



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

**Aus dem Institut für Biologie  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. Hartmann**

**„Untersuchungen zum Einfluss des reifen Teils sekretorischer  
Proteine auf den Proteinimport in das endoplasmatische Retikulum  
des Säugers“**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von  
Alexandra Schatt  
aus Halle (Saale)

Lübeck, 2023

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: PD Dr. Kai Kalies

2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. Norbert Tautz

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2023

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 22.09.2023

## 1 Zusammenfassung

Ein großer Anteil des Proteoms im Säuger wird über das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Dieser Transport wird durch eine N-terminale Signalsequenz initiiert, woraufhin die Proteine den Sec61-Kanal passieren und im Lumen des ER glykosyliert werden, falls sie das passende Motiv aufweisen. Die Signalsequenz dient damit als positiver Regulator für die Translokation und ist in aller Regel für einen vollständigen Import ausreichend. Dem entgegen stehen Proteine mit intrinsisch ungeordneten Bereichen innerhalb des reifen Teils. Diese Bereiche dienen als negative Regulatoren und verhindern trotz geeigneter Signalsequenzen einen vollständigen Import in das ER. Für das peroxisomale Protein Pex8 aus *Saccharomyces cerevisiae* gibt es ebenfalls Hinweise darauf, dass das Protein auch mit einer Signalsequenz nicht vollständig in das ER importiert wird. Dieses Protein besitzt allerdings keine intrinsisch ungeordneten Bereiche.

In dieser Arbeit konnte unter Verwendung eines *in vitro* Systems gezeigt werden, dass ScPex8 mit der Signalsequenz des Präprolaktins nicht final im ER vorliegt. Der Import wird durch ein Signal hinter der zweiten von insgesamt sieben Glykosylierungsstellen des Proteins behindert, sodass das Protein nicht vollständig glykosyliert wird und in das Cytosol ragt, wo es für eine Protease zugänglich ist. Es konnte gezeigt werden, dass die unvollständige Translokation durch zwei hydrophobe Bereiche ausgelöst wird, die etwa zehn Aminosäuren lang sind. Bei Entfernung der Bereiche zeigt sich, dass weitere Glykosylierungsstellen genutzt werden können. Außerdem ist nun ein Proteaseschutz zu beobachten. Das Protein wird also ohne die hydrophoben Abschnitte vollständig importiert.

Die Hemmung des Importes durch die hydrophoben Bereiche ist nicht spezifisch für Pex8, sondern lässt sich auf eine Chimäre aus dem Hefeprotein Präpro- $\alpha$ -Faktor und der Signalsequenz des Säugerproteins Präprolaktin übertragen. Die Chimäre mit den hydrophoben Bereichen wird weniger effizient glykosyliert und importiert.

Die identifizierten Bereiche verhindern aufgrund ihrer Länge und Hydrophobizität eine eindeutige Einordnung durch das Translokon, ob das Protein löslich oder als Transmembranprotein vorliegt. Der Sec61-Komplex kann die Proteine aufgrund des uneindeutigen Signales nicht zuordnen, weshalb die Translokation verlangsamt wird. Der Signalsequenz, die den Transport in das ER auslöst und damit als positiver Regulator dient, steht mit den hydrophoben Bereichen ein bislang unbekannter negativer Regulator entgegen. Dieser sorgt vermutlich dafür, dass nicht eindeutig klassifizierbare Proteine in das ER gelangen.

## 2 Abstract

A large proportion of the proteome in mammals is transported via the endoplasmic reticulum (ER). This transport is triggered by an N-terminal signal sequence, whereupon the proteins pass the Sec61 channel and are glycosylated in the lumen of the ER if they have the appropriate motif. The signal sequence thus serves as a positive regulator for translocation and is generally sufficient for complete import. This is in contrast to proteins with intrinsically disordered regions within the mature part. These domains serve as negative regulators and prevent complete import into the ER despite suitable signal sequences. For the peroxisomal protein Pex8p from *Saccharomyces cerevisiae*, there is also evidence that the protein is not completely imported into the ER even with a signal sequence. However, this protein does not have intrinsically disordered domains.

In this thesis, it was shown using an *in vitro* system that Pex8 is not fully imported into the ER with the signal sequence of preprolactin. Import is hindered by a signal downstream of the protein's second glycosylation site, causing the protein to not be fully glycosylated and to protrude into the cytosol where it is accessible to a protease. It has been shown that incomplete translocation is triggered by two hydrophobic domains that are approximately ten amino acids long. Removal of the domains shows that more glycosylation sites can be used and protease protection is observed. Thus, the protein is fully imported without the hydrophobic sections.

The inhibition of the import induced by the hydrophobic regions is not specific to Pex8. It could be transferred to a chimera composed of the yeast protein prepro alpha factor and the signal sequence of the mammalian protein preprolactin. The chimera with the hydrophobic domains is less efficiently glycosylated and imported.

Due to their length and hydrophobicity, the identified regions prevent a clear classification by the translocon as to whether the protein is soluble or a transmembrane protein. The Sec61-Komplex cannot assign the proteins due to the ambiguous signal, which is why translocation slows down. The signal sequence that triggers transport into the ER and thus serves as a positive regulator is opposed by the hydrophobic domains, a previously unknown negative regulator. This probably ensures that proteins that cannot be clearly classified enter the ER.

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	I
2	Abstract .....	II
3	Einleitung.....	1
3.1	Der sekretorische Weg .....	1
3.2	Das endoplasmatische Retikulum als Startpunkt des sekretorischen Weges.....	2
3.2.1	Proteinmodifikationen im endoplasmatischen Retikulum.....	2
3.2.2	Qualitätskontrollsysteme des endoplasmatischen Retikulums .....	3
3.3	Proteinimport in das endoplasmatische Retikulum.....	5
3.3.1	Cotranslationaler Transport .....	5
3.3.2	Posttranslatinaler Transport .....	7
3.4	Signale im ER-Import .....	7
3.4.1	Signalsequenzen für das endoplasmatische Retikulum .....	8
3.4.2	Signale im reifen Teil von Proteinen.....	8
3.4.3	ScPex8p.....	9
3.5	Fragestellung .....	10
4	Material und Methoden .....	11
4.1	Geräte.....	11
4.2	Chemikalien .....	11
4.3	Kits .....	11
4.4	Medien .....	12
4.5	Puffer und Lösungen .....	12
4.6	Enzyme .....	12
4.7	Biologisches Material .....	13
4.8	Polymerasekettenreaktion .....	13
4.9	Restriktionsverdau .....	13
4.10	Phosphorylierung, Ligation und Transformation .....	13
4.11	DNA-Präparation .....	14
4.12	<i>In vitro</i> Transkription .....	14
4.13	Agarosegeelektrophorese .....	14
4.14	<i>In vitro</i> Translation und Translokation .....	14
4.15	NYT-Behandlung.....	14
4.16	Proteinase K-Behandlung .....	15
4.17	Sedimentation unter Hochsalzbedingungen .....	15
4.18	Ammoniumsulfatfällung.....	15
4.19	SDS-Gelelektrophorese .....	15

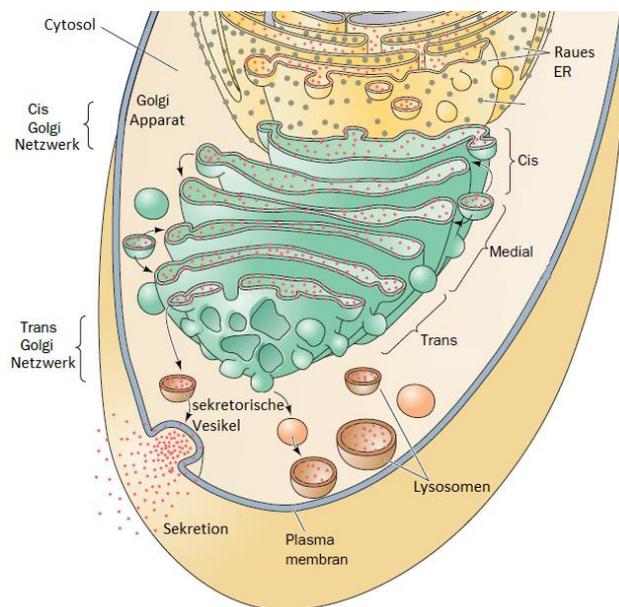
4.20	Tools zur Vorhersage von Sekundärstrukturen.....	15
5	Ergebnisse.....	16
5.1	ssPex8 wird vermutlich nicht vollständig in das ER importiert .....	16
5.2	Die ersten beiden Glykosylierungsstellen von Pex8 werden genutzt .....	20
5.3	Die peroxisomalen Targetingsignale sind nicht für den unvollständigen Import von ssPex8 verantwortlich .....	24
5.4	Die letzte Glykosylierungsstelle von Pex8 ist funktional .....	27
5.5	Der Import von ssPex8 wird nach AS 201 unterbrochen .....	29
5.6	ssPex8 liegt membranassoziiert vor .....	37
5.7	Das hydrophobe Segment HS1 (AS 209-219) unterbricht den Import von ssPex8 .....	39
5.8	Das hydrophobe Segment HS2 (AS 321-329) unterbricht ebenfalls den Import .....	42
5.9	Der Import der Chimäre pPL[ss]- $\alpha$ F wird durch die HS gehemmt.....	46
6	Diskussion.....	54
6.1	ssPex8 wird nicht vollständig in das Lumen des ER importiert .....	54
6.2	ssPex8 besitzt hydrophobe Bereiche, die den ER-Import hemmen.....	56
6.3	Kurze hydrophobe Bereiche hemmen generell den ER-Import .....	57
6.4	Welches Kontrollsystem ist für den Abbau von Proteinketten mit hydrophoben Bereichen <i>in vivo</i> verantwortlich?.....	59
7	Literaturverzeichnis.....	61
8	Eidesstattliche Erklärung .....	68
9	Danksagung .....	69
10	Anhang.....	70
10.1	Abkürzungsverzeichnis .....	70
10.2	Verwendete Primer .....	71
10.3	Plasmide .....	72

## 3 Einleitung

### 3.1 Der sekretorische Weg

Eukaryotische Zellen sind durch Membranen in verschiedene Kompartimente unterteilt. Diese Unterteilung bietet den Vorteil, dass innerhalb der Zelle verschiedene Reaktionsräume geschaffen werden, in denen biochemische Prozesse unter optimierten Bedingungen und unter Nutzung eines distinkten Sets aus Proteinen ablaufen können. Gleichzeitig ergibt sich aus der Unterteilung die enorme Herausforderung, Proteine spezifisch an ihren Zielort zu dirigieren. Trotz der großen Zahl an Proteinen und ihrer hohen Diversität muss dabei gewährleistet werden, dass die Transportwege effizient und gleichzeitig spezifisch funktionieren.

Ein Beispiel für einen solchen Transportweg ist der sekretorische Weg (Abbildung 1). Dieser beginnt mit der Erkennung von sekretorischen Proteinen und Proteinen, deren finales Ziel das endoplasmatische Retikulum (ER) oder die Lysosomen sind. All diese Proteine werden über den sekretorischen Weg transportiert und machen zusammen rund ein Drittel des Proteoms aus. Schon bei der ersten Erkennung zum Import in das ER ist es wichtig, dass nur Substrate des sekretorischen Weges erkannt werden, da fehlgeleitete Proteine den Transportweg zusätzlich belasten. Für den sekretorischen Weg bestimmte Proteine werden zunächst in das ER importiert, wo sie gefaltet und modifiziert werden. Insbesondere die Faltung wird durch die *ER-associated degradation* (ERAD) überprüft, bevor die Proteine weitertransportiert werden. Fehlgefaltete Proteine werden in das Cytosol zurücktransportiert und dort abgebaut, um das ER zu entlasten und vor einer Akkumulation zu schützen (Sun und Brodsky 2017).



**Abbildung 1: Der sekretorische Weg.** Gezeigt ist eine Übersicht des sekretorischen Weges. Das raue ER ist gelb dargestellt. Die verschiedenen Subkompartimente des Golgi-Apparates sind in grün zu sehen, sekretorische Vesikel und Lysosomen in braun. Die Proteine, die entlang der Pfeile durch das ER und den Golgi-Apparat transportiert werden, sind als rote Kügelchen gezeigt. Modifiziert nach Voet und Voet 2011.

Im ER werden die Proteine entweder durch ein ER-Retentionssignal festgehalten oder vom ER aus zu ihrem Zielort weitertransportiert (Munro und Pelham 1987). Der weitere Transport erfolgt im vollständig gefalteten Zustand in Vesikeln. Diese schnüren sich vom ER ab und verschmelzen mit dem cis-Golgi-Netzwerk, wo eine Abgabe der Proteine an den Golgi-Apparat erfolgt. Sie werden über den

medial-Golgi zum trans-Golgi-Netzwerk transportiert und während des Transportes weiter modifiziert. Auch in diesem Schritt wird die Faltung der Proteine überwacht und fehlgefaltete Proteine werden zurück in das ER transportiert, wo sie wiederum der ERAD zugeführt werden (Sun und Brodsky 2019). Nachdem die Proteine ihre finale Form erreicht haben, werden sie vom trans-Golgi-Netzwerk je nach Zielort sortiert. Die entstandenen Proteinsets werden in Golgi-Vesikeln zum Zielort transportiert und damit in den meisten Fällen sekretiert. Außerdem bildet das trans-Golgi-Netzwerk die Lysosomen aus, die ebenfalls spezifische Proteine enthalten.

Das ER und der Golgi-Apparat bewältigen damit zusammen die Herausforderung, eine große Anzahl unterschiedlicher Proteine ihrem finalen Bestimmungsort zuzuführen. Der reibungslose Ablauf dieses Transportes ist für das Überleben der Zelle notwendig, daher sind eine Vielzahl von Kontrollpunkten und –mechanismen angelegt.

### 3.2 Das endoplasmatische Retikulum als Startpunkt des sekretorischen Weges

Der sekretorische Weg beginnt mit dem Import von Proteinen in das endoplasmatische Retikulum. In diesem Organell finden erste Modifikationen, wie die Prozessierung und N-glykosidische Glykosylierung, aber auch Proteinfaltung und deren Kontrolle statt. Im Anschluss erfolgt der Export aus dem ER und der Weitertransport zum Zielort.

#### 3.2.1 Proteinmodifikationen im endoplasmatischen Retikulum

Die N-terminale Signalsequenz, die sekretorische Proteine tragen, ist dafür verantwortlich, Proteine zielgerichtet zum ER zu dirigieren. Nachdem das Protein das ER erreicht hat, ist die Aufgabe der Signalsequenz daher erfüllt, weshalb sie im Folgenden abgespalten wird. Die Spaltung erfolgt hierbei hochspezifisch. Aus dem Vergleich verschiedener Signalsequenzen lassen sich einige Regeln für die Spaltstelle ableiten. Entscheidend ist der Bereich direkt vor der Schnittstelle mit den Positionen -3 bis -1 (wobei -1 die letzte Aminosäure innerhalb der Signalsequenz bezeichnet). An Position -1 und -3 finden sich kleine, neutrale Aminosäuren, während an Position -2 Aminosäuren mit großen Seitenketten (z.B. Phenylalanin oder Tryptophan) abundant sind (Heijne 1983).

Der für die Abspaltung der Signalsequenz verantwortliche Enzymkomplex wird im Säuger als Signalpeptidasekomplex bezeichnet (SPC). Der SPC gehört zu den Serin-Endopeptidasen, weist jedoch nicht die typische katalytische Triade aus Serin, Histidin und Asparaginsäure auf. Stattdessen besteht das katalytische Zentrum aus einem Serin, einem Histidin und zwei Asparaginsäuren (VanValkenburgh et al. 1999). Der Transmembrankomplex setzt sich aus den drei Untereinheiten SPC12, SPC22/23 und SPC25, sowie einer proteolytischen Untereinheit zusammen. Im Säuger gibt es zwei verschiedene proteolytische Untereinheiten, SPC18 und SPC21, in jedem Komplex liegt jedoch nur entweder SPC18 oder SPC21 vor (Liaci et al. 2021). SPC22/23 ragt in das ER-Lumen und ist ein Glykoprotein, während SPC25 und SPC12 teilweise in das Cytosol ragen (Liaci et al. 2021). Alle am Komplex beteiligten Proteine besitzen Transmembrandomänen und verankern den Komplex in der ER-Membran, um eine räumliche Nähe zur Signalsequenz zu gewährleisten. In der Bindetasche der proteolytischen Untereinheit wird der hydrophobe Kern der Signalsequenz gebunden und die Peptidbindung aufgespalten, sodass der reife Teil des Proteins verbleibt (Liaci et al. 2021).

Neben der Prozessierung spielt auch die N-Glykosylierung der Proteine im ER eine wichtige Rolle. Durch das Anhängen der Zuckerreste wird das Protein hydrophiler, was einer Aggregatbildung vorbeugt und die Wahrscheinlichkeit für eine korrekte Faltung erhöht. Der Zuckerbaum ist außerdem ein Marker für die *ER-associated degradation*, die fehlgefaltete Proteine erkennt und abbaut.

Der für die Glykosylierung benötigte Zuckerbaum wird zunächst teilweise im Cytosol an einem in der ER-Membran verankerten Dolicholphosphatanker (PP-Dol) assembliert (Snider et al. 1980; Lehle und Tanner 1978). Dafür werden zunächst in den ersten sieben Assemblierungsschritten zwei N-Acetyl Glukosamine (GlcNAc) und fünf Mannosereste (Man) von verschiedenen Glykosyltransferasen auf den

Anker übertragen (Li und Kornfeld 1979). Der noch unfertige Zuckerbaum wird nun wahrscheinlich mithilfe einer Flippase auf die luminal Seite des ER gebracht, wobei der zugrundeliegende Mechanismus noch nicht geklärt ist. Im endoplasmatischen Retikulum werden weitere sieben Monosaccharide angehängen, vier Mannose- und drei Glukosereste (Glc) (Chapman et al. 1979). Dafür verantwortlich sind wiederum verschiedene Glykosyltransferasen, deren Spezifität die Reihenfolge der angehängten Reste bestimmt. Alle am Aufbau des Zuckerbaums beteiligten Enzyme werden von einer Gruppe von Genen kodiert, die als *asparagine linked glycosylation*-Gene (ALG-Gene) bezeichnet werden. Es ergibt sich ein Zuckerbaum mit der finalen Komposition  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$ , der weiterhin über den Dolicholphosphatanker in der ER-Membran verankert liegt.

Im Anschluss muss das fertige Glykan auf die Polypeptidkette übertragen werden. Dieser Prozess erfolgt in den meisten Fällen schon während der Translokation, jedoch müssen sich mindestens zwischen 12 und 14 Aminosäuren der wachsenden Proteinkette im ER befinden (Nilsson und Heijne 1993). Der Transfer kann auch nach abgeschlossener Translokation stattfinden. In beiden Fällen wird die Konsensussequenz N-X-S/T benötigt, wobei X kein Prolin sein darf.

Die Übertragung des Zuckerbaumes auf die Polypeptidkette stellt aufgrund der Größe beider Substrate eine Herausforderung dar. Der verantwortliche Enzymkomplex, die Oligosaccharyltransferase (OST), besteht in Hefen aus acht und in Säugern aus sieben Untereinheiten (Karaoglu et al. 1997; Kelleher et al. 2003). Die spezifischen Funktionen der einzelnen Untereinheiten sind bislang nicht vollständig verstanden. Es kann jedoch als gesichert angesehen werden, dass in allen Eukaryoten die Untereinheit STT3 die katalytische Einheit darstellt (Yan und Lennarz 2002; Burda und Aebi 1999). Während in Hefen nur eine Kopie dieser Untereinheit vorliegt, gibt es in Säugern zwei Isoformen, STT3A und STT3B, wobei jeder Komplex nur eine der Isoformen aufweist (Kelleher et al. 2003). Die verschiedenen katalytischen Untereinheiten verleihen dem Komplex unterschiedliche Substratspezifitäten. Während STT3A die Substrate während der Translokation in das ER-Lumen glykosyliert, kann STT3B auch vollständig importierte Substrate glykosylieren (Ruiz-Canada et al. 2009). Dennoch wird durch eine räumliche Nähe der OST zum Translokon gewährleistet, dass eine Glykosylierung möglichst während der Translokation erfolgt. Die Glykosylierung vollständig importierter Proteine birgt die Gefahr, dass durch eine Faltung der Proteine Glykosylierungsstellen nicht mehr zugänglich sind (Harada et al. 2009). In der richtigen Konformation kommt es zu einer Übertragung des Zuckerbaums auf die Polypeptidkette (Imperiali et al. 1999).

### 3.2.2 Qualitätskontrollsysteme des endoplasmatischen Retikulums

Aufgrund der enormen Menge von löslichen Proteinen und Membranproteinen, die über das endoplasmatische Retikulum transportiert wird, ist eine schnelle und effiziente Qualitätskontrolle essenziell. Sie verhindert, dass fehlerhafte Proteine an ihre Zielorte exportiert werden, sowie eine Aggregation von fehlgefalteten oder nicht korrekt modifizierten Proteinen im ER selbst. Da das Organell eine Schlüsselrolle für das intra- und interzelluläre Targeting spielt, sind mehrere Mechanismen angelegt, die eine Überlastung durch Proteinaggregation verhindern.

Die *ER-associated degradation* (ERAD) ist ein Prozess in Eukaryoten, der fehlgefaltete Proteine innerhalb des ER erkennt, über die Membran zurücktransportiert und final dem cytosolischen Proteasom zuführt, wo sie abgebaut werden. Die Substrate der ERAD sind dabei sehr divers und können an verschiedenen Eigenschaften erkannt werden. Dazu zählen zum Beispiel frei liegende hydrophobe Bereiche, ungepaarte Cysteine oder getrimmte Zuckerbäume bei glykosylierten Proteinen.

Die Erkennung von fehlgefalteten Glykoproteinen ist im Säuger gut charakterisiert. Diese durchlaufen zunächst den Calnexin/Calretikulin-Kreislauf, der dazu beiträgt, dass glykosylierte Proteine korrekt gefaltet werden. Hierbei werden durch die Enzyme Glucosidase I und II zunächst zwei Glukosereste vom Zuckerbaum abgespalten (Suh et al. 1989). Der verbleibende Glukoserest begünstigt eine Bindung an membrangebundenes Calnexin oder das lösliche Homolog Calretikulin (Hammond et al. 1994).

Beide Enzyme erfüllen den Zweck, das Glykoprotein vor Aggregatbildung zu schützen und es spezifischen Chaperonen zugänglich zu machen, welche die Proteinfaltung zum Beispiel durch Ausbildung von Disulfidbrückenbindungen unterstützen (Zapun et al. 1998). Sobald die Glucosidase II den letzten Glukoserest abspaltet, löst sich das Protein von Calnexin/Calretikulin und wird nun vollständig gefaltet in sein Zielkompartiment transportiert (Zapun et al. 1997). Sollte das Protein fehlerhaft oder unvollständig gefaltet vorliegen, bindet die UDP-Glucose:Glycoprotein Glucosyltransferase (UGGT) (Sousa et al. 1992). Diese glykosyliert das gebundene Substrat, sodass es wieder in den Calnexin/Calretikulin-Kreislauf eintritt und diesen durchläuft, bis es gefaltet vorliegt. Wenn dieser Prozess zu viel Zeit in Anspruch nimmt, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass lösliche Mannosidasen Mannosereste entfernen. Durch diesen Vorgang wird das Protein für die *ER-associated degradation* markiert und daher von den ERAD-assoziierten Lektinen OS-9 oder XTP3-B gebunden (Groisman et al. 2011). Die Brücke zu den membranständigen Komponenten der ERAD bildet das Glykoprotein SEL1L. Dieses bindet an OS-9/XTP3-B und interagiert mit den Transmembranproteinen Hrd1 und Derlin-1 (Christianson et al. 2008; Lilley und Ploegh 2005; Willer et al. 2008). Wie die Substrate letztendlich über die ER-Membran gelangen, konnte bislang noch nicht aufgelöst werden. Die wahrscheinlichsten Kanäle für die Retrotranslokation sind das Transmembranproteine Derlin-1, die membranständige E3-Ligase Hrd1 und der Sec61-Kanal (Rao et al. 2021; Wu et al. 2020; Tretter et al. 2013). Im Cytosol findet eine Ubiquitinierung der Substrate statt, die die Proteine für einen Abbau im cytosolischen Proteasom markiert.

Die Erkennung und die Retrotranslokation von nicht glykosylierten, fehlgefalteten Proteinen ist weniger gut verstanden. Obwohl für einige Substrate eine Interaktion mit den genannten Komponenten der ERAD nachgewiesen ist, konnte deren Regulation noch nicht genauer charakterisiert werden (Okuda-Shimizu und Hendershot 2007).

Durch Proteinaggregation oder Oligomere entstehen teilweise sehr große Substrate im ER. Diese können die Pore zur Retrotranslokation während der ERAD nicht passieren und müssen, um eine Akkumulation zu verhindern, auf anderem Weg aus dem ER gebracht werden. Diese Funktion erfüllt die selektive Autophagie des ER. Es konnte unter anderem für Prokollagen gezeigt werden, dass dieses in fehlgefalteter Form kein ERAD-Substrat darstellt, sondern von dem Rezeptor FAM134B erkannt und anschließend mittels selektiver ER-Phagie abgebaut wird (Ishida et al. 2009; Forrester et al. 2019).

Während die *ER-associated degradation* das ER ständig vor der Akkumulation fehlgefalteter Proteine schützt, greift die *preemptive quality control* (pQC) insbesondere bei ER-Stress. Die pQC scheint dabei den Abbau von Proteinen mit weniger starken Signalsequenzen zu begünstigen (Kang et al. 2006). Dies ermöglicht im Falle eines Stressereignisses eine Priorisierung, welche Proteine zwingend in das ER importiert werden müssen. Dazu werden die abzubauenen Proteine schon während des Importvorganges erkannt, vom Translokon gelöst und in das Cytoplasma verbracht, wo sie abgebaut werden. Die dahinterstehenden Mechanismen sind noch nicht vollständig verstanden und teilweise umstritten. Ein mögliches Modell sieht vor, dass Derlin-1 bei ER-Stress mit SRP und dem SRP-Rezeptor interagiert und auf diesem Weg die wachsende Peptidkette des pQC-Substrates erkennt (Kadowaki et al. 2015). Infolgedessen wird das Peptid von der E3-Ligase Hrd1 markiert, die auch im Abbauprozess von ERAD-Substraten eine Rolle spielt, und anschließend in einem Bag6-abhängigen Prozess abgebaut (Kadowaki et al. 2018; Hessa et al. 2011). In diesem Modell tritt die naszierende Kette nicht in das ER-Lumen ein. Andere Modelle nehmen eine Erkennung des Substrates durch das luminale Protein BiP und damit einen zumindest teilweise erfolgreichen Eintritt in das ER-Lumen an (Rutkowski et al. 2007). Durch das membranspannende Protein p58<sup>IPK</sup> wird ein Signal zur Rekrutierung cytosolischer Faktoren wie dem Hsp70 gegeben, die das Substrat dem Proteasom zuführen (Oyadomari et al. 2006). Bislang konnte nicht aufgelöst werden, welches der Modelle zutreffend ist.

Zusätzlich gibt es Kontrollmechanismen für Proteine, die im Translokon immobilisiert sind, weil sie nicht vollständig importiert werden können. Dadurch kann die ERAD diese Substrate nicht erreichen

und sie müssen auf anderem Weg abgebaut werden. Das verstopfte Translokation stellt ein Problem für das ER dar, da es nicht mehr als Importkanal zur Verfügung steht. Es gibt in diesen Fällen sowohl für den co- als auch für den posttranslationalen Transport eine Möglichkeit, das Translokation von der Proteinkette zu befreien. Im posttranslationalen Transport kann es durch eine teilweise Faltung der Proteine im Cytosol dazu kommen, dass der Sec61-Kanal nicht passiert werden kann. Auf der luminalen Seite wird die Proteinkette durch BiP/Kar2 gebunden, sodass auch ein Zurückrutschen in das Cytosol nicht möglich ist. Für die Aufhebung dieses Zustandes ist eine in allen Eukaryoten vorkommende Metalloprotease verantwortlich. Es konnte für ZMPSTE24 in Säugern und das Homolog Ste24 in *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt werden, dass die Protease zu den verstopften Kanälen rekrutiert wird und die Proteinketten schneidet, sodass sie sich vom Translokation lösen können (Ast et al. 2016). Bei einem cotranslational stattfindenden Transport konnte ein Verdau der Proteinkette im Zuge der *ribosomal quality control* (rQC) gezeigt werden. Normalerweise ist das Ribosom fest an das Sec61-Translokation gebunden, sodass die naszierende Kette keinen Kontakt zum Cytosol erhält. Bei einer Verzögerung oder Unterbrechung der Translation lockert sich diese Bindung, sodass die Kette in das Cytosol ragt und von der E3-Ligase Listerin erkannt wird, welche für eine Ubiquitinierung und letztendlich für einen Abbau der Kette durch das cytosolische Proteasom sorgt (Malsburg et al. 2015).

### 3.3 Proteinimport in das endoplasmatische Retikulum

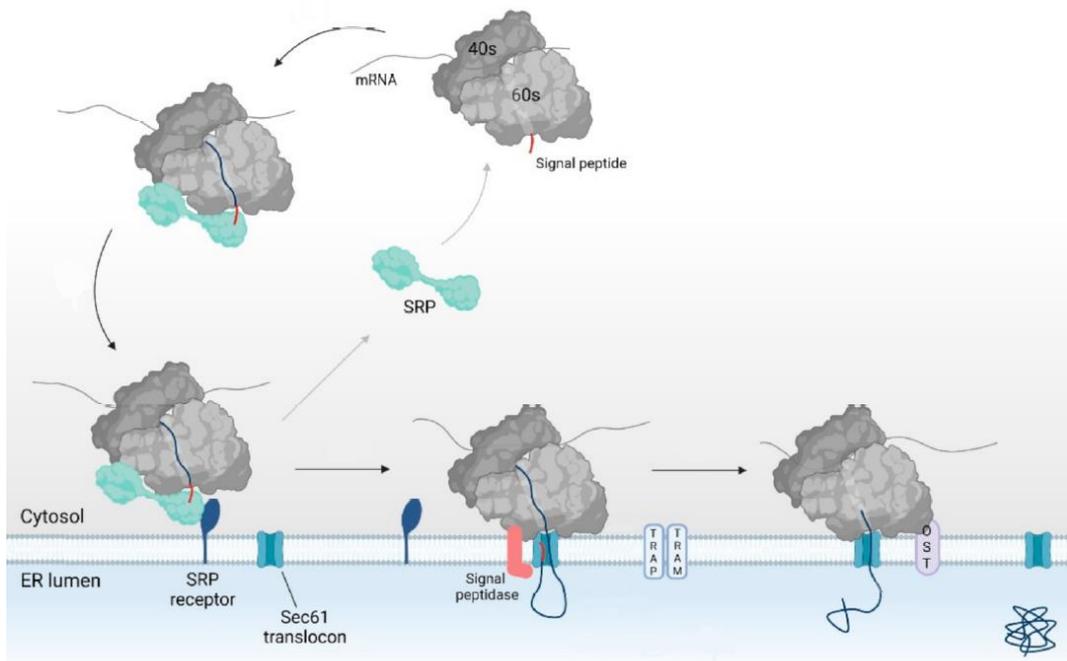
Auch der Import von Proteinen in das ER stellt einen wichtigen Regulationspunkt im inter- und intrazellulären Targeting dar. An dieser Stelle werden cytosolische Proteine von Proteinen getrennt, die ER-ständig sind oder über das ER weitertransportiert werden. Der Transport in das ER wird in den meisten Fällen durch eine Signalsequenz initiiert und kann cotranslational oder posttranslational erfolgen. Verantwortlich ist ein hochspezialisierter Membranproteinkomplex, der über alle drei Domänen evolutionär konserviert vorliegt (Auer et al. 1991). Er wird nach seiner jeweiligen Kernkomponente in Eukaryoten Sec61-Komplex genannt, wohingegen er in Archaea und Bakterien als SecY-Komplex bezeichnet wird.

#### 3.3.1 Cotranslationaler Transport

In Säugern ist der cotranslationale Transport die wesentlich häufigere Variante des ER-Importes. Hierbei wird die naszierende Proteinkette schon während der Translation in das ER transportiert, Translation und Transport laufen also simultan ab (Abbildung 2). Nach einer anfänglichen Translation, die den N-Terminus der wachsenden Polypeptidkette im Cytosol exponiert vorliegen lässt, wird entweder die am Terminus befindliche Signalsequenz oder die erste Transmembrandomäne vom *signal recognition particle* (SRP) erkannt und gebunden. Bei der Bindung zwischen SRP und Proteinkette spielt auch der heterodimere *nascent polypeptide associated complex* (NAC) eine Rolle, der die wachsende Kette gegen das Cytosol abschirmt und unspezifische Bindungen des SRP mit Proteinketten ohne Signalsequenz oder dem Ribosom minimiert (Wang et al. 1995; Powers und Walter 1996; Hsieh et al. 2020). Infolge der SRP-Bindung kommt es zu einem Translationsarrest, der so lange anhält, bis das SRP an den SRP-Rezeptor gebunden hat, der sich in unmittelbarer Nähe zum Translokation in der ER-Membran befindet (Walter und Blobel 1981).

Das Translokation im Säuger ist der heterotrimere Sec61-Komplex aus den drei Untereinheiten Sec $\alpha$ , Sec $\beta$  und Sec $\gamma$ . Die größte Untereinheit ist Sec $\alpha$ , welche in erster Linie aus zehn Transmembranhelices besteht, die die zentrale Pore in der ER-Membran bilden (Pfeffer et al. 2015). Die Pore hat die Form einer Sanduhr, deren engster Punkt durch eine Reihe von hydrophoben Aminosäuren gebildet wird. Höchstwahrscheinlich dient die Verengung der Aufrechterhaltung der Permeabilitätsbarriere während des Proteinimportes. Außerdem bildet Sec $\alpha$  einen *plug* aus, welcher das Translokation im inaktiven Zustand verschließt (van den Berg et al. 2004). Die kleineren Untereinheiten Sec $\beta$  und Sec $\gamma$  sind peripher mit Sec $\alpha$  assoziiert und bilden jeweils eine Transmembranhelix aus. Durch eine Interaktion

der Untereinheiten  $\alpha$  und  $\gamma$  des Translokons mit dem Ribosom wird ein hydrophober Bereich des Translokons frei. Mit diesem interagiert die Signalsequenz der Peptidkette und verursacht dadurch eine Konformationsänderung in Sec $\alpha$ , die einen lateralen Transport in die Membran erlauben würde (Becker et al. 2009). Die hydrophobe Signalsequenz nimmt die Position einer Transmembranhelix des Sec61 $\alpha$  ein, was die laterale Öffnung des Sec61 $\alpha$ -Kanals verschließt und den Kanal für den eigentlichen Proteinimport öffnet (Voorhees und Hegde 2016). Die wachsende Polypeptidkette wird nun direkt in das ER-Lumen synthetisiert. Anders als beim posttranslationalen Transport ist hier die Translation selbst die treibende Kraft des Importes. Noch während oder direkt nach der Translokation wird die Signalsequenz der Polypeptidkette durch den Signalpeptidasekomplex abgespalten. Durch das Stop-Codon am Ende des Proteins wird die Translation beendet und das Ribosom löst sich vom Sec61-Komplex und der ER-Membran.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des cotranslationalen Transportes eines sekretorischen Proteins in das endoplasmatische Retikulum.** Das Protein wird von einem Ribosom (grau) bis zur Signalsequenz translatiert, welche vom *signal recognition particle* (SRP, türkis) erkannt und gebunden wird. Das SRP bindet an den SRP-Rezeptor (dunkelblau), der den Komplex aus Ribosom, SRP und Kette an das Sec61-Translokon übergibt (mittelblau). Die Signalsequenz wird in das Translokon inseriert und die Proteinkette in das Lumen des ER translatiert. Im Anschluss wird die Signalsequenz durch den Signalpeptidasekomplex (rot) abgespalten. TRAM und TRAP (weiß) unterstützen den Import, durch die Oligosaccheryltransferase (OST, pink) wird gegebenenfalls eine Glykosylierung angefügt. Nach Abschluss der Translation löst sich das Ribosom und das sekretorische Protein liegt frei im ER-Lumen vor. Modifiziert nach Pauwels et al. 2021.

Neben dem Import löslicher Proteine erfolgt auch der Transport von Transmembranproteinen über das Sec61-Translokon. Unabhängig vom finalen Zielkompartiment wird schon hier die Topologie des Proteins festgelegt und Tertiär- und Quartärstrukturen determiniert. Zusätzlich wird das Transmembranprotein in seiner geplanten Orientierung in die ER-Membran integriert. Dafür werden die Transmembransegmente durch eine laterale Öffnung der Pore in die Membran entlassen. Der Sec61-Komplex steht mit einer Vielzahl weiterer Proteine in Verbindung, die unterschiedliche Funktionen im ER-Import übernehmen. Dazu zählen der SPC, der die Signalsequenz prozessiert und die OST, die die importierten Proteine glykosyliert. Außerdem spielt der TRAM-Komplex (*translocating chain-associated membrane protein*-Komplex) eine Rolle bei der Integration von Transmembrandomänen in die ER-Membran und interagiert mit der Signalsequenz der wachsenden Peptidkette

(McCormick et al. 2003; Voigt et al. 1996). Der TRAP-Komplex (*translocon-associated protein*-Komplex) assoziiert mit dem Ribosom, das an den Sec61-Komplex gebunden ist und trägt so vermutlich zur Stabilität des Komplexes aus Translokation und Ribosom bei (Menetret et al. 2000). Ebenfalls in unmittelbarer Nähe des Sec61-Komplexes ist das membrangebundene Chaperon Calnexin zu finden, das die Proteinfaltung von Glykoproteinen unterstützt.

