., NICCHITTA, C.V. (2002): Endoplasmic reticulum-bound ribosomes reside in stable association with the translocon following termination of protein synthesis. *J Biol Chem*, **277**, 26, 23314-23320
- POTTER, M.D., SEISER, R.M., NICCHITTA, C.V. (2001): Ribosome exchange revisited: a mechanism for translation-coupled ribosome detachment from the ER membrane. *Trends Cell Biol*, **11**, 3, 112-115
- PRINZ, A., BEHRENS, C., RAPOPORT, T.A., HARTMANN, E., KALIES, K.U. (2000): Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *EMBO J*, **19**, 8, 1900-1906
- RABU, C., SCHMID, V., SCHWAPPACH, B., HIGH, S. (2009): Biogenesis of tail-anchored proteins: the beginning for the end? *J Cell Sci*, **122**, 20, 3605-3612
- RADEN, D., SONG, W., GILMORE, R. (2000): Role of the cytoplasmic segments of Sec61alpha in the ribosome-binding and translocation-promoting activities of the Sec61 complex. *J Cell Biol*, **150**, 1, 53-64
- RAJ, P.A., MARCUS, E., SUKUMARAN, D.K. (1998): Structure of human salivary histatin 5 in aqueous and nonaqueous solutions. *Biopolymers*, **45**, 1, 51-67
- RAJ, P.A., SONI, S.D., LEVINE, M.J. (1994): Membrane-induced helical conformation of an active candidacidal fragment of salivary histatins. *J Biol Chem*, **269**, 13, 9610-9619
- RAPOPORT, T.A. (2007): Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature*, **450**, 7170, 663-69
- REDMAN C.M., SIEKEVITZ P., PALADE G.E. (1966): Synthesis and transfer of amylase in pigeon pancreatic micromosomes. *J Biol Chem*, **241**, 5, 1150-1158
- 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**, 7, 1211-1221
- ROTHBLATT, J.A., DESHAIES, R.J., SANDERS, S.L., DAUM, G., SCHEKMAN, R. (1989): Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **109**, 6, 2641-2652
- ROTHBLATT, J.A., MEYER, D.I. (1986): Secretion in yeast: translocation and glycosylation of prepro-alpha-factor in vitro can occur via an ATP-dependent post-translational mechanism. *EMBO J*, **5**, 5, 1031-1036

- SADLER, I., CHIANG, A., KURIHARA, T., ROTHBLATT, J., WAY, J., SILVER, P. (1989): A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an *Escherichia coli* heat shock protein. *J Cell Biol*, **109**, 6, 2665-2675
- SANDERS, S.L., WHITFIELD, K.M., VOGEL, J.P., ROSE, M.D., SCHEKMAN, R.W. (1992): Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. *Cell*, **69**, 2, 353-365
- SCHÄGGER, H., VON JAGOW, G. (1987): Tricin-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem*, **166**, 2, 368-379
- SCHALETZKY, J., RAPOPORT, T.A. (2006): Ribosome binding to and dissociation from translocation sites of the endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell*, **17**, 9, 3860-3869
- SCHLENSTEDT, G., ZIMMERMANN, R. (1987): Import of frog prepropeptide GLa into microsomes requires ATP but does not involve docking protein or ribosomes. *EMBO J*, **6**, 3, 699-703
- SCHULDINER, M., METZ, J., SCHMID, V., DENIC, V., RAKWALSKA, M., SCHMITT, H.D., SCHWAPPACH, B., WEISSMAN, J.S. (2008): The GET complex mediates insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *Cell*, **134**, 4, 634-645
- SIEKEVITZ, P., PALADE, G.E. (1960): A cytochemical study on the pancreas of the guinea pig. 5. In vivo incorporation of leucine-1-C<sup>14</sup> into the chymotrypsinogen of various cell fractions. *J Biophys Biochem Cytol*, **7**, 619-630
- SKOWRONEK, M.H., ROTTER, M., HAAS, I.G. (1999): Molecular characterization of a novel mammalian DnaJ-like Sec63p homolog. *Biol Chem*, **380**, 9, 1133-1138
- STEFANOVIC, S., HEGDE, R.S. (2007): Identification of a targeting factor for posttranslational membrane protein insertion into the ER. *Cell*, **128**, 6, 1147-1159
- STEFER, S., REITZ, S., WANG, F., WILD, K., PANG, Y.Y., SCHWARZ, D., BOMKE, J., HEIN, C., LÖHR, F., BERNHARD, F., DENIC, V., DÖTSCH, V., SINNING, I. (2011): Structural basis for tail-anchored membrane protein biogenesis by the Get3-receptor complex. *Science*, **333**, 6043, 758-762
- SULOWAY, C.J., ROME, M.E., CLEMONS JR., W.M. (2011): Tail-anchor targeting by a Get3 tetramer: the structure of a archaeal homologue. *EMBO J*, Online-Vorabveröffentlichung
- TAJIMA, S., LAUFFER, L., RATH, V.L., WALTER, P. (1986): The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains. *J Cell Biol*, **103**, 1167-1178
- TAM, P.C., MAILLARD, A.P., CHAN, K.K., DUONG, F. (2005): Investigating the SecY plug movement at the SecYEG translocation channel. *EMBO J*, **24**, 19, 3380-3388

