

**Analyse der Lokalisation und Funktion uncharakterisierter
Mitglieder der Zuckertransporterfamilie
in *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von Carsten Frühbeis
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2007
D30

Vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als
Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Rüdiger Wittig

Gutachter: Prof. Dr. Eckhard Boles
HD Dr. Torsten Stein

Datum der Disputation: 27.11.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Transportproteine in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.1.1	Transportproteine der „major facilitator superfamily“	1
1.1.2	Zuckertransport in <i>S. cerevisiae</i>	2
1.1.2.1	Die Familie der Zuckertransporter	2
1.1.2.2	Die uncharakterisierten Mitglieder der Zuckertransporterfamilie Ybr241 und Ygl104	4
1.2	Die Vakuole	5
1.2.1	Transportproteine der Vakuole	6
1.3	Trehalose	8
1.3.1	Synthese und Abbau von Trehalose	8
1.3.2	Der Phänotyp von <i>tps1</i> -Mutanten	9
1.3.3	Trehalose als Stressschutzmolekül	10
1.4	Subzelluläre Sortierung von Proteinen	11
1.4.1	Insertion der Proteine in die ER-Membran	12
1.4.2	Formierung von COPII-Vesikeln	12
1.4.3	ER-Verpackungschaperone	14
1.4.4	Proteintransport vom späten Golgi zur Vakuole	16
1.5	Zielsetzung der Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Bakterienstämme, Kultivierung und Medien	20
2.1.1	Bakterienstämme	20
2.1.2	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> -Stämmen	20
2.1.3	Medien	20
2.2	Hefestämme, Kultivierung und Medien	21
2.2.1	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme	21
2.2.2	Kultivierung von Hefestämmen	23
2.2.3	Medien	24
2.3	Plasmide	25
2.4	Synthetische Oligonukleotide	27
2.5	Antikörper	39
2.6	Chemikalien, Enzyme und Materialien	40

2.7	Transformation	41
2.7.1	Transformation von <i>E. coli</i>	41
2.7.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	41
2.8	Präparation und Analyse von DNA	42
2.8.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	42
2.8.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	42
2.8.3	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	42
2.8.4	Phenol-Chloroform-Extraktion	43
2.8.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	43
2.8.6	Aufreinigung von PCR-Produkten	43
2.8.7	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	43
2.8.8	DNA-Sequenzierung	43
2.8.9	Bestimmung der DNA-Konzentration	44
2.9	Enzymatische Modifikation von DNA	44
2.9.1	DNA-Restriktion	44
2.9.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	44
2.9.3	Ligation	44
2.9.4	Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR	44
2.10	Klonierung von Plasmiden über in <i>vivo</i> -Rekombination	45
2.11	Deletion von Genen in <i>S. cerevisiae</i>	45
2.11.1	Genomische Integration codierender Sequenzen von Tags	46
2.12	Präparation und Analyse von Proteinen	47
2.12.1	Induktion der Proteinsynthese durch Galactosezugabe	47
2.12.2	Herstellung von Rohextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	47
2.12.3	Zellfraktionierung durch Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation	47
2.12.3.1	Kontinuierlicher Saccharosedichtegradient	47
2.12.3.2	Zehnstufiger Saccharosedichtegradient	48
2.12.4	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	49
2.12.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot-Analyse	49
2.12.6	Nachweis von Proteinen über Ponceau S-Färbung	50
2.12.7	Proteinmengenbestimmung nach Lowry	50
2.13	Präparation vakuolärer Extrakte	50
2.13.1	Isolation vakuolärer Vesikel nach Roberts <i>et al.</i> (1991)	50
2.13.1.1	Aufnahmemessung mit isolierten Vesikeln	51

2.13.1.2	Bestimmung der α -Mannosidaseaktivität nach Roberts <i>et al.</i> (1991)	52
2.13.2	Permeabilisierung der Plasmamembran mit Cu-Ionen	52
2.14	Mikroskopie	53
2.14.1	Vitalfärbung	53
2.14.2	Fluoreszenzmikroskopie	53
2.14.2.1	Vakuolenfärbung mit CMAC	53
2.15	Zuckeranalytik	54
2.15.1	Zuckeranalytik mittels RI-Detektion	54
2.15.2	Zuckeranalytik über amperometrische Detektion	54
2.15.3	Probenvorbereitung	54
2.15.4	Ansetzen der Standards	55
2.16	Spezielle Methoden für <i>S. cerevisiae</i>	55
2.16.1	Herstellung von Verdünnungsreihen	55
2.16.2	Bestimmung der Thermotoleranz	55
2.16.3	Bestimmung der Überlebensrate nach hypoosmotischem Schock nach Tamas <i>et al.</i> (1999)	55
2.16.4	Kreuzung und Sporulation von Hefestämmen	55
2.16.5	Tetradenanalyse	56
2.16.6	Synthetic Genetic Array (SGA)	56
3	Ergebnisse	58
3.1	Uncharakterisierte Mitglieder der Zuckertransporterfamilie	58
3.1.1	Analyse der subzellulären Lokalisation der uncharakterisierten Transportproteine Ybr241 und Ygl104	58
3.1.1.1	Analyse der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation und Western-Blot	59
3.1.1.1.1	Zellfraktionierung durch einen kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten	59
3.1.1.1.2	Zellfraktionierung durch einen zehnstufigen Saccharosedichtegradienten	62
3.1.1.2	Analyse der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 mittels Fluoreszenz-Mikroskopie	65
3.1.2	Frage nach dem Grund der vakuolären Lokalisation von Ybr241 und Ygl104	67

3.1.2.1	Analyse der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in einer <i>rsp5</i> -Mutante	67
3.1.2.2	Analyse der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in Endocytose-Mutanten	68
3.1.3	Ermittlung des Transportweges zur Vakuole	70
3.1.3.1	Analyse der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in einer <i>vps1</i> -Mutante	70
3.1.3.2	Analyse der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in einer <i>apl5</i> -Mutante	73
3.1.3.3	Untersuchung der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in einer <i>vps27</i> -Mutante	74
3.1.3.4	Untersuchung der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in einer <i>vps45</i> -Mutante	75
3.1.4	Suche nach Hinweisen auf die physiologische Funktion der putativen Zuckertransporter Ybr241 und Ygl104 durch Datenbankanalysen	77
3.1.4.1	Hinweise auf den Trehalosestoffwechsel	78
3.1.5	Trehalose als Kohlenstoffquelle	78
3.1.6	Extrazelluläre Spaltung von Trehalose	80
3.1.6.1	Analyse der Funktion von Ath1	81
3.1.7	Analyse der Funktion von Ybr241 und Ygl104	82
3.1.7.1	Deletion der Gene <i>YBR241C</i> und <i>YGL104C</i>	82
3.1.7.2	Suche nach einem Wachstumsphänotyp der Deletionsmutanten	83
3.1.7.3	Phenotype MicroArrays™	85
3.1.7.4	Suche nach unbekanntem Hexosetransportern	85
3.1.7.5	Suche nach Substraten von Ybr241 und Ygl104 durch Wachstumsversuche	86
3.1.7.5.1	Überexpression von <i>YBR241C</i> und <i>YGL104C</i> im Stamm EBY.VW4000	86
3.1.7.5.2	Überexpression in Mutanten mit Defekten in Transportwegen zur Vakuole	87
3.1.7.5.3	Fusionsprotein Can1-Ybr241	88
3.1.7.6	Suche nach Substraten von Ybr241 und Ygl104 durch Analyse des Zuckergehalts der Vakuole	91
3.1.7.7	Bestimmung der Thermotoleranz der Deletionsmutanten	91

3.1.7.8	Analyse des Trehalosegehalts von Wildtyp und Deletionsmutanten nach Hitzeschock	94
3.1.7.9	Vergleich des Trehalosegehalts des Cytosols und der Vakuolen von Wildtyp und Deletionsmutanten nach Hitzeschock	95
3.1.7.10	Suche nach genetischen Interaktionen	98
3.1.7.10.1	Genetische Interaktion mit <i>TPSI</i>	101
3.1.7.10.2	Genetische Interaktion mit <i>FPSI</i>	101
3.1.7.11	Deletion von Genen des Trehalosestoffwechsels in den Stämmen CFY03 und CEN.PK2-1C	103
3.1.7.11.1	Deletion der Gene der Trehalasen <i>ATH1</i> und <i>NTH1</i>	103
3.1.7.11.2	Deletion des Gens der Trehalose-6-Phosphat-Synthase <i>TPSI</i>	105
3.1.7.12	Analyse des Wachstumsverhaltens der Deletionsmutanten mit geringen Glucosemengen	110
3.1.7.13	Messung der Aufnahme radioaktiv markierter Substrate von isolierten vakuolären Vesikeln	111
3.1.7.14	Analyse des Phosphat- und Polyphosphatgehalts ganzer Zellen	113
3.2	Entwicklung eines genomweiten Screens zur Identifizierung bisher uncharakterisierter ER-Verpackungschaperone	116
3.2.1	Screen basierend auf dem Transkriptionsregulator Htr1 (Mth1)	116
3.2.2	Screen basierend auf hyperaktivem Ras2(V19)	117
3.2.3	Screen mittels einer konstitutiv aktiven Mutante des Glycerintransporters Fps1	119
3.2.4	Screen basierend auf dem Split-Ubiquitin-System	122
3.2.4.1	System mit myristoyliertem CubRUra3-Fusionsprotein	123
3.2.4.2	System mit myristoyliertem CubRHis3-Fusionsprotein	126
3.2.4.3	System mit Transkriptionsfaktor PLV	126
3.2.4.4	„Packaging Chaperone Screening Assay“(PCSA)	128
4	Diskussion	135
4.1	Charakterisierung der Mitglieder der Zuckertransporterfamilie Ybr241 und Ygl104	135
4.1.1	Die Gene <i>YBR241C</i> und <i>YGL104C</i> codieren für vakuoläre Membranproteine	135
4.1.2	Degradation ist nicht der Grund für die vakuoläre Lokalisation von Ybr241 und Ygl104	139

4.1.3	Ygl104 wird vermutlich über den Cpy-Weg zur Vakuole transportiert	141
4.1.4	Sekretion der sauren Trehalase Ath1	142
4.1.5	Wachstumsphänotypen der Deletionsmutanten	143
4.1.6	Suche nach Substraten der Proteine Ybr241 und Ygl104	144
4.1.7	Mögliche Funktionen von Ybr241 und Ygl104 im Trehalose-, Glycerin- oder Phosphatstoffwechsel	147
4.1.7.1	Eventuelle Rolle im Trehalosestoffwechsel	147
4.1.7.2	Eventuelle Rolle im Glycerin- oder Phosphatstoffwechsel	150
4.1.7.3	Mögliche Funktion von Ybr241 und Ygl104 beim Glycerintransport und vakuolärer Osmoregulation	156
4.1.8	Hypothetisches Modell der Funktion von Ybr241 und Ygl104	157
4.2	Entwicklung eines genomweiten Screens zur Identifizierung bisher uncharakterisierter ER-Verpackungschaperone	161
5	Zusammenfassung	165
6	Literatur	167

1 Einleitung

1.1 Transportproteine in *Saccharomyces cerevisiae*

Das Cytoplasma prokaryotischer und eukaryotischer Zellen ist durch die Plasmamembran nach außen begrenzt. Weitere, intrazelluläre Membranen sorgen für die Unterteilung der eukaryotischen Zelle in verschiedenartige Reaktions- und Speicherräume, wie zum Beispiel Vakuolen oder andere Zellorganellen. Diese einzelnen Kompartimente zeichnen sich durch sehr unterschiedliche chemische Milieus aus, wodurch optimale Bedingungen für den jeweiligen Stoffwechselprozeß geschaffen werden. Ferner können dadurch verschiedenste Prozesse in der Zelle parallel ablaufen. Um die Kommunikation der einzelnen Kompartimente miteinander zu ermöglichen, ist ein Stoffaustausch über die Membranen essentiell. Da Membranen allerdings nur für kleine ungeladene Moleküle permeabel sind, werden Transportprozesse nötig, die durch integrale Membranproteine vermittelt werden. Solche Transportproteine sorgen für den Stoffaustausch innerhalb der Zelle sowie für den Austausch mit der extrazellulären Umgebung.

Die Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist der erste eukaryotische Organismus, dessen komplettes Genom sequenziert wurde (Goffeau *et al.*, 1996; Johnston *et al.*, 1997). Obwohl heute schon die Genome vieler Eukaryoten sequenziert worden sind, machen die einfache genetische Manipulierbarkeit und die problemlose Kultivierung unter Laborbedingungen *S. cerevisiae* auch weiterhin zu einem idealen eukaryotischen Modellorganismus. Die umfassende Klassifizierung und funktionelle Zuordnung der im Genom codierten Proteine kann als Beispiel für andere Eukaryoten dienen. Das gilt auch für die Charakterisierung der Gesamtheit der Transportproteine. Computerunterstützte Analysen von Sequenzähnlichkeiten stellen ein hervorragendes Werkzeug dar, um diese Transporter in Familien und Unterfamilien einzugliedern und dadurch die Funktion bisher uncharakterisierter Transporter zu postulieren (Nelissen *et al.*, 1997; Paulsen *et al.*, 1998).

1.1.1 Transportproteine der „major facilitator superfamily“

Mit 78 putativen Mitgliedern ist die „major facilitator superfamily“ (MFS) die größte Familie von Transportproteinen der Hefe (Paulsen *et al.*, 1998). Die MFS wurde als Überfamilie von Transportproteinen definiert, die aus zwei strukturellen Einheiten von je sechs transmembran-spannenden, α -helikalen Segmenten bestehen, welche durch einen cytoplasmatischen Loop verbunden sind. Das resultierende Transportprotein hat eine Länge von 500 bis 600 Aminosäuren und insgesamt 12 Transmembran-Domänen. Die

MFS ist in Bakterien und Eukaryoten präsent und weist Uniporter, Symporter und Antiporter auf (Marger und Saier, 1993). Die zwei größten Unterfamilien der MFS in Hefe sind die Familie der Zuckertransporter-Homologen mit 34 Mitgliedern und die Familie der Aminosäuretransporter-Homologen, die aus 24 Proteinen besteht (Nelissen *et al.*, 1997).

1.1.2 Zuckertransport in *S. cerevisiae*

S. cerevisiae kann eine ganze Reihe verschiedener Zucker zu Ethanol und Kohlendioxid fermentieren. Da die hydrophilen Zuckermoleküle nicht frei durch biologische Membranen diffundieren können, sind spezifische Transportproteine notwendig, die den Transport über die Plasmamembran vermitteln. Der Transport der Hexosen Glucose, Fructose, Mannose und Galactose erfolgt passiv entlang eines Konzentrationsgradienten über den energieunabhängigen Mechanismus der erleichterten Diffusion (Kruckeberg, 1996). Disaccharide wie Maltose hingegen werden über Protonen-Symporter aufgenommen, die von einem elektrochemischen Protonengradienten abhängig sind (Lagunas, 1993). Anschließend wird Maltose intrazellulär durch die α -Glucosidase in zwei Moleküle Glucose hydrolysiert. Das Disaccharid Saccharose und das Trisaccharid Raffinose jedoch werden extrazellulär durch sekretierte Enzyme gespalten. Saccharose wird durch die Invertase, Raffinose mittels Invertase und α -Galactosidase hydrolysiert. Die bei der Spaltung entstandenen Monosaccharide werden im Anschluß in die Zelle transportiert (Barnett, 1976).

1.1.2.1 Die Familie der Zuckertransporter

Die Familie der Zuckertransporter setzt sich aus 34 Transportproteinen zusammen (Abb. 1.1), darunter die Hexosetransporter Hxt1 bis 17 und Gal2, außerdem die Glucosesensoren Snf3 und Rgt2 (Kruckeberg, 1996; Ozcan und Johnston, 1999). Die für das Wachstum mit Hexosen relevante Aufnahme von Glucose, Fructose oder Mannose erfolgt jedoch nur über die Transporter Hxt1 bis Hxt4, Hxt6 und Hxt7. Durch Deletion der entsprechenden Gene verliert die Hefezelle die Fähigkeit zum Wachstum mit Hexosen als Kohlenstoffquelle (Reifenberger *et al.*, 1995), was allerdings abhängig vom Stammhintergrund ist (Wieczorke *et al.*, 1999). Die Transporter Hxt5, Hxt8 bis 11 und Hxt13 bis 17 sind für das Wachstum mit Hexosen unbedeutend, aber bei Überexpression in der Lage Hexosen zu transportieren. Bei *HXT12* handelt es sich um ein Pseudogen (Wieczorke *et al.*, 1999). Der Hexosetransporter Gal2 dient zum Transport von Galactose, kann aber auch Glucose transportieren (Reifenberger *et al.*, 1997). Snf3 und Rgt2 sind nicht in der Lage Hexosen zu transportieren und fungieren als Glucosesensoren (Ozcan *et al.*, 1998).

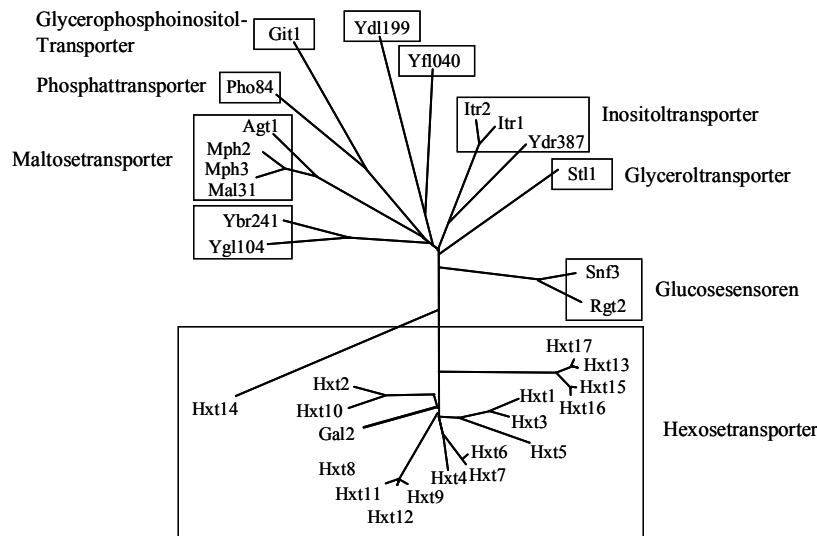


Abb. 1.1: Stammbaum der Zuckertransporterfamilie modifiziert nach Nelissen *et al.* (1997). Der Stammbaum illustriert den Verwandtschaftsgrad zwischen den 34 Zuckertransporter-Homologen.

Weitere Mitglieder der Zuckertransporterfamilie sind die Maltosetransporter Mal31, Mph2, Mph3 und Agt1, wobei das Gen *MAL31* für einen hochaffinen Maltosetransporter (Chow *et al.*, 1989) codiert. Die identischen Proteine Mph1 und Mph2 sind α -Glucosidtransporter, die Maltose, Maltotriose, α -Methylglucosid und Turanose transportieren können (Day *et al.*, 2002). Agt1 ist ein Transporter mit einem breiten Substratspektrum an α -Glucosiden. Er kann neben Maltose auch Isomaltose, α -Methylglucosid, Maltotriose, Palatinose, Melezitose und Trehalose befördern (Han *et al.*, 1995). Bei den Maltosetransportern handelt es sich um Symporter, die α -Glucoside zusammen mit Protonen transportieren.

Der Zuckertransporterfamilie wurden auch die Inositoltransporter Itr1, Itr2 und Ydr387 zugeordnet. Itr1 und Itr2 transportieren myo-Inositol (Nikawa *et al.*, 1991). Der putative Transporter Ydr387 ist bisher nicht charakterisiert, zeigt allerdings eine hohe Sequenzhomologie zu Itr1 und Itr2. Des weiteren zählen zu der Familie der Zuckertransporter noch der Glycerophosphoinositol-Transporter Git1 (Patton-Vogt und Henry, 1998) und der hochaffine Phosphattransporter Pho84 (Bun-Ya *et al.*, 1991). Pho84 ist ein Protonen-Symporter, der neben anorganischem Phosphat auch Mangan befördern kann (Jensen *et al.*, 2003). Die Affinität zu Mangan ist jedoch gering. Ebenfalls in diese Familie eingeordnet wurde der Glycerin-Protonen-Symporter Stl1 (Ferreira *et al.*, 2005). Außerdem wurden noch weitere putative Transporter in die Zuckertransporterfamilie eingegliedert, deren Funktion bisher aber völlig unbekannt ist. Für diese Proteine codieren die Gene *YDL199C*, *YFL040W*, *YBR241C* und *YGL104C*.

1.1.2.2 Die uncharakterisierten Mitglieder der Zuckertransporterfamilie Ybr241 und Ygl104

Die Proteine Ybr241 und Ygl104 wurden aufgrund ihrer hohen Sequenzidentität von 47,4% in dasselbe Cluster innerhalb der Zuckertransporterfamilie eingeordnet, was nur aus diesen beiden Proteinen besteht (Nelissen *et al.*, 1997). Mit Ausnahme von Ybr241 und Ygl104 konnte bisher für kein anderes Protein unbekannter Funktion dieser Familie eine subzelluläre Lokalisation ermittelt werden. Alle bereits charakterisierten Proteine der Zuckertransporterfamilie konnten als Transporter der Plasmamembran identifiziert werden. Dagegen wurde die GFP-Fusion von Ybr241 in einem genomweiten Screen in der vakuolären Membran detektiert (Huh *et al.*, 2003), und der Transporter Ygl104 wurde im Proteom des Mitochondriums mittels Massenspektrometrie entdeckt (Sickmann *et al.*, 2003).

Über die Funktion dieser beiden putativen Zuckertransporter ist in der Literatur wenig beschrieben. Bei einer genomweiten Suche nach Genen, die Resistenz gegenüber dem Antimykotikum Fluconazol vermitteln, stellte sich heraus, daß die Expression von 44 Genen, darunter die von *YBR241C*, unter Einwirkung von Fluconazol hochreguliert ist (Kontoyiannis, 1999). Fluconazol inhibiert ein Schlüsselenzym der Biosynthese des Membranbestandteils Ergosterol (Vanden Bossche *et al.*, 1995). Des Weiteren wurde durch eine Untersuchung der Sammlung der Deletionsmutanten auf Mutanten, die Carboxypeptidase Y (CPY) sekretieren, unter 146 anderen die Deletionsmutante des Gens *YGL104C* identifiziert (Bonangelino *et al.*, 2002). Mutanten, die eine Fehlsortierung von CPY aufweisen, sind vorwiegend an der Sortierung vakuolärer Proteine („vacuolar protein sorting“, vps) beteiligt. Daher wird das Protein Ygl104 auch als Vps73 bezeichnet. Weitere Hinweise auf eine vakuoläre Funktion von Ygl104 kamen aus einer Studie über die Protein-Phosphatase-2C-Familie der Hefe (Gonzalez *et al.*, 2006). Die Deletionsmutanten des Gens der Phosphatase Ptc1 zeigten fragmentierte Vakuolen, Sensitivität gegenüber Bedingungen, die die Zellwand schädigen, außerdem Sensitivität gegenüber hohen Calcium-Konzentrationen und alkalischem pH-Wert. Diese Eigenschaften weisen oft Mutanten mit fehlerhafter vakuolärer Funktion auf. Das Ergebnis eines Multicopy-Suppressor-Screens war, daß die Überexpression des Gen *VPS73* diese Phänotypen der *ptc1*-Mutante aufheben konnte.

Überdies weist der in der Membran des Golgi-Apparates von *Arabidopsis thaliana* lokalisierte Hexosetransporter SGB1 eine Sequenzähnlichkeit zu Ybr241 und Ygl104 auf. Die Sequenz von SGB1 zeigte 28% Identität zu der von Ybr241 (Wang *et al.*, 2006).

Zudem konnte für die Aminosäuresequenz des Proteins Ygl104 eine Identität von 40% zu der des Zuckertransporters GpMST1 des symbiotischen Pilzes *Geosiphon pyriformis* festgestellt werden. Dieser Transporter hat die höchste Affinität zu Glucose, kann aber auch Mannose, Galactose und Fructose befördern (Schussler *et al.*, 2006).

Die beschriebenen Hinweise aus der Literatur deuten zum Teil auf eine vakuoläre Lokalisation und auch vakuoläre Funktion von Ybr241 und Ygl104 hin. Eine tatsächliche Lokalisation von Vps73 im Mitochondrium (Sickmann *et al.*, 2003) wäre überraschend, da Transporter der „mitochondrial carrier family“ (MCF) eine andere Struktur haben. Sie zeichnen sich beispielsweise durch sechs Transmembran-Domänen aus (Kuan und Saier, 1993).

1.2 Die Vakuole

Vakuolen sind die größten Organellen der Hefe *S. cerevisiae*, sie nehmen ca. 25% des gesamten Zellvolumens ein und sind in viele verschiedene physiologische Prozesse verwickelt. Die Hefevakuole wird oft als Analog zum Lysosom der höheren Eukaryoten beschrieben, da Lysosomen und Vakuolen Kompartimente mit saurem pH-Wert sind, die eine Vielzahl hydrolytischer Enzyme enthalten (Achstetter und Wolf, 1985). Eine Hauptfunktion der Vakuolen liegt wie bei den Lysosomen in der Degradation von Proteinen, beispielsweise findet unter Hungerbedingungen etwa 85% des Gesamtproteinabbaus in der Vakuole statt (Thumm, 2000). Besonders Membranproteine werden in der Vakuole abgebaut. Sie werden ubiquitiniert, mittels Endocytose internalisiert, dann über den MVB („multivesicular body“) zum Lumen der Vakuole transportiert und dort degradiert (Hicke, 1997; Prescianotto-Baschong und Riezman, 1998).

Außerdem könnte die Vakuole eine Rolle in der Anpassung an verschiedene osmotische Bedingungen spielen (Hohmann, 2002). In Pflanzen fungiert die Vakuole als Wasserreservoir, und der Tonoplast ist aufgrund einer Reihe verschiedener Wasserkanäle für Wasser höchst permeabel (Maurel und Chrispeels, 2001). Allerdings scheint die viel kleinere Hefevakuole nicht die gleiche Funktion zu übernehmen, und die vakuoläre Membran ist auch nicht spezifisch für Wasser permeabel (Coury *et al.*, 1999). Jedoch sind viele Mutanten mit geänderter vakuolärer Morphologie oder mit Defekten in der Sortierung vakuolärer Proteine sensitiv gegenüber osmotischem Streß (Latterich und Watson, 1993). Andererseits muß sich auch die Vakuole selbst an sich ändernde osmotische Bedingungen anpassen. Damit die Vakuole ihre Form aufrechterhalten kann,

weist sie wahrscheinlich einen etwas höheren Turgor als das umgebende Cytosol auf. Nach osmotischem Schock schrumpft die Vakuole, erholt sich aber auch wieder (Nass und Rao, 1999). Somit scheint eine aktive Osmoregulation stattzufinden, wozu das Protein Nhx1 benötigt wird. Nhx1 ist ein endosomales Na^+/H^+ -Austauschprotein, das vermutlich die Konzentration von Na^+ -Ionen im vakuolären Lumen erhöht und so zur Osmoregulation beiträgt (Nass und Rao, 1999).

Des Weiteren ist die Vakuole wichtig für die Regulation der cytosolischen pH- und Ionenhomöostase (Klionsky *et al.*, 1990), für Entgiftungsprozesse (Petrovic *et al.*, 2000) und fungiert als Speicherkompartiment für eine Vielzahl verschiedenartiger Metabolite, wie zum Beispiel Metallionen (Raguzzi *et al.*, 1988; Ramsay und Gadd, 1997), Aminosäuren (Kitamoto *et al.*, 1988), Polyamine (Kakinuma *et al.*, 1992), Phosphat (Okorokov *et al.*, 1980) und Polyphosphat (Urech *et al.*, 1978). Der Transport dieser Komponenten in das Lumen der Vakuole wird über eine ganze Reihe von Transportsystemen vermittelt, von denen schon einige bekannt sind.

1.2.1 Transportproteine der Vakuole

Zu den bereits identifizierten Transportsystemen in der vakuolären Membran gehören vakuoläre Aminosäure-, Polyamin- und Ionenporter. Diese Transportproteine kontrollieren den vakuolären Pool der entsprechenden Substanzen in der Zellhomöostase. Weitere Transportsysteme sind an zellulären Entgiftungsprozessen beteiligt.

Der Großteil der basischen Aminosäuren Arginin, Histidin und Lysin befindet sich in der Vakuole (Kitamoto *et al.*, 1988). Auch die aktive Aufnahme dieser Aminosäuren in vakuoläre Vesikel konnte nachgewiesen werden. Außerdem wurde noch die Aufnahme von Tyrosin, Isoleucin, Glutamin, Tryptophan, Phenylalanin, Leucin und Asparagin gemessen (Sato *et al.*, 1984). Es stellte sich heraus, daß das Protein Avt1 für den Import von Glutamin, Isoleucin und Tyrosin in die Vakuole verantwortlich ist (Rusnak *et al.*, 2001). Ferner wird die Aufnahme von Histidin, Lysin und Arginin durch die Transporter Vba1 bis 3 vermittelt (Shimazu *et al.*, 2005), die zur MFS gehören. Die Transporter Avt3, Avt4 und Avt6 hingegen sind am Aminosäure-Efflux beteiligt, wobei Avt6 Aspartat und Glutamat exportiert (Rusnak *et al.*, 2001). Alle diese Transportprozesse sind an einen Protonengradienten gekoppelt, der von der vakuolären ATPase erzeugt wird.

Auch der Polyamingehalt des Cytoplasmas wird von Transportproteinen in der vakuolären Membran reguliert. Es konnten die Transporter Tpo1 bis 4 identifiziert werden, die Mitglieder der MFS sind. Tpo1 und Tpo4 erkennen Putrescin, Spermidin und Spermin, wobei Tpo2 und Tpo3 spezifisch für Spermin sind (Tomitori *et al.*, 2001; Tomitori *et al.*,

1999). Ein weiterer Polyamintransporter ist Uga4, der die Aufnahme von GABA und Putrescin vermittelt (Uemura *et al.*, 2004).

Für die Anreicherung von Calcium-Ionen im Vakuolenlumen sind die Ca^{2+} -ATPase Pmc1 (Cunningham und Fink, 1994) und der Calcium-Protonen-Antiporter Vcx1 (Pozos *et al.*, 1996) verantwortlich. Außerdem wurden die Zinktransporter Cot1 und Zrc1 (MacDiarmid *et al.*, 2000) entdeckt, die Zinkionen vom Cytosol in die als Zinkspeicher dienende Vakuole importieren. Diese Proteine können auch Cobaltionen transportieren. Dagegen exportiert das Protein Zrt3 Zinkionen bei Zinkmangel aus der Vakuole. Ferner dient die Vakuole als Speicherorganell für Eisen, und auch die vermittelnden Transporter Fth1 (Urbanowski und Piper, 1999) und Ccc1 (Li *et al.*, 2001) konnten beschrieben werden. Die Mobilisierung vakuolärer Kupfervorräte geschieht mittels Ctr2, einem in der vakuolären Membran lokalisierten Kupfertransporter (Rees *et al.*, 2004).

Die vakuolären ABC-Transporter Ycf1 (Li *et al.*, 1996) und Bpt1 (Sharma *et al.*, 2002) sind an der Entgiftung von Schwermetallionen über Glutathionkonjugate beteiligt. Das Protein Ybt1 spielt beim vakuolären Transport von Gallensäuren eine Rolle (Ortiz *et al.*, 1997), die beim Abbau von Steroiden entstehen.

In der Hefe *S. cerevisiae* konnten bisher keine in der vakuolären Membran lokalisierten Zuckertransporter charakterisiert werden. Erste Hinweise auf deren Existenz kommen von einer genomweiten GFP-Studie (Huh *et al.*, 2003), die das Mitglied der Zuckertransporterfamilie Ybr241 in der vakuolären Membran plazierte. Zusätzliche Anhaltspunkte brachten Untersuchungen, die zeigten, daß Ygl104, ein weiteres Protein der Zuckertransporterfamilie, in unbekannter Weise mit der Funktion der Vakuole assoziiert ist (Bonangelino *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2006). Dagegen sind in Pflanzen schon eine ganze Reihe vakuolärer Zuckertransporter bekannt. Viele Pflanzen speichern Zucker wie Glucose oder Saccharose in der Vakuole (Thom *et al.*, 1982). Dementsprechend konnten auch vakuoläre Glucosetransporter sowie Saccharosetransporter aus *A. thaliana* identifiziert werden (Endler *et al.*, 2006), darunter der vakuoläre Glucosetransporter AtVGT1, der auch zur MFS gehört (Aluri und Buttner, 2007). Im Gegensatz zu Pflanzen ist von Hefen nicht bekannt, daß sie Zucker in der Vakuole speichern. Hefezellen produzieren als Speicherkohlenwasserstoffe überwiegend Glycogen und Trehalose und akkumulieren diese Substanzen im Cytosol (Keller *et al.*, 1982; Lillie und Pringle, 1980).

1.3 Trehalose

Das nicht-reduzierende Disaccharid Trehalose besteht aus zwei Glucosemolekülen, die über eine α,α -1,1-glycosidische Bindung verknüpft sind. In der Natur kommt Trehalose in vielen Organismen vor und spielt eine wichtige Rolle als Energiequelle und als Streßschutzmolekül. In Hefezellen wird Trehalose als Speicherkohlenhydrat in der stationären Phase oder beim Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen gebildet. Eine weitere Funktion liegt aber auch im Schutz vor möglichen zellulären Streßsituationen (Abb. 1.2) wie Hitze, Frost, Austrocknung, osmotischem und oxidativem Streß (Elbein *et al.*, 2003). Des Weiteren scheint das Zwischenprodukt der Trehalosesynthese Trehalose-6-Phosphat (T6P) als wichtiger metabolischer Regulator zu fungieren (Gancedo und Flores, 2004).

1.3.1 Synthese und Abbau von Trehalose

Trehalose wird vom Trehalosesynthase-Komplex produziert (Abb. 1.2). Um T6P zu erhalten, wird ein Glucosylrest von Uridin-Diphospho-Glucose (UDP-Glucose) durch das Enzym Tps1 (Trehalose-6-Phosphat-Synthase) auf Glucose-6-Phosphat übertragen (Cabib und Leloir, 1958; Vuorio *et al.*, 1993). T6P wird dann über Tps2 (Trehalose-6-Phosphatase) zu Trehalose dephosphoryliert (De Virgilio *et al.*, 1993). Weitere Komponenten des Trehalosesynthase-Komplexes sind Tsl1 (Vuorio *et al.*, 1993) und Tps3 (Thevelein und Hohmann, 1995), die allerdings keine katalytische Aktivität besitzen. Diese Komponenten stabilisieren den Komplex und scheinen eine regulatorische Funktion zu haben (Bell *et al.*, 1998).

Auf der anderen Seite sind zwei Enzyme bekannt, die Trehalose zu Glucose hydrolysieren (Londesborough und Varimo, 1984). Die neutrale Trehalase Nth1 mit einem pH-Optimum von 7 ist im Cytosol lokalisiert und für die intrazelluläre Mobilisation von Trehalose verantwortlich (App und Holzer, 1989; Kopp *et al.*, 1993; Nwaka *et al.*, 1995a). Dagegen ist die saure Trehalase Ath1 für das Wachstum mit Trehalose als Kohlenstoffquelle essentiell (Nwaka *et al.*, 1996). Zu Beginn dieser Arbeit wurde von einer vakuolären Lokalisation von Ath1 ausgegangen (Keller *et al.*, 1982). Die maximale Aktivität zeigt Ath1 bei einem pH-Wert von 4,5 (Mittenbuhler und Holzer, 1988). Es existiert noch eine dritte, putative Trehalase, die vom Gen *NTH2* codiert wird, was ein Homolog des Gens *NTH1* ist. Jedoch konnte keine Trehalaseaktivität des Genprodukts Nth2 gemessen werden (Nwaka *et al.*, 1995a).

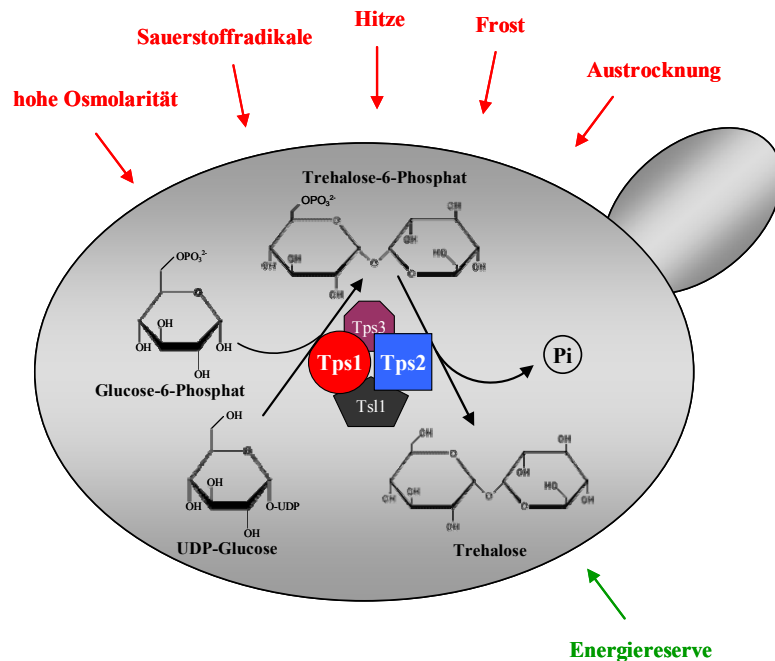


Abb. 1.2: Synthese von Trehalose. Als Reservekohlenhydrat sowie als Antwort auf verschiedenste zelluläre Stresssituationen wird Trehalose vom Trehalosesynthase-Komplex (Tps1, Tps2, Tps3, Tsl1) produziert (Elbein *et al.*, 2003).

1.3.2 Der Phänotyp von *tps1*-Mutanten

Die Mutation des Gens *TPS1* beeinflusst den Glucose-Metabolismus. Entsprechende Mutanten weisen einen Wachstumsdefekt mit Glucose und Fructose als Kohlenstoffquelle auf, wachsen aber mit Galactose. Da die katabolischen Schritte nach der Bildung von Glucose-6-phosphat durch die Hexokinase für beide Zucker identisch sind, ist es wahrscheinlich, daß der Wachstumsdefekt entweder mit dem Glucosetransport, dem Hexokinase-katalysierten Schritt der Glycolyse oder dem „glucose sensing“ in Verbindung steht (Gancedo und Flores, 2004). Blazquez *et al.* (1993) zeigten, daß T6P die Hexokinasen der Hefe kompetitiv inhibieren kann. Die Hexokinase II, die während des Wachstums mit Glucose präsent ist, weist die höhere Sensitivität auf. Diese verminderte Inhibition in *tps1*-Mutanten könnte der Grund für den Wachstumsdefekt auf Glucosemedium sein, da durch die nicht inhibierte Hexokinase ein stark erhöhter ATP-Verbrauch verursacht würde, der die Regenerationskapazität für ATP später in der Glycolyse überstiege. Dementsprechend zeigen *tps1*-Mutanten eine starke Akkumulation von Hexosephosphaten und eine Verminderung des ATP-Gehalts (Navon *et al.*, 1979; van de Poll *et al.*, 1974). Der Vorschlag der Autoren war, daß T6P in Hefe eine Rolle als Feedback-Inhibitor spielt, genau wie Glucose-6-Phosphat in höheren Organismen (Blazquez *et al.*, 1993). Doch wie soll T6P, das durch den Trehalosesynthase-Komplex

geschleust wird, im Cytoplasma eine ausreichend hohe Konzentration erreichen, um die Hexokinase zu inhibieren. Außerdem ist die Inhibition der Hexokinase durch T6P kompetitiv mit Glucose, und die intrazelluläre Glucosekonzentration ist wesentlich höher als die an T6P. Daher wurden zwei andere Hypothesen entwickelt (Thevelein und Hohmann, 1995): 1) Der Trehalose-Biosyntheseweg könnte eine zusätzliche Funktion in der Regeneration von Phosphat haben, was in der Glycolyse beim Schritt der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase benötigt wird. Aufgrund der *tps1*-Mutation wird kein T6P produziert, somit findet auch keine Regeneration von Phosphat durch die T6P-Phosphatase statt. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese zeigen *tps1*-Mutanten nach Glucose-Zugabe eine geringere Phosphat-Konzentration als der Wildtyp (Navon *et al.*, 1979). 2) Das Tps1-Protein an sich könnte als Teil eines hypothetischen „glucose sensing“-Komplexes eine Rolle bei der Inhibition des glycolytischen Flusses spielen. Dieser Komplex würde aus Tps1, der Hexokinase und dem Glucosetransporter bestehen. In einem solchen Komplex würde T6P sofort die Hexokinase erreichen und könnte mit höherer Effizienz agieren. Jedoch gibt es keinerlei experimentelle Daten, die diese Hypothese bestätigen (Gancedo und Flores, 2004).

1.3.3 Trehalose als Streßschutzmolekül

Besonders in der zellulären Reaktion auf Hitzestress spielt Trehalose in *S. cerevisiae* eine entscheidende Rolle. Stimuli, die die Hitzeschockantwort auslösen, führen auch zu einer verstärkten Expression der Gene des Trehalosesynthase-Komplexes (Winderickx *et al.*, 1996). Somit können nicht-letale Hitzebehandlungen eine intrazelluläre Akkumulation von Trehalose in Konzentrationen von bis zu 0,5 M bewirken (Wiemken, 1990). Hingegen zeigen Deletionsmutanten der Schlüsselenzyme (*TPS1*, *TPS2*) des Trehalose-Metabolismus eine verminderte Thermotoleranz, da sie keine Trehalose mehr synthetisieren können (De Virgilio *et al.*, 1994). Die Erklärung dafür ist, daß Trehalosemoleküle Membranen und Proteine bei hoher Temperatur stabilisieren (Hottiger *et al.*, 1994). Außerdem verhindert Trehalose die Aggregation denaturierter Proteine. Die Proteine werden in einem partiell gefalteten Zustand gehalten, aus dem sie mit Hilfe molekularer Chaperone leicht in die aktiven Konformation überführt werden können. Jedoch behindert eine andauernde, hohe Konzentration an Trehalosemolekülen den Renaturierungsprozeß. Deshalb müssen diese schnell nach Hitzeschock hydrolysiert werden (Singer und Lindquist, 1998), was die essentielle Rolle der Trehalase Nth1 in der Erholungsphase nach Hitzestress erklärt (Nwaka *et al.*, 1995a). Ein weiterer Faktor, der den schnellen Abbau der Trehalose nötig macht, ist, daß hohe Trehalosekonzentrationen die

Funktion von Enzymen inhibieren, was für die cytosolischen Enzyme Glutathion-Reduktase, Pyrophosphatase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase gezeigt werden konnte (Sebolla *et al.*, 2004).