### 3.3.2 Posttranslationaler Transport

Werden Proteine posttranslational vom Cytosol in das endoplasmatische Retikulum transportiert, findet der Transport nach der Translation statt. Dieser Transportweg wird im Säuger eher selten genutzt, es konnte jedoch für einige kurze Proteine ein posttranslationaler Transport gezeigt werden (Shao und Hegde 2011). In Hefen werden hingegen alle Proteine posttranslational transportiert, die eine Signalsequenz tragen, deren Hydrophobizität nicht ausgeprägt genug ist, um vom SRP erkannt zu werden (Ng et al. 1996). Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass die Zellen von weniger komplexen Eukaryoten schneller wachsen und daher die Translation schneller abläuft als der Import, was bei einem cotranslationalen Transport zu einer Blockade des Systems führen würde (Rapoport 2007).

Nach der im Cytosol stattfindenden Translation muss dafür gesorgt werden, dass die Proteine nicht oder nur lose gefaltet werden. Daher binden an die Proteinkette Chaperone, die eine vollständige Faltung des Proteins verhindern. Hauptverantwortlich sind Proteine der Chaperonfamilien Hsp40 und Hsp70 (Ngosuwan et al. 2003). Nachdem die Proteinkette zur ER-Membran verbracht wurde, tritt sie durch den Sec61-Kanal ins ER-Lumen ein, welcher für den posttranslationalen Transport an den Sec62/Sec63-Komplex gebunden ist. Hierbei lösen sich alle cytosolischen Chaperone von der Proteinkette und auf der luminalen Seite bindet BiP (*binding immunoglobulin protein*), ein Chaperon aus der Familie der ATPasen. Aufgrund der Brownschen Molekularbewegung könnte sich die Kette nun sowohl in Richtung des Cytosols als auch in Richtung des ER-Lumens bewegen. BiP verhindert jedoch ein Zurückrutschen der Kette ins Cytosol, was letztendlich zum Import führt.

Der zugehörige Mechanismus wird als Brownsche Ratsche bezeichnet. Hierbei liegt BiP zunächst in der ATP-gebundenen Form vor. In diesem Zustand ist die Bindetasche für Peptide geöffnet. Die Interaktion von BiP mit Sec63 löst eine Hydrolyse des von BiP gebundenen ATPs zu ADP aus, wodurch sich die Bindetasche in unmittelbarer Nähe der eintretenden Peptidkette schließt und diese dadurch bindet. Ein Zurückrutschen der Kette ist nun ausgeschlossen, während eine Bewegung in das ER-Lumen weiterhin möglich bleibt. Sobald weitere Teile der Kette zugänglich werden, binden zusätzliche BiP-Moleküle, sodass das Peptid sukzessive passiv in das ER geschleust wird. Liegt die Peptidkette vollständig transloziert vor, lösen sich die BiP-Moleküle von der Kette (Matlack et al. 1999). Da BiP bevorzugt an hydrophobe Bereiche bindet, verhindert die Bindung außerdem eine Aggregatbildung von ungefalteten Proteinketten. In Hefen funktioniert der Mechanismus analog, BiP ist dort allerdings als Kar2 bekannt.

### 3.4 Signale im ER-Import

Da ein großer Anteil des Proteoms über das endoplasmatische Retikulum transportiert wird, müssen die Importkomplexe des ER eine große Varianz der transportierten Substrate bewältigen. Dies wird unter anderem dadurch erleichtert, dass Proteine ungefaltet über die ER-Membran transportiert werden und daher die Topologie der Substrate keine Rolle für den Import spielt. Daher galt die von Blobel und Dobberstein aufgestellte Signalthypothese, die besagt, dass der Import in das ER ausschließlich von einer N-terminalen Signalsequenz abhängt, lange uneingeschränkt (Blobel und Dobberstein 1975). Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass es zumindest einige Ausnahmen von dieser Regel gibt.

### 3.4.1 Signalsequenzen für das endoplasmatische Retikulum

Proteine, die im endoplasmatischen Retikulum verbleiben, sowie sekretorische Proteine und Membranproteine, die über das ER transportiert werden, weisen eine Signalsequenz auf, die den Transport in das endoplasmatische Retikulum initiiert (Blobel und Dobberstein 1975).

Bei löslichen Proteinen handelt es sich bei der Signalsequenz um ein N-terminales Signal, das etwa 15-35 Aminosäuren lang ist und einen hydrophoben Kern aufweist. Die Sequenz der Signale ist hierbei in sehr geringem Maße konserviert, allerdings ist die Verteilung der hydrophoben Reste immer so ausgerichtet, dass die höchste Hydrophobizität in der Mitte des etwa 10-15 Aminosäuren langen Kerns liegt (Heijne 1982). Des Weiteren wird der hydrophobe Kern auf N-terminaler Seite von einem basischen Bereich flankiert, während sich C-terminal vermehrt polare, ungeladene Aminosäuren finden (Heijne 1983, 1984). Aufgrund ihrer hydrophoben Natur bilden Signalpeptide eine alpha-helicale Struktur aus (Emr und Silhavy 1983). Das Maß der Hydrophobizität im Kern der Signalsequenz entscheidet in Hefen außerdem darüber, ob das betreffende Protein co- oder posttranslational transportiert wird. Bei hydrophoberen Resten ist die Affinität der Signalsequenz zum SRP höher, sodass der cotranslationale Weg eingeschlagen wird, andernfalls wird das Protein vollständig translatiert und posttranslational transportiert (Ng et al. 1996). In Säugern entscheidet hingegen eher die Länge des Proteins über die Transportroute. Welche Kettenlänge für einen cotranslationalen Transport erforderlich ist, ist jedoch nicht final geklärt. Studien konnten zeigen, dass mindestens eine Kettenlänge von 70 Aminosäuren für einen cotranslationalen Transport notwendig sind (Zimmermann et al. 1990). Außerdem gibt es zumindest für einige Proteine auch die Möglichkeit, zwischen den Transportwegen zu wechseln. Diese können sowohl SRP-abhängig, als auch SRP-unabhängig transportiert werden.

Bei Membranproteinen, die keine Signalsequenz aufweisen, wird der Transport in das ER durch das erste Transmembransegment ausgelöst, das 16-25 hydrophobe Aminosäuren umfasst. Dieses Segment wird Signalanker genannt und unterscheidet sich von dem klassischen ER-Import-Signal neben seiner etwas geringeren Länge dadurch, dass die hydrophoben Reste weniger geclustert vorliegen und sich über das gesamte Signal verteilen (Heijne 1982).

### 3.4.2 Signale im reifen Teil von Proteinen

Abweichend von der Signalthypothese gibt es einige Beispiele, in denen ein Einfluss des reifen Teils von Proteinen auf den ER-Import beobachtet wurde. Dabei sind sowohl positive als auch negative Regulatoren bekannt. Die Arbeitsgruppe um Zimmermann konnte zeigen, dass kleine Vorläuferproteine teilweise in Abhängigkeit von ihrem reifen Teil importiert werden. Beispielweise ist das Protein Prepromelittin aus der Honigbiene mit 70 Aminosäuren recht klein und trägt eine ER-spezifische Signalsequenz. Aufgrund seiner Größe wird es in einem *in vitro* Säugersystem posttranslational transportiert. Es konnte gezeigt werden, dass in diesem Protein eine Kombination aus einem hydrophoben Bereich am N-Terminus und einem vier Aminosäuren langen, positiv geladenen Bereich am C-Terminus den Import positiv beeinflusst (Müller und Zimmermann 1987). Die Autoren stellen die These auf, dass diese beiden Bereiche während des Importes miteinander interagieren und so für eine erfolgreiche Translokation sorgen (Zimmermann et al. 1988).

Für das Prionprotein konnte hingegen in einem cotranslationalen Transport beobachtet werden, dass die N-terminalen Aminosäuren des reifen Teils den Import negativ beeinflussen können. Wenn diese eine positive Ladung aufwiesen und mit einer schwachen Signalsequenz kombiniert wurden, so war BiP als zusätzlicher Faktor nötig, um einen Import zu erreichen (Ziska et al. 2019). Dies ist bei einem cotranslationalen Transport normalerweise nicht der Fall.

Überraschenderweise haben ausgewählte Sekundärstrukturen einen negativen Effekt auf den ER-Import. Dies ist insofern unerwartet, dass die Translokation in das ER vollständig ungefalteter erfolgt. Dennoch konnte gezeigt werden, dass lange Abschnitte aus  $\beta$ -Faltblättern den Transport durch den Sec61-Kanal behindern oder sogar vollständig unterbinden (Gonsberg et al. 2017). Ein ähnliches

Verhalten zeigte sich für Proteine mit intrinsisch ungeordneten Bereichen. Proteine, die diese Bereiche aufwiesen, wurden nicht vollständig importiert und noch während des Importes durch die *preemptive quality control* abgebaut (Miesbauer et al. 2009). Die ungeordneten Abschnitte scheinen daher einen negativen Regulator der Translokation darzustellen. Allerdings lässt sich der Einfluss der ungeordneten Abschnitte durch das Einfügen von alpha-helicalen Strukturen wieder aufheben, die auf den ungeordneten Bereich folgen (Dirndorfer et al. 2013).

Die bisherigen Erkenntnisse zeigen daher, dass der reife Teil von Proteinen nicht bedeutungslos für den ER-Import ist. Es konnte zunächst für einzelne Proteine, in den letzten Jahren jedoch auch konzeptuell, ein Einfluss nachgewiesen werden. Bislang konnten neben intrinsisch ungeordneten Bereichen und langen Abschnitten aus  $\beta$ -Faltblättern jedoch keine weiteren Regulatoren für den ER-Import im reifen Teil von Proteinen identifiziert werden.

### 3.4.3 ScPex8p

Das peroxisomale Hefeprotein Pex8p besitzt keine Signalsequenz für einen ER-Import. Dennoch wird diskutiert, ob es ein Substrat für den ER-Import darstellt. Eine Studie von van der Zand et al. in *Saccharomyces cerevisiae* legt nahe, dass das Protein über das ER in die Peroxisomen transportiert wird (van der Zand et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Fluoreszenzmarkierung des Proteins und des endoplasmatischen Retikulums beide Signale colokalisieren. ScPex8p muss sich daher laut den Autoren zumindest vorübergehend im ER befinden. Andererseits legen die Ergebnisse von Deckers et al. nahe, dass ScPex8p aus dem Cytosol ohne Umwege in die Peroxisomen gelangt. Es wird postuliert, dass ScPex8p neben dem PTS1 Rezeptor Pex5p auch mit dem PTS2-Rezeptor Pex7p interagiert und letztendlich proteasegeschützt vorliegt, woraus die Autoren schließen, dass ScPex8p direkt aus dem Cytosol in die Peroxisomen transportiert wird (Deckers et al. 2010). Allerdings wurde in beiden Studien nicht untersucht, ob die sieben Glykosylierungsstellen des Proteins genutzt werden können, wodurch ein Import in das ER nachgewiesen werden könnte. Um diese Lücke zu schließen, wurden in der Arbeitsgruppe Kalies *in vitro* Studien durchgeführt, in denen ScPex8p mit einer Signalsequenz in das ER gebracht werden sollte (Ohms 2015). Bei diesen Versuchen fiel auf, dass das Protein zwar glykosyliert wird, allerdings nicht alle Stellen genutzt werden. Außerdem lag ScPex8p nicht innerhalb des ER vor, was durch Versuche mit einer externen Protease gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse sind dahingehend überraschend, dass die Signalsequenz gemäß der Signalthypothese ausreichend sein sollte, um ein beliebiges Protein vollständig in das ER zu zwingen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es einen Bereich im reifen Teil des Proteins geben muss, der den vollständigen Import des Proteins verhindert.

### 3.5 Fragestellung

Der sekretorische Weg stellt einen Dreh- und Angelpunkt des intra- und interzellulären Transportes dar. Seine Eintrittspforte ist das endoplasmatische Retikulum. Daher ist es von hoher Relevanz, dass nur Proteine des sekretorischen Weges in das ER importiert werden. Auslösend für den Import ist eine ER-spezifische Signalsequenz, die das Protein zum ER dirigiert. Diese galt lange als hinreichend für einen Import in das ER, während dem reifen Teil des Proteins keine Bedeutung für die Translokation beigemessen wurde. Für das peroxisomale Protein ScPex8 mit vorgeschalteter Signalsequenz scheint diese Annahme jedoch nicht zuzutreffen. Das Protein wird trotz einer angefügten Signalsequenz nicht vollständig glykosyliert und liegt nicht final im ER vor.

In Vorarbeiten wurde die Signalsequenz des Hefeproteins Präpro- $\alpha$ -Faktor in Kombination mit rauen Membranen des Hundes verwendet, um einen Import von ScPex8 zu erreichen. Daher soll in dieser Arbeit zunächst geprüft werden, ob die Signalsequenz des Säugerproteins Präprolaktin besser geeignet ist, einen regulären Import von Pex8 herbeizuführen. Dazu wird das Protein mit der Signalsequenz von Präprolaktin kombiniert und in einem zellfreien *in vitro* System der Import in das ER anhand von stattfindenden Glykosylierungen, sowie anhand von Proteaseschutzassays untersucht. Sollte die Signalsequenz von Präprolaktin ebenfalls nicht ausreichend sein, um einen regulären Import in das ER zu erreichen, wird untersucht, ob ScPex8 vollständig in das ER importiert wird und ein anschließender Export stattfindet oder nur ein unvollständiger Import stattfindet. Des Weiteren wird der Versuch unternommen, ein putatives Signal innerhalb des Proteins zu identifizieren, das einen Import negativ beeinflusst. Dieses würde damit als Gegengewicht zur Signalsequenz dienen, die einen ER-Import initiiert. Schlussendlich soll geklärt werden, ob das Signal spezifisch für ScPex8 ist oder auch in anderen Proteinen den Import in das ER behindert.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Geräte

PCR-Cycler „Biometra Trio“	Analytik Jena
Nanodrop 2000	Thermo Scientific
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Typhoon FLA 7000	GE Healthcare
Ultrazentrifuge Optima MAX-XP	Beckman Coulter

### 4.2 Chemikalien

Aminosäuremix ohne Methionin	Promega
Ampicillin Natriumsalz	Roth
Agarose	Serva
Bacto-Agar	BD
Bromphenolblau	Roth
BSA	NEB
DNA Stain G	Serva
dNTPs	Roche
DTT	Promega
EDTA	Roth
Eisessig	Merck
Glucose	Merck
Glycin	Biomol
Hefeextrakt	BD
HEPES	Sigma Aldrich
Kaliumacetat	Roth
Magnesiumacetat	Merck
NaCl	Roth
Puromycin	Biomol
PMSF	AppliChem
RNasin®	Promega
rNTPs	Promega
<sup>35</sup> S-Methionin	Hartmann Analytic
SDS	Roth
Tris-HCl	Roth
Trypton	Gibco

### 4.3 Kits

NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel
NucleoSpin® Gel and PCR CleanUp	Macherey-Nagel
NucleoSpin® RNA CleanUp	Macherey-Nagel

#### 4.4 Medien

##### LB-Agar

1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % NaCl; 2 % (w/v) Bacto-Agar

##### LB-Medium

1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) NaCl

#### 4.5 Puffer und Lösungen

##### Elektrophoresepuffer

25 mM Tris-HCl; 200 mM Glycin; 0,1 % SDS

##### Hochsalzpuffer

50 mM HEPES (pH 7,5); 860 mM Kaliumacetat; 3 mM Magnesiumacetat; 250 mM Sucrose

##### Hochsalzkissen

50 mM HEPES (pH 7,5); 500 mM Natriumacetat; 3 mM Magnesiumacetat; 500 mM Sucrose

##### Membranpuffer

50 mM HEPES (pH 7,6); 1 mM DTT; 250 mM Sucrose

##### SDS-Probenpuffer (2x)

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

##### TAE-Puffer

40 mM Tris-HCl (pH 8,5); 1 mM EDTA; 0,114 % (v/v) Eisessig

10x Green FastDigest™-Puffer

Thermo Scientific

5x HF-Puffer

Thermo Scientific

5x Q5® Reaction-Puffer

NEB

5x Rapid Ligation-Puffer

Thermo Scientific

5x Transcription-Puffer

Promega

6x DNA Loading Dye

Thermo Scientific

DNA Serva Stain G

Serva

#### 4.6 Enzyme

FastDigest-Enzyme

Thermo Scientific

KLD Enzyme-Mix

NEB

Q5® High Fidelity-Polymerase

NEB

S7-Phusion-Polymerase

MobiDiag

T4-Polynukleotidkinase (PNK)

Thermo Scientific

T4-DNA-Ligase

Thermo Scientific

T7-RNA-Polymerase

Promega

Proteinase K

Roche

#### 4.7 Biologisches Material

Retikulozytenlysat (Kaninchen), nukleasebehandelt	Promega
Raue Membranen des Hundes	Präparation AG Kalies nach (Walter und Blobel 1983)
Chemokompetente <i>E.coli</i> ; Stamm XL1blue	Präparation AG Kalies nach (Sambrook und Russell 2001)

#### 4.8 Polymerasekettenreaktion

Für die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) wurde ein Ansatz bestehend aus 1x HF-Puffer, jeweils 0,5 µM *forward*- und *reverse*-Primer, 10 ng Template-DNA, 0,5 mM je dNTP, 3 % DTT und 0,02 U/µl Polymerase angesetzt, mit Wasser auf ein finales Volumen von 50 µl aufgefüllt und gemischt. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem dreischriftigen Programm und einer anschließenden Abkühlung auf 4 °C. Dabei wurde die Temperatur zur Primerhybridisierung so gewählt, dass sie zwei Grad unter der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur lag. Wenn die Schmelztemperaturen sich innerhalb eines Primerpaars unterschieden, wurde die geringere Temperatur als Anhaltspunkt verwendet. Angaben zu den Primern finden sich im Anhang unter Absatz 10.2. Die Dauer des Elongationsschrittes wurde gemäß Herstellerangaben an die Länge des Zielfragmentes angepasst. Die DNA-Fragmente wurden mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

#### 4.9 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau erfolgte in allen Fällen unter Verwendung von FastDigest-Enzymen und dem dazugehörigen 10x Green FastDigest™-Puffer, welcher dem Ansatz bis auf eine einfache Endkonzentration zugesetzt wurde. Es wurde 1 FDU (*fast digest unit*) Enzym (präparativer Verdau) oder 0,5 FDU Enzym (analytischer Verdau) zu 500 ng DNA gegeben und die Restriktion bei 37 °C für 20 min durchgeführt. Die Vollständigkeit des Verdau wurde mit einem Agarosegel überprüft und die DNA-Fragmente mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean Up Kit nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

#### 4.10 Phosphorylierung, Ligation und Transformation

Um die Enden der DNA-Fragmente zu phosphorylieren, wurde zu 300 ng des jeweiligen Fragments 1,5 µl ATP (10 mM), 3 µl 5x Rapid Ligation-Puffer und 1 µl PNK gegeben und das Volumen des Ansatzes auf 15 µl gebracht. Die Phosphorylierung erfolgte bei 37 °C für 30 min. Dieser Prozess wurde anschließend für 10 min bei 72 °C terminiert und der Ansatz auf Raumtemperatur abgekühlt. Für die Ligation wurden 1 µl T4-DNA-Ligase, 1 µl 5x Rapid Ligation-Puffer und die beiden Fragmente im Verhältnis 1:1 eingesetzt, das Volumen auf 20 µl gebracht und gemischt. Die Ligation erfolgte für 20 min bei Raumtemperatur. In einigen Fällen wurde der KLD Enzyme-Mix verwendet, der Phosphorylierung und Ligation in einem Schritt erlaubt. Die Durchführung fand gemäß Herstellerangaben statt.

Es erfolgte eine Transformation der Vektoren in *E.coli* vom Stamm XL1blue. Dafür wurden 100 µl chemokompetente Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend mit 10 µl Ligationsansatz versetzt. Der Ansatz wurde für 5-20 min auf Eis inkubiert, für 1 min bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zugabe von 1 ml LB-Medium und der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Es wurde auf LB-Platten mit Ampicillin (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 4.11 DNA-Präparation

Es wurden 10 ml flüssiges LB-Medium bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml mit Ampicillin versetzt und mit einer Einzelkolonie angeimpft. Anschließend wurde die Kultur über Nacht bei 37 °C geschüttelt, 6 ml abgenommen und durch Zentrifugation geerntet. Die DNA-Isolation erfolgte gemäß den Anweisungen des NucleoSpin® Plasmid Kits, dabei wurde ein zusätzlicher Waschschrift durchgeführt. Es wurde mit 50 µl Elutionspuffer eluiert und die Konzentration mittels eines Nanodrop unter Verwendung von 2 µl Probe bestimmt. Angaben zu den erstellten und verwendeten Plasmiden finden sich im Anhang unter dem Abschnitt 10.3.

#### 4.12 *In vitro* Transkription

In einer *in vitro* Transkription wurde die DNA in mRNA umgeschrieben. Dazu wurden in einem Ansatz 1 µg DNA, 30 U T7-Polymerase, 0,5 mM rNTPs, 1x Transcription-Puffer, 10 mM DTT, 0,2 mg/ml BSA und 100 U RNasin gemischt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte eine Zugabe von 0,25 mM rNTPs und 15 U T7-Polymerase und eine Inkubation für weitere 2 h bei 37 °C. Die RNA wurde mittels des NucleoSpin® RNA CleanUp Kits gereinigt, die Reinigung mittels eines Agarosegels überprüft und die RNA aliquotiert bei -80 °C eingefroren.

#### 4.13 Agarosegeelektrophorese

Für ein Gel wurden 30 ml einer Agaroselösung (1 %; w/v) in 1x TAE-Puffer verwendet. Zusätzlich wurde der DNA-Farbstoff Stain G im Verhältnis 1:10000 (v/v) zugegeben. Die Proben wurden bis zu einer einfachen Konzentration mit 6x DNA Loading Dye versetzt. Eine Ausnahme hiervon bildeten Proben aus einem Restriktionsverdau, da der verwendete FastDigest™-Puffer bereits einen Farbstoff enthält. Die DNA-Fragmente wurden auf das gehärtete Gel geladen und in einer Elektrophoresekammer mit 1x TAE-Puffer bei 90 V für 20 min aufgetrennt. Die Analyse erfolgte unter UV-Licht.

#### 4.14 *In vitro* Translation und Translokation

Für die *in vitro* Translation und Translokation wurde zunächst das Retikulozytenlysat in einer Kühlzentrifuge 5417R bei 14000 rpm bei 4 °C für 10 min zentrifugiert, um die endogenen Membranen zu entfernen, und nur mit dem Überstand weitergearbeitet. Es wurde ein Ansatz pipettiert, der die geeignete Menge mRNA (0,5-1,5 µl), sowie die ebenfalls ermittelte Menge raue Membranen des Hundes (0,4-0,6 eq) enthielt. Außerdem erfolgte eine Zugabe von 7 µl Retikulozytenlysat, 20 µM (je Aminosäure) Aminosäuremix ohne Methionin und 0,185 MBq <sup>35</sup>S-Methionin. Der Ansatz wurde mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Translation und Translokation wurden bei 25 °C für 45 min durchgeführt.

#### 4.15 NYT-Behandlung

Die Behandlung mit dem Tripeptid NYT diente zur Sicherung der Glykosylierungsergebnisse. Bei Zugabe des Peptides sollte dieses bevorzugt glykosyliert und daher die Glykosylierung des Zielproteins unterbunden werden. Dafür wurde die Durchführung der *in vitro* Translation und Translokation insofern abgewandelt, dass dem Ansatz vor der Inkubation bis zu einer Endkonzentration von 10 mM NYT zugegeben wurde, um auftretende Glykosylierungen zu verdrängen. Die Durchführung der *in vitro* Translokation blieb ansonsten unverändert.

#### 4.16 Proteinase K-Behandlung

Mit der Behandlung der Proben mit Proteinase K (PK) wurde überprüft, ob Proteine in einem membranumschlossenen Raum vorliegen. Sie wurde direkt an die *in vitro* Translation und Translokation angeschlossen. Dafür wurde der Ansatz halbiert und zu jeweils 5 µl Ansatz entweder 5 µl Proteasepuffer oder 4 µl Proteasepuffer und 1 µl Proteinase K (100 µg/ml Endkonzentration) gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Behandlung wurde durch Zugabe von 1 µl gesättigtem PMSF und 5 min Inkubation auf Eis gehemmt.

#### 4.17 Sedimentation unter Hochsalzbedingungen

Die Sedimentation mittels Ultrazentrifugation fand direkt im Anschluss an eine *in vitro* Translokation statt. Es wurde 1 µl Probe entnommen (Fraktion „Ausgang“) und der verbleibende Reaktionsansatz mit 10 µl Hochsalzpuffer versetzt. Anschließend wurde in geeigneten Reaktionsgefäßen 50 µl Hochsalzkissen (0,5 M Sucrose) vorgelegt und vorsichtig mit dem Translokationsansatz überschichtet. Es wurde für 16 min bei 55000 rpm und 4 °C in der Ultrazentrifuge mit dem Rotor TLA55 zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mittels Ammoniumsulfatfällung reduziert und das Pellet in 2x SDS-Probenpuffer gelöst.

#### 4.18 Ammoniumsulfatfällung

Einige Proben wurden mittels einer Ammoniumsulfatfällung aufkonzentriert und gereinigt. Diese Fällung eliminiert sowohl Biomoleküle, die keine Proteine sind, als auch kleine Proteine. Dies ist insbesondere von Bedeutung, da in dem verwendeten Retikulozytenlysat Globin in hohen Konzentrationen vorliegt. Die vorbehandelten Proben wurden hierzu bis zu einer Endkonzentration von 70 % mit gesättigtem Ammoniumsulfat versetzt. Bei Proben, die eine Proteinase K Behandlung durchlaufen hatten, wurde außerdem gesättigtes PMSF bis zu einer Endkonzentration von 1 % zugegeben. Es erfolgte eine 10-minütige Fällung auf Eis, gefolgt von 10 min Zentrifugation in der Kühlzentrifuge 5415R bei 4 °C und 16000 rpm. Im Anschluss wurde der Überstand abgenommen und verworfen, das Pellet getrocknet und schließlich in 2x SDS-Probenpuffer aufgenommen.

#### 4.19 SDS-Gelelektrophorese

Die Proben wurden für die SDS-Gelelektrophorese mit SDS-Probenpuffer bis zu einer einfachen Konzentration versetzt und für 10 min bei 60 °C inkubiert. Bei einer erfolgten PK-Behandlung wurde zusätzlich gesättigtes PMSF bis zu einer Endkonzentration von 1 % in den Ansatz gegeben. Für die Gelelektrophorese wurden Gele mit 8-15 % oder 15 % Acrylamid verwendet. In einem Lauf bei 45 mA für etwa 2 h in einer Kammer mit 1x Elektrophoresepuffer wurden die Proteine aufgetrennt. Im Anschluss wurde das Gel für 15 min in 15 % Essigsäure fixiert und zweimal 10 min mit Wasser gewaschen. Das Gel wurde bei 65 °C getrocknet und die Signale nach 72 h mittels des Phosphoimagers und dazugehöriger Software (Version 1.3.0; GE Healthcare) ausgelesen. Die Auswertung der Signale und der dazugehörigen Intensitäten erfolgte mithilfe des Programmes „Image Quant TL“ (Version 8.1; GE Healthcare).

#### 4.20 Tools zur Vorhersage von Sekundärstrukturen

Phyre2 unter „<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>“ (Kelley et al. 2015); abgerufen am 13.01.2023

Scratch unter „<https://scratch.proteomics.ics.uci.edu>“ (Cheng et al. 2005); abgerufen am 13.01.2023

## 5 Ergebnisse

Der zielgerichtete Transport von Proteinen innerhalb von eukaryotischen Zellen ist ein Schlüsselprozess für das Überleben des Organismus. Daher tragen viele Proteine spezifische Signalsequenzen, die einen Transport in ihre Zielorganellen ermöglichen. Dies gilt auch für Proteine, die in das endoplasmatische Retikulum importiert werden sollen. Ein korrektes Targeting von Proteinen zum ER ist dabei von besonderer Relevanz, da von dort aus eine weitere Verteilung vieler Proteine stattfindet. Dementsprechend werden sowohl der Import in das ER, als auch die folgenden Faltungs- und Modifikationsschritte engmaschig überwacht und fehlgeleitete, fehlgefaltete oder unvollständig modifizierte Proteine abgebaut.

Das Tragen einer ER-spezifischen Signalsequenz ist die erste Voraussetzung für den Eintritt in das Lumen des ER und damit in den Verteilungsprozess. Es wurde lange davon ausgegangen, dass die Signalsequenz zwingend zu einem Import führt und der reife Teil des Proteins erst wieder im Lumen eine Rolle spielt. Neuere Erkenntnisse legen jedoch nahe, dass schon während des Importes der reife Teil des Proteins evaluiert wird und gegebenenfalls Schritte eingeleitet werden, um eine Translokation zu verhindern. Bislang konnten intrinsisch ungeordnete Bereiche als Signalgeber für einen verminderten Import identifiziert werden. Ob es noch weitere Sequenz- oder Struktur motive gibt, die den Import in das ER positiv oder negativ beeinflussen, bleibt hingegen offen.

### 5.1 ssPex8 wird vermutlich nicht vollständig in das ER importiert

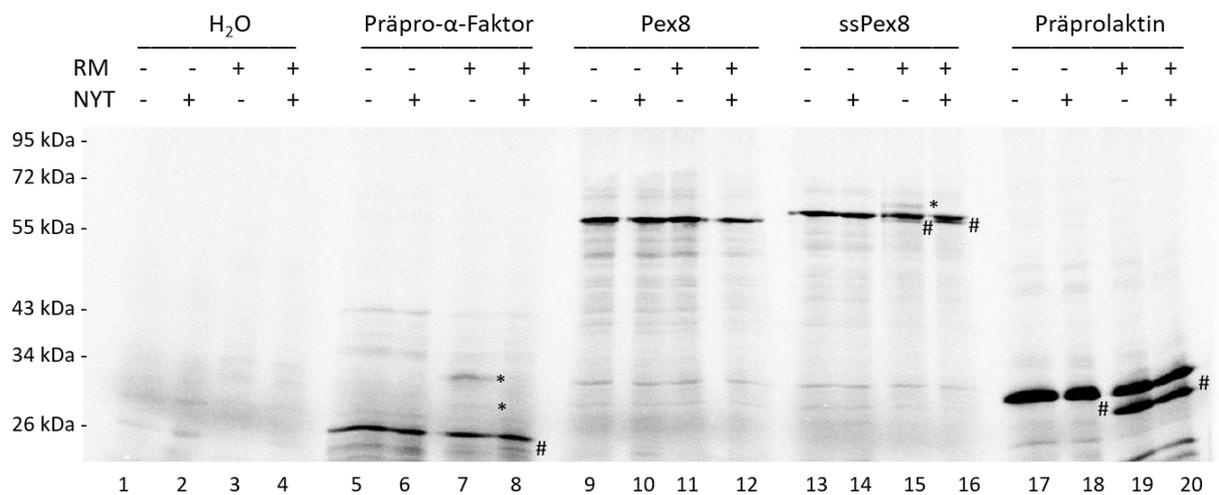
Das Importverhalten des Proteins ScPex8p wurde in der Arbeitsgruppe Kalies schon zuvor analysiert. Dafür wurde ein zellfreies *in vitro* System aus Retikulozytenlysat und rauen Membranen des Hundes verwendet. Die Daten konnten zeigen, dass das peroxisomale Protein ScPex8p bei Vorschaltung der Signalsequenz des Präpro- $\alpha$ -Faktors nur teilweise in das ER importiert wird (Ohms 2015). Trotz sieben vorliegender Glykosylierungsstellen wurden nicht alle Stellen genutzt und das Protein lag nicht final im ER vor. Dies ist dahingehend überraschend, dass gemäß der Signalthypothese von Blobel und Dobberstein (Blobel und Dobberstein 1975) das Vorschalten einer Signalsequenz eigentlich ausreichend sein sollte, um ein beliebiges Protein in das ER zu dirigieren. Allerdings wurden in den Versuchen von Ohms raue Membranen des Säugers verwendet, wohingegen der Präpro- $\alpha$ -Faktor und damit seine Signalsequenz aus Hefe stammen. Möglicherweise ist der unvollständige Import auf eine Inkompatibilität zwischen beiden Importsystemen zurückzuführen. Daher wäre zu erwarten, dass die Signalsequenz eines Säugerproteins eher geeignet ist, um einen vollständigen Import von ScPex8p (im Folgenden nur als Pex8 bezeichnet) zu erreichen.

Es soll zunächst untersucht werden, ob beim Vorschalten der Signalsequenz des Säugerproteins Präprolaktin eine Nutzung aller Glykosylierungsstellen erfolgt. Es wurde die Signalsequenz von Präprolaktin verwendet, da diese Sequenz effizient mit dem SRP interagiert und eine sehr feste Bindung zwischen Ribosom und Translokation erzeugt (Jungnickel und Rapoport 1995). Die Signalsequenz von Präprolaktin umfasst mit dem Startmethionin 30 Aminosäuren. Zusätzlich wurden weitere sechs Aminosäuren aus Präprolaktin (Spacer) vor dem reifen Teil von Pex8 eingefügt, um eine ungehinderte Prozessierung zu ermöglichen. Pex8 wurde letztendlich um 36 Aminosäuren verlängert, womit sich eine Gesamtgröße von 71,8 kDa ergibt. Das entstandene Fusionsprotein wird im Folgenden als ssPex8 bezeichnet. Alle Nummerierungen der Aminosäuren von ssPex8, die in dieser Arbeit verwendet werden, beziehen sich auf das Volllängenprotein mit Signalsequenz und Spacer. Als Kontrollen werden der Präpro- $\alpha$ -Faktor aus *Saccharomyces cerevisiae* und Präprolaktin aus *Bos taurus* verwendet. Der Präpro- $\alpha$ -Faktor wurde als Kontrolle gewählt, da er zuverlässig sowohl prozessiert als auch glykosyliert wird. Das Protein besitzt drei Glykosylierungsstellen und ist mit Signalsequenz 19,8 kDa groß. Mit Präprolaktin wurde ein 25,8 kDa großes Säugerprotein als zweite Importkontrolle gewählt, das nur prozessiert wird, da es keine Glykosylierungsstelle besitzt. Aus Präprolaktin stammt die für ssPex8 verwendete Signalsequenz. Alle verwendeten Proteine sind in Abbildung 3 gezeigt.



**Abbildung 3: Maßstabsgetreue Darstellung von ssPex8 und den verwendeten Kontrollen.** Gezeigt ist ssPex8, sowie Präprolaktin und Präpro- $\alpha$ -Faktor mit den jeweiligen Signalsequenzen. Pex8 ist in grün dargestellt, Präprolaktin in blau und der Präpro- $\alpha$ -Faktor in rot. Die Signalsequenzen sind jeweils dunkler gefärbt als der reife Teil. Glykosylierungsstellen sind durch Y dargestellt. Der Maßstab ist unten links gezeigt; AS = Aminosäuren.

Es sollte analysiert werden, ob Pex8 mit der Signalsequenz von Präprolaktin (ssPex8) vollständig glykosyliert wird. Um den Import zu untersuchen, wurde ein zellfreies *in vitro* System verwendet, das das Retikulozytenlysat aus Kaninchen in Kombination mit rauen Membranen des Hundes nutzt. Diese Membranen bestehen in erster Linie aus dem rauen endoplasmatischen Retikulum. Die Membranen und das Retikulozytenlysat wurden mit der mRNA der Proteine, einem Aminosäuremix ohne Methionin und  $^{35}\text{S}$ -Methionin kombiniert. Außerdem wurden Ansätze ohne raue Membranen präpariert, die stattdessen Membranpuffer enthielten. Vor der Translation wurden die Proben halbiert und die Hälfte der Proben mit einem Tripeptid aus Asparagin-Tyrosin-Threonin (NYT) gemischt, das als Glykosylierungskompetitor wirkt. Die Translation wurde 45 Minuten bei 25 °C durchgeführt. In Anwesenheit von rauen Membranen kann zusätzlich eine Translokation in das ER stattfinden. Es wurden 10 % jedes Ansatzes in SDS-Probenpuffer bei 60 °C für 10 Minuten denaturiert und in einer 8-15% SDS-PAGE bei 45 mA etwa zwei Stunden aufgetrennt. Die Gele wurden mit 15% Essigsäure fixiert, gewaschen und getrocknet. Anschließend wurden die radioaktiven Signale am Phosphoimager detektiert. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abbildung 4 zu sehen.