- TAMBORERO, S., VILAR, M., MARTINEZ-GIL, L., JOHNSON, A.E., MINGARRO, I. (2011): Membran insertion and topology of the translocating chain-associating membrane protein (TRAM). *J Mol Biol*, **406**, 4, 571-582
- TOWBIN H., STAEBELIN T., GORDON J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS USA*, **76**, 9, 4350-4354
- TYEDMERS, J., LERNER, M., BIES, C., DUDEK, J., SKOWRONEK, M.H., HAAS, I.G., HEIM, N., NASTAINCZYK, W., VOLKMER, J., ZIMMERMANN, R. (2000): Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *PNAS USA*, **97**, 13, 7214-7219
- TYEDMERS, J., LERNER, M., WIEDMANN, M., VOLKMER, J., ZIMMERMANN, R. (2003): Polypeptide-binding proteins mediate completion of co-translational protein translocation into the mammalian endoplasmic reticulum. *EMBO Rep*, **5**, 505-510
- VAN DEN BERG, B., CLEMONS JR., W.M., COLLINSON, I., MODIS, Y., HARTMANN, E., HARRISON, S.C., RAPOPORT, T.A. (2004): X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature*, **427**, 6969, 36-44
- VILARDI, F., LORENZ, H., DOBBERSTEIN, B. (2011): WRB is the receptor for TRC40/Asn1-mediated insertion of tail-anchored proteins into the ER membrane. *J Cell Sci*, **124**, 8, 1301-1307
- VOGEL, J.P., MISRA, L.M., ROSE, M.D. (1990): Loss of BiP/GRP78 function blocks translocation of secretory proteins in yeast. *J Cell Biol*, **110**, 6, 1885-1895
- VOIGT, S., JUNGNIKEL, B., HARTMANN, E., RAPOPORT, T.A. (1996): Signal-sequence dependent function of the TRAM protein during early phases of protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *J cell Biol*, **134**, 1, 25-35
- WALTER, P., BLOBEL, G. (1981b): Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. *J Cell Biol*, **91**, 557-561
- WALTER, P., BLOBEL, G. (1982): Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature*, **299**, 5885, 691-698
- WALTER, P., BLOBEL, G. (1983): Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. *Methods Enzymol*, **96**, 84-93
- WALTER, P., BLOBEL, G. (1981a): Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. II. Signal recognition protein (SRP) mediates the selective binding to microsomal membranes of in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*, **91**, 551-556

- WALTER, P., IBRAHIMI, I., BLOBEL, G. (1981): Translocation of proteins across the Endoplasmic Reticulum I. Signal recognition protein (SPR) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol*, **91**, 545-550
- WALTER, P., BLOBEL, G. (1980): Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *PNAS USA*, **77**, 12, 7112-7116
- WANG, Q., SHINKRE, B.A., LEE, J.G., WENIGER, M.A., LIU, Y., CHEN W. WIESTNER, A., TRENKLE, W.C., YE, Y. (2010): The ERAD inhibitor Eeyarestatin I is a bifunctional compound with a membrane-binding domain and a p97/VCP inhibitory group. *PLoS One*, **12**, 5, 11. Online-Publikation
- WATERS, M.G., BLOBEL, G. (1986): Secretory protein translocation in a yeast cell-free system can occur posttranslationally and requires ATP hydrolysis. *J Cell Biol*, **102**, 5, 1543-1550
- WIEDMANN, B., SAKAI, H., DAVIS, T.A., WIEDMANN, M. (1994): A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation, *Nature*, **370**, 6489, 434-440
- WILLER, M., JERMY, A.J., YOUNG, B.P., STIRLING, C.J. (2003): Identification of novel protein-protein interactions at the cytosolic surface of the Sec63 complex in the yeast ER membrane. *Yeast*, **20**, 2, 133-148
- WILSON, D.N., BECKMANN, R. (2011): The ribosomal tunnel as a functional environment for nascent polypeptide folding and translational stalling. *Curr Opin Struct Biol*, **21**, 2, 274-282
- WITKE, S., DÜNNWALD, M., JOHANSSON, N. (2000): Sec62p, a component of the endoplasmic reticulum protein translocation machinery, contains multiple binding sites for the Sec-complex. *Mol Biol Cell*, **11**, 11, 3859-3871
- YAHR, T.L., WICKNER, W.T. (2000): Evaluating the oligomeric state of SecYEG in preprotein translocase. *EMBO J*, **19**, 16, 4393-4401
- YAMAGUCHI, A., HORI, O., STERN, D.M., HARTMANN, E., OGAWA, S., TOHYAMA, M. (1999): Stress-associated endoplasmic reticulum protein 1 (SERP1)/Ribosome-associated membrane protein 4 (RAMP4) stabilizes membrane proteins during stress and facilitates subsequent glycosylation. *J Cell Biol*, **147**, 6, 1195-1204
- ZIMMERMANN, R., MOLLAY, C. (1986): Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum. Requirements for membrane insertion, processing, and sequestration. *J Biol Chem*, **261**, 27, 12889-12895
- ZIMMERMANN, R., SAGSTETTER, M., SCHLENSTEDT, G. (1990a): Ribonucleoparticle-independent import of proteins into mammalian microsomes involves a membrane protein which is sensitive to chemical alkylation. *Biochimie*, **72**, 2-3, 95-101