Des Weiteren ist die Akkumulation von Trehalosemolekülen in Hefezellen auch für das Überdauern von Frost essentiell. Zellen mit einer hohen intrazellulären Trehalosekonzentration sind toleranter gegenüber Temperaturen von 0°C und darunter, wogegen Zellen ohne Trehalose wesentlich schneller unter solchen Bedingungen sterben (Lewis *et al.*, 1995). Daher findet eine adaptive Antwort auf Kältestreß statt, die Zellen toleranter gegenüber niedrigen Temperaturen und Einfrieren macht. Bei Temperaturen unter 10°C wird diese Antwort aktiviert und induziert die Expression der Gene Trehalose-synthetisierender Enzyme (*TPS1*, *TPS2*), was folglich zur Akkumulation von Trehalose führt (Kandror *et al.*, 2004).

Überdies soll die Menge an intrazellulärer Trehalose direkt mit der Resistenz der Hefezellen gegenüber Austrocknung korrelieren (Hottiger *et al.*, 1987). Eine aktuelle Studie konnte dies allerdings nicht bestätigen (Ratnakumar und Tunnacliffe, 2006).

Weiterhin konnte eine direkte Beziehung zwischen intrazellulären Trehalosekonzentrationen und der Fähigkeit der Hefezellen, schweren osmotischen Streß zu überstehen, aufgedeckt werden. Somit scheint Trehalose wie Glycerin als kompatibles Solut zu fungieren, wobei Glycerin bei der Adaptation an moderaten osmotischen Streß eine Rolle spielt (Hounsa *et al.*, 1998).

Außerdem wirkt Trehalose als Schutz der Zellen vor Sauerstoffradikalen. Eine Studie zeigte, daß Mutanten, die keine Trehalose synthetisieren können, wesentlich empfindlicher gegenüber der toxischen Wirkung von Sauerstoffradikalen sind. Der Zusatz von Trehalose ins Medium hingegen konnte die Resistenz dieser Mutante erhöhen. Die Schlußfolgerung daraus war, daß Trehalose als Radikalfänger wirkt (Benaroudj *et al.*, 2001).

Trehalose ist ein multifunktionelles Molekül, das unter einer ganzen Reihe von verschiedenartigen Streßbedingungen eine essentielle Rolle spielt. Die Funktion als „chemisches Chaperon“ ist unumstritten, jedoch sind weder alle Zusammenhänge noch die Wirkungsweise im Detail entschlüsselt.

1.4 Subzelluläre Sortierung von Proteinen

Jedes Kompartiment innerhalb der eukaryotischen Zelle weist einen charakteristischen Satz residenter Proteine auf. Während der Sortierung über den sekretorischen Weg müssen die entsprechenden Proteine dem spezifischen Kompartiment zugeordnet werden. Der

Transport dieser Proteine von einem Kompartiment zum nächsten erfolgt über Transportvesikel, die sich von der Ausgangsmembran durch Knospung abschnüren und mit der Zielmembran fusionieren. Es wurden Clathrin-, COPI- und COPII-Vesikel identifiziert. Diese drei Arten von Vesikeln unterscheiden sich in ihren Proteinhüllen und spielen in verschiedenen Transportwegen eine Rolle (Cosson und Letourneur, 1994; Pishvaei und Payne, 1998; Schmid, 1997).

Nach ihrer Synthese in die ER-Membran gelangen Membranproteine vom ER über COPII-Vesikel zum Golgi-Apparat. Dieser besteht aus den frühen (cis, medial) und den späten (trans, trans-Golgi-Netzwerk) Zisternen. Jede Zisterne ist eine transiente Struktur, die von der frühen zur späten Form reift. Dabei erwirbt und verliert die Zisterne im Laufe der Reifung spezifische Golgi-residente Proteine. Die Frachtproteine des sekretorischen Weges durchqueren den Golgi, indem sie in der reifenden Zisterne verbleiben (Losev *et al.*, 2006; Matsuura-Tokita *et al.*, 2006). Beinhaltet ein Protein ein ER-Rückhaltesignal, wird es über COPI-Vesikel zurück zum ER befördert (retrograder Transport), wenn nicht, verbleibt es in der Zisterne des Golgi-Apparates. Später im TGN trennen sich dann die Wege der vakuolären und der Plasmamembran-Proteine (Griffiths und Simons, 1986; Jackson *et al.*, 1990; Lemmon und Traub, 2000; Nilsson *et al.*, 1989).

1.4.1 Insertion der Proteine in die ER-Membran

Lösliche Proteine und Membranproteine, die entsprechende Signale enthalten, nehmen den sekretorischen Weg. Diese Proteine werden entweder durch die ER-Membran transloziert oder in diese integriert, was auf zwei unterschiedlichen, parallel ablaufenden Wegen geschehen kann. Der co-translationale Weg wird durch SRP („signal recognition particle“) und der post-translationale Weg wird durch den Sec63-Komplex vermittelt (Ng *et al.*, 1996). Beide Wege liefern Proteine zum ER-Membran-Translokon, das aus den Komponenten des Sec61-Komplexes (Sec61, Sbh1, Sss1) besteht (Esnault *et al.*, 1993; Esnault *et al.*, 1994; Panzner *et al.*, 1995).

1.4.2 Formierung von COPII-Vesikeln

Proteine werden vom ER mittels COPII-Vesikel zum Golgi-Apparat befördert. Die Proteinhülle der COPII-Vesikel besteht aus der GTPase Sar1, einem Heterodimer von Sec23 und Sec24 und einem Heterotetramer von Sec13 und Sec31, das sich aus zwei Molekülen jeder Untereinheit zusammensetzt (Barlowe *et al.*, 1994; Lederkremer *et al.*, 2001). Das Zusammenfügen der COPII-Vesikel (Abb. 1.3) beginnt mit dem Austausch des von Sar1 gebundenen GDP durch GTP mittels Sec12 (Barlowe und Schekman, 1993;

Nakano *et al.*, 1988; Oka *et al.*, 1991). Das G-Protein Sar1 liegt in der GDP-gebundenen Form frei im Cytosol vor. Nach Austausch des GDP gegen GTP (Bi *et al.*, 2002; Goldberg, 1998) wird eine N-terminale Ankersequenz freigesetzt, was die Bindung von Sar1 an die Membran ermöglicht. Diese Konformationsänderung erhöht die Affinität von Sar1 zum heterodimeren Sec23/Sec24-Komplex, wodurch die Bindung an den Komplex und damit die Bildung der inneren Hülle erfolgen kann (Bi *et al.*, 2002). So formiert sich der „pre-budding complex“, der Fracht und SNARE-Proteine inkorporiert. Anschließend wird die äußere Hülle durch das Sec13/Sec31-Heterotetramer ausgebildet, und die COPII-Vesikel schnüren sich vom ER ab (Matsuoka *et al.*, 2001). Eine weitere wichtige Rolle spielt das periphere ER-Membranprotein Sec16, das hilft, das Zusammenfügen der Vesikelhülle zu organisieren. Sec16 wird auch inkorporiert und kann ebenso wie das Sec12-Homologe Sed4 die GTPase-Aktivität von Sar1 entweder direkt oder über die Änderung der GAP- („GTPase activating protein“)-Aktivität von Sec23 negativ beeinflussen (Espenshade *et al.*, 1995; Gimeno *et al.*, 1995; Gimeno *et al.*, 1996; Saito-Nakano und Nakano, 2000; Shaywitz *et al.*, 1997). Das Sec16-Homolog aus Säugetieren ist an der Ausbildung der sogenannten ER „exit sites“, definierte Stellen von denen sich COPII-Vesikel abschnüren, beteiligt. In *S. cerevisiae* hingegen scheinen diese Stellen nicht so gut organisiert zu sein (Iinuma *et al.*, 2007). Durch die intrinsische GTPase-Aktivität von Sar1 wird das GTP nach der Knospung hydrolysiert, weshalb es zu einer Destabilisierung der Vesikelhülle kommt (Barlowe *et al.*, 1994). Die GTPase-Aktivität von Sar1 wird durch die GAP-Aktivität von Sec23 verstärkt (Yoshihisa *et al.*, 1993). Die relativ schwache GAP-Aktivität von Sec23 wiederum wird durch die Präsenz von Sec13 und Sec31 gesteigert (Antonny *et al.*, 2001). Das Abfallen der Vesikelhülle exponiert die v-SNARE-Proteine auf der Vesikeloberfläche. Somit wird ein Andocken der Vesikel an die Membran des Golgi-Apparates ermöglicht, die ihrerseits t-SNARE-Proteine enthält (Barlowe *et al.*, 1994; Lian und Ferro-Novick, 1993; Rexach *et al.*, 1994).

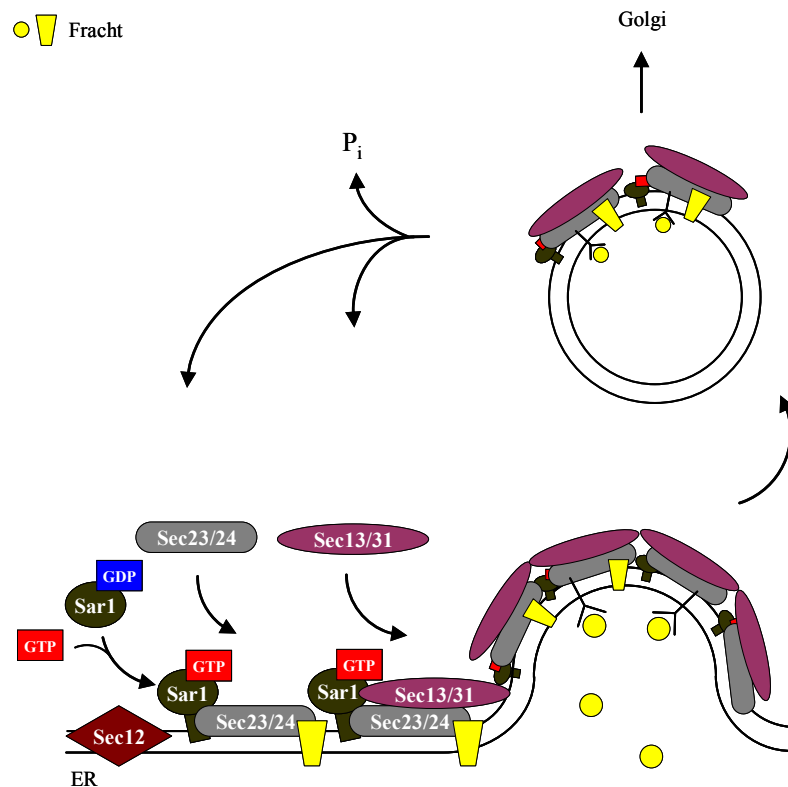


Abb. 1.3: Formierung von COPII-Vesikeln. Die Proteinhülle besteht aus Sar1, dem Sec23/24 Heterodimer und dem Sec13/31 Heterotetramer. Nach der Hydrolyse des GTP durch Sar1 fällt die Vesikelhülle ab und der Vesikel kann an die Golgi-Membran andocken.

1.4.3 ER-Verpackungschaperone

Die innere Hülle der COPII-Vesikel scheint direkt an der Sortierung der Fracht beteiligt zu sein. Demgemäß konnten auch eine ganze Reihe von Sortierungs-Signalen identifiziert werden, die ER-Export vermitteln. Es ist wahrscheinlich, daß diese Motive mit spezifischen Bindungsstellen von Sec24 interagieren (Miller *et al.*, 2003; Mossessova *et al.*, 2003). Infolgedessen muß das Beladen der Vesikel mit Fracht an deren Bildung gekoppelt sein. Allerdings gibt es Proteine, die nicht als Fracht erkannt werden, da sie Sortierungs-Signale besitzen, die nicht ohne die Assistenz von Hilfsproteinen identifiziert werden können. Abhängig davon, wie diese Proteine Assistenz vermitteln, werden sie in drei Kategorien eingeteilt: Outfitters, Escorts und Guides (Herrmann *et al.*, 1999). Outfitters und Escorts funktionieren in gleicher Weise. Diese Hilfsproteine halten die Substrate in einem Transport-kompetenten Status, in dem ihre Sortierungs-Signale exponiert sind. So können diese Signale von den Hüllkomponenten erkannt werden, beispielsweise von Sec24. Escorts begleiten ihre Fracht im Unterschied zu Outfitters auch auf dem Weg aus dem ER. Guides hingegen fungieren als Rezeptoren, die Proteine binden, die selbst keine von den Hüllkomponenten zu erkennenden Sortierungs-Signale aufweisen.

Viele Membranproteine benötigen solche Hilfsproteine, um in COPII-Vesikel verpackt zu werden. Falls diese Hilfsproteine mutiert oder deletiert sind, gelangen deren Substrate nicht in die COPII-Vesikel und akkumulieren im ER. Bezeichnet werden diese integralen Komponenten der ER-Membran als Verpackungschaperone, die jedoch keine signifikante Sequenz- oder Strukturhomologie zeigen (Nyman *et al.*, 2004).

Die ersten Hinweise auf die Existenz von Verpackungschaperonen kamen von einer Studie, die Aminosäure-Aufnahme in Hefe untersuchte. Mutationen in einem *SHR3*-genannten Gen verhinderten den Transport von Mitgliedern der Aminosäuretransporter-Familie vom ER zum Golgi-Apparat (Ljungdahl *et al.*, 1992). Das Produkt des Gens *SHR3* ist ein integrales ER-Membranprotein mit 4 Transmembran-Domänen und einem hydrophilen, cytoplasmatisch orientierten C-Terminus. Weitere Experimente machten deutlich, daß Shr3 für das Verpacken der Aminosäuretransporter in Vesikel benötigt wird (Kuehn *et al.*, 1996), wobei Shr3 selbst nicht mit in die Vesikel verpackt wird. Außerdem bindet Shr3 direkt an Gap1, Sec13, Sec24, Sec31, aber nicht an Sar1 (Gilstring *et al.*, 1999). Die Aminosäuretransporter Gap1 und Hip1 konnten in Abhängigkeit von Shr3 zusammen mit Sar1-Sec23/Sec24 „pre-budding“-Komplexen aufgereinigt werden. Diese Ergebnisse implizieren, daß Shr3 die Formierung der Vesikel in die Nachbarschaft der Aminosäuretransporter dirigiert (Gilstring *et al.*, 1999). Des weiteren verhindert Shr3 die Aggregation der Aminosäuretransporter, wodurch es ihnen ermöglicht wird, sich korrekt innerhalb der ER-Membran zu falten. Somit scheint Shr3 als in der Membran lokalisiertes Chaperon zu fungieren, das für die Faltung der Aminosäuretransporter in ihre native tertiäre Membrankonformation verantwortlich ist, welche Voraussetzung für das Verlassen des ER ist (Kota und Ljungdahl, 2005). Diese Chaperon-Aktivität konnte mit einem gespaltenen Gap1-Protein näher untersucht werden. Shr3 interagiert mit dem N-terminalen Fragment, das aus den Transmembrandomänen I-V besteht, und hält es in einer Konformation, die es befähigt, sich mit dem C-terminalen Fragment (Transmembrandomänen VI-XII) zu einem funktionellen Komplex zu vereinigen. Folglich scheint Shr3 früh während der Insertion der Aminosäuretransporter in die ER-Membran mit diesen zu interagieren (Kota *et al.*, 2007).

Weitere Verpackungschaperone wurden in der ER-Membran von Hefezellen identifiziert, aber deren Funktionsmechanismen konnten bisher noch nicht im Detail aufgeklärt werden. Der Phosphattransporter Pho84 benötigt das Protein Pho86, um in COPII-Vesikel verpackt zu werden. Pho86 weist zwei Transmembran-Domänen und einen cytoplasmatisch orientierten C-Terminus auf und wird wie Shr3 nicht mit in die COPII-

Vesikel verpackt (Lau *et al.*, 2000). Ferner ist das ER-Protein Chs7 für den Transport der katalytischen Untereinheit der Chitinsynthase III (Chs3) vom ER zum Golgi-Apparat verantwortlich, wobei Chs7 sieben putative Transmembran-Domänen besitzt (Trilla *et al.*, 1999). Das ER-Protein Gsf2 hat zwei Transmembran-Domänen (Hamacher, 2004) und ist für die Inkorporation der Hexosetransporter Hxt1, Hxt3 und Gal2 in COPII-Vesikel erforderlich (Sherwood und Carlson, 1999). Im Gegensatz zu anderen Verpackungschaperonen besitzt Gsf2 ein ER-Rückhaltemotiv und wird über COPI-Vesikel zum ER zurück transportiert (Ochmann und Boles, unveröffentlicht). Für Gsf2, Pho86 und Chs7 konnte wie für Shr3 gezeigt werden, daß in Abwesenheit dieser ER-Proteine deren Substrate Aggregate bilden (Kota und Ljungdahl, 2005).

1.4.4 Proteintransport vom späten Golgi zur Vakuole

Nach dem Durchlaufen der frühen Stufen des sekretorischen Weges werden die vakuolären Proteine im späten Golgi-Apparat von den Proteinen separiert, die zur Plasmamembran befördert werden sollen. Es konnten bisher mehr als 70 Proteine identifiziert werden, die in Transportprozesse vom Golgi zur Vakuole involviert sind. Eine Vielzahl von Untersuchungen im großen Maßstab wurde angewandt, um Mutanten mit Defekten in diesem Prozeß zu entdecken. Darunter fallen beispielsweise auch die *vps*- („vacuolar protein sorting“)-Mutanten, die lösliche Hydrolase CPY (Carboxypeptidase Y) sekretieren anstelle zur Vakuole zu transportieren. Die codierten Proteine spielen eine entscheidende Rolle bei der Sortierung vakuolärer Proteine.

Vom Golgi zur Vakuole sind zwei Transportrouten für vakuoläre Proteine beschrieben (Abb. 1.4). Der bestcharakterisierte Weg führt vom späten Golgi über den MVB („multivesicular body“), auch spätes Endosom oder prävakuoläres Kompartiment genannt, zur Vakuole. Diese Route ist nach der am besten untersuchten Fracht CPY benannt. Der zweite Weg führt am endosomalen Netzwerk vorbei zur Vakuole und wird nach der bekanntesten Fracht ALP (alkalische Phosphatase) als ALP-Weg bezeichnet (Bowers und Stevens, 2005; Bryant und Stevens, 1998).

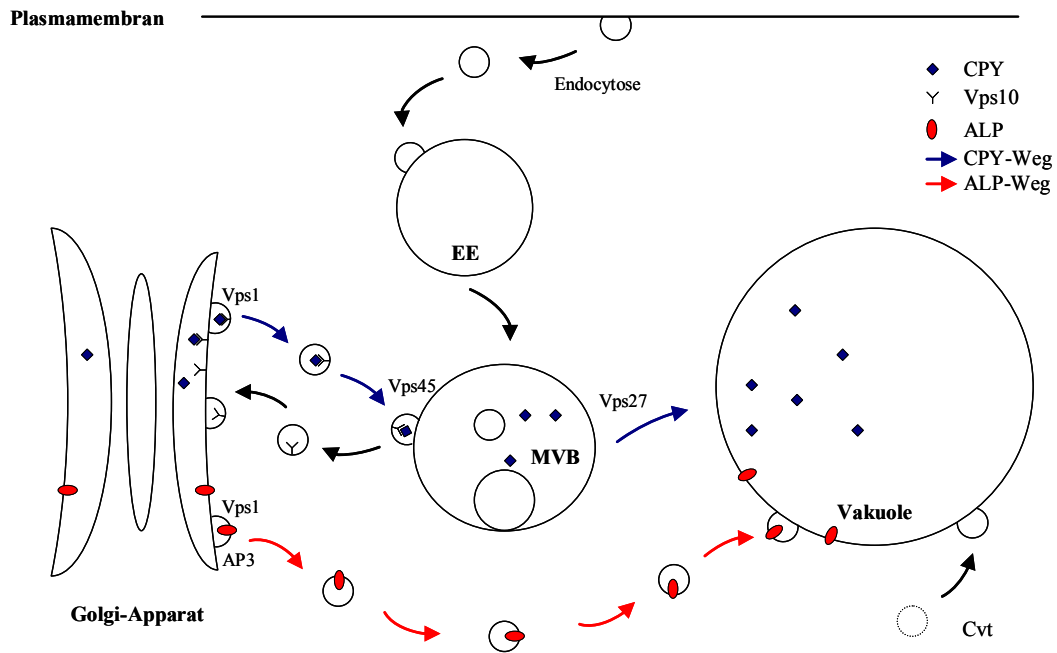


Abb. 1.4: Transportwege zur Vakuole. Proteine erreichen die Vakuole vom Golgi-Apparat aus über den CPY- oder den ALP-Weg. Im Gegensatz zum CPY-Weg werden die Proteine des ALP-Weges direkt zur Vakuole transportiert. Daneben gibt es noch die Möglichkeit für Proteine über Endocytose zur Vakuole zu gelangen oder aus dem Cytoplasma mittels Cvt importiert zu werden (Bowers und Stevens, 2005; Bryant und Stevens, 1998).

CPY wird als Vorstufe synthetisiert und durch die ER-Membran transportiert, gefolgt von der Abspaltung des Signalpeptids. Die resultierende Precursor-Form p1 (67 kDa) wird durch den Golgi geschleust und dort weiter zur p2-Form (69 kDa) modifiziert. Dann bindet die p2-Form an den spezifischen Rezeptor Vps10, und der CPY/Vps10-Komplex wird vom Golgi zum späten Endosom transportiert (Marcusson *et al.*, 1994). An diesem Schritt ist Clathrin und die Dynamin-verwandte GTPase Vps1 involviert, wobei Vps1 für die Abschnürung der Vesikel sorgt (Deloche *et al.*, 2001). Für die Fusion dieser Vesikel mit dem späten Endosom ist das Protein Vps45 essentiell (Conibear und Stevens, 1995). Bei Erreichen des Endosoms dissoziiert CPY von Vps10, und Vps10 wird über den retrograden Transportweg zum Golgi zurück befördert (Seaman *et al.*, 1997). CPY hingegen gelangt zur Vakuole und wird dort zur reifen Form prozessiert (61 kDa). Den Proteinverkehr aus dem späten Endosom kontrolliert Vps27 (Piper *et al.*, 1995).

Im Gegensatz zu CPY passiert das Membranprotein ALP, codiert vom Gen *PHO8*, nicht das späte Endosom. Das konnte anhand von Mutationen der Gene *VPS27*, *VPS4* und *VPS45* demonstriert werden, da ALP in Mutanten, bei denen diese Stufen des Vps-Weges.

blockiert sind, weiterhin zur Vakuole geliefert wird (Cowles *et al.*, 1997b; Piper *et al.*, 1997). Die Beobachtung, daß ALP mittels Vesikeln transportiert wird, die von Vps45 unabhängig sind, impliziert die Existenz einer zweiten Klasse von Transportvesikeln, die vakuoläre Fracht befördern. Wahrscheinlich ist Vps1 an der Bildung beider Klassen von Vesikeln beteiligt, da die Beförderung von ALP gleichermaßen wie die von CPY in einer *vps1*-Mutante betroffen ist (Nothwehr *et al.*, 1995).

Im Unterschied zu den Transportvesikeln im CPY-Weg benötigen die Vesikel des ALP-Weges kein Clathrin. Die Beförderung von ALP und Vam3, ein weiteres Frachtprotein des ALP-Weges, erfordert den AP3-Adapterkomplex (Cowles *et al.*, 1997a). Adapterproteine stellen Bindungsstellen in der Membran für Komponenten der Vesikelhülle zur Verfügung. Außerdem interagieren sie mit den Frachtproteinen, um diese spezifisch in Vesikel zu verpacken. Der AP3-Adapterkomplex setzt sich aus vier Proteinen zusammen: Apl6, Apl5, Apm3 und Aps3 (Panek *et al.*, 1997). Zusätzlich assoziiert noch das Protein Vps41 mit diesem Komplex und ist an der Formierung der AP3-Vesikel im späten Golgi beteiligt (Rehling *et al.*, 1999).

Proteine, die in den alternativen ALP-Weg eingeschleust werden, besitzen ein saures Di-Leucin-Sortierungs-Signal in ihren cytoplasmatischen Domänen, welches mit dem AP3-Adapter-Komplex interagiert. Dadurch werden die betreffenden Proteine erkannt und spezifisch in Transportvesikel verpackt (Darsow *et al.*, 1998; Vowels und Payne, 1998).

Neben dem Transport über die frühen Stufen des sekretorischen Weges und anschließend vom Golgi zur Vakuole, existieren noch alternative Routen, nämlich über Endocytose von der Plasmamembran zur Vakuole oder mittels direkter Aufnahme aus dem Cytoplasma („cytoplasm-to-vacuole targeting“, Cvt) (Bryant und Stevens, 1998).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im ersten Teil dieser Doktorarbeit sollten die Proteine Ybr241 und Ygl104 der Zuckertransporterfamilie näher charakterisiert werden. Neben der Aufklärung der subzellulären Lokalisation unter Anwendung verschiedener Methoden sollte die Funktion der Proteine im Zellmetabolismus analysiert werden. Das primäre Ziel war, die Substrate dieser putativen Transportproteine zu identifizieren.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte ein genomweiter Screen nach ER-Verpackungschaperonen entwickelt werden. Mit dessen Hilfe sollte es möglich werden, für diverse Plasmamembran-Proteine die spezifischen Verpackungschaperone zu ermitteln. Die Funktionalität verschiedener Ansätze sollte anhand schon bekannter Verpackungschaperone getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Bakterienstämme, Kultivierung und Medien

2.1.1 Bakterienstämme

Tab. 2.1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle
DH5 α F'	<i>F'</i> (Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15) Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>) <i>supE44 λ gyrA96 thi-1 relA1</i>	Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA
DH10B	<i>F'</i> , <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 <i>AlacX74 deoR recA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ rpsL end A1 nupG</i>	Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA
SURE	<i>e14</i> (<i>McrA</i> ⁻) Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>) 171 <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5</i> (<i>Kan^r</i>) <i>uvrC</i> [<i>F'</i> <i>proAB lacI^qZ</i> Δ M15 <i>Tn10</i> (<i>Tet^r</i>)] ^c	Stratagene, La Jolla, CA, USA
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [<i>F'</i> <i>proAB lacI^qZ</i> Δ M15 <i>Tn10</i> (<i>Tet^r</i>)]	Stratagene, La Jolla, CA, USA

2.1.2 Kultivierung von *Escherichia coli*-Stämmen

E. coli-Stämme (Tab. 2.1) wurden in flüssigem LB-Medium oder auf LB-Agarplatten (Tab. 2.2) im 37°C-Brutraum kultiviert. Nach Transformation der Bakterien mit Plasmiden wurde LB-Medium verwendet, das mit dem Antibiotikum Ampicillin versetzt war, um auf die plasmidcodierte Antibiotikaresistenz zu selektieren. Ampicillin wurde in einer Konzentration von 40 μ g/ml nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.1.3 Medien

Tab. 2.2: Medien zur Kultivierung von *E. coli*

Medium	Zusammensetzung	Referenz
Vollmedium (LB)	1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, pH 7,5	Maniatis , 1982
LB-Amp	zusätzlich 40 μ g/ml Ampicillin	
LB-Agarplatten	zusätzlich 1,8% Agar	

2.2 Hefestämme, Kultivierung und Medien

2.2.1 *S. cerevisiae*-Stämme

Tab. 2.3: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle, Referenz
CEN.PK2-1C	<i>MATa leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	Entian, Frankfurt
CEN.PK2-1D	<i>MATa leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	Entian, Frankfurt
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF, Frankfurt (Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
BY4742	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF, Frankfurt (Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
BY4743	<i>MATa/MATa his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0 /MET15 LYS2/lys2Δ0 ura3Δ0/ura3Δ0</i>	EUROSCARF, Frankfurt (Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
BY4741 (deletion strain collection)	<i>MATa xΔ::kanMX his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF, Frankfurt (Winzeler <i>et al.</i> , 1999)
FY1679-010	<i>MATa ura3-52; LEU2; TRP1; HIS3; GAL2</i>	EUROSCARF, Frankfurt (Winston <i>et al.</i> , 1995)
EBY.VW1000	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δmph2 Δmph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	(Wieczorke <i>et al.</i> , 1999)
EBY.VW4000	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	(Wieczorke <i>et al.</i> , 1999)
EBY.VW5000	<i>MATa snf3Δ::loxP rgt2Δ::loxP Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	(Wieczorke <i>et al.</i> , 1999)
4GS5-E-4 (=S288C Ybr241-TAP)	<i>MATa ybr241c-TAP-URA3 his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0</i>	Open Biosystems, Huntsville, AL, USA (Ghaemmaghami <i>et al.</i> , 2003)
THY.14	<i>MATa gsf2Δ::kanMX Δhxt1-17 Δgal2 stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	(Hamacher, 2004)
THY.15	<i>MATa gsf2Δ::kanMX leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	(Hamacher, 2004)
JBY01	<i>MATa ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2 Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 Aphxt3:pHXT7-HXT1</i>	(Buziol <i>et al.</i> , 2002)
JBY02	<i>MATa ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2 Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 Aphxt3:pHXT7-HXT7</i>	(Buziol <i>et al.</i> , 2002)

Stamm	Genotyp	Quelle, Referenz
DVY.09	<i>MATa rsp5ΔC2⁴¹⁴ Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Astl1 Amph2 Amph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-ΔI MAL2-8^C SUC2</i>	(Voss, 2005)
SKY39	<i>MATa end4A::loxP leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-ΔI MAL2-8^C SUC2</i>	(Krampe, 2001)
AÖY01	<i>MATa his3Δ0; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0 Δmet15::natMxLexA-URA3</i>	(Österreicher, 2006)
AÖY02	<i>MATa his3Δ0; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0 Δmet15::natMx LexA-URA3, Δhxt2::Hxt1CubPLVMet15</i>	(Österreicher, 2006)

Tab. 2.4: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Ausgangsstamm
CFY01	<i>MATa ybr241cΔ::loxP-lacZ leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-ΔI MAL2-8^C SUC2</i>	CEN.PK2-1C
CFY01HA	<i>MATa YBR241c-3xHA-kanMX leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-ΔI MAL2-8^C SUC2</i>	CEN.PK2-1C
CFY02	<i>MATa ygl104cΔ::loxP leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-ΔI MAL2-8^C SUC2</i>	CEN.PK2-1C
CFY02HA	<i>MATa YGL104c-3xHA-kanMX leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-ΔI MAL2-8^C SUC2</i>	CEN.PK2-1C
CFY02TAP	<i>MATa YGL104c-TAP-URA3 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-ΔI MAL2-8^C SUC2</i>	CEN.PK2-1C
CFY03	<i>MATa ybr241cΔ::loxP ygl104cΔ::loxP leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-ΔI MAL2-8^C SUC2</i>	CFY02
CFY04	<i>MATa ybr241cΔ::loxP Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Astl1 Amph2 Amph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-ΔI MAL2-8^C SUC2</i>	EBY.VW4000
CFY05	<i>MATa ygl104cΔ::loxP Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Astl1 Amph2 Amph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-ΔI MAL2-8^C SUC2</i>	EBY.VW4000
CFY06	<i>MATa ybr241cΔ::loxP ygl104cΔ::loxP Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Astl1 Amph2 Amph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-ΔI MAL2-8^C SUC2</i>	CFY05
CFY07	<i>MATa ath1Δ::kanMX Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Astl1 Amph2 Amph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-ΔI MAL2-8^C SUC2</i>	EBY.VW4000
CFY08	<i>MATa snf3Δ::kanMX ygl104cΔ::loxP Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Astl1 Amph2 Amph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-ΔI MAL2-8^C SUC2</i>	CFY05
CFY09	<i>MATa snf3Δ::kanMX ybr241cΔ::loxP ygl104cΔ::loxP Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Astl1 Amph2 Amph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-ΔI MAL2-8^C SUC2</i>	CFY06
CFY10	<i>MATa vps1Δ::kanMX Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Astl1 Amph2 Amph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-ΔI MAL2-8^C SUC2</i>	EBY.VW4000

Stamm	Genotyp	Ausgangsstamm
CFY11	<i>MATa apl5Δ::kanMX Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	EBY.VW4000
CFY12	<i>MATa ybr241cΔ::URA3-MFA1pHIS3 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	BY4742
CFY13	<i>MATa ygl104cΔ::LEU2MX his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	BY4742
CFY14	<i>MATa ygl104cΔ::LEU2MX ybr241cΔ::URA3-MFA1p HIS3 his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	CFY12
CFY15	<i>MATa gsf2Δ::loxP-kanMX his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	BY4741
CFY16	<i>MATa ybr241cΔ::natMX YGL104cΔ::LEU2MX his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	CFY13
CFY17	<i>MATa can1Δ::URA3-MFA1pHIS3 ybr241cΔ::natMX ygl104cΔ::LEU2MX his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	CFY16
CFY18	<i>MATa SHR3Δ::kanMX ura3Δ0</i>	FY1679-010
CFY19	<i>MATa can1::kanMX Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	EBY.VW4000
CFY20	<i>MATa ath1Δ::loxP leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	CEN.PK2-1C
CFY21	<i>MATa ath1Δ::loxP ybr241cΔ::loxP ygl104cΔ ::loxP leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	CFY03
CFY22	<i>MATa nth1Δ::loxP leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	CEN.PK2-1C
CFY23	<i>MATa nth1Δ::loxP ybr241cΔ::loxP ygl104cΔ ::loxP leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	CFY03
CFY24	<i>MATa tps1Δ::loxP leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	CEN.PK2-1C
CFY25	<i>MATa tps1Δ::loxP ybr241cΔ::loxP ygl104cΔ ::loxP leu2-3, 112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	CFY03
CFY26	<i>MATa tps1Δ::loxP Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	EBY.VW4000
CFY27	<i>MATa tps1Δ::loxP ybr241cΔ::loxP ygl104cΔ ::loxP Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	CFY06

2.2.2 Kultivierung von Hefestämmen

Hefezellen wurden bei 30°C im Brutraum in Flüssigmedien oder auf Agarplatten (Tab. 2.5) kultiviert. Hitzeschockexperimente wurden bei 35-40°C im Brutschrank durchgeführt.

2.2.3 Medien

Tab. 2.5: Medien zur Kultivierung von Hefestämmen

Medien	Zusammensetzung	Referenz
Vollmedium (YEP)	1% Hefeextrakt, 2% Bacto-Pepton, Kohlenstoffquelle in unten angegebener Konzentration	(Sherman, 1991)
Vollmedium G418	1% Hefeextrakt, 2% Bacto-Pepton, 200 mg/l Geneticin (G418), Kohlenstoffquelle in unten angegebener Konzentration	(Guldener <i>et al.</i> , 1996)
Synthetisches Kompletmedium (SC)	0,17% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate, 0,5% Ammoniumsulfat, Adenin (0,08 mM), Arginin (0,22 mM), Histidin (0,25 mM), Isoleucin (0,44 mM), Leucin (0,44 mM), Lysin (0,35 mM), Methionin (0,26 mM), Phenylalanin (0,29 mM), Tryptophan (0,19 mM), Threonin (0,48 mM), Tyrosin (0,34 mM), Uracil (0,44 mM), Valin (0,49 mM), Kohlenstoffquelle in unten angegebener Konzentration	(Wickersham, 1951) (Zimmermann, 1975)
Synthetisches Minimalmedium (SM)	0,17% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate, 0,5% Ammoniumsulfat	(Sherman, 1991)
SC FOA	siehe oben, 1mg/ml FOA (5-Fluoroorotic-Säure)	(Boeke <i>et al.</i> , 1984)
Selektivmedium	SC, nur ohne die entsprechende Aminosäure bzw. Uracil	
SC G418/clonNAT	SC, nur mit Glutaminsäure als Stickstoffquelle (1 g/l), 200 mg/l G418, 100 mg/l clonNAT	(Tong <i>et al.</i> , 2001)
Sporulationsmedium	2% Agar, 1% Kaliumacetat, 0,1% Hefeextrakt, 0,05% Glucose, Uracil (0,44 mM), Histidin (0,25 mM), Leucin (0,44 mM)	(Sherman, 1991)

Den in Tab. 2.5 beschriebenen Medien wurden Kohlenstoffquellen zugesetzt. Als Standardkohlenstoffquellen wurden Glucose (2%) oder Maltose (1%) verwendet, außerdem Fructose (2%), Mannose (2%), Trehalose (1%, 2%), Galactose (2%), Glycerin (2%), Raffinose (2%), Saccharose (2%) oder Ethanol (2%). Alle Kohlenstoffquellen bis auf Raffinose, Saccharose und Ethanol wurden im Medium gelöst. Anschließend wurde das komplette Medium autoklaviert. Raffinose und Saccharose wurden gelöst, dann sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren des Mediums zugesetzt. Auch Ethanol wurde nach dem Autoklavieren zugegeben. Feste Nährböden enthielten zusätzlich 1,8% Agar. Hefestämme, die Plasmide trugen, wurden in der Regel in synthetischem Kompletmedium ohne Zusatz der entsprechenden Markeramino-säure bzw. ohne Uracil herangezogen.