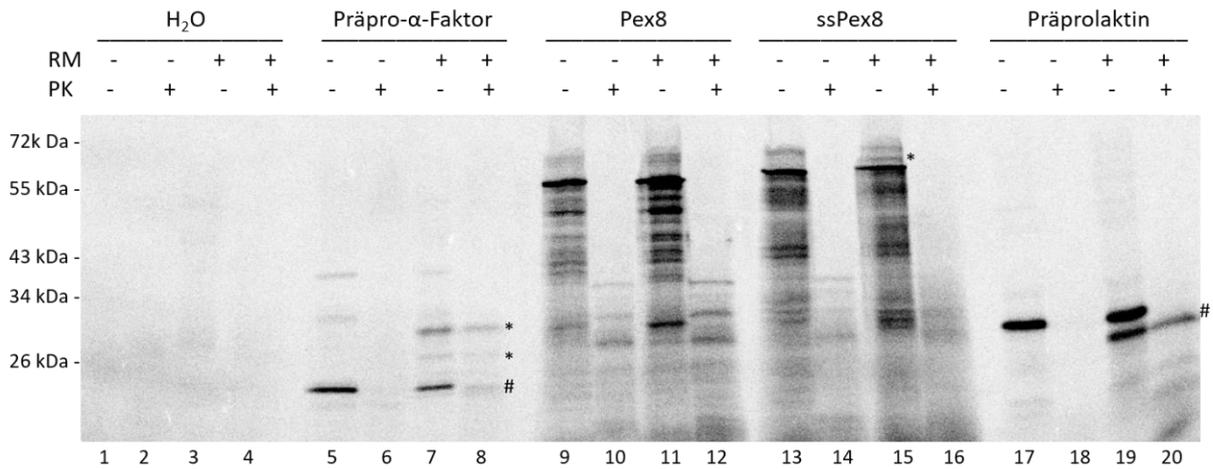
**Abbildung 4: ssPex8 wird vermutlich nicht vollständig in das ER importiert.** Die *in vitro* Translation der Proteine wurde bei 25°C für 45 min durchgeführt, zur Markierung wurde  $^{35}\text{S}$ -Methionin verwendet. In der Hälfte der Fälle wurden außerdem raue Membranen des Hundes (RM) zugegeben, um eine Translokation zu ermöglichen. Um mögliche Glykosylierungen zu überprüfen, wurde außerdem bei der Hälfte der Ansätze das Tripeptid NYT in den Translationsansatz gegeben. Im Anschluss wurden die Proteine in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

Das Protein ssPex8 (Spur 13-16) wird bei Zugabe von rauen Membranen des Hundes sowohl glykosyliert als auch prozessiert (Spur 15). Die glykosylierte Form läuft dabei etwas höher und die prozessierte Form etwas tiefer als die Bande des unmodifizierten Proteins. Mittels Zugabe des Tripeptides NYT kann gesichert werden, dass es sich bei der höheren Bande tatsächlich um eine Glykosylierung handelt (Spur 16), da die Bande oberhalb des unmodifizierten Signals nicht mehr zu sehen ist. Pex8 hat sieben potentielle Glykosylierungsstellen, wobei jede Glykosylierung das Molekulargewicht eines Proteins um etwa 2,5 kDa erhöht. Bei einer vollständigen Glykosylierung von ssPex8 wäre daher eine Vergrößerung um etwa 17,5 kDa zu erwarten. Der Abstand zwischen der Bande des unmodifizierten Proteins und der Glykosylierungsbande ist jedoch erheblich geringer (Spur 15). Daraus lässt sich schließen, dass ssPex8 nicht vollständig glykosyliert wird. Außerdem ist es ungewöhnlich, dass ohne Zugabe des Tripeptides NYT eine deutliche Prozessierungsbande sichtbar ist (Spur 15). Diese lässt vermuten, dass ein Teil des Proteins importiert und ausschließlich prozessiert wird, ohne dass eine Glykosylierung stattfindet. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass eine Prozessierung der Signalsequenz von Präprolaktin das Molekulargewicht des Proteins um etwa 3 kDa verringert. Es ist daher durchaus möglich, dass sich die Größenveränderungen durch Prozessierung und Glykosylierung ausgleichen. Bei der oberhalb sichtbaren Glykosylierungsbande könnte es sich entweder um eine doppelt glykosylierte und prozessierte Form oder eine einfach glykosylierte, nicht prozessierte Form handeln. Bei Zugabe des Tripeptides NYT wird die Prozessierungsbande intensiver als es durch das Eingehen des Signals der sichtbaren Glykosylierungsbande zu erwarten wäre (Spur 16). Dies deutet darauf hin, dass ein Teil des Proteins einfach glykosyliert und prozessiert wurde und daher etwa die Größe des unmodifizierten Proteins hat. Durch die Verhinderung der Glykosylierung geht dieser Teil in die ausschließlich prozessierte Form ein, was die Prozessierungsbande zusätzlich deutlicher werden lässt. Zusammengefasst deutet das Bandenmuster auf eine einfache oder doppelte Glykosylierung von ssPex8 hin. Das Protein wird also nicht vollständig glykosyliert.

Pex8 diene als Negativkontrolle und die Betrachtung der zugehörigen Spuren zeigt keinen Hinweis auf eine Modifikation und damit auf einen Import des Proteins (Spur 9-12). Die beiden Positivkontrollen Präpro- $\alpha$ -Faktor und Präprolaktin werden hingegen in das ER importiert. Dies zeigt sich für den Präpro- $\alpha$ -Faktor anhand der Glykosylierungen (Spur 7) und der Prozessierung (Spur 8). Für Präprolaktin wird eine Prozessierungsbande sichtbar (Spur 19). Auf die Prozessierung hat die Zugabe des Tripeptides keine Wirkung. Dies wird durch das unveränderte Bandenmuster in Spur 20 ersichtlich.

Es wurde deutlich, dass Pex8 auch durch das Vorschalten der Signalsequenz von Präprolaktin nur teilweise in das ER gelangt und dort vermutlich eine oder zwei der vorhandenen Glykosylierungsstellen genutzt wird oder werden. Es gibt für dieses Verhalten zwei mögliche Erklärungen. Einerseits wäre es möglich, dass ssPex8 nicht vollständig importiert wird und daher nicht alle Stellen in das ER gelangen, was ihre Glykosylierung verhindert. Andererseits könnte das Protein vollständig importiert werden und die Glykosylierungsstellen aus unbekanntem Gründen nicht genutzt werden. Im zweiten Fall sollte das Protein vollständig im ER vorliegen und damit vor einer externen Protease geschützt sein.

Um zu ermitteln, welche von beiden Varianten zutreffend ist, wurde erneut Retikulozytenlysat mit der mRNA der Proteine, Aminosäuremischung ohne Methionin,  $^{35}\text{S}$ -Methionin und rauen Membranen des Hundes kombiniert. Es wurden außerdem Ansätze ohne raue Membranen erstellt, welche als Kontrolle dienen, dass die Proteine grundsätzlich durch die verwendete Protease verdaut werden können. Es wurde eine *in vitro* Translation für 45 Minuten bei 25 °C durchgeführt. In den Ansätzen mit rauen Membranen konnte zusätzlich eine Translokation in das ER stattfinden. Nach der Translation/Translokation wurden die Ansätze aufgeteilt und der einen Hälfte Proteinase K bis zu einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  zugegeben. Der Verdau erfolgte für 30 Minuten auf Eis und wurde mit gesättigtem PMSF abgestoppt. Die Proteine wurden denaturiert und in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde fixiert, gewaschen und getrocknet. Im Anschluss wurden die radioaktiven Signale mittels Phosphorimaging detektiert und analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 zu sehen.



**Abbildung 5: Der ER-Import von ssPex8 ist unvollständig.** Die *in vitro* Translation der Proteine wurde bei 25°C für 45 min durchgeführt, zur Markierung wurde <sup>35</sup>S-Methionin verwendet. In der Hälfte der Fälle wurden außerdem raue Membranen des Hundes (RM) zugegeben, um eine Translokation zu ermöglichen. Um den Proteaseschutz zu überprüfen, wurde außerdem in der Hälfte der Ansätze die Proteinase K (PK) bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml in den Translationsansatz gegeben. Im Anschluss wurden die Proteine in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

Die Betrachtung der Spuren zu ssPex8 zeigt zunächst, dass das Protein wie im vorherigen Versuch glykosyliert wird (Spur 15). Dies lässt erneut darauf schließen, dass es zumindest teilweise importiert wird. Dennoch werden keine geschützten Banden auf Höhe des glykosylierten Proteins sichtbar (Spur 16). Es zeigen sich jedoch drei kleinere Banden zwischen 30 kDa und 40 kDa, die aus dem Verdau zu stammen scheinen. Dennoch kann man hier nicht von einem Schutz in einem membranumhüllten Raum ausgehen, da die Banden sich sowohl mit als auch ohne Membranzugabe zeigen (Spur 14 und Spur 16). Zusätzlich sind sie auch für die Negativkontrolle in Form von Pex8 zu beobachten (Spur 10 und Spur 12), was weiterhin dafür spricht, dass es sich um für die Protease nicht zugängliche Bereiche innerhalb des Proteins handelt. Aus der Abbildung ergeben sich daher keine Hinweise auf einen vollständigen Import von ssPex8.

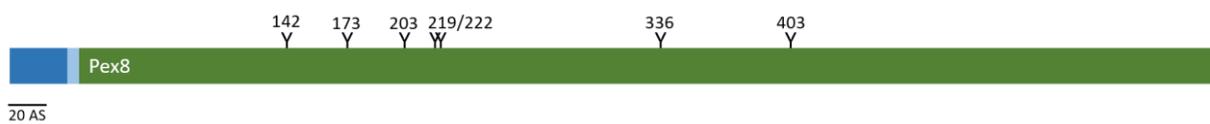
Pex8 diente erneut als Negativkontrolle, da das Protein nicht importiert wird und daher nicht geschützt vorliegen kann. Dementsprechend zeigen sich keine Glykosylierungs- oder Prozessierungsbanden (Spur 11). Die Banden oberhalb der unmodifizierten Proteinbanden sind hier Background- und keine Glykosylierungsbanden, da sie sich sowohl mit als auch ohne raue Membranen ergeben. Bei Behandlung mit der Proteinase sind für Pex8 die schon bei ssPex8 beobachteten Abbaubanden zu sehen (Spur 12). Da sie sich jedoch erneut mit und ohne raue Membranen ergeben, stammen sie vermutlich aus Bereichen des Proteins, die nicht zugänglich für die Protease sind. Es kann daher geschlossen werden, dass sich Pex8 nicht innerhalb des ER befindet. Der  $\alpha$ -Faktor liegt nach einem erfolgten Import geschützt im ER vor. Mehrere Glykosylierungsbanden zeigen einen Import in das ER (Spur 7). Bei Zugabe von Proteinase K ist nur die unmodifizierte Variante für die Proteinase zugänglich, daher sind die dazugehörigen Banden nicht mehr zu sehen. Für die glykosylierten Formen ergibt sich durch den ER-Import ein Schutz, weshalb die entsprechenden Banden nach wie vor sichtbar sind (Spur 8). Prolaktin wird ebenfalls importiert (Spur 19). Auch in diesem Fall befindet sich die prozessierte Form innerhalb des ER, weshalb bei Zugabe der PK die dazugehörige Bande weiterhin sichtbar ist (Spur 20).

Der Versuch zeigt, dass ssPex8 nicht geschützt innerhalb des ER vorliegt. Daher lässt sich vermuten, dass auch die unvollständige Nutzung der Glykosylierungsstellen darauf zurückzuführen ist, dass ssPex8 nicht vollständig importiert wird. Es kann geschlossen werden, dass auch die Signalsequenz eines Säugerproteins nicht hinreichend für einen vollständigen Import von Pex8 in das ER ist. Dies ist

insofern überraschend, als die Signalsequenz durchaus für einen anfänglichen Import von ssPex8 in das ER sorgt. Daher scheint ein Signal im reifen Teil von Pex8 vorzuliegen, das einen finalen Import von ssPex8 in das ER verhindert.

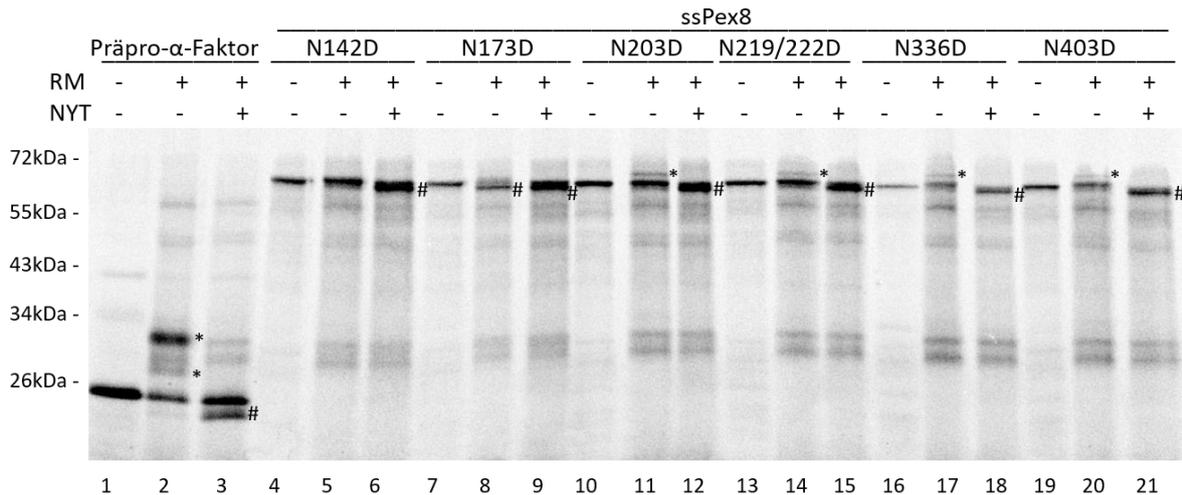
## 5.2 Die ersten beiden Glykosylierungsstellen von Pex8 werden genutzt

Pex8 besitzt sieben potentielle Glykosylierungsstellen (siehe Abbildung 6). Die bisherigen Ergebnisse zeigen jedoch, dass ssPex8 vermutlich nur teilweise in das ER importiert wird und nicht alle sieben Glykosylierungsstellen genutzt werden. Anhand des Größenunterschiedes zum unmodifizierten Protein kann vermutet werden, dass das Protein entweder einfach oder doppelt glykosyliert wird. Es sollte daher mit den folgenden Versuchen aufgeklärt werden, ob es sich um eine einfache oder doppelte Glykosylierung handelt und welche der sieben Glykosylierungsstellen genutzt wird oder werden.



**Abbildung 6: Maßstabsgetreue Darstellung von ssPex8 unter Berücksichtigung der Glykosylierungsstellen.** Gezeigt ist ssPex8 in grün mit den sieben Glykosylierungsstellen des Proteins. Diese sind mit Y gekennzeichnet und gemäß der Glykosylierungsposition nummeriert. Die Signalsequenz und zusätzliche sechs Aminosäuren aus Präprolaktin sind in blau zu sehen, wobei die Signalsequenz dunkelblau und der Spacer hellblau eingefärbt ist. Der Maßstab ist unten links gezeigt; AS = Aminosäuren.

Es wurden Varianten von ssPex8 erstellt, in denen jeweils eine der Glykosylierungsstellen fehlt, um zu überprüfen, ob sich eine Veränderung des Glykosylierungsverhaltens ergibt. Dies wurde erreicht, indem jeweils das Asparagin (N) der jeweiligen Stelle durch eine Asparaginsäure (D) ersetzt und damit das Glykosylierungsmotiv zerstört wurde. Die vierte und fünfte Glykosylierungsstelle (Position 219 und 222) liegen direkt hintereinander, daher wird vermutlich ohnehin immer nur eine der beiden Stellen glykosyliert (Gavel und Heijne 1990). Diese beiden Stellen wurden deshalb nur in Kombination verändert. Die mRNA der Varianten wurde mit Retikulozytenlysate, Aminosäuremix,  $^{35}\text{S}$ -Methionin und entweder mit rauen Membranen oder Membranpuffer kombiniert. Die Ansätze wurden mit dem Tripeptid NYT behandelt und eine Translation mit möglichem Transport durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktiven Signale wurden mittels Phosphorimaging detektiert und analysiert. Das Ergebnis des Versuches ist in Abbildung 7 gezeigt.



**Abbildung 7: Die Deletion der ersten und zweiten Glykosylierungsstelle hat eine Auswirkung auf das Glykosylierungsverhalten von ssPex8.** Die *in vitro* Translation der Proteine wurde bei 25°C für 45 min durchgeführt, zur Markierung wurde  $^{35}\text{S}$ -Methionin verwendet. In der Hälfte der Fälle wurden außerdem raue Membranen des Hundes (RM) zugegeben, um eine Translokation zu ermöglichen. Um mögliche Glykosylierungen zu überprüfen, wurde außerdem für einen Teil der Ansätze das Tripeptid NYT in den Translationsansatz gegeben. Im Anschluss wurden die Proteine in einem 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

Die Variante von ssPex8, in der die erste Glykosylierungsstelle fehlt (N142D), wird bei Zugabe von rauen Membranen nicht sichtbar glykosyliert (Spur 5). Bei zusätzlicher Zugabe von NYT wird eine Prozessierungsbande sichtbar (Spur 6). Dies lässt vermuten, dass sich die Größenveränderungen beider Modifikationen gegenseitig aufgehoben haben. Daher zeigt sich die Prozessierung nur, wenn die Glykosylierung durch Zugabe des Tripeptides unterbunden wird. Auf Höhe der für ssPex8 sichtbaren Glykosylierungsbande (siehe Abbildung 4) lässt sich hingegen keine Bande beobachten. Dies spricht dafür, dass ssPex8N142D ausschließlich einfach glykosyliert wird. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Variante ohne die zweite Glykosylierungsstelle (N173D). Die Prozessierung ist in diesem Fall jedoch auch ohne Zugabe des Tripeptides NYT sichtbar. Sie wird bei Zugabe des Tripeptides NYT intensiver, was wiederum für eine einfache Glykosylierung spricht, die aufgrund der gleichzeitigen Prozessierung im Gel nicht sichtbar wird.

Im Unterschied zu ssPex8N142D und ssPex8N173D ist für die anderen vier Varianten eine Glykosylierungsbande oberhalb zu beobachten (Spur 11, Spur 14, Spur 17, Spur 20). Diese befindet sich etwa auf Höhe der zuvor schon für ssPex8 beobachteten Bande (siehe Abbildung 4). Darüber hinaus ist auch für diese Proteine bei Zugabe des Tripeptides NYT eine Intensivierung der Prozessierungsbande zu beobachten (Spur 12, Spur 15, Spur 18, Spur 21). Die Intensivierung ist dabei ausgeprägter, als durch das alleinige Eingehen der sichtbaren Glykosylierungsbande zu erwarten wäre. Daher lässt sich vermuten, dass für diese Proteine ebenfalls eine einfache Glykosylierung vorliegt. Diese wird durch die Prozessierung maskiert, weshalb sie im Gel nicht zu sehen ist und geht bei Zugabe des Tripeptides in die Prozessierungsbande über. Außerdem gibt die Tatsache, dass die Deletion zweier Stellen das Glykosylierungsmuster verändert, einen Hinweis darauf, dass es sich bei der sichtbaren Glykosylierungsbande um eine doppelte Glykosylierung handeln könnte.

Der Präpro- $\alpha$ -Faktor wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Dieser wird in das ER importiert und daher bei Zugabe von rauen Membranen glykosyliert und prozessiert (Spur 2). In Spur 3 wird die prozessierte Form des Proteins deutlich sichtbar, da sie aufgrund der Verdrängung der Glykosylierungen stärker zur Geltung kommt.

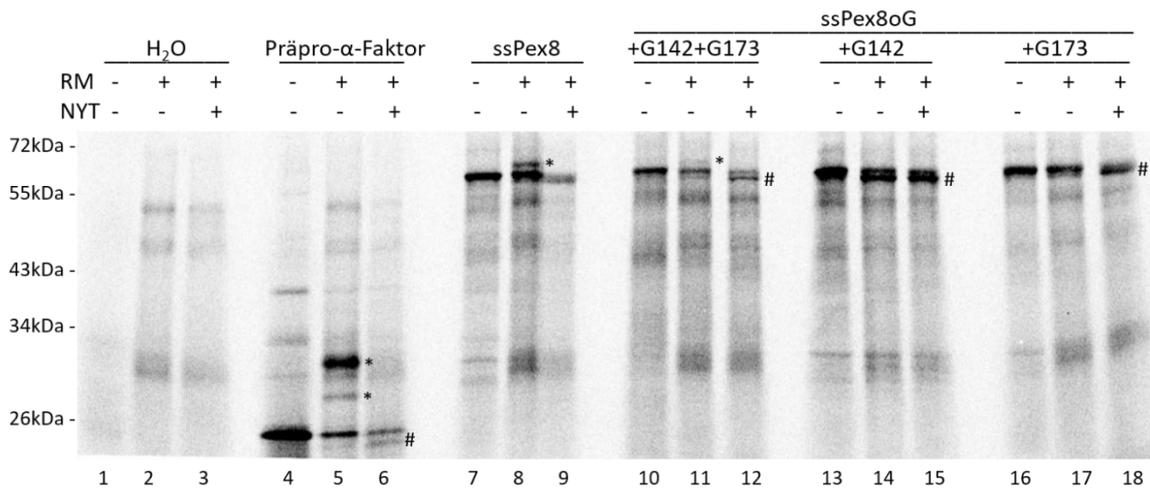
Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Entfernung der ersten beiden Glykosylierungsstellen an den Positionen 142 und 173 zur Folge hat, dass für ssPex8 keine Glykosylierungsbande mehr zu sehen ist. Es findet bei diesen Proteinen vermutlich nur eine einfache Glykosylierung statt, die aufgrund einer gleichzeitigen Prozessierung im Gel nur indirekt sichtbar ist. Für die Proteine, bei denen jeweils eine der fünf C-terminalen Stellen nicht vorhanden war, lässt sich hingegen eine sichtbare Glykosylierungsbande erkennen. Vermutlich werden hier bei einem Import die Glykosylierungsstellen an den Positionen 142 und 173 genutzt, wodurch sich eine doppelte Glykosylierung ergibt.

Um diese Hypothese zu stützen, wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, in der die beiden ersten Stellen gesondert betrachtet wurden. Es wurde dafür eine Variante von ssPex8 kloniert, die ausschließlich die beiden ersten Stellen in Kombination trägt (ssPex8oG+G142+G173). Die Verwendung aller anderen Stellen wurden durch einen Aminosäureaustausch von Asparagin (N) zu Asparaginsäure (D) ausgeschlossen. Außerdem wurden Proteine verwendet, in denen nur noch die erste (ssPex8oG+G142) bzw. nur noch die zweite (ssPex8oG+G173) Glykosylierungsstelle zur Verfügung standen. Die Proteine sind in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8: Maßstabsgetreue Darstellung von drei ssPex8-Varianten mit der ersten und/oder der zweiten Glykosylierungsstelle.** Gezeigt sind drei verschiedene Varianten von ssPex8 in grün mit den jeweils vorhandenen Glykosylierungsstellen. Diese sind mit Y gekennzeichnet und nach der Glykosylierungsposition nummeriert. Die Signalsequenz und zusätzliche sechs Aminosäuren aus Präprolaktin sind in blau zu sehen, wobei die Signalsequenz dunkelblau und der Spacer hellblau eingefärbt ist. Der Maßstab ist unten links gezeigt; AS = Aminosäuren.

Die mRNA der Varianten wurde mit Retikulozytenlysat, Aminosäuremix und  $^{35}\text{S}$ -Methionin kombiniert und entweder rauen Membranen oder Membranpuffer zugegeben. Es wurde eine Translation mit möglichem Transport in Anwesenheit des Tripeptides NYT durchgeführt. Die Proteine wurden in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die radioaktiven Signale mittels Phosphoimaging detektiert. Das Ergebnis des Versuches ist in Abbildung 9 gezeigt.



**Abbildung 9: In ssPex8 werden die ersten beiden Glykosylierungsstellen genutzt.** Die *in vitro* Translation der Proteine wurde bei 25°C für 45 min durchgeführt, zur Markierung wurde <sup>35</sup>S-Methionin verwendet. In der Hälfte der Fälle wurden außerdem raue Membranen des Hundes (RM) zugegeben, um eine Translokation zu ermöglichen. Um mögliche Glykosylierungen zu überprüfen, wurde außerdem in einen Teil der Ansätze das Tripeptid NYT gegeben. Im Anschluss wurden die Proteine in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

Für die Variante von ssPex8, die die erste und zweite Glykosylierungsstelle trägt (Spur 10-12), zeigt sich eine Glykosylierungsbande auf derselben Höhe wie für das unmodifizierte ssPex8 (Spur 11, siehe Spur 8). Die Glykosylierungsintensität ist etwas schwächer als bei ssPex8, allerdings ist auch die Gesamtintensität der Banden im Vergleich etwas schwächer. Es handelt sich hier mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine doppelte Glykosylierung der beiden Stellen an den Positionen 142 und 173. Außerdem ist für ssPex8oG+G142+G173 eine Prozessierungsbande sichtbar (Spur 11), die bei Verwendung des Tripeptides deutlich intensiver wird (Spur 12). Die Intensität nimmt dabei in höherem Maße zu, als durch das Eingehen der doppelten Glykosylierungsbande zu erklären wäre. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das Protein auch einfach glykosyliert wird. Die Glykosylierung und Prozessierung gleichen sich jedoch gegenseitig aus, weshalb die Prozessierung erst durch das Unterbinden von Glykosylierungen sichtbar wird. Für die Variante, die nur die erste Glykosylierungsstelle trägt, lässt sich schon ohne das Tripeptid eine Prozessierungsbande beobachten (Spur 14). Bei Zugabe des Tripeptides (Spur 15) wird sie etwas intensiver, weshalb sich auch für dieses Protein eine einfache Glykosylierung vermuten lässt. Eine ähnliche Konstellation ergibt sich, wenn ssPex8 nur noch die zweite Glykosylierungsstelle trägt. Auch diese Variante wird schon ohne Zugabe des Tripeptides sichtbar prozessiert (Spur 17). Die Intensität wird jedoch auch für diese Variante mit NYT höher, weshalb sich eine einfache Glykosylierung annehmen lässt.

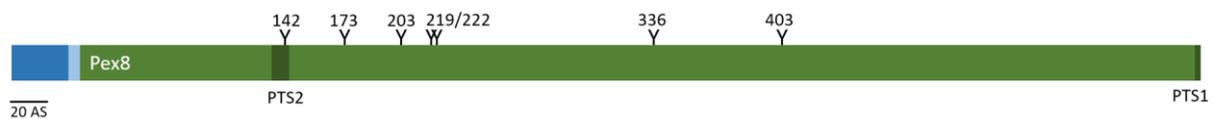
Bei Betrachtung von ssPex8 zeigt sich, dass das Protein analog zu vorangegangenen Versuchen glykosyliert und prozessiert wird. Auch der Präpro- $\alpha$ -Faktor wird glykosyliert und prozessiert und damit importiert.

Dieser Versuch bestätigt die zuvor getätigte Vermutung, dass bei einem Import in das ER nur die beiden N-terminalen Glykosylierungsstellen von ssPex8 genutzt werden. Die sichtbare Bande oberhalb der unmodifizierten Proteinbande, die auch in vorherigen Versuchen beobachtet werden konnte, stammt also von einer doppelten Glykosylierung nach einer Nutzung beider Stellen. Sobald eine der beiden genutzten Stellen nicht zur Verfügung steht, erfolgt nur noch eine einfache Glykosylierung. Der entstehende Größenunterschied wird jedoch zumindest teilweise durch die Prozessierung ausgeglichen. Durch die hohe Gesamtgröße des Proteins ist der Größenunterschied zum

unmodifizierten Protein nicht ausreichend groß, um im Gelsystem sichtbar zu werden. Daher ergeben sich keine differenzierbaren Banden, wenn nur eine einfache Glykosylierung stattfindet. Zusammengenommen zeigen beide Versuche die Nutzung der ersten und zweiten Glykosylierungsstelle an Positionen 142 und 173 von ssPex8.

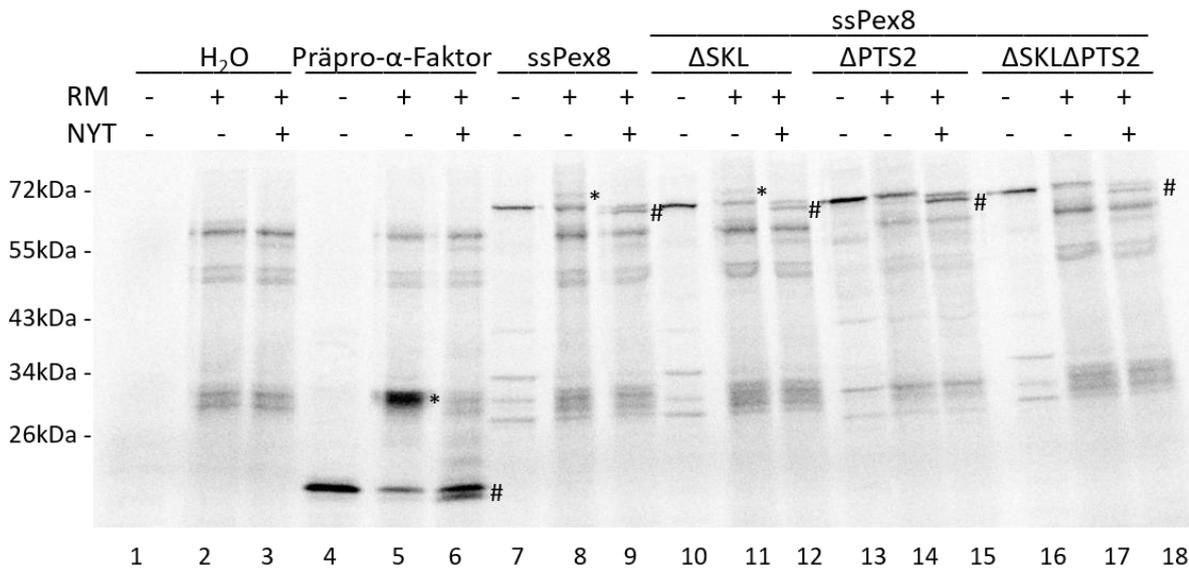
### 5.3 Die peroxisomalen Targetingsignale sind nicht für den unvollständigen Import von ssPex8 verantwortlich

Das in dieser Arbeit verwendete Pex8 weist als einziges bekanntes Protein beide peroxisomale Targetingsignale (PTS) auf (siehe Abbildung 10). Zum einen befindet sich ein PTS2 an Position 139-146 und damit auf Höhe der ersten Glykosylierungsstelle. Die Sequenz des Nonapeptides in Pex8 lautet RATWNLSTQ und entspricht damit nur teilweise der Konsensussequenz für ein PTS2. Zum anderen befindet sich am extremen C-Terminus des Proteins das PTS1 mit der Sequenz SKL. Es wäre denkbar, dass eines dieser Signale den ER-Import behindert oder einen Rücktransport aus dem ER in das Cytosol initiiert, damit im Anschluss ein Transport zu den Peroxisomen stattfinden kann. Es sollte daher analysiert werden, ob die peroxisomalen Targetingsignale für den unvollständigen Import von ssPex8 verantwortlich sind.



**Abbildung 10: Maßstabgetreue Darstellung von ssPex8 unter Berücksichtigung des PTS2 und PTS1.** Gezeigt ist ein Längenschema von ssPex8 (grün). Die peroxisomalen Targetingsignale (PTS1; PTS2) sind dunkelgrün markiert. Die Signalsequenz und zusätzliche sechs Aminosäuren aus Präprolaktin sind in blau zu sehen, wobei die Signalsequenz dunkelblau und der Spacer hellblau eingefärbt ist. Die Glykosylierungsstellen sind mit Y gekennzeichnet und gemäß der Position der ersten Aminosäure im Glykosylierungsmotiv nummeriert. Der Maßstab ist unten links gezeigt; AS = Aminosäuren.

Es wurde untersucht, ob eine Deletion der peroxisomalen Targetingsignale dazu führt, dass in ssPex8 zusätzlich zu den ersten beiden Glykosylierungsstellen auch die C-terminalen Stellen genutzt werden können. Dafür wurden Varianten von ssPex8 erstellt, in denen jeweils ein PTS fehlt (ssPex8 $\Delta$ SKL und ssPex8 $\Delta$ PTS2) und eine, die keines der beiden peroxisomalen Targetingsignale trägt (ssPex8 $\Delta$ SKL $\Delta$ PTS2). Hierbei ist zu beachten, dass eine Deletion des PTS2 zur Entfernung der ersten Glykosylierungsstelle führt, da sie sich innerhalb des Signals befindet. Es wurden alle Komponenten für eine *in vitro* Translation kombiniert und entweder mit rauen Membranen des Hundes oder Membranpuffer gemischt. Anschließend wurden die Ansätze mit dem Tripeptid NYT versetzt. Die Translation wurde durchgeführt, wobei in Anwesenheit von rauen Membranen auch ein Transport möglich war. Die entstandenen Proteine wurden durch eine 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels Phosphoimaging analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 11 gezeigt.



**Abbildung 11: Die Deletion der peroxisomalen Targetingsignale sorgt nicht für eine zusätzliche Glykosylierung von ssPex8.** Die *in vitro* Translation der Proteine wurde bei 25 °C für 45 min durchgeführt, zur Markierung wurde <sup>35</sup>S-Methionin verwendet. In der Hälfte der Fälle wurden außerdem raue Membranen des Hundes (RM) zugegeben, um eine Translokation zu ermöglichen. Um mögliche Glykosylierungen zu überprüfen, wurde außerdem in einen Teil der Translationsansätze das Tripeptid NYT gegeben. Im Anschluss wurden die Proteine in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

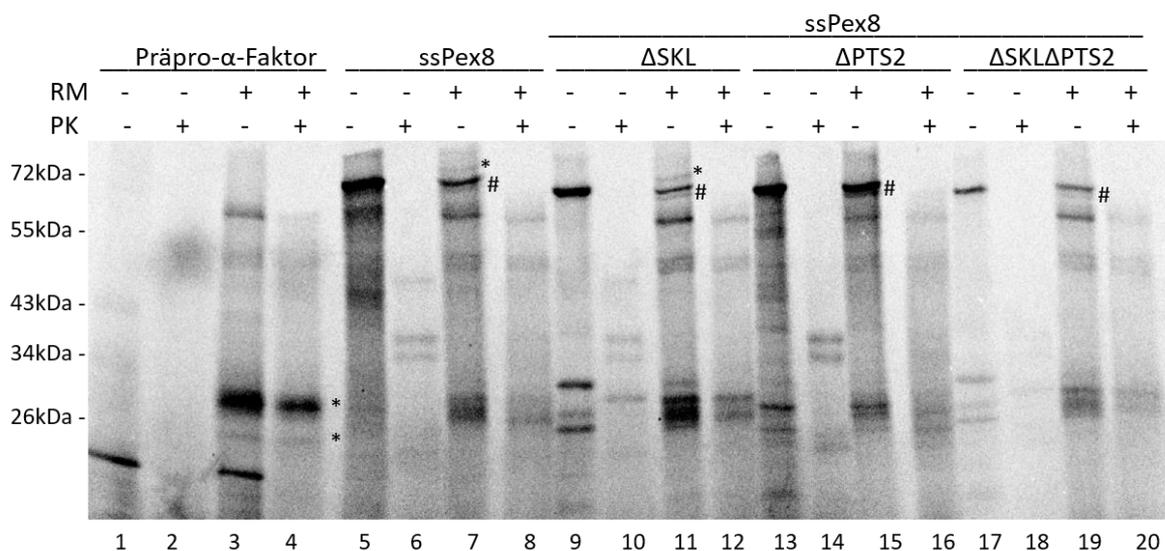
Das Protein ssPex8 $\Delta$ SKL wird bei Verwendung von rauen Membranen glykosyliert (Spur 11). Die Bande befindet sich auf derselben Höhe wie bei ssPex8, sodass man von einer doppelten Glykosylierung ausgehen kann. Außerdem wird das Protein prozessiert, was allerdings erst bei Zugabe des Tripeptides deutlich wird (Spur 12). Die Intensität der Prozessierungsbande ist dabei höher als die Intensität der Glykosylierungsbande. Dies war zuvor schon zu beobachten und spricht für eine versteckte einfache Glykosylierung, deren Größenveränderung durch die Prozessierung aufgehoben werden kann. Das Protein ohne das PTS1 wird also in gleichem Maße glykosyliert wie ssPex8. Dies war insofern zu erwarten, dass sich das PTS1 am extremen C-Terminus des Proteins befindet. Ein Einfluss auf das Glykosylierungsverhalten war daher nicht wahrscheinlich, wenn man davon ausgeht, dass die unvollständige Glykosylierung durch einen unvollständigen Import bedingt wird. Bei Betrachtung der Variante ohne das PTS2 (ssPex8 $\Delta$ PTS2) in Spur 13-15 zeigt sich keine Glykosylierungsbande oberhalb der unmodifizierten Form (Spur 14). Eine Prozessierung wird erneut nur bei Verwendung von NYT (Spur 15) sichtbar. Vermutlich liegt hier eine einfache Glykosylierung vor, die durch eine gleichzeitige Prozessierung verdeckt wird. Das Protein ssPex8 $\Delta$ PTS2 trägt damit eine Glykosylierung weniger als ssPex8. Dies lässt sich damit erklären, dass durch die Deletion des PTS2 die erste Glykosylierungsstelle entfernt wird. Auch ssPex8 $\Delta$ PTS2 zeigt damit nicht mehr Glykosylierungen als ssPex8. Das Protein, in dem die beiden peroxisomalen Targetingsignale fehlen (ssPex8 $\Delta$ SKL $\Delta$ PTS2) zeigt bei Zugabe von rauen Membranen ebenfalls keine Glykosylierungsbande (Spur 17). Auch für ssPex8 $\Delta$ SKL $\Delta$ PTS2 wird erst eine Prozessierung sichtbar, wenn NYT zugegeben wird (Spur 18). Dies ist vermutlich ebenfalls auf eine einfache Glykosylierung, deren Größenveränderung durch die Prozessierung ausgeglichen wird zurückzuführen. Als Erklärung bietet sich wiederum die Entfernung der ersten Stelle durch die Deletion des PTS2 an. Somit wird auch dieses Protein nicht in höherem Maße glykosyliert als ssPex8.

Der Präpro- $\alpha$ -Faktor wird in hohem Maße glykosyliert und verhält sich damit erwartungsgemäß.

Es lässt sich zeigen, dass durch die Deletion des PTS1 nicht mehr Glykosylierungsstellen von ssPex8 genutzt werden. Auch bei einer Deletion des PTS2 finden nicht mehr Glykosylierungen statt. Daraus

kann geschlossen werden, dass die peroxisomalen Targetingsignale nicht dafür verantwortlich sind, dass die C-terminalen Glykosylierungsstellen nicht genutzt werden.

Dennoch wäre es denkbar, dass die Proteine ohne PTS weiter importiert werden und die Glykosylierungsstellen aus anderen Gründen nicht genutzt werden. Es sollte daher im Folgenden untersucht werden, ob die Deletion der peroxisomalen Targetingsignale dazu führt, dass ssPex8 vollständig importiert wird. Daher wurde mit allen im vorherigen Versuch verwendeten Varianten ein Translationsansatz erstellt, der entweder raue Membranen oder Membranpuffer enthielt. Die Translation mit möglichem Transport fand statt und im Anschluss wurden die Proben mit der Proteinase K verdaut. Der Verdau wurde durch Zugabe von PMSF gehemmt. Im Anschluss wurden die Proteine mit einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktiven Signale wurden mittels Phosphoimaging ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abbildung 12 gezeigt.