ZIMMERMANN, R., ZIMMERMANN, M., WIECH, H., SCHLENSTEDT, G., MÜLLER, G., MOREL, F., KLAPPA, P., JUNG, C., COBET, W.W. (1990b): Ribonucleoparticle-independent transport of proteins into mammalian microsomes. *J Bioenerg Biomembr*, **22**, 6, 711-723

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström, Größenangabe (1 Å entspricht 0,1 nm)
$\alpha$ D6	$\alpha$ -Defensin 6
Amp <sup>R</sup>	Ampicillinresistenz
AS	Aminosäure
ATP/ADP/AMP	Adenosintriphosphat/ -diphosphat/ -monophosphat
TBq/MBq/Bq	Tera-/Mega-/Bequerel, Einheit der Radioaktivität (radioaktive Zerfälle pro Sekunde)
$\beta$ D2/ $\beta$ D6	$\beta$ -Defensin 2 bzw. $\beta$ -Defensin 6
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
Ct	C-terminal
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Deoxy-Nukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (Bakterium)
EDTA	Ethylendiamintetraethansäure
EKRM	EDTA und Hochsalz behandelte raue Mikrosomen
eq	Äquivalent, absolute Mengenangabe bei Mikrosomen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES1	Eeyarestatin I

fw	<i>forward</i> , Richtungsangabe für Oligonukleotide in der PCR
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
His1/His3	Histatin 1 /Histatin 3
His	Histidin, Anhang zur Proteinreinigung
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante, Maß für die Bindungsintensität
kDa	Kilodalton, Größenangabe von Proteinen
Met	Methionin
min	Minute
nmol/μmol/mol	Nano-/Mikro-/Mol, absolute Stoffmengenangabe
μg/mg/g	Mikro-/Milli-/Gramm
μl/ml/l	Mikro-/Milli-/Liter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
nM/μM/mM/M	nano-/mikro-/milli-/molar, Konzentrationsangabe
NAC	<i>Nascent-chain complex</i>
NEM	N-Ethylmaleimid
nm	Nanometer
nX	n-fach konzentriert
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte, der Index x gibt die Wellenlänge (in nm) an
OST	Oligosaccharyltransferasekomplex
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase chain reaction</i> )
PK	Proteinase K

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pp $\alpha$ F	Präpro- $\alpha$ -Faktor
ppL	Präprolaktin
R-	Rinder-
RAMP4	Ribosomen-assoziiertes Membranprotein 4 ( <i>ribosome-associated membrane protein 4</i> )
rev	<i>reverse</i> , Richtungsangabe für Oligonukleotide in der PCR
RM	ribosomenbesetzte (raue) Mikrosomen/Membranen
RNA	Ribonukleinsäure
RNC	Komplex aus Ribosom und der naszierenden Kette ( <i>ribosome nascent chain complex</i> )
rNTPs	Ribonukleotidtriphosphate
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
rT	reifer Teil
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Hefe)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPC	Signalpeptidasekomplex
SR	SRP-Rezeptor
SRP	<i>Signal Recognition Particle</i>
Stat	Statherin
TMD	Transmembrandomäne
TRAM	<i>Translocating chain-associating membrane protein</i>
TRAP	Translokon-assoziiertes Proteinkomplex

*(Translocon associated protein complex)*

Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Aktivitätseinheit von Enzymen
UTR	untranslatierte Region auf der DNA
% v/v	Volumenprozent ( <i>volume per volume</i> )
% w/v	Gewichtsprozent ( <i>weight per volume</i> )
Y-	Hefe-

## 9 Anhang

### WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN

STOKES, V., HARTMANN, E., KALIES, K.U. (2010): Biogenesis of proteins involved in innate immunity - Post-translational translocation of Defensines and related proteins.

Posterbeitrag Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie

KALIES, K.U., STOKES, V., HARTMANN, E. (2008): A single Sec61-complex functions as a protein-conducting channel. *Biochim Biophys Acta*, **1783**, 12, 2375-2383

TROEDSSON, C., LEE, R.F., STOKES, V., WALTERS, T.L., SIMONELLI, P., FRISCHER, M.E. (2008): Development of a denaturing high-performance liquid chromatography method for detection of protist parasites of metazoans. *Appl Environ Microbiol*, **74**, 14, 2443-4345

TROEDSSON, C., LEE, R.F., WALTERS, T., STOKES, V., BRINKLEY, K., NÄGELE, V., FRISCHER, M.E. (2008): Detection and discovery of crustacean parasites in blue crabs (*Callinectes sapidus*) by using 18S rRNA gene-targeted denaturing high-performance liquid chromatography. *Appl Environ Microbiol*, **74**, 14, 2446-4353

## **ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, Vivica Stokes, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Vivica Stokes

(Lübeck, Januar 2012)