2.3 Plasmide

Tab. 2.6: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Quelle, Referenz	Beschreibung
YCplac33	(Gietz und Sugino, 1988)	CEN/ARS-Klonierungsvektor, <i>URA3</i> -Selektionsmarker
YCplac111	(Gietz und Sugino, 1988)	CEN/ARS-Klonierungsvektor, <i>LEU2</i> -Selektionsmarker
p426HXT7-6HIS	Becker und Boles, 2003	2 μ -Expressionsvektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit His ₆ -Epitop, <i>URA3</i> -Selektionsmarker, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor, <i>CYCI</i> -Terminator
p423MET25	(Mumberg <i>et al.</i> , 1994)	2 μ -Expressionsvektor, <i>HIS3</i> -Selektionsmarker, <i>MET25</i> -Promotor, <i>CYCI</i> -Terminator
p426MET25	(Mumberg <i>et al.</i> , 1994)	2 μ -Expressionsvektor, <i>URA3</i> -Selektionsmarker, <i>MET25</i> -Promotor, <i>CYCI</i> -Terminator
pYES2	Invitrogen	2 μ -Expressionsvektor, <i>URA3</i> -Selektionsmarker, <i>GALI</i> -Promotor, <i>CYCI</i> -Terminator
pYES-M-dpolya	(Aronheim <i>et al.</i> , 1994)	SRS-System
pCM189	(Gari <i>et al.</i> , 1997)	CEN/ARS-Expressionsvektor, <i>URA3</i> -Selektionsmarker, <i>tetO</i> -Promotor, codierende Sequenz des tTA-Transaktivators
BG1805	(Gelperin <i>et al.</i> , 2005)	yeast <i>ORF</i> collection (<i>YBR241C</i> , <i>YGL104C</i>)
pUG73	(Gueldener <i>et al.</i> , 2002)	Vorlage zur Amplifizierung der <i>loxP-LEU2-loxP</i> -Kassette zur Deletion von Genen
pAG25	(Goldstein und McCusker, 1999)	Vorlage zur Amplifizierung der <i>natMX</i> -Kassette zur Deletion von Genen
pUG6	(Guldener <i>et al.</i> , 1996)	Vorlage zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Kassette zur Deletion von Genen
pUG6-lacZ	(Buziol <i>et al.</i> , 2002)	Vorlage zur Amplifizierung der <i>lacZ-kanMX</i> -Kassette zur Deletion von Genen
pUG6-HA	(Boles <i>et al.</i> , 1998)	Vorlage zur Amplifizierung der <i>HA-kanMX</i> -Kassette zur genomischen Integration eines HA-Tags
pSH47	(Guldener <i>et al.</i> , 1996)	Cre-Rekombinase-Gen unter Kontrolle des <i>GALI</i> -Promotors, <i>URA3</i> -Selektionsmarker
pBS1539	(Rigaut <i>et al.</i> , 1999)	Vorlage zur Amplifizierung der <i>TAP-URA3</i> -Kassette zur genomischen Integration eines TAP-Tags
pRS416-MFA1pHIS3	Buchhaupt, Frankfurt	CEN/ARS-Vektor, <i>HIS3</i> unter Kontrolle des <i>MFA1</i> -Promotors, <i>URA3</i> -Selektionsmarker
pCPLV	te Heesen, Zürich	2 μ -Expressionsvektor zur konstitutiven Expression des Fusionsproteins Cub-PLV, <i>ADHI</i> -Promotor und -Terminator, <i>LEU2</i> -Selektionsmarker

Plasmid	Quelle, Referenz	Beschreibung
pNubwt	(Obrdlik <i>et al.</i> , 2004)	2 μ -Expressionsplasmid zur konstitutiven Expression des N _{ubwt} -Proteins, <i>ADHI</i> -Promotor und -Terminator, <i>TRP1</i> - Selektionsmarker
pNubwt-Hxt1	(Hippe, 2003)	Expression der <i>Nubwt-HXT1</i> -Fusion, <i>TRP1</i> - Selektionsmarker
pMyrCubRURA3	(Hippe, 2003)	2 μ -Plasmid, <i>MyrCubRURA3</i> unter Kontrolle des <i>CUP</i> - Promotors, <i>HIS3</i> -Selektionsmarker
pMET25HXT1CPLV	(Österreicher, 2006)	<i>HXT1-B2-CPLV</i> -Fusion unter Kontrolle des <i>MET25</i> - Promotors, <i>LEU2</i> -Selektionsmarker
YCpMET25Nubwt	(Österreicher, 2006)	N _{ubwt} unter Kontrolle des <i>MET25</i> -Promotors, <i>LEU2</i> - Selektionsmarker
pHTR1-23	(Schulte <i>et al.</i> , 2000)	dominantes Allel <i>HTR1-23</i> , <i>URA3</i> -Selektionsmarker
YCp50RAS2V19	Boles, Frankfurt	dominantes Allel <i>RAS2(V19)</i> , <i>URA3</i> -Selektionsmarker

Tab. 2.7: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Ausgangsvektor	Beschreibung
p426HXT7-HISYBR241	p426HXT7-6HIS	Überexpression von <i>6xHisYBR241C</i>
p426HXT7-HISYGL104	p426HXT7-6HIS	Überexpression von <i>6xHisYGL104C</i>
pGAL1-HISYBR241C	pYES2	Überexpression von <i>6xHisYBR241C</i>
pGAL1-HISYGL104C	pYES2	Überexpression von <i>6xHisYGL104C</i>
pGAL1-YBR241-GFP	pYES2	Überexpression von <i>YBR241CyEGFP</i>
pGAL1-YGL104-GFP	pYES2	Überexpression von <i>YGL104CyEGFP</i>
p426HXT7-YBR241	p426HXT7-6HIS	Überexpression von <i>YBR241C</i>
p426HXT7-YGL104	p426HXT7-6HIS	Überexpression von <i>YGL104C</i>
p426MET25-CAN1-YBR241	p426MET25	Überexpression der <i>CAN1-YBR241C</i> - Fusion
p426MET25-CAN1-HXT1	p426MET25	Überexpression der <i>CAN1-HXT1</i> -Fusion
YCp111YBR241	YCplac111	<i>YBR241C</i> unter Kontrolle des endogenen Promotors und Terminators
YCp33YGL104	YCplac33	<i>YGL104C</i> unter Kontrolle des endogenen Promotors und Terminators
pMET25MyrCubRURA3	pMyrCubRURA3	<i>MyrCubRURA3</i> unter Kontrolle des <i>MET25</i> -Promotors
YCpMET25MyrCubRURA3	YCplac111	<i>MyrCubRURA3</i> unter Kontrolle des <i>MET25</i> -Promotors
YCpGAL1MyrCubRURA3	YCplac111	<i>MyrCubRURA3</i> unter Kontrolle des <i>GAL1</i> -Promotors
pMET25MyrCubRHIS3	p426MET25	<i>MyrCubRHIS3</i> unter Kontrolle des <i>MET25</i> -Promotors

Plasmid	Ausgangsvektor	Beschreibung
YCpLexAURA3	YCplac111	<i>URA3</i> unter Kontrolle des <i>lexA</i> -Promotors
YCpMET25MyrCPLVLexAURA3 p423MET25CPLV	YCpLexAURA3 p423MET25	zusätzlich myristoyliertes CPLV CPLV unter Kontrolle des <i>MET25</i> -Promotors
YCpMET25NubwtPHO84	YCplac111	<i>NubwtPHO84</i> unter Kontrolle des <i>MET25</i> -Promotors
YCpMET25NubwtCHS3	YCpMET25NubwtPHO84	<i>NubwtCHS3</i> unter Kontrolle des <i>MET25</i> -Promotors
YCpMET25NubwtFTR1	YCpMET25NubwtPHO84	<i>NubwtFTR1</i> unter Kontrolle des <i>MET25</i> -Promotors
YCptetONubwtPHO84	YCpMET25NubwtPHO84	<i>NubwtPHO84</i> unter Kontrolle des <i>tetO</i> -Promotors
YCptetONubwtCHS3	YCpMET25NubwtCHS3	<i>NubwtCHS3</i> unter Kontrolle des <i>tetO</i> -Promotors
YCptetONubwtFTR1	YCpMET25NubwtFTR1	<i>NubwtFTR1</i> unter Kontrolle des <i>tetO</i> -Promotors
pMET25HXT1RAS2V19	pMET25MyrCubRURA3	<i>HXT1-RAS2(V19)</i> -Fusion unter Kontrolle des <i>MET25</i> -Promotors
pMET25HXT1dFPS1	p426MET25	<i>HXT1-ΔN-FPS1</i> -Fusion unter Kontrolle des <i>MET25</i> -Promotors
pMET25HIP1dFPS1	p426MET25	<i>HIP1-ΔN-FPS1</i> -Fusion unter Kontrolle des <i>MET25</i> -Promotors

2.4 Synthetische Oligonukleotide

Tab. 2.8: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide zum Konstruieren von Deletionsmutanten

Oligonukleotid	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Beschreibung
S1-APL5	ATGACCTCTTTATATGCACCTGGGGCG GAGGATATTCGGCAAAGGTTACGTTTC TACGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>APL5</i>
S2-APL5	TTAAATGTCAGTGCTTTGGTCTCGAAG AAATTCATTTGGTTCTGGAGAAGCATA GGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>APL5</i>
A1-APL5	GCAGGTGATGGTCATTATGG	Nachweis der <i>apl5</i> -Deletion
A4-APL5	GACTATTGCCGTACGTATC	Nachweis der <i>apl5</i> -Deletion
S1-ATH1	ATGAAAAGAATAAGATCGCTTTGGTTC AATGCGGAGGCTTCTTATTCAAACCTT CGTACGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>ATH1</i>

Oligonukleotid	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Beschreibung
S2-ATH1	TTAATCATTGAGAACAATTTCCCTTGAT TGTAGCTCCTTTGTTATCATCATGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>ATH1</i>
A1-ATH1	GCTTTGTTATTCTCGCTTCAC	Nachweis der <i>ath1</i> -Deletion
A4-ATH1	GGTAATCCCGATGGAATCAG	Nachweis der <i>ath1</i> -Deletion
S1-CAN1	ATGACAAATTCAAAAGAAGACGCCGAC ATAGAGGAGAAGCATATGTACAATTCG TACGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>CAN1</i>
S2-CAN1	CTATGCTACAACATTCAAAAATTTGTC CCAAAAAGTCTTTGGTTCATGATGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>CAN1</i>
S1-NTH1	ATGAGTCAAGTTAATAACAAGCCAAGGA CCGGTAGCCCAAGGCCGTCAAAGTTCG TACGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>NTH1</i>
S2-NTH1	CTATAGTCCATAGAGGTTTCTTTCTTG AGGCCTTAAACTGCTAAAGAATGGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>NTH1</i>
A1-NTH1	CTTTCTTCTTTCTCCAATTG	Nachweis der <i>nth1</i> -Deletion
A4-NTH1	GCTTGCAAAAAGGTCACATGC	Nachweis der <i>nth1</i> -Deletion
S1-SHR3	ATGTTCTCATATTCAGATTTCTGTTCT ATCGGTACGGCCATGATCTTATCTTCG TACGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>SHR3</i>
S2-SHR3	CTATTTTTTGGCGTTCTTCCTCTTTTG AGCACCTTTAGATTTGTTATCATGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>SHR3</i>
A1-SHR3	CTGCTGAGCTTTGAGCTGC	Nachweis der <i>shr3</i> -Deletion
A4-SHR3	CAACCAACGGCGAGGGCAAACG	Nachweis der <i>shr3</i> -Deletion
S1-TPS1	ATGACTACGGATAACGCTAAGGCGCAA CTGACCTCGTCTTCAGGGGGTAATTCG TACGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>TPS1</i>
S2-TPS1	TCAGTTTTTGGTGGCAGAGGAGCTTGT TGAGCTTGATGATGTACTGTATAGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>TPS1</i>
A1-TPS1	GAGCGGTCCGTTCTGTGGTTG	Nachweis der <i>tps1</i> -Deletion
A4-TPS1	GAATAGAGGCAAAAAGGGCGATG	Nachweis der <i>tps1</i> -Deletion
S1-VPS1	ATGGATGAGCATTTAATTTCTACTATT AACAAAGCTTCAGGACGCTTTGGCGTTC GTACGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>VPS1</i>

Oligonukleotid	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Beschreibung
S2-VPS1	CTAAACAGAGGAGACGATTTGACTAGC GTTTCTCAATATCTCGACCATCGCATA GGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>VPS1</i>
A1-VPS1	CCTTTTGAGAGCTCATTATTTG	Nachweis der <i>vps1</i> -Deletion
A4-VPS1	CAAATTCTCGTAACATTC	Nachweis der <i>vps1</i> -Deletion
S1-YBR241c	ATGGCTGAAACTGAAAGACTAATGCCT AACGGTGGTTCCCGCGAAACATTCGTA CGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>YBR241C</i>
S2-YBR241c	TCAGTAGCCAGCCAAACCTCGCTGTA TGTA GTCTTGCCCTTTGTCTCGGGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>YBR241C</i>
S1-YBR241c-HA	CCGAGACAAAGGGCAAGACTACATACA GCGAGGTTTGGGCTGGCTACGCCGGTG CTGGATCCGGT	Amplifizierung der <i>HA-kanMX</i> -Kassette zur Integration eines HA-Tags downstream vom <i>YBR241C</i> -ORF
S2-YBR241c-HA	CGAGAAAGAAGTAAAAAATAGTTGCTT AGGTATATATGACTGGCTACAGAGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>HA-kanMX</i> -Kassette zur Integration eines HA-Tags downstream vom <i>YBR241C</i> -ORF
A1-YBR241c	GTA CT TGGCTTTCAGGCTTC	Nachweis der <i>ybr241c</i> -Deletion
A4-YBR241c	ACGCGAGTACTCTGCGTGAG	Nachweis der <i>ybr241c</i> -Deletion
S1-YGL104c	ATGAATAGGATTCTATCTAGTGCATCG TTGCTATCCAATGTTAGCATGTTTCGTA CGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>YGL104C</i>
S2-YGL104c	TTAGCCGCTCCTCTTGGTCTCCGGAAC CTTCTTCCAGATAAAGGCGCTTAGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Kassette zur Deletion von <i>YGL104C</i>
S1-YGL104c-HA	ATAAGCGCCTTTATCTGGAAGAAGGTT CCGGAGACCAAGAGGAGCGCGCCGGT GCTGGATCCGGT	Amplifizierung der <i>HA-kanMX</i> -Kassette zur Integration eines HA-Tags downstream vom <i>YGL104C</i> -ORF
S2-YGL104c-HA	GCTAATAACACGCCGTCGCCGATACGCC TCAATGGTTAGCCCTTATTTTCATTGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>HA-kanMX</i> -Kassette zur Integration eines HA-Tags downstream vom <i>YGL104C</i> -ORF
A1-YGL104c	ACGCGAGTACTCTGCGTGAG	Nachweis der <i>YGL104c</i> -Deletion
A4-YGL104c	CTTTGGACGCTATGCAAGAA	Nachweis der <i>YGL104c</i> -Deletion

Oligonukleotid	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Beschreibung
Tap1Ygl104c	ATAAGCGCCTTTATCTGGAAGAAGGTT CCGGAGACCAAGAGGAGCGGCTCCATG GAAAAGAGAAG	Amplifizierung der <i>TAP-URA3</i> -Kassette zur Integration eines TAP-Tags downstream vom <i>YGL104C</i> -ORF
Tap2Ygl104c	GCTAATAACACGCCGTCCCGATACGCC TCAATGGTTAGCCCTTATTTTCATTTAC GACTCACTATAGGG	Amplifizierung der <i>TAP-URA3</i> -Kassette zur Integration eines TAP-Tags downstream vom <i>YGL104C</i> -ORF
TAPseqYGL104c-f	GGTACCATTTGCAATTGGGTAG	Sequenzierprimer TAP-Tag
TAPseqYGL104c-r	GTATTGCTAATGCTCAAGTCCG	Sequenzierprimer TAP-Tag
TAPseqYGL104c-r2	CCTCCAGACTGTTTGTTCATC	Sequenzierprimer TAP-Tag
MM-URA-CAN1-A	ATGACAAATTCAAAAGAAGACGCCGAC ATAGAGGAGAAGCATATGTACAAGATT GTACTGAGAGTGCACCATACCAC	SGA: Deletion von <i>CAN1</i> mit der <i>MFAl</i> -Promotor- <i>HIS3</i> -Kassette, „forward“-Primer
MM-URA-CAN1-B	CTATGCTACAACATTCCAAAATTTGTC CCAAAAAGTCTTTGGTTCATGATCAAG CTTATCGATACACCGCATAGATCCG	SGA: Deletion von <i>CAN1</i> mit der <i>MFAl</i> -Promotor- <i>HIS3</i> -Kassette, „reverse“-Primer
k2-natMX	GAAGCCCGCCAGGTCGCCGTC	Überprüfung von Gendeletionen, Bindestelle im <i>natMX</i>
k3-natMX	GAGGTCACCAACGTCAACGCAC	Überprüfung von Gendeletionen, Bindestelle im <i>natMX</i>
k2-kanMX	TTGTCGCACCTGATTGCCCCG	Überprüfung von Gendeletionen, Bindestelle im <i>kanMX</i>
k3-kanMX	TATGGAAGTGCCTCGGTGAG	Überprüfung von Gendeletionen, Bindestelle im <i>kanMX</i>

Tab. 2.9: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide zum Konstruieren von Plasmiden

Oligonukleotid	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Beschreibung
ÜE-His-YBR241c-f	ATTTTAATCAAAAAGTTAACATGC ATCACCATCACCATCACGCTGAAA CTGAAAGACT	p426HXT7-HISYBR241: Amplifizieren von <i>YBR241C</i> , inklusive 6xHis-Epitop, homologer Überhang zum <i>HXT7</i> -Promotor
ÜE-His-YGL104c-f	ATTTTAATCAAAAAGTTAACATGC ATCACCATCACCATCACAATAGGA TTCTATCTAG	p426HXT7-HISYGL104: Amplifizieren von <i>YGL104C</i> , inklusive 6xHis-Epitop, homologer Überhang zum <i>HXT7</i> -Promotor
ÜE-YBR241c-f	AACACAAAAACAAAAAGTTTTTTTT AATTTTAATCAAAAATGGCTGAA ACTGAAAGACT	p426HXT7-YBR241: Amplifizieren von <i>YBR241C</i> , homologer Überhang zum <i>HXT7</i> - Promotor
ÜE-YBR241c-r	GAATGTAAGCGTGACATAACTAAT TACATGACTCGAGTCAGTAGCCAG CCCAAACCT	p426HXT7-YBR241: Amplifizieren von <i>YBR241C</i> , homologer Überhang zum <i>CYCI</i> - Terminator
ÜE-YGL104c-f	AACACAAAAACAAAAAGTTTTTTTT AATTTTAATCAAAAATGAATAGG ATTCTATCTAG	p426HXT7-YGL104: Amplifizieren von <i>YGL104C</i> , homologer Überhang zum <i>HXT7</i> - Promotor
ÜE-YGL104c-r	GAATGTAAGCGTGACATAACTAAT TACATGACTCGAGTTAGCCGCTCC TCTTGGTCT	p426HXT7-YGL104: Amplifizieren von <i>YGL104C</i> , homologer Überhang zum <i>CYCI</i> - Terminator
YcpPromYbr	TGTGAGCGGATAACAATTCACAC AGGAAACAGCTATGACCATGATTA CGGATCGACGAAAAGTGAAATG	YCp111YBR241: Amplifizieren von <i>YBR241C</i> , inklusive Promotor- und Terminatorregion, homologer Überhang zum Vektor YCplac111
YcpTermYbr	GTTTTCCAGTCACGACGTTGTAA AACGACGGCCAGTGAATTCGAGCT CGGGACGCAGAACCGAATATTGGG CTC	YCp111YBR241: Amplifizieren von <i>YBR241C</i> , inklusive Promotor- und Terminatorregion, homologer Überhang zum Vektor YCplac111
YcpPromYgl_1	TGTGAGCGGATAACAATTCACAC AGGAAACAGCTATGACCATGATTA CGCTGCGGGCTATTCACGCGCCAG	YCp111YGL104: Amplifizieren von <i>YGL104C</i> , inklusive Promotor- und Terminatorregion, homologer Überhang zum Vektor YCplac33

Oligonukleotid	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Beschreibung
YcplTermYgl_2	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAA AACGACGGCCAGTGAATTCGAGCT CGGGATGAAGAAGGCCCAAGA ACTG	Ycpl111YGL104: Amplifizieren von <i>YGL104C</i> , inklusive Promotor- und Terminatorregion, homologer Überhang zum Vektor Ycplac33
GalYbr241	CAAAAAATTGTTAATATACTCTA TACTTTAACGTCAAGGAGAAAAA CCATGGCTGAACTGAAAGACT	pGAL1-YBR241-GFP: Amplifizieren von <i>YBR241C</i> mit homologem Überhang zum <i>GAL1</i> -Promotor
GalYgl104	CAAAAAATTGTTAATATACTCTA TACTTTAACGTCAAGGAGAAAAA CCATGAATAGGATTCTATCTAG	pGAL1-YGL104-GFP: Amplifizieren von <i>YGL104C</i> mit homologem Überhang zum <i>GAL1</i> -Promotor
Ybr241GFPf	GCGAGGTTTGGGCTGGCTACGGTG ACGGTGCTGGTTTAATT	pGAL1-YBR241-GFP: Amplifizieren vom <i>yEGFP</i> -ORF mit homologem Überhang zu <i>YBR241C</i>
Ybr241GFPr	AATTAACCAGCACCGTCACCGTA GCCAGCCCAAACCTCGC	pGAL1-YBR241-GFP: Amplifizieren von <i>YBR241C</i> mit homologem Überhang zum <i>yEGFP</i> -ORF
Ygl104GFPf	CGGAGACCAAGAGGAGCGGCGGTG ACGGTGCTGGTTTAATT	pGAL1-YGL104-GFP: Amplifizieren vom <i>yEGFP</i> -ORF mit homologem Überhang zu <i>YGL104C</i>
Ygl104GFPr	AATTAACCAGCACCGTCACCGCC GCTCCTCTTGGTCTCCG	pGAL1-YGL104-GFP: Amplifizieren von <i>YGL104C</i> mit homologem Überhang zum <i>yEGFP</i> -ORF
yGFPcyc	GGAGGGCGTGAATGTAAGCGTGAC ATAACTAATTACATGATGCGGCCC TCTTATTTGTACAATTCATCCA	pGAL1-YBR241/YGL104-GFP: Amplifizieren vom <i>yEGFP</i> -ORF mit homologem Überhang zum <i>CYC1</i> -Terminator
GalHis_f	CAAAAAATTGTTAATATACTCTA TACTTTAACGTCAAGGAGAAAAA CCATGCATCACCATCACCATCAC	pGAL1-HISYBR241C/-HISYGL104C: Amplifizieren von Genen aus dem Vektor p426HXT7-6HIS, homologer Überhang zum <i>GAL1</i> -Promotor

Oligonukleotid	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Beschreibung
Cyc_term_r	CGTTCTTAATACTAACATAAC	pGAL1-HISYBR241C/- HISYGL104C: Amplifizieren von Genen aus dem Vektor p426HXT7-6HIS, homologer Überhang zum <i>CYC1</i> -Terminator
Met25CAN1_f	ACATAGATACAATTCTATTACCCC CATCCATACTCTAGAACTAGTGGA TCATGACAAATTCAAAGAAGA	p426MET25-CAN1- YBR241/HXT1: Amplifizieren von <i>CAN1</i> mit homologem Überhang zum <i>MET25</i> -Promotor
CAN1_His_L_YBR241c_f	AATTTTGGGAATGTTGTAGCACATC ACCATCACCATCACGGCGCAGGCA TGGCTGAAACTGAAAGACT	p426MET25-CAN1-YBR241: Amplifizieren von <i>YBR241C</i> mit homologem Überhang zu <i>CAN1</i> , inklusive 6xHisTag und Linker
CAN1_His_L_YBR241c_r	AGTCTTTCAGTTTCAGCCATGCCT GCGCCGTGATGATGATGGTGATGT GCTACAACATTCCAAAATT	p426MET25-CAN1-YBR241: Amplifizieren von <i>CAN1</i> mit homologem Überhang zu <i>YBR241C</i> , inklusive 6xHisTag und Linker
CAN1_His_L_HXT1_f	AATTTTGGGAATGTTGTAGCACATC ACCATCACCATCACGGCGCAGGCA TGAATTCAACTCCCGATCT	p426MET25-CAN1-HXT1: Amplifizieren von <i>HXT1</i> mit homologem Überhang zu <i>CAN1</i> , inklusive 6xHisTag und Linker
CAN1_His_L_HXT1_r	AGATCGGGAGTTGAATTCATGCCT GCGCCGTGATGATGATGGTGATGT GCTACAACATTCCAAAATT	p426MET25-CAN1-HXT1: Amplifizieren von <i>CAN1</i> mit homologem Überhang zu <i>HXT1</i> , inklusive 6xHisTag und Linker
YBR241c_Term_r	TAGAGCGGATGTGGGGGGAGGGCG TGAATGTAAGCGTGACATAACTAA TTTCAGTAGCCAGCCCAAACCTCG CT	p426MET25-CAN1-YBR241: Amplifizieren von <i>YBR241C</i> mit homologem Überhang zum <i>CYC1</i> -Terminator
Hxt1_Term_r	TAGAGCGGATGTGGGGGGAGGGCG TGAATGTAAGCGTGACATAACTAA TTTTATTTCCTGCTAAACAAAC	p426MET25-CAN1-HXT1: Amplifizieren von <i>HXT1</i> mit homologem Überhang zum <i>CYC1</i> -Terminator
1-GAL	TGACCATGATTACGCCAAGCTTGC ATGCCTGCAGGTCGACACGGATTA GAAGCCGCCGAGCG	YCpGAL1MyrCubRURA3: Amplifizieren vom <i>GAL1</i> -Promotor, homologer Bereich zum Vektor YCplac111

Oligonukleotid	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Beschreibung
2-MYR	GATGCATGCTCGAGCGGCCGCCAG TGTGATGGATATCTGCA	YCpGAL1MyrCubRURA3: Amplifizieren vom <i>GAL1</i> - Promotor, homologer Bereich zum <i>MyrCubRURA3</i>
3-MYR	TGCAGATATCCATCACACTGGCGG CCGCTCGAGCATGCATCGGTATCC CTCCAGATCAACAAAG	YCpGAL1MyrCubRURA3: Amplifizieren von <i>MyrCubRURA3</i> , homologer Bereich zum <i>GAL1</i> - Promotor
4-URA	AACGACGGCCAGTGAATTCGAGCT CGGTACCCGGGGATCCCTCGAGGT CGACGGTATCGATAA	YCpGAL1MyrCubRURA3: Amplifizieren von <i>MyrCubRURA3</i> , homologer Bereich zum Vektor YCplac111
MET1	GGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGT GGCGGCCGCTCTAGAGATGCAAGG GTTCTGAATCCCT	pMET25MyrCubRURA3: Amplifizieren vom <i>MET25</i> - Promotor, homologer Überhang zum Plasmid pMyrCubRURA3
MET2	GAGGGATACCGTCGACGATCTTAG ATGGAGCAGCACCCATTGTATGGA TGGGGTAATAGA	pMET25MyrCubRURA3: Amplifizieren vom <i>MET25</i> - Promotor, homologer Überhang zum Plasmid pMyrCubRURA3
Met25NotICub	AGATACAATTCTATTACCCCATC CATACTCTAGAACTAGTGCGGCCG CATGGGTATCCCTCCAGATCAACA	pMET25MyrCubRHIS3: Amplifizieren von <i>MyrCub</i> , homologer Überhang zum <i>MET25</i> - Promotor
CubRHIS3	TACTAGGGCTTTCTGCTCTGTCCT ACCACCTCTTAGCCTTAGCA	pMET25MyrCubRHIS3: Amplifizieren von <i>MyrCub</i> , homologer Überhang zum <i>HIS3</i> - Gen, Einfügen des Arginins
RHIS3Cub	TGCTAAGGCTAAGAGGTGGTAGGA CAGAGCAGAAAGCCCTAGTA	pMET25MyrCubRHIS3: Amplifizieren des <i>HIS3</i> -Gens, homologer Überhang zum <i>MyrCub</i> , Einfügen des Arginins
HIS3Term	GAATGTAAGCGTGACATAACTAAT TACATGACTCGAGCTACATAAGAA CACCTTTGG	pMET25MyrCubRHIS3: Amplifizieren des <i>HIS3</i> -Gens, homologer Überhang zum <i>CYCI</i> - Terminator
NotI-LexA	TAACAATTTACACAGGAAACAGC TATGACCATGATTACGGCGGCCGC TTGGATGGACGCAAAGAAGTT	YCpLexAURA3: Amplifizieren des <i>lexA</i> -Promotors, homologer Überhang zum YCplac111, NotI- Schnittstelle

Oligonukleotid	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Beschreibung
LexA-URA3	CCTTATATGTAGCTTTCGACATTA TAGTTTTTTTCTCCTTGACGT	YCpLexAURA3: Amplifizieren des <i>lexA</i> -Promotors, homologer Überhang zum <i>URA3</i> -Gen
URA3-LexA	ACGTCAAGGAGAAAAAACTATAAT GTCGAAAGCTACATATAAGG	YCpLexAURA3: Amplifizieren des <i>URA3</i> -Gens, homologer Überhang zum <i>lexA</i> -Promotor
URA3	CAGGGTTTTCCAGTCACGACGTT GTAAAACGACGGCCAGGGGATTTT GCCGATTTCCGGCC	YCpLexAURA3 Amplifizieren des <i>URA3</i> -Gens, homologer Überhang zum YCplac111
HindIII-Met25	TAACAATTTACACAGGAAACAGC TATGACCATGATTACGAAGCTTGA TGCAAGGGTTCGAATCCC	YCpMET25MyrCPLVLexAURA3: Amplifizieren von <i>MET25MyrCub</i> , homologer Überhang zum YCpLexAURA3
Myr-Cub	ACCACCTCTTAGCCTTAGCACAAG ATGTAAGGTGGACTCC	YCpMET25MyrCPLVLexAURA3: Amplifizieren von <i>MET25MyrCub</i> , homologer Überhang zum <i>CPLV</i>
Cub-PLV	GGAGTCCACCTTACATCTTGTGCT AAGGCTAAGAGGTGGT	YCpMET25MyrCPLVLexAURA3: Amplifizieren von <i>CPLV</i> , homologer Überhang zum <i>MET25MyrCub</i>
LexA	CCATGTAATATGATTATTAACCTT CTTTGCGTCCATCCAAAGCCGTCA TAGCGCGGGTTC	YCpMET25MyrCPLVLexAURA3: Amplifizieren von <i>CPLV</i> , homologer Überhang zum YCpLexAURA3
Met25CPLV	ACATAGATAACAATTCTATTACCCC CATCCATACTCTAGAAATGTCTCG CGACTGCAGGTA	p423MET25CPLV: Amplifizieren von <i>CPLV</i> , homologer Überhang zum <i>MET25</i> -Promotor
CPLVTerm	GAGGGCGTGAATGTAAGCGTGACA TAACTAATTACATGACCTACCCAC CGTACTCGTCAA	p423MET25CPLV: Amplifizieren von <i>CPLV</i> , homologer Überhang zum <i>CYC1</i> -Terminator
NubwtPho84_fwd	TTAAGTCGAAAATTCAAGACAAGG AAGGGATCCCTGGTGGGTGCACCA TGATGAGTTCCGTCAATAAAGA	YCpMET25NubwtPHO84: Amplifizieren von <i>PHO84</i> inklusive Terminator, homologer Überhang zum <i>Nubwt</i>
NubwtPho84_rev	CCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGC TGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC GCTTTATGAGATACCTGATCTG	YCpMET25NubwtPHO84: Amplifizieren von <i>PHO84</i> inklusive Terminator, homologer Überhang zum Vektor YCplac111

Oligonukleotid	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Beschreibung
NubwtCHS3	TTAAGTCGAAAATTCAAGACAAGG AAGGGATCCCCTGGTGGGTCGACCA TGATGACCGGCTTGAATGGAGA	YCpMET25NubwtCHS3: Amplifizieren von <i>CHS3</i> inklusive Terminator, homologer Überhang zum <i>Nubwt</i>
CHS3TermYCplac	CAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCT GCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACG CCAGCAAGTGAAGATTCAATCGGT GAC	YCpMET25NubwtCHS3: Amplifizieren von <i>CHS3</i> inklusive Terminator, homologer Überhang zum Vektor YCplac111
NubwtFTR1	TTAAGTCGAAAATTCAAGACAAGG AAGGGATCCCCTGGTGGGTCGACCA TGATGCCTAACAAAGTGTTTAAC	YCpMET25NubwtFTR1: Amplifizieren von <i>FTR1</i> inklusive Terminator, homologer Überhang zum <i>Nubwt</i>
FTR1TermYCplac	CAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCT GCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACG CCAGCTAAGCCTGCCGAACCGCTC	YCpMET25NubwtFTR1: Amplifizieren von <i>FTR1</i> inklusive Terminator, homologer Überhang zum Vektor YCplac111
Tet-Prom-Reg_f	GCTTTACTACTTTATGCTTCCGGCT CGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC GGACTACCCACCGTACTCGTCAA	YCptetONubwtX: Amplifizieren des <i>tetO</i> -Promotors und der codierenden Sequenz des tTA-Transaktivators, homologer Überhang zum <i>MET25</i> -Promotor
Tet-Prom-Reg_r	ACTTCCAATGTTATGGTTTTACCG GTCAAAGTCTTGACGAAAATCTGC ATGTTAACAGGCCTGTTTAAAC	YCptetONubwtX: Amplifizieren des <i>tetO</i> -Promotors und der codierenden Sequenz des tTA-Transaktivators, homologer Überhang zum <i>Nubwt</i>
Met25Hxt1	TCAGATACATAGATACAATTCTAT TACCCCATCCATACAATGAATTC AACTCCCGATCT	pMET25HXT1RAS2V19: Amplifizieren von <i>HXT1</i> , homologer Überhang zum <i>MET25</i> - Promotor
Hxt1Ras2r	CGACTTGTTCAAAGGACCGGCACC TTTCCTGCTAAACAACTCT	pMET25HXT1RAS2V19: Amplifizieren von <i>HXT1</i> , homologer Überhang zum <i>RAS2</i> - Gen, Glycin-Alanin-Glycin-Linker
Hxt1Ras2f	TTGTTTAGCAGGAAAGGTGCCGGT CCTTTGAACAAGTCGAACAT	pMET25HXT1RAS2V19: Amplifizieren eines <i>RAS2</i> - Fragments, homologer Überhang zum <i>HXT1</i> -Gen, Glycin-Alanin- Glycin-Linker

Oligonukleotid	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Beschreibung
Ras2V19r	AAAGCAGATTTACCAACACCAACA CCACCAACGACGACTAGCT	pMET25HXT1RAS2V19: Amplifizieren eines <i>RAS2</i> - Fragments, homologer Überhang zum <i>RAS2</i> -Gen, Austausch Glycin 19 gegen Valin
Ras2V19f	AGCTAGTCGTCGTTGGTGGTGTG GTGTTGGTAAATCTGCTTT	pMET25HXT1RAS2V19: Amplifizieren des <i>RAS2</i> -Gens, homologer Überhang zum <i>RAS2</i> - Fragment, Austausch Glycin 19 gegen Valin
Ras2Term	GCCCCCCTCGAGGTCGACGGTAT CGATAAGCTTGATATCTTAACCTTA TAATACAACAGC	pMET25HXT1RAS2V19: Amplifizieren des <i>RAS2</i> -Gens, homologer Überhang zur Terminatorregion
Met25-HXT1	TCAGATACATAGATACAATTCTAT TACCCCATCCATACTCTAGAATG AATTCAACTCCCGATCTAATAT	pMET25HXT1dFPS1: Amplifizieren von <i>HXT1</i> , homologer Überhang zum <i>MET25</i> - Promotor
HXT1-L-dFPS1	TCTTTGCTTCACCATAATGCCCGG GCCCTTTCCTGCTAAACAACTCT TG	pMET25HXT1dFPS1: Amplifizieren von <i>HXT1</i> , homologer Überhang zum <i>dFPS1</i> , Glycin-Alanin-Glycin-Linker
dFPS1-L-HXT1	CAAGAGTTTGTGTTAGCAGGAAAGG GCCCGGCATTATGGTGAAGCCAA AGA	pMET25HXT1dFPS1: Amplifizieren von <i>dFPS1</i> , homologer Überhang zum <i>HXT1</i> , Glycin-Alanin-Glycin-Linker
FPS1	GCGTGAATGTAAGCGTGACATAAC TAATTACATGACTCGAGTGTTACC TTCTTAGCATTACCA	pMET25HXT1/HIP1dFPS1 Amplifizieren von <i>dFPS1</i> , homologer Überhang zum p426MET25
Met25-HIP1	TCAGATACATAGATACAATTCTAT TACCCCATCCATACTCTAGAATG CCTAGAAACCCATTGAAAAAG	pMET25HIP1dFPS1: Amplifizieren von <i>HIP1</i> , homologer Überhang zum <i>MET25</i> - Promotor
HIP1-L-dFPS1	GATTTTTACATTTCTGGTGTGGGC CCGGGACACCTACAGTCTTGCCCT C	pMET25HIP1dFPS1: Amplifizieren von <i>HIP1</i> , homologer Überhang zum <i>dFPS1</i> , Glycin-Alanin-Glycin-Linker

Oligonukleotid	Sequenz in 5'-3'-Richtung	Beschreibung
dFPS1-L-HIP1	GAGGGCAAGACTGTAGGTGTCCCG GGCCACACACCAGAAATGTAAAAAT C	pMET25HIP1dFPS1: Amplifizieren von <i>dFPS1</i> , homologer Überhang zum <i>HIP1</i> , Glycin-Alanin-Glycin-Linker
Nub-HXT1-Seq	CCTTCTGGAGTATTCATGGC	Sequenzierprimer
URA3-Seq	GCAAAGGGAAGGGATGCTAAG	Sequenzierprimer
HXT7seq1	TCACCCCAGGATGCATTACC	Sequenzierprimer, bindet im <i>HXT7</i> - Promotor
HXT7seq2	GTTAGTTGTTCCAGAACTA	Sequenzierprimer, bindet im <i>HXT7</i> - Promotor

2.5 Antikörper

Tab. 2.10: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Hersteller
anti-ALP	anti-alkalische-Phosphatase (Pho8), Hefevakuole, Maus-IgG, monoklonal	Molecular Probes
anti-Cox3	anti-Cytochrom-Oxidase (Cox3), Mitochondrium der Hefe, Maus-IgG, monoklonal	Molecular Probes
anti-Dpm1	anti-Dolichol-Phosphat-Mannose-Synthase (Dpm1), ER der Hefe, Maus-IgG, monoklonal	Molecular Probes
anti-HA High Affinity	Monoklonaler Antikörper aus Ratte gegen ein Epitop des Hämagglutinins des humanen Influenzavirus	Roche
anti-Penta-His	Antikörper gegen Sequenzen aus 5 und 6 Histidinen, Maus-IgG, monoklonal	Qiagen
anti-Pep12	anti-Pep12 (t-SNARE), Endosom der Hefe, Maus-IgG, monoklonal	Molecular Probes
anti-Pma1 (yL-14)	anti-Plasmamembran-ATPase (Pma1), Plasmamembran der Hefe, Ziege-IgG, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-Vph1	anti-vakuoläre-ATPase (Vph1), 100 kDa-Untereinheit, Hefevakuole, Maus-IgG, monoklonal	Molecular Probes
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase	Sigma
anti-Maus	anti-Maus-Sekundär-Antikörper, gekoppelt an Peroxidase	Roche
anti-Ratte	anti-Ratte-Sekundär-Antikörper, gekoppelt an Peroxidase, IgG-POD-Fab-Fragmente	Roche
anti-Ziege	anti-Ziege-Sekundär-Antikörper, gekoppelt an Peroxidase	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

2.6 Chemikalien, Enzyme und Materialien

Tab. 2.11: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien, Enzyme und Materialien

Hersteller	Chemikalien, Enzyme, Materialien
Acros Organics	Arginin, Kaliumacetat, Lysin, Natriumacetat, Phenylalanin
Alltech	Filterröhrchen, Nylon, 0,2 µm
Beckman	Ultra-Clear-SW40-Röhrchen, Polyallomer-SW40-Röhrchen, Polyallomer-SW28-Röhrchen
Biomers	synthetische Oligonukleotide
Biorad	Precision Plus Protein Dual Color Standards
Braun-Melsungen	Glasperlen (∅ = 0,45 mm)
Calbiochem	G418-Sulfat (Geneticin)
Difco	bakteriologischer Hefeextrakt, bakteriologisches Trypton, Maltose, yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulphate
Fujifilm	medizinische Röntgenfilme SuperRX
Gibco BRL /	UltraPure Agarose, T4-DNA-Ligase
Invitrogen	
J.T.Baker	Kaliumacetat, Kaliumdihydrogenphosphat, di-Kaliumhydrogenphosphat, Kaliumhydroxid, Magnesiumchlorid, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Schwefelsäure
Janssen Chimica	Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO)
Kodak	Röntgenfilm-Entwickler, Röntgenfilm-Fixierer
New England Biolabs (NEB)	Restriktionsenzyme
Fermentas	Lambda-Phagen-DNA, Lambda-HindIII-Marker, 5-Fluoroorotsäure (5-FOA), dNTP-Mix, Restriktionsenzyme
Macherey-Nagel	Nucleogel 810H, sample vials, vial caps
Merck	Adenin, Alanin, Ammoniumperoxidsulfat (APS), EDTA, N,N-Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSF), di-Kaliumhydrogenphosphat, Leucin, β-Mercaptoethanol, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Methanol, di-Natriumhydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat, 2-Propanol, Salzsäure, TEMED, Tween20, Uracil
Millipore	Immobilon-N PVDF Transfer-Membran
Molecular Probes	CMAC (7-Amino-4-Chloromethylcoumarin)
Oxoid	bakteriologischer Agar, Hefeextrakt, bakteriologisches Pepton
Pierce	SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate
Qiagen	QIAprep Spin Miniprep Kit, Plasmid Mini Kit, QIAquick PCR Purification Kit, QIAex II Gel Extraction Kit
Roche	Protease-Inhibitor-Mix Complete

Hersteller	Chemikalien, Enzyme, Materialien
Roth	Rotiphorese Gel 30 Acrylamid, Adenin, Ammoniumsulfat, Ampicillin, BSA, Calciumchlorid, Coomassie brillant blue G250, Dextrose, N,N-Dimethylformamid (DMF), Dithiothreitol (DTT), EDTA, EGTA, Essigsäure, Ethanol, Ethidiumbromid, Galactose, Glasperlen, Glycin, Glycerin, HEPES, Histidin, Isoleucin, Isopropyl-Thio- β -D-Galactopyranosid (IPTG), Kaliumchlorid, Lithiumacetat, Lysin, Magnesiumacetat, Magnesiumsulfat, Methionin, β -Mercaptoethanol, MES, Milchpulver, Morpholinopropanesulfonsäure (MOPS), Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Natriumcitrat, Natriumhydroxid, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Phenylalanin, Phenol, ortho-Phosphorsäure, 2-Propanol, Prolin, Raffinose, Saccharose, Salzsäure, SDS, Sorbitol, TEMED, Threonin, Trichloressigsäure (TCA), Tris, Triton X100, Tween 20, Tyrosin, Valin
Serva	Ammoniumpersulfat (APS), Bromphenolblau, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid (X-Gal), Morpholinopropanesulfonsäure (MOPS), PonceauS
Sigma / Fluka	Ampicillin, L-Citrullin, Chymostatin, Ficoll 400, Kupferchlorid, Lithiumacetat, Lyticase, o-Nitrophenyl- α -D-Galactopyranosid (ONPG), PMSF, Polyethylenglycol 3350, Succinat
Werner BioAgents	clonNAT
Whatman	Whatmanpapier

2.7 Transformation

2.7.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte mittels Elektroporation nach Dower *et al.* (1988) und Wirth *et al.* (1989). Es wurden die Geräte Gene Pulser (BioRad) oder Easyject prima (EQUIBO) verwendet.

2.7.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae*-Stämmen mit Plasmid-DNA bzw. DNA-Fragmenten wurde mittels Lithiumacetat-Methode nach Gietz und Woods (1994) durchgeführt. Zur Selektion auf eine Geneticin-Resistenz wurden die Zellen nach der Transformation für 4 h bei 30°C in Vollmedium inkubiert und danach auf G418-Medium ausplattiert.

2.8 Präparation und Analyse von DNA

2.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979), alternativ mittels „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) oder „Plasmid Mini Kit“ (Qiagen).

2.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Die Zellen einer stationären Hefekultur (5 ml) wurden durch Zentrifugation geerntet, anschließend gewaschen und in 400 µl Puffer P1 (Plasmid Mini Kit, Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von 400 µl Puffer P2 und $\frac{2}{3}$ Volumen Glasperlen ($\varnothing = 0,45$ mm) wurde ein Zellaufschluß durch fünfminütiges Schütteln auf dem Vibrax (IKA) durchgeführt. Der Überstand wurde mit $\frac{1}{2}$ Volumen Puffer P3 versetzt, gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer zehnminütigen Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die Plasmid-DNA durch Zugabe von 0,75 ml Isopropanol zum Überstand bei Raumtemperatur gefällt. Dann wurde die DNA durch Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Wasser resuspendiert.

2.8.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae*

Chromosomale DNA wurde nach einer modifizierten Version des Protokolls von Strathern und Higgins (1991) isoliert. Die Zellen einer stationären Hefekultur (50 ml) des Stammes FY1679 (oder CEN.PK2-1C) wurden mittels Zentrifugation geerntet, zweimal gewaschen, in 4 ml SCE-Lösung (1 M Sorbit, 100 mM Na-Citrat, 60 mM Na₂-EDTA, pH 7,0) mit 1 µl/ml β-Mercaptoethanol und 250 µg Zymolyase resuspendiert und für 1 h bei 37°C vorsichtig invertiert. Im Anschluß wurden 200 µg RNaseA dem Ansatz zugefügt und dieser erneut für 1 h bei 37°C vorsichtig invertiert. Nach Zugabe von 8 ml SDS-Lösung (2% SDS, 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8,0) wurde der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit 4 ml 5 M NaCl versetzt, für mindestens 2 h bei 4°C inkubiert, 15 min bei 10000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 8 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert. Der Ansatz wurde über eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt, die chromosomale DNA mit dem $2\frac{1}{2}$ -fachen Volumen eiskaltem 96%igem Ethanol gefällt, für 30 min bei 13000 rpm zentrifugiert, mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen. Die DNA-

Konzentration wurde spektralphotometrisch (260 nm) bestimmt. Die chromosomale DNA wurde als Matrize für die PCR eingesetzt.

2.8.4 Phenol-Chloroform-Extraktion

Der zu präparierende Ansatz wurde mit 5 ml Phenol versetzt (Kirby, 1957), dann mehrmals invertiert und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde abgenommen und mit Phenol gewaschen. Der Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde die wäßrige Phase mit 5 ml Chloroform versetzt, ebenfalls mehrmals invertiert und für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Auch diese Prozedur wurde dreimal durchgeführt. Danach wurde die DNA mit Ethanol gefällt.

2.8.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Durch die Elektrophorese wurden DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt (Southern, 1979). Als Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 2 mM EDTA). Die Agarose wurde in einer Endkonzentration von 1% mit TAE-Puffer gemischt. Die Suspension wurde solange in der Mikrowelle gekocht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde ein horizontales Gel gegossen. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit $\frac{1}{6}$ Volumen DNA-Probenpuffer („loading dye“, Fermentas) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 Volt. Danach wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml Wasser) für mehrere Minuten gefärbt. Anschließend wurde der Ethidiumbromid-DNA-Komplex durch Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht.

2.8.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde mittels „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen) durchgeführt.

2.8.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das betreffende DNA-Fragment wurde im Agarosegel unter langwelligem UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht, ausgeschnitten und mit dem „QIAex II Gel Extraction Kit“ oder dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) aufgereinigt.

2.8.8 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen (Sanger *et al.*, 1977) von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten wurden von der Firma SRD (Scientific Research and Development GmbH, Oberursel) durchgeführt.