**Abbildung 12: Die Deletion der peroxisomalen Targetingsignale führt nicht zum Import von ssPex8.** Die *in vitro* Translation der Proteine wurde bei 25°C für 45 min durchgeführt, zur Markierung wurde <sup>35</sup>S-Methionin verwendet. In der Hälfte der Fälle wurden außerdem raue Membranen des Hundes (RM) zugegeben, um eine Translokation zu ermöglichen. Um den Proteaseschutz zu überprüfen, wurde außerdem in der Hälfte der Ansätze die Proteinase K (PK) bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml in den Translationsansatz gegeben. Im Anschluss wurden die Proteine in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

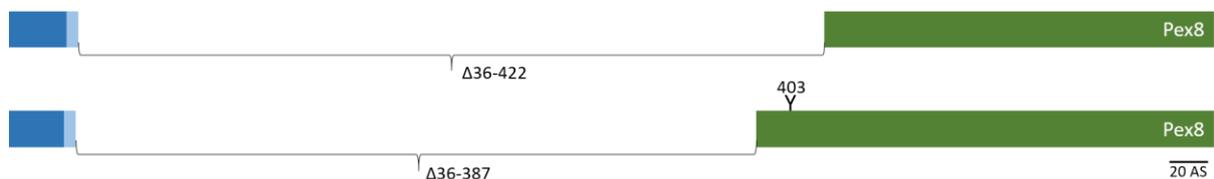
Für das Protein ssPex8 $\Delta$ SKL konnte kein Schutz vor der Proteinase beobachtet werden (Spur 12), obwohl es deutlich glykosyliert und prozessiert wurde (Spur 11). Anhand der Position des PTS1 wäre es lediglich denkbar gewesen, dass es nach einem vollständigen Import als Signal für einen retrograden Transport fungiert. Dies scheint jedoch nicht der Fall zu sein, da ssPex8 $\Delta$ SKL ungeschützt und damit außerhalb des ER vorliegt. Auch ssPex8 $\Delta$ PTS2 liegt ungeschützt vor (Spur 16). Aufgrund der Tatsache, dass dieser Variante die erste Glykosylierungsstelle fehlt, war keine sichtbare Glykosylierung zu erwarten. Da ssPex8 $\Delta$ PTS2 jedoch prozessiert wird, ist zumindest ein partieller Import gesichert (Spur 15). Dennoch scheint das Protein nicht vollständig importiert zu werden, da kein Schutz zu beobachten ist. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Variante, in der beide peroxisomale Targetingsignale fehlen (ssPex8 $\Delta$ SKL $\Delta$ PTS2). Auch hier findet durch die fehlende erste Glykosylierungsstelle nur eine einfache Glykosylierung statt, die im Gel nicht sichtbar ist. Die Prozessierung zeigt einen Import von ssPex8 $\Delta$ SKL $\Delta$ PTS2 (Spur 19), dennoch liegt das Protein vollständig ungeschützt vor (Spur 20). Es wird dementsprechend nicht vollständig importiert.

Bei Betrachtung des Präpro- $\alpha$ -Faktors wird deutlich, dass das Protein bei Zugabe von raue Membranen glykosyliert und damit importiert wird (Spur 3). Die glykosylierten Formen liegen final im ER vor (Spur 4). Das unmodifizierte ssPex8 wird glykosyliert und prozessiert (Spur 7), liegt aber nicht final im ER vor (Spur 8).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Varianten von ssPex8, in denen eines oder beide peroxisomale Targetingsignale fehlen, analog zum unveränderten ssPex8 glykosyliert werden und ebenfalls nicht final im ER vorliegen. Folglich sind weder das PTS1 noch das PTS2 dafür verantwortlich, dass ssPex8 nicht vollständig glykosyliert wird und final nicht im ER vorliegt.

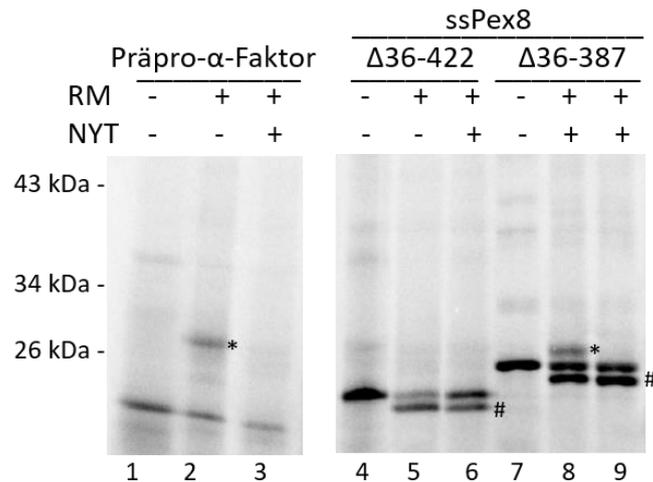
#### 5.4 Die letzte Glykosylierungsstelle von Pex8 ist funktional

In bisherigen Versuchen zeigte sich, dass bei ssPex8 nur die ersten beiden Glykosylierungsstellen genutzt wurden, obwohl das Protein insgesamt sieben Glykosylierungsstellen besitzt. Es wird davon ausgegangen, dass ssPex8 nur teilweise importiert wird, was eine Nutzung der C-terminalen Stellen verhindert. Theoretisch wäre es jedoch auch möglich, dass für ssPex8 ein vollständiger Import mit anschließendem retrograden Transport stattfindet und die C-terminalen Glykosylierungsstellen nicht funktional sind. Um zu klären, welches Modell zutreffend ist, wurde repräsentativ die letzte Glykosylierungsstelle an Position 403 betrachtet. Dafür wurden Verkürzungen von ssPex8 erstellt, in denen ein N-terminaler Bereich des reifen Pex8 deletiert wurde. Die Signalsequenz von Präprolaktin mit Spacer, sowie der C-Terminus von Pex8 bleiben somit unverändert (siehe Abbildung 13). Durch die Erstellung einer Variante mit Signalsequenz und Spacer, sowie der Aminosäuren 388-624 von ssPex8 wurde eine isolierte Betrachtung der letzten Glykosylierungsstelle (G403) möglich. Zusätzlich wurde eine Variante kloniert, die nur aus den Aminosäuren 423-624 von ssPex8 mit Signalsequenz und Spacer besteht und somit keine Glykosylierungsstelle trägt. Diese dient als Negativkontrolle.



**Abbildung 13: Maßstabgetreue Darstellung der N-terminalen Verkürzungen von ssPex8.** Gezeigt sind die N-terminalen Verkürzungen von ssPex8 in grün. Außerdem ist die Glykosylierungsstelle an Position 403 mit Y gekennzeichnet und gemäß der Position der ersten Aminosäure im Glykosylierungsmotiv nummeriert. Die Signalsequenz und zusätzliche sechs Aminosäuren aus Präprolaktin sind in blau zu sehen, wobei die Signalsequenz dunkelblau und der Spacer hellblau eingefärbt ist. Der Maßstab ist unten rechts gezeigt; AS = Aminosäuren.

Mit den genannten Varianten von ssPex8 wurde ein Translationsansatz zusammengestellt, der raue Membranen des Hundes enthielt. Außerdem wurde der Glykosylierungskompetitor NYT zugegeben. Mit den Proben wurde eine *in vitro* Translation mit möglicher Translokation durchgeführt. Die entstandenen Proteine wurden in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Signale wurden mittels Phosphoimaging detektiert, das Ergebnis ist in Abbildung 14 gezeigt.



**Abbildung 14: Die letzte Glykosylierungsstelle von ssPex8 kann prinzipiell genutzt werden.** Die *in vitro* Translation der Proteine wurde bei 25°C für 45 min durchgeführt, zur Markierung wurde  $^{35}\text{S}$ -Methionin verwendet. In der Hälfte der Fälle wurden außerdem raue Membranen des Hundes (RM) zugegeben, um eine Translokation zu ermöglichen. Um mögliche Glykosylierungen zu überprüfen, wurde außerdem in einen Teil der Translationsansätze das Tripeptid NYT zugegeben. Im Anschluss wurden die Proteine in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Die oben gezeigten Proben stammen aus demselben Versuch. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

Das Protein mit der Glykosylierungsstelle an Position 403 (ssPex8 $\Delta 36-387$ ) wird glykosyliert (Spur 8). Es handelt sich hierbei um eine einfache Glykosylierung, da in dieser Variante nur die letzte Glykosylierungsstelle vorliegt. Das Protein wird außerdem in hohem Maße prozessiert (Spur 8, Spur 9). Die Prozessierung ist schon ohne Zugabe des Tripeptides NYT sichtbar, was bedeutet, dass ein Teil des Proteins ausschließlich prozessiert wird. Trotz der hohen Intensität der Prozessierungsbanden lässt sich die erwartete Zunahme der prozessierten Bande bei Zugabe des Tripeptides beobachten. Eine Glykosylierung der C-terminalen Glykosylierungsstelle ist also im verwendeten Versuchsaufbau möglich.

Das Protein ssPex8 $\Delta 36-422$  diente als Negativkontrolle und wird nicht glykosyliert. Dies war zu erwarten, da es keine Glykosylierungsstellen aufweist. Es wird jedoch in hohem Maße prozessiert und dementsprechend in das ER importiert (Spur 5). Der Präpro- $\alpha$ -Faktor wird wie erwartet glykosyliert (Spur 2).

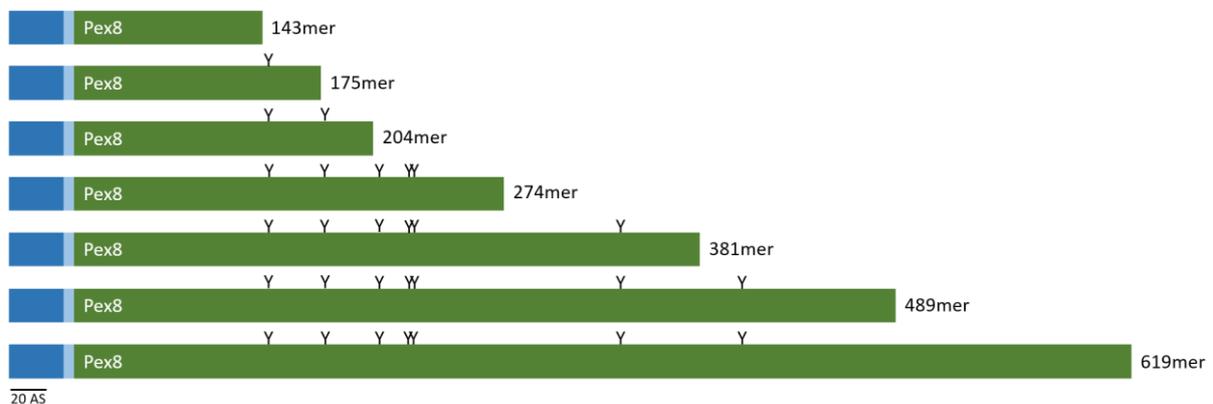
Der Versuch zeigt eindeutig, dass die letzte Glykosylierungsstelle von ssPex8 funktional ist und im verwendeten System genutzt werden kann. Dennoch werden bei Versuchen mit dem Vollängenprotein nur die beiden N-terminalen Stellen glykosyliert. Im Falle eines vollständigen Transportes mit anschließendem retrograden Transport wäre eine Nutzung der C-terminalen Glykosylierungsstelle zu erwarten. Daher ist nun davon auszugehen, dass die unvollständige Nutzung der Glykosylierungsstellen von ssPex8 auf einen unvollendeten Import des Proteins zurückzuführen ist. Das Protein wird also anfänglich importiert, der Import jedoch unterbrochen.

Dieses Verhalten ist typisch für Proteine mit intrinsisch ungeordneten Bereichen. Sie werden schon während des ER-Importes erkannt und über den Weg der *preemptive quality control* dem Proteasom zugeführt. Die Sequenz von ssPex8 wurde daher mit den Vorhersage-Tools „Scratch“ und „Phyre2“ nach ungeordneten Bereichen durchsucht. In einem Fall (Phyre2) wurden wenige Aminosäuren lange, ungeordnete Abschnitte gefunden, jedoch mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit vorhergesagt. Im zweiten Fall (Scratch) wurden keine intrinsisch ungeordneten Bereiche für vorhergesagt. Daher muss es für den gehinderten Import andere verantwortliche Bereiche geben.

### 5.5 Der Import von ssPex8 wird nach AS 201 unterbrochen

Trotz sieben vorhandenen Glykosylierungsstellen in ssPex8 werden nur die ersten beiden Stellen genutzt, obwohl die letzte Stelle funktional ist. Außerdem liegt das Protein nicht final im ER vor. Dies zeigt sich dadurch, dass es nicht vor einer externen Protease geschützt ist. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der Import von ssPex8 in das endoplasmatische Retikulum nur unvollständig stattfindet. Die verwendete Signalsequenz ist geeignet, Proteine im verwendeten *in vitro* System zum ER zu dirigieren, wo sie normalerweise vollständig importiert werden. Daher stellt sich die Frage, ob es innerhalb der Proteinsequenz einen Bereich gibt, der den ER-Import unterbricht. Die beiden peroxisomalen Targetingsignale konnten bereits ausgeschlossen werden. Außerdem besitzt das Protein keine intrinsisch ungeordneten Bereiche.

Anhand der Nutzung der ersten beiden Stellen lässt sich vermuten, dass der Bereich hinter der zweiten Glykosylierungsstelle und damit hinter Position 173 liegen muss. Im Folgenden sollte der Bereich genauer eingegrenzt werden, in dem sich das putative hemmende Signal befindet. Dafür wurden sieben Verkürzungen erstellt. Das Protein wird vom C-Terminus her verkürzt, der N-Terminus mit der Signalsequenz von Präprolaktin mit dem Spacer bleibt unverändert. Alle Verkürzungen wurden mit einem Stop-Codon versehen, daher lösen sie sich nach Ende der Translation vom Ribosom. Außerdem wurden in die kürzeren Varianten C-terminal Methionine eingefügt, um die Detektion mittels radioaktiver Markierung abzusichern. Das 143mer, das 175mer und das 204mer tragen drei zusätzliche Methionine, das 274mer trägt ein zusätzliches Methionin. Es muss daher berücksichtigt werden, dass beispielsweise das 204mer nur 201 Aminosäuren aus Pex8 trägt und die Gesamtlänge durch die zusätzlichen Methionine zustande kommt. Die erstellten Verkürzungen sind in Kombination mit den Glykosylierungsstellen in Abbildung 15 gezeigt. Wie aus dem Schema deutlich wird, besitzt die kürzeste Variante noch keine Glykosylierungsstelle. Erst ab dem 175mer von ssPex8 ist die erste Glykosylierungsstelle vorhanden. Das 204mer ist die erste Verkürzung, die die beiden genutzten Glykosylierungsstellen trägt.

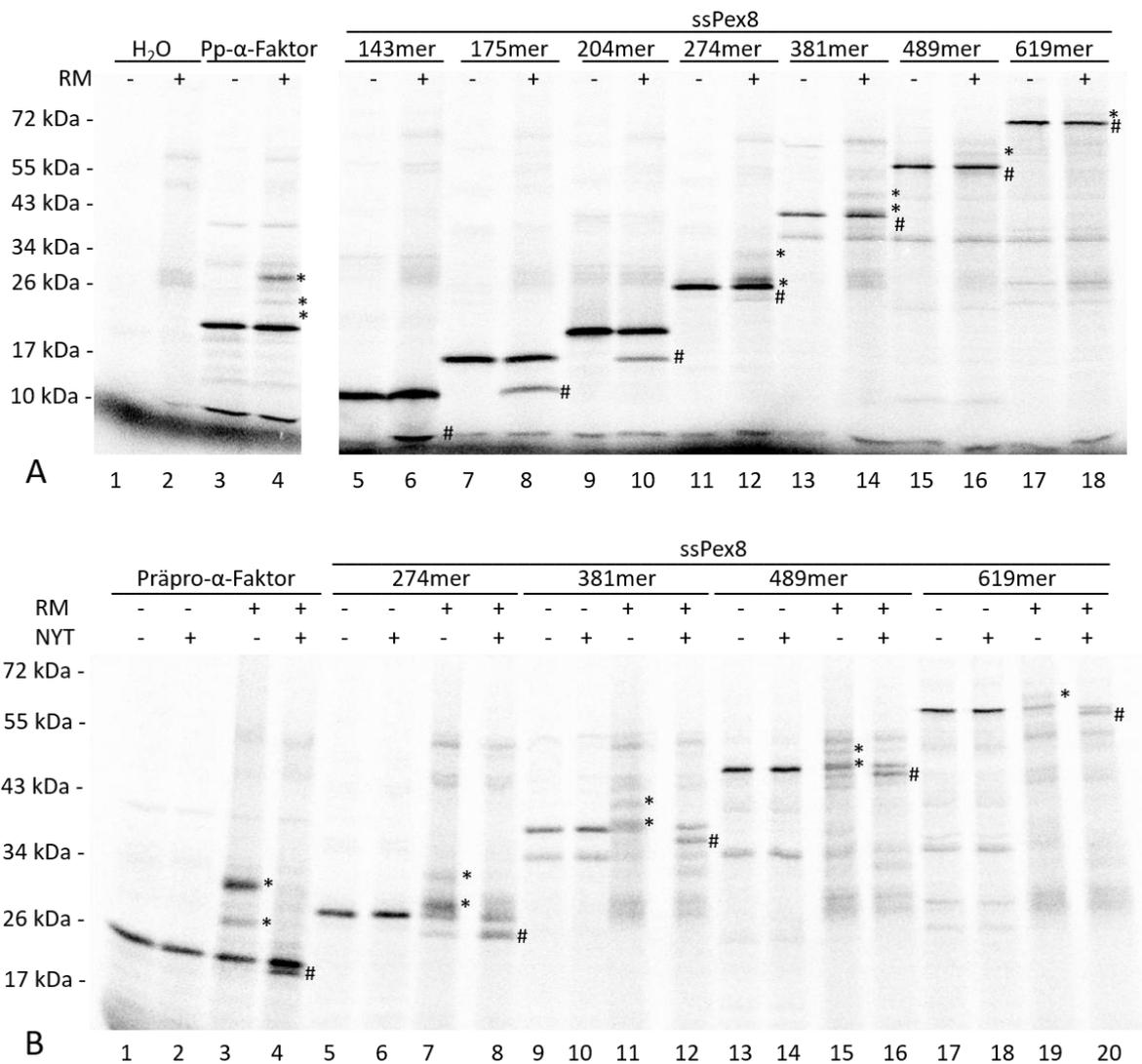


**Abbildung 15: Maßstabgetreue Verkürzungen von ssPex8 unter Berücksichtigung der Glykosylierungsstellen.**

Gezeigt sind die sieben verwendeten Verkürzungen von ssPex8 in grün. Außerdem sind die Glykosylierungsstellen mit Y gekennzeichnet. Die Signalsequenz und zusätzliche sechs Aminosäuren aus Präprolaktin sind in blau zu sehen, wobei die Signalsequenz dunkelblau und der Spacer hellblau eingefärbt ist. Der Maßstab ist unten links gezeigt; AS = Aminosäuren.

Falls es ein Signal gibt, das für den Abbruch des Importes verantwortlich ist, sollten nicht alle Verkürzungen diesen Bereich tragen. Für diese Verkürzungen wäre eine Glykosylierung über die ersten beiden Stellen hinaus und damit eine höhere Gesamtanzahl von Glykosylierungen zu erwarten. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob die erstellten Verkürzungen im Vergleich zu ssPex8 in höherem Maße glykosyliert werden. Es wurde mit allen Verkürzungen eine *in vitro* Translation durchgeführt. Eine Zugabe von rauen Membranen des Hundes ermöglicht außerdem einen Import in das ER. Im

Anschluss wurden die entstandenen Proteine auf einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Signale wurden mittels Phosphoimaging ausgewertet (Abbildung 16A). Zusätzlich wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, in dem die beobachteten Glykosylierungsbanden verifiziert wurden. Dazu wurde den Ansätze mit der RNA der längeren vier Verkürzungen vor der Translation das Tripeptid NYT zugegeben (Abbildung 16B). Es wurde eine Translation mit möglicher Translokation durchgeführt. Die Durchführung der SDS-PAGE und deren Auswertung waren zum vorherigen Versuch unverändert. Das Ergebnis beider Versuche ist in Abbildung 16 gezeigt.



**Abbildung 16: Die Verkürzungen von ssPex8 werden vermutlich nur doppelt glykosyliert.**

**A:** Die *in vitro* Translation der Proteine wurde bei 25°C für 45 min durchgeführt, zur Markierung wurde <sup>35</sup>S-Methionin verwendet. In allen Spuren mit geraden Zahlen wurden außerdem raue Membranen des Hundes (RM) zugegeben, um eine Translokation zu ermöglichen. Die gezeigten Proben stammen aus demselben Versuch. „Pp-α-Faktor“ entspricht „Präpro-α-Faktor“.

**B:** Die *in vitro* Translation der Proteine wurde bei 25°C für 45 min durchgeführt, zur Markierung wurde <sup>35</sup>S-Methionin verwendet. In der Hälfte der Fälle wurden außerdem raue Membranen des Hundes (RM) zugegeben, um eine Translokation zu ermöglichen. Um mögliche Glykosylierungen zu überprüfen, wurde außerdem bei einem Teil der Ansätze das Tripeptid NYT in den Translationsansatz gegeben.

**A und B:** Im Anschluss wurden an die Translokation wurden die Proteine in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

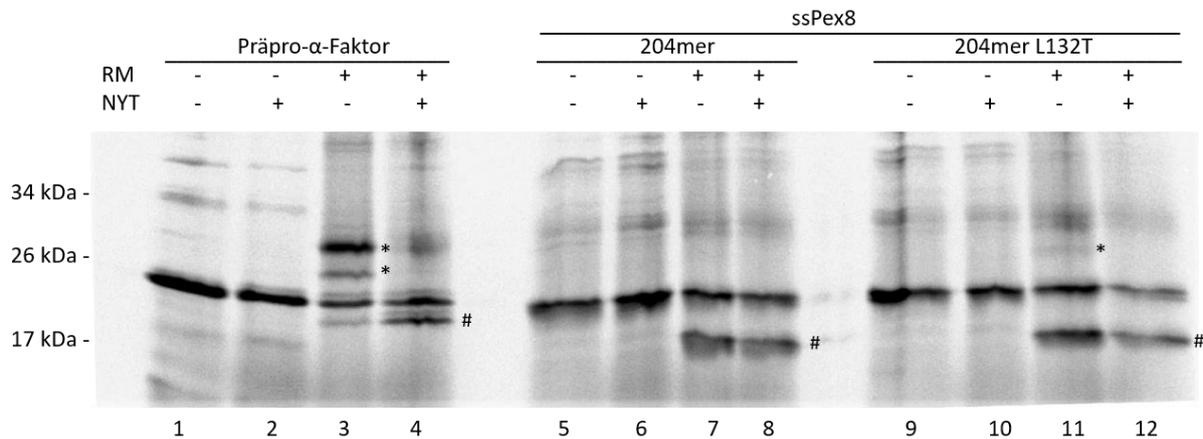
Für das 143mer zeigt sich keine Glykosylierungsbande (A, Spur 6). Dies war zu erwarten, da das 143mer noch keine Glykosylierungsstelle besitzt. Das Protein wird jedoch deutlich prozessiert, was einen Import zeigt. Für die Verkürzungen 175mer und 204mer ist ebenfalls keine Glykosylierung zu beobachten (A, Spur 8; A, Spur 10). Dies ist unerwartet, da das 175mer die erste und das 204mer sogar die ersten beiden Glykosylierungsstellen trägt. Gemäß Experimenten mit dem Vollängenprotein werden die ersten beiden Glykosylierungsstellen genutzt. Daher ist es unwahrscheinlich, dass das putative Signal, das den Import unterbricht, schon in einer der beiden Verkürzungen zu finden ist. Es wäre denkbar, dass die Glykosylierungsstellen nicht genutzt werden, weil diese beiden Verkürzungen nicht importiert werden. Eine Prozessierung beider Proteine zeigt jedoch, dass sie in das ER importiert werden. Eine Aufhebung der beiden Größenveränderungen aus Glykosylierung und Prozessierung im Gel, ist für das 175mer denkbar, da sich nach dem Ausgleich einer einfachen Glykosylierung und einer Prozessierung ein Größenunterschied von nur noch 0,5 kDa ergibt. Für das 204mer sollte jedoch die durch eine doppelte Glykosylierung entstandene Bande auf jeden Fall sichtbar sein.

Für das 274mer von ssPex8 zeigen sich zwei Glykosylierungsbanden (A, Spur 12; B, Spur 7). Aufgrund der Abstände zwischen der unmodifizierten Bande und den Glykosylierungsbanden könnte es sich um eine einfache und eine doppelte Glykosylierung handeln. Dabei läuft die putative einfache Glykosylierung direkt über der unmodifizierten Bande, da sich das Molekulargewicht um 2,5 kDa erhöht. Die doppelte Glykosylierung befindet sich mit etwas mehr Abstand darüber, da das Protein in diesem Fall 5 kDa größer wird. Dies ist insofern überraschend, da das 274mer insgesamt fünf Glykosylierungsstellen trägt. Bei einer Nutzung aller Stellen würde sich eine Größenveränderung von 12,5 kDa ergeben. Diese ist nicht zu beobachten, weshalb eine gleichzeitige Nutzung aller Stellen ausgeschlossen ist. Es ist daher anzunehmen, dass der Import dieser Verkürzung schon nicht mehr vollständig abläuft.

Ein ähnliches Verhalten ist für das 381mer zu beobachten. Auch diese Verkürzung wird glykosyliert (A, Spur 14; B, Spur 11). Die Abstände zur unmodifizierten Bande sind hierbei ähnlich zum 274mer, weshalb es sich vermutlich ebenfalls um eine einfache und eine doppelte Glykosylierung handelt. Die vermutliche einfache Glykosylierung befindet sich aufgrund der Größe des Proteins jedoch deutlich näher an der unmodifizierten Bande. Auch für dieses Protein lässt sich sagen, dass es nicht vollständig glykosyliert wird. Es wären insgesamt sechs Glykosylierungen möglich gewesen, was eine Größenveränderung von 15 kDa ergeben hätte. Diese lässt sich definitiv nicht beobachten. Für die Verkürzung 489mer sind wiederum Glykosylierungsbanden sichtbar. Die obere Glykosylierungsbande ist in beiden Abbildungen zu erkennen (A, Spur 16; B, Spur 15). Die Bande, die vermutlich der einfachen Glykosylierung zuzuordnen ist, befindet sich sehr nahe an der Bande des unmodifizierten Proteins und ist nur in Abbildung 16B zu sehen (B, Spur 15). Es ist jedoch eine Intensivierung der Prozessierungsbande bei Zugabe des Tripeptides zu beobachten, die der kombinierten Intensität der beiden Glykosylierungsbanden entspricht (B, Spur 16). Auch für diese Verkürzung lässt sich eine vollständige Nutzung aller vorhandenen Stellen ausschließen, da das Protein alle sieben Stellen trägt. Die Glykosylierung aller Stellen hätte eine Vergrößerung des Molekulargewichtes um 17,5 kDa zur Folge. Die im Gel zu beobachtende Verschiebung ist wesentlich geringer. Das 619mer wird nur schwach sichtbar glykosyliert, allerdings ist die Translationseffizienz auch etwas geringer, als bei den kleineren Verkürzungen (A, Spur 18; B, Spur 19/20). Die Glykosylierungsbande befindet sich für diese Verkürzung in einem ähnlichen Abstand zur unmodifizierten Bande wie beim ssPex8. Daher handelt es sich hier vermutlich um eine doppelte Glykosylierung. Die einfache Glykosylierung ist für diese Verkürzung vermutlich aufgrund des zu geringen Größenunterschiedes und der gleichzeitig stattfindenden Prozessierung nicht zu sehen. Diese These wird zusätzlich durch die starke Intensivierung der Prozessierungsbande bei Zugabe des Tripeptides gestützt (B, Spur 20). Es lässt sich daher für dieses Protein vermuten, dass es in gleichem Maß wie ssPex8 glykosyliert wird.

Der Präpro- $\alpha$ -Faktor verhält sich in beiden Fällen wie in den vorherigen Versuchen und wird bei Zugabe von rauen Membranen glykosyliert.

Wie schon erwähnt ist es unerwartet, dass nicht schon das 175mer oder zumindest das 204mer glykosyliert werden, da in diesen Verkürzungen schon die erste respektive die erste und die zweite Glykosylierungsstelle vorliegen. Für das 175mer wäre es möglich, dass es nur einfach glykosyliert wird und der Größenunterschied in Kombination mit der Prozessierung nicht groß genug ist, um im Gel sichtbar zu werden. Die Verkürzung 204mer sollte jedoch sichtbar doppelt glykosyliert vorliegen, da sie beide Glykosylierungsstellen trägt, die im Volllängenprotein genutzt werden. Neben einem nicht weit genug erfolgten Import kommt noch eine zu geringe Glykosylierungseffizienz als Ursache für die nicht erfolgte Glykosylierung in Frage. Es wurde daher untersucht, ob das 204mer mit einer verbesserten Glykosylierungsstelle modifiziert wird. Zu diesem Zweck wurde die erste Glykosylierungsstelle durch eine Punktmutation aufgewertet, indem das Leucin hinter dem Motiv mit einem Threonin ausgetauscht wurde. Es wurde eine *in vitro* Translation mit oder ohne raue Membranen durchgeführt. Den Ansätzen wurde außerdem vor der Translation das Tripeptid NYT zugegeben. Die Proteine wurden nach Ablauf der Translation in diesem Fall aufgrund der ähnlichen Proteingrößen in einer 15% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Signale wurden mittels Phosphoimaging detektiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 17 gezeigt.



**Abbildung 17: Das 204mer mit verbesserter Glykosylierungsstelle wird glykosyliert.** Die *in vitro* Translation der Proteine wurde bei 25 °C für 45 min durchgeführt, zur Markierung wurde  $^{35}\text{S}$ -Methionin verwendet. In der Hälfte der Fälle wurden außerdem raue Membranen des Hundes (RM) zugegeben, um eine Translokation zu ermöglichen. Um mögliche Glykosylierungen zu überprüfen, wurde außerdem in einen Teil der Translationsansätze das Tripeptid NYT gegeben. Im Anschluss wurden die Proteine in einer 15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

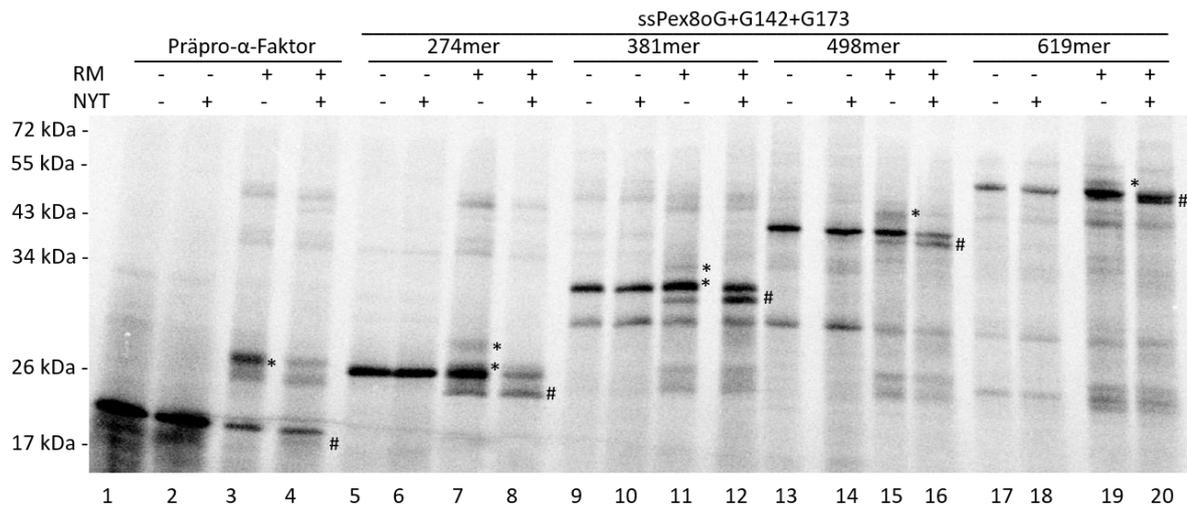
Mit der verbesserten ersten Glykosylierungsstelle wird das 204mer schwach, aber sichtbar glykosyliert (Spur 11). Es ist die Bande einer vermutlich doppelten Glykosylierung oberhalb der unmodifizierten Proteinbande sichtbar. Dies lässt sich anhand eines Vergleichs mit dem Präpro- $\alpha$ -Faktor annehmen, dessen doppelte Glykosylierung sich in etwa demselben Abstand zur unmodifizierten Bande befindet (vgl. Spur 3). Die Verkürzung wird also wie anhand der vorhandenen Glykosylierungsstellen erwartet glykosyliert, allerdings mit einer geringeren Effizienz. Dies lässt sich eventuell dadurch begründen, dass die Translokation nach Eintritt der Glykosylierungsstelle im Vergleich zum Volllängenprotein und den längeren Verkürzungen sehr viel schneller abgeschlossen ist und daher der OST während der Translokation ein kleineres Zeitfenster zur erfolgreichen Glykosylierung bleibt. Es lässt sich aus dem Ergebnis schlussfolgern, dass das 204mer vollständig glykosyliert wird und daher vermutlich den Bereich noch nicht trägt, der den Import unterbricht.

Der Präpro- $\alpha$ -Faktor wird wie erwartet glykosyliert. Das 204mer ohne die aufgewertete Stelle, das hier als Negativkontrolle dient, wird hingegen nur prozessiert.

Zusätzlich lässt sich anhand dieses Versuches vermuten, dass das 175mer tatsächlich einfach glykosyliert wird. Dies ist jedoch vermutlich durch eine Kombination mit einer Prozessierung nicht zu erkennen, da die Größenverschiebung zu gering ausfällt. Dies würde den Erwartungen entsprechen, da das 175mer lediglich die erste Glykosylierungsstelle trägt. Damit wäre das 274mer die erste Verkürzung, in der nicht alle vorhandenen Glykosylierungsstellen genutzt werden.

Anhand der Größenunterschiede zwischen den glykosylierten Formen und der unmodifizierten Proteine lässt sich vermuten, dass die sichtbar glykosylierten Proteine eine einfache und eine doppelte Glykosylierung tragen. Dies lässt sich auch dadurch untermauern, dass sich der Abstand zwischen unmodifizierter Bande und den Glykosylierungsbanden sukzessive verkleinert, je länger die Verkürzungen werden. Für das 619mer zeigt sich der gleiche Abstand der Bande der unmodifizierten Form zur Glykosylierungsbande wie in ssPex8 zur doppelten Glykosylierungsbande. Daher werden die Verkürzungen mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht in höherem Maß glykosyliert als das Volllängenprotein. Dennoch kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass auch in den Verkürzungen die ersten beiden Glykosylierungsstellen genutzt werden. Es wäre theoretisch möglich, dass bei den Verkürzungen andere Glykosylierungsstellen als im Volllängenprotein genutzt werden, sodass vom Maß der Glykosylierung kein direkter Rückschluss darauf gezogen werden kann, wie weit die jeweilige Verkürzung importiert wird.

Es sollte daher geprüft werden, ob Verkürzungen, in denen nur die ersten beiden Glykosylierungsstellen zu Verfügung stehen, in gleichem Maße wie die zuvor betrachteten Verkürzungen glykosyliert werden. Dafür wurden von einer Variante von ssPex8, die nur die beiden ersten Stellen trägt (ssPex8oG+G142+G173), Verkürzungen erstellt. Es wurde sich dabei auf jene Varianten beschränkt, die schon im Gel sichtbare Banden zeigen. Mit den Verkürzungen wurde eine *in vitro* Translation durchgeführt. Erneut wurde durch die Zugabe von rauen Membranen eine Translokation ermöglicht und durch die Zugabe des Tripeptides Glykosylierungen verifiziert. Nach der Translation wurden die Proteine auf einer 8-15% SDS-PAGE getrennt und die Signale am Phosphoimager detektiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 18 zu sehen.