2.8.9 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Proben wurden im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen (Ausubel *et al.*, 1994-1997). Eine Extinktion von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml Lösung. Die Reinheit einer DNA-Präparation kann durch den Quotient von E_{260} und E_{280} bestimmt werden. Reine DNA-Präparationen weisen einen Quotienten von 1,8 bis 2,0 auf. Liegt der Quotient unter 1,8, ist die Präparation mit Protein verunreinigt.

2.9 Enzymatische Modifikation von DNA

2.9.1 DNA-Restriktion

Sequenzspezifische Spaltungen von DNA-Molekülen durch Restriktionsendonukleasen wurden in dem vom Hersteller (NEB, Fermentas) empfohlenen Puffer bei der für das jeweilige Enzym angegebenen Temperatur durchgeführt. Die Restriktion erfolgte für 1-3 h mit 5 Units Enzym pro µg DNA im ThermoStat plus (Eppendorf).

2.9.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Zusatz einer Unit alkalischer Phosphatase zum Restriktionsansatz (Ausubel *et al.*, 1994-1997). Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die dephosphorylierten DNA-Fragmente in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend aufgereinigt.

2.9.3 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem 20 µl Ansatz bestehend aus geschnittenem Vektor, einem 3-5fachen molaren Überschuß an DNA-Fragment und einer Unit T4-Ligase für 16 h bei 4°C (Ausubel *et al.*, 1994-1997).

2.9.4 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels PCR

DNA-Fragmente wurden mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1985). Es kam das „ExpandTM High Fidelity“ PCR-System (Roche) zum Einsatz. Jeder Ansatz bestand aus 1-10 ng DNA, 0,2 mM dNTP-Mix, 1x Puffer 2 (1,5 mM MgCl₂), einer Unit DNA-Polymerase und je 100 pmol der entsprechenden Oligonukleotidprimer. Gesamtvolumen des Ansatzes waren 50 µl. Die PCR-Reaktion wurde im Mastercycler gradient (Eppendorf) durchgeführt. Nach dem ersten Denaturierungsschritt wurde die Polymerase zugegeben („hot start PCR“). Die Bedingungen der PCR wurden je nach Bedarf in folgendem Rahmen variiert:

Denaturierung 4 min 95°C, Denaturierung 30-45 s 95°C, Annealing 30-45 s 52-60°C, Elongation 1 min (pro kb) 68 bzw. 72°C, finale Elongation 4-8 min 68 bzw. 72°C.

2.10 Klonierung von Plasmiden über *in vivo*-Rekombination

Ein Großteil der Klonierungen dieser Arbeit wurde über eine *in vivo*-Rekombination in *S. cerevisiae* durchgeführt (Fusco *et al.*, 1999). Dazu wurde die zu klonierende DNA-Sequenz in einer PCR amplifiziert. Als Matrize diente genomische DNA oder Plasmid-DNA. Die eingesetzten Oligonukleotide enthielten im 3'-Bereich ca. 20 Basen, die homolog zum 5'-Ende bzw. komplementär zum 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz waren. Diese Bereiche dienten zum Amplifizieren des zu klonierenden Gens von der Matrizen-DNA. Zusätzlich besaßen die Primer 5'-terminale Überhänge von 40-50 Basen, die homolog zur Region vor bzw. komplementär zur Region nach der gewählten Integrationsstelle der betreffenden Vektoren (YCplac33, YCplac111, p423MET25, p426MET25, p426HXT7-6HIS, pYES2) waren (Tab. 2.9). Der jeweilige Vektor wurde durch Restriktion im Integrationsbereich linearisiert, dann aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt. Der linearisierte Vektor wurde zusammen mit dem PCR-Produkt in die Hefezellen transformiert. In einigen Hefezellen fand homologe Rekombination statt, das PCR-Produkt wurde in den Vektor integriert. Es entstand ein zirkuläres Plasmid, und die verbliebenen linearisierten DNA-Moleküle wurden degradiert. Diese Rekombinanten konnten dann auf synthetischem Komplettmedium selektiert werden, dem abhängig vom Markergen des Vektors die entsprechende Aminosäure oder Nukleobase fehlte. Wenn möglich wurden schon mit den Rekombinanten Wachstumsexperimente durchgeführt, um positive Klone zu identifizieren. Anschließend wurden die Plasmide aus den rekombinanten Hefezellen präpariert, in *E. coli* amplifiziert und durch eine Restriktionsanalyse und falls angegeben zusätzlich durch DNA-Sequenzierung überprüft.

Wenn zwei PCR-Produkte in einen Vektor kloniert werden sollten, wurde eine doppelte homologe Rekombination durchgeführt. In diesem Fall wurden PCR-Produkte erzeugt, die homologe Bereiche zueinander und zum Vektor hatten. Fand homologe Rekombination statt, wurden beide Fragmente in den Vektor integriert.

2.11 Deletion von Genen in *S. cerevisiae*

Zur Deletion von Genen wurde eine *kanMX*- (Guldener *et al.*, 1996), eine *natMX*- (Goldstein und McCusker, 1999) oder eine *LEU2MX*-Kassette (Guldener *et al.*, 2002) bei

gleichzeitiger Entfernung des betreffenden Gens genomisch integriert. In einer PCR wurde zunächst die Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 (pAG25, pUG73) mit entsprechenden S1- und S2-Oligonukleotiden (Tab. 2.8) amplifiziert. Diese Primer weisen Sequenzen von 20 Basen auf, die für das Amplifizieren der Kassette nötig sind, außerdem Sequenzen von 50 Basen, die homolog zum 5'-Ende bzw. komplementär zum 3'-Ende des zu deletierenden Gens sind. Nach Transformation der Deletionskassette in den entsprechenden Hefestamm erfolgte eine Selektion auf G418-haltigen Vollmediumsplatten (clonNAT, SCD Leu⁻). Mit Klonen, die auf G418-Medium wachsen konnten, wurde eine Plasmid-DNA-Isolierung durchgeführt. Dabei wurde auch genomische DNA präpariert, die als Matrize für die Kontroll-PCR mit den A1- und A4-Primern und bei Bedarf mit den Kombinationen A1/K2 oder A4/K3 eingesetzt wurde.

Das integrierte *kanMX*-Gen kann mit Hilfe des Enzyms Cre-Rekombinase über Rekombination der in der Kassette enthaltenen *loxP*-Sequenzen wieder effizient entfernt werden. Somit können mehrfache Deletionen mittels *loxP-kanMX-loxP*-Kassette durchgeführt werden. Die Deletionsmutanten wurden dafür mit dem Plasmid pSH47 transformiert, welches das Gen für das Enzym Cre-Rekombinase unter Kontrolle des induzierbaren *GALI*-Promotors trägt. Nach einer mindestens zweitägigen Inkubation der Transformanten auf Galactose- oder Maltose-haltigem (EBY.VW4000) Medium wurden die Kolonien auf G418-Medium replikaplattiert und G418-sensitive Kolonien isoliert. Die Entfernung des *kanMX*-Gens wurde unter Verwendung der Primerkombinationen A1/A4 in einer PCR überprüft.

2.11.1 Genomische Integration codierender Sequenzen von Tags

Die genomische Integration der codierenden Region des HA-Tags (TAP-Tags) wurde nach dem gleichen Prinzip wie die Gen-Deletion durchgeführt. Nur wurden in diesem Fall die Primer so gewählt, daß das Stopcodon des betreffenden Gens gegen die Sequenzen des Tags und des Markergens *kanMX* (*URA3*) ausgetauscht wurde. Dafür mußte vorher das entsprechende DNA-Fragment von den Plasmiden pUG6-HA (Buziol *et al.*, 2002) oder pBS1539 (Puig *et al.*, 2001) amplifiziert werden. Die erfolgreiche Integration des Tags wurde mittels Kontroll-PCR (A1, A4), DNA-Sequenzierung und Western-Blot-Analyse (anti-HA, PAP) überprüft.

2.12 Präparation und Analyse von Proteinen

2.12.1 Induktion der Proteinsynthese durch Galactosezugabe

Die Induktion der Proteinsynthese erfolgte modifiziert nach Gelperin *et al.* (2005). Es wurden Vorkulturen (SCD Ura⁻, 5 ml) der betreffenden Transformanten angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Mit diesen Vorkulturen wurden 100 ml Kulturen (SC Ura⁻ 2% Raffinose) mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und über Nacht herangezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 1,5-2,5 wurden 50 ml 3x YEP mit 6% Galactose zugesetzt und die Kulturen für 6 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (4°C) und mit eiskaltem Wasser gewaschen. Die Zellpellets wurden bei -20°C eingefroren.

2.12.2 Herstellung von Rohextrakten aus *S. cerevisiae*

Die Herstellung von Rohextrakten wurde nach dem Protokoll von Kölling und Hollenberg (1994) mit leichten Modifikationen durchgeführt. Die Zellen einer logarithmisch wachsenden Hefekultur (100 ml) mit einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 (5-8 x 10⁶ Zellen/ml) wurden durch Zentrifugation geerntet und mit STED10-Lösung (10% Saccharose, 10 mM Tris/HCl pH 7,6, 1 mM EDTA) gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 250 µl eiskalter STED10-Lösung, versetzt mit 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF und 1x Protease-Inhibitor-Mix („Complete“, Roche), resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte nach Zugabe von Glasperlen (Ø = 0,45 mm) bis zum Meniskus der Flüssigkeit durch 3-minütiges Schütteln auf dem Vibrax (IKA). Dann wurde 1 ml STED10-Lösung (1 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 1x Protease-Inhibitor-Mix) zugegeben, der Überstand abgenommen und bei 3000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde bei -20°C weggefroren.

2.12.3 Zellfraktionierung durch Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation

2.12.3.1 Kontinuierlicher Saccharosedichtegradient

Die Herstellung des Saccharosedichtegradienten wurde nach Kölling und Hollenberg (1994) in einem SW40-Röhrchen durchgeführt. Es wurden 4 ml STED53-Lösung (53% Saccharose, 10 mM Tris/HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 1x Protease-Inhibitor-Mix), 4 ml STED36-Lösung (36% Saccharose) und 5 ml STED20 (20% Saccharose) übereinander geschichtet. Das Röhrchen wurde mit Parafilm verschlossen und vorsichtig in eine horizontale Lage gebracht. Nach drei Stunden bei 4°C war durch Diffusion ein kontinuierlicher Saccharosedichtegradient entstanden. Das Röhrchen wurde in die Vertikale gebracht und mit 1 ml Rohextrakt überschichtet. Anschließend wurde für 14 h im Beckman SW40-Rotor bei 30000 rpm zentrifugiert (4°C, Optima L-70). Dann

wurden 700 µl-Fractionen des Gradientens abgenommen, mit dem gleichen Volumen 2x Probenpuffer (100 mM Tris/HCl pH 6,8, 4 mM EDTA, 4% SDS, 20% Glycerin, 20 mM DTT, 0,02% Bromphenolblau) versetzt und bei -20°C gelagert. Jeweils 10 µl der einzelnen Fractionen wurden elektrophoretisch aufgetrennt, und der spezifische Nachweis der Proteine erfolgte durch eine Western-Blot-Analyse.

2.12.3.2 Zehnstufiger Saccharosedichtegradient

Der zehnstufige Saccharosedichtegradient wurde gemäß eines modifizierten Protokolls nach Sorin *et al.* (1997) durchgeführt. Es wurde eine Vorkultur (10 ml) des Hefestammes der Fragestellung in YEPD- oder SCD-Medium herangezogen. Mit dieser wurde eine 200 ml Kultur des gleichen Mediums angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,2 wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen bei 2500 rpm für 5 min abzentrifugiert und mit H₂O gewaschen. Das Pellet wurde in 50 ml 0,1 M Tris-SO₄ pH 9,4 (10 mM DTT) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert und dann abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 50 ml Puffer S (5 mM Mes-Tris, pH 6,9, 1,2 M Sorbitol) resuspendiert und die Suspension danach erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml Puffer S resuspendiert, dem 2000 Units Lyticase zugesetzt worden waren und für 30-60 min bei 30°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Während der Inkubationsphase wurde die Spheroplasten-Bildung im Mikroskop analysiert. Die Spheroplasten wurden bei 2000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert und dann zweimal mit eiskaltem Puffer S gewaschen. Das Pellet wurde zur Spheroplasten-Lyse in 2 ml Lysepuffer (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 200 mM Sorbitol, 1x Roche „Complete“ Protease-Inhibitor-Mix, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) resuspendiert. Die Spheroplasten wurden im Dounce-Homogenisator auf Eis homogenisiert (20 Wiederholungen), und das Homogenisat wurde zweimal 3 min bei 2000 rpm abzentrifugiert (4°C). Da sich die unlysierten Zellen im Pellet befanden, wurde jeweils der Überstand abgenommen. Im Anschluß wurde der zehnstufige Gradient in ein SW40-Röhrchen gegossen. Jeweils 1200 µl der Saccharoselösungen (10 mM Hepes pH 7,5, 1 mM MgCl₂) wurden in folgender Reihenfolge überschichtet: 54, 50, 46, 42, 38, 34, 30, 26, 22, 18% [w/w] Saccharose. Danach wurden 1200 µl Spheroplastenlysat auf den Gradienten geladen und 2 h bei 28000 rpm im Beckman SW40-Rotor zentrifugiert (4°C, Optima L-70). Hinterher wurden 11 Fractionen von je 1200 µl nacheinander abgenommen.

2.12.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen der Größe nach in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Laemmli, 1970). Ein 5%iges Sammelgel (125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,15% TEMED, 0,15% APS, 5% Acrylamid) wurde über ein 10%iges Trenngel (375 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,0625% TEMED, 0,1% APS, 10% Acrylamid) gegossen (Maniatis *et al.*, 1982). Zum Einsatz kam das Mini-PROTEAN3-System (Biorad). Der verwendete Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 0,192 M Glycin und 0,1% SDS. Die Proben wurden mit 2x Probenpuffer (100 mM Tris/HCl pH 6,8, 4 mM EDTA, 4% SDS, 20% Glycerin, 20 mM DTT, 0,02% Bromphenolblau) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 15-25 mA. Als Molekulargewichtsstandard diente der „prestained“-Marker „Precision Plus Protein Standards Dual Color“ (Biorad).

2.12.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot-Analyse

Im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung mittels SDS-Page wurden die Proteine auf eine Immobilon-P PVDF-Membran (Millipore) transferiert (Burnette, 1981). Zur Anwendung kam die Mini-PROTEAN3-Apparatur (Biorad). Der Transfer erfolgte in Blotting-Puffer (25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 20% Methanol) für 2 h 30 min bei 100 mA. Der Erfolg des Proteintransfers war an der Übertragung des „prestained“-Markers erkennbar. Bei Bedarf wurde der Transfer zusätzlich durch die reversible Färbung der Membran mit Ponceau S überprüft. Zum Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran über Nacht in TBST (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) mit 1% BSA geblockt. Die Reaktion mit dem Primärantikörper (Verdünnung je nach Herstellerangaben in TBST, 1% BSA) erfolgte für 1-3 h bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran viermal mit TBST gewaschen und anschließend für 1 h mit dem sekundären Antikörper (1:10000 in TBST, 1% BSA) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran viermal mit TBST gewaschen. Es kam ein Peroxidase gekoppelter Sekundärantikörper zum Einsatz, daher wurde die Membran für 3 min mit Chemilumineszenz-Substrat (SuperSignal ULTRA Chemiluminescent Substrate, Pierce) behandelt. Anschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt, durch den das emittierte Licht der Reaktion detektiert werden konnte.

2.12.6 Nachweis von Proteinen über Ponceau S-Färbung

Der Nachweis von auf eine PVDF-Membran geblotteten Proteinen erfolgte mit einer Ponceau S-Färbelösung (0,05% Ponceau S, 0,1% Essigsäure) für 5-20 min bei Raumtemperatur. Die Membran wurde anschließend in Wasser entfärbt (Salinovich und Montelaro, 1986).

2.12.7 Proteinmengenbestimmung nach Lowry

Die Proteinmengenbestimmung nach Lowry *et al.* (1951) ist eine kolorimetrische Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Solubilisierung mit Detergenzien. Die Methode basiert auf der Reaktion von Proteinen mit einer alkalischen Kupfer-Tartrat-Lösung und Folin-Reagenz. Zwei Schritte führen zur Farbentwicklung. Erstens die Reaktion zwischen Protein und Kupfer in alkalischem Medium und zweitens die darauf folgende Reduktion des Folin-Reagenz durch die mit Kupfer behandelten Proteine. Nach Reduktion entwickelt das Folin-Reagenz eine charakteristische blaue Farbe.

Vor jeder Messung wurde das Reaktionsgemisch neu angesetzt. 1 ml 1%ige CuSO₄-Lösung, 1 ml 2%ige Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung und 10 ml 10%ige SDS-Lösung (vakuoläre Vesikel: 20%ige SDS-Lösung) wurden gemischt und auf 100 ml mit Lowry-Reagenz 1 (20 g Na₂CO₃, 20 ml 5 N NaOH, ad 1 l H₂O) aufgefüllt. Bei jeder Messung wurde eine komplette Eichreihe erstellt. BSA-Standards von 0,1 bis 2 mg/ml wurden vermessen, zusätzlich 4 Nullwerte. Die Proteinproben wurden gegebenenfalls mit 1 % SDS verdünnt, damit eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml nicht überschritten wurde. Für alle Proben wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. 100 µl Probe wurden vorgelegt, mit 1 ml Reaktionsgemisch versetzt, mittels Vortex gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 100 µl Lowry-Reagenz 2 (120 ml Folin-Ciocalleus-Phenolreagenz, 230 ml H₂O) zugegeben, sofort auf dem Vortex gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden bei 578 nm im Photometer vermessen.

2.13 Präparation vakuolärer Extrakte

2.13.1 Isolation vakuolärer Vesikel nach Roberts *et al.* (1991)

Vorkulturen (50 ml) der betreffenden Stämme wurden in YEPD-Medium herangezogen. Dann wurden Übernachtskulturen (2 l YEPD) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 1 herangezogen. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation (4000 g) geerntet und einmal mit Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 50 ml 0,1 M Tris-SO₄ (pH 9,4)

resuspendiert, außerdem wurde DTT in einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt. Danach wurden die Zellen 10 min bei 30°C im Schüttel-Wasserbad inkubiert und dann bei 2500 rpm 5 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden einmal mit Puffer S (5 mM Mes-Tris, pH 6,9, 1,2 M Sorbitol) gewaschen. Im Anschluß wurde das Pellet in 50 ml Puffer S resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit Lyticase (2000 U) versetzt und 45 min bei 30°C im Wasserbad geschüttelt. Währenddessen wurde die Spheroplasten-Bildung im Mikroskop überprüft. Die Spheroplasten wurden mittels Zentrifugation (2000 rpm, 8 min, 4°C) gesammelt und im Anschluß zweimal mit eiskaltem Puffer S gewaschen. Für 2 Präparationen wurde Puffer A (10 mM Mes-Tris pH 6,9, 0,1 mM MgCl₂) vorbereitet. Es wurden 12 g Ficoll 400 (12 % Endkonzentration) in 100 ml Puffer A gelöst, 2 Tabletten Protease-Inhibitor-Mix ohne EDTA („Complete“ Roche) und PMSF in einer Endkonzentration von 0,2 mM zugegeben. Das Spheroplasten-Pellet wurde in 25 ml Puffer A (komplett) aufgenommen und im Dounce-Homogenisator auf Eis homogenisiert (10 Wiederholungen). Es wurden 500 µl des Lysats als Probe für die Bestimmung der Enzymaktivität abgenommen. 25 ml des Homogenisats wurden in ein SW28-Röhrchen überführt, vorsichtig mit 13 ml Puffer A (komplett) überschichtet und bei 21000 rpm für 30 min in der Ultrazentrifuge (Beckman Optima L-70) zentrifugiert. Die weiße Schicht (Vakuolen), die auf dem Ficoll schwamm, wurde sorgfältig mit einem Stahlspatel abgenommen und in 6,5 ml Puffer A (komplett) resuspendiert. Für 2 Präparationen wurde Puffer B (10 mM Mes-Tris pH 6,9, 0,5 mM MgCl₂) vorbereitet. 1,2 g Ficoll 400 (8% Endkonzentration) wurden in 15 ml gelöst, mit Protease-Inhibitor-Mix ohne EDTA („Complete“ Roche) nach Herstellerangaben und PMSF in einer Endkonzentration 0,2 mM versetzt. 6,5 ml der Vakuolensuspension wurden dann in ein SW40-Röhrchen überführt und mit 6,5 ml Puffer B (komplett) überschichtet. Anschließend wurde bei 22000 rpm 30 min zentrifugiert (4°C). Die weiße, auf dem Ficoll schwimmende Schicht wurde mit einem Spatel abgenommen und in 250 µl 2x Puffer C (0,1 M Mes-Tris pH 6,9, 0,1 M KCl, 0,02 mM MgCl₂, 1x Protease-Inhibitor-Mix ohne EDTA, 0,2 mM PMSF) mit Hilfe einer Pipettenspitze homogenisiert. Als nächstes wurde das gleiche Volumen 1x Puffer C zugegeben, die Suspension (vakuoläre Vesikel) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.13.1.1 Aufnahmemessung mit isolierten Vesikeln

Die Aufnahmemessung wurde mit Änderungen nach dem Protokoll von Ohsumi und Anraku (1981) durchgeführt. Der Standardansatz (100 µl) bestand aus 25 mM Mes-Tris (pH 7,4), 4 mM MgCl₂, 6 mM ATP und 40-60 µg Protein vakuolärer Vesikel. Dem Ansatz

wurden als letztes die vakuolären Vesikel zugesetzt und direkt im Anschluß wurde 2 min bei 30°C inkubiert. Dann wurden 50 µl Substratlösung (0,1 mM Lysin/¹⁴C-Lysin, 10 mM Trehalose/¹⁴C-Trehalose, 1 mM Glycerin/¹⁴C-Glycerin) mit einer Aktivität von 600000 cpm zugegeben. Der Ansatz wurde 1 und 2 min bei 30°C inkubiert, anschließend wurden die Vesikel abfiltriert und die Filter (Celluloseacetat, 0,45 µm) im Szintillationszähler (Wallac 1409) vermessen. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Vesikel und mit Vesikel, aber ohne ATP. Außerdem wurde die Gesamtaktivität bestimmt. Für die Aufnahmemessung mit Phosphat wurden 30 µl der Vesikelsuspension mit 120 µl 150 mM K₂HPO₄ (25 mM Mes-Tris pH 7,4, 4 mM MgCl₂) versetzt und 3 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 50 µl 150 mM K₂HPO₄ zugesetzt. Diese Lösung enthielt 0,4 µl ³³P-Phosphat mit einer spezifischen Aktivität von 3000 Ci/mmol. Die Vesikelsuspension wurde 1, 2 und 3 min bei 30°C inkubiert, dann wie oben beschrieben filtriert und vermessen.

2.13.1.2 Bestimmung der α-Mannosidaseaktivität nach Roberts *et al.* (1991)

600 µl 0,1 M Mes-NaOH (pH 6,5, 0,2 % Triton X-100), 200 µl 4 mM p-Nitrophenyl-α-D-Mannopyranosid wurden mit 40 µl Vesikelsuspension gemischt und auf 1000 µl mit Wasser aufgefüllt. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mit 1000 µl 0,5 M Glycin/Na₂CO₃ (pH 10) abgestoppt und die Extinktion bei 400 nm im Photometer vermessen (bis 1,5 linear). Anschließend wurde die spezifische Enzymaktivität ausgerechnet.

2.13.2 Permeabilisierung der Plasmamembran mit Cu-Ionen

Die Fraktionierung von Zellen in Vakuolen und Cytosol wurde nach einer modifizierten Version des Protokolls von Ohsumi *et al.* (1988) durchgeführt. Die Zellen der Stämme einer Fragestellung wurden über Nacht in 5 ml SCD herangezogen und auf eine OD₆₀₀ von 4 mit SCD verdünnt. Gegebenenfalls wurde ein Hitzeschock bei 52°C im Thermomixer (Eppendorf) bei 800 rpm durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 2000 rpm abzentrifugiert (4°C), zweimal mit Wasser gewaschen und in 1000 µl 2,5 mM K₂PO₄ (pH 6,0) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit verschiedenen Volumina CuCl₂-Lösung versetzt, was zu folgenden Endkonzentrationen führte: 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 4 mM und 40 mM. Kontrollen ohne Zellen oder ohne CuCl₂ wurden durchgeführt. Die Proben wurden 10-20 min bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden mittels einer speziell modifizierten Filterapparatur über einen Nylonfilter (0,2 µM) abfiltriert. Danach zweimal mit 500 µl 2,5 mM K₂PO₄ (pH 6,0) gewaschen. Alle Filtrate wurden gesammelt und

vereinigt (cytosolischer Extrakt). Der Filter wurde nochmals mit 5 ml Puffer gewaschen. Anschließend wurde der Filter in ein Reaktionsgefäß überführt, was mit 1000 µl Wasser befüllt und 15 min bei 99°C im Thermomixer (1400 rpm) inkubiert wurde. Die Suspension wurde für 15 min bei 13200 rpm zentrifugiert und der Überstand (vakuolärer Extrakt) abgenommen.

2.14 Mikroskopie

2.14.1 Vitalfärbung

Die Vitalfärbung wurde nach der Methode von Sivadon *et al.* (1997) durchgeführt. Dieser Test beruht auf der Fähigkeit intakter Zellen den in die Zelle diffundierenden Farbstoff Metylenblau aktiv wieder zurück ins Medium zu transportieren. 100 µl einer Zellkultur wurden durch Zentrifugation pelletiert, in 200 µl Färbelösung (2% Trinatriumcitrat, 0,01% Metylenblau) resuspendiert und anschließend 10 min bei 30°C geschüttelt. Im Mikroskop erschienen vitale Zellen weiß, tote Zellen waren blau gefärbt.

2.14.2 Fluoreszenzmikroskopie

Vitale, unfixierte Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop untersucht (Axioskop, Zeiss). Für GFP-Analysen wurde der Filtersatz 13, für Färbungen mit CMAC der Filtersatz 01 (Zeiss) verwendet. Bilder der untersuchten Zellen wurden mit einer digitalen Kamera (AxioCam, Zeiss) aufgenommen und mit Hilfe der Software Photoshop 7.0 (Adobe) ausgewertet.

2.14.2.1 Vakuolenfärbung mit CMAC

Das Lumen der Hefevakuole wurde mit 7-Amino-4-Chloromethylcoumarin (CMAC, Molecular Probes) angefärbt (Stefan und Blumer, 1999). Es wurde eine Stammlösung des Farbstoffs mit einer Endkonzentration von 10 mM in DMSO hergestellt. Zu Beginn des jeweiligen Experiments wurde eine Arbeitslösung (25 µM) in SCD angesetzt. Zellen wurden über Nacht in SCD herangezogen, dann pelletiert und in der Arbeitslösung resuspendiert. Die Zellen wurden für 30 min bei 30°C inkubiert, dann abzentrifugiert, in SCD resuspendiert und nochmals für 30 min bei 30°C inkubiert. Dann wurden die Zellen in PBS gewaschen und im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

2.15 Zuckeranalytik

2.15.1 Zuckeranalytik mittels RI-Detektion

Zur Standardanalytik von Zuckern wurde ein BioLC-Chromatographie-System (Dionex) eingesetzt, was aus den folgenden Komponenten bestand: Gradientenpumpe GS50, RI-Detektor Shodex RI-101, Säulenofen TCC-100, Autosampler AS50. Die Trennung erfolgte isokratisch über die Säule Nucleogel 810H (Macherey-Nagel) bei einer Flußrate von 0,6 ml/min und einer Temperatur von 65°C, wobei Schwefelsäure in einer Konzentration von 5 mM als Laufmittel diente. Die Meßzelle des RI-Detektors wurde auf 50°C temperiert. Die Steuerung der Anlage und Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Chromatographie-Software Chromeleon 6.5 (Dionex). Zum Ansetzen der Eluenten wurde Reinstwasser (18,2 MΩ/cm) aus dem „Labwater“-System (ELGA) verwendet, außerdem wurden alle Eluenten filtriert (0,2 µm) und mit He 4.6 entgast.

2.15.2 Zuckeranalytik über amperometrische Detektion

Um sensitivere Analysen durchzuführen, wurde das oben beschriebene BioLC-System mit dem elektrochemischen Detektor ED50A (Dionex) kombiniert. Die Trennung erfolgte isokratisch über die Säule CarboPacMA1 (Dionex) bei einer Flußrate von 0,4 ml/min und einer Temperatur von 30°C (Weitzhandler *et al.*, 1998). In diesem Fall diente als Laufmittel NaOH in einer Konzentration von 600-800 mM. Vor die Säule wurde eine „BorateTrap“ (Dionex) geschaltet, um eventuelle Borat-Ionen aus dem Eluenten abzufangen. Somit konnte eine Bindung von Borat-Ionen auf die Säule verhindert werden. Eluenten wurden mit Reinstwasser angesetzt, sofort filtriert (0,2 µm) und entgast. Das Ansetzen der Eluenten wurde so schnell wie möglich durchgeführt, um das Lösen von CO₂ im Eluenten zu verhindern. Der Detektor ED50A für die gepulste amperometrische Detektion der Kohlenwasserstoffe wurde mit der Wellenform „Carbohydrates quad potential“ bei einer „Data collection rate“ von 1 Hz betrieben. Für die Referenzelektrode wurde die Einstellung Ag/AgCl gewählt. Steuerung und Auswertung erfolgten mittels Chromeleon 6.5 (Dionex).

2.15.3 Probenvorbereitung

Proben, die mittels BioLC analysiert werden sollten, wurden mit $\frac{1}{10}$ Volumen 50%iger Sulfosalicylsäure versetzt, um die Proteine auszufällen. Dann wurde 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mittels Filterröhrchen (Nylon, 0,2 µm, Alltech) filtriert. Das Filtrat wurde gegebenenfalls verdünnt und für die Analyse eingesetzt.

2.15.4 Ansetzen der Standards

Es wurden 10%ige [w/v] Lösungen der Standards hergestellt. Das Ansetzen erfolgte in geeichten 10 ml Meßkölbchen (Schott). Die Standards wurden je nach Detektionsvariante in Endkonzentrationen von 0,005 bis 1% eingesetzt.

2.16 Spezielle Methoden für *S. cerevisiae*

2.16.1 Herstellung von Verdünnungsreihen

Hefezellen wurden über Nacht in synthetischem Kompletmedium herangezogen. Dann wurde die optische Dichte bei 600 nm bestimmt und die Zellen auf die gleiche OD₆₀₀ (1-2) in Wasser verdünnt. Gegebenenfalls wurden die Zellen einmal mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden in Mikrotiterplatten serielle 1:5 Verdünnungsreihen in Wasser hergestellt und je 3 µl der Zellsuspensionen auf Agarplatten (SC) getropft. Diese wurden dann 2 (3) Tage bei 30°C (37°C) inkubiert.

2.16.2 Bestimmung der Thermotoleranz

Die Hefezellen wurden über Nacht herangezogen, dann auf gleiche OD₆₀₀ (2-4 je nach Stamm) in einem Endvolumen von 1000 µl verdünnt und im Thermomixer (Eppendorf) bei 800 rpm bei 52°C bis zu 2 h inkubiert. Anschließend wurden serielle 1:5 Verdünnungsreihen (in Wasser) in Mikrotiterplatten hergestellt, je 3 µl der Zellsuspensionen auf Agarplatten (SCD oder YEPD) getropft und diese 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

2.16.3 Bestimmung der Überlebensrate nach hypoosmotischem Schock nach Tamas *et al.* (1999)

Hefezellen wurden über Nacht in YEPD-Medium mit 1 M Sorbitol kultiviert, danach wurde die optische Dichte bei 600 nm bestimmt und die Zellsuspension auf eine OD₆₀₀ von 1 entweder in Wasser (hypoosmotischer Schock) oder in YEPD mit 1 M Sorbitol (Kontrolle) verdünnt. Es wurden serielle 1:5 Verdünnungsreihen der Zellsuspensionen hergestellt und je 3 µl davon auf YEPD (hypoosmotischer Schock) oder YEPD mit 5% NaCl (Kontrolle) getropft. Die Platten wurden bei 30°C (37°C) für 2-3 Tage inkubiert.

2.16.4 Kreuzung und Sporulation von Hefestämmen

Haploide Hefezellen der Paarungstypen *MATa* und *MATα* wurden übereinander auf YEPD-Medium ausgestrichen oder alternativ in Flüssigmedium herangezogen und dann

übereinander getropft. Die Platten wurden einen Tag bei Raumtemperatur inkubiert. Die diploiden Zellen wurden dann auf Sporulationsmedium übertragen, und die Platten wurden 5-7 Tage bei 22°C im Brutschrank inkubiert (Sherman, 1991).

2.16.5 Tetradenanalyse

Zellen, die 5-7 Tage auf Sporulationsmedium inkubiert worden waren, wurden mit einer Impföse abgenommen und in 200 µl Zymolyase-Lösung (2 mg/ml) vorsichtig resuspendiert. Nach 3 min wurde die Suspension durch Zugabe von 800 µl Wasser verdünnt und 20 µl der Verdünnung auf eine YEPD-Agarplatte getropft. Der Tropfen wurde auf der Platte nach unten laufen gelassen, so daß eine ca. 1 cm breite Spur von Zellen und Tetraden bedeckt war. Nach Eintrocknen der Suspension konnten die Sporen mit Hilfe des Mikromanipulators (Singer Instruments) vereinzelt werden (Sherman und Hicks, 1991). Nach Vereinzeln wurden die Sporen 2-3 Tage bei 30°C inkubiert und anschließend auf Medien mit den entsprechenden Selektionsmarkern gestempelt.

2.16.6 Synthetic Genetic Array (SGA)

Um synthetische Interaktion zwischen Genen zu identifizieren, kam das Verfahren des „Synthetic Genetic Array“ (Tong *et al.*, 2001) zum Einsatz. Es wurde ein Ausgangsstamm mit dem Paarungstyp *MAT α* konstruiert, der neben der Deletion der Gene der Fragestellung (*YBR241C*, *YGL104C*), das *MFA1prHIS3-URA3*-Reporterkonstrukt trug. Das Reporterkonstrukt war in den *CANI*-Locus integriert worden. Dieser Stamm wurde auf einer großen YEPD-Agarplatte ausgestrichen. Nachdem der Stamm hochgewachsen war, wurde er von dieser Platte mit einem 96 Pin Replicator auf neue YEPD-Platten übertragen. Auf diese Platten wurde dann die Stammsammlung (EUROSCARF) mit dem Paarungstyp *MAT α* aus Mikrotiterplatten gestempelt. Zum Stempeln wurde eine Schablone (modifizierter Deckel) verwendet, damit die einzelnen Stämme immer auf den gleichen Punkt gestempelt werden konnten. So wurde jeder einzelne Stamm aus der Stammsammlung auf den Ausgangsstamm gestempelt. Diese Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte die Paarung der Deletionsmutanten der Stammsammlung mit dem Ausgangsstamm. Zur Diploidselektion wurden die Zellen auf synthetisches Kompletmedium mit G418 und clonNAT, aber ohne Leucin übertragen und über Nacht bei 30°C bebrütet. Die resultierenden Diploiden wurden dann auf Sporulationsmedium gestempelt und 5 Tage bei 22°C im Brutschrank inkubiert. Um auf die haploide Nachkommenschaft des Paarungstyps *MAT α* zu selektieren, wurde auf Haploidselektions-Medium (SCD His⁻, Arg⁻, Ura⁻, 50 mg/l Canavanin) gestempelt und die

Platten zwei Tage bei 30°C inkubiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, allerdings wurde die Inkubation bei 30°C auf einen Tag verkürzt. Die haploiden Zellen wurden auf zwei Arten von Endselektionsmedium übertragen: Erstens auf Medium (SCD G418, His⁻, Arg⁻, Ura⁻, Canavanin), durch das nur auf die Deletion aus der Stammsammlung selektiert wurde. Zweitens auf Medium (SCD G418, clonNAT, Leu⁻, His⁻, Arg⁻, Ura⁻, Canavanin), durch das auf alle Deletionen selektiert wurde. Der Vergleich der Platten konnte synthetische Interaktionen aufdecken, die dann über eine Tetradenanalyse bestätigt wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Uncharakterisierte Mitglieder der Zuckertransporterfamilie

Die Familie der Zuckertransporter ist eine Unterfamilie der „major facilitator superfamily“. Dieser Unterfamilie werden 34 Mitglieder (Nelissen *et al.*, 1997) zugeordnet, darunter die Hexosetransporter, die Maltosetransporter, die Glucoserezeptoren, die Inositoltransporter, ein Glycerintransporter (Ferreira *et al.*, 2005), ein Phosphattransporter (Bun-Ya *et al.*, 1991), ein Glycerophosphoinositol-Transporter (Patton-Vogt und Henry, 1998) und fünf Proteine unbekannter Funktion. Für zwei uncharakterisierte Mitglieder der Zuckertransporterfamilie codieren die Gene *YBR241C* und *YGL104C*. Beide Gene wurden aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie (47,4% Identität) in dasselbe Cluster eingeordnet. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die subzelluläre Lokalisation und die physiologische Funktion dieser uncharakterisierten Transportproteine analysiert werden.

3.1.1 Analyse der subzellulären Lokalisation der uncharakterisierten Transportproteine Ybr241 und Ygl104

Eine genomweite Analyse mittels GFP-Fusionen ergab eine Lokalisation von Ybr241 in der vakuolären Membran (Huh *et al.*, 2003). Des Weiteren wurde das Gen *YGL104C* in einer genomweiten Suche nach Mutanten gefunden, die Carboxypeptidase Y (CPY) (Bonangelino *et al.*, 2002) sekretieren. Derartige Mutanten weisen oft Defekte im Transport vakuolärer Proteine zu ihrem Bestimmungsort, der Vakuole, auf. Deshalb werden sie auch als „vacuolar protein sorting“-Mutanten bezeichnet und Ygl104 dementsprechend als Vps73. Diese Ergebnisse deuten im Fall von Ybr241 sehr stark auf eine Lokalisation in der vakuolären Membran hin, im Fall von Ygl104 zumindest auf eine Assoziation mit der Vakuole. Da Ybr241 und Ygl104 der Zuckertransporterfamilie angehören, sind das starke Hinweise darauf, daß es sich bei Ybr241 und Ygl104 um vakuoläre Zuckertransporter handelt. Bislang konnten sowohl in Hefen allgemein als auch in *S. cerevisiae* keine vakuolären Zuckertransporter charakterisiert werden. Bekannt sind hingegen vakuoläre Aminosäure- (Shimazu *et al.*, 2005) und Ionentransporter (Rees *et al.*, 2004). Da es sich bei den Daten zur Lokalisation von Ybr241 um weniger zuverlässige „high throughput“-Daten handelt, sollte die vakuoläre Lokalisation mit alternativen Methoden bestätigt werden. Die subzelluläre Lokalisation von Ygl104 sollte aufgeklärt werden.

3.1.1.1 Analyse der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation und Western-Blot

3.1.1.1.1 Zellfraktionierung durch einen kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten

Um Ybr241 und Ygl104 nachzuweisen, wurde die codierende Sequenz eines 3xHA-Epitops über homologe Rekombination genomisch integriert. Die Integration erfolgte jeweils am 3'-Ende der codierenden Region und wurde über eine PCR-Analyse bestätigt. Aufgrund der genomischen Integration blieb das Gen von Interesse unter Kontrolle des endogenen Promotors. Folglich wurde die Stärke der Genexpression kaum beeinflusst. Die auf diese Weise konstruierten Stämme wurden als CFY01HA und CFY02HA bezeichnet. Von diesen Stämmen wurden Rohextrakte hergestellt und mittels Western-Blot mit Antikörpern gegen das HA-Epitop auf die Fusionen Ybr241-HA und Ygl104-HA untersucht. Allerdings wies der belichtete Röntgenfilm sehr viele unspezifische Banden auf (nicht gezeigt), und es war nicht möglich, die entsprechenden Banden der Fusionsproteine zu identifizieren.

Da die HA-Fusionen nicht detektierbar waren, wurde zur Analyse der Lokalisation von Ybr241 ein kommerziell erhältlicher Stamm (Open Biosystems) verwendet, der am 3'-Ende des Gens die chromosomal integrierte Sequenz eines „tandem affinity“ (TAP)-tags enthält (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Von diesem Stamm (S288C-YBR241-TAP) wurde ein Rohextrakt hergestellt und mittels Western-Blot mit Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Antikörpern analysiert. Da das Ybr241-TAP-Fusionsprotein nachgewiesen werden konnte, wurde dieser Rohextrakt durch einen kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten (Kolling und Hollenberg, 1994) fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden über eine Western-Blot-Analyse auf die Präsenz des Ybr241-TAP-Fusionsproteins, auf die eines Markerproteins der vakuolären Membran (alkalische Phosphatase ALP) und auf die eines Markerproteins der Plasmamembran (ATPase Pma1) untersucht. Zur immunologischen Detektion wurden PAP-Antikörper und spezifische Antikörper gegen ALP und Pma1 eingesetzt. Die Intensität der Signale aus der Western-Blot-Analyse sollte quantifiziert werden. Deshalb wurden die entsprechenden Röntgenfilme eingescannt und mit dem Programm Scion Image (Scion Corporation) densitometrisch ausgewertet. Die Intensität des stärksten Signals wurde als 100% definiert. Die Fraktionen 8 bis 14 enthielten überwiegend Ybr241-TAP und ALP. Pma1 akkumulierte in den Fraktionen 11 bis 18 (Abb. 3.1). Ergebnis war also eine eindeutige Co-Lokalisation von Ybr241-TAP mit dem

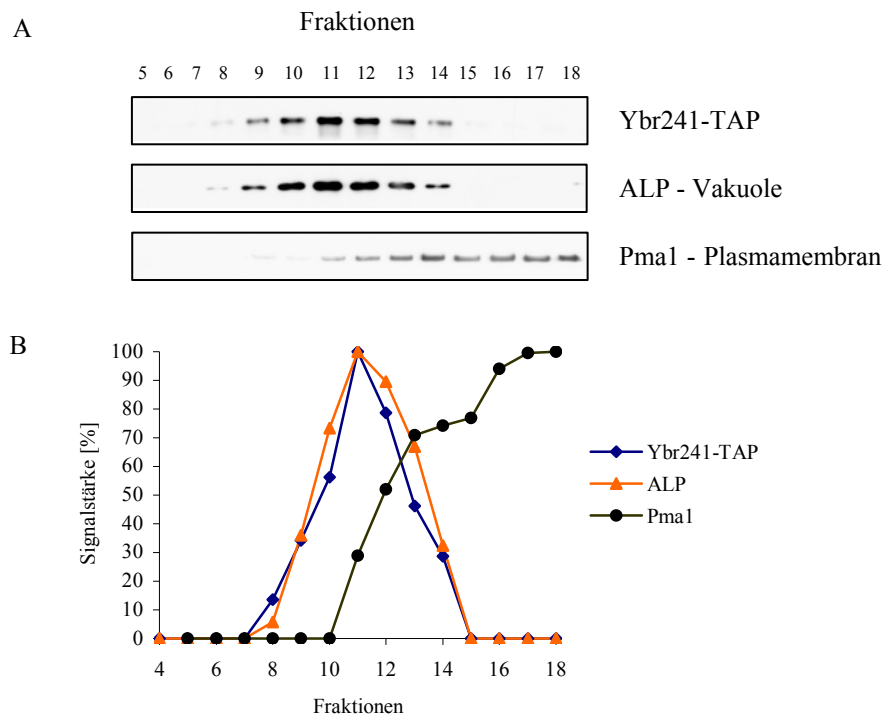


Abb. 3.1: Fraktionierung eines Rohextraktes des Stammes S288C-YBR241-TAP durch einen kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten. Mittels Western-Blot wurden die Fraktionen auf die Anwesenheit des Ybr241-TAP-Fusionsproteins sowie der Markerproteine ALP und Pma1 untersucht (A). Zum Einsatz kamen PAP-Antikörper und spezifische Antikörper gegen die Markerproteine. Die Signale aus der Western-Blot-Analyse wurden durch eine densitometrische Auswertung quantifiziert, wobei das stärkste Signal als 100% definiert wurde. Die Signalintensität wurde gegen die Fraktionsnummer aufgetragen (B). Fraktionen 1 bis 4 sind nicht dargestellt, da sie keines der gesuchten Proteine enthielten. Fraktion 1 hat die geringste Dichte.