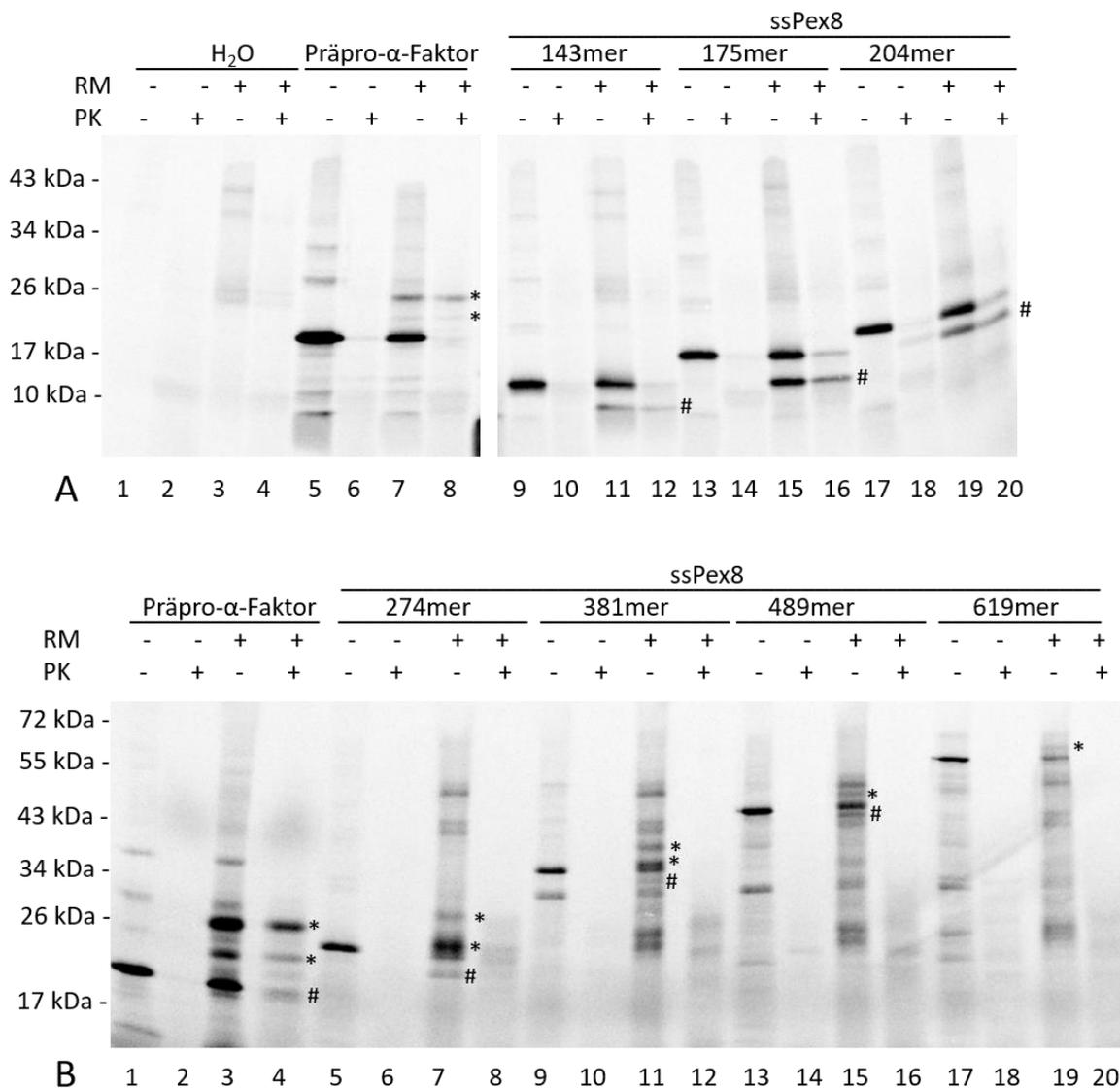


**Abbildung 18: Verkürzungen, die ausschließlich die ersten beiden Glykosylierungsstellen tragen, werden unverändert glykosyliert.** Die *in vitro* Translation der Proteine wurde bei 25 °C für 45 min durchgeführt, zur Markierung wurde  $^{35}\text{S}$ -Methionin verwendet. Es wurden außerdem raue Membranen des Hundes (RM) zugegeben, um eine Translokation zu ermöglichen. Um mögliche Glykosylierungen zu überprüfen, wurde außerdem in einen Teil der Translationsansätze das Tripeptid NYT gegeben. Im Anschluss wurden die Proteine in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

Für das 274mer, das nur die ersten beiden Stellen trägt, werden zwei Glykosylierungsbanden oberhalb der unmodifizierten Bande sichtbar (Spur 7). Dabei befindet sich die putative einfache Glykosylierung sehr knapp oberhalb und die doppelte Glykosylierung mit etwas Abstand darüber. Die Verkürzung wird damit im selben Maß glykosyliert wie das 274mer von ssPex8, das die ersten fünf Stellen trägt (siehe Abbildung 16, Spur A12 und B7). Auch die Abstände zur Bande des unmodifizierten Proteins sind ähnlich. Das 381mer mit der ersten und zweiten Stelle verhält sich analog. Hier befindet sich die putative einfache Glykosylierung allerdings noch dichter an der Bande des unmodifizierten Proteins, sodass sie mit dieser verschmilzt (Spur 11). Die Prozessierung wird bei Zugabe des Tripeptides deutlich intensiver, sodass davon auszugehen ist, dass hier Anteile der verdrängten einfachen Glykosylierung eingeflossen sind. Auch für diese Verkürzung erfolgt die Glykosylierung analog zum 381mer, das die ersten sechs Stellen trägt (siehe Abbildung 16, Spur A14 und B11). Für die beiden längeren Verkürzungen ist hingegen jeweils nur eine Glykosylierungsbande sichtbar, bei der es sich anhand des Größenunterschiedes vermutlich um die doppelte Glykosylierung handelt (Spur 15, Spur 19). Die deutliche Intensivierung der Prozessierungsbande bei Zugabe des Tripeptides lässt in beiden Fällen vermuten, dass außerdem eine einfache Glykosylierung vorlag. Deren Signal geht zusätzlich zum Signal der doppelten Glykosylierung in die Prozessierungsbande über (Spur 16, Spur 20). Beide Verkürzungen verhalten sich damit analog zu den Verkürzungen des ssPex8 (siehe Abbildung 16).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass alle betrachteten Verkürzungen bei der Entfernung der hinteren fünf Glykosylierungsstellen unverändert glykosyliert werden. Dies gibt einen starken Hinweis darauf, dass auch in den Verkürzungen die ersten beiden Glykosylierungsstellen genutzt werden. Um das Ergebnis abzusichern wurde eine Variante von ssPex8 verkürzt, die nur die hinteren fünf Stellen trägt. Mit den Verkürzungen wurde analog zum vorangegangenen Versuch verfahren. Es zeigte sich, dass für keine der Verkürzungen Glykosylierungsbanden zu beobachten waren (Daten nicht gezeigt). Insgesamt kann daher davon ausgegangen werden, dass die Verkürzungen von ssPex8 ebenso wie das Vollängenprotein an den ersten beiden Stellen glykosyliert werden. Dies bedeutet, dass aus der Anzahl der Glykosylierungen ein Hinweis abgeleitet werden kann, wie weit die Verkürzungen importiert wurden.

Anhand der bisherigen Ergebnisse lässt sich vermuten, dass das 204mer ohne Hemmnis in das ER importiert wird und daher die beiden zur Verfügung stehenden Glykosylierungsstellen genutzt werden. Der Import des 274mers läuft jedoch nicht mehr reibungslos ab, weshalb nicht alle vorhandenen Glykosylierungsstellen genutzt werden können. Um diese These zu prüfen, wurde untersucht, ab welcher Verkürzung die Proteine nicht mehr vollständig in das ER gelangen. Dazu wurden die oben genannten Verkürzungen in einem zellfreien *in vitro* System aus Retikulozytenlysat translatiert. Zusätzlich wurde durch die Zugabe von rauen Membranen des Hundes die Möglichkeit eines Importes gegeben. Im Anschluss wurden die Proteine mit der Proteinase K verdaut und der Verdau durch PMSF gestoppt. Die Proteine wurden aufgrund der Probenmenge mit zwei 8-15% SDS-PAGEs aufgetrennt und die Signale mittels Phosphoimaging ausgewertet. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 gezeigt.



**Abbildung 19: Die kürzeren Varianten von ssPex8 sind proteasegeschützt, die längeren nicht.** Die *in vitro* Translation der Proteine wurde bei 25°C für 45 min durchgeführt, zur Markierung wurde <sup>35</sup>S-Methionin verwendet. In der Hälfte der Fälle wurden außerdem raue Membranen des Hundes (RM) zugegeben, um eine Translokation zu ermöglichen. Um den Proteaseschutz zu überprüfen, wurde außerdem in der Hälfte der Ansätze die Proteinase K bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml in den Translationsansatz gegeben (PK). Im Anschluss wurden die Proteine in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Die oben gezeigten Abbildungen stammen aus demselben Versuch, aufgrund der Probenmenge wurden zwei Gele verwendet. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

Die beiden kürzesten Varianten von ssPex8 (143mer und 175mer) werden in das ER importiert, was sich anhand der Prozessierungen erkennen lässt (A, Spur 11 und 15). Die prozessierten Varianten liegen bei Zugabe der Protease weiterhin vor (A, Spur 12 und 16), woraus sich ableiten lässt, dass sie sich im ER befinden und daher geschützt sind. Diese beiden Verkürzungen werden also vollständig importiert. Die unmodifizierten Formen sind teilweise geschützt, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß als die prozessierten Proteine. Dies zeigt, dass es sich hier um einen nicht ganz vollständigen Verdau handelt und nicht um einen ER-bedingten Schutz der unmodifizierten Formen. Das 204mer wird ebenfalls importiert, was sich durch eine Prozessierung zeigt (A, Spur 19). Auch in diesem Fall liegt die prozessierte Form nach Behandlung mit der Proteinase weiterhin vor, was dafür spricht, dass sie sich vollständig innerhalb des ER befindet. Auch für diese Verkürzung liegt die unmodifizierte Form teilweise geschützt vor, wobei der geschützte Anteil im Vergleich zur prozessierten Form auch hier wesentlich geringer ist. Des Weiteren fällt für das 204mer auf, dass eine schwach geschützte Form im Ansatz ohne raue Membranen vorliegt. Diese läuft auf einer ähnlichen Höhe wie die prozessierte Form, ist jedoch minimal größer (A, Spur 18). Vermutlich handelt es sich um für die Protease nicht zugängliche Bereiche innerhalb des Proteins wie sie auch schon für das Vollängenprotein zu beobachten waren. Für diese drei Verkürzungen ist der Import also noch vollständig und sie sollten das Signal, das den Import negativ beeinflusst, noch nicht tragen.

Die Verkürzung 274mer wird prozessiert. Außerdem wird sie doppelt und einfach glykosyliert (B, Spur 7) und gelangt daher zumindest teilweise in das ER. Dennoch liegt das Protein nur teilweise geschützt im ER vor (B, Spur 8). Es finden sich mehrere schwache Banden auf Höhe der modifizierten Formen. Der Schutz fällt im Vergleich zu den kürzeren Proteinen deutlich geringer aus. Dies deckt sich mit den vorherigen Ergebnissen, die vermuten lassen, dass das 274mer nicht vollständig importiert wird und stützt die These, dass der Import in dieser Verkürzung schon unterbrochen sein muss. Die Verkürzung 381mer wird ebenfalls einfach und doppelt glykosyliert (B, Spur 11) und außerdem prozessiert. Obwohl sich dieses Protein damit teilweise im ER-Lumen befunden hat, liegt es final nicht im ER vor (B, Spur 12). Ähnlich verhält sich das 489mer. Allerdings wird für diese Verkürzung nur die doppelte Glykosylierung sichtbar, sowie eine Prozessierungsbande (B, Spur 15). Auch dieses Protein liegt final zumindest teilweise im Cytosol vor (B, Spur 16). Für das 619mer ist ebenfalls nur eine Glykosylierungsbande sichtbar, die von der doppelten Glykosylierung stammt (B, Spur 19). Die Prozessierung ist hier nur schwach ausgeprägt. Dies ist vermutlich erneut auf eine geringere Translationseffizienz zurückzuführen. Auch das 619mer liegt außerhalb des ER vor (B, Spur 20).

Der Präpro- $\alpha$ -Faktor wird in sehr hohem Maße translatiert, sodass ein kleiner Teil des Proteins schon ohne raue Membranen nicht verdaut wird. Dennoch wird bei Zugabe von Membranen deutlich, dass die importierten Formen des Proteins wesentlich effizienter vor der Protease geschützt sind. Dies spricht für einen nicht ganz vollständigen Verdau, wie er auch schon bei den kleineren Verkürzungen beobachten werden konnte.

Es ist erkennbar, dass nur die kürzeren Varianten von ssPex8 vollständig importiert werden. Ab dem 274mer liegen die Proteine hingegen vollständig oder teilweise außerhalb des ER vor und sind daher für die Protease zugänglich. Es gibt für dieses Verhalten mehrere mögliche Erklärungen. Zum einen ist es denkbar, dass die längeren Proteine im Translokation stecken bleiben und der C-Terminus im Anschluss von der zugegebenen Protease abgebaut wird. Allerdings ließen sich keine Abbaubanden detektieren, die in einem solchen Fall zu erwarten wären (siehe Abbildung 19). Dies ist jedoch möglicherweise auf die Verteilung der Methionine innerhalb des Proteins zurückzuführen, die sich verstärkt C-terminal finden. Bei einem Angriff der Protease bleibt ein N-terminaler Abschnitt geschützt, der jedoch nur wenige Methionine aufweist. Da die Proteine ausschließlich anhand der radioaktiven Markierung dieser Aminosäure detektiert werden, ist das Signal der geschützten Abschnitte möglicherweise zu schwach, um im Gel erkennbar zu sein. So bleiben beispielsweise bei einem Abbau des 274mers nur noch zwei Methionine zurück (Abbildung 20). Dies ergibt sich aus dem Vergleich mit dem 204mer, das

vollständig importiert wird und daher geschützt vorliegt. Der Abbau würde das Signal des 274mers um die Hälfte reduzieren. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass nur ein Anteil an Protein importiert wird und damit geschützt vorliegt, erscheint es durchaus denkbar, dass eine Detektion der Abbauprodukte nicht möglich ist.



**Abbildung 20: Maßstabgetreue Darstellung des 204mers und des 274mers von ssPex8 unter Berücksichtigung der Methionine.** Dargestellt sind das 204mer und das 274mer von ssPex8 in grün. Die Signalsequenz und zusätzliche sechs Aminosäuren aus Präprolaktin sind in blau zu sehen, wobei die Signalsequenz dunkelblau und der Spacer hellblau eingefärbt ist. Die Methionine inklusive dem Startmethionin sind rosa dargestellt. Der Maßstab ist unten links gezeigt; AS = Aminosäuren.

Neben einem Arrest im Translokation kommt ein retrograder Transport in Frage, der die längeren Verkürzungen frei im Cytosol vorliegen lässt. Dies würde ebenfalls dazu führen, dass die Proteine proteasezugänglich vorliegen und keine Abbaubanden nachweisbar wären.

In beiden Fällen scheint das 274mer einen Punkt zu markieren, an dem sich das Importverhalten von ssPex8 verändert, da diese Form noch einen rudimentären Schutz aufweist, der jedoch hinter dem der kürzeren Varianten zurückbleibt.

Das 274mer ist die erste Verkürzung, die nicht vollständig importiert und glykosyliert wird. Innerhalb dieser Verkürzung muss es also einen Bereich geben, der den Import behindert. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung, dass im Vollängenprotein nur die ersten beiden Glykosylierungsstellen genutzt werden. Das 204mer trägt nur diese beiden Stellen, während das 274mer schon drei weitere Stellen aufweist. Es muss berücksichtigt werden, dass das 204mer nur bis zur Aminosäure 201 aus Pex8 stammt und das 274mer nur bis zur Aminosäure 273. Zusammengefasst zeigen die Versuche daher, dass das Signal, welches den Import unterbricht, sich vermutlich in dem Bereich zwischen den Aminosäuren 201 und 273 befindet.

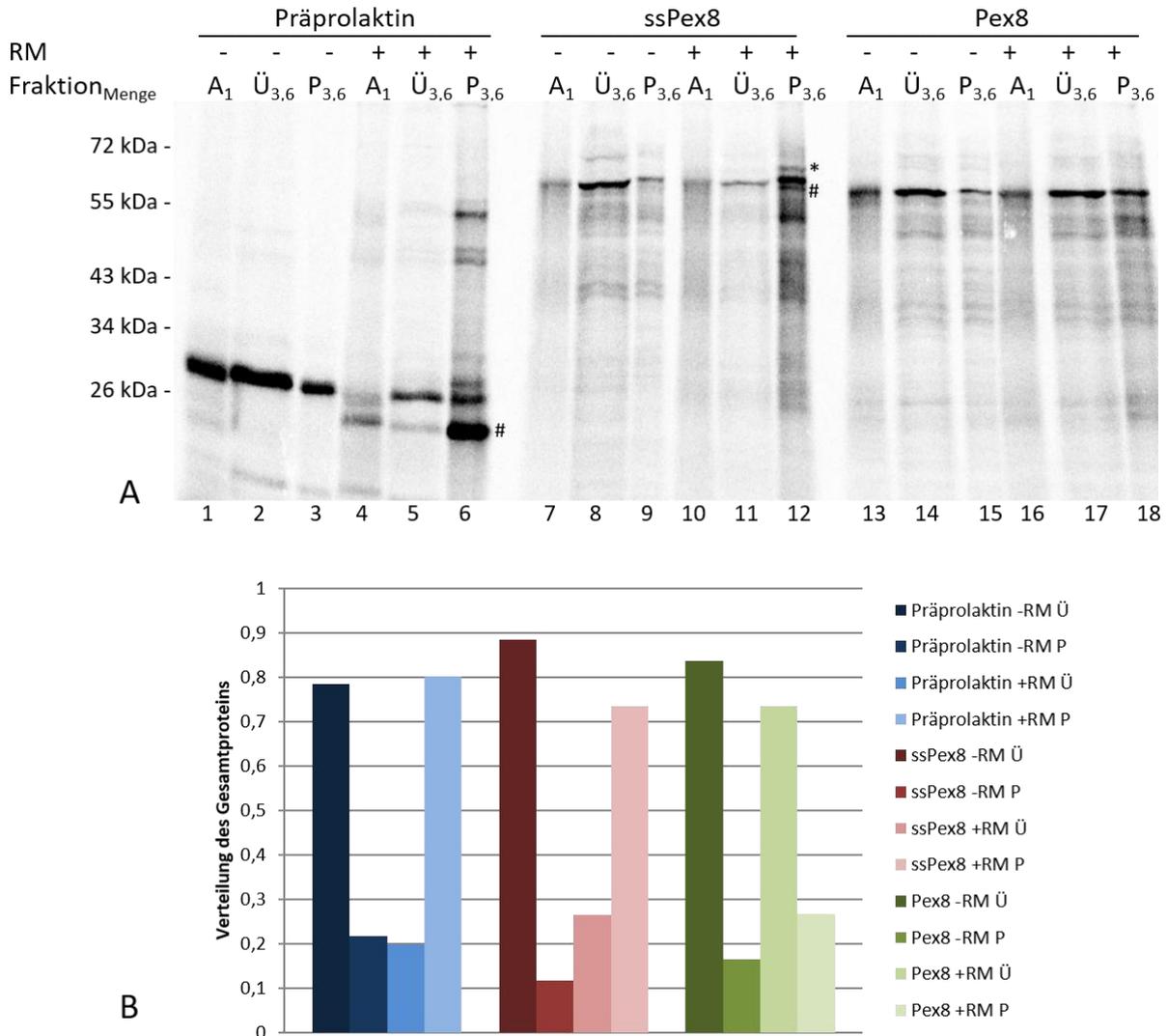
## 5.6 ssPex8 liegt membranassoziiert vor

Es wurde gezeigt, dass ssPex8 nicht vollständig in das endoplasmatische Retikulum transportiert wird, obwohl es eine ER-Signalsequenz besitzt. Das Protein wird schon während des Importes behindert und liegt für eine externe Protease zugänglich vor. Dabei könnte das Protein einerseits angegriffen werden, während es noch im Translokation vorliegt. Andererseits wäre auch ein retrograder Transport denkbar, der ssPex frei im Cytosol vorliegen lässt, sodass es dort von der Protease abgebaut werden kann. Es sollte daher die Fragestellung adressiert werden, ob ssPex8 membranassoziiert vorliegt.

Daher wurde ssPex8 unter Hochsalzbedingungen sedimentiert. Diese Bedingungen wurden gewählt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Als Kontrollen wurden Präprolaktin und Pex8 ohne Signalsequenz mitgeführt. Prolaktin sollte aufgrund seines Importes in das ER auch unter Hochsalzbedingungen vollständig sedimentieren, insbesondere in seiner prozessierten Form. Pex8 sollte sich hingegen im Überstand befinden und wird als Negativkontrolle für unspezifische Wechselwirkungen verwendet.

Es wurden mit Präprolaktin, Pex8 und ssPex8 Translationsansätze erstellt, die entweder raue Membranen oder Membranpuffer enthielten. Es wurde eine Translation mit möglicher Translokation durchgeführt. Anschließend wurden aus den Ansätzen 10% des Volumens entnommen, um die Fraktion „Ausgang“ zu erhalten. Im Anschluss wurden die Proben auf Hochsalzbedingungen eingestellt

und bei 55000 rpm durch ein Hochsalzkissen sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch eine Ammoniumsulfatfällung reduziert. Die Pellets aus der Sedimentation (Fraktion „Pellet“) und aus der Fällung (Fraktion „Überstand“) wurden in Probenpuffer aufgenommen und in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Signale wurden mittels Phosphoimaging detektiert. Die Intensitäten der Banden wurden mit dem Programm Image Quant TL ermittelt und die relative Verteilung der Proteine zwischen Überstand und Pellet errechnet. Dazu wurde die Intensität aller Signale innerhalb der Spuren „Überstand“ und „Pellet“, die dem Zielprotein zuzuordnen waren, aufsummiert. Im Anschluss wurde der Anteil an Protein ermittelt, der sich in der jeweiligen Spur befand. Das Ergebnis des Versuches ist in Abbildung 21 gezeigt.



**Abbildung 21: Das Protein ssPex8 liegt unter Hochsalzbedingungen an der ER-Membran vor.**

**A:** Es wurde zunächst für 45 min bei 25°C ein Transport in raue Membranen des Hundes (+RM) durchgeführt. Hierbei wurden die Proteine mit <sup>35</sup>S markiert. Es wurden jeweils Ansätze ohne raue Membranen mitgeführt (-RM). Zunächst wurde eine Probe für die Fraktion „Ausgang“ entnommen (A) und der Ansatz mit Hochsalzpuffer verdünnt. Anschließend wurde eine Hochsalzsedimentation durch ein Sucrosekissen durchgeführt. Die Fraktionen Überstand (Ü) und Pellet (P) wurden getrennt und der Überstand durch eine Ammoniumsulfatfällung reduziert. Die Proben wurden in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels Phosphoimager aufgenommen. Es ist zu beachten, dass sich von den Fraktionen Überstand und Pellet die 3,6-fache Menge im Vergleich zum Ausgang auf dem Gel befindet. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

**B:** Es wurde mittels Image Quant TL jeweils eine Gesamtintensität der dem Zielprotein zuzuordnenden Signale aus den Fraktionen Überstand (Ü) und Pellet (P) ermittelt und die Verteilung zwischen den Fraktionen berechnet.

Die Ergebnisse für ssPex8 sind in Spur 7-12 (A) und in rot (B) zu sehen. Es zeigt sich, dass ssPex8 ohne raue Membranen (A, Spur 7-9) größtenteils im Überstand vorliegt (A, Spur 8; B, dunkelrot). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass das Protein nur wenige Aggregate ausbildet, die unter Hochsalzbedingungen sedimentieren. Werden raue Membranen zugegeben, so wird das Protein sichtbar prozessiert und glykosyliert (A, Spur 12). Dass diese beiden Bande im Ausgang nicht deutlich werden, liegt vermutlich daran, dass eine geringere Probenmenge aufgetragen wurde. Die sichtbare Glykosylierungsbande ist dabei der doppelten Glykosylierung zuzuordnen. Die beiden modifizierten Formen finden sich ausschließlich in der Pelletfraktion. Sie liegen also entweder assoziiert mit dem Translokon vor oder sind von außen an die ER-Membran gebunden. Überraschend ist, dass auch eine Bande auf Höhe der unmodifizierten Form in der Pelletfraktion sichtbar ist (A, Spur 12; B, hellrot). Bei Betrachtung der Pelletfraktion von Pex8 mit rauer Membran wird ebenfalls eine Bande deutlich (A, Spur 18; B hellgrün). Dies zeigt, dass das Protein auch ohne erfolgreichen Import teilweise unspezifisch mit den Membranen interagiert oder hochsalzresistente Aggregate ausbildet. Ein Teil des Signals auf Höhe der unmodifizierten Bande ist daher bei ssPex8 vermutlich ebenfalls auf dieses Verhalten zurückzuführen. Dennoch erscheint das Signal im Vergleich intensiver als bei Pex8. Dies lässt sich damit begründen, dass auch die einfach glykosylierte Form von ssPex8 in dieses Signal mit eingeht, welche teilweise importiert wird. Wie in vorangegangenen Versuchen schon beobachtet, befindet sich diese Form vermutlich durch eine zusätzliche Prozessierung etwa auf Höhe der unmodifizierten Bande von ssPex8.

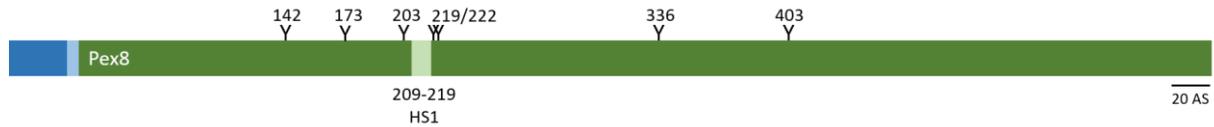
Bei Betrachtung von Pex8 ohne Signalsequenz wird deutlich, dass das Protein größtenteils im Überstand vorliegt (A, Spur 14/17; B, grün). Dabei ist es unerheblich, ob raue Membranen zugegeben werden (A, Spur 17; B, hellgrün) oder nicht (A, Spur 14; B, dunkelgrün). Pex8 liegt also unter Hochsalzbedingungen hauptsächlich löslich im Cytosol vor. Ein kleiner Anteil des Proteins scheint hingegen hochsalzresistent mit den Membranen zu interagieren oder Aggregate auszubilden. Präprolaktin bildet nur wenige Aggregate aus und liegt daher ohne Zugabe von rauen Membranen größtenteils im Überstand vor (A, Spur 2; B, dunkelblau). Bei Zugabe von rauen Membranen wird das Protein sehr effizient importiert, was sich anhand der Prozessierung zeigt (A, Spur 6). Daher liegt es zu großen Teilen innerhalb des ER oder mit dem Translokon assoziiert vor, weshalb es in erster Linie in der Pelletfraktion zu beobachten ist (A, Spur 6; B, hellblau).

Der Versuch zeigt, dass der überwiegende Anteil von ssPex8 assoziiert mit der ER-Membran vorliegt. Dies wird insbesondere für die prozessierten und glykosylierten Formen deutlich. Ein freies Vorliegen der modifizierten Formen im Cytosol konnte nicht beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass die Hemmung des Importes ssPex8 innerhalb des Translokons vorliegen lässt. Darüber hinaus besteht noch die Möglichkeit, dass das Protein nach einem retrograden Transport durch Faktoren gebunden wird, die sich auf cytosolischer Seiten an der ER-Membran befinden. Ein retrograder Transport, der ssPex8 frei im Cytosol vorliegen lässt, kann jedoch ausgeschlossen werden.

### 5.7 Das hydrophobe Segment HS1 (AS 209-219) unterbricht den Import von ssPex8

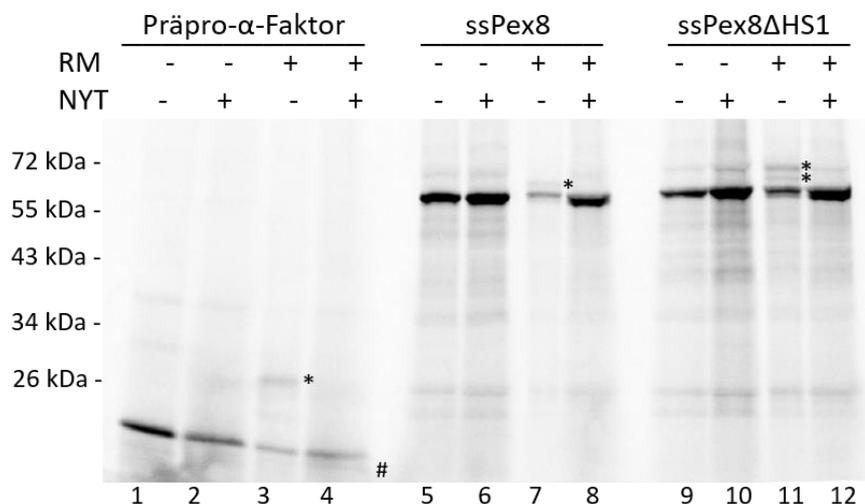
Es konnte gezeigt werden, dass die ersten beiden Glykosylierungsstellen an den Positionen 142 und 173 genutzt werden. Es ist damit gesichert, dass das Protein mindestens bis zur Position 185 in das Lumen des ER gelangt. Dies ergibt sich aus der Position der zweiten Glykosylierungsstelle an Position 173 und zusätzlichen 12 Aminosäuren nach dem Asparagin des Triplets, die für eine Glykosylierung notwendig sind (Nilsson und Heijne 1993). Der für den Abbruch des Importes verantwortliche Bereich muss sich daher hinter dieser Position befinden. Zusätzlich geben die durchgeführten Versuche mit C-terminalen Verkürzungen von ssPex8 einen Hinweis darauf, in welchem Bereich des Proteins sich das Signal für die Hemmung befinden könnte. Es wurde ermittelt, dass der Schutz bei der Verkürzung 204mer noch voll ausgeprägt ist. Er lässt jedoch ab dem 274mer nach und besteht für die längeren Verkürzungen nicht mehr (siehe Abbildung 19). Ein mögliches Signal sollte sich daher zwischen

Aminosäure (AS) 201 und 273 in ssPex8 befinden. Eine Analyse dieser Sequenz ergibt einen kurzen stark hydrophoben Abschnitt von AS 209-219 mit der Sequenz `CLLIALALLF`, der genau in diesem Bereich liegt (Abbildung 22). Er wird im Folgenden als HS1 (hydrophobes Segment 1) bezeichnet. Es sollte geprüft werden, ob dieses kurze hydrophobe Segment den Import von ssPex8 unterbricht.



**Abbildung 22: Maßstabgetreue Darstellung von ssPex8 unter Einbezug des HS1.** Gezeigt ist ssPex8 in grün. Außerdem ist das stark hydrophobe Segment HS1 mintgrün gekennzeichnet und seine Position innerhalb des Proteins angegeben. Die Glykosylierungsstellen sind mit Y gekennzeichnet und gemäß der Position der ersten Aminosäure im Glykosylierungsmotiv nummeriert. Die Signalsequenz und zusätzliche sechs Aminosäuren aus Präprolaktin sind in blau zu sehen, wobei die Signalsequenz dunkelblau und der Spacer hellblau eingefärbt ist. Der Maßstab ist unten rechts gezeigt; AS = Aminosäuren.

Es wurde zunächst die Frage adressiert, ob eine Deletion des HS1 dafür sorgt, dass in ssPex8 mehr Glykosylierungsstellen genutzt werden. Daher wurden die zehn betreffenden Aminosäuren entfernt und die auftretenden Glykosylierungen des entstandenen Proteins untersucht. Dafür wurden erneut Translationsansätze mit und ohne raue Membranen des Hundes erstellt. Zusätzlich wurde das Tripeptid NYT zugegeben und eine *in vitro* Translation mit möglicher Translokation durchgeführt. Die Proteine wurden mittels einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt. Im Anschluss wurden die Signale auf dem Gel mittels Phosphoimaging detektiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 dargestellt.



**Abbildung 23: Die Deletion des HS1 führt zu weiteren Glykosylierungen in ssPex8.** Die *in vitro* Translation der Proteine wurde bei 25°C für 45 min durchgeführt, zur Markierung wurde  $^{35}\text{S}$ -Methionin verwendet. In der Hälfte der Fälle wurden außerdem raue Membranen des Hundes (RM) zugegeben, um eine Translokation zu ermöglichen. Um mögliche Glykosylierungen zu überprüfen, wurde außerdem das Tripeptid NYT in einen Teil der Translationsansätze gegeben. Im Anschluss wurden die Proteine in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

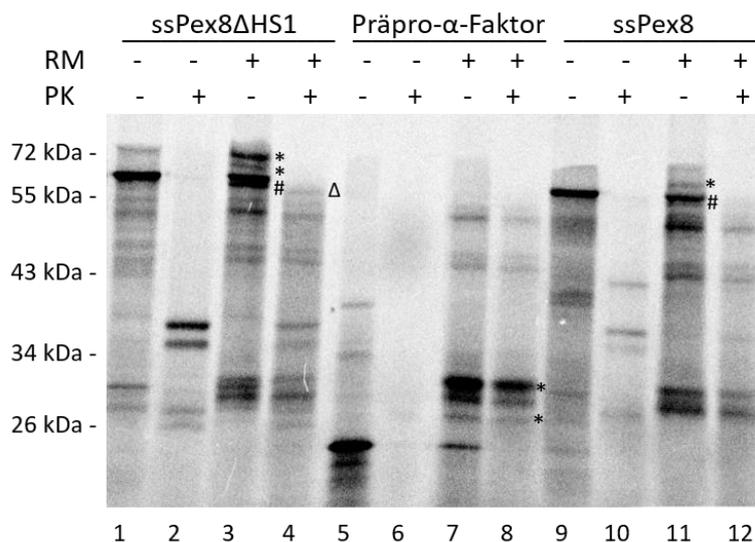
Für das Protein ssPex8 $\Delta$ HS1 kann neben der doppelten Glykosylierungsbande eine zusätzliche Glykosylierungsbande beobachtet werden (Spur 11). Diese befindet sich oberhalb der doppelten Glykosylierung, die sich auch bei ssPex8 beobachten lässt (Spur 11, vgl. Spur 7). Sie läuft genau auf der

Höhe einer Hintergrundbande. Anhand dessen, dass sie bei Zugabe von rauen Membranen intensiver wird und außerdem bei Zugabe von NYT auf das Hintergrundniveau zurückgeht (Spur 12), lässt sie sich als Glykosylierungsbande einordnen. Damit wird das Protein erstmals mehr als doppelt glykosyliert. Anhand der zusätzlich erfolgenden Glykosylierung wird deutlich, dass ssPex8 $\Delta$ HS1 durch die Deletion des HS1 weiter in das ER transportiert wird als ssPex8. Es handelt sich jedoch vermutlich nicht um eine vollständige Glykosylierung. Diese hätte bei einer gleichzeitigen Nutzung aller Stellen eine Größenveränderung von 17,5 kDa zur Folge, die sich nicht beobachten lässt.

Der Präpro- $\alpha$ -Faktor wird in diesem Fall verhältnismäßig schwach glykosyliert. Dies ist jedoch vermutlich auf eine insgesamt geringe Translationseffizienz zurückzuführen. Auch ssPex8 wird nur schwach glykosyliert, was sich wiederum durch eine niedrige Effizienz in der Translation erklären lässt.

Es lässt sich sagen, dass ssPex8 $\Delta$ HS1 vermutlich weiter in das endoplasmatische Retikulum gelangt als ssPex8. Dennoch ist anhand der zu geringen Größenverschiebung davon auszugehen, dass auch bei einer Deletion des HS1 nicht alle sieben Glykosylierungsstellen genutzt wurden. Dies spricht dafür, dass das Protein zwar weiter, aber dennoch nicht vollständig importiert wird.

Um dies zu überprüfen wurde mit den oben genannten Proteinen eine *in vitro* Translation mit möglichem Transport in raue Membranen durchgeführt. Im Anschluss an die Translation wurde ein Verdau durch die externe Proteinase K durchgeführt, der mit PMSF abgestoppt wurde. Die Auftrennung erfolgte in einer 8-15% SDS PAGE, welche im Anschluss mittels Phosphoimaging analysiert wurde. Das Ergebnis ist in Abbildung 24 zu sehen.



**Abbildung 24: Die Deletion von HS1 führt zum Auftreten einer geschützten Form von ssPex8.** Die *in vitro* Translation der Proteine wurde bei 25°C für 45 min durchgeführt, zur Markierung wurde <sup>35</sup>S-Methionin verwendet. In der Hälfte der Fälle wurden außerdem raue Membranen des Hundes (RM) zugegeben, um eine Translokation zu ermöglichen. Um den Proteaseschutz zu überprüfen, wurde außerdem in der Hälfte der Ansätze die Proteinase K bis zu einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml in den Translationsansatz gegeben (PK). Im Anschluss wurden die Proteine in einem 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit # und die geschützte Form von ssPex8 mit  $\Delta$ .

Das Protein ssPex8 $\Delta$ HS1 wird wie im vorherigen Versuch glykosyliert und prozessiert (Spur 3), wodurch sich ein zumindest teilweise erfolgreicher Import dieser Formen in das ER belegen lässt. Es fällt auf, dass sich nach der Deletion des HS1 erstmals eine geschützte Form von ssPex8 beobachten lässt (Spur 4). Sie ist minimal kleiner als das prozessierte Protein (vgl. Spur 3). Somit ergibt sich ein eindeutiger

Unterschied zu ssPex8, für das sich auf dieser Höhe keine geschützte Bande beobachten lässt (vgl. Spur 12). Es scheint also eine Form von ssPex8 $\Delta$ HS1 zu geben, die in das ER importiert wird und dort bleibt. Diese Form liegt vor der Protease geschützt vor.

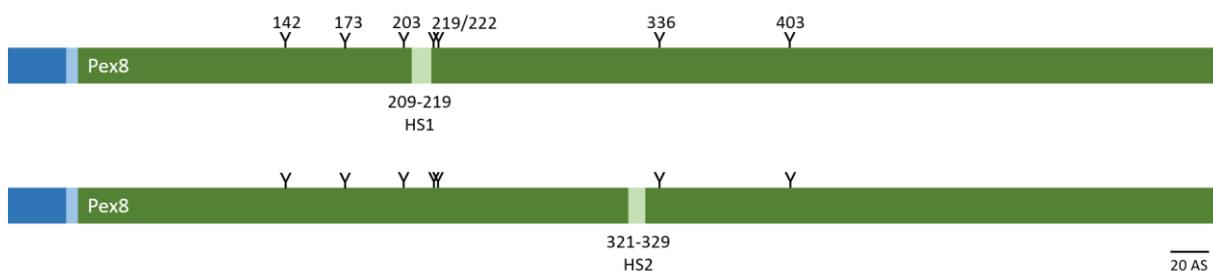
Die Kontrollen in Form des Präpro- $\alpha$ -Faktors und ssPex8 verhalten sich wie erwartet.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse des Versuches, dass die Deletion des HS1 dazu führt, dass ssPex8 weiter in das ER eintaucht. Dies lässt sich anhand dessen belegen, dass das Protein mehr als doppelt glykosyliert wird. Außerdem zeigt sich erstmals ein Schutz einer Form des Proteins, die jedoch nicht genau zugeordnet werden kann. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass das hydrophobe Segment einen negativen Effekt auf die Translokation von ssPex8 hat. Trotz der Deletion des HS1 kann kein vollständiger Import beobachtet werden.

Die Position des hydrophoben Segmentes erklärt auch, warum in vorherigen Versuchen keine Banden aus dem Verdau der Proteine detektiert werden konnten. Wenn die Proteine bis zum HS1 importiert werden, jedoch im Anschluss der Import unterbrochen wird und der hintere Teil proteasezugänglich in das ER ragt, so wäre nur der Teil des Protein detektierbar, der sich N-terminal zum HS1 befindet. Dieser weist allerdings nur zwei von insgesamt elf Methioninen auf, die für eine Detektion des Proteins entscheidend sind. In Anbetracht dessen, dass die modifizierten Formen von ssPex8 ohnehin nicht sehr abundant sind, ist es denkbar, dass durch einen Verlust von rund 80% des Signals ein Nachweis nicht mehr möglich ist.

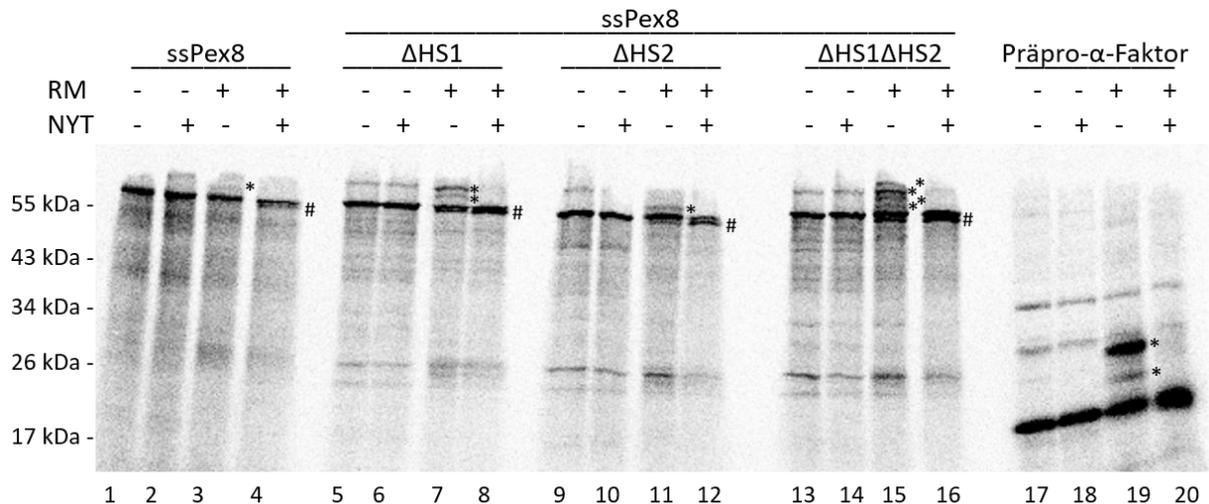
### 5.8 Das hydrophobe Segment HS2 (AS 321-329) unterbricht ebenfalls den Import

Die Analyse von ssPex8 $\Delta$ HS1 hat gezeigt, dass in diesem Protein mehr Glykosylierungsstellen genutzt werden können als für ssPex8. Dennoch scheinen nicht alle sieben Stellen glykosyliert zu werden, was die Frage aufwirft, ob noch weitere Bereiche vorliegen, die den Import negativ beeinflussen. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse wurde die Sequenz von ssPex8 auf eine weitere Aminosäurefolge durchsucht, die dem HS1 ähnelt. Es findet sich tatsächlich ein neun Aminosäuren langer Bereich mit der Sequenz VFILIIILA, der aufgrund seiner Hydrophobizität für eine Importhemmung in Frage kommt. Dieser liegt an Position 321-329 und damit zwischen den Glykosylierungsstellen an den Positionen 222 und 336 (Abbildung 25). Es wird im Folgenden untersucht, ob das hydrophobe Segment von Aminosäure 321-329 (HS2) ebenfalls für einen Abbruch des Importes verantwortlich ist.



**Abbildung 25: Maßstabsgetreue Darstellung von ssPex8 mit Einordnung des HS1 und des HS2.** Gezeigt ist ssPex8 in grün. Die Glykosylierungsstellen sind mit Y gekennzeichnet und gemäß der Position der ersten Aminosäure im Glykosylierungsmotiv nummeriert. Oben ist das HS1 in mintgrün hervorgehoben und mit seiner Position beschriftet. Unten ist die Position des hinteren hydrophoben Segmentes (HS2) hervorgehoben und beschriftet. Die Signalsequenz und zusätzliche sechs Aminosäuren aus Präprolaktin sind in blau zu sehen, wobei die Signalsequenz dunkelblau und der Spacer hellblau eingefärbt ist. Der Maßstab ist unten rechts gezeigt; AS = Aminosäuren.

Zunächst sollte ermittelt werden, ob das Segment die Nutzung der C-terminalen Glykosylierungsstellen verhindert. Daher wurde das HS2 deletiert. Dies geschah sowohl einzeln als auch in Kombination mit der Deletion von HS1. Außerdem wird ssPex8 $\Delta$ HS1 mitgeführt, das im vorherigen Versuch ein höheres Maß an Glykosylierung gezeigt hatte. Mit diesen Varianten wurde in der Anwesenheit des Glykosylierungskompetitor NYT eine *in vitro* Translation/Translokation durchgeführt. Die Proteine wurden auf einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Signale wurde mittels Phosphoimaging detektiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 26 gezeigt.



**Abbildung 26: Die Kombination aus den Deletionen des HS1 und HS2 führt zu einer höheren Anzahl an Glykosylierung von ssPex8.** Die *in vitro* Translation der Proteine wurde bei 25°C für 45 min durchgeführt, zur Markierung wurde <sup>35</sup>S-Methionin verwendet. In der Hälfte der Fälle wurden außerdem raue Membranen des Hundes (RM) zugegeben, um eine Translokation zu ermöglichen. Um mögliche Glykosylierungen zu überprüfen, wurde außerdem in einen Teil der Translationsansätze das Tripeptid NYT zugegeben. Im Anschluss wurden die Proteine in einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

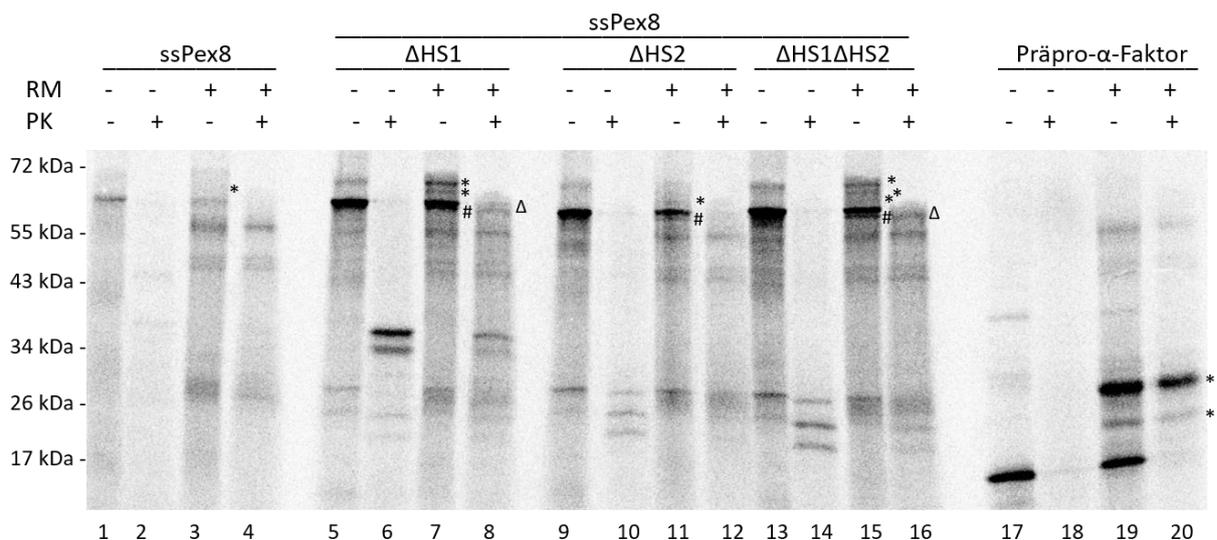
Die Variante, in der die beiden hydrophoben Segmente fehlen (ssPex8 $\Delta$ HS1 $\Delta$ HS2, Spur 13-16), wird bei Zugabe von rauhen Membranen im Vergleich zu ssPex8 und ssPex8 $\Delta$ HS1 in noch höherem Maße glykosyliert (Spur 15). Es werden oberhalb der unmodifizierten Bande vier Banden sichtbar, die Glykosylierungen zugeordnet werden können. Unter der Annahme, dass eine einfache Glykosylierung aufgrund des zu geringen Größenunterschiedes nicht sichtbar ist, würde sich eine Gesamtzahl von fünf erfolgten Glykosylierungen ergeben. Dies ergäbe eine Größenverschiebung von 12,5 kDa, was ungefähr der Veränderung im Gel entspricht. Daraus lässt sich ableiten, dass ssPex8 $\Delta$ HS1 $\Delta$ HS2 noch weiter in das ER gelangt als ssPex8 $\Delta$ HS1. Wie viele Glykosylierungsstellen tatsächlich genutzt werden und um welche Stellen es sich hierbei handelt, lässt sich letztendlich nicht vollständig auflösen. Es erfolgen jedoch im Vergleich zu ssPex8 $\Delta$ HS1 nochmals mehr Glykosylierungen.

Es kann damit als gesichert angesehen werden, dass das zweite hydrophobe Segment für eine weitere Hemmung des Importes verantwortlich ist. Das HS2 hat aber nur einen negativen Einfluss auf den Import, wenn das vordere hydrophobe Segment zusätzlich entfernt wird. Dies zeigt sich bei Betrachtung des Proteins ssPex8 $\Delta$ HS2 (Spur 9-12). Es wird bei Zugabe von rauhen Membranen vermutlich im selben Maß glykosyliert wie ssPex8 (Spur 11, vgl. Spur 3). Dies lässt sich anhand der Glykosylierungsbande vermuten, die bei beiden Proteinen in einem vergleichbaren Abstand zur unmodifizierten Bande erkennbar ist. Daher lässt sich schließen, dass das HS1 in diesem Fall schon den Import unterbricht, sodass eine Deletion des HS2 keinen Effekt entwickelt. Nur wenn die beiden hydrophoben Segmente in Kombination entfernt werden, wird das Protein so weit in das ER importiert, dass zusätzliche Stellen genutzt werden können.

Bei Betrachtung des Proteins ssPex8 $\Delta$ HS1 zeigt sich, dass es wie im vorherigen Versuch mehr als zweifach glykosyliert (Spur 7) und prozessiert (Spur 7/8) wird. Das unmodifizierte ssPex8 wird schwach glykosyliert sowie prozessiert. Der Präpro- $\alpha$ -Faktor bei Zugabe von rauen Membranen glykosyliert.

Der Versuch zeigt, dass das HS2 an den Positionen 321-329 die Nutzung der C-terminalen Glykosylierungsstellen verhindert. Allerdings wird dies nur relevant, wenn das HS1 fehlt, da sonst schon an dieser Stelle ein Abbruch des Importes stattfindet. Ob im Falle der doppelten Deletion der hydrophoben Segmente eine vollständige Glykosylierung erfolgt, kann nicht vollständig aufgelöst werden.

Unabhängig von der vollständigen Glykosylierung stellt sich die Frage, ob ssPex8 $\Delta$ HS1 $\Delta$ HS2 vollständig in das ER importiert wird. In diesem Fall sollten zumindest die glykosylierten Formen geschützt vorliegen. Um diese Frage zu beantworten, wurden mit den oben genannten Varianten von ssPex8 Ansätze mit und ohne raue Membranen für eine *in vitro* Translation erstellt. Die Translation/Translokation wurde durchgeführt und die Proteine im Anschluss mit der Proteinase K behandelt. Der Verdau wurde mit PMSF abgestoppt und die Proteine auf einer 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt. Diese wurde anschließend mittels Phosphoimaging analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 27 gezeigt.



**Abbildung 27: Die Kombination aus den Deletionen des HS1 und HS2 führt zu einer geschützten Form von ssPex8.** Die *in vitro* Translation der Proteine wurde bei 25°C für 45 min durchgeführt, zur Markierung wurde <sup>35</sup>S-Methionin verwendet. In der Hälfte der Fälle wurden außerdem raue Membranen des Hundes (RM) zugegeben, um eine Translokation zu ermöglichen. Um den Proteaseschutz zu überprüfen, wurde außerdem in der Hälfte der Ansätze die Proteinase K bis zu einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml in den Translationsansatz gegeben (PK). Im Anschluss wurden die Proteine in einem 8-15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit # und die geschützte Form von ssPex8 mit  $\Delta$ .

Für die Variante, in der die beiden hydrophoben Segmente fehlen (ssPex8 $\Delta$ HS1 $\Delta$ HS2), zeigt sich eine geschützte Form (Spur 16). Sie befindet sich erneut etwa auf Höhe der prozessierten Form des Proteins. Bei ssPex8 ist diese Bande nicht zu beobachten (vgl. Spur 4), wohingegen sie bei ssPex8 $\Delta$ HS1 auch sichtbar ist (Spur 8). Sie ist für ssPex8 $\Delta$ HS1 $\Delta$ HS2 jedoch im Vergleich etwas intensiver (Spur 16, vgl. Spur 8). Die Entfernung des HS2 sorgt also neben einer höheren Anzahl an Glykosylierungen auch für einen erhöhten Schutz im Vergleich zu ssPex8 und ssPex8 $\Delta$ HS1. Dieser Effekt wird erneut nur deutlich, wenn HS2 und HS1 in Kombination deletiert werden. Dies zeigt sich bei Betrachtung von

ssPex8 $\Delta$ HS2, da sich dieses Protein analog zu ssPex8 verhält (Spur 12, vgl. Spur 4). Es wird nur eine Glykosylierungsbande sichtbar und das Protein liegt ungeschützt vor. Am wahrscheinlichsten lässt sich dies auch hier damit begründen, dass das HS1 den Import zuerst unterbricht, da es beim Import zuerst am Translokator angelangt. Die negative Wirkung des HS2 auf den Import wird daher erst relevant, wenn der HS1 entfernt wird.

Das unmodifizierte ssPex8 wird in diesem Fall nur schwach glykosyliert, was sich jedoch durch eine insgesamt geringe Translationseffizienz erklären lässt. Das Protein liegt wie zuvor nicht final im ER vor. Der Präpro- $\alpha$ -Faktor wird glykosyliert und die glykosylierten Formen liegen innerhalb des ER-Lumens vor, weshalb sie vor der Proteinase K geschützt sind.

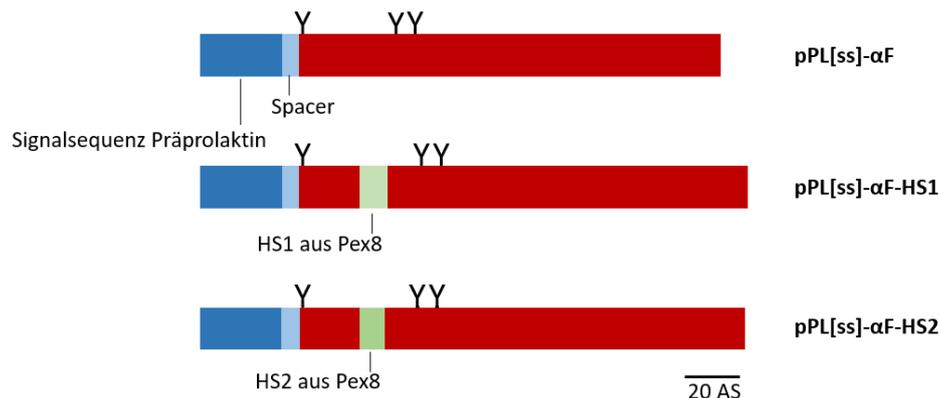
Aus diesem Experiment wird deutlich, dass auch der HS2 dafür sorgt, dass der Import von ssPex8 in das ER-Lumen unterbrochen wird. Allerdings entfaltet sich der Effekt auch hier nur, wenn der HS1 zusätzlich entfernt wird, da sonst schon dieses Segment einen vollständigen Import verhindert. Erst wenn beide Segmente in Kombination deletiert werden, liegt eine Form von ssPex8 $\Delta$ HS1 $\Delta$ HS2 im ER-Lumen vor. Die Form ist etwas kleiner als das Vollängenprotein und befindet sich ungefähr auf Höhe des prozessierten Proteins. Mittels eines zusätzlichen Versuches, indem die Behandlung mit dem Tripeptid und Proteinase K kombiniert wurden, konnte für die geschützten Banden gezeigt werden, dass es sich nicht um teilweise verdaute glykosylierte Formen handelt (Daten nicht gezeigt). Letztendlich kann die Natur der geschützten Form nicht aufgelöst werden. Weitere stark hydrophobe Bereiche, die einen vollständigen Import verhindern könnten und so erklären würden, warum die glykosylierten Formen ungeschützt vorliegen, finden sich in der Sequenz des Proteins nicht.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass der Import von ssPex8 durch die hydrophoben Segmente so stark gehemmt wird, dass die jeweils C-terminal zu den Segmenten liegenden Glykosylierungsstellen nicht genutzt werden können. Außerdem sind die Proteine schon während des Importes oder nach vollendeter Translation mit anschließender Ablösung des Ribosoms zugänglich für eine Protease und werden vollständig verdaut. Bei einer Entfernung der hydrophoben Segmente wird ssPex8 hingegen weiter importiert und es findet vermutlich eine Nutzung von Glykosylierungsstellen statt, die sich hinter den ersten beiden Stellen befinden. Darüber hinaus wird erstmals eine geschützte Form des Proteins sichtbar.

### 5.9 Der Import der Chimäre pPL[ss]- $\alpha$ F wird durch die HS gehemmt

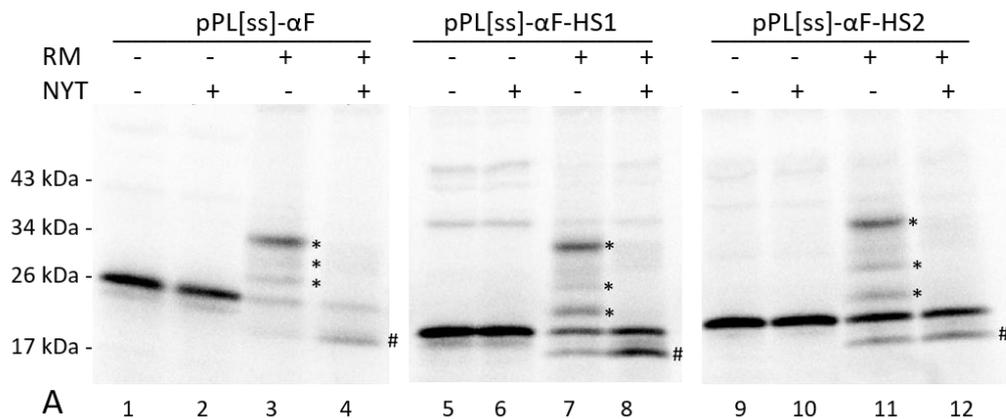
Die hydrophoben Segmente von Pex8 unterbrechen den Import des Proteins mit vorgeschalteter Signalsequenz. Obwohl die Signalsequenz geeignet ist, ssPex8 zum ER zu dirigieren, wird das Protein nicht vollständig in das ER importiert. Pex8 ist jedoch ein peroxisomales Protein und damit eher kein klassisches Substrat für einen ER-Import. Im Folgenden soll daher untersucht werden, ob die hydrophoben Segmente in der Lage sind, den Import anderer Proteine in das ER zu unterbrechen, die normalerweise ungehindert importiert werden.

Zu diesem Zweck wurde eine Chimäre aus dem reifen Teil des Präpro- $\alpha$ -Faktors und der Signalsequenz von Präprolaktin mit sechs zusätzlichen Aminosäuren als Spacer erstellt. Das Protein ist etwa 21,3 kDa groß und wird im Folgenden als pPL[ss]- $\alpha$ F bezeichnet. Der reife Teil des Präpro- $\alpha$ -Faktors wurde gewählt, da er effizient glykosyliert wird, sodass der Import zuverlässig überprüft werden kann. Die Verwendung der Signalsequenz von Präprolaktin wurde beibehalten, um Konsistenz zu den vorangegangenen Versuchen zu gewährleisten. Um die eigentliche Fragestellung zu adressieren, wurde jeweils ein hydrophober Abschnitt aus Pex8 hinter der ersten Glykosylierungsstelle eingefügt. Dabei wurden die Segmente in einem Abstand von zwanzig Aminosäuren zur ersten Glykosylierungsstelle platziert, um die Nutzbarkeit der Stelle zu gewährleisten und eine Vergleichbarkeit zu ssPex8 herzustellen. Die Größe der Chimäre pPL[ss]-HS1- $\alpha$ F beträgt 22,5 kDa. Wenn der HS2 verwendet wird (pPL[ss]-HS2- $\alpha$ F), ist die Chimäre 22,1 kDa groß. Eine Übersicht der verwendeten Proteine findet sich in Abbildung 28.



**Abbildung 28: Maßstabsgetreue Darstellung der Chimäre und ihrer Varianten mit den hydrophoben Segmenten aus Pex8 innerhalb der Präpro- $\alpha$ -Faktor Sequenz.** Dargestellt ist die verwendete Chimäre aus der Signalsequenz von Präprolaktin und dem reifen Teil des Präpro- $\alpha$ -Faktors (oben) und ihre Varianten mit hydrophoben Segmenten aus Pex8 (mittig, unten). Der Präpro- $\alpha$ -Faktor ist rot dargestellt und seine drei Glykosylierungsstellen mit Y gekennzeichnet. Die Signalsequenz und zusätzliche sechs Aminosäuren aus Präprolaktin sind in blau zu sehen, wobei die Signalsequenz dunkelblau und der Spacer hellblau eingefärbt ist. Die hydrophoben Segmente aus Pex8 sind mintgrün markiert, wobei der HS1 (mittig) heller ist als HS2 (unten). Die im Folgenden verwendeten Bezeichnungen für die Proteine sind rechts angegeben. Der Maßstab ist unten rechts gezeigt; AS = Aminosäuren.

Es sollte zunächst ermittelt werden, ob die eingefügten hydrophoben Segmente eine Glykosylierung der zweiten und dritten Stelle verhindern. Dies wäre zu erwarten, wenn der Import durch die hydrophoben Segmente an diesem Punkt analog zu ssPex8 unterbrochen wird. Mit den Chimären wurde daher erneut ein *in vitro* Translokation in Anwesenheit von rauen Membranen und unter Zugabe des Tripeptides NYT durchgeführt. Nach der Durchführung der Translation wurden die Proteine in einer 15% SDS-PAGE aufgetrennt. Die Signale wurde mittels Phosphoimaging detektiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 29 gezeigt.

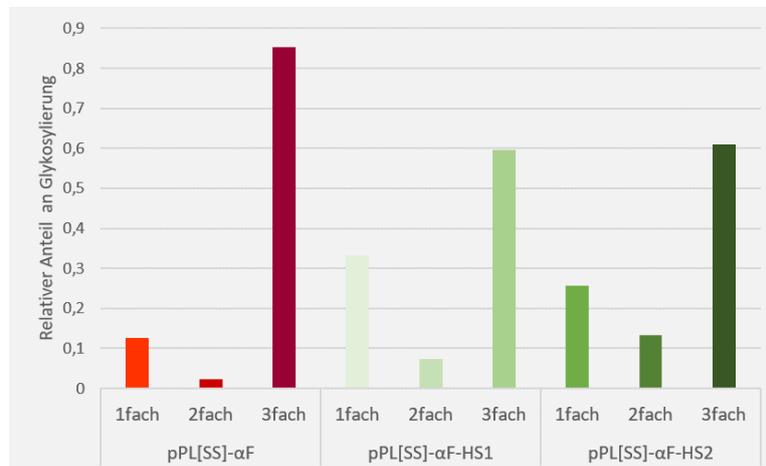


**Abbildung 29: Das Einfügen der hydrophoben Segmente aus Pex8 verhindert die Glykosylierung der hinteren Stellen nicht.** Es wurde zunächst für 45 min bei 25°C ein Transport in raue Membranen des Hundes (RM) durchgeführt. Hierbei wurden die Proteine wurden mit  $^{35}\text{S}$  markiert und es wurden jeweils Ansätze ohne raue Membranen mitgeführt. Um mögliche Glykosylierungen zu überprüfen, wurde außerdem in einen Teil der Translationsansätze das Tripeptid NYT zugegeben. Im Anschluss wurden die Proteine in einer 15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Die oben gezeigten Proben stammen aus demselben Versuch. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

Das Vergleichsprotein pPL[ss]-αF wird einfach, doppelt und dreifach glykosyliert (A, Spur 3). Es fällt auf, dass die dreifache Glykosylierung die höchste Abundanz besitzt, wohingegen die einfache und doppelte Glykosylierung weniger wahrscheinlich sind. Es ist also für das Kontrollprotein eine dreifache Glykosylierung am wahrscheinlichsten, was zeigt, dass alle drei Stellen effektiv genutzt werden können.

Die Chimäre mit dem vorderen hydrophoben Segment (pPL[ss]-αF-HS1) wird ebenfalls einfach, doppelt und dreifach glykosyliert (A, Spur 7). Dies ist insofern überraschend, dass das hydrophobe Segment eigentlich den Import und damit die Nutzung der hinteren beiden Glykosylierungsstellen verhindern sollte. Das ist jedoch nicht der Fall. Die einfache Glykosylierung erscheint etwas intensiver im Vergleich zum Kontrollprotein. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei pPL[ss]-αF-HS1 die erste Glykosylierungsstelle stärker genutzt wird. Dieses Verhalten wäre durch eine Hemmung des Importes durch die hydrophoben Segmente denkbar, da sich dadurch das Zeitfenster der OST für eine Glykosylierung der ersten Stelle vergrößern würde. Es ist außerdem auffällig, dass pPL[ss]-αF-HS1 weiter unten im Gel läuft als pPL[ss]-αF, da das Protein bei Einfügen des HS1 eigentlich größer werden sollte. Dies lässt sich möglicherweise durch die Hydrophobizität des eingefügten Segments erklären, die das Laufverhalten beeinflusst. Für die Chimäre mit dem HS2 aus Pex8 lässt sich ebenfalls eine einfache, doppelte und dreifache Glykosylierung beobachten. Auch für dieses Protein wäre das nicht zu erwarten gewesen, da das HS2 ebenfalls die Nutzung der C-terminal liegenden Glykosylierungsstellen unterbinden sollte. Eine Zunahme der einfachen Glykosylierung lässt sich in diesem Fall nicht zweifelsfrei erkennen. Außerdem weicht das Laufverhalten dieser Chimäre ebenfalls von den Erwartungen ab. Auch in diesem Fall wäre durch das höhere Molekulargewicht eine Verschiebung nach oben im Vergleich zu pPL[ss]-αF zu erwarten gewesen. Erneut findet jedoch eine Verschiebung nach unten statt, wenn auch nicht so ausgeprägt wie für pPL[ss]-αF-HS1. Vermutlich ist dies auch in diesem Fall durch die Hydrophobizität des eingefügten Segments zu begründen. Diese ist etwas geringer als bei HS1, was zur geringeren Verschiebung passt.

Um die Vermutung zu überprüfen, dass die einfache Glykosylierung in den Chimären mit den hydrophoben Segmenten aus ssPex8 in höherem Maße vorliegt, wurden die Banden des oben gezeigten Versuches quantifiziert. Anschließend wurde die Signalintensität der einzelnen Glykosylierungsbanden ermittelt und ihr Anteil am gesamten glykosylierten Protein errechnet. Das Ergebnis ist in Abbildung 30 gezeigt.



**Abbildung 30: Die einfache Glykosylierung ist nach dem Einfügen der HS stärker ausgeprägt.** Es wurden jeweils die Intensitäten der Glykosylierungsbanden für ein Protein aufsummiert und der relative Anteil der einfachen, doppelten und dreifachen Glykosylierung berechnet.

Es wurde deutlich, dass das Kontrollprotein tatsächlich mit Abstand am stärksten dreifach glykosyliert wird (rot, 3fach). Die einfache und doppelte Glykosylierung treten hingegen kaum auf (rot, 1fach und 2fach). Dies deckt sich mit der qualitativen Beobachtung (vgl. Abbildung 29).

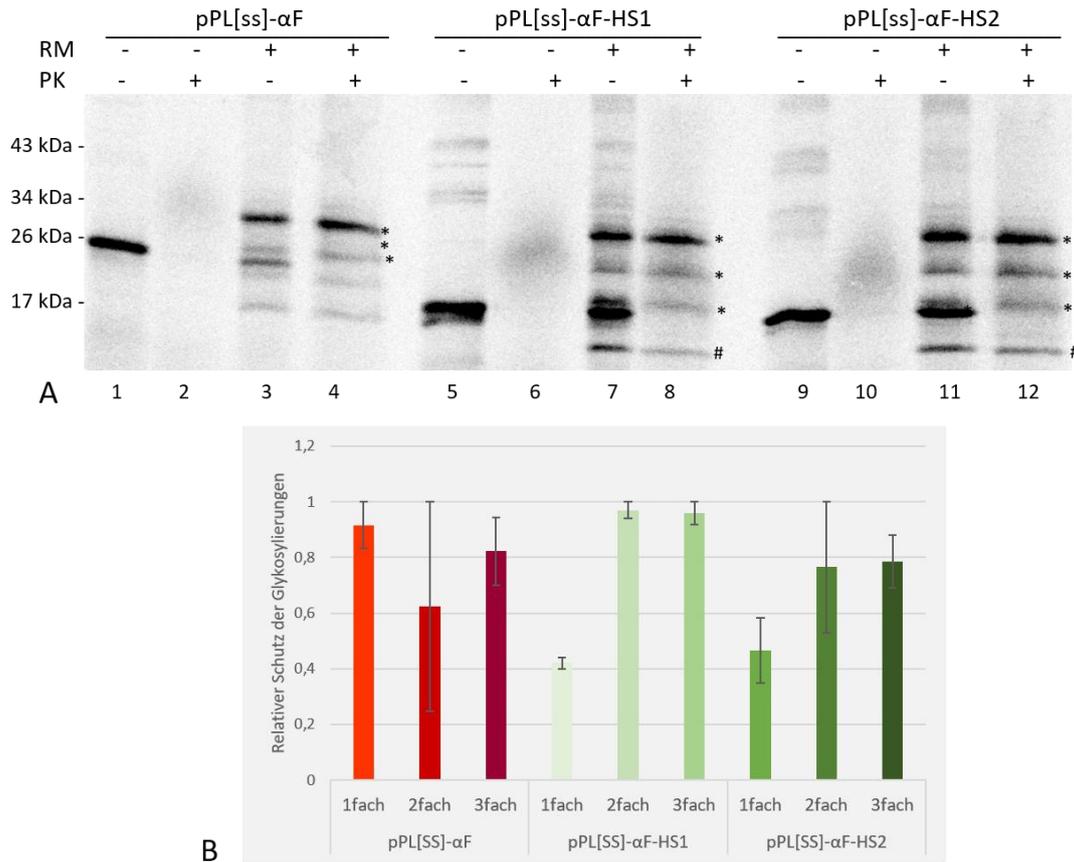
Für die Chimäre mit dem ersten hydrophoben Segment (pPL[ss]-αF-HS1) fiel schon in der Betrachtung der Banden auf, dass die einfache Glykosylierung im Vergleich zum Kontrollprotein stärker zu erfolgen scheint (vgl. Abbildung 29). Dies lässt sich mit der Quantifizierung bestätigen, da sich eine deutliche Verschiebung zugunsten der einfachen Glykosylierung zeigt (hellgrün, 1fach). Die doppelte Glykosylierung wird ebenfalls in höherem Maße beobachtet, die Zunahme ist jedoch nicht so deutlich (hellgrün, 2fach). Eine dreifache Glykosylierung wird im Vergleich zum Kontrollprotein unwahrscheinlicher (hellgrün, 3fach). Für die Chimäre mit HS2 aus Pex8 (pPL[ss]-αF-HS2) lässt sich ein ähnliches Verhalten beobachten. In diesem Fall ist die Zunahme der einfachen Glykosylierung im Gel weniger gut sichtbar, lässt sich jedoch durch eine Quantifizierung ermitteln. Hier wird aus der Verteilung der Signale erneut ersichtlich, dass die einfache Glykosylierung deutlich zunimmt (dunkelgrün, 1fach). Für die doppelte Glykosylierung (dunkelgrün, 2fach) ist ebenfalls ein Anstieg sichtbar. Dieser ist jedoch nicht so deutlich wie die Zunahme der einfachen Glykosylierung. Das Signal der dreifachen Glykosylierung nimmt auch für diese Chimäre ab (dunkelgrün, 3fach).

Es kann vermutet werden, dass die erste Glykosylierungsstelle, die noch vor den hydrophoben Segmenten liegt, in höherem Maße genutzt wird. Dies führt zu einem Anstieg der einfachen Glykosylierung. Die anderen beiden Glykosylierungsstellen werden jedoch ebenfalls glykosyliert, wenn auch mit geringerer Effizienz. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die hydrophoben Segmente in den Chimären zwar den Import behindern, jedoch nicht vollständig unterbrechen. Daher sind auch doppelte und dreifache Glykosylierungen möglich. Diese sind aufgrund ihrer Position von der importhemmenden Wirkung der eingefügten Segmente jedoch stärker betroffen, weshalb die Wahrscheinlichkeit für eine gleichzeitige Nutzung aller Glykosylierungsstellen sinkt. Eine

Glykosylierung der ersten Stelle ist wahrscheinlicher, da eine Verlangsamung des Importes zu einem Zeitpunkt, zu dem die Glykosylierung der ersten Stelle möglich ist, die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Glykosylierung erhöht. Einschränkend muss bemerkt werden, dass nicht gesichert werden kann, dass das Signal der einfachen Glykosylierung ausschließlich von der Nutzung der ersten Stelle stammt. Es erscheint jedoch unter Einbezug des betrachteten Importmechanismus wahrscheinlich. Daher kann für die Chimären vermutet werden, dass der Import der Proteine durch die hydrophoben Segmente gehemmt wird und diese mit geringerer Wahrscheinlichkeit vollständig importiert werden.

Bei einem gehemmten Import wäre auch zu erwarten, dass die hydrophoben Segmente an dieser Position den Schutz der einfach glykosylierten Form vermindern. Nach einer erfolgten Glykosylierung der ersten Stelle muss das hydrophobe Segment das Translokon noch passieren und es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass das Protein nicht vollständig transloziert wird. In diesem Zustand wäre es für die Protease zugänglich. Die beiden mehrfach glykosylierten Formen hingegen wurden schon über das hydrophobe Segment hinaus importiert und werden daher mit höherer Wahrscheinlichkeit vollständig transloziert, sodass sie geschützt vorliegen sollten.

Im Folgenden sollte die These geprüft werden, dass die hydrophoben Segmente den Schutz der einfach glykosylierten Form verringern, wenn sie nach der ersten Stelle eingesetzt werden. Es wurde erneut eine *in vitro* Translation mit den zuvor verwendeten Proteinen in Anwesenheit von rauen Membranen durchgeführt. Im Anschluss fand ein Verdau mit der Proteinase K statt, der durch PMSF abgestoppt wurde. Die Proteine wurden auf einer 15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Gele mittels Phosphoimaging analysiert. Da die Analyse der Glykosylierungen eher auf eine Verschiebung der Verteilung als auf einen absoluten Effekt hindeutet (siehe Abbildung 29; Abbildung 30) wurden die Signalintensitäten der glykosylierten Formen quantitativ ermittelt. Anschließend wurde der Anteil an geschütztem, glykosyliertem Protein jeweils für die einfach, doppelt und dreifach glykosylierte Form ermittelt und verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 31 gezeigt.



**Abbildung 31: Das Einfügen der hydrophoben Segmente aus Pex8 in die Chimären verringert den Schutz der einfachen Glykosylierung.**

**A:** Es wurde zunächst für 45 min bei 25°C ein Transport in raue Membranen des Hundes (RM) durchgeführt. Hierbei wurden die Proteine mit <sup>35</sup>S markiert und es wurden jeweils Ansätze ohne raue Membranen mitgeführt. Um den Proteaseschutz zu überprüfen, wurde außerdem im Anschluss an die Translation die Proteinase K in die Hälfte der Translationsansätze gegeben (PK). Danach wurden die Proteine in einer 15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphorimagers aufgenommen. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

**B:** Die Signale wurden mittels Image Quant TL quantifiziert und jeweils der Anteil an geschütztem einfach, doppelt und dreifach glykosyliertem Protein ermittelt. Es wurden Standardabweichungen berechnet, n=2.

Die Chimäre ohne hydrophobe Segmente pPL[ss]-αF wird glykosyliert (A, Spur A) und die glykosylierten Formen liegen in hohem Maß geschützt vor (A, Spur 4; B, rot). Für das Kontrollprotein ist die doppelte Glykosylierung in einigen Versuchen nur schwach sichtbar, was zu einer hohen Standardabweichung in der Quantifizierung führt (B, pPL[ss]-αF 2fach). Die glykosylierten Formen sind etwa gleich gut geschützt.

Die Chimäre pPL[ss]-αF-HS1 (A, Spur 5-8; B, hellgrün) liegt in der einfach, doppelt und dreifach glykosylierten Form vor (A, Spur 7). Es zeigt sich, dass der geschützte Anteil der einfach glykosylierten Form deutlich geringer ist, als bei den anderen beiden Formen (A, Spur 8). Dies lässt sich auch in der Quantifizierung erkennen (B, hellgrün). Aus dieser wird deutlich, dass die einfach glykosylierte Variante von pPL[ss]-αF-HS1 nicht einmal halb so effizient geschützt vorliegt wie die doppelt und dreifach glykosylierten Formen. Die Chimäre mit dem hinteren Segment aus Pex8 pPL[ss]-αF-HS2 (A, Spur 9-12; B, dunkelgrün) wird ebenfalls einfach, zweifach und dreifach glykosyliert (A, Spur 11). Alle Formen sind zumindest teilweise geschützt (A, Spur 12). Auch hier wird ein geringerer Schutz der einfach glykosylierten Form qualitativ und quantitativ sichtbar (B, dunkelgrün). Der Unterschied ist für pPL[ss]-

$\alpha$ F-HS2 nicht ganz so ausgeprägt wie für pPL[ss]- $\alpha$ F-HS1, was sich eventuell dadurch erklären lässt, dass der HS1 etwas länger ist als der HS2.