Markerprotein ALP, was stark auf eine Lokalisation von Ybr241 in der vakuolären Membran hindeutet. Ein Stamm, der eine *YGL104C-TAP*-Fusion exprimiert, ist nicht kommerziell erhältlich. Deswegen sollte ein solcher Stamm konstruiert werden. Das Stopcodon des *YGL104C*-Gens wurde über homologe Rekombination durch die codierende Sequenz des TAP-Tags ersetzt. Die einwandfreie Integration wurde durch PCR-Analyse und DNA-Sequenzierung bestätigt. Trotzdem war ein Nachweis des Fusionsproteins durch Western-Blot mit PAP-Antikörpern nicht möglich.

Um das Problem des Nachweises von Ygl104 zu bewältigen, wurden die Plasmide p426HXT7-HISYBR241 und p426HXT7-HISYGL104 über homologe Rekombination konstruiert und durch DNA-Sequenzierung überprüft. Die Gene *YBR241C* und *YGL104C* sollten so unter Kontrolle der verkürzten Version des *HXT7*-Promotors überexprimiert werden. Die Verkürzung des *HXT7*-Promotors führt normalerweise zu einer starken, konstitutiven Expression der kontrollierten Gene. Ferner handelt es sich hier um 2 μ -

Plasmide, die in hoher Kopienzahl vorliegen, was die Expression weiter verstärkt. Durch die Überexpression sollte ein Nachweis des Proteins Ygl104 möglich werden. Außerdem wurde Ybr241 als Positivkontrolle parallel untersucht. Zum Detektieren in der Western-Blot-Analyse diente ein N-terminales Hexahistidin-Epitop, gegen das Penta-His-Antikörper verwendet wurden. Nur die Positivkontrolle, das 6xHis-Ybr241-Fusionsprotein, konnte detektiert werden. Hingegen war ein Nachweis von 6xHisYgl104 nicht möglich.

Da auch durch Einsatz eines konstitutiven Promotors offenbar keine stabile Überproduktion des Proteins Ygl104 erreichbar war, wurden die 2 μ -Plasmide BG-YBR241-TAP und BG-YGL104-TAP mit induzierbarem *GALI*-Promotor verwendet (Gelperin *et al.*, 2005). Diese bei Open Biosystems erhältlichen Plasmide codieren für die offenen Leserahmen von *YBR241C* bzw. *YGL104C*, an deren 3'-Ende die Sequenz eines TAP-Tags fusioniert ist. Die Gene stehen unter Kontrolle des *GALI*-Promotors, der sich durch Galactosezugabe in Abwesenheit von Glucose induzieren läßt. Es wurde der Hefestamm CEN.PK2-1C mit diesen Plasmiden transformiert, bis in die exponentielle Wachstumsphase herangezogen, die Produktion der Proteine durch Galactosezugabe induziert und Rohextrakte hergestellt. Durch Western-Blot-Analyse mit PAP-Antikörpern konnten beide Fusionsproteine nachgewiesen werden. Demnach war bei Überexpression mittels *GALI*-Promotor auch *YGL104C* detektierbar. Anschließend wurden die Rohextrakte über einen kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten fraktioniert. Die Fraktionen wurden mittels Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit der Fusionsproteine Ybr241-TAP und Ygl104-TAP, der vakuolären ATPase-Untereinheit Vph1, der ER-Dolichol-Phosphat-Mannose-Synthase Dpm1 und der Plasmamembran-ATPase Pma1 untersucht. Zum immunologischen Nachweis wurden PAP-Antikörper und spezifische Antikörper gegen die Markerproteine verwendet, und die Intensität der Signale aus der Western-Blot-Analyse wurde über eine densitometrische Auswertung quantifiziert. Die Transporter Ybr241 und Ygl104 waren überwiegend in den Fraktionen 6 bis 14 zu finden (Abb. 3.2). Da diese Fraktionen auch das Markerprotein der Vakuolenmembran Vph1 enthielten, repräsentierten diese Fraktionen die vakuoläre Membran. Das war ein deutlicher Hinweis auf eine Lokalisation der beiden Transporter in der vakuolären Membran. Dennoch enthielt ein Teil dieser Fraktionen auch das Markerprotein des ER (Dpm1), und auch die densitometrische Auswertung ergab gleiche Maxima für ER und Vakuole. Somit konnte eine Lokalisation der Transporter in der ER-Membran nicht völlig

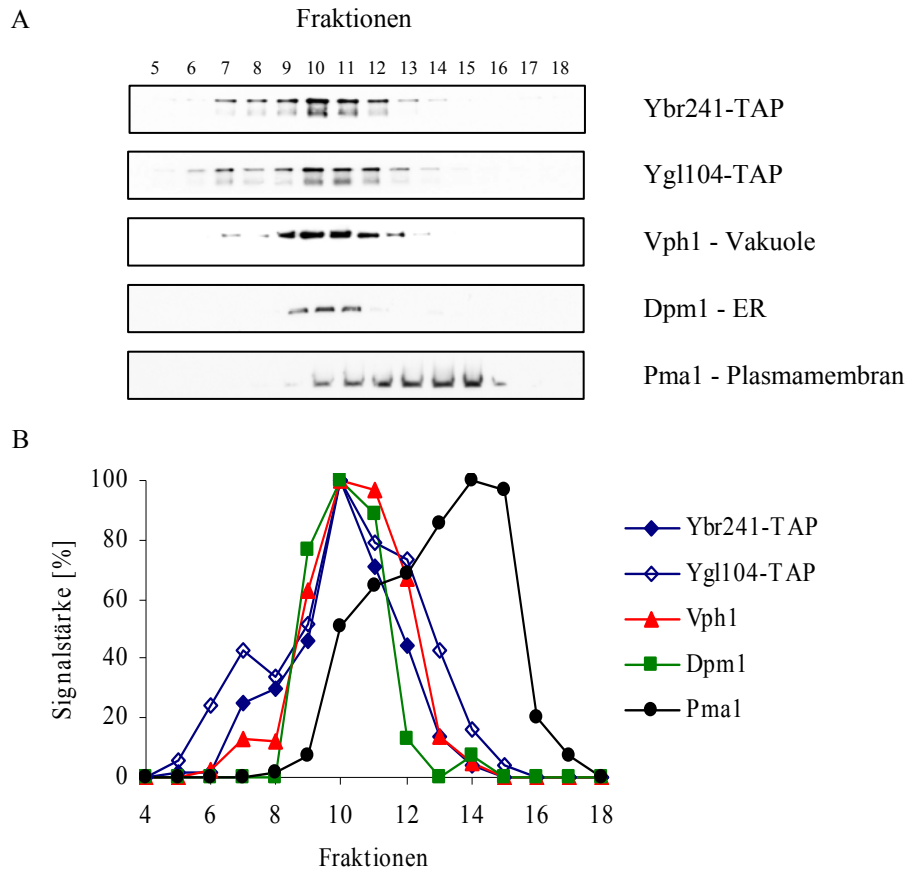


Abb. 3.2: Fraktionierung von Rohextrakten des Stammes CEN.PK2-1C, der die Fusionsproteine Ybr241-TAP bzw. Ygl104-TAP produziert, durch einen kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten. Mittels Western-Blot wurden die Fraktionen auf die Anwesenheit des Ybr241-TAP- bzw. des Ygl104-TAP-Fusionsproteins sowie der Markerproteine Vph1, Dpm1 und Pma1 untersucht (A). Zum Einsatz kamen PAP-Antikörper und spezifische Antikörper gegen die Markerproteine. Die Signale aus der Western-Blot-Analyse wurden densitometrisch ausgewertet und gegen die Fraktionsnummer aufgetragen (B). Die Fraktionen 1 bis 4 sind nicht dargestellt, da sie keines der gesuchten Proteine enthielten. Die geringste Dichte besitzt Fraktion 1.

ausgeschlossen werden. Dagegen akkumulierte das Plasmamembran-Protein Pma1 größtenteils in den Fraktionen 9 bis 18, was nahelegt, daß die Transporter nicht in der Plasmamembran lokalisiert sind.

3.1.1.1.2 Zellfraktionierung durch einen zehnstufigen Saccharosedichtegradienten

Um eine bessere Trennung der zellulären Kompartimente zu erreichen, wurden Spheroplastenlysate des Stammes CEN.PK2-1C, der mit dem Plasmid BG-YBR241-TAP oder dem Plasmid BG-YGL104-TAP (Abb. 3.3) transformiert war, durch einen zehnstufigen Saccharosedichtegradienten (Sorin *et al.*, 1997) fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Western-Blot mit den entsprechenden Antikörpern auf die Verteilung der Fusionsproteine (Ybr241-TAP, Ygl104-TAP) und der folgenden

Markerproteine untersucht: Vph1 (vakuoläre ATPase Untereinheit), Dpm1 (Dolichol-Phosphat-Mannose-Synthase des ER), Cox3 (Cytochrom-Oxidase des Mitochondriums) und Pep12 (t-SNARE des Endosoms). Die Verteilung der Markerproteine zeigte eine Separation der vakuolären Membranfragmente von Fragmenten der ER-, Mitochondrium- und Endosomen-Membran. Die Fusionsproteine Ybr241-TAP und Ygl104-TAP konnten den Fraktionen zugeordnet werden, die die vakuoläre Membran repräsentierten. Außerdem befand sich ein Anteil der Gesamtmenge von Ygl104 in den Fraktionen des Endosoms.

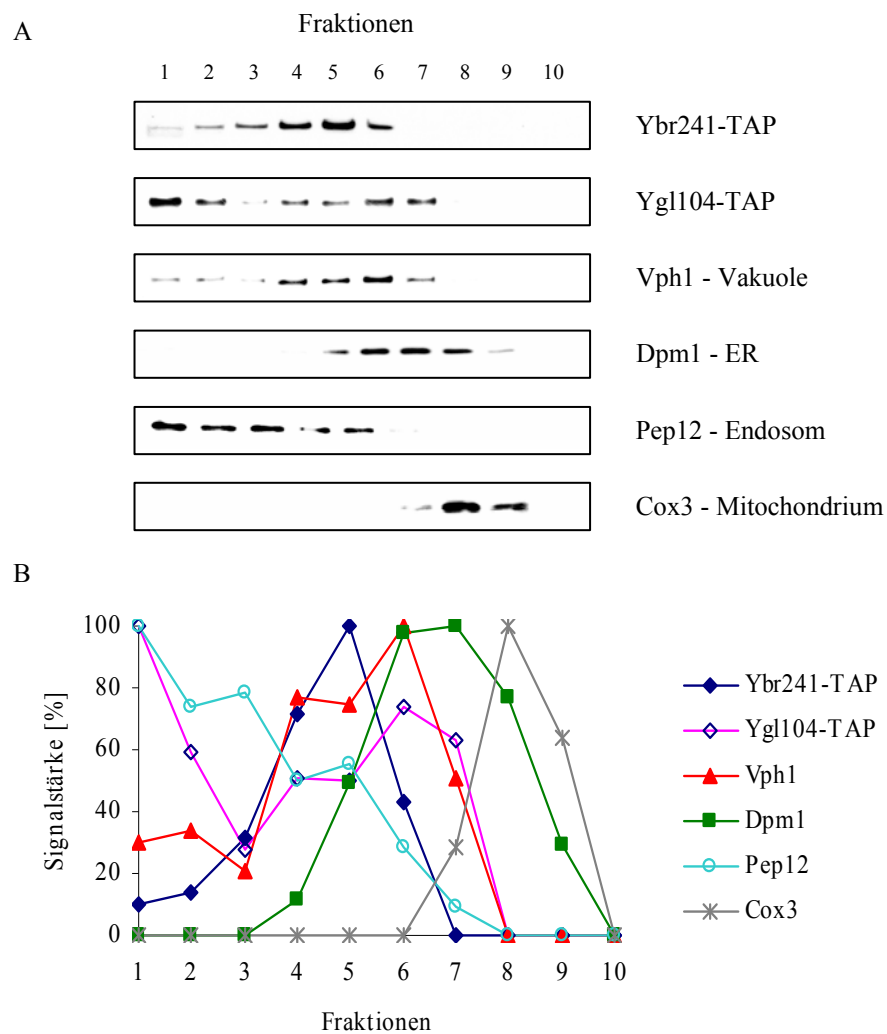


Abb. 3.3: Fraktionierung von Rohextrakten des Stammes CEN.PK2-1C, der das Fusionsprotein Ybr241-TAP oder Ygl104-TAP produzierte, durch einen zehnstufigen Saccharosedichtegradienten. Mittels Western-Blot wurden die Fraktionen auf die Präsenz des Ybr241-TAP- bzw. Ygl104-TAP-Fusionsproteins sowie der Markerproteine Vph1, Dpm1, Pep12 und Cox3 untersucht (A). Zum Einsatz kamen PAP-Antikörper und spezifische Antikörper gegen die Markerproteine. Die Signale aus der Western-Blot-Analyse wurden durch eine densitometrische Auswertung quantifiziert und gegen die Fraktionsnummer aufgetragen (B). Fraktion 1 weist die geringste Dichte auf.

Die Fusion mit Tags kann die subzelluläre Lokalisation von Proteinen beeinflussen. Entscheidend dafür können sterische Effekte der Aminosäureseitenketten auf die Sortierung oder das Verdecken von Sortierungssignalen durch die Tags sein. Eine frühere Studie konnte zeigen, daß auch die vakuoläre Lokalisation eine Folge von verdeckten Sortierungssignalen sein kann (Roberts *et al.*, 1992). Um auszuschließen, daß der C-terminale TAP-Tag für die vakuoläre Lokalisation der Fusionsproteine verantwortlich ist, sollte die Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 bei Fusion mit einem N-terminalen Tag untersucht werden. Bei Expression der Gene *YBR241C* und *YGL104C* von den Plasmiden p426HXT7-HISYBR241 und p426HXT7-HISYGL104 war nur das 6xHisYbr241-Fusionsprotein mittels Western-Blot nachweisbar. Deshalb wurden Plasmide konstruiert, auf denen die offenen Leserahmen, die am 5'-Ende mit der codierenden Sequenz eines Hexahistidin-Epitops fusioniert sind, unter der Kontrolle des induzierbaren *GALI*-Promotors stehen. Unter Kontrolle des *GALI*-Promotors konnte schon Ygl104-TAP detektiert werden. Nach Transformation des Stammes CEN.PK2-1C mit diesen Plasmiden wurden Spheroplastenlysate hergestellt und über Western-Blot mit Penta-His-Antikörpern analysiert. Es konnte wieder nur das 6xHisYbr241-Fusionsprotein detektiert werden. Dieses Spheroplastenlysate wurde durch einen zehnstufigen Saccharosedichtegradienten fraktioniert und die Verteilung der Markerproteine und die des Transporters Ybr241 bestimmt (Abb. 3.4). Auch hier konnte eine vakuoläre Lokalisation festgestellt werden. Sowohl die N- als auch die C-terminale Fusion resultierte für Ybr241 in der gleichen subzellulären Lokalisation. Somit kann höchstwahrscheinlich ein Einfluß der Tags auf die Lokalisation von Ybr241 ausgeschlossen werden. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Zellfraktionierungs-Experimente recht deutlich, daß Ybr241 und Ygl104 in der vakuolären Membran lokalisiert sind. Allerdings scheint zumindest die TAP-Fusion von Ygl104 auch im Endosom lokalisiert zu sein.

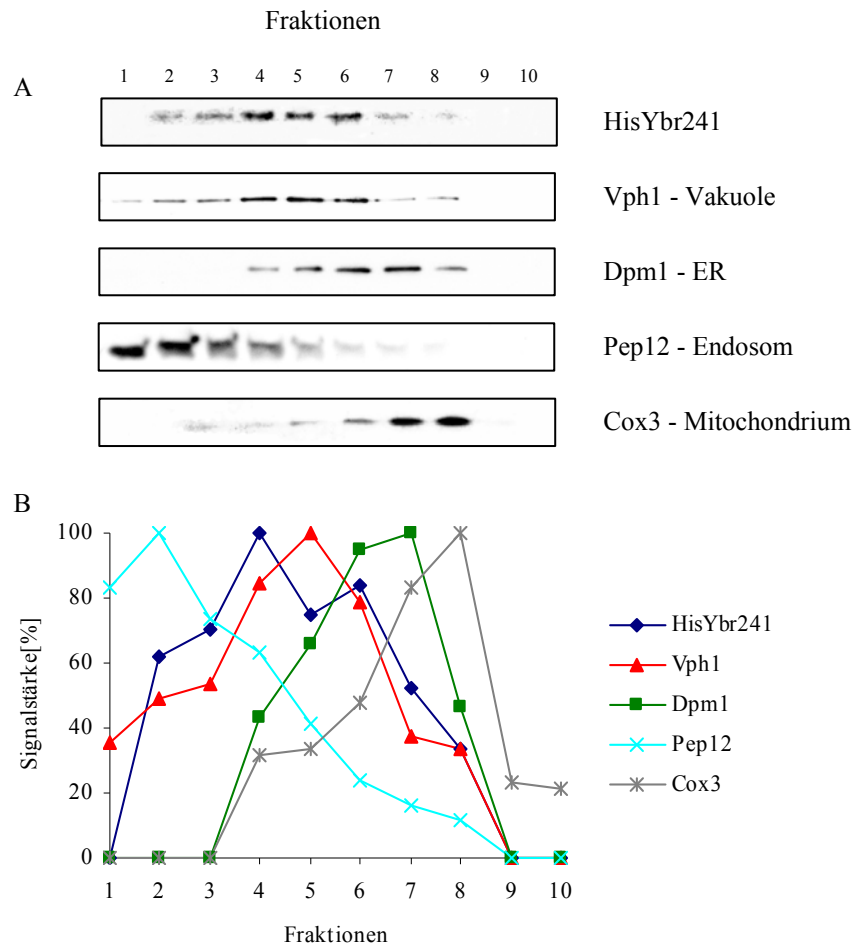


Abb. 3.4: Fraktionierung eines Rohextraktes des Stammes CEN.PK2-1C, der das Fusionsprotein HisYbr241 synthetisierte, durch einen zehnstufigen Saccharosedichtegradienten. Mittels Western-Blot wurden die Fraktionen auf die Anwesenheit des HisYbr241-Fusionsproteins sowie der Markerproteine Vph1, Dpm1, Pep12 und Cox3 untersucht (A). Zum Einsatz kamen Penta-His-Antikörper und spezifische Antikörper gegen die Markerproteine. Die Signale aus der Western-Blot-Analyse wurden durch eine densitometrische Auswertung quantifiziert und gegen die Fraktionsnummer aufgetragen (B). Fraktion 1 hat die geringste Dichte.

3.1.1.2 Analyse der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 mittels Fluoreszenz-Mikroskopie

Um die Ergebnisse der Zellfraktionierungs-Experimente mit einer alternativen Methode zu bestätigen, wurde Fluoreszenzmikroskopie von Hefezellen, die GFP-Fusionen von Ybr241 und Ygl104 produzierten, durchgeführt. Da die Expression mittels 2 μ -Plasmiden mit induzierbarem *GALI*-Promotor am aussichtsreichsten war, wurden die Plasmide pGAL1-YBR241-GFP und pGAL1-YGL104-GFP über homologe Rekombination im Stamm BY4742 konstruiert. Dazu wurde der *yEGFP-ORF* im Leserahmen an das 3'-Ende des *YBR241C*- bzw. des *YGL104C*-Gens fusioniert. Die Gene stehen unter Kontrolle des

induzierbaren *GALI*-Promotors, so konnte die Proteinmenge über die Expressionszeit reguliert werden. Nach erfolgter homologer Rekombination wurden Flüssigkulturen mit Kolonien der Rekombinanten angeimpft und die Synthese der Fusionsproteine durch Galactosezugabe für eine, drei und fünf Stunden induziert. Anschließend wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss) auf Fluoreszenz untersucht. Nach fünf Stunden war bei einigen Rekombinanten Fluoreszenz zu beobachten. Aus diesen wurden die Plasmide isoliert und mittels Restriktionsanalyse überprüft. Nach Retransformation wurden die Zellen abermals fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Stämme zeigten Fluoreszenz an intrazellulären Membranen, die im Vergleich mit dem Interferenzkontrastbild und dem Fluoreszenz-Farbstoff 7-Amino-4-Chloromethylcoumarin (CMAC, Molecular Probes) als vakuolär identifiziert werden konnten (Abb. 3.5). Durch Behandlung der Zellen mit CMAC fluoresziert das Lumen der Vakuole blau. Die Untersuchung der Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte demnach die Ergebnisse der Zellfraktionierung bestätigen: Ybr241 und Ygl104 sind in der vakuolären Membran lokalisiert. Eine endosomale Lokalisation von Ygl104 konnte hingegen nicht festgestellt werden.

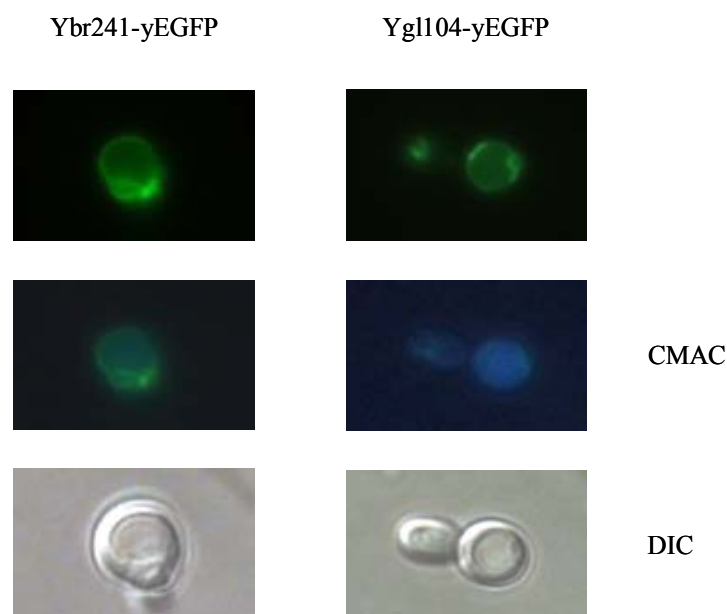


Abb. 3.5: Untersuchung der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 mittels Fluoreszenzmikroskopie. C-terminale GFP-Fusionen wurden von 2 μ -Plasmiden unter Kontrolle des induzierbaren *GALI*-Promotors exprimiert. Das Lumen der Vakuole wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff CMAC blau angefärbt.

3.1.2 Frage nach dem Grund der vakuolären Lokalisation von Ybr241 und Ygl104

Die vakuoläre Lokalisation konnte auf verschiedene Weise interpretiert werden. Entweder es handelt sich tatsächlich um vakuoläre Membranproteine, die am Stoffwechsel der Vakuole beteiligt sind oder Ybr241 und Ygl104 sind Plasmamembran-Transporter mit extrem kurzen Halbwertszeiten, die nur zum Abbau in die Vakuole befördert werden. Zum Abbau werden Plasmamembran-Transporter ubiquitiniert, dann durch Endocytose internalisiert und über das frühe Endosom zum MVB transportiert. Anschließend werden diese Membranproteine in Vesikel sortiert, die sich während der Bildung des MVB in das Lumen des Endosoms abschnüren. Nach der Fusion des MVB mit der Vakuole erreichen diese Proteine das Lumen der Vakuole, wo sie dann degradiert werden (Hicke, 1997; Odorizzi *et al.*, 1998). Gegen Abbau sprachen die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie, da die Fluoreszenz an der vakuolären Membran und nicht im Lumen der Vakuole lokalisiert war. Allerdings konnte ein Teil der Gesamtmenge von Ygl104 in der Vakuole, ein Anteil aber auch im Endosom detektiert werden. Diese ungleichmäßige subzelluläre Verteilung könnte wiederum ein Indiz für den Abbau von Ygl104 in der Vakuole sein. Damit sicher zwischen den Alternativen Abbau und residenter Lokalisation unterschieden werden konnte, sollte die Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in Mutanten mit Defekten in Ubiquitinierung und zusätzlich in Mutanten mit Defekten in Endocytose untersucht werden.

3.1.2.1 Analyse der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in einer *rsp5*-Mutante

Da Rsp5-vermittelte Ubiquitinierung als Signal für die proteolytische Degradation einer Reihe von Plasmamembran-Transportern fungiert, sollte die Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in einer *rsp5*-Mutante untersucht werden. *RSP5* ist ein essentielles Hefegen, das für eine Ubiquitin-Protein-Ligase codiert, die Proteine durch Konjugation von Ubiquitin an Lysinresten modifiziert (Huibregtse *et al.*, 1997). Rsp5 besteht aus einer N-terminalen C2 Domäne, drei WW-Domänen und einer C-terminalen HECT-Domäne (Wang *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, daß die C2-Domäne für die essentielle *in vivo* Funktion entbehrlich ist, aber nicht für die genaue Lokalisierung von Rsp5 (Wang *et al.*, 1999). Ein Rsp5-Protein, dessen C2-Domäne fehlt, kann noch ubiquitinieren, trotzdem werden die zu degradierenden Proteine anschließend nicht mehr endocytiert. Frühere Studien konnten zeigen, daß die Halbwertszeiten der Plasmamembran-Proteine Gap1 (Springael *et al.*, 1999) und Fur4 (Wang *et al.*, 2001) in *rsp5Δc2*-Stämmen verlängert waren. Wenn Ybr241 und Ygl104 Plasmamembran-Proteine mit extrem kurzen Halbwertszeiten sind, d.h. diese

Proteine sehr schnell zum Abbau in die Vakuole befördert werden, könnte deren Aufenthalt in der Plasmamembran einer solchen Mutante ebenfalls verlängert sein. So könnte der Nachweis von Ybr241 und Ygl104 mittels Zellfraktionierung und Western-Blot in den Fraktionen, die die Plasmamembran repräsentieren, möglich werden. Verwendet wurde der Stamm DVY09 (Voss, 2005), der ein *RSP5*-Gen mit deletierter C2-Domäne trägt. Dieser Stamm wurde mit den Plasmiden BG-YBR241-TAP und BG-YGL104-TAP transformiert, anschließend wurde die Expression durch Galactosezugabe induziert, dann Rohextrakte hergestellt und mittels kontinuierlichem Saccharosedichtegradienten fraktioniert. Danach wurden die Fraktionen auf die Anwesenheit von Ybr241, Ygl104 und die der Markerproteine Vph1 und Pma1 untersucht, mit dem Ergebnis, daß keine Akkumulation von Ybr241 und Ygl104 in den Plasmamembran-Fraktionen nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.6). Das bedeutet, daß Ybr241 und Ygl104 nicht Rsp5-vermittelt abgebaut werden, was nahe legt, daß es sich tatsächlich um vakuoläre Membranproteine handelt.

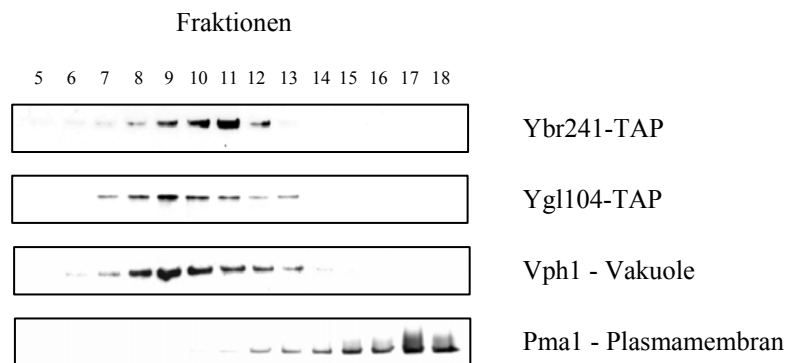


Abb. 3.6: Analyse der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in einer *Δc2rsp5*-Mutante. Der Stamm DVY09, der die Fusionsproteine Ybr241-TAP bzw. Ygl104-TAP produzierte, wurde durch einen kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten fraktioniert. Die Fraktionen wurden mittels Western-Blot auf die Präsenz der Fusionsproteine Ybr241-TAP und Ygl104-TAP sowie der Markerproteine Vph1 und Pma1 untersucht.

3.1.2.2 Analyse der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in Endocytose-Mutanten

Um sicherzugehen, daß Ybr241 und Ygl104 nicht von Rsp5 unabhängig über Endocytose internalisiert werden, wurde die subzelluläre Lokalisation in den Endocytose-Mutanten *end3* und *end4* untersucht. Diese Mutanten haben Defekte in frühen Schritten des Endocytose-Prozesses (Raths *et al.*, 1993). Wenn Ybr241 und Ygl104 aufgrund schneller Degradation nur kurz an der Plasmamembran bleiben, sollten sie in *end3* und *end4* Mutanten stabilisiert sein, da in solchen Mutanten keine Endocytose von Plasmamembran-Proteinen mehr stattfindet. Entsprechendes konnte für den ABC-Transporter Ste6 gezeigt

werden, der unter normalen Bedingungen mit intrazellulären Membranen assoziiert ist, aber in Endocytose-Mutanten in der Plasmamembran akkumuliert (Kolling und Hollenberg, 1994). Daher wurden Zellfraktionierungs-Experimente durchgeführt, wie für die *rsp5*-Mutante beschrieben. Es wurden die Stämme BY4742 *end3* (EUROSCARF) und SKY39 (*end4*, Krampe, 2001) verwendet. Die Transporter Ybr241 und Ygl104 wurden in den Fraktionen detektiert, die hauptsächlich die vakuoläre Membran repräsentierten und nicht die Plasmamembran (Abb. 3.7), was demonstriert, daß Ybr241 und Ygl104 die Vakuole über einen Weg erreichen, der unabhängig von Endocytose ist. Folglich werden die beiden Proteine wahrscheinlich über einen der Transportwege für vakuoläre Proteine zur Vakuole befördert.

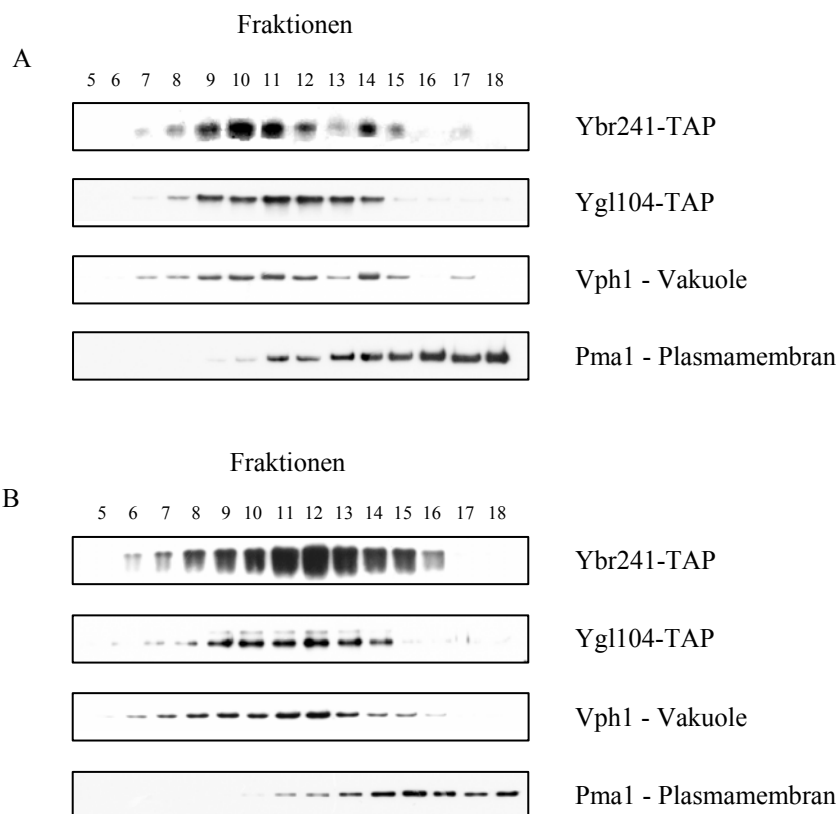


Abb. 3.7: Analyse der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in *end3*-(A) und *end4*-Mutanten (B) Die Stämme BY4742 *end3* und SKY39, die die Fusionsproteine Ybr241-TAP bzw. Ygl104-TAP produzierten, wurden mittels kontinuierlichem Saccharosedichtegradienten fraktioniert. Die Fraktionen wurden über Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit der Fusionsproteine Ybr241-TAP und Ygl104-TAP sowie auf die der Markerproteine Vph1 und Pma1 untersucht.

3.1.3 Ermittlung des Transportweges zur Vakuole

In *S. cerevisiae* werden Proteine über eine ganze Reihe von verschiedenartigen Stoffwechselwegen zur Vakuole befördert. Es besteht die Möglichkeit des Transports zur Vakuole über Endocytose oder die direkte Aufnahme der Proteine aus dem Cytoplasma („cytoplasm to vacuole targeting“, Cvt). Allerdings passiert der Großteil der vakuolären Proteine die frühen Stufen des sekretorischen Wegs und erst im späten Golgi-Apparat trennen sich die Transportwege. Proteine, deren Zielort die Vakuole ist, werden von den Proteinen separiert, die zur Plasmamembran befördert werden sollen. Vom Golgi-Apparat zur Vakuole sind in der Literatur als Haupttransportrouten der CPY- und der ALP-Weg beschrieben. Diese Routen sind jeweils nach der am besten untersuchten Fracht, nämlich der Carboxypeptidase Y (CPY) bzw. der alkalische Phosphatase (ALP) benannt. Proteine, die über den CPY-Weg befördert werden, erreichen die Vakuole vom Golgi-Apparat über das späte Endosom. Fracht, die den ALP-Weg nutzt, wird vom Golgi-Apparat direkt zur Vakuole transportiert (Bryant und Stevens, 1998).

Die Transportprozesse, die die Proteine Ybr241 und Ygl104 zur Vakuole bringen, sollten in Zellfraktionierungs-Experimenten näher charakterisiert werden. Es sollte analysiert werden, über welche der bekannten Routen die Proteine Ybr241 und Ygl104 die vakuoläre Membran erreichen. Die Aufnahme über Endocytose konnte nach den unter 3.1.2 beschriebenen Ergebnissen ausgeschlossen werden, da keine Beeinflussung der Lokalisation in Endocytose-Mutanten feststellbar war. Die Aufnahme aus dem Cytoplasma ist eher ungewöhnlich und bisher nur für die vakuoläre Hydrolase API (Klionsky *et al.*, 1992) und die α -Mannosidase Ams1 (Hutchins und Klionsky, 2001) bekannt. Somit blieben als wahrscheinlichste Alternativen der CPY- oder der ALP-Weg. Um die tatsächlichen Transportrouten zu identifizieren, sollte die Lokalisation der Transporter Ybr241 und Ygl104 in Mutanten mit spezifischen Defekten in den Transportwegen zur Vakuole untersucht werden. Diese Defekte führen entweder zur Akkumulation der Fracht in bestimmten Kompartimenten oder zwingen die Fracht über andere Transportrouten die Vakuole zu erreichen.

3.1.3.1 Analyse der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in einer *vps1*-Mutante

Das Gen *VPS1* codiert für eine GTPase (Vater *et al.*, 1992), die an der Abschnürung der Vesikel vom späten Golgi-Apparat beteiligt ist. *Vps1* scheint eine Rolle bei der Separation der vakuolären Fracht von der Fracht mit Zielort Plasmamembran zu spielen (Conibear und Stevens, 1995). Die Vesikel mit Bestimmungsort Vakuole enthalten vakuoläre Hydrolasen und vakuoläre Membranproteine. Daher sekretieren Hefezellen, denen das

Protein Vps1 fehlt, CPY und transportieren vakuoläre Membranproteine wie ALP zur Plasmamembran. Die betreffenden Membranproteine werden dann alternativ über Endocytose zur Vakuole transportiert (Nothwehr *et al.*, 1995).

Ein Einfluß der Deletion des Gens *VPS1* auf die Lokalisation der putativen Zuckertransporter Ybr241 und Ygl104 sollte untersucht werden. Falls eine Abweichung der Lokalisation in *vps1*-Mutanten nachweisbar wäre, wäre das ein Hinweis, daß die Proteine Ybr241 und Ygl104 mit Hilfe der Proteine des „vacuolar protein sorting“, zu denen auch Vps1 gehört, zur Vakuole befördert werden. Das Gen *VPS1* wurde im Stamm EBY.VW4000 mittels *loxP-kanMX-loxP*-System deletiert. Der auf diese Weise konstruierte Stamm wurde als CFY10 bezeichnet. Anschließend wurden Rohextrakte des Stammes CFY10, der mit den Plasmiden BG-YBR241-TAP bzw. BG-YGL104-TAP transformiert war, hergestellt und über einen kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten fraktioniert. Die Fraktionen wurden über Western-Blot-Analyse auf die Präsenz der Fusionsproteine Ybr241-TAP und Ygl104-TAP, auf die der vakuolären ATPase Vph1 und die der Plasmamembran-ATPase Pma1 untersucht. Um die Intensität der Signale aus der Western-Blot-Analyse zu quantifizieren, wurden die entsprechenden Röntgenfilme eingescannt und mit dem Programm Scion Image (Scion Corporation) densitometrisch ausgewertet. Die Intensität des stärksten Signals wurde als 100% definiert. Zur Analyse des Einflusses der *vps1*-Deletion auf die Lokalisation der Proteine wurden die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung den Ergebnissen der Zellfraktionierungs-Experimente des Wildtyps (3.1.1.1.1) graphisch gegenübergestellt. Die subzelluläre Verteilung von Pma1 in *vps1*-Zellen und in Wildtyp-Zellen war erwartungsgemäß identisch (nicht gezeigt), aber auch die von Vph1 und Ybr241-TAP blieb unverändert. Nur die Verteilung von Ygl104-TAP war beeinflusst (Abb. 3.8). Das Fusionsprotein Ygl104-TAP akkumulierte anstatt in den Fraktionen 6 bis 14 jetzt in den Fraktionen 5 bis 18. Auch das Maximum war von Fraktion 10 auf Fraktion 12 verschoben. Da das Markerprotein der Plasmamembran Pma1 in den Fraktionen 6 bis 18 zu finden ist, war in *vps1*-Mutanten eine partielle Co-Lokalisation von Ygl104 mit Pma1 zu beobachten, jedoch lag das Maximum von Pma1 in Fraktion 18 und das von Ygl104 in Fraktion 12. Das deutete darauf hin, daß ein Teil der Gesamtproteinmenge von Ygl104 in der Plasmamembran lokalisiert sein könnte, ein Teil in anderen, nicht identifizierbaren Kompartimenten. Auch konnte nicht ausgeschlossen werden, daß ein Anteil der Proteinmenge weiterhin in der Vakuole lokalisiert war.

Anscheinend hatte das Fehlen der GTPase Vps1 keinen Einfluß auf die Endlokalisation von Vph1 und die von Ybr241. Erwartet worden war neben einem Nachweis in den vakuolären Fraktionen jedenfalls ein schwacher Nachweis in den Fraktionen, die die Plasmamembran repräsentierten, da zumindest Vph1 die Vakuole über die Plasmamembran erreichen sollte. Doch die Proteinmenge in diesen Fraktionen schien für einen Nachweis mittels Western-Blot nicht auszureichen. Möglicherweise wurden die Proteine Vph1 und Ybr241 sofort endocytisiert und zur Vakuole transportiert.

Diese Experimente konnten nicht klären, ob die Proteine Ybr241 und Ygl104 die Vakuole mittels „vacuolar protein sorting“ erreichen, da schon im Fall von Vph1 kein Unterschied in der Verteilung zwischen *vps1*-Mutante und Wildtyp zu erkennen war. Aus der Literatur ist von Vph1 bekannt, daß es über den CPY-Weg zur Vakuole transportiert wird. Immerhin konnte gezeigt werden, daß die *vps1*-Deletion einen spezifischen Effekt auf die Lokalisation von Ygl104 hat. In welchen Kompartimenten Ygl104 in *vps1*-Mutanten tatsächlich akkumuliert, bleibt allerdings unklar.

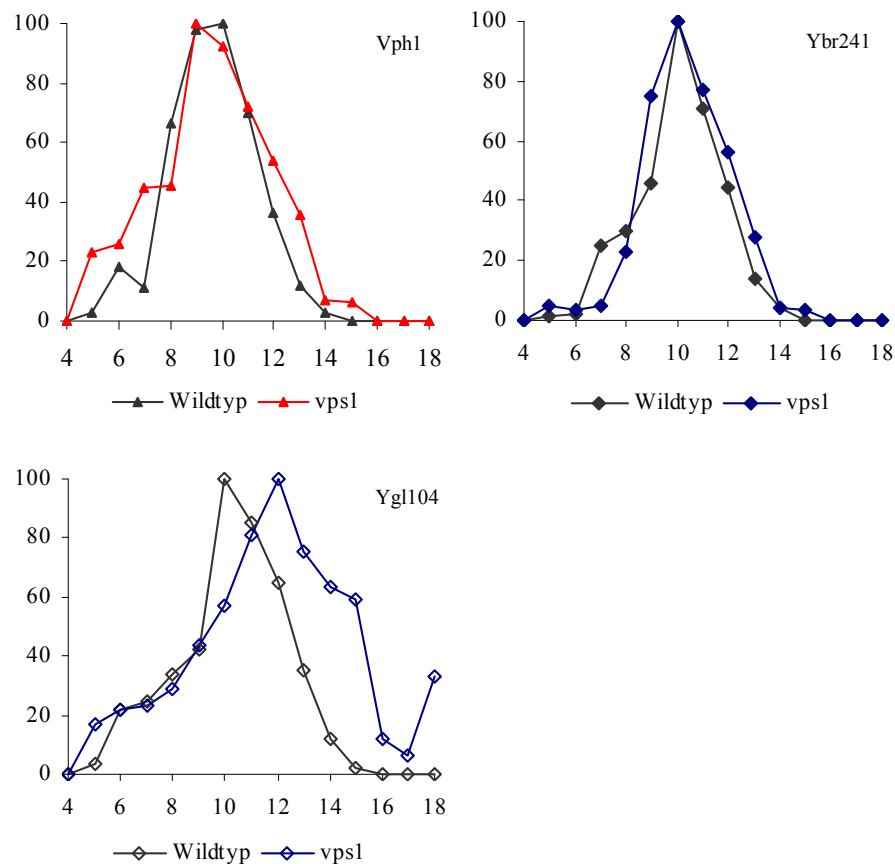


Abb. 3.8: Analyse der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in einer *vps1*-Mutante. Der Stamm CFY10, der die Fusionsproteine Ybr241-TAP bzw. Ygl104-TAP produzierte, wurde mittels kontinuierlichem Saccharosedichtegradienten fraktioniert. Die Fraktionen wurden über Western-Blot-Analyse auf die Präsenz

der Fusionsproteine Ybr241-TAP und Ygl104-TAP sowie auf die des Markerproteins Vph1 untersucht. Die Signale aus der Western-Blot-Analyse wurden durch eine densitometrische Auswertung quantifiziert. Die Signalstärke in Prozent (y-Achse) für Wildtyp und *vps1*-Mutante wurde gegen die Fraktionsnummer (x-Achse) aufgetragen.

3.1.3.2 Analyse der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in einer *apl5*-Mutante

Das Gen *APL5* codiert für eine Untereinheit des AP3-Adapter-Komplexes, welcher für den spezifischen Transport der alkalischen Phosphatase ALP (Pho8) und der t-SNARE Vam3 zur Vakuole essentiell ist. Die Deletion einer der vier Untereinheiten des AP3-Komplexes führt zum Funktionsverlust des gesamten Komplexes, was in einer schweren Fehllokalisierung von ALP resultiert. ALP akkumuliert dann in einer Vielzahl cytoplasmatischer Vesikel. Der Funktionsverlust des AP3-Komplexes hat aber keinen Effekt auf die Lieferung von CPY oder Vph1 zur Vakuole (Cowles *et al.*, 1997a).

Der Einfluß der *apl5*-Deletion auf die subzelluläre Verteilung der putativen Zuckertransporter Ybr241 und Ygl104 sollte in Zellfraktionierungs-Experimenten analysiert werden. Wenn Ybr241 und Ygl104 zur Fracht gehören, die den ALP-Weg benutzt, sollte die Lokalisation der Proteine in *apl5*-Mutanten verändert sein. Vph1 dürfte keinesfalls fehllokalisiert sein, da das Protein ein Substrat des CPY-Wegs ist. Es wurde nach der gleichen Prozedur vorgegangen, wie für die *vps1*-Mutante beschrieben (3.1.3.1). Die Lokalisation von Vph1 blieb erwartungsgemäß in *apl5*-Mutanten völlig unverändert (Abb. 3.9). Allerdings akkumulierte besonders Ybr241, aber auch Ygl104, etwas stärker in Fraktionen geringerer Dichte. Doch war der Einfluß der *apl5*-Deletion auf die beiden Proteine relativ gering. Falls Ybr241 und Ygl104 wirklich über den ALP-Weg befördert würden, hätte der Effekt wesentlich deutlicher ausfallen müssen, da das schon identifizierte Substrat ALP eine schwere Fehllokalisierung aufweist. Somit sprechen diese Ergebnisse eher gegen einen Transport über den ALP-Weg.

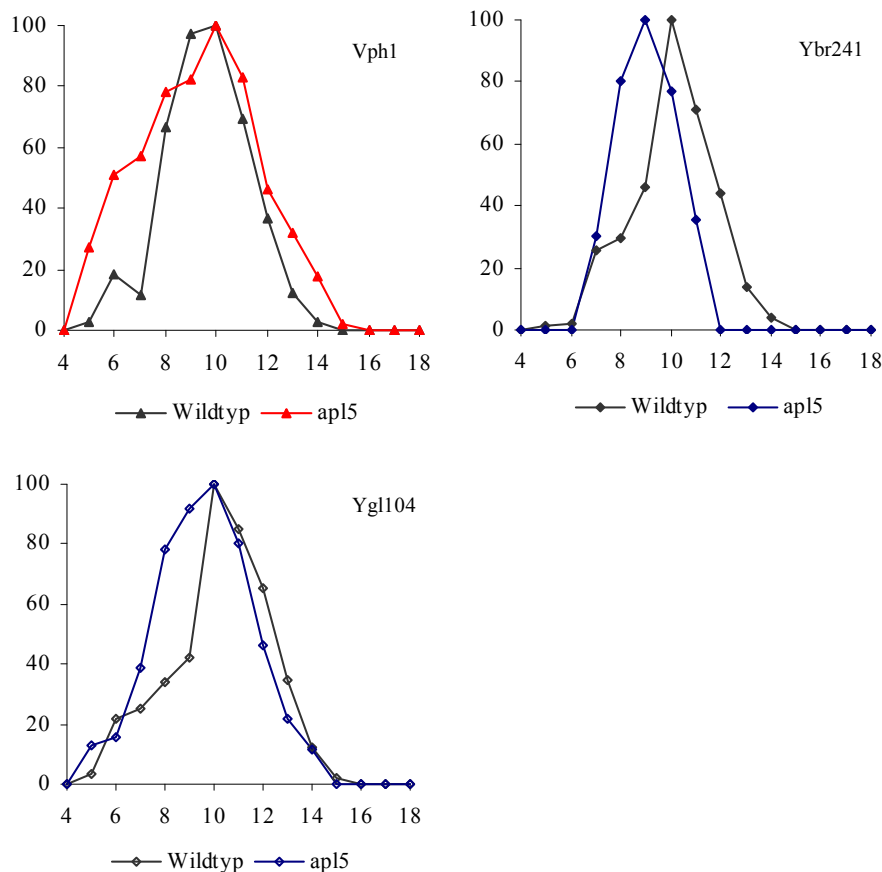


Abb. 3.9: Analyse der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in einer *apl5*-Mutante. Der Stamm CFY11, der die Fusionsproteine Ybr241-TAP bzw. Ygl104-TAP synthetisierte, wurde durch einen kontinuierlichen Saccharosedichtegradienten fraktioniert. Die Fraktionen wurden über Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit der Fusionsproteine Ybr241-TAP und Ygl104-TAP sowie auf die des Markerproteins Vph1 untersucht. Die Signale aus der Western-Blot-Analyse wurden densitometrisch ausgewertet. Die Signalstärke in Prozent (y-Achse) wurde für die *vps1*-Mutante und für den Wildtyp gegen die Fraktionsnummer (x-Achse) aufgetragen.

3.1.3.3 Untersuchung der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in einer *vps27*-Mutante

Vps27 ist ein endosomales Protein, das den Proteinverkehr aus dem prävakuolären Kompartiment (spätes Endosom) kontrolliert. Mutationen, die die Funktion von Vps27 aufheben, führen zu einer Expansion des prävakuolären Kompartiments, in dem dann vakuoläre und Golgi-Proteine akkumulieren. Diese vergrößerte Form wird als Klasse- E-Kompartiment bezeichnet (Piper *et al.*, 1995).

Der Effekt der *vps27*-Deletion auf die Lokalisation der Proteine Ybr241 und Ygl104 sollte in Zellfraktionierungs-Experimenten untersucht werden. Falls diese beiden Proteine über den CPY-Weg, also über das prävakuoläre Kompartiment, zur Vakuole transportiert

werden, sollten sie in *vps27*-Mutanten im Klasse-E-Kompartiment akkumulieren. Die subzelluläre Verteilung müßte verändert sein. Als Positiv-Kontrolle sollte die Untereinheit der vakuolären ATPase Vph1 dienen, da sich auch Vph1 im Klasse-E-Kompartiment anhäuft. Als Negativ-Kontrolle sollte Dpm1 fungieren, da die Verteilung des ER-Proteins unverändert sein müßte. Außerdem sollte die Lokalisation des endosomalen t-SNARE Pep12 analysiert werden, es könnte auch in diesem Fall ein Einfluß der *vps27*-Deletion erkennbar sein. Der Stamm BY4742 *vps27* (EUROSCARF) wurde mit den Plasmiden BG-YBR241-TAP bzw. BG-YGL104-TAP transformiert. Anschließend wurden Spheroplastenlysate der Transformanten über einen zehnstufigen Saccharosedichtegradienten fraktioniert. Darauf wurde eine Western-Blot-Analyse der Fraktionen durchgeführt, deren Ergebnis densitometrisch ausgewertet und die Daten mit den Ergebnissen der Zellfraktionierungs-Experimente des Wildtyps verglichen (3.1.1.1.2). Die subzelluläre Verteilung von Dpm1 blieb, wie erwartet, weitgehend unverändert. Sowohl in *vps27*-Zellen, die Ybr241-TAP produzierten, als auch in *vps27*-Zellen, die Ygl104-TAP produzierten, war die Verteilung von Vph1 nur geringfügig verändert. Ebenfalls leicht beeinflusst war die Verteilung von Ybr241 und Ygl104. Pep12 zeigte in *vps27*-Mutanten nur bei Überexpression von *YGL104C* eine etwas andere, breitere Verteilung als im Wildtyp (nicht gezeigt). Die Proteine Ybr241 oder Ygl104 in *vps27*-Mutanten entweder dem Klasse-E-Kompartiment oder der Vakuole zuzuordnen, schien mittels Zellfraktionierung durch zehnstufige Saccharosedichtegradienten sehr schwierig zu sein. Es war ein leichter Einfluß von Vps27 auf die Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 feststellbar, aber ob die Proteine in *vps27*-Mutanten wirklich im Klasse-E-Kompartiment akkumulierten, konnte nicht aufgeklärt werden. Die leichten Differenzen in der subzellulären Verteilung könnten auch auf Unterschiede bei der Präparation des Dichtegradienten oder bei der Fraktionierung zurückzuführen sein.

3.1.3.4 Untersuchung der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in einer *vps45*-Mutante

Das Gen *VPS45* codiert für ein Membranprotein, das zur Gruppe der Sec1-Homologen (SM-Proteine) gehört, welche an Q_A -SNAREs binden. Vps45 spielt eine Rolle im Membranverkehr zwischen Golgi-Apparat und Vakuole. Es wird angenommen, daß Vps45 an der Fusion von Vesikeln, die vom Golgi-Apparat stammen, mit dem prävakuolären Kompartiment beteiligt ist (Conibear und Stevens, 1995). Daher akkumulieren Zellen mit einer *vps45*-Deletion eine Vielzahl kleiner Vesikel im Cytoplasma. In diesen Vesikeln sind

vakuoläre Proteine wie Vph1 gefangen, die daher die Vakuole nicht erreichen (Piper *et al.*, 1997). CPY wird indessen sekretiert.

Die subzelluläre Verteilung von Ybr241 und Ygl104 sollte in *vps45*-Mutanten untersucht werden. Falls Ybr241 und Ygl104 Substrate des CPY-Wegs sind, würden die Proteine, genau wie Vph1, in cytoplasmatischen Vesikeln akkumulieren, d.h. beide Proteine müßten mit Vph1 co-fraktionieren. Es wurde der gleiche Versuchsansatz wie für die *vps27*-Mutante ausgewählt. Als Negativ-Kontrolle diente wieder das Protein des ER Dpm1, dessen Lokalisation auch tatsächlich nur geringfügig beeinflusst war (Abb. 3.10). Dagegen war die Verteilung von Vph1 und Ygl104 deutlich beeinflusst. Beide Proteine zeigten in *vps45*-Mutanten eine andere Verteilung als im Wildtyp. Vph1 und Ygl104 akkumulierten nun stärker in Fraktionen geringerer Dichte. Außerdem waren sie in denselben Fraktionen zu finden. Hingegen war die Verteilung des endosomalen t-SNARE Pep12 nur sehr geringfügig beeinflusst. Andererseits war das Fusionsprotein Ybr241-TAP in *vps45*-Mutanten mittels Western-Blot überhaupt nicht detektierbar.

In diesen Zellfraktionierungs-Experimenten konnte der gleiche Einfluß der *vps45*-Deletion auf die subzelluläre Verteilung von Vph1 sowie auf die von Ygl104 festgestellt werden. Das deutet darauf hin, daß Ygl104 die Vakuole über das prävakuoläre Kompartiment, somit also über den CPY-Weg erreichen könnte.

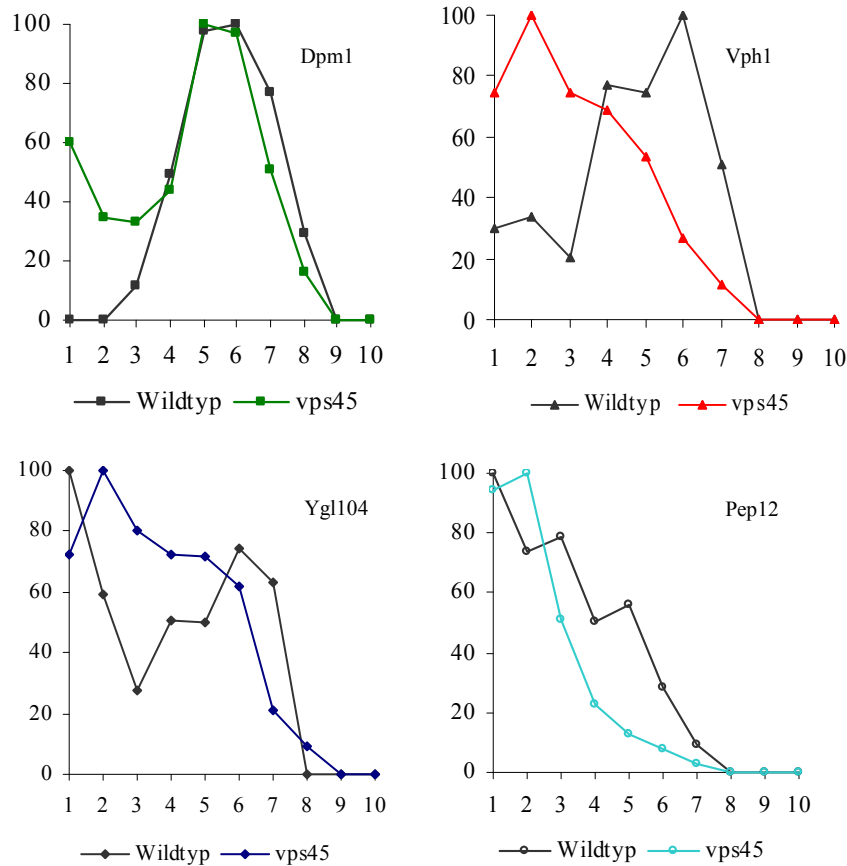


Abb. 3.10: Analyse der subzellulären Verteilung von Ygl104 in einer *vps45*-Mutante. Der Stamm BY4742 *vps45*, der das Fusionsprotein Ygl104-TAP produzierte, wurde durch einen zehnstufigen Saccharosedichtegradienten fraktioniert. Die Fraktionen wurden mittels Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit des Fusionsproteins Ygl104-TAP und auf die der Markerproteine Dpm1, Vph1 und Pep12 untersucht. Die erhaltenen Signale wurden densitometrisch ausgewertet und die Signalstärke in Prozent (y-Achse) gegen die Fraktionsnummer (x-Achse) aufgetragen. Außerdem wurden die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der Western-Blot-Analyse des Wildtyps dargestellt.

3.1.4 Suche nach Hinweisen auf die physiologische Funktion der putativen Zuckertransporter Ybr241 und Ygl104 durch Datenbankanalysen

Um weitere Hinweise auf die physiologische Funktion der uncharakterisierten Transporter Ybr241 und Ygl104 zu erhalten, wurde eine „NCBI-Blast“-Analyse durchgeführt. Die Aminosäuresequenz der Proteine wurde mit der Datenbank Swissprot verglichen. Die Analyse ergab ausschließlich Sequenzhomologien mit Zuckertransportern, besonders deutlich mit einer ganzen Reihe von Glucosetransportern aus Säugetieren, beispielsweise mit dem bovinen Glucosetransporter GLUT1 (29% Identität). Im nächsten Schritt wurde nach Hefegenen gesucht, die unter verschiedenen Bedingungen das gleiche Expressionsmuster wie *YBR241C* bzw. *YGL104C* zeigen. Die Durchführung einer Co-

Expressionsanalyse („Expression Connection“) mittels „Saccharomyces Genome Database“ (SGD, www.yeastgenome.org) ergab eine Co-Expression mit Genen des Trehalosestoffwechsels in mehreren Datensätzen: 1. Im Datensatz „Expression in response to arsenic“ (Haugen *et al.*, 2004) wird *YBR241C* ähnlich wie *TPS2* reguliert. *TPS2* codiert für die Phosphatase-Untereinheit des Trehalose-6-Phosphat-Synthase-Komplexes. 2. Im Datensatz „Ploidy regulation of gene expression“ (Galitski *et al.*, 1999) wird *YGL104C* ähnlich wie die Trehalose-6-Phosphat-Synthase *TPS1* exprimiert. 3. Im Datensatz „Response to environmental changes“ (Gasch *et al.*, 2000) zeigt *YGL104C* ein ähnliches Expressionsmuster wie *TSL1*. Das Gen *TSL1* codiert für die große Untereinheit des Trehalose-6-Phosphat-Synthase-Komplexes. *TPS2*, *TPS1* und *TSL1* sind unter Streßbedingungen co-induziert und durch den Ras-cAMP-Signalweg co-reprimiert (Winderickx *et al.*, 1996).

3.1.4.1 Hinweise auf den Trehalosestoffwechsel

Datenbankanalysen ergaben Hinweise auf eine Beteiligung von Ybr241 und Ygl104 am Trehalosestoffwechsel. Trehalose ist ein Disaccharid, das von Hefezellen bei Streß synthetisiert wird, da es Proteine und Membranen vor Hitze (De Virgilio *et al.*, 1991) und Austrocknung (Eleutherio *et al.*, 1995) schützt. Außerdem wird Trehalose in der stationären Phase als Reservekohlenhydrat (Lillie und Pringle, 1980) gebildet. Des weiteren können Hefezellen Trehalose als Kohlenstoffquelle nutzen (Kotyk und Michaljanicova, 1979). Da Trehalose unter bestimmten Bedingungen intrazellulär akkumuliert, kommt der Zucker als putatives Substrat für intrazelluläre Zuckertransporter in Frage. Ferner besteht laut Stammbaum der Zuckertransporter (Nelissen *et al.*, 1997) eine relativ hohe Sequenzhomologie von *YBR241C* und *YGL104C* zu den Maltosetransportern, zu denen auch der Trehalosetransporter *AGT1* gehört (Plourde-Owobi *et al.*, 1999). Ein weiterer Anhaltspunkt ist die in der Literatur vorgeschlagene vakuoläre Lokalisation der sauren Trehalase Ath1 (Keller *et al.*, 1982). Auch hier könnte ein Zusammenhang aufgrund der vakuolären Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 bestehen.

3.1.5 Trehalose als Kohlenstoffquelle

In der Literatur sind zwei Aufnahmesysteme für Trehalose beschrieben, die Voraussetzung für das Wachstum der Hefezellen mit dem Disaccharid als Kohlenstoffquelle sind. Erstens ein hochaffines Aufnahmesystem über den α -Glucosid-Transporter Agt1, verbunden mit der cytosolischen Hydrolyse der Trehalose durch die neutrale Trehalase Nth1 zu je zwei Molekülen Glucose (Plourde-Owobi *et al.*, 2000). Die entstehende Glucose wird dann in

die Glycolyse eingeschleust. Zweitens ein unbekanntes, niederaffines Aufnahmesystem über Endocytose in die Vakuole, dann die vakuoläre Spaltung durch die saure Trehalase Ath1 zu zwei Molekülen Glucose (Nwaka *et al.*, 1996). Die Funktion der beiden vakuolären Transporter Ybr241 und Ygl104 könnte im Transport der gebildeten Glucosemoleküle in das Cytosol liegen, wo diese dann weiter abgebaut werden könnten.

Um die beschriebenen Aufnahmesysteme näher zu charakterisieren, wurde das Wachstumsverhalten der Stämme CEN.PK2-1C, EBY.VW1000 und EBY.VW4000 auf synthetischem Minimalmedium mit Trehalose als einziger Kohlenstoffquelle untersucht. Zusätzlich enthielt das Medium lediglich die Auxotrophiemarker Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil, es war mit Succinat gepuffert und der pH-Wert wurde auf 4,5 eingestellt. Der Stamm CEN.PK2-1C ist der Wildtyp. Der Stamm EBY.VW1000 weist Deletionen der Hexosetransporter-Gene *HXT1* bis *HXT17* (Wieczorke *et al.*, 1999) auf. Der Stamm EBY.VW4000, der sogenannte *hxt*-Null-Stamm, besitzt die zusätzlichen Deletionen der Gene des Glycerintransporters *Stl1*, des Galactosetransporters *Gal2*, der Maltosetransporter *Mph2* und *Mph3* und des α -Glucosid-Transporters *Agt1*, der auch Trehalose transportiert (Wieczorke *et al.*, 1999). Beide Stämme können nicht mehr mit Hexosen als Kohlenstoffquelle wachsen. Ein Wachstum des EBY.VW1000-Stammes mit Trehalose als Kohlenstoffquelle wurde erwartet. Falls der Stamm EBY.VW4000 auch noch wächst, könnte die Aufnahme der Trehalose auf Endocytose zurückzuführen sein, da das Aufnahmesystem über *Agt1* ausgeschaltet ist. Ergebnis war, daß nur der Stamm CEN.PK2-1C mit Trehalose als Kohlenstoffquelle wachsen konnte. Obwohl der Stamm EBY.VW1000 noch beide Trehalose-Aufnahmesysteme, den Trehalosetransporter *Agt1* und Endocytose, besitzt, konnte dieser nicht wachsen. Auch der Stamm EBY.VW4000, der noch das niederaffine Aufnahmesystem aufweisen sollte, konnte nicht wachsen (Abb. 3.11). Diese Ergebnisse zeigen, daß weder durch den Transporter *Agt1* noch durch die Aufnahme von Trehalose über Endocytose Wachstum vermittelt werden konnte. Neben den Aufnahmesystemen für Trehalose wäre das Freisetzen von Trehalasen, verbunden mit einer extrazellulären Spaltung der Trehalose in zwei Glucoseeinheiten und Aufnahme der Glucose, eine weitere Möglichkeit. Extrazelluläre Hydrolyse ist beispielsweise für das Disaccharid Saccharose bekannt, es wird durch das Enzym Invertase in Fructose und Glucose gespalten (Barnett, 1976). Falls Trehalose extrazellulär hydrolysiert wird, sollte das weder zum Wachstum des EBY.VW1000 noch zum Wachstum des EBY.VW4000 führen, da beide Stämme nicht fähig sind, die entstehende Glucose aufzunehmen. Da beide

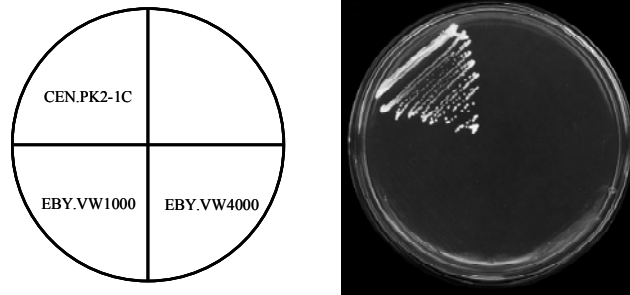


Abb. 3.11: Wachstumstest auf Trehalosemedium. Die Stämme CEN.PK2-1C, EBY.VW1000 und EBY.VW4000 wurden auf synthetischem Minimalmedium mit Trehalose als Kohlenstoffquelle ausgestrichen und 5 Tage bei 30°C inkubiert.

Stämme nicht mit Trehalose als Kohlenstoffquelle wachsen konnten, sollte eine eventuelle extrazelluläre Spaltung der Trehalose in weiteren Experimenten untersucht werden.

3.1.6 Extrazelluläre Spaltung von Trehalose

Da die Wachstumsexperimente eine extrazelluläre Spaltung der Trehalose implizierten, wurde das Wachstumsverhalten der Hefestämme JBY01 und JBY02 (Buziol *et al.*, 2002) untersucht. Der Stamm JBY01, ein *hxt*-Null-Stamm, der ausschließlich den niederaffinen Hexosetransporter Hxt1 (Reifenberger *et al.*, 1997) produziert, zeigte ebenfalls den Wachstumsdefekt auf Trehalosemedium. Dagegen war beim Stamm JBY02, der den hochaffinen Hexosetransporter Hxt7 (Reifenberger *et al.*, 1997) als einzigen Hexosetransporter produziert, Wachstum mit Trehalose zu beobachten (Abb. 3.12). Da ein Transport von Trehalose durch den Hexosetransporter Hxt7 unwahrscheinlich war, war das Ergebnis ein weiterer Hinweis auf die extrazelluläre Spaltung der Trehalose in Glucose in Verbindung mit anschließender Aufnahme der Glucose über den Hexosetransporter Hxt7. Die Menge der gebildeten Glucose schien relativ gering zu sein, da der niederaffine Transporter Hxt1 kein Wachstum vermitteln konnte. Unterschiede bei der Regulation der Expression von *HXT1* und *HXT7* konnten keine Rolle spielen, da beide Gene unter Kontrolle der verkürzten Version des *HXT7*-Promotors standen (Buziol *et al.*, 2002). Für die extrazelluläre Spaltung der Trehalose ist möglicherweise die saure Trehalase Ath1 verantwortlich, die dazu eventuell sekretiert wird. Dafür spricht, daß Ath1 essentiell für das Wachstum mit Trehalose als Kohlenstoffquelle ist (Nwaka *et al.*, 1996).

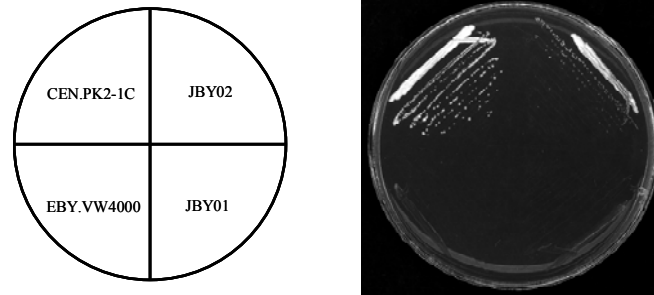


Abb. 3.12: Wachstumstest auf Trehalosemedium. Die Stämme CEN.PK2-1C, EBY.VW4000, JBY01 und JBY02 wurden auf synthetischem Minimalmedium mit Trehalose als Kohlenstoffquelle ausgestrichen und 5 Tage bei 30°C inkubiert.

3.1.6.1 Analyse der Funktion von Ath1

Die Hypothese der extrazellulären Spaltung der Trehalose durch Ath1 galt es durch Analyse des Zuckergehalts des Mediums zu verifizieren. Im *hxt*-Null-Stamm wäre keine Aufnahme der entstehenden Glucose möglich, also müßte diese im Medium akkumulieren. Deswegen wurde der *hxt*-Null-Stamm EBY.VW4000 in Trehalose/Ethanol-Minimalmedium herangezogen. Ethanol wurde dem Medium zugesetzt, um Wachstum zu ermöglichen. Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben genommen und deren Zuckergehalt mittels Dionex BioLC (Nucleogel810H, Shodex RI-101) analysiert. Es konnte eine eindeutige Abnahme der Trehalose und damit verbundene Bildung von Glucose im Medium nachgewiesen werden (Abb. 3.13A). Nach ca. 110 Stunden war die komplette Trehalose zu Glucose umgesetzt worden. Die Reaktion wurde wahrscheinlich durch Ath1 katalysiert. Im nächsten Schritt wurde die saure Trehalase Ath1 im Stamm EBY.VW4000 deletiert. Der Deletionsstamm CFY07 konnte die Trehalose nicht extrazellulär spalten, es war keine Glucose im Medium nachweisbar (Abb. 3.13B). Um auszuschließen, daß es sich um freigesetzte Trehalase aus zerstörten Zellen handelte, wurden die Zellen mittels Vitalfärbung kontrolliert, wobei nach 100 Stunden noch ca. 95% der Zellen vital waren. Ein vorsätzlich herbeigeführter Zellaufschluß führte nicht zu einer Steigerung der Trehalaseaktivität. Somit konnte die Sekretion der sauren Trehalase Ath1 bestätigt werden. Trehalose wird extrazellulär gespalten und die entstehenden Glucosemoleküle werden über die Hexosetransporter in die Zelle transportiert.

Die Rolle der vakuolären Transporter Ybr241 und Ygl104 im Zellmetabolismus bleibt allerdings weiter ungeklärt. Da die Hypothese der Aufnahme von Trehalose durch Endocytose in die Vakuole und anschließender Abbau durch Ath1 nach diesen Ergebnissen wenig wahrscheinlich erscheint, können sie auch nicht am Transport der resultierenden Glucose beteiligt sein.

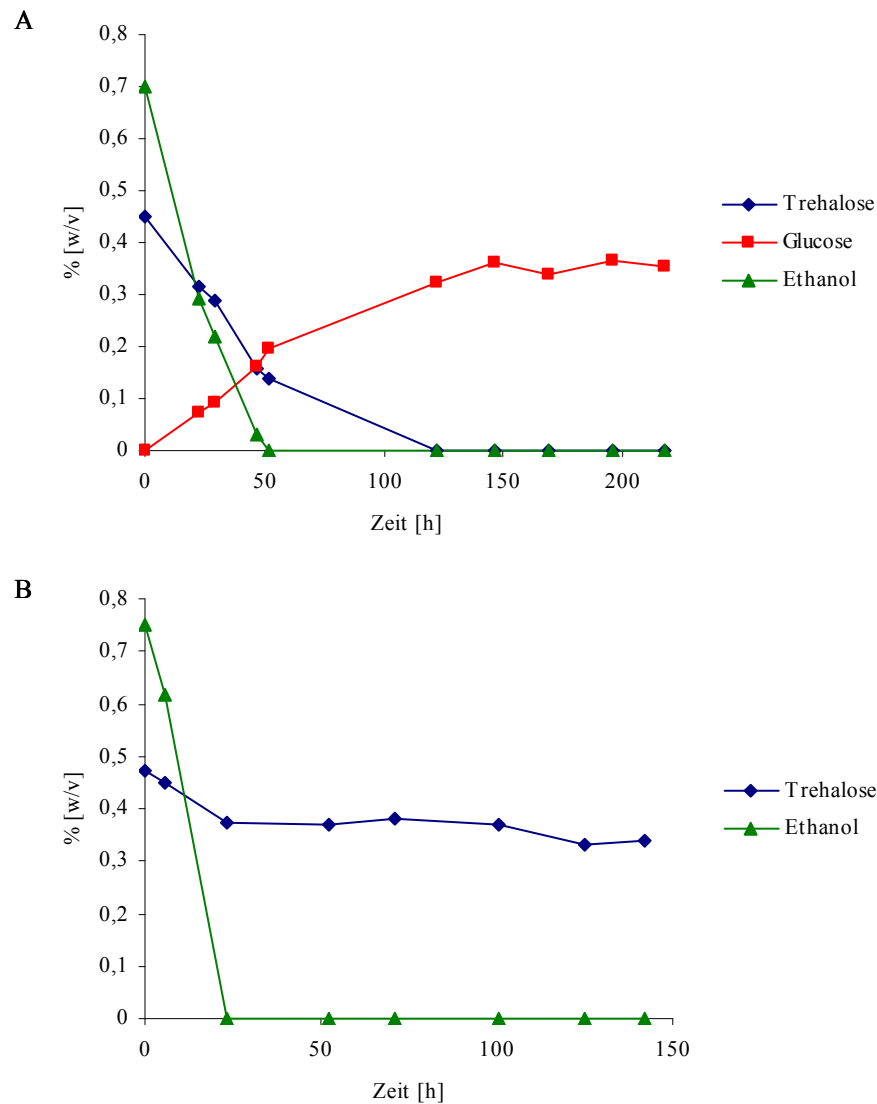


Abb. 3.13: Extrazelluläre Spaltung von Trehalose. Der *hxt*-Null-Stamm EB.Y.VW4000 (A) und die *ath1*-Mutante CFY07 (B) wurden in Trehalose/Ethanol-Minimalmedium kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und deren Zuckergehalt mittels BioLC analysiert.

3.1.7 Analyse der Funktion von Ybr241 und Ygl104

3.1.7.1 Deletion der Gene *YBR241C* und *YGL104C*

Informationen über die Funktion der Gene *YBR241C* und *YGL104C* sollten mit Hilfe von Deletionsmutanten gewonnen werden. Dazu wurden jeweils Einzel- und Doppeldelentionsmutanten der Stämme CEN.PK2-1C und EB.Y.VW4000 konstruiert. Die Konstruktion der Doppeldelentionsstämme war notwendig, weil die Gene *YBR241C* und *YGL104C* aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie eine redundante Funktion haben könnten. Durch die Deletion beider Gene sollte jedoch ein möglicher Phänotyp detektierbar werden. Eine *loxP*-*kanMX*-*loxP*-Kassette wurde über homologe

Rekombination in die entsprechenden Genloci integriert. Um die Doppeldeletionsmutanten herzustellen, wurde das integrierte *kanMX*-Gen mittels Cre-Rekombinase wieder entfernt, somit konnte das *loxP-kanMX-loxP*-System erneut verwendet werden. Erfolgreiche Deletionen wurden über analytische PCR bestätigt. Die resultierenden Stämme waren: CFY01 (CEN.PK2-1C *ybr241c*), CFY02 (CEN.PK2-1C *ygl104c*), CFY03 (CEN.PK2-1C *ybr241c ygl104c*), CFY04 (EBY.VW4000 *ybr241c*), CFY05 (EBY.VW4000 *ygl104c*) und CFY06 (EBY.VW4000 *ybr241c ygl104c*).

Neben dem Stamm CEN.PK2-1C wurde auch der Stamm EBY.VW4000 als Ausgangsstamm für die Deletion der Gene *YBR241C* und *YGL104C* ausgewählt. Dieser sogenannte *hxt*-Null-Stamm weist Deletionen der Gene aller bekannten Hexosetransporter, des Glycerintransporters *Stl1* und der Maltosetransporter *Mph1* und *Mph2* auf. Die zusätzliche Deletion des Gens *SNF3* im Stamm EBY.VW4000 führt wieder zum Wachstum des *hxt*-Null-Stammes mit Hexosen als Kohlenstoffquelle. Da *SNF3* für einen Glucosesensor codiert, ist dieses Wachstum vermutlich auf die Repression der Gene unbekannter Hexosetransporter durch *Snf3* zurückzuführen (Wieczorke *et al.*, 1999). Falls die zusätzliche Deletion von *YBR241C* und *YGL104C* im Stamm EBY.VW4000 ebenfalls dessen Wachstumsdefekt aufheben könnte, wäre das ein Hinweis auf eine reprimierende Funktion der Genprodukte. Möglicherweise handelt es sich bei *Ybr241* und *Ygl104*, ähnlich wie bei *Snf3*, um Sensoren.

3.1.7.2 Suche nach einem Wachstumsphänotyp der Deletionsmutanten

Aus Wachstumsphänotypen lassen sich oft Rückschlüsse auf die Funktion von Proteinen ziehen, daher wurde das Wachstumsverhalten der Deletionsstämme auf synthetischen Komplettmedien mit den folgenden Kohlenstoffquellen untersucht: Glucose, Maltose, Fructose, Mannose, Trehalose, Galactose und Glycerin. Außerdem wurden Vollmedien mit Glucose und Maltose getestet. Die verschiedenen Stämme wurden auf Agarplatten ausgestrichen und dann bei 30 bzw. 37°C inkubiert (Tab. 3.1, 3.2). Durch die Inkubation bei 37°C sollte ein eventueller Phänotyp verstärkt werden. Die Wachstumsexperimente ergaben weder im CEN.PK2-1C- noch im EBY.VW4000-Stammhintergrund Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten. Somit konnte kein Phänotyp detektiert werden.

Tab. 3.1: Wachstum der Deletionsstäme auf synthetischen Komplettmedien mit verschiedenen Kohlenstoffquellen bei 30 und 37°C für drei Tage. (+) Wachstum, (+/-) mäßiges Wachstum, (-) kein Wachstum, (x) nicht getestet

Stamm	Genotyp	Wachstum											
		2% Glucose		1% Maltose		2% Fructose		2% Mannose		1% Trehalose		2% Galactose	
		30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	37°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
CEN.PK2-1C		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CFY01	<i>ybr241c</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CFY02	<i>ygl104c</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CFY03	<i>ybr241c ygl104c</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
EBY.VW4000		-	x	+	x	-	x	-	x	-	x	+/-	x
CFY04	<i>ybr241c</i>	-	x	+	x	-	x	-	x	-	x	+/-	x
CFY05	<i>ygl104c</i>	-	x	+	x	-	x	-	x	-	x	+/-	x
CFY06	<i>ygl104c ybr241c</i>	-	x	+	x	-	x	-	x	-	x	+/-	x

Tab. 3.2: Wachstum der Deletionsstäme auf Vollmedium mit Glucose (YEPD) und Maltose (YEPM) oder auf synthetischem Komplettmedium mit Glycerin bei 30 und 37°C für drei Tage. (+) Wachstum, (-) kein Wachstum, (x) nicht getestet

Stamm	Genotyp	Wachstum				
		YEPD		YEPM		2% Glycerin
		30°C	37°C	30°C	37°C	30°C
CEN.PK2-1C		+	+	+	+	+
CFY01	<i>ybr241c</i>	+	+	+	+	+
CFY02	<i>ygl104c</i>	+	+	+	+	+
CFY03	<i>ybr241c ygl104c</i>	+	+	+	+	+
EBY.VW4000		-	x	+	x	x
CFY04	<i>ybr241c</i>	-	x	+	x	x
CFY05	<i>ygl104c</i>	-	x	+	x	x
CFY06	<i>ygl104c ybr241c</i>	-	x	+	x	x

3.1.7.3 Phenotype MicroArrays™

Da mit stichprobenartigen Wachstumsversuchen kein Phänotyp gefunden wurde, sollte eine systematische Suche zum Erfolg führen. Die Verwendung von Phenotype MicroArrays™ ist eine von Bochner *et al.* (2001) entwickelte Methode, um Zellen auf verschiedenste Wachstumsphänotypen zu testen. Der Vorteil dieses Verfahrens, das im Mikrotiterplatten-Format durchgeführt wird, liegt im hohen Durchsatz. Es werden gleichzeitig Tests auf nahezu 2000 verschiedene Phänotypen durchgeführt. Getestet werden verschiedene Kohlenstoff- und Stickstoffquellen, außerdem unterschiedliche pH-Bedingungen. Auch die Sensitivität gegenüber NaCl und anderen wichtigen Ionen wird bestimmt. Ferner wird die Reaktion der Zellen auf mikrobielle Inhibitoren, die verschiedene zelluläre Stoffwechselwege unterbrechen, untersucht. Bei Phenotype MicroArrays™ wird die Wachstumsrate über die Zellatmung bestimmt. Je nach Stärke der Zellatmung wird mehr oder weniger des Redox-Farbstoffs Tetrazoliumchlorid umgesetzt. Die Zunahme der Farbintensität wird über einen Zeitraum von 24 Stunden gemessen. Führt man die Experimente für unterschiedliche Zelltypen durch, beispielsweise für Wildtyp und Mutanten, kann der Vergleich der Ergebnisse Phänotypen aufdecken. Die Ergebnisse werden graphisch in unterschiedlichen Farben dargestellt. Durch Übereinanderlegen der Graphen können dann eventuelle Unterschiede identifiziert werden.

Eine Untersuchung der Stämme CFY03 (*ybr241c ygl104c*) und CEN.PK2-1C mittels Phenotype MicroArrays™ wurde bei Biolog, Inc. (Hayward, USA) durchgeführt. Ein Vergleich der Daten sollte Hinweise auf die Funktion der uncharakterisierten Transporter geben. Allerdings wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

3.1.7.4 Suche nach unbekanntem Hexosetransportern

Die zusätzliche Deletion der Gene *YBR241C* und *YGL104C* konnte keinen der Wachstumsdefekte des Stammes EBY.VW4000 aufheben, daher konnte eine reprimierende Funktion der Genprodukte auf unbekannte Hexosetransporter (Wieczorke *et al.*, 1999) ausgeschlossen werden. Doch könnte es sich bei Ybr241 und Ygl104 an sich um die gesuchten Hexosetransporter handeln, was durch die Deletion von *SNF3* in den Stämmen CFY05 und CFY06 überprüft werden sollte. Nach erfolgreicher Deletion mittels *loxP-kanMX-loxP*-System wurden die resultierenden Stämme auf synthetischem Kompletmedium und auf Vollmedium mit Glucose als Kohlenstoffquelle ausgetrieben. Allerdings wurde in beiden Fällen Wachstum der Mutanten beobachtet, was bedeutet, daß weder Ybr241 noch Ygl104 ein durch Snf3 reprimierter Hexosetransporter ist.

3.1.7.5 Suche nach Substraten von Ybr241 und Ygl104 durch Wachstumsversuche

Um Substrate der vakuolären Transporter zu ermitteln, sollte ein einfacher Wachstumstest etabliert werden. In diesem Test sollte über Wachstum analysiert werden, ob die Proteine Ybr241 und Ygl104 bestimmte Zucker transportieren können oder nicht. Der Test sollte auf der Verwendung des *hxt*-Null-Stammes EBY.VW4000 basieren, da dieser keine Hexosen mehr aufnehmen kann. Demzufolge kann der Stamm nicht mehr mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle wachsen. Durch Expression der Gene bestimmter Transporter konnte dieser Wachstumsdefekt durch die Transportaktivität des entsprechenden Proteins wieder aufgehoben werden. Dieses System wurde schon zur Charakterisierung einzelner Hexosetransporter aus Hefe sowie von Glucosetransportern aus Säugetieren eingesetzt (Wieczorke *et al.*, 2003; Wieczorke *et al.*, 1999). Auch die Transportaktivität von Ybr241 bzw. Ygl104 könnte im Fall der entsprechenden Substrate zum Wachstum des *hxt*-Null-Stammes führen. Allerdings sind Ybr241 und Ygl104 vakuoläre Proteine, die ihre Substrate höchstwahrscheinlich über die vakuoläre Membran befördern. Um überhaupt Wachstum des *hxt*-Null-Stammes ermöglichen zu können, müssten Ybr241 und Ygl104 Transport über die Plasmamembran vermitteln. Eine Voraussetzung dafür wäre zumindest die Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in der Plasmamembran des Stammes EBY.VW4000. Eine solche Fehllokalisation sollte durch die Überexpression der Gene der Transporter verursacht werden.