Unter der Annahme, dass für die einfache Glykosylierung in den meisten Fällen die erste Glykosylierungsstelle entscheidend ist, kann geschlussfolgert werden, dass die hydrophoben Segmente den Import erst hinter der ersten Glykosylierungsstelle hemmen. Diese wird folglich noch genutzt, das Protein jedoch anschließend in einigen Fällen nicht mehr vollständig importiert und daher abgebaut. Wenn der Import hingegen über das hydrophobe Segment hinaus stattfindet und im Zuge dessen eine doppelte oder sogar dreifache Glykosylierung möglich sind, wird das Protein vollständig importiert und liegt folglich geschützt vor.

Zusammengenommen legen die Ergebnisse nahe, dass die hydrophoben Segmente aus Pex8 in den Chimären die Wahrscheinlichkeit verringern, dass es zu einem vollständigen Import kommt. Vermutlich ist dies durch eine Hemmung des Importes zu erklären, der die Translokation langsamer ablaufen lässt.

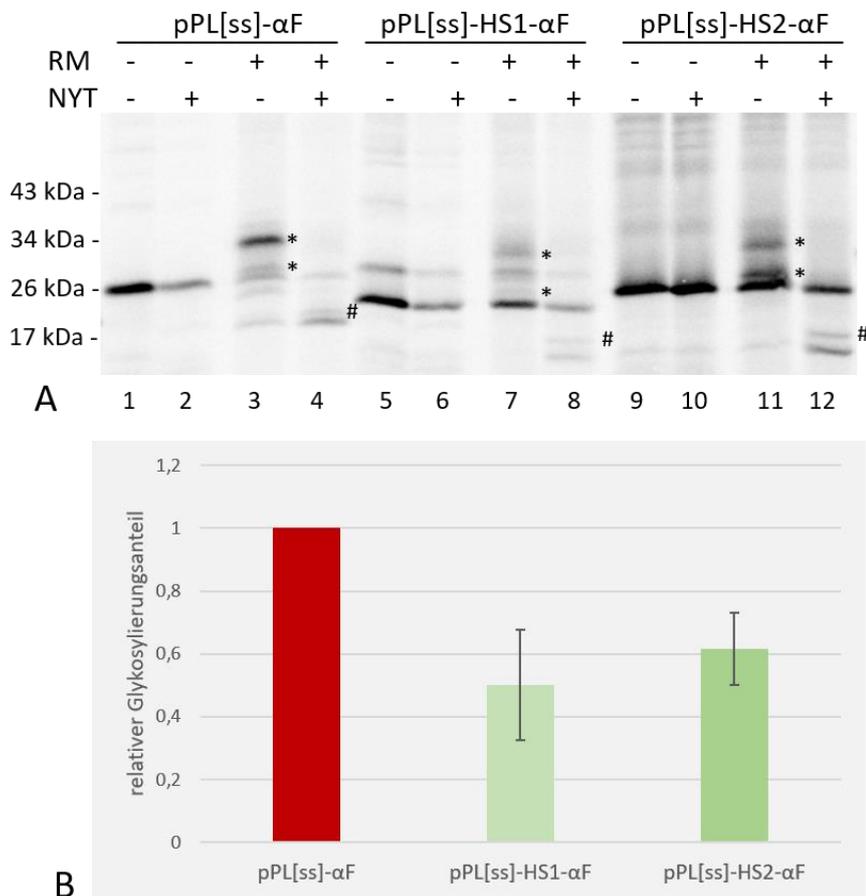
Es kann jedoch nicht abgesichert werden, dass eine einfache Glykosylierung tatsächlich durch eine Glykosylierung der ersten Stelle entsteht. Daher sollte untersucht werden, ob die Chimäre insgesamt weniger effizient glykosyliert wird, wenn die HS vor den Glykosylierungsstellen positioniert werden. Dies würde einen weiteren Hinweis auf einen gehemmten Import geben. Es wurde erneut die Chimäre pPL[ss]- $\alpha$ F als Referenzprotein verwendet. Darüber hinaus wurden die hydrophoben Segmente aus Pex8 in die Chimäre direkt hinter dem Spacer eingefügt. Sie liegen unmittelbar vor der ersten Glykosylierungsstelle und somit N-terminal zu allen Glykosylierungsstellen. Die verwendeten Proteine sind in Abbildung 32 dargestellt.



**Abbildung 32: Maßstabsgetreue Darstellung der Chimäre und ihrer Varianten mit den hydrophoben Segmenten aus Pex8 direkt hinter dem Spacer.** Gezeigt ist die verwendete Chimäre aus dem reifen Teil des Präpro- $\alpha$ -Faktors und der Signalsequenz von Präprolaktin (oben) und ihre Varianten mit den hydrophoben Segmenten aus Pex8 (mittig, unten). Der  $\alpha$ -Faktor ist rot dargestellt, die Signalsequenz und zusätzliche sechs Aminosäuren aus Präprolaktin sind in blau zu sehen, wobei die Signalsequenz dunkelblau und der Spacer hellblau eingefärbt ist. Die hydrophoben Segmente aus Pex8 sind mintgrün markiert, wobei HS1 (mittig) heller ist, als HS2 (unten). Die Glykosylierungsstellen sind mit Y gekennzeichnet. Die im Folgenden verwendeten Bezeichnungen für die Proteine sind rechts angegeben. Der Maßstab ist unten rechts gezeigt; AS = Aminosäuren.

Es sollte untersucht werden, ob die Importeffizienz beim Einfügen der hydrophoben Segmente in die Chimären abnimmt. Als indirekter Indikator hierfür wurde die Effizienz der Glykosylierungen betrachtet. Mit den genannten Proteinen wurde eine *in vitro* Translation durchgeführt, in der durch Zugabe von rauen Membranen ein Transport möglich war. Zusätzlich wurde das Tripeptid NYT zugegeben. Nach Durchführung der Translation wurden die Proteine auf einer 15% SDS-PAGE aufgetrennt. Die radioaktiven Signale wurden mittels Phosphoimaging detektiert und die Signalintensitäten der Proteine in jeder Spur mittels der Software Image Quant TL ermittelt. Die

Intensitäten der glykosylierten Formen wurden aufsummiert und der Anteil gegenüber der Gesamtintensität des Proteins berechnet. Der Glykosylierungsanteil der Kontrolle wurde auf eins normiert. Das Ergebnis des Versuches ist in Abbildung 33 gezeigt.



**Abbildung 33: Das Einfügen der hydrophoben Segmente verringert die Glykosylierungseffizienz der Chimären.**

**A:** Es wurde zunächst für 45 min bei 25°C ein Transport in raue Membranen des Hundes (RM) durchgeführt. Hierbei wurden die Proteine mit <sup>35</sup>S markiert und es wurden jeweils Ansätze ohne raue Membranen mitgeführt. Um mögliche Glykosylierungen zu überprüfen, wurde außerdem in einen Teil der Translationsansätze das Tripeptid NYT zugegeben. Im Anschluss wurden die Proteine in einem 15% SDS-PAGE aufgetrennt und die Signale mittels des Phosphoimagers aufgenommen. Glykosylierungsbanden sind mit \* gekennzeichnet, Prozessierungsbanden mit #.

**B:** Die Signale wurden mittels Image Quant TL quantifiziert und jeweils der Anteil an Glykosylierungen am Gesamtprotein innerhalb einer Spur berechnet. Der Anteil der Glykosylierungen in der Chimäre ohne hydrophobe Segmente wurde auf eins normiert. Es wurden Standardabweichungen berechnet, n=2.

Die Chimäre ohne hydrophobe Segmente (pPL[ss]-αF) wird effizient glykosyliert (A, Spur 3). Dabei ist die dreifache Glykosylierung besonders abundant. Eine einfache Glykosylierung scheint deutlich weniger häufig vorzukommen, ist jedoch noch detektierbar. Dahingegen erfolgte eine zweifache Glykosylierung nur in wenigen Fällen und konnte im gezeigten Gel nicht detektiert werden. Bei Zugabe des Tripeptides wird deutlich, dass das Protein außerdem prozessiert wird (A, Spur 4). Daraus lässt sich ableiten, dass die Chimäre in das ER importiert wird und die vorhandenen drei Glykosylierungsstellen in den meisten Fällen alle genutzt werden.

Wenn HS1 aus Pex8 in die Chimäre eingesetzt wurde (pPL[ss]-HS1-αF), wird das Protein einfach und dreifach glykosyliert (A, Spur 7). Die doppelte Glykosylierung lässt sich nicht detektieren. Außerdem ist

schon im Gel qualitativ zu erkennen, dass die Glykosylierung im Vergleich zum Kontrollprotein insgesamt weniger effizient erfolgt, während die Translationseffizienz konstant bleibt. Durch die Quantifizierung wird dies bestätigt (B, hellgrün), da der Anteil an glykosyliertem Protein sich etwa halbiert. Die Chimäre mit dem HS1 wird also nur noch halb so gut glykosyliert. Damit sinkt vermutlich auch die Importeffizienz um etwa 50%.

Die Chimäre mit HS2 aus Pex8 wird ebenfalls sichtbar einfach und dreifach glykosyliert (A, Spur 11). Der Anteil an glykosyliertem Protein sinkt jedoch auch für diese Variante im Vergleich zu pPL[ss]- $\alpha$ F ab. Die Quantifizierung ergibt, dass pPL[ss]-HS2- $\alpha$ F etwa 40% weniger effizient glykosyliert wird. Dies lässt indirekt auch auf eine Verringerung der Importeffizienz schließen.

Das Einfügen beider hydrophober Segmente verringert den Gesamtanteil an glykosyliertem Protein um 40%. beziehungsweise 50%. Dadurch, dass das Vergleichsprotein dieselbe Sequenz und dieselben Glykosylierungsstellen trägt, kann durch einen Vergleich von der relativen Glykosylierungseffizienz auf die relative Importeffizienz geschlossen werden. Diese sinkt bei einem Einfügen der hydrophoben Segmente um stark ab.

Das Ergebnis stützt die Theorie, dass die Chimären im Import gehemmt werden, weiter ab. Die hydrophoben Segmente haben jedoch keinen Abbruch der Translokation zu Folge. Dies ist daran erkennbar, dass weiterhin glykosylierte Formen zu beobachten sind. Es liegt daher nahe zu vermuten, dass hydrophobe Segmente in der Proteinsequenz zu einer Verlangsamung des Importes führen, wobei ein vollständiger Import dennoch möglich ist. Die hydrophoben Segmente fungieren also auch in den Chimären als negative Regulatoren für den ER-Import. Allerdings scheint der Effekt in den kürzeren Chimären nicht so absolut auszufallen wie im längeren ssPex8.

Es konnte gezeigt werden, dass kurze hydrophobe Segmente problematisch für den Import in das ER sind. Dabei werden die Proteine mit diesen Sequenzen von der Signalsequenz zunächst plangemäß zum ER geleitet und zumindest anfänglich reibungslos importiert. Mit Erreichen der hydrophoben Segmente gerät der Import jedoch ins Stocken oder kommt ganz zum Stillstand. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass das Protein von der zugegebenen Protease angegriffen und abgebaut wird. Der Signalsequenz als positivem Signal für eine Translokation steht mit den hydrophoben Segmenten damit ein negativer Regulator gegenüber, der bislang unbekannt war.

## 6 Diskussion

Die Kompartimentierung innerhalb von eukaryotischen Zellen ermöglicht die räumliche Trennung verschiedener biochemischer Reaktionen, erfordert allerdings auch den Transport von Proteinen in die jeweiligen Reaktionsräume. Der Transport erfolgt dabei in allen Fällen über eine oder mehrere Membranen und seine Funktionalität und Spezifität sind essenziell für das Überleben der Zelle. Ein wichtiger Teil des inter- und intrazellulären Proteintransportes ist der sekretorische Weg. Er beginnt nach oder während der Synthese der Proteine mit einem Import in das endoplasmatische Retikulum. Der Transport wird dabei durch eine ER-spezifische Signalsequenz ausgelöst, die im Anschluss durch die Prozessierung abgespalten wird.

Im sekretorischen Weg stellt der Import in das ER den ersten Kontrollpunkt dar. Eine für das ER spezifische Signalsequenz stellt sicher, dass nur Proteine des sekretorischen Weges Eintritt in das Lumen des ER finden. Sie dient damit als positiver Regulator für einen ER-Import. Es war dabei lange Zeit Konsens, dass die Signalsequenz hinreichend für einen Import in das ER sei (Blobel und Dobberstein 1975). Der reife Teil des Proteins spielte für den Import keine Rolle. Erste Hinweise zeigen jedoch, dass es Ausnahmen von dieser Regel geben könnte. So werden Proteine mit intrinsisch ungeordneten Bereichen nicht vollständig in das ER importiert. In diesem Fall dient also ein Signal im reifen Teil des Proteins als negativer Regulator des ER-Importes. Dies ist insofern unerwartet, dass insbesondere das Faltungsverhalten während der Translokation keine Rolle spielen sollte, da die Proteine ungefaltet über die ER-Membran transportiert werden. Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe Kalies konnten ein ähnliches Verhalten für das peroxisomale Protein Pex8 zeigen. Trotz der vorgeschalteten ER-Importsequenz des Präpro- $\alpha$ -Faktors wurden nicht alle sieben Glykosylierungsstellen des Proteins genutzt und es lag nicht final im ER vor (Ohms 2015). Die Signalsequenz des Präpro- $\alpha$ -Faktors war also nicht hinreichend, um eine vollständige Translokation des Proteins in das ER zu erreichen.

### 6.1 ssPex8 wird nicht vollständig in das Lumen des ER importiert

Es wurde zunächst vermutet, dass der unvollständige Import von Pex8 auf die Verwendung der Signalsequenz des Präpro- $\alpha$ -Faktors zurückzuführen war. Alle Versuche wurden in einem zellfreien *in vitro* System durchgeführt und der Import in das ER des Säugers untersucht. Daher war es vorstellbar, dass die Signalsequenz des Hefeproteins Präpro- $\alpha$ -Faktor eventuell inkompatibel mit dem System sein könnte, was einen vollständigen Import verhindert. In dieser Arbeit wurde Pex8 die Signalsequenz des Säugerproteins Präprolaktin vorangestellt (ssPex8) und erneut der Import in das ER anhand von Glykosylierungen und Proteaseschutz untersucht. Auch dieses Fusionsprotein wurde unvollständig glykosyliert und lag nicht geschützt im ER vor. Aus diesem Vergleich ergab sich ein erster Hinweis, dass der reife Teil des Proteins unabhängig von der Signalsequenz einen finalen ER-Import verhindert.

Bislang war offen, wie weit ssPex8 in das ER importiert wird. Über die Klärung der Frage, welche Glykosylierungsstellen des Proteins genutzt werden, lässt sich zumindest abschätzen, bis zu welchem Punkt es mindestens in das ER eingetaucht sein muss. Die Analyse von Varianten denen jeweils eine der sieben Stellen fehlte, zeigte, dass nur die Entfernung der ersten beiden Stellen an den Positionen 142 und 173 einen Einfluss auf das Glykosylierungsverhalten von ssPex8 hat. Anhand einer Variante, die nur die beiden N-terminalen Glykosylierungsstellen trägt und analog zu ssPex8 glykosyliert wird, lässt sich absichern, dass die ersten beiden Stellen genutzt werden und das Protein mindestens bis zur Position 185 in das Lumen des ER gelangt. Dies ergibt sich aus der Position der zweiten Glykosylierungsstelle an Position 173 und zusätzlichen 12 Aminosäuren nach dem Asparagin des Triplets, die für eine Glykosylierung notwendig sind (Nilsson und Heijne 1993).

Es blieb jedoch zunächst offen, ob die ausschließliche Nutzung der beiden N-terminalen Stellen auf einen unvollständigen Import zurückzuführen ist, der die fünf hinteren Stellen nicht in das ER-Lumen gelangen lässt oder auf einen vollständigen Import mit anschließendem Rücktransport in das Cytosol,

bei dem die ungenutzten Stellen aus anderen Gründen nicht glykosyliert werden. Um diese Unklarheit aufzulösen, wurde exemplarisch die letzte Glykosylierungsstelle an Position 403 betrachtet, indem ein N-terminal zu dieser Stelle liegender Abschnitt des Proteins deletiert wurde, um einen reibungslosen Import zu gewährleisten. Dabei wurde deutlich, dass die letzte Glykosylierungsstelle von ssPex8 funktional ist und im verwendeten System glykosyliert werden kann. Dies lässt einen vollständigen Import mit anschließendem Rücktransport in das Cytosol unwahrscheinlich erscheinen, da dann eine Glykosylierung der letzten Stelle zu beobachten wäre. Es kann daher geschlussfolgert werden, dass ssPex8 nicht vollständig in das ER gelangt, sondern schon im Import behindert wird.

Dadurch, dass nur die ersten beiden Glykosylierungsstellen von ssPex8 genutzt werden, lässt sich vermuten, dass der Import des Proteins nach der zweiten Glykosylierungsstelle an Position 173 unterbrochen oder gehemmt werden muss. Um genauer einzugrenzen, wie weit das ssPex8 in das ER-Lumen importiert wird, wurden Verkürzungen des Proteins erstellt. Dabei wurde deutlich, dass eine Verkürzung der Länge 204 AS noch vollständig importiert und glykosyliert vorlag. Im Gegensatz dazu wurde die nächstgrößere Verkürzung, das 274mer, nur noch doppelt glykosyliert, obwohl sie insgesamt fünf Glykosylierungsstellen trägt. Auch der Schutz dieser Verkürzung war unvollständig. Unter der Berücksichtigung der eingefügten Methionine kann eingegrenzt werden, dass ssPex8 bis zur Position 201 reibungslos importiert wird.

Aufgrund der verwendeten Signalsequenz und der Kettenlänge von Pex8 kann von einem cotranslationalen Transport ausgegangen werden (Zimmermann et al. 1990). Die Translation läuft trotz des unterbrochenen Importes weiter ab. Dies ist daran zu erkennen, dass trotz des unvollständigen Importes vollständig translatierte Proteine beobachtet werden. Möglicherweise ragt die naszierende Proteinkette daher schon während der Translation in das Cytosol und ist dort für die zugegebene Protease zugänglich. Im Allgemeinen ermöglicht die feste Bindung zwischen Translokation und Ribosom den Transport sekretorischer Proteine ohne Kontakt zum Cytosol. Der verzögerte Import führt jedoch zu einer Lockerung der Interaktion zwischen Sec61-Komplex und Ribosom. Diese Möglichkeit ist für verschiedene sekretorische Proteine beschrieben, die bei Unterbrechung der Translokation während des Importes in das Cytosol gelangen (Connolly et al. 1989). Bislang konnte gezeigt werden, dass dieses Verhalten durch *pause-transfer* Sequenzen ausgelöst wird (Hegde und Lingappa 1996). Aufgrund der entstehenden Lücken zwischen Ribosom und Translokation beginnt die wachsende Peptidkette in das Cytosol zu ragen. Währenddessen läuft die Translation vermutlich weiterhin ab, sodass sich ein *loop* in das Cytosol bildet. Dadurch ist das Protein für die extern zugegebene Protease an verschiedenen Punkten zugänglich, was erklären könnte, warum keine Abbaubanden detektiert wurde. Zusätzlich ist die Proteinkette nach Abschluss der Translation proteasezugänglich. Nachdem der Import ins Stocken gerät, die Translation aber vollständig abläuft, löst sich das Ribosom im Anschluss von der Kette und der ER-Membran und lässt den Bereich des Proteins, der C-terminal zum hydrophoben Segment liegt, in das Cytosol ragen, wo es durch die zugegebene Protease angegriffen werden kann. Allerdings würden man in einem solchen Fall erwarten, dass sich Abbaubanden des Proteins detektieren lassen, welche jedoch weder für die Verkürzungen noch für das Vollängenprotein beobachtet wurden. Möglicherweise ist dies dadurch zu begründen, dass sich bis zur Position 201 nur zwei von elf Methioninen befinden, was eine Detektion des N-terminalen, geschützten Teils von ssPex8 erschwert.

Nach Abschluss der Translation und der Ablösung des Ribosoms könnte es zu einem retrograden Transport des Proteins zurück in das Cytosol kommen, um das Translokation wieder freizugeben. Dies würde ebenfalls erklären, warum weder für die Verkürzungen noch für das Vollängenprotein bei Zugabe der externen Protease Abbaubanden zu beobachten waren. Anhand einer Sedimentation unter Hochsalzbedingungen konnte jedoch gezeigt werden, dass insbesondere die modifizierten Formen von ssPex8 entweder im Translokation oder von außen assoziiert mit der ER-Membran vorliegen. Es kommt also offenbar nicht zu einem vollständigen retrograden Transport, der das Protein frei im Cytosol vorliegen lässt.

## 6.2 ssPex8 besitzt hydrophobe Bereiche, die den ER-Import hemmen

In den meisten Fällen werden Proteine zunächst vollständig in das ER importiert, bevor sie durch die Kontrollsysteme innerhalb des ER erkannt und wieder exportiert werden. Ein Abbruch des Importes ist ungewöhnlich, da das zugehörige Signal während des Importes detektiert werden muss und das Translokon durch den unterbrochenen Import blockiert wird. Bislang ist für Proteine, die intrinsisch ungeordnete Bereiche aufweisen, ein unvollständiger Import in das ER bekannt (Miesbauer et al. 2009). Diese Proteine werden teilweise importiert, bevor ihre Translokation unterbrochen wird. Wenn alpha-helicale Strukturen auf die ungeordneten Bereiche folgen, wird der Import fortgesetzt, andernfalls werden die Proteine retransloziert. Im Anschluss werden sie vermutlich durch die *preemptive quality control* abgebaut (Miesbauer et al. 2009). Vereinzelt wird ein ähnliches Verhalten für Proteine mit langen Abschnitten aus  $\beta$ -Faltblättern beschrieben (Gonsberg et al. 2017). Die intrinsisch ungeordneten Bereiche und langen Abschnitte aus  $\beta$ -Faltblättern sind bislang die einzigen bekannten Signale innerhalb des reifen Teils von Proteinen, die den Import in das ER negativ beeinflussen. Da Pex8 laut Vorhersagen jedoch keines dieser Merkmale aufweist, kann vermutet werden, dass innerhalb des reifen Teils von Pex8 ein anderer Auslöser für den unvollständigen Import vorliegen muss.

Pex8 besitzt mit PTS1 und PTS2 zwei peroxisomale Targetingsignale. Insbesondere für das PTS2 kann aufgrund seiner Position im Protein vermutet werden, dass es den Import negativ beeinflusst. Es konnte jedoch durch eine Deletion der beiden peroxisomalen Targetingsignale gezeigt werden, dass sie den ER-Import von ssPex8 nicht beeinträchtigen. Es liegt daher in der Sequenz von Pex8 vermutlich ein bislang unbekanntes Signal vor, das den Import in das Lumen des ER unterbricht.

Durch die erstellten Verkürzungen konnte eingegrenzt werden, dass sich das Signal in einem Bereich zwischen den Aminosäuren 201 und 273 befinden muss. Bei genauerer Analyse dieses Abschnittes fiel ein kurzer, stark hydrophober Bereich auf. Er ist zehn Aminosäuren lang und befindet sich an Position 209-219 (HS1). Zusätzlich wurde ein weiterer Bereich an Position 321-329 identifiziert (HS2). Er ist mit neun Aminosäuren etwas kürzer und ebenfalls stark hydrophob. Beide Bereiche sind zu kurz für Transmembrandomänen, die in der Regel 16-25 Aminosäuren lang sind. Anhand der Position des HS1 lässt sich begründen, warum in ssPex8 nur die ersten beiden Glykosylierungsstellen genutzt werden. Der Bereich befindet sich zwar C-terminal zur dritten Glykosylierungsstelle, allerdings beträgt der Abstand zur Glykosylierungsstelle an Position 203 nur sechs Aminosäuren. Dies ist unter Annahme, dass die Proteinkette im Translokon hängen bleibt, für eine erfolgreiche Glykosylierung zu wenig. Laut Literatur muss die Proteinkette mindestens 12 Aminosäuren weit in das Lumen des ER ragen, um eine Glykosylierung zu ermöglichen (Nilsson und Heijne 1993).

Bei einer Entfernung des HS1 wird das Protein hingegen bis zum HS2 importiert, was theoretisch eine Nutzung der ersten fünf Stellen ermöglicht. Wie erwartet ist in diesem Fall eine Zunahme der Glykosylierungen zu beobachten. Eine kombinierte Deletion beider hydrophober Bereiche ermöglicht theoretisch eine Nutzung aller sieben Glykosylierungsstellen von ssPex8. Erwartungsgemäß nimmt hier die Anzahl der beobachteten Glykosylierungen nochmals zu. Es lässt sich nicht eindeutig determinieren, ob ssPex8 ohne die beiden HS vollständig glykosyliert wird. Es ist jedoch auch nicht unbedingt zu erwarten, dass bei einem vollständigen Import alle Glykosylierungsstellen genutzt werden. Zunächst bietet ein Glykosylierungsmotiv nur die Möglichkeit einer Glykosylierung (Apweiler et al. 1999). Ob die Stelle tatsächlich genutzt wird, hängt von vielen weiteren Faktoren ab (Mellquist et al. 1998; Bañó-Polo et al. 2011). So wurde in einer Datenbankanalyse festgestellt, dass nah zusammenliegende Stelle nicht zeitgleich genutzt werden, was möglicherweise auf eine sterische Hinderung zurückzuführen ist (Gavel und Heijne 1990). Daher ist es fraglich, ob die Stellen an Position 219 und 222 gleichzeitig glykosyliert werden können. Experimentell nachgewiesen wurde in Pex8 nur die Nutzbarkeit der ersten beiden Stellen und der letzten Stelle. Letztendlich ist anhand der Zunahme der Glykosylierungen und der Tatsache, dass sich C-terminal zum HS2 keine weiteren hydrophoben

Bereiche fanden, davon auszugehen, dass eine Deletion beider HS den reibungslosen Import in das ER ermöglicht.

Neben einer höheren Anzahl an Glykosylierungen wurde bei einer Deletion von HS1 und HS2 erstmals eine geschützte Form sichtbar. Sie war etwas kleiner als die unmodifizierte Variante und damit etwa so groß wie das prozessierte Protein. Es konnte mittels einer Kombination aus der Zugabe des Glykosylierungskompetitors NYT während der Translation und der Zugabe der PK nach der Translokation ausgeschlossen werden, dass es sich um glykosyliertes Protein handelte, das teilweise verdaut wurde. Um welche Form es sich bei der geschützten handelt, konnte nicht aufgeklärt werden. Dennoch gibt das Vorliegen des geschützten Proteins nach der Deletion der HS einen weiteren Hinweis darauf, dass die hydrophoben Bereiche dafür verantwortlich sind, dass das Protein nicht final im ER vorliegt.

Die hydrophoben Bereiche innerhalb von ssPex8 fungieren als Signal, den Import zu verlangsamen oder ganz zu beenden. Möglicherweise erklären solche Abschnitte auch das Importverhalten des humanen Apolipoprotein B. Es ist beschrieben, dass es teilweise importiert und glykosyliert, dann jedoch abgebaut wird (Chuck et al. 1990). Das Signal für diesen unterbrochenen Import ist umstritten (Chuck und Lingappa 1992; Pease et al. 1995). Ähnlich zu Pex8 weist dieses Protein ebenfalls kurze hydrophobe Abschnitte auf, die zu kurz für Transmembrandomänen sind. Allerdings gibt es keine Sequenzhomologien der Bereiche von ApoB und Pex8. Die möglichen Signale haben nur ihre Hydrophobizität gemeinsam. Auch die beiden hydrophoben Bereiche innerhalb von ssPex8 ähneln sich in erster Linie in ihrer Hydrophobizität, nicht in Hinblick auf ihre Sequenz. Es scheint daher in diesem Fall tatsächlich ein Signal zu geben, dass ausschließlich auf Hydrophobizitäten beruht.

Das Protein ssPex8 wird bis zum Erreichen der hydrophoben Bereiche cotranslational transportiert. Sobald jedoch der HS1 in das Translokon eintritt, verlangsamt sich der Import oder kommt ganz zum Erliegen. Das Importverhalten der Chimären gibt einen Hinweis darauf, dass es sich eher um eine Verlangsamung des Importes handelt, als um einen vollständigen Abbruch. Hier ergab sich eine Diskrepanz zwischen dem längeren ssPex8 und den kürzeren Chimären. Es war für ssPex8 keine Glykosylierung der C-terminal zum HS1 liegenden Glykosylierungsstellen zu beobachten. Bei den Chimären können hingegen die hinter den Segmenten liegenden Glykosylierungsstellen teilweise genutzt werden und es ist in einigen Fällen ein Schutz zu beobachten. Es handelt sich um einen dynamischen Prozess, der die Wahrscheinlichkeit eines vollständigen Importes verringert, ihn jedoch nicht vollständig ausschließt. Dies ist scheinbar ein Widerspruch zwischen beiden Ergebnissen. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Signale der glykosylierten Banden für ssPex8 in aller Regel sehr viel schwächer als bei den Chimären waren. Dies lässt sich einerseits durch die Größe des Proteins und andererseits durch eine geringere Glykosylierungseffizienz erklären. Es ist denkbar, dass auch der Import von ssPex8 beim Erreichen der hydrophoben Segmente nicht abgebrochen, sondern lediglich verlangsamt wird. Hierdurch wird die Wahrscheinlichkeit verringert, dass das Protein über die zweite Glykosylierungsstelle hinaus in das ER gelangt. Diese Verringerung ist bei ssPex8 jedoch möglicherweise ausreichend, dass eine Nutzung der hinteren Stellen nicht mehr detektierbar ist. Daher erscheint die Hemmung des Importes hier wie ein Abbruch. Zusammengefasst kann davon ausgegangen werden, dass die hydrophoben Segmente den Import von Proteinen hemmen, aber nicht abbrechen.

### 6.3 Kurze hydrophobe Bereiche hemmen generell den ER-Import

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die kurzen hydrophoben Segmente in ssPex8 den Import des Proteins behindern. Fraglich war, ob dies ein isolierter Effekt für ssPex8 ist oder als prinzipielles Konzept auch für andere Proteine gilt. Als exemplarisches Protein wurde eine Chimäre verwendet, die aus dem reifen Teil des Präpro- $\alpha$ -Faktors, sowie der Signalsequenz von Präprolaktin besteht. Der Präpro- $\alpha$ -Faktor wird im verwendeten *in vitro* System effizient importiert und glykosyliert. Die

Signalsequenz aus dem Säugerprotein Präprolaktin dirigiert Proteine zuverlässig SRP-abhängig zum ER (Kurzchalia et al. 1986). Bei einem Einfügen der hydrophoben Segmente vor allen Glykosylierungsstellen wurden die Chimären insgesamt weniger gut glykosyliert und daher vermutlich im Import gehemmt. Bei einer Positionierung der HS zwischen den ersten beiden Glykosylierungsstellen, lässt sich ein weiterer Hinweis ableiten, dass auch diese Chimären schon in ihrem Import behindert werden. Die hydrophoben Bereiche beeinflussen die erste Stelle stärker als die beiden C-terminalen Stellen, was als Indiz für eine Hemmung des Importes betrachtet werden kann. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die kurzen hydrophoben Abschnitte auch in Proteinen ein Importhemmnis sind, die normalerweise reibungslos importiert werden. Es lässt sich daraus die These ableiten, dass kurze hydrophobe Abschnitte innerhalb des reifen Teils von Proteinen ein generelles Problem für das Translokation darstellen.

Dies ist vermutlich dadurch zu erklären, dass diese Abschnitte für das Translokation einen Sonderfall darstellen. Bei längeren hydrophoben Abschnitten, die sich als Transmembrandomänen eignen, würde eine Insertion in die Membran stattfinden, wohingegen Proteine ohne stark hydrophobe Abschnitte einfach über die Membran transportiert werden. Die kurzen hydrophoben Bereiche bewirken hingegen einen Transportstau. Dies ist möglicherweise dadurch zu begründen, dass aufgrund der Hydrophobizität eine Membraninsertion begonnen wird, die jedoch aufgrund der zu geringen Länge der Segmente wieder unterbrochen wird. Transmembrandomänen sind im Durchschnitt 17,6 Aminosäuren lang, damit sie die Membran durchspannen können (Hildebrand et al. 2004). Die hydrophoben Segmente HS1 und HS2 sind mit zehn und neun Aminosäuren deutlich kürzer. Es ist denkbar, dass die hydrophoben Bereiche zwischen der lateralen Öffnung, die einen Eintritt in den hydrophoben Membraninnenraum und eine Interaktion mit den Lipiden erlaubt, und dem aquatischen Kanal des Sec61-Komplexes wechseln. Dies würde den Import verzögern und ein Ereignis erfordern, dass diesen Zustand beendet.

Die Ergebnisse decken sich zudem mit einer bioinformatischen Studie, die zeigen konnte, dass sekretorische Proteine im Vergleich zu anderen Proteinen insgesamt eine geringere Hydrophobizität besitzen (Zhang et al. 2018). Eine geringe Gesamthydrophobizität scheint also einen Transport über Membranen zu begünstigen. Die Arbeiten von Hessa et al. beschäftigen sich ebenfalls mit der Hydrophobizität von Transportsubstraten. In diesen Studien wird ein Fokus auf die lokale Hydrophobizität von Transmembranproteinen gelegt. Die Autoren führen eine Skala der *biological hydrophobicity* ein, um anhand lokaler Hydrophobizität zu beurteilen, wie gut ein Protein über die ER-Membran transportiert wird (Hessa et al. 2007). Sekretorische Proteine werden auch hier anhand ihrer lokalen Hydrophobizität als am wenigsten hydrophob eingestuft. Cytosolische Proteine können hingegen lokal deutlich hydrophober sein und weisen insgesamt eine breitere Streuung in Bezug auf ihre *biological hydrophobicity* auf. Es gibt zwar eine Schnittmenge zwischen cytosolischen und sekretorischen Proteinen, jedoch überschreiten sekretorische Proteine einen gewissen Wert nicht. Die Autoren stellen daher die These auf, dass es eine Obergrenze für die lokale Hydrophobizität von sekretorischen Proteinen gibt, welche durch das Translokation definiert wird.

In dieser Arbeit konnte die Theorie von Hessa et al. experimentell gestützt werden. Das Translokation scheint tatsächlich nicht in der Lage zu sein, Proteine mit zu hohen lokalen Hydrophobizitäten zu transportieren. Vermutlich gab und gibt es daher einen evolutionären Druck auf sekretorische Proteine, der ein Auftreten von hydrophoben Bereichen, die zu kurz für Transmembrandomänen sind, weniger wahrscheinlich macht. Für cytosolische Proteine liegt dieser Druck hingegen nicht vor. Daher finden sich in dieser Proteinklasse Vertreter diverser Hydrophobizitäten.

Die gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass es neben intrinsisch ungeordneten Bereichen ein weiteres Charakteristikum der reifen Proteinkette gibt, das den Import in das ER behindert. Die hydrophoben Bereiche hemmen unabhängig von der Signalsequenz den Import in das ER. Eine Signalsequenz ist bei Proteinen mit diesem Merkmal nicht ausreichend, um eine vollständige Translokation des Proteins in das ER zu sichern.

#### 6.4 Welches Kontrollsystem ist für den Abbau von Proteinketten mit hydrophoben Bereichen *in vivo* verantwortlich?

Proteinketten, die sich zu lange im Translokation aufhalten, stellen ein großes Problem für die Zelle dar, da sie eine Nutzung der Transportkanäle durch andere Proteine verhindern und so deren Translokation verzögern oder verhindern. Proteine, die kurze hydrophobe Bereiche tragen, werden daher *in vivo* vermutlich aus dem Translokation entfernt, wenn ihr Import zu viel Zeit in Anspruch nimmt. Dafür erfolgt wahrscheinlich ein retrograder Transport in das Cytosol. Es gibt Hinweise, dass die Möglichkeit eines Transportes von glykosylierten Proteinen durch den Sec61-Kanal prinzipiell besteht (Gillece et al. 2000). Dies würde einen Rücktransport der nicht vollständig importierten, aber schon teilweise glykosylierten Proteine ermöglichen. Ob ein retrograder Transport auch im verwendeten *in vitro* System erfolgt, wurde in dieser Arbeit nicht explizit untersucht. Die Hochsalzsedimentation lässt neben einem Vorliegen im Translokation prinzipiell die Möglichkeit offen, dass das Protein auf cytosolischer Seite hochsalzresistent mit der ER-Membran interagiert. Dies käme möglicherweise zustande, da es durch Proteine der Qualitätskontrolle aus dem Translokation entfernt wurde und für den Abbau vorbereitet wird. Zudem lassen sich bei Zugabe der Proteinase K keine Abbauprodukte für die verwendeten Proteine beobachten. Dies würde auf einen retrograden Transport hindeuten, allerdings ergab eine Analyse, dass die jeweils geschützten Fragmente von ssPex8 und den Chimären zu wenig Methionine enthalten, als dass eine Detektion möglich wäre.

Nach der Retrotranslokation wird das Protein *in vivo* vermutlich im Cytosol abgebaut. Im verwendeten *in vitro* System konnte jedoch beispielsweise die doppelt glykosylierten Form von ssPex8 nachgewiesen werden, die durch den HS1 im weiteren Import behindert wird. Dies ist dadurch zu erklären, dass im Retikulozytenlysate das Proteasom inhibiert ist. Daher findet ohne Zugabe der Proteinase K kein Abbau statt. Zusätzlich fehlen möglicherweise Proteine, die den verlangsamten Import detektieren. Der genaue Mechanismus zum Abbau der Ketten und die Identifikation des verantwortlichen Kontrollsystems bedarf daher weiterer Untersuchungen.

Für den Abbau von aufgrund der hydrophoben Bereiche im Import gehemmten Proteinketten kommen *in vivo* prinzipiell mehrere bekannte Qualitätskontrollsysteme des endoplasmatischen Retikulums in Frage. Dazu zählt beispielsweise die *ER-associated degradation* (ERAD). Es konnte in dieser Arbeit ein vollständiger Import mit anschließendem Export ausgeschlossen werden. Stattdessen wird die Proteinkette abgebaut, nachdem sie teilweise importiert wurde und der Import gehemmt wird. Die ERAD erkennt vollständig importierte Glykoproteine, die unvollständig oder fehlgefaltet sind anhand ihrer Verweildauer im Calnexin/Calretikulin-Kreislauf und schleust sie zurück in das Cytosol, wo sie vom Proteasom abgebaut werden (Groisman et al. 2011). Da sowohl ssPex8, als auch die erstellten Chimären schon im Import behindert werden, kann die ERAD sie nicht als Substrate erkennen. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die *ER-associated degradation* für die Entfernung und den Abbau der Proteinketten verantwortlich ist.