3.1.7.5.1 Überexpression von *YBR241C* und *YGL104C* im Stamm EBY.VW4000

Die Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in der Plasmamembran sollte durch eine Überexpression erreicht werden. Zwar konnte bei Überexpression der entsprechenden Gene in Lokalisationsstudien kein Anteil der Proteinmenge in den Fraktionen der Plasmamembran detektiert werden, doch sind Wachstumsanalysen wesentlich sensitiver, da meist wenige Moleküle der Transporter ausreichen, um Wachstum zu ermöglichen. Daher wurden mittels homologer Rekombination die 2 μ -Plasmide p426HXT7-YBR241 und p426HXT7-YGL104 konstruiert und durch DNA-Sequenzierung überprüft. Die Plasmide tragen den *URA3*-Selektionsmarker und die Gene *YBR241C* und *YGL104C* stehen unter Kontrolle der verkürzten, konstitutiv aktiven Version des *HXT7*-Promotors. Der Stamm EBY.VW4000 wurde mit diesen Plasmiden transformiert und die resultierenden Transformanten auf synthetischen Minimalmedien mit Histidin, Leucin, Tryptophan und folgenden Kohlenstoffquellen ausgestrichen: Glucose, Fructose, Mannose, Trehalose und Galactose. Da die Stämme auf keinem der Medien wachsen konnten, wurde

eine Mutagenese mit UV-Licht durchgeführt, um so durch zufällige Mutationen Wachstum herbeizuführen (Wieczorke *et al.*, 2003). Die Stämme, die die Gene *YBR241C* bzw. *YGL104C* überexprimierten, wurden auf synthetischem Komplettmedium ohne Uracil und auf Vollmedium ausplattiert. Beide Medien enthielten Glucose als Kohlenstoffquelle. Nach Bestrahlung mit einer nicht-letalen Dosis UV-Licht wurden die Zellen für ca. 14 Tage bei 30°C inkubiert. Auf Vollmedium wuchsen einige Suppressorkolonien, auf synthetischem Medium nicht.

Mögliche Gründe für die Wiederherstellung des Wachstums auf Glucosemedium konnten sein: 1) Eine Mutation im Hefegenom oder in der Sequenz der Gene *YBR241C* und *YGL104C* auf dem Plasmid, die dazu führte, daß Ybr241 und Ygl104 anstatt zur Vakuole an die Plasmamembran transportiert wurden. Vielleicht waren auch noch weitere Mutationen nötig, damit die Transporter funktionell wurden. 2) Eine Mutation im Hefegenom, durch die ein endogenes Hefeprotein in einen Glucosetransporter konvertiert oder durch die die Expression eines unbekanntes Glucosetransporters induziert worden war. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden 100 Kolonien der Suppressormutanten auf Vollmedium mit Glucose ausgestrichen und nach drei Tagen Inkubation bei 30°C auf synthetisches Komplettmedium mit und ohne FOA (5-Fluoroorotic-Säure) gestempelt. Als Kohlenstoffquelle diente wieder Glucose. Nach drei Tagen Inkubation zeigte sich, daß die Kolonien, die überhaupt auf den synthetischen Medien wachsen konnten, auch auf den Medien wuchsen, die FOA enthielten. FOA wird durch das Produkt des *URA3*-Gens in das toxische 5-Fluorouracil umgewandelt. Da die Plasmide p426HXT7-YBR241 und p426HXT7-YGL104 den Selektionsmarker *URA3* tragen, konnten also nur Stämme wachsen, die die Plasmide verloren hatten. Das bedeutet, daß die Plasmide und somit auch die Transporter Ybr241 und Ygl104 nicht für das Wachstum entscheidend waren. Es müssen also Mutationen innerhalb des Hefegenoms für das Aufheben des Wachstumsdefekts verantwortlich gewesen sein.

3.1.7.5.2 Überexpression in Mutanten mit Defekten in Transportwegen zur Vakuole

Um eine gezielte Fehllokalisierung zu erreichen, sollten *YBR241C* und *YGL104C* in *hxt*-Null-Stämmen überexprimiert werden, bei denen Transportwege zur Vakuole gestört waren. Neben Endocytose werden vakuoläre Proteine über den CPY- und den ALP-Weg (Bryant und Stevens, 1998) zu ihrem Bestimmungsort transportiert. Da zum Zeitpunkt der Experimente unbekannt war, über welchen Weg Ybr241 und Ygl104 die Vakuole erreichen, wurden die Gene *VPS1* und *APL5* im Stamm EBY.VW4000 mittels *loxP*-

kanMX-loxP-System deletiert. Daraus resultierten die Stämme CFY10 und CFY11. Vps1 hat wichtige Funktionen in beiden Wegen, Apl5 im ALP-Weg. So ist Vps1 an der Bildung von Vesikeln beteiligt, die vakuoläre Proteine vom sekretorischen Weg weg zur Vakuole transportieren. Falls Vps1 nicht mehr vorhanden ist, wird CPY sekretiert und ALP erreicht die Vakuole über die Plasmamembran (Nothwehr *et al.*, 1995). Apl5 ist eine Untereinheit des AP3-Adapter-Komplexes, der für den Transport der Substrate vom Golgi-Apparat zur Vakuole essentiell ist. Ohne die Untereinheit Apl5 verliert der ganze Komplex seine Funktion und ALP akkumuliert intrazellulär in Vesikeln (Cowles *et al.*, 1997a). Die Plasmide p426HXT7-YBR241 und p426HXT7-YGL104 wurden in die Stämme CFY10 und CFY11 transformiert. Mehrere Kolonien der Transformanten wurden auf synthetischem Kompletmedium ohne Uracil mit den Kohlenstoffquellen Glucose, Fructose, Mannose, Trehalose und Galactose ausgestrichen und mehrere Tage inkubiert. Es konnte kein Wachstum beobachtet werden. Die Zellen wurden bis zu 14 Tage weiter inkubiert, es erfolgte aber keine Bildung von Suppressorkolonien. Somit konnte durch die Überexpression der Transporter in Verbindung mit der systematischen Beeinflussung der Transportwege zur Vakuole der Wachstumsdefekt des *hxt*-Null-Stammes nicht aufgehoben werden. Mit diesem einfachen Testsystem war es also nicht möglich, unter den getesteten Zuckern die Substrate der vakuolären Transporter zu identifizieren.

3.1.7.5.3 Fusionsprotein Can1-Ybr241

Da die alleinige Überexpression von Ybr241 und Ygl104 nicht zum Erfolg führte, sollten die Transporter durch eine Fusion mit einem Plasmamembran-Protein zu einer Lokalisation in der Plasmamembran gezwungen werden. Der Arginin-Transporter Can1 wurde als Fusionspartner ausgewählt. Da Can1 das toxische Aminosäureanalogon Canavanin transportiert, war es möglich, durch Selektion auf Canavanin-Sensitivität Zellen zu identifizieren, bei denen das Fusionsprotein in der Plasmamembran lokalisiert war. Dazu mußte vorher das endogene *CAN1*-Gen durch Deletion ausgeschaltet werden. Als Ausgangsstamm diente wieder der Stamm EBY.VW4000, dessen Wachstumsdefekt aufgehoben werden sollte (Abb. 3.14). Das *CAN1*-Gen wurde mittels *loxP-kanMX-loxP*-System deletiert, und der neue Stamm wurde als CFY19 bezeichnet. Um das Testsystem zu etablieren, wurde Can1 C-terminal erstmal nur mit Ybr241, außerdem als Kontrolle mit dem Hexosetransporter Hxt1 fusioniert. Die Gene wurden mittels doppelter homologer Rekombination in den Vektor p426MET25 kloniert, somit stehen sie unter Kontrolle des über die Methioninkonzentration regulierbaren *MET25*-Promotors. Der Selektionsmarker

dieses Plasmids ist *URA3*. Nach erfolgter homologer Rekombination wurde auf Maltose-Komplettmedium ohne Uracil selektiert. Die Uracil-prototrophen Transformanten wurden auf Minimalmedien, die ausschließlich die Aminosäuren Histidin, Leucin und Tryptophan enthielten, gestempelt. Als Kohlenstoffquellen dienten: 0,1/2% Glucose, 2% Fructose, 2% Mannose, 1% Trehalose und 2% Galactose. Außerdem wurde auf synthetisches Maltosemedium gestempelt, dem Canavanin zugesetzt worden war. Keines der Medien enthielt Methionin, daher war der *MET25*-Promotor voll induziert. Ergebnis war, daß Stämme, die das Can1-Hxt1-Fusionsprotein produzierten, auf allen Kohlenstoffquellen wachsen konnten. Allerdings wuchsen sie auf 0,1% Glucose und 1% Trehalose schlechter, da Hxt1 ein niederaffiner Hexosetransporter ist und nur geringe Mengen Glucose im Medium vorhanden waren. Das Can1-Ybr241-Fusionsprotein konnte zunächst kein Wachstum vermitteln. Auf Medium mit Canavanin konnte in keinem Fall Wachstum beobachtet werden, was bedeutete, daß Can1 funktionell in der Plasmamembran lokalisiert war. Ebenso war Hxt1 funktionell und befand sich in der Plasmamembran.

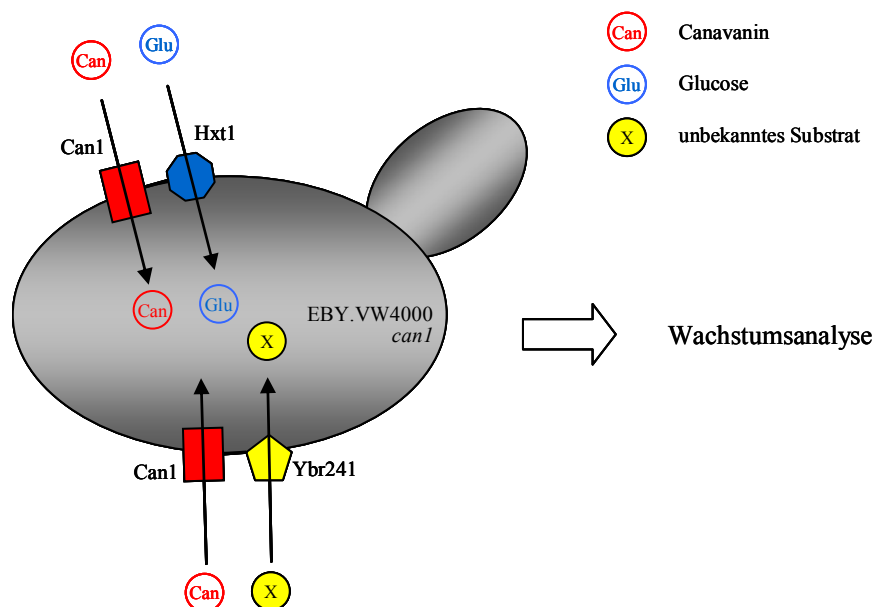


Abb. 3.14: Fusionsprotein Can1-Ybr241. Durch die Fusion mit dem Plasmamembran-Protein Can1 sollte der vakuoläre Transporter Ybr241 zu einer Lokalisation in der Plasmamembran des *hxt*-Null-Stammes gezwungen werden. Dadurch sollte der Transport eventueller Substrate X über die Plasmamembran möglich werden. Außerdem sollte das Fusionsprotein Canavanin in die Zellen transportieren, was den Zellen Sensitivität gegenüber Canavanin verleihen würde. Somit sollte eine Selektion auf Zellen möglich werden, bei denen das Fusionsprotein in der Plasmamembran lokalisiert ist. Als Positivkontrolle diente das Fusionsprotein Can1-Hxt1, es sollte Hexosetransport und damit Wachstum des *hxt*-Null-Stammes auf Medien mit Glucose oder andere Hexosen als Kohlenstoffquelle vermitteln.

Das Can1-Hxt1-Fusionsprotein schien also die Transportaktivitäten beider Ausgangsproteine zu besitzen. Der Stamm CFY19, transformiert mit dem Leerplasmid p426MET25, diente als Negativkontrolle. Nach ca. 10 Tagen bildeten Zellen, die *CAN1-YBR241C* exprimierten, Suppressorkolonien auf Trehalosemedium. Strich man die Suppressormutanten erneut auf Trehalosemedium aus, zeigte sich, daß die Zellen über Nacht zu einem dichten Rasen heranwuchsen. Um zu testen, ob das Wachstum durch das Plasmid vermittelt wurde, wurden die Mutanten auf Trehalosemedium mit FOA ausgestrichen. Auf FOA-Medium erfolgte kein Wachstum der Mutanten, also war ohne das Plasmid, das das Gen *CAN1-YBR241C* trägt, kein Wachstum mit Trehalose als Kohlenstoffquelle möglich. Plasmide aus gewöhnlichen Transformanten und aus Suppressormutanten wurden isoliert und mittels Restriktion analysiert. Im Vergleich zeigten die Plasmide aus den Suppressormutanten ein verändertes Bandenmuster als Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese. Eine Restriktionsschnittstelle war weggefallen. Eine Retransformation in den Stamm CYF19 verlieh diesem aber nicht die Fähigkeit mit Trehalose als Kohlenstoffquelle zu wachsen. Das war insofern nicht überraschend, da auch der Stamm EBY.VW1000 nicht mit Trehalose als Kohlenstoffquelle wachsen konnte, obwohl der Stamm den α -Glucosid-Transporter Agt1 aufweist. Somit war es wahrscheinlich, daß neben der Mutation des Plasmids noch weitere genomische Mutationen nötig waren, die dann erst das Wachstum mit Trehalose ermöglichten. Daher wurden die mutierten Plasmide in Suppressormutanten, die kein Plasmid mehr trugen, transformiert. Aber auch dadurch konnte das Wachstum auf Trehalose nicht wiederhergestellt werden. Es ist unklar, wie die Suppressoren überhaupt auf Trehalosemedium wachsen konnten. Das Fusionsprotein Can1-Ybr241 könnte die Aufnahme von Trehalose über die Plasmamembran vermittelt haben. Allerdings wäre Wachstum nur in Verbindung mit Mutationen, die eine intrazelluläre Mobilisation der aufgenommenen Trehalose ermöglichten, denkbar. Aufnahme von Glucose, die aus der extrazellulären Spaltung von Trehalose resultierte, über Can1-Ybr241 war eher unwahrscheinlich, da sich sonst auch auf Glucosemedium Suppressoren hätten bilden müssen. Da mit Hilfe des Fusionsproteins Can1-Ybr241 keine eindeutigen Hinweise auf die Substrate von Ybr241 gefunden wurden, wurde auf die Konstruktion eines Can1-Ygl104-Fusionsproteins verzichtet.

3.1.7.6 Suche nach Substraten von Ybr241 und Ygl104 durch Analyse des Zuckergehalts der Vakuole

Falls es möglich ist, Zucker in der Vakuole nachzuweisen, sollte der Zuckergehalt des Vakuolenlumens des Doppeldeletionsstammes CFY03 und des Wildtyps analysiert werden. Die Deletion der Transporter müßte zu einer Anreicherung oder zum Fehlen der Substrate in den Vakuolen führen, so könnten Substrate der vakuolären, putativen Zuckertransporter durch Vergleich der beiden Stämme identifiziert werden. Eine Standardmethode zur Präparation vakuolärer Vesikel nach Roberts *et al.* (1991) kam zur Anwendung. Die Anreicherung des vakuolären Enzyms α -Mannosidase gibt über den Erfolg einer solchen Präparation Aufschluß und konnte anhand der Enzymaktivität der α -Mannosidase nachgewiesen werden. Um den Inhalt der vakuolären Vesikel freizusetzen, wurden sie in 0,5%iger Triton X-100-Lösung resuspendiert. Die Zusammensetzung des Inhalts wurde mittels BioLC unter Verwendung der CarbopacMA1-Säule, kombiniert mit dem elektrochemischen Detektor ED50A, analysiert. Nur Spuren von Glucose und Sorbitol waren meßbar, wobei es sich wahrscheinlich um Artefakte aus der Präparation handelte, da beide Substanzen in den verwendeten Pufferlösungen vorkamen. Der Grund für den geringen Zuckergehalt könnte im Homogenisieren der Vakuolensuspension während der Präparation liegen, da sich bei diesem Schritt vakuoläre Vesikel aus ganzen Vakuolen bilden. Wahrscheinlich geht dabei der größte Teil der Inhaltsstoffe verloren. Ausschlaggebend war hingegen, daß keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten festgestellt wurden.

3.1.7.7 Bestimmung der Thermotoleranz der Deletionsmutanten

Aus Datenbankanalysen ergaben sich mehrere Hinweise auf den Trehalosestoffwechsel (3.1.4.1). Aber eine Rolle der vakuolären Transporter Ybr241 und Ygl104 beim Wachstum mit Trehalose als Kohlenstoffquelle war nach den unter Punkt 3.1.6.1 dargestellten Ergebnissen unwahrscheinlich. Laut Literatur liegt die Hauptfunktion des Dissacharids Trehalose in Hefezellen allerdings auch eher in der Fähigkeit des Trehalosemoleküls, Zellen unter bestimmten Streßbedingungen zu schützen (Nwaka und Holzer, 1998). Trehalose wird in Hefezellen vor allem bei Hitzestreß synthetisiert, da Trehalose Proteine und Membranen vor hohen Temperaturen schützt (Eleutherio *et al.*, 1995). Daher kann die Mutation von Genen des Trehalosestoffwechsels zu einer Verminderung der Thermotoleranz der Zellen führen (De Virgilio *et al.*, 1994). Falls die Mutationen in Genen liegen, die für die Trehalosesynthese verantwortlich sind, beispielsweise im Gen der Trehalose-6-Phosphat-Synthase, fehlen die Trehalosemoleküle, die Proteine und

Membranen vor Hitze schützen. Die Vorgänge sind aber wesentlich komplexer, da auch Mutationen in Genen, die wie *NTH1* für Trehalose-abbauende Enzyme codieren, zu einer verminderten Thermotoleranz führen. Ein Grund dafür ist, daß Trehalosemoleküle in hoher Konzentration die Funktion vieler Enzyme inhibieren (Sebollela *et al.*, 2004). Ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der Trehalose scheint also entscheidend für das Überdauern von Hitzeschockbedingungen zu sein. Der Abbau durch die neutrale Trehalase *NTH1* ist sogar absolut essentiell für die Erholung der Zellen nach Hitzeschock (Nwaka *et al.*, 1995b), da sich Mutanten, die verminderte oder gar keine Nth1-Aktivität zeigen, schlechter oder nicht mehr nach Hitzestress regenerieren können. Das Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten bei hohen Temperaturen könnte also weitere Anhaltspunkte auf eine Beteiligung von Ybr241 und Ygl104 am Trehalosestoffwechsel hervorbringen.

Das Wachstumsverhalten der Stämme CFY01, CFY02 und CFY03, die Einzel- und Doppeldelationen der Gene *YBR241C* und *YGL104C* aufweisen, wurde unter Hitzeschock-Bedingungen untersucht. Diese Stämme wurden auf synthetischem Glucose-Komplettmedium ausgestrichen und bei moderat erhöhten Temperaturen (37, 40°C) inkubiert. Es war kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutanten feststellbar (nicht gezeigt). Daher wurden die Deletionsmutanten und der Wildtyp kurzzeitig stark erhöhten Temperaturen ausgesetzt. Die Zellen wurden in synthetischem Komplettmedium bis in die stationäre Phase herangezogen, bei 52°C für ein bis zwei Stunden in Flüssigmedium inkubiert und anschließend Verdünnungsreihen der Zellsuspensionen auf synthetisches Glucose-Komplettmedium getropft. Als Positivkontrolle diente ein Stamm, dessen *TPS1*-Gen, das für die Trehalose-6-Phosphat-Synthase codiert, deletiert ist, er kann demnach keine Trehalose mehr synthetisieren (Bell *et al.*, 1992). Nach einer Inkubation von zwei Tagen bei 30°C war zu beobachten, daß der Wildtyp die Hitzeschock-Bedingungen besser überdauert hatte als die Mutanten. Setzte man die Zellen zwei Stunden lang einer Temperatur von 52°C aus, hatte nur noch der Wildtyp überlebt (Abb. 3.15). Somit zeigten beide Einzeldelentionsmutanten und die Doppeldelentionsmutante eine verminderte Toleranz gegenüber stark erhöhten Temperaturen. Nach Deletion der vakuolären Transporter Ybr241 und Ygl104 reduziert sich demzufolge die Überlebensrate der Zellen nach massivem Hitzeschock. Da die Zellen bis in die stationäre Phase herangezogen worden waren, sollten sie schon Trehalose akkumuliert haben. Demnach könnte dieser Phänotyp mit Trehalose-Akkumulation oder mit dem Abbau der Trehalose nach Hitzestress assoziiert sein, was auf eine Beteiligung von Ybr241 und Ygl104 am Trehalosestoffwechsel hindeutete.

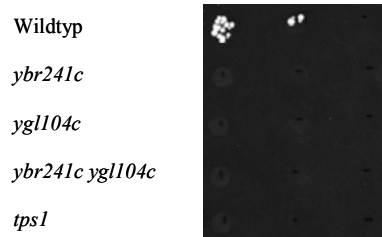


Abb. 3.15: Bestimmung der Thermotoleranz von Wildtyp und Deletionsmutanten. Nach zwei Stunden Hitzeschock bei 52°C in synthetischem Flüssigmedium wurden Verdünnungsreihen (1:5) der Zellsuspensionen auf synthetisches Glucose-Komplettmedium getropft und zwei Tage bei 30°C inkubiert.

Um sicherzustellen, daß der Phänotyp auf die Transporter Ybr241 und Ygl104 zurückzuführen war, sollten die Gene, die für die Transporter codieren, auf Plasmiden wieder in die Mutanten gebracht werden. Dadurch müßte der Hitzeschock-Phänotyp aufgehoben werden. Da die Überexpression von *YBR241C* und *YGL104C* mittels der Plasmide p426HXT7-YBR241 bzw. p426HXT7-YGL104 zu einem leichten Wachstumsdefekt führt, wurden die CEN-Plasmide YCp111YBR241 und YCp33YGL104 über homologe Rekombination konstruiert. Diese Plasmide liegen in geringer Kopienzahl vor, und die Gene stehen unter Kontrolle des endogenen Promotors, so ist das Maß der natürlichen Genexpression kaum beeinflußt. Nach Transformation der Plasmide in die Deletionsstämme CFY01 und CFY02 wurden mit den erhaltenen Transformanten Hitzeschockexperimente durchgeführt. Es stellte sich heraus, daß schon Stämme, die leere Vektoren trugen, überraschenderweise empfindlicher gegenüber Hitzeschock waren, obwohl in beiden Fällen synthetische Komplettmedien verwendet wurden. Deshalb wurde die Dauer des Hitzeschocks verkürzt. Die Stämme CFY01 und CFY02 mit Leervektor zeigten den Hitzeschock-Phänotyp, Stämme hingegen, die mit den Plasmiden YCp111YBR241 oder YCp33YGL104 transformiert waren, zeigten ein dem Wildtyp ähnliches Wachstumsverhalten (Abb. 3.16). Die erfolgreiche Komplementation des Phänotyps demonstrierte, daß tatsächlich die Deletion der Gene *YBR241C* und *YGL104C* für die verminderte Thermotoleranz verantwortlich ist.

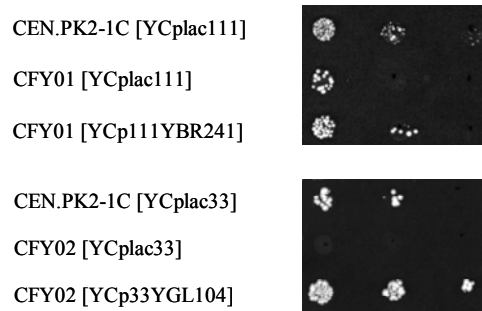


Abb. 3.16: Komplementation des Hitzeschock-Phänotyps. Der Stamm CEN.PK2-1C, transformiert mit den Plasmiden YCplac111 bzw. YCplac33, der Stamm CFY01 (*ybr241c*), der das Plasmid YCplac111 oder das Plasmid YCp111YBR241 trug, und der Stamm CFY02 (*ygl104c*), der die Plasmide YCplac33 bzw. YCp33YGL104 aufwies, wurden bei 52°C in synthetischem Flüssigmedium für eine Stunde hitzegeschockt. Dann wurden Verdünnungsreihen (1:5) der Zellsuspensionen auf synthetisches Glucose-Komplettmedium getropft und zwei Tage bei 30°C inkubiert.

3.1.7.8 Analyse des Trehalosegehalts von Wildtyp und Deletionsmutanten nach Hitzeschock

Hefezellen, die unter Hitzeschock-Bedingungen weniger Trehalose akkumulieren können, weisen eine verminderte Thermotoleranz auf. Beispielsweise ist ein Stamm temperatursensitiv, dessen *TPSI*-Gen ausgeschaltet ist, da er keine Trehalose mehr produzieren und damit auch nicht akkumulieren kann. Möglicherweise sind die vakuolären Transporter Ybr241 und Ygl104 in unbekannter Weise an der intrazellulären Akkumulation von Trehalose beteiligt, und der Hitzeschock-Phänotyp ist auf eine reduzierte Fähigkeit zur Anhäufung von Trehalose zurückzuführen. Deswegen wurde der Trehalosegehalt des Wildtyps, der Deletionsmutanten CFY01, CFY02 und CFY03 und der eines *tpsI*-Stammes als Negativkontrolle analysiert. Eine Vorkultur der Stämme wurde über Nacht in synthetischem Maltose-Komplettmedium herangezogen, dann wurden Flüssigkulturen mit einer finalen optischen Dichte von 0,4 angeimpft und 5 Stunden bei 30°C kultiviert. Da bei 40°C eine verstärkte Trehalosesynthese stattfindet, wurden die Kulturen bei 40°C für eine Stunde im Wasserbad inkubiert. Dann wurden jeweils Teile der Kulturen für die spätere Analyse abgenommen. Der Hitzeschock-Phänotyp trat jedoch bei 52°C auf (3.1.7.7), weshalb der Rest der Kulturen noch für eine Stunde bei 52°C im Wasserbad weiter inkubiert wurde. Als Kontrolle dienten Ausgangszellen, die die zwei Stunden bei 30°C verblieben waren. Anschließend wurden die Zellen mit Glasperlen aufgeschlossen, um den Zellinhalt und damit die Trehalose freizusetzen. Der Trehalosegehalt wurde mittels BioLC (CarbopacMA1, ED50A) bestimmt, mit dem Ergebnis, daß der Wildtyp und alle Mutanten außer der Negativ-Kontrolle nach einer

Kultivierung bei 40°C Trehalose enthielten. Nach einer Stunde Hitzeschock bei 52°C hatte der Trehalosegehalt aller Stämme um ca. 70% abgenommen. Die Kontrollzellen zeigten keine starke Akkumulation von Trehalose (Abb. 3.17). Allerdings war unter keiner der Bedingungen ein signifikanter Unterschied im Trehalosegehalt des Wildtyps und der Mutanten feststellbar, demzufolge war die höhere Empfindlichkeit gegenüber Hitzeschock nicht auf einen verminderten Trehalosegehalt der Deletionsmutanten zurückzuführen.

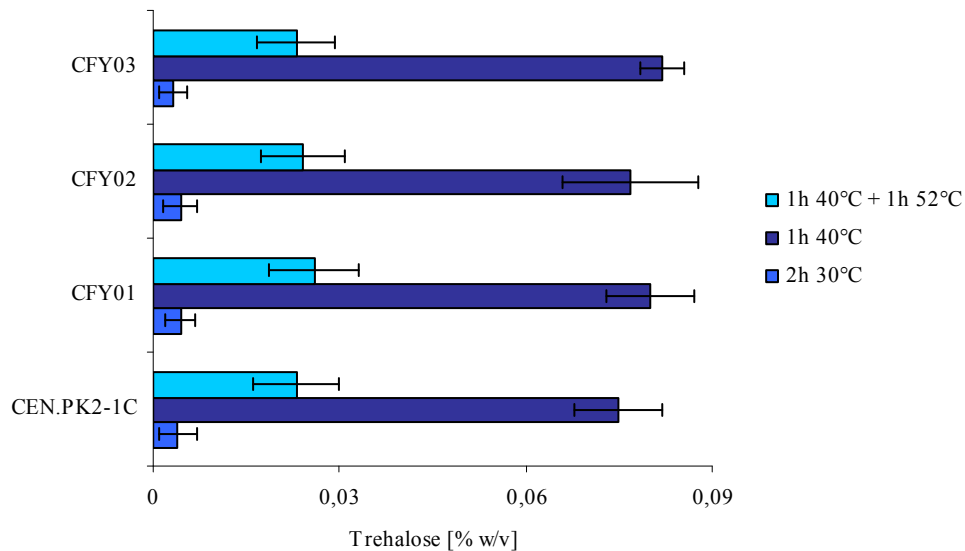


Abb. 3.17: Analyse des Trehalosegehalts von Zellen nach Hitzeschock. Der Wildtyp CEN.PK2-1C und die Deletionsmutanten CFY01 (*ybr241c*), CFY02 (*ygl104c*) und CFY03 (*ybr241c ygl104c*) wurden bei 30, 40 und 52°C inkubiert. Nach einer Stunde Inkubation bei 40°C und nach einer weiteren Stunde bei 52°C sowie nach zwei Stunden bei 30°C wurden Proben abgenommen. Anschließend wurde ein Zellaufschluß durchgeführt und die Rohextrakte mittels BioLC analysiert. Die gezeigten Werte sind das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung vom Mittelwert darstellen.

3.1.7.9 Vergleich des Trehalosegehalts des Cytosols und der Vakuolen von Wildtyp und Deletionsmutanten nach Hitzeschock

Zwar war kein Unterschied im Gesamttrehalosegehalt von Wildtyp und Deletionsmutanten feststellbar, aber es könnten Unterschiede in der subzellulären Verteilung der Trehalose bestehen. Möglicherweise akkumulieren Wildtypzellen Trehalose in der Vakuole und die Mutanten nicht, weil durch die Deletion der Transporter Ybr241 und Ygl104 kein Transport der Trehalosemoleküle über die Vakuolenmembran mehr möglich ist. Wenn auch vakuoläre Proteine und Membranen Hitzeschutz durch Trehalosemoleküle benötigen, könnte das Fehlen von Trehalose in der Vakuole zu einer geringeren Thermotoleranz der Mutanten führen. Um den Vakuoleninhalt nach Hitzestreß zu analysieren, sollten Zellen in Cytosol und Vakuolen fraktioniert werden, und zwar durch eine Permeabilisierung der

Plasmamembran mit Cu-Ionen. Diese bewirken eine Durchlässigkeit der Plasmamembran für Ionen und Metabolite, haben aber keinen Einfluß auf die Vakuolenmembran, demzufolge fließen nur die Inhaltsstoffe des Cytosols aus. Es verbleiben die Zellen inklusive der Vakuolen, die dann abfiltriert werden können. Es resultieren eine cytosolische und eine vakuoläre Fraktion. Diese Methode wurde von Ohsumi *et al.* (1988) zur Analyse des vakuolären Aminosäurepools entwickelt und bietet im Vergleich zur Präparation vakuolärer Vesikel den Vorteil, daß keine Inhaltsstoffe des Vakuolenlumens verloren gehen.

Zum Testen der Anwendbarkeit der Methode in Verbindung mit Zuckeranalytik wurden Flüssigkulturen der Stämme CEN.PK2-1C und CEN.PK2-1D *tps1* als Negativkontrolle bei einer Temperatur von 40°C im Wasserbad eine Stunde inkubiert und dann unter Einsatz verschiedener CuCl₂-Konzentrationen fraktioniert. Es wurden folgende CuCl₂-Konzentrationen verwendet: 0,1 mM, 0,2 mM, 0,4 mM, 4 mM, 40 mM. Die erhaltenen cytosolischen und vakuolären Extrakte wurden mittels BioLC (CarbopacMA1, ED50A) analysiert. Zum Abfiltrieren wurden Nylonfilter verwendet, da diese keine Zucker binden können. Ergebnis war, daß, wie erwartet, weder der vakuoläre noch der cytosolische Extrakt der *tps1*-Mutante Trehalose aufwies. Die Extrakte des Wildtyps enthielten Trehalose, die Verteilung war jedoch abhängig von der Cu-Konzentration. Nach Ohsumi war ab einer Konzentration von 0,2 mM keine Veränderung der Aminosäurekonzentration des cytosolischen Extrakts mehr erkennbar. Dagegen war mit steigender Cu-Konzentration immer mehr Trehalose in der cytosolischen Fraktion zu finden, bei 0,1 mM CuCl₂ waren es ca. 35% der Gesamttrehalose, bei 0,2 mM waren es ca. 50%, bei 4 mM waren es schon ca. 90% und bei 40 mM fast 100%. Dabei ist unklar, ob einfach mehr Cu nötig ist, um die Trehalose des Cytosols freizusetzen oder ob wirklich Trehalose in der Vakuole gespeichert ist und bei sehr hohen Cu-Konzentrationen auch die vakuoläre Membran durch die Cu-Ionen bzw. durch sekundäre Effekte permeabel wird. In der Literatur konnten bisher keine Zucker in der Vakuole identifiziert werden, somit waren keine Substanzen im Lumen der Vakuole bekannt, die als Kontrollen hätten fungieren können. Ferner mußte das Protokoll von Ohsumi dahingehend abgeändert werden, daß kein Sorbitol zum Stabilisieren der Extraktion verwendet werden konnte, da Sorbitol die gleiche Retentionszeit wie Trehalose aufweist. Nach Ohsumi sollte das aber nur zu einem geringen Verlust vakuolärer Inhaltsstoffe führen. Bei Zugrundelegen der Cu-Konzentration (0,2 mM), die von Ohsumi zur Standardextraktion von Aminosäuren angewandt wird, befand sich ca. 50% der Gesamttrehalose der Zelle in der Vakuole. Daher sollten die Deletionsmutanten im

Vergleich zum Wildtyp untersucht werden, falls Unterschiede feststellbar wären, wären das starke Hinweise auf eine Funktion von Ybr241 und Ygl104 beim Transport von Trehalose über die vakuoläre Membran.

Die Deletionsstämme CFY01, CFY02 und CFY03 und der Wildtyp CEN.PK2-1C wurden parallel über Nacht herangezogen, auf die gleiche optische Dichte ($OD_{600} = 2$) verdünnt und eine Stunde bei 40°C inkubiert, um eine verstärkte Trehalosesynthese auszulösen. Ein Teil der Kultur wurde abgenommen und der Rest wurde bei 52°C weiter inkubiert, da bei 52°C der Hitzeschockphänotyp auftrat. Danach wurde die Extraktion durchgeführt und die cytosolischen und vakuolären Extrakte mittels BioLC analysiert. Um die Verteilung der Trehalose zwischen Vakuole und Cytosol zu analysieren, wurde der Trehalosegehalt des jeweiligen Extrakts prozentual als Anteil der Gesamttrehalosemenge der Zellen ausgedrückt. Es konnten jedoch auch nach mehrfacher Wiederholung des Experiments keine signifikanten Unterschiede in der subzellulären Verteilung der Trehalose zwischen Deletionsmutanten und Wildtyp identifiziert werden (Abb. 3.18). Das konnte entweder darauf zurückzuführen sein, daß tatsächlich keine Unterschiede bestehen oder darauf, daß die Fraktionierung in Verbindung mit Zuckeranalytik nicht funktioniert hatte. Eine Erklärung für das eventuelle Versagen der Methode bei der Analyse des vakuolären Trehalosepools wäre, daß die Trehalosemoleküle des Cytosols im Gegensatz zu Aminosäuren nur eine unter Einsatz extrem hoher Cu-Konzentrationen permeabilisierte Membran passieren können.

Allerdings fällt bei Vergleich der absoluten Trehalosekonzentrationen in den Extrakten von Wildtyp und Mutanten auf (nicht gezeigt), daß die Extrakte der Deletionsmutanten zehnmal mehr Trehalose enthielten. Das ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß der Wildtyp die Hitzeschock-Bedingungen besser überdauerte als die Mutanten. Einfach mehr Zellen des Wildtyps konnten überleben, diese Zellen degradierten dann die Trehalosemoleküle in der 30°C-Inkubationsphase der Cu-Extraktion. Viele Zellen der Deletionsmutanten starben während der Hitzeschockphase ab, diese toten Zellen enthielten noch große Mengen Trehalose. Eine andere Erklärung könnte sein, daß die Mutanten Probleme beim Abbau der Trehalosemoleküle haben. Somit konnten die Mutanten den Großteil der Trehalose nicht degradieren.

Mit der Fraktionierung der Zellen in Vakuolen und Cytosol durch Cu-Ionen konnten also keine Aussagen über eine mögliche Akkumulation von Trehalose in der Vakuole und über eine Beteiligung der Transporter Ybr241 und Ygl104 am Trehalosetransport über die vakuoläre Membran getroffen werden.

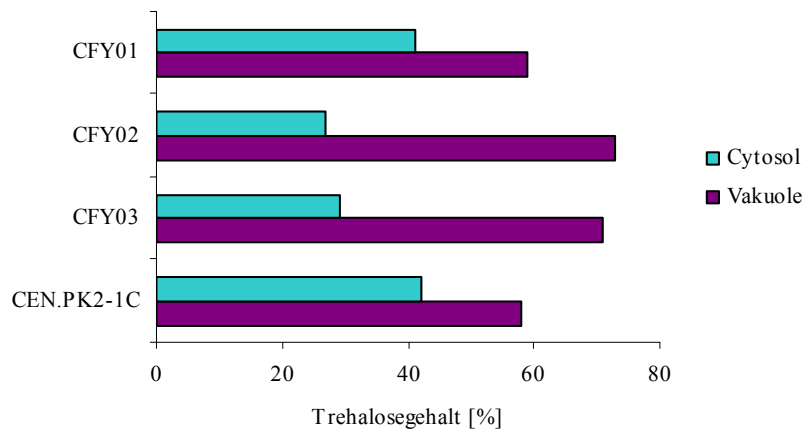


Abb. 3.18: Fraktionierung von Zellen in Vakuolen und Cytosol durch Cu-Ionen. Der Wildtyp CEN.PK2-1C und die Deletionsmutanten CFY01 (*ybr241c*), CFY02 (*ygl104c*) und CFY03 (*ybr241c ygl104c*) wurden für eine Stunde bei 40°C und anschließend eine weitere Stunde bei 52°C inkubiert. Danach wurde die Cu-Fraktionierung durchgeführt und der Trehalosegehalt des vakuolären und cytosolischen Extrakts mittels BioLC analysiert. Der Trehalosegehalt der Vakuole und des Cytosols wurde prozentual als Anteil am Gesamttrehalosegehalt der Zellen ausgedrückt.

3.1.7.10 Suche nach genetischen Interaktionen

Da die Suche nach Substraten der vakuolären Transporter ergebnislos verlaufen war, sollte versucht werden, Hinweise auf die physiologische Funktion der Gene *YBR241C* und *YGL104C* mit Hilfe von genetischen Interaktionen zu erhalten. Redundante Funktionen von Genen können oft mit genetischen Interaktionen aufgedeckt werden. Genetische Interaktionen wiederum können durch synthetisch letale Mutanten identifiziert werden. Beispielsweise sind die einzelnen Deletionen A und B für die Zellen nicht letal, Zellen aber, die die Deletionen beider Gene aufweisen, sind nicht lebensfähig. Ein solcher Phänotyp wird als synthetisch letal bezeichnet. Falls die Doppeldeletion der Gene A und B zu einem langsameren Wachstum der entsprechenden Mutanten führt, wurde das als synthetisch krank definiert (Appling, 1999). Sowohl bei Einzel- als auch bei Doppeldeletionsmutanten der Gene *YBR241C* und *YGL104C* war kein Phänotyp detektierbar. Da die Gene aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie schon eine redundante Funktion haben könnten, sollte nach Genen gesucht werden, deren Deletion zusätzlich zur Doppeldeletion Mutanten erzeugt, die einen synthetisch letalen oder einen synthetisch kranken Phänotyp zeigen. Das würde Hinweise auf eine redundante Funktion im selben Stoffwechselweg geben, da die Deletion von *YBR241C*, die von *YGL104C* und die des zusätzlichen Gens nötig ist, um den Stoffwechselweg zu eliminieren. Eine Beteiligung an zwei verschiedenen Stoffwechselwegen wäre auch möglich, wenn einer den Defekt des

anderen kompensieren kann, also mindestens einer der Wege für den gleichen essentiellen Prozeß notwendig ist. Gewiß könnten auch genetische Interaktionen mit nur einem der Gene *YBR241C* oder *YGL104C* bestehen, da die redundante Funktion der Gene nur eine Hypothese ist.

Zur Suche nach synthetisch letalen Mutanten kam das Verfahren des „Synthetic Genetic Array“ (SGA) nach Tong *et al.* (2001) zur Anwendung. Das Verfahren beruht darauf, daß die Mutante von Interesse mit einer Sammlung von ca. 4700 Deletionsmutanten gekreuzt wird. Resultieren daraus nicht lebensfähige Doppeldeletionsmutanten, können über diese funktionelle Beziehungen zwischen Genen identifiziert werden.