Für die Erkennung und den Abbau von Substraten, die nicht vollständig importiert werden, kommt die *ribosomal quality control* (rQC) in Frage. Hier werden Proteine von der E3-Ligase Listerin erkannt und zum Abbau vorbereitet (Malsburg et al. 2015). Es erfolgt eine Ubiquitinierung des Substrates, die das Protein zum Abbau durch das Proteasom kennzeichnet. Der Abbau von Substraten mit kurzen hydrophoben Bereichen durch die rQC ist dabei anhand mehrerer Aspekte als unwahrscheinlich zu beurteilen. Der wichtigste Punkt ist der Mechanismus, nach dem die rQC arbeitet. Während des Importes kommt es zu einem Translationsarrest, der durch verschiedene Faktoren hervorgerufen werden kann. Dazu zählen zum Beispiel einige Merkmale der naszierenden Kette, wie das Fehlen eines Stop-Codons oder direkt aufeinander folgende Proline, aber auch beschädigte Komponenten des Translationsapparates (Arakawa et al. 2016; Woolstenhulme et al. 2013; Simms et al. 2014). Diese

Signale können für die verwendeten Proteine anhand der Sequenzen und der verwendeten Methoden ausgeschlossen werden. Zusätzlich erscheint ein Translationsarrest für die verwendeten Proteine unwahrscheinlich, da in allen Fällen die Volllängeproteine detektiert werden konnten.

Wenn ein bekanntes Qualitätskontrollsystem für den Abbau von Proteinen mit hydrophoben Segmenten verantwortlich ist, kommt am ehesten die *preemptive quality control* (pQC) in Frage. Die pQC ist neben der rQC ein weiterer Weg, um im Translokation befindliche Proteinketten abzubauen. Dieser Qualitätskontrollmechanismus greift bei ER-Stress, um das Organell vor Überlastung zu schützen. Je nach Signalsequenz werden Proteine nach ihrer Relevanz sortiert und noch während des Imports abgebaut (Kang et al. 2006). Es ist durchaus denkbar, dass im Falle von ER-Stress Substrate mit kurzen hydrophoben Bereichen als zusätzliche Belastung wahrgenommen werden, da sie langsamer translozieren. Dies lässt einen Abbau durch die pQC sinnvoll erscheinen. Bislang ist bekannt, dass das Kontrollsystem Substrate anhand ihrer Signalsequenz erkennt und sie nach ihrer Relevanz ordnet (Kang et al. 2006). Weniger relevante Substrate werden abgebaut, während für die Funktionalität der Zelle essenzielle Substrate normal importiert werden. Außerdem ist die pQC für den Abbau von Proteinen mit intrinsisch ungeordneten Bereichen verantwortlich (Miesbauer et al. 2009). Keines der verwendeten Proteine weist einen solchen Bereich auf. Allerdings ist die Erkennung der intrinsisch ungeordneten Bereiche ein Indiz dafür, dass die pQC neben den Signalsequenzen auch den reifen Teil der Translokationssubstrate evaluiert oder in der Lage ist, eine Verlangsamung im Import zu detektieren. Daher ist es denkbar, dass dieses System auch in der Lage ist, die verlangsamte Translokation von Proteinen mit kurzen hydrophoben Sequenzen zu detektieren und anhand dessen den Abbau der Kette einleiten könnte. Vertiefende Untersuchungen müssen noch belegen, ob die verlangsamte Translokation der hydrophoben Bereiche tatsächlich die pQC aktiviert oder mit einem bislang unbekanntem Kontrollsystem in Verbindung steht. Dafür wäre eine Untersuchung *in vivo* geeignet; möglicherweise in Verbindung mit Interaktionsstudien.

## 7 Literaturverzeichnis

- Apweiler, R.; Hermjakob, H.; Sharon, N. (1999): On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. In: *Biochimica et biophysica acta* 1473 (1), S. 4–8. DOI: 10.1016/S0304-4165(99)00165-8.
- Arakawa, S.; Yunoki, K.; Izawa, T.; Tamura, Y.; Nishikawa, S.-I.; Endo, T. (2016): Quality control of nonstop membrane proteins at the ER membrane and in the cytosol. In: *Scientific reports* 6, S. 30795. DOI: 10.1038/srep30795.
- Ast, T.; Michaelis, S.; Schuldiner, M. (2016): The Protease Ste24 Clears Clogged Translocons. In: *Cell* 164 (1-2), S. 103–114. DOI: 10.1016/j.cell.2015.11.053.
- Auer, J.; Spicker, G.; Böck, A. (1991): Presence of a gene in the archaebacterium *Methanococcus vannielii* homologous to *secY* of eubacteria. In: *Biochimie* 73 (6), S. 683–688. DOI: 10.1016/0300-9084(91)90048-6.
- Bañó-Polo, M.; Baldin, F.; Tamborero, S.; Marti-Renom, M. A.; Mingarro, I. (2011): N-glycosylation efficiency is determined by the distance to the C-terminus and the amino acid preceding an Asn-Ser-Thr sequon. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 20 (1), S. 179–186. DOI: 10.1002/pro.551.
- Becker, T.; Bhushan, S.; Jarasch, A.; Armache, J.-P.; Funes, S.; Jossinet, F. et al. (2009): Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome. In: *Science (New York, N.Y.)* 326 (5958), S. 1369–1373. DOI: 10.1126/science.1178535.
- Blobel, G.; Dobberstein, B. (1975): Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. In: *The Journal of cell biology* 67 (3), S. 835–851. DOI: 10.1083/jcb.67.3.835.
- Burda, P.; Aebi, M. (1999): The dolichol pathway of N-linked glycosylation. In: *Biochimica et biophysica acta* 1426 (2), S. 239–257. DOI: 10.1016/S0304-4165(98)00127-5.
- Chapman, A.; Li, E.; Kornfeld, S. (1979): The biosynthesis of the major lipid-linked oligosaccharide of Chinese hamster ovary cells occurs by the ordered addition of mannose residues. In: *The Journal of biological chemistry* 254 (20), S. 10243–10249. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)86700-5.
- Cheng, J.; Randall, A. Z.; Sweredoski, M. J.; Baldi, P. (2005): SCRATCH: a protein structure and structural feature prediction server. In: *Nucleic acids research* 33 (Web Server issue), W72-6. DOI: 10.1093/nar/gki396.
- Christianson, J. C.; Shaler, T. A.; Tyler, R. E.; Kopito, R. R. (2008): OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. In: *Nature cell biology* 10 (3), S. 272–282. DOI: 10.1038/ncb1689.
- Chuck, S. L.; Lingappa, V. R. (1992): Pause transfer: A topogenic sequence in apolipoprotein B mediates stopping and restarting of translocation. In: *Cell* 68 (1), S. 9–21. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90202-N.
- Chuck, S. L.; Yao, Z.; Blackhart, B. D.; McCarthy, B. J.; Lingappa, V. R. (1990): New variation on the translocation of proteins during early biogenesis of apolipoprotein B. In: *Nature* 346 (6282), S. 382–385. DOI: 10.1038/346382a0.
- Connolly, T.; Collins, P.; Gilmore, R. (1989): Access of proteinase K to partially translocated nascent polypeptides in intact and detergent-solubilized membranes. In: *The Journal of cell biology* 108 (2), S. 299–307. DOI: 10.1083/jcb.108.2.299.

- Deckers, M.; Emmrich, K.; Girzalsky, W.; Awa, W. L.; Kunau, W.-H.; Erdmann, R. (2010): Targeting of Pex8p to the peroxisomal importomer. In: *European journal of cell biology* 89 (12), S. 924–931. DOI: 10.1016/j.ejcb.2010.06.019.
- Dirndorfer, D.; Seidel, R. P.; Nimrod, G.; Miesbauer, M.; Ben-Tal, N.; Engelhard, M. et al. (2013): The  $\alpha$ -helical structure of prodomains promotes translocation of intrinsically disordered neuropeptide hormones into the endoplasmic reticulum. In: *The Journal of biological chemistry* 288 (20), S. 13961–13973. DOI: 10.1074/jbc.M112.430264.
- Emr, S. D.; Silhavy, T. J. (1983): Importance of secondary structure in the signal sequence for protein secretion. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (15), S. 4599–4603. DOI: 10.1073/pnas.80.15.4599.
- Forrester, A.; Leonibus, C. de; Grumati, P.; Fasana, E.; Piemontese, M.; Staiano, L. et al. (2019): A selective ER-phagy exerts procollagen quality control via a Calnexin-FAM134B complex. In: *The EMBO journal* 38 (2). DOI: 10.15252/embj.201899847.
- Gavel, Y.; Heijne, G. von (1990): Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering. In: *Protein engineering* 3 (5), S. 433–442. DOI: 10.1093/protein/3.5.433.
- Gillece, P.; Pilon, M.; Römisch, K. (2000): The protein translocation channel mediates glycopeptide export across the endoplasmic reticulum membrane. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (9), S. 4609–4614. DOI: 10.1073/pnas.090083497.
- Gonsberg, A.; Jung, S.; Ulbrich, S.; Origi, A.; Ziska, A.; Baier, M. et al. (2017): The Sec61/SecY complex is inherently deficient in translocating intrinsically disordered proteins. In: *The Journal of biological chemistry* 292 (52), S. 21383–21396. DOI: 10.1074/jbc.M117.788067.
- Groisman, B.; Shenkman, M.; Ron, E.; Lederkremer, G. Z. (2011): Mannose trimming is required for delivery of a glycoprotein from EDEM1 to XTP3-B and to late endoplasmic reticulum-associated degradation steps. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (2), S. 1292–1300. DOI: 10.1074/jbc.M110.154849.
- Hammond, C.; Braakman, I.; Helenius, A. (1994): Role of N-linked oligosaccharide recognition, glucose trimming, and calnexin in glycoprotein folding and quality control. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (3), S. 913–917. DOI: 10.1073/pnas.91.3.913.
- Harada, Y.; Li, H.; Li, H.; Lennarz, W. J. (2009): Oligosaccharyltransferase directly binds to ribosome at a location near the translocon-binding site. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (17), S. 6945–6949. DOI: 10.1073/pnas.0812489106.
- Hegde, R. S.; Lingappa, V. R. (1996): Sequence-specific alteration of the ribosome-membrane junction exposes nascent secretory proteins to the cytosol. In: *Cell* 85 (2), S. 217–228. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81098-3.
- Heijne, G. von (1982): Signal sequences are not uniformly hydrophobic. In: *Journal of molecular biology* 159 (3), S. 537–541. DOI: 10.1016/0022-2836(82)90300-x.
- Heijne, G. von (1983): Patterns of amino acids near signal-sequence cleavage sites. In: *European journal of biochemistry* 133 (1), S. 17–21. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07424.x.
- Heijne, G. von (1984): Analysis of the distribution of charged residues in the N-terminal region of signal sequences: implications for protein export in prokaryotic and eukaryotic cells. In: *The EMBO journal* 3 (10), S. 2315–2318. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1984.tb02132.x.

- Hessa, T.; Meindl-Beinker, N. M.; Bernsel, A.; Kim, H.; Sato, Y.; Lerch-Bader, M. et al. (2007): Molecular code for transmembrane-helix recognition by the Sec61 translocon. In: *Nature* 450 (7172), S. 1026–1030. DOI: 10.1038/nature06387.
- Hessa, T.; Sharma, A.; Mariappan, M.; Eshleman, H. D.; Gutierrez, E.; Hegde, R. S. (2011): Protein targeting and degradation are coupled for elimination of mislocalized proteins. In: *Nature* 475 (7356), S. 394–397. DOI: 10.1038/nature10181.
- Hildebrand, P. W.; Preissner, R.; Frömmel, C. (2004): Structural features of transmembrane helices. In: *FEBS letters* 559 (1-3), S. 145–151. DOI: 10.1016/S0014-5793(04)00061-4.
- Hsieh, H.-H.; Lee, J. H.; Chandrasekar, S.; Shan, S.-O. (2020): A ribosome-associated chaperone enables substrate triage in a cotranslational protein targeting complex. In: *Nature communications* 11 (1), S. 5840. DOI: 10.1038/s41467-020-19548-5.
- Imperiali, B.; O'Connor, S. E.; Hendrickson, T.; Kellenberger, C. (1999): Chemistry and biology of asparagine-linked glycosylation. In: *Pure and Applied Chemistry* 71 (5), S. 777–787. DOI: 10.1351/pac199971050777.
- Ishida, Y.; Yamamoto, A.; Kitamura, A.; Lamandé, S. R.; Yoshimori, T.; Bateman, J. F. et al. (2009): Autophagic elimination of misfolded procollagen aggregates in the endoplasmic reticulum as a means of cell protection. In: *Molecular biology of the cell* 20 (11), S. 2744–2754. DOI: 10.1091/mbc.e08-11-1092.
- Jungnickel, B.; Rapoport, T. A. (1995): A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. In: *Cell* 82 (2), S. 261–270. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90313-5.
- Kadowaki, H.; Nagai, A.; Maruyama, T.; Takami, Y.; Satrimafitrah, P.; Kato, H. et al. (2015): Pre-emptive Quality Control Protects the ER from Protein Overload via the Proximity of ERAD Components and SRP. In: *Cell reports* 13 (5), S. 944–956. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.09.047.
- Kadowaki, H.; Satrimafitrah, P.; Takami, Y.; Nishitoh, H. (2018): Molecular mechanism of ER stress-induced pre-emptive quality control involving association of the translocon, Derlin-1, and HRD1. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 7317. DOI: 10.1038/s41598-018-25724-x.
- Kang, S.-W.; Rane, N. S.; Kim, S. J.; Garrison, J. L.; Taunton, J.; Hegde, R. S. (2006): Substrate-specific translocational attenuation during ER stress defines a pre-emptive quality control pathway. In: *Cell* 127 (5), S. 999–1013. DOI: 10.1016/j.cell.2006.10.032.
- Karaoglu, D.; Kelleher, D. J.; Gilmore, R. (1997): The highly conserved Stt3 protein is a subunit of the yeast oligosaccharyltransferase and forms a subcomplex with Ost3p and Ost4p. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (51), S. 32513–32520. DOI: 10.1074/jbc.272.51.32513.
- Kelleher, D. J.; Karaoglu, D.; Mandon, E. C.; Gilmore, R. (2003): Oligosaccharyltransferase isoforms that contain different catalytic STT3 subunits have distinct enzymatic properties. In: *Molecular cell* 12 (1), S. 101–111. DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00243-0.
- Kelley, L. A.; Mezulis, S.; Yates, C. M.; Wass, M. N.; Sternberg, M. J. E. (2015): The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. In: *Nature protocols* 10 (6), S. 845–858. DOI: 10.1038/nprot.2015.053.
- Kurzchalia, T. V.; Wiedmann, M.; Girshovich, A. S.; Bochkareva, E. S.; Bielka, H.; Rapoport, T. A. (1986): The signal sequence of nascent preprolactin interacts with the 54K polypeptide of the signal recognition particle. In: *Nature* 320 (6063), S. 634–636. DOI: 10.1038/320634a0.

- Lehle, L.; Tanner, W. (1978): Glycosyl transfer from dolichyl phosphate sugars to endogenous and exogenous glycoprotein acceptors in yeast. In: *European journal of biochemistry* 83 (2), S. 563–570. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1978.tb12124.x.
- Li, E.; Kornfeld, S. (1979): Biosynthesis of lipid-linked oligosaccharides. Isolation and structure of a second lipid-linked oligosaccharide in Chinese hamster ovary cells. In: *The Journal of biological chemistry* 254 (8), S. 2754–2758. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)30137-0.
- Liaci, A. M.; Steigenberger, B.; Telles de Souza, P. C.; Tamara, S.; Gröllers-Mulderij, M.; Ogrissek, P. et al. (2021): Structure of the human signal peptidase complex reveals the determinants for signal peptide cleavage. In: *Molecular cell* 81 (19), 3934-3948.e11. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.07.031.
- Lilley, B. N.; Ploegh, H. L. (2005): Multiprotein complexes that link dislocation, ubiquitination, and extraction of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum membrane. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (40), S. 14296–14301. DOI: 10.1073/pnas.0505014102.
- Malsburg, K. von der; Shao, S.; Hegde, R. S. (2015): The ribosome quality control pathway can access nascent polypeptides stalled at the Sec61 translocon. In: *Molecular biology of the cell* 26 (12), S. 2168–2180. DOI: 10.1091/mbc.E15-01-0040.
- 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. In: *Cell* 97 (5), S. 553–564. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80767-9.
- McCormick, P. J.; Miao, Y.; Shao, Y.; Lin, J.; Johnson, A. E. (2003): Cotranslational protein integration into the ER membrane is mediated by the binding of nascent chains to translocon proteins. In: *Molecular cell* 12 (2), S. 329–341. DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00304-6.
- Mellquist, J. L.; Kasturi, L.; Spitalnik, S. L.; Shakin-Eshleman, S. H. (1998): The amino acid following an asn-X-Ser/Thr sequon is an important determinant of N-linked core glycosylation efficiency. In: *Biochemistry* 37 (19), S. 6833–6837. DOI: 10.1021/bi972217k.
- Menetret, J. F.; Neuhof, A.; Morgan, D. G.; Plath, K.; Radermacher, M.; Rapoport, T. A.; Akey, C. W. (2000): The structure of ribosome-channel complexes engaged in protein translocation. In: *Molecular cell* 6 (5), S. 1219–1232. DOI: 10.1016/S1097-2765(00)00118-0.
- Miesbauer, M.; Pfeiffer, N. V.; Rambold, A. S.; Müller, V.; Kiachopoulos, S.; Winklhofer, K. F.; Tatzelt, J. (2009):  $\alpha$ -Helical domains promote translocation of intrinsically disordered polypeptides into the endoplasmic reticulum. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (36), S. 24384–24393. DOI: 10.1074/jbc.M109.023135.
- Müller, G.; Zimmermann, R. (1987): Import of honeybee prepromelittin into the endoplasmic reticulum: structural basis for independence of SRP and docking protein. In: *The EMBO journal* 6 (7), S. 2099–2107. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1987.tb02476.x.
- Munro, S.; Pelham, H. R. (1987): A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. In: *Cell* 48 (5), S. 899–907. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90086-9.
- Ng, D. T.; Brown, J. D.; Walter, P. (1996): Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. In: *The Journal of cell biology* 134 (2), S. 269–278. DOI: 10.1083/jcb.134.2.269.
- Ngoswan, J.; Wang, N. M.; Fung, K. L.; Chirico, W. J. (2003): Roles of cytosolic Hsp70 and Hsp40 molecular chaperones in post-translational translocation of presecretory proteins into the

- endoplasmic reticulum. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (9), S. 7034–7042. DOI: 10.1074/jbc.M210544200.
- Nilsson, I. M.; Heijne, G. von (1993): Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (8), S. 5798–5801.
- Ohms, M. (2015): Untersuchungen zum in vitro Transport in das endoplasmatische Retikulum und zur heterologe Expression des Proteins Pex8p aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Bachelorarbeit. Universität zu Lübeck, Lübeck. Institut für Biologie.
- Okuda-Shimizu, Y.; Hendershot, L. M. (2007): Characterization of an ERAD pathway for nonglycosylated BiP substrates, which require Herp. In: *Molecular cell* 28 (4), S. 544–554. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.09.012.
- Oyadomari, S.; Yun, C.; Fisher, E. A.; Kreglinger, N.; Kreibich, G.; Oyadomari, M. et al. (2006): Cotranslocational degradation protects the stressed endoplasmic reticulum from protein overload. In: *Cell* 126 (4), S. 727–739. DOI: 10.1016/j.cell.2006.06.051.
- Pauwels, E.; Schüle, R.; Vermeire, K. (2021): Inhibitors of the Sec61 Complex and Novel High Throughput Screening Strategies to Target the Protein Translocation Pathway. In: *IJMS* 22 (21), S. 12007. DOI: 10.3390/ijms222112007.
- Pease, R. J.; Leiper, J. M.; Harrison, G. B.; Scott, J. (1995): Studies on the translocation of the amino terminus of apolipoprotein B into the endoplasmic reticulum. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (13), S. 7261–7271. DOI: 10.1074/jbc.270.13.7261.
- Pfeffer, S.; Burbaum, L.; Unverdorben, P.; Pech, M.; Chen, Y.; Zimmermann, R. et al. (2015): Structure of the native Sec61 protein-conducting channel. In: *Nature communications* 6, S. 8403. DOI: 10.1038/ncomms9403.
- Powers, T.; Walter, P. (1996): The nascent polypeptide-associated complex modulates interactions between the signal recognition particle and the ribosome. In: *Current biology : CB* 6 (3), S. 331–338. DOI: 10.1016/s0960-9822(02)00484-0.
- Rao, B.; Li, S.; Yao, D.; Wang, Q.; Xia, Y.; Jia, Y. et al. (2021): The cryo-EM structure of an ERAD protein channel formed by tetrameric human Derlin-1. In: *Science advances* 7 (10). DOI: 10.1126/sciadv.abe8591.
- Rapoport, T. A. (2007): Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. In: *Nature* 450 (7170), S. 663–669. DOI: 10.1038/nature06384.
- Ruiz-Canada, C.; Kelleher, D. J.; Gilmore, R. (2009): Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. In: *Cell* 136 (2), S. 272–283. DOI: 10.1016/j.cell.2008.11.047.
- Rutkowski, D. T.; Kang, S.-W.; Goodman, A. G.; Garrison, J. L.; Taunton, J.; Katze, M. G. et al. (2007): The role of p58IPK in protecting the stressed endoplasmic reticulum. In: *Molecular biology of the cell* 18 (9), S. 3681–3691. DOI: 10.1091/mbc.E07-03-0272.
- Sambrook, Joseph; Russell, David W. (2001): *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3. ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shao, S.; Hegde, R. S. (2011): A calmodulin-dependent translocation pathway for small secretory proteins. In: *Cell* 147 (7), S. 1576–1588. DOI: 10.1016/j.cell.2011.11.048.

- Simms, C. L.; Hudson, B. H.; Mosior, J. W.; Rangwala, A. S.; Zaher, H. S. (2014): An active role for the ribosome in determining the fate of oxidized mRNA. In: *Cell reports* 9 (4), S. 1256–1264. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.10.042.
- Snider, M. D.; Sultzman, L. A.; Robbins, P. W. (1980): Transmembrane location of oligosaccharide-lipid synthesis in microsomal vesicles. In: *Cell* 21 (2), S. 385–392. DOI: 10.1016/0092-8674(80)90475-4.
- Sousa, M. C.; Ferrero-Garcia, M. A.; Parodi, A. J. (1992): Recognition of the oligosaccharide and protein moieties of glycoproteins by the UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase. In: *Biochemistry* 31 (1), S. 97–105. DOI: 10.1021/bi00116a015.
- Suh, K.; Bergmann, J. E.; Gabel, C. A. (1989): Selective retention of monoglucosylated high mannose oligosaccharides by a class of mutant vesicular stomatitis virus G proteins. In: *The Journal of cell biology* 108 (3), S. 811–819.
- Sun, Z.; Brodsky, J. L. (2017): Guardians of the ERAD Galaxy. In: *Cell* 171 (2), S. 267–268. DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.023.
- Sun, Z.; Brodsky, J. L. (2019): Protein quality control in the secretory pathway. In: *The Journal of cell biology* 218 (10), S. 3171–3187. DOI: 10.1083/jcb.201906047.
- Tretter, T.; Pereira, F. P.; Ulucan, O.; Helms, V.; Allan, S.; Kalies, K.-U.; Römisch, K. (2013): ERAD and protein import defects in a sec61 mutant lacking ER-luminal loop 7. In: *BMC cell biology* 14, S. 56. DOI: 10.1186/1471-2121-14-56.
- van den Berg, B.; Clemons, W. M.; Collinson, I.; Modis, Y.; Hartmann, E.; Harrison, S. C.; Rapoport, T. A. (2004): X-ray structure of a protein-conducting channel. In: *Nature* 427 (6969), S. 36–44. DOI: 10.1038/nature02218.
- van der Zand, A.; Braakman, I.; Tabak, H. F. (2010): Peroxisomal membrane proteins insert into the endoplasmic reticulum. In: *Molecular biology of the cell* 21 (12), S. 2057–2065. DOI: 10.1091/mbc.e10-02-0082.
- VanValkenburgh, C.; Chen, X.; Mullins, C.; Fang, H.; Green, N. (1999): The catalytic mechanism of endoplasmic reticulum signal peptidase appears to be distinct from most eubacterial signal peptidases. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (17), S. 11519–11525. DOI: 10.1074/jbc.274.17.11519.
- Voet, Donald; Voet, Judith G. (2011): *Biochemistry*. 4. ed. Hoboken, NJ: Wiley.
- Voigt, S.; Jungnickel, 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. In: *The Journal of cell biology* 134 (1), S. 25–35. DOI: 10.1083/jcb.134.1.25.
- Voorhees, R. M.; Hegde, R. S. (2016): Structure of the Sec61 channel opened by a signal sequence. In: *Science (New York, N.Y.)* 351 (6268), S. 88–91. DOI: 10.1126/science.aad4992.
- Walter, P.; Blobel, G. (1981): Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum III. Signal recognition protein (SRP) causes signal sequence-dependent and site-specific arrest of chain elongation that is released by microsomal membranes. In: *The Journal of cell biology* 91 (2 Pt 1), S. 557–561. DOI: 10.1083/jcb.91.2.557.
- Walter, P.; Blobel, G. (1983): Preparation of microsomal membranes for cotranslational protein translocation. In: *Methods in enzymology* 96, S. 84–93. DOI: 10.1016/s0076-6879(83)96010-x.

- Wang, S.; Sakai, H.; Wiedmann, M. (1995): NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center. In: *The Journal of cell biology* 130 (3), S. 519–528. DOI: 10.1083/jcb.130.3.519.
- Willer, M.; Forte, G. M. A.; Stirling, C. J. (2008): Sec61p is required for ERAD-L: genetic dissection of the translocation and ERAD-L functions of Sec61P using novel derivatives of CPY. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (49), S. 33883–33888. DOI: 10.1074/jbc.M803054200.
- Woolstenhulme, C. J.; Parajuli, S.; Healey, D. W.; Valverde, D. P.; Petersen, E. N.; Starosta, A. L. et al. (2013): Nascent peptides that block protein synthesis in bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (10), E878-87. DOI: 10.1073/pnas.1219536110.
- Wu, X.; Siggel, M.; Ovchinnikov, S.; Mi, W.; Svetlov, V.; Nudler, E. et al. (2020): Structural basis of ER-associated protein degradation mediated by the Hrd1 ubiquitin ligase complex. In: *Science (New York, N.Y.)* 368 (6489). DOI: 10.1126/science.aaz2449.
- Yan, Q.; Lennarz, W. J. (2002): Studies on the function of oligosaccharyl transferase subunits. Stt3p is directly involved in the glycosylation process. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (49), S. 47692–47700. DOI: 10.1074/jbc.M208136200.
- Zapun, A.; Darby, N. J.; Tessier, D. C.; Michalak, M.; Bergeron, J. J.; Thomas, D. Y. (1998): Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (11), S. 6009–6012. DOI: 10.1074/jbc.273.11.6009.
- Zapun, A.; Petrescu, S. M.; Rudd, P. M.; Dwek, R. A.; Thomas, D. Y.; Bergeron, J. J. (1997): Conformation-independent binding of monoglucosylated ribonuclease B to calnexin. In: *Cell* 88 (1), S. 29–38. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81855-3.
- Zhang, J.; Chai, H.; Guo, S.; Guo, H.; Li, Y. (2018): High-Throughput Identification of Mammalian Secreted Proteins Using Species-Specific Scheme and Application to Human Proteome. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 23 (6). DOI: 10.3390/molecules23061448.
- Zimmermann, R.; Sagstetter, M.; Schlenstedt, G.; Wiech, H.; Kaßbeckert, B.; Müller, G. (1988): Import of Small Secretory and Plasma Membrane Proteins into the Endoplasmic Reticulum. In: Jos A. F. Op den Kamp (Hg.): *Membrane Biogenesis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, S. 337–350.
- Zimmermann, R.; Zimmermann, M.; Wiech, H.; Schlenstedt, G.; Müller, G.; Morel, F. et al. (1990): Ribonucleoparticle-independent transport of proteins into mammalian microsomes. In: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 22 (6), S. 711–723. DOI: 10.1007/BF00786927.
- Ziska, A.; Tatzelt, J.; Dudek, J.; Paton, A. W.; Paton, J. C.; Zimmermann, R.; Haßdenteufel, S. (2019): The signal peptide plus a cluster of positive charges in prion protein dictate chaperone-mediated Sec61 channel gating. In: *Biology open* 8 (3). DOI: 10.1242/bio.040691.

## 8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Lübeck, den 16.06.2023

Alexandra Schatt

## 9 Danksagung

Danke...

...an Prof. Dr. Enno Hartmann für die Möglichkeit, meine Arbeit im Institut für Biologie anfertigen zu können und für die Besuche im Hellas.

...an PD Dr. Kai Kalies für die Unterstützung bei Verfolgen des roten Fadens und dem Verfassen der Arbeit, die Betreuung und die Grillabende.

...an Prof. Dr. Norbert Tautz und Prof. Dr. Thomas Peters für die Übernahme des Zweitgutachtens und des Prüfungsvorsitzes.

...an das Institut für Biologie für die Motivation, das Verständnis, die fachlichen und nichtfachlichen Gespräche und die Hilfsbereitschaft. Besonderer Dank an Suse für die scheinbar endlose Nervennahrung, die Klonierungen und das Ausharren an langen Tagen.

...an das Isotopenlabor für die Gespräche in Inkubationszeiten, für die Gabe des Gefühls, dass jedes Problem lösbar ist und für den jährlichen Glühwein. Und für die Kekse, die vom Kurs übrig geblieben waren.

...an Frauke für das wissenschaftliche Sparring, den Flammkuchen-Freitag, fürs Da-Sein und fürs Mit-Fühlen. Ich hätte mir keine bessere Mitstreiterin vorstellen können.

...an die Korrekturleser Frauke, Chris & Annika für die investierte Zeit, die Anregungen und die Beruhigungen.

...an meine Freunde in Lübeck und überall sonst fürs Zuhören, Nachfragen und Ablenken.

...an meine Familien, die Schatts und die Großbröhmers, für das Schaffen von Orten, an denen diese Arbeit keine Rolle spielt.

...und zuletzt und zuerst an Chris für das Vertrauen in mich, das Ermutigen, die Kritik, die Auszeiten und die Geduld.

## 10 Anhang

### 10.1 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ALG	<i>asparagine linked glycosylation</i>
ApoB	Apolipoprotein B
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BiP	<i>binding immunoglobulin protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER-associated degradation</i>
eq	<i>equivalents</i> , Äquivalente
FDU	<i>fast digest unit</i>
fwd	<i>forward</i> , siehe „Vorwärtsprimer“
Glc	Glukose
GlcNAc	N-Acetyl Glukosamin
G	Glykosylierungsstelle
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
Man	Mannose
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
OST	Oligosaccharyltransferase
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
Pex	Peroxin
PP-Dol	Dolicholphosphat
pPL[ss]	Signalsequenz des Präprolaktins
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pQC	<i>preemptive quality control</i>
PTS	<i>peroxisomal targeting signal</i>
rev	<i>reverse</i> , siehe „Rückwärtsprimer“
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rNTP	Ribonukleosidtriphosphat
rpm	<i>rounds per minute</i>
rQC	<i>ribosomal quality control</i>
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
SPC	<i>signal peptidase complex</i> , Signalpeptidasekomplex
SRP	<i>signal recognition particle</i>
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TRAM	<i>translocating chain-associated membrane protein</i>
TRAP	<i>translocon-associated protein</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UGGT	UDP-Glucose:Glycoprotein Glucosyltransferase

## 10.2 Verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
Bgl fw	AAGTTGCAGGACCACTTCTG	Halbvektor <i>forward</i> Primer
Bgl rev	CAGCAATAAACCCAGCCAGC	Halbvektor <i>reverse</i> Primer
ppL78mer fw	ATGCAGCTGGCTTATCG	Erstellung Verkürzungen von pPL-Pex8
pPL SS+6AS rev	ATTGGGACAGACGGGGTGGAG	Austausch der pPL-Signalsequenz
Pex8 fwd(-ATG)	TTTGATCATGACGTCGAATATCTG	Austausch der pPL-Signalsequenz
P+L 143mer rev	TCATTACTACATCATCATCGTGGCTCGGTGA GATTCCG	Erstellung des ssPex8-143mers
P+L 175mer rev	TCATTACTACATCATCATGCTGGATTCATCA ATAAAATAGG	Erstellung des ssPex8-175mers
P+L 204mer rev	TCATTACTACATCATCATCCTGACAATGGCA GTATTCC	Erstellung des ssPex8-204mers
P+L 274mer rev	TCATTACTACATGGCCAAATGATTCAAGTTG	Erstellung des ssPex8-274mers
P+L 381mer rev	TCATTACTATACTAAATTATCGTAAACATAA TCG	Erstellung des ssPex8-381mers
P+L 489mer rev	TCATTACTAGGATACTTGCCATTGTGCAACC TG	Erstellung des ssPex8-489mers
P+L 619mer rev	TCATTACTAACTTGATAAGACCGTTGTG	Erstellung des ssPex8-619mers
AS14	TGTTTAAGCCTTTTCCACGTCC	Erstellung ssPex8 $\Delta$ 36-422
AS17	GATGACTGGTCTAAAATCACTACAG	Erstellung ssPex8 $\Delta$ 36-387
AS26	TTTAATCAGTCAAACCGAAGCGCC	Deletion AS210-219 aus pPL-Pex8 fw
AS27	GCAATGCTGAATCGATAAATTAGCCCTGAC	Deletion AS210-219 aus pPL-Pex8 rev
AS30	AAAGAATTATCCGCCATGAATATG	Deletion AS321-329 aus pPL-Pex8 fw
AS40	ATTTTGGAACTTGAAATCTAGTTG	Deletion AS321-329 aus pPL-Pex8 rev
AS32	AGCTTTACTTTTTAATAACACTACAACAGAA GATGAAACGG	Q5-Primer Insertion HS1 in ppPL[SS]-6AS-aF[mp] fw
AS33	AATGCTATCAGAAGGCAATTGGGACAGAC GGGGGT	Q5-Primer Insertion HS1 in ppPL[SS]-6AS-aF[mp] rev
AS36	TTTATCCTGATAATCCTCGCGTTAAAC	Q5-Primer Insertion HS2 in ppPL[SS]-6AS-aF[mp] fw
AS37	TACATTGGGACAGACGGGGTGGGA	Q5-Primer Insertion HS2 in ppPL[SS]-6AS-aF[mp] rev
AS41	AATCCTCGCGTTAGGGGATTCGATGTTGC TG	Q5-Primer Insertion HS2 in ppPL[SS]-6AS-aF[mp] mittig fw
AS42	ATCAGGATAAATACTTCTAAATCTGAGTAA CCGATG	Q5-Primer Insertion HS2 in ppPL[SS]-6AS-aF[mp] mittig rev
AS43	AGCTTTACTTTTTAATGGGGATTCGATGTT GCTG	Q5-Primer Insertion HS1 in ppPL[SS]-6AS-aF[mp] mittig fw
AS44	AATGCTATCAGAAGGCATTCTAAATCTGAG TAACCGATG	Q5-Primer Insertion HS1 in ppPL[SS]-6AS-aF[mp] mittig rev
AS53	GACAGCACAAATAACGGGTTATTG	Deletion 2. G in pPL[ss]-aF[mp] (N71D) fw
AS54	GGAAAATGGCAAAACAGCAACATC	Deletion 2. G in pPL[ss]-aF[mp] (N71D) rev

## 10.3 Plasmide

Plasmid	Ersteller
pGEM4a_ppαF	V. Stokes
pGEM4a_pPL	V. Stokes
pGEM4a_ScPex8	I. Harms
pGEM4a_pPL-SS+6AS_ScPex8	F. Kerlin
pGEM4a_pPL-SS+6AS_ScPex8-N219D-N403D-N336D-N203D-N173D	A. Schatt
pGEM4a_pPL-SS+6AS_ScPex8-N219D-N403D-N336D-N203D-N142D	A. Schatt
pGEM4a_pPL-SS+6AS_ScPex8-N219D-N403D-N336D-N203D	A. Schatt
pGEM4a_pPL-SS+6AS_Pex8-N142D	A. Schatt
pGEM4a_pPL-SS+6AS_Pex8-N173D	A. Schatt
pGEM4a_pPL-SS+6AS_Pex8-N203D	A. Schatt
pGEM4a_pPL-SS+6AS_Pex8-N219/22D	A. Schatt
pGEM4a_pPL-SS+6AS_Pex8-N336D	A. Schatt
pGEM4a_pPL-SS+6AS_Pex8-N403D	A. Schatt
pGEM4a_pPL-SS+6AS_ScPex8ΔPTS2	F. Fahrig
pGEM4a_pPL-SS+6AS_ScPex8ΔSKL	S. Allan
pGEM4a_pPL-SS+6AS_ScPex8ΔSKLΔPTS2	S. Allan
pGEM4a_pPL-SS+6AS_Pex8-240mervh	A. Schatt
pGEM4a_pPL-SS+6AS_Pex8-274mervh	A. Schatt
pGEM4a_pPL-SS+6AS_Pex8-L132T	F. Kerlin
pGEM4a_pPL-SS+6AS_Pex8ΔHS1	A. Schatt
pGEM4a_pPL-SS+6AS_Pex8ΔHS2	S. Allan
pGEM4a_pPL-SS+6AS-Pex8ΔHS1ΔHS2	S. Allan
pGEM4a_pPL[SS]-alphaF[mp]	A. Schatt
pGEM4a_pPL[SS]-HS1-alphaF[mp]	A. Schatt
pGEM4a_pPL[SS]-HS2-alphaF[mp]	A. Schatt
pGEM4a_pPL[ss]-aF[mp]HS1	A. Schatt
pGEM4a_pPL[ss]-aF[mp]HS2	A. Schatt