Der erste Schritt war die Konstruktion des Ausgangsstamms CFY17 im Stammhintergrund BY4742. Zur Deletion der Gene *YBR241C* und *YGL104C* wurde eine *LEU2-MX*-Kassette über homologe Rekombination in den *YGL104C*-Locus integriert, dann eine *natMX*-Kassette, die den Zellen eine Resistenz gegen das Antibiotikum Nourseothricin (clonNAT) verleiht, in den *YBR241C*-Locus. Als nächstes wurde ein *MFA1prHIS3-URA3*-Reporterkonstrukt in den *CAN1*-Locus integriert. Da das *HIS3*-Gen unter Kontrolle des *MFA1*-Promotors steht, wird es nur in Zellen des Paarungstyps *MATa* exprimiert. Nur in Zellen dieses Paarungstyps werden die Gene der Transkriptionsfaktoren exprimiert, die den *MFA1*-Promotor anschalten. Zusätzlich verleiht die *can1*-Deletion Resistenz gegenüber dem toxischen Arginin-Analogon Canavanin. Im Laufe des SGA wird auf Medium ohne Histidin auf haploide *MATa*-Zellen selektiert, weil nur in diesen Zellen der *MFA1*-Promotor aktiv sein sollte, somit sollten auch nur diese Zellen wachsen. Zumal aber diploide Zellen homozygot im *MATa/MATa*-Locus werden können, also *MATa/MATa*, und auch in diesen der *MFA1*-Promotor aktiv ist, enthält das Haploidselektions-Medium zusätzlich Canavanin. Nur Haploide mit *can1*-Deletion können wachsen, da sie kein Canavanin aufnehmen können. Diploide dagegen haben noch ein *CAN1*-Allel, sie nehmen Canavanin auf und wachsen nicht. Daher ist diese Maßnahme nötig, um das Wachstum der *MATa/MATa*-Diploiden zu verhindern (Ooi *et al.*, 2003). Der Ausgangsstamm (CFY17) wurde mit der Stammsammlung (EUROSCARF) gekreuzt. Jeder einzelne Stamm der Sammlung weist die Deletion eines anderen Gens auf, was hier als Deletion *x* bezeichnet wird. Die Stammsammlung setzt sich aus allen lebensfähigen Deletionsmutanten der Hefe zusammen. Die aus der Kreuzung resultierenden Diploiden wurden selektiert und auf Medium mit Kaliumacetat übertragen, um die Sporulation auszulösen. Nur Sporen mit dem Paarungstyp *MATa* bildeten Kolonien auf Haploidselektions-Medium. Dann erfolgte die Selektion über die mit den Deletionen verbundenen Markern. Auf die Mutation *x* aus der

Stammsammlung wurde auf Medium mit G418 und auf die Mutationen *ybr241*, *ygl104* und *x* auf Medium mit clonNat, ohne Leucin und mit G418 selektiert. Die beiden entsprechenden Platten wurden verglichen und Wachstumsunterschiede identifiziert.

Ein Nachteil der SGA-Technik ist die hohe Anzahl an falsch positiven Interaktionen. Bei einer ganzen Reihe von Deletionsmutanten werden schon bei Kreuzung mit dem Wildtyp synthetisch letale Phänotypen als Folge des Verfahrens festgestellt. Das sind alle Mutanten, die aufgrund der Deletion des Gens *X* sehr langsam wachsen, da sie im Laufe des Verfahrens wegen des Wachstumsdefekts verloren gehen. Außerdem sind das Mutanten, die sich nicht paaren oder die nicht sporulieren können, sie bilden keine Diploiden bzw. keine Sporen, ferner Mutanten, die Defekte in den Stoffwechselwegen der Markeramino säuren Histidin oder Leucin haben und diese Aminosäuren nicht mehr selber herstellen können. Aus diesem Grund können sie nicht auf den Selektionsmedien wachsen. Das gleiche gilt für Mutanten des Arginin-Biosynthesewegs, sie benötigen Arginin, und das Haploidselektions-Medium enthält anstatt Arginin Canavanin. Des weiteren bilden Mutanten, deren Deletion genetisch mit der Deletion von Interesse gekoppelt ist, Doppelmutanten mit geringerer Häufigkeit, weil deren Bildung über eine meiotische Rekombination erfolgt. Auch das kann zu falsch positiven Ergebnissen führen. Deswegen wurden die erhaltenen Ergebnisse den Ergebnissen von Tong *et al.* (supplementary material) gegenübergestellt, da in dieser Studie ein SGA mit dem Wildtyp als Kontrolle durchgeführt worden war. Es konnten ca. 90% der falsch positiven Mutanten wiedergefunden werden. Außerdem bildeten sich keine Doppelmutanten, wenn die Deletion aus der Stammsammlung identisch war mit der Deletion des Gens *YBR241C* oder *YGL104C*, was darauf zurückzuführen ist, daß die haploiden Zellen nur jeweils eine Kopie des Allels enthalten. Diese Daten beweisen, daß das Verfahren erfolgreich zum Abschluß gebracht worden war. Die ca. 10%ige Abweichung ist vermutlich auf das Wachstum von Suppressormutanten zurückzuführen.

Durch Vergleich der Selektionsplatten konnten einige wenige sehr deutliche synthetisch letale Phänotypen identifiziert werden, wobei alle bis auf einen auf genetische Kopplung zurückzuführen waren und damit als falsch positiv ausgeschlossen wurden. Als einzige deutliche Interaktion blieb die mit dem Gen der Threonin-Synthase *THR4*. Ansonsten waren nur schwache Wachstumsunterschiede auszumachen. Die putativen genetischen Interaktionen sollten mittels Tetradenanalyse verifiziert werden. Deshalb wurden die entsprechenden Sporen auf Agarplatten separiert. Es wurde ihnen erlaubt zu reifen und Kolonien zu bilden. Anschließend wurden die Kolonien auf Platten ohne Leucin, mit G418

oder clonNat replikaplatziert. Über die Verteilung der Markergene konnte dann auf die verbundenen Mutationen rückgeschlossen werden. Um eine genetische Interaktion zu bestätigen, mußte die Verteilung auftreten, daß Zellen, die Phänotypen zeigten, alle Markergene und damit alle Deletionen enthielten. Die Interaktion mit *THR4* konnte nicht durch eine Tetradenanalyse verifiziert werden. Um keine genetische Interaktion zu verpassen, wurde auch ein Teil der sehr schwachen putativen Interaktionen mittels Tetradenanalyse überprüft. So konnten zwar keine synthetisch letalen, aber synthetisch kranke Interaktionen von *YBR241C* und *YGL104C* mit dem Gen *TPS1* und dem Gen *FPS1* identifiziert werden. Allerdings können die Interaktionen entweder mit *YBR241C*, mit *YGL104C* oder mit beiden Genen bestehen.

3.1.7.10.1 Genetische Interaktion mit *TPS1*

Um die Mutanten zu erhalten, die alle drei Mutationen aufweisen, in diesem Fall *tps1*, *ybr241c* und *ygl104c*, wurden die Hapliden auf Medien ohne Leucin, mit G418 und clonNat gestempelt. Damit falsch positive Interaktionen ausgeschlossen werden konnten, wurde außerdem auf die Mutation aus der Stammsammlung, hier *tps1*, auf Medien, die G418 enthielten, selektiert. Der Vergleich des Wachstums ergab einen schwachen Unterschied zwischen Einfachmutanten (*tps1*) und Dreifachmutanten (*tps1 ybr241c ygl104c*). Daher wurde eine Tetradenanalyse durchgeführt, und es konnten Sporen identifiziert werden, die alle drei Mutationen aufwiesen. Eine Tetrade wurde näher untersucht, die Sporen mit folgenden Genotypen enthielt: *tps1*, *ybr241c*, *ygl104c* und *tps1 ybr241c ygl104c*. Das Wachstumsverhalten der Mutanten auf synthetischen Komplettmedien mit Glucose wurde bei 30 und 37°C analysiert. Die Einfachmutationen *ybr241c* und *ygl104c* zeigten erwartungsgemäß keinen Phänotyp. Die *tps1*-Mutante wuchs bei 30°C geringfügig langsamer als der Wildtyp, die Dreifachmutante wuchs noch etwas langsamer. Durch Inkubation bei 37°C ließ sich der Effekt erheblich verstärken. Die *tps1*-Mutante wuchs sehr langsam, die Dreifachmutante wuchs fast nicht mehr (nicht gezeigt). Um diesen Wachstumsphänotyp zu bestätigen und näher zu charakterisieren sollte *TPS1* in den Stämmen CEN.PK2-1C- und CFY03 deletiert werden (3.1.7.11).

3.1.7.10.2 Genetische Interaktion mit *FPS1*

Das Gen *FPS1* codiert für einen Glycerintransporter der Plasmamembran (Luyten *et al.*, 1995). Durch Vergleich des Wachstumsverhaltens im finalen Schritt des SGA konnte ein schwacher Wachstumsunterschied zwischen der *fps1*-Mutante und der *fps1 ybr241 ygl104*-Mutante festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde eine Tetradenanalyse durchgeführt.

Es konnten Einfach- und Dreifachmutanten isoliert werden, deren Wachstumsverhalten auf synthetischem Kompletmedium mit Glucose bei 30 und 37°C untersucht wurde. Bei 30°C war kaum ein Unterschied zwischen Wildtyp, *fps1*-Mutante und Dreifachmutante sichtbar. Durch Inkubation bei 37°C konnte der Wachstumsdefekt verstärkt werden, die *fps1*-Mutante wuchs langsamer als der Wildtyp und die Dreifachmutante wuchs noch langsamer. Nach diesen Ergebnissen bestand also eine schwache genetische Interaktion mit dem Gen *FPS1*, dessen Produkt eine Rolle in der Osmoregulation der Zelle spielt. Hefezellen akkumulieren Glycerin intrazellulär als kompatibles Solut, was nach hypoosmotischem Schock schnell durch Fps1 freigesetzt wird (Tamas *et al.*, 1999). Daher sollten die Überlebensraten der Mutanten nach hypoosmotischem Schock verglichen werden, eventuell könnte auf diese Weise der Wachstumsdefekt der Dreifachmutante noch stärker hervorgehoben werden. Um die Akkumulation des kompatiblen Solutes Glycerin auszulösen, wurden die Zellen über Nacht in flüssigem Vollmedium, das 1M Sorbitol enthielt, inkubiert. Dann wurde ein hypoosmotischer Schock durch Verdünnen der Zellsuspension in Wasser verursacht. Ein Teil der Zellsuspension wurde als Kontrolle ohne hypoosmotischen Schock in Medium mit Sorbitol verdünnt. Anschließend wurden von diesen Zellsuspensionen Verdünnungsreihen hergestellt und auf Vollmedien getropft, die Kontrolle auf Vollmedium, das mit 5% NaCl versetzt war. Da die *fps1*-Mutanten das akkumulierte Glycerin nicht schlagartig freisetzen konnten, waren sie im Vergleich zum Wildtyp wesentlich empfindlicher gegenüber hypoosmotischem Schock. Nur wenige Zellen der *fps1*-Mutante überlebten die Schockbedingungen, und die Überlebensrate der Dreifachmutante war noch geringer (Abb. 3.19A). Auf den Kontrollplatten waren die Zellen keinem hypoosmotischen Schock ausgesetzt, da die Platten 5% NaCl enthielten. Unter diesen Bedingungen waren keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutanten auszumachen (Abb. 3.19B). Als nächstes wurden die Tests mit Einfach- und Dreifachmutanten, die von Sporen aus anderen Tetraden abstammten, wiederholt. Die Ergebnisse waren reproduzierbar. Das Gen des Glycerintransporters der Plasmamembran Fps1 zeigt also eine schwache genetische Interaktion mit den Genen *YBR241C* und *YGL104C*.

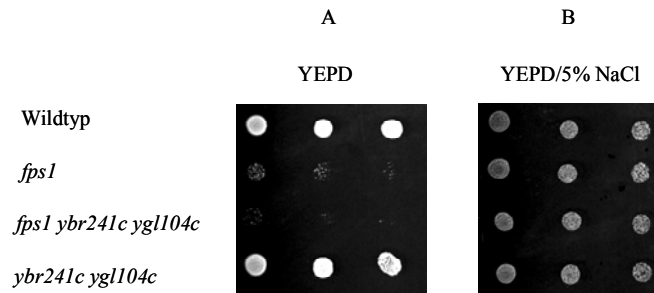


Abb. 3.19: Sensitivität von *fps1*- und *fps1 ybr241c ygl104c*-Mutanten gegenüber hypoosmotischem Schock. Die Zellen wurden über Nacht in flüssigem Vollmedium, das 1M Sorbitol enthielt, inkubiert. Anschließend wurde bei einem Teil der Zellen ein hypoosmotischer Schock durch Inkubation in Wasser verursacht. Der Rest der Zellen wurde als Kontrolle in Medium mit Sorbitol verdünnt. Dann wurden Verdünnungsreihen (1:5) hergestellt und auf Vollmedium (A) und als Kontrolle auf Vollmedium, das mit 5% NaCl versetzt war (B), getropft. Die Zellen wurden für drei Tage bei 37°C inkubiert.

3.1.7.11 Deletion von Genen des Trehalosestoffwechsels in den Stämmen CFY03 und CEN.PK2-1C

Die Ergebnisse der Hitzeschock-Experimente waren Hinweise auf eine Beteiligung von Ybr241 und Ygl104 am Trehalosestoffwechsel, da die Deletionsmutanten eine höhere Sensitivität gegenüber Hitzestress zeigten. Des Weiteren konnte als Ergebnis der SGA-Analyse eine synthetisch kranke Interaktion der Gene *YBR241C* und *YGL104C* mit dem Gen der Trehalose-6-Phosphat-Synthase identifiziert werden. Es sollte untersucht werden, ob noch weitere synthetisch kranke Beziehungen zu anderen Genen des Trehalosestoffwechsels bestehen, die unter den Standardbedingungen der SGA-Analyse möglicherweise nicht detektierbar waren. Daher wurde jeweils *ATH1* bzw. *NTH1* in den Stämmen CEN.PK2-1C und CFY03 deletiert. Das Gen *ATH1* codiert für die saure Trehalase (Destruelle *et al.*, 1995) und *NTH1* für die neutrale Trehalase (Kopp *et al.*, 1993). Außerdem wurde *TPS1* deletiert, um das Ergebnis der SGA-Analyse im CEN.PK-Stammhintergrund zu bestätigen. Die Stämme wurden mittels *loxP-kanMX-loxP*-System konstruiert und als CFY20 (*ath1*), CFY21 (*ath1 ybr241c ygl104c*), CFY22 (*nth1*), CFY23 (*nth1 ybr241c ygl104c*), CFY24 (*tps1*) und CFY25 (*tps1 ybr241c ygl104c*) bezeichnet. Das Wachstumsverhalten dieser Deletionsmutanten sollte unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden.

3.1.7.11.1 Deletion der Gene der Trehalasen *ATH1* und *NTH1*

Das Gen *NTH1* wird bei einer Temperatur von 40°C stark induziert (Nwaka *et al.*, 1995b). Diese erhöhte Expressionsrate steht mit der Rolle der neutralen Trehalase Nth1 bei der

Erholung der Hefezellen nach Hitzestress in Verbindung (Nwaka *et al.*, 1995a). Die saure Trehalase Ath1 hingegen soll laut Literatur keinen Einfluß auf die Thermotoleranz der Zellen haben (Nwaka *et al.*, 1995b). Um das zu überprüfen und eine mögliche Beziehung zu den vakuolären Transportern Ybr241 und Ygl104 aufzudecken, sollte das Verhalten von Stämmen, die Deletionen der Trehalasen aufweisen, unter Hitzeschockbedingungen analysiert werden. Daher wurden Verdünnungsreihen von Zellsuspensionen (OD₆₀₀ von 2) der Stämme CEN.PK2-1C, CFY20, CFY21, CFY22 und CFY23, die zwei Tage lang in Flüssigmedium herangezogen worden waren, auf synthetisches Komplettmedium mit Glucose getropft und bei 40°C für drei Tage inkubiert. Alle Deletionsmutanten wuchsen minimal langsamer als der Wildtyp. Die Dreifachmutanten CFY21 und CFY23 wuchsen noch etwas langsamer (Abb. 3.20).

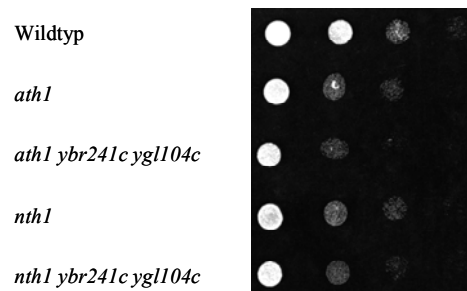


Abb. 3.20: Analyse des Wachstumsverhaltens bei 40°C. Verdünnungsreihen (1:5) der Zellsuspensionen (OD₆₀₀ von 2) der Stämme CEN.PK2-1C, CFY20 (*ath1*), CFY21 (*ath1 ybr241c ygl104c*), CFY22 (*nth1*) und CFY23 (*nth1 ybr241c ygl104c*), die zwei Tage in synthetischem Flüssigmedium mit Glucose herangezogen worden waren, wurden auf synthetisches Komplettmedium mit Glucose getropft und bei 40°C für drei Tage inkubiert.

Die saure Trehalase Ath1 soll essentiell für das Wachstum mit Trehalose als Kohlenstoffquelle sein (Nwaka *et al.*, 1996). Um das im CEN.PK-Stammhintergrund zu überprüfen, wurde das Wachstum der Stämme CEN.PK2-1C und CFY20 sowie auch der Dreifachmutante CFY21 auf Trehalose-Minimalmedium untersucht. Die *ath1*-Mutante konnte wachsen, allerdings deutlich langsamer als der Wildtyp. Der Stamm CFY21, der noch zusätzlich die Deletionen der Gene *YBR241C* und *YGL104C* aufweist, wuchs noch langsamer (Abb. 3.21).

Durch diese Wachstumsexperimente konnten Hinweise auf eventuelle Beziehungen der vakuolären Transporter Ybr241 und Ygl104 zu Trehalose-abbauenden Enzymen gefunden werden. Die identifizierten Phänotypen waren allerdings zu schwach, um darauf basierend weitere Experimente durchzuführen.

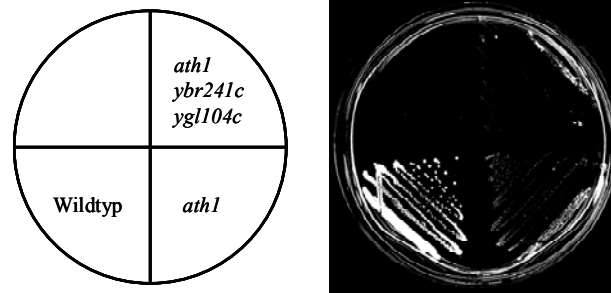


Abb. 3.21: Wachstumstest auf Trehalosemedium. Die Stämme CEN.PK2-1C, CFY20 (*ath1*) und CFY21 (*ath1 ybr241c ygl104c*) wurden auf synthetischem Minimalmedium mit Trehalose ausgestrichen und bei 30°C für sieben Tage inkubiert.

3.1.7.11.2 Deletion des Gens der Trehalose-6-Phosphat-Synthase *TPS1*

Mutanten, bei denen die Trehalose-6-Phosphat-Synthase, codiert vom Gen *TPS1*, inaktiv ist, zeigen aufgrund einer verminderten Glycolyseregulation einen Wachstumsdefekt mit Glucose als Kohlenstoffquelle. Das Wachstum mit Galactose als Kohlenstoffquelle wird jedoch nicht beeinflusst (Thevelein und Hohmann, 1995). Außerdem sind solche Mutanten empfindlicher gegenüber Hitzestress, da sie keine Trehalose mehr synthetisieren können (De Virgilio *et al.*, 1994). Der Wachstumsphänotyp auf Glucosemedium ist stammabhängig (Neves *et al.*, 1995), und sowohl die *tps1*-Mutante aus der Stammsammlung (BY) als auch die *tps1*-Deletionsmutante des Stammes CEN.PK2-1C kann mit Glucose wachsen, allerdings auf synthetischen Medien langsamer als der Wildtyp. Nach den Ergebnissen des SGA besteht eine synthetisch kranke Interaktion von *TPS1* mit *YGL104C* und *YBR241C*. Da *tps1*-Mutanten keine intrazelluläre Trehalose mehr akkumulieren, deutet diese Interaktion an, daß Trehalose nicht das Substrat der Transporter Ybr241 und Ygl104 sein kann. Die Wachstumsversuche des SGA wurden mit Glucose als Kohlenstoffquelle durchgeführt, daher wäre eine Verstärkung des Phänotyps der *tps1*-Mutante, verursacht durch die verminderte Glycolyseregulation, bei Fehlen von Ybr241 und Ygl104 möglich. Deswegen sollte das Wachstumsverhalten der Stämme CFY24 und CFY25, die die *tps1*-Deletion bzw. die Deletion von *TPS1* und von *YBR241C* und *YGL104C* aufweisen, bei 30 und 37°C auf synthetischen Komplettmedien mit Galactose (2%), Glucose (2%), Maltose (2%) und Glycerin/Ethanol (je 2%) als Kohlenstoffquelle analysiert werden. Die Hefezellen wurden für zwei Tage in synthetischem Flüssigmedium mit Galactose (2%) herangezogen. Dann wurden Verdünnungsreihen der Zellsuspensionen (OD₆₀₀ von 1) auf die verschiedenen Platten getropft und diese zwei Tage bei 30 bzw. drei Tage bei 37°C inkubiert. Die *tps1*-Deletionsmutante CFY24 wuchs bei 30°C auf

synthetischen Komplettdmedien mit Galactose, Glucose und Maltose langsamer als der Wildtyp, der Dreifachdeletionsstamm CFY25 wuchs noch etwas langsamer als der Stamm CFY24. Besonders deutlich war der Wachstumsdefekt mit Maltose, kaum erkennbar mit Glucose. Mit Glycerin/Ethanol als Kohlenstoffquelle wuchs die *tps1*-Mutante etwas schneller als der Wildtyp, die Dreifachmutante wuchs wesentlich langsamer (Abb. 3.22A). Bei 37°C waren die Wachstumsunterschiede zwischen Wildtyp und den Stämmen CFY24 und CFY25 auf Galactose-, Glucose- und auf Maltosemedium noch wesentlich deutlicher. Die *tps1*-Mutante CFY24 wuchs sehr langsam, die Dreifachmutante CFY25 wuchs noch langsamer. Am stärksten war der Effekt wieder auf Maltosemedium (Abb. 3.22B). Auf Glycerin/Ethanolmedium war bei 37°C überhaupt kein Wachstum der Stämme zu beobachten (nicht gezeigt). Da *tps1*-Mutanten keine Trehalose mehr synthetisieren können, sollte untersucht werden, ob der Wachstumsphänotyp durch extrazelluläre Trehalose komplementiert werden kann. Die extrazelluläre Trehalose müsste über den α -Glucosidtransporter Agt1 in die Zelle transportiert werden. Daher wurden die Zellen auf Platten getropft, die zusätzlich zu den Kohlenstoffquellen Galactose, Glucose, Maltose und Glycerin/Ethanol noch 2% Trehalose enthielten. Wenn die Medien zusätzlich mit Trehalose versetzt waren, konnte der Wachstumsdefekt der Einfachmutante CFY24 fast komplett aufgehoben werden, der des Dreifachdeletionsstammes CFY25 hingegen nur teilweise. Besonders deutlich war der Effekt auf den Maltosemedien. Auf Glycerin/Ethanolmedium war generell bei Zusatz von Trehalose schnelleres Wachstum aller getesteten Stämme feststellbar (Abb. 3.22A). Durch Inkubation bei 37°C ließ sich der Unterschied zwischen *tps1*-Mutante und Dreifachmutante noch verstärken (Abb. 3.22B). Wurden die Zellen nicht in flüssigem Galactosemedium, sondern in flüssigem Glucosemedium herangezogen und dann auf Glucosemedium getropft, war der Effekt der Komplementation durch extrazelluläre Trehalose bei 37°C noch wesentlich deutlicher (3.24A).

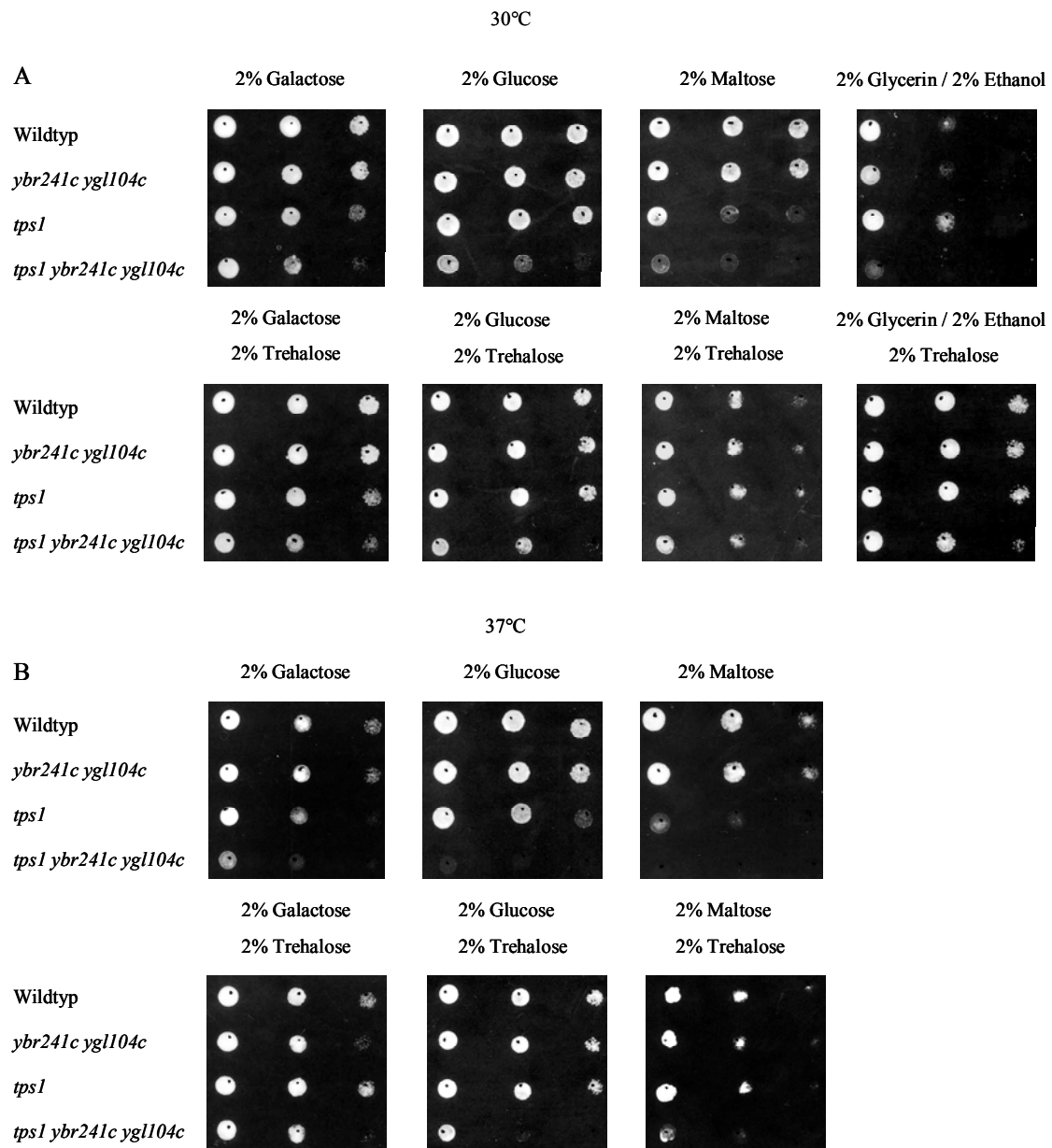


Abb. 3.22: Analyse des Wachstumsverhaltens von *tps1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die Stämme CEN.PK2-1C, CFY03 (*ybr241c ygl104c*), CFY24 (*tps1*) und CFY25 (*tps1 ybr241c ygl104c*) wurden zwei Tage in synthetischem Flüssigmedium mit Galactose herangezogen. Dann wurden Verdünnungsreihen (1:5) der Zellsuspensionen (OD_{600} von 1) auf synthetische Komplettmedien mit Galactose (2%), Glucose (2%), Maltose (2%) und Glycerin/Ethanol (je 2%) getropft und außerdem auf Medien, die noch zusätzlich 2% Trehalose enthielten. Dann wurden die Platten für zwei Tage bei 30°C (A) bzw. für drei Tage bei 37°C (B) inkubiert.

Um den Wachstumsdefekt des Stammes CFY25 bei 37°C auf synthetischem Glucose-/Trehalosemedium aufzuheben, sollten die Gene, die für die vakuolären Transporter Ybr241 und Ygl104 codieren, auf Plasmiden wieder in die Mutanten gebracht werden. Falls die Komplementation möglich wäre, wäre das der Nachweis, daß der Phänotyp wirklich auf die Proteine Ybr241 und Ygl104 zurückzuführen ist. Des weiteren sollte

analysiert werden, ob tatsächlich die Deletion beider Gene für den Phänotyp verantwortlich ist, oder ob die Deletion eines der Gene ausreicht. Daher wurden die CEN-Plasmide YCp111YBR241 und YCp33YGL104 in den Deletionsstamm CFY25 transformiert. Es wurde jedes der Plasmide einzeln sowie beide Plasmide zusammen transformiert. Mit den erhaltenen Transformanten wurden dann, wie oben beschrieben, Wachstumsexperimente durchgeführt. Es zeigte sich, daß beide Plasmide nötig waren, um den Phänotyp zu komplementieren. Allerdings war es nicht möglich den Phänotyp komplett aufzuheben. Der Wildtyp mit leeren Vektoren wuchs schneller als der Stamm CFY25, der die Plasmide YCp111YBR241 und YCp33YGL104 trug. Der Unterschied zum Stamm CFY25, der mit den leeren Vektoren transformiert war, war jedoch sehr deutlich (Abb. 3.23B). Somit konnten die Ergebnisse der SGA-Analyse bestätigt werden. Es besteht eine synthetisch kranke Interaktion zwischen den Genen *TPS1*, *YBR241C* und *YGL104C*. Diese Interaktion ist vermutlich auf eine Verstärkung des Wachstumsdefekts der *tps1*-Mutante mit schnell fermentierbaren Kohlenstoffquellen zurückzuführen. Der Defekt beruht möglicherweise auf einer verminderten Glycolyseregulation. Eine alternative Erklärung ist eine Rolle des Trehalosestoffwechsels bei der Regeneration von freiem Phosphat. Die *tps1*-Mutanten scheinen die Zuckerphosphate zu akkumulieren, die normalerweise zur Trehalosesynthese genutzt werden, was im Endeffekt zu einem Mangel an freiem Phosphat führt (Thevelein und Hohmann, 1995). Daher könnte eine Beziehung von Ybr241 und Ygl104 zum Phosphatstoffwechsel bestehen. Somit wäre eine Rolle von Ybr241 und Ygl104 beim Phosphattransport über die vakuoläre Membran denkbar. Allerdings kann auch die Stimulation der Glycerinsynthese den Wachstumsdefekt der *tps1*-Mutante aufheben (Luyten *et al.*, 1995), was durch das Freisetzen von anorganischem Phosphat bei der Glycerinproduktion erklärbar ist. Somit spielt der Glycerinstoffwechsel wie der Trehalosestoffwechsel eine Rolle bei der Regeneration von freiem Phosphat. Daher wäre auch ein sekundärer Einfluß der beiden Proteine auf die Phosphatkonzentration aufgrund einer Beziehung zum Glycerinstoffwechsel vorstellbar. Deswegen käme als Substrat neben Phosphat auch Glycerin in Betracht.

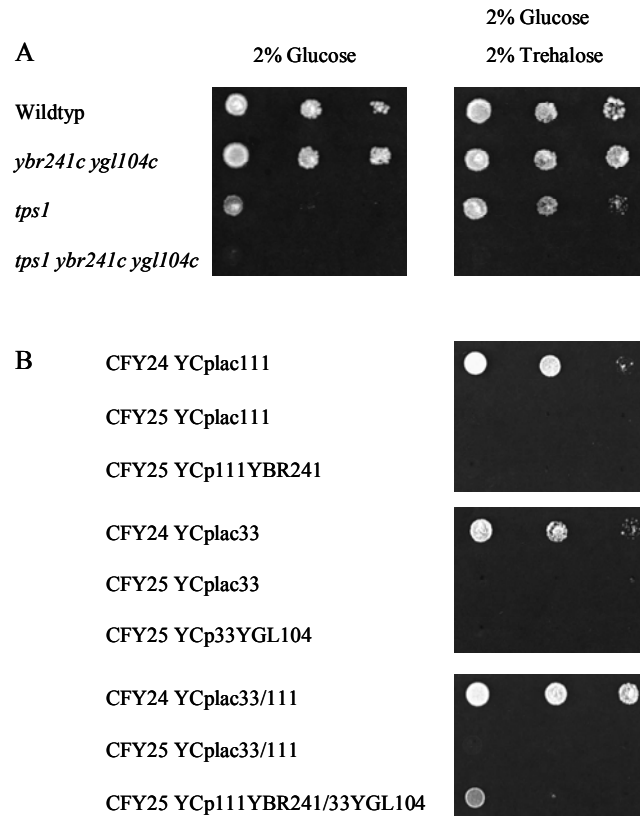


Abb. 3.23: (A) Analyse des Wachstumsverhaltens von *tps1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die Stämme CEN.PK2-1C, CFY03 (*ybr241c ygl104c*), CFY24 (*tps1*) und CFY25 (*tps1 ybr241c ygl104c*) wurden zwei Tage in synthetischem Flüssigmedium mit Glucose herangezogen. Dann wurden Verdünnungsreihen (1:5) der Zellsuspensionen (OD_{600} von 1) auf synthetisches Komplettmedium mit Glucose (2%) und mit Glucose (2%) und Trehalose (2%) getropft und für drei Tage bei 37°C inkubiert. (B) Komplementation des Wachstumsphänotyps des Stammes CFY25 auf Trehalose-/Glucosemedium bei 37°C. Die Stämme CFY24 (*tps1*) und CFY25 (*tps1 ybr241c ygl104c*) wurden mit den in der Abbildung beschriebenen Plasmiden transformiert. Die Transformanten wurden zwei Tage in synthetischem Flüssigmedium mit Glucose herangezogen. Dann wurden Verdünnungsreihen (1:5) der Zellsuspensionen (OD_{600} von 1) auf synthetisches Komplettmedium mit Glucose und Trehalose getropft und für drei Tage bei 37°C inkubiert. In den Medien fehlten Uracil, Leucin oder Uracil und Leucin, um auf die Plasmide zu selektieren.

Ferner wurde das Wachstum auf synthetischem Komplettmedium mit 2% Trehalose als Kohlenstoffquelle bei 30 und 37°C analysiert. Bei 30°C war kein Unterschied im Wachstumsverhalten zwischen den einzelnen Mutanten zu beobachten. Bei 37°C allerdings wuchs die Dreifachdeletionsmutante CFY25 (*tps1 ybr241c ygl104c*) deutlich schneller als der Stamm CFY24 (*tps1*). Doch schon der Stamm CFY03 (*ybr241c ygl104c*) zeigte schnelleres Wachstum (Abb. 3.24), daher war dieser Phänotyp unabhängig von *TPS1*. Ein solcher Wachstumsphänotyp konnte nach Ausstreichen der Stämme

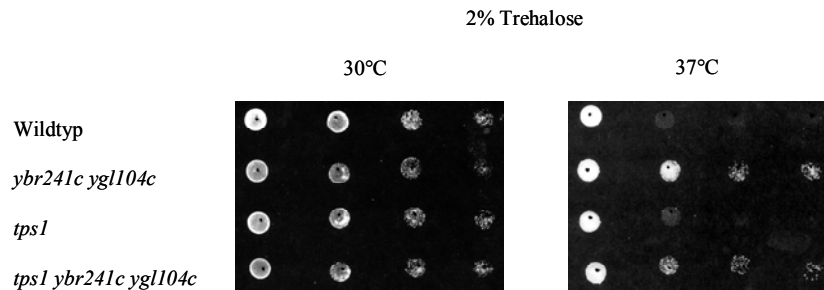


Abb. 3.24: Analyse des Wachstumsverhaltens von *tps1*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Die Stämme CEN.PK2-1C, CFY03 (*ybr241c ygl104c*), CFY24 (*tps1*) und CFY25 (*tps1 ybr241c ygl104c*) wurden zwei Tage in synthetischem Flüssigmedium mit Galactose herangezogen. Dann wurden Verdünnungsreihen (1:5) der Zellsuspensionen (OD₆₀₀ von 1) auf synthetisches Komplettmedium mit Trehalose (2%) getropft und zwei Tage bei 30°C bzw. für drei Tage bei 37°C inkubiert.

CEN.PK2-1C und CFY03 auf synthetischem Komplettmedium mit Trehalose und anschließender Inkubation bei 37°C nicht beobachtet werden (3.1.7.2).

3.1.7.12 Analyse des Wachstumsverhaltens der Deletionsmutanten mit geringen Glucosemengen

Bei der Analyse des Wachstumsverhalten der *tps1*-Mutanten stellte sich heraus, daß die Deletionsmutante der Gene *YBR241C* und *YGL104C* schneller bei 37°C mit Trehalose als Kohlenstoffquelle wachsen konnte als der Wildtyp. Da durch die extrazelluläre Spaltung der Trehalose über Ath1 nur relativ geringe Mengen an Glucose freigesetzt werden (3.1.6), können die Mutanten möglicherweise diese geringen Glucosemengen besser verstoffwechseln als der Wildtyp. Daher wurde das Wachstum auf synthetischen Komplettmedien mit 2% Trehalose, 0,1% Glucose, 2% Saccharose und 2% Raffinose bei 30 und 37°C untersucht. Auch bei der extrazellulären Spaltung von Saccharose und Raffinose entstehen nur geringe Mengen an Glucose. Außerdem sollte geklärt werden, ob die Deletion von *YBR241C*, *YGL104C* oder die Deletion beider Gene für den Phänotyp nötig ist. Die Zellen wurden in synthetischem Komplettmedium mit Glucose herangezogen, einmal mit Wasser gewaschen und Verdünnungsreihen der Zellsuspensionen (OD₆₀₀ von 1) auf die entsprechenden Platten getropft und diese bei 30 und 37°C inkubiert. Nach Inkubation bei 30°C war bei Trehalose als Kohlenstoffquelle kein Unterschied im Wachstum zwischen Mutanten und Wildtyp erkennbar (nicht gezeigt). Bei 37°C allerdings wuchs die *ybr241c*-Mutante auf Trehalosemedium geringfügig schneller als der Wildtyp, die *ygl104c*-Mutante und die Doppelmutante (*ybr241c ygl104c*) wuchsen wesentlich schneller als der Wildtyp (Abb. 3.25). Enthielt das Medium Raffinose

als Kohlenstoffquelle war bei 30°C ebenfalls kein Unterschied feststellbar (nicht gezeigt). Jedoch wuchsen die *ygl104c*-Mutante und die Doppelmutante bei 37°C deutlich schneller als der Wildtyp, die *ybr241c*-Mutante wuchs kaum schneller (Abb. 3.25). Mit den Kohlenstoffquellen Saccharose und 0,1% Glucose war sowohl bei 30 als auch bei 37°C kein Unterschied zum Wildtyp zu beobachten (nicht gezeigt). Somit haben die Deletionsmutanten der Gene *YBR241C* und *YGL104C* einen Vorteil beim Wachstum mit geringen Glucosemengen, die bei der extrazellulären Spaltung von Trehalose und Raffinose entstehen.

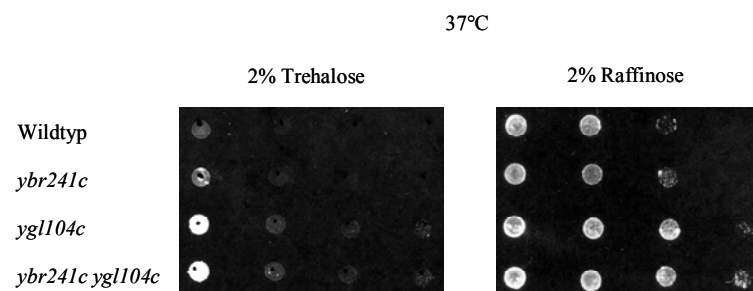


Abb. 3.25: Analyse des Wachstumsverhaltens des Wildtyps und der Deletionsmutanten mit den Kohlenstoffquellen Trehalose (2%) und Raffinose (2%) bei 37°C. Die Stämme CEN.PK2-1C, CFY01 (*ybr241c*), CFY02 (*ygl104c*) und CFY03 (*ybr241c ygl104c*) wurden in flüssigem Glucosemedium herangezogen, einmal mit Wasser gewaschen und Verdünnungsreihen (1:5) der Zellsuspensionen (OD₆₀₀ von 1) auf synthetische Komplettmedien mit Trehalose und Raffinose getropft.

3.1.7.13 Messung der Aufnahme radioaktiv markierter Substrate von isolierten vakuolären Vesikeln

Die Ergebnisse der Wachstumsexperimente deuteten an, daß Trehalose, Glycerin oder Phosphat das Substrat von Ybr241 und Ygl104 sein könnte. Trehalose aufgrund einer verminderten Toleranz gegenüber massivem Hitzeschock und den schwachen synthetisch kranken Beziehungen der Gene *YBR241C* und *YGL104C* zu *ATH1* und *NTH1*, Glycerin und Phosphat wegen der synthetisch kranken Interaktion mit *TPS1*. Deswegen sollte in Aufnahmeexperimenten mit radioaktiv markierten Substraten die Funktion von Ybr241 und Ygl104 aufgeklärt werden. Es wurden vakuoläre Vesikel nach der Methode von Roberts *et al.* (1991) präpariert und mit den isolierten Vesikeln Aufnahmemessungen nach Ohsumi und Anraku (1981) durchgeführt. Als Kontrolle wurde die schon publizierte ATP-abhängige ¹⁴C-Lysinaufnahme der präparierten Vesikel bestimmt (Shimazu *et al.*, 2005). Unterschiede zwischen Wildtyp und Doppeldelentionsmutante (*ybr241c ygl104c*) in der Aufnahmeaktivität der entsprechenden Substanzen sollte das spezifische Substrat identifizieren. Bei Verwendung der Stämme CEN.PK2-1C und CFY03 für die Präparation

war nur eine sehr schwache Lysinaufnahme der Vesikel meßbar (nicht gezeigt). Wenn jedoch vakuoläre Vesikel der Stämme BY4742 und CFY16 präpariert wurden, war eine deutliche Lysinaufnahme in Abhängigkeit von ATP feststellbar. Wurde dem Ansatz kein ATP zugesetzt, konnte kein Protonengradient durch die vakuoläre ATPase aufgebaut werden, demzufolge war nur eine sehr geringe Aufnahme von Lysin zu beobachten (Abb. 3.26). Im nächsten Schritt sollte die Aufnahme der putativen Substrate Trehalose/¹⁴C-Trehalose und Glycerin/¹⁴C-Glycerin untersucht werden. Da Trehalose intrazellulär relativ hohe Konzentrationen erreichen kann, wurde die eingesetzte Menge an Substrat gegenüber der für die Lysinaufnahme von 0,1 mM auf 10 mM erhöht. Zum Teil konnte sowohl beim Wildtyp als auch beim Deletionsstamm Aufnahme von Trehalose gemessen werden. Die erhaltenen Meßwerte schwankten allerdings sehr stark und eine eindeutige Abhängigkeit der Aufnahmeaktivität von ATP konnte nicht festgestellt werden. Auch Glycerin kann intrazellulär in hohen Konzentrationen akkumulieren, daher wurde in diesem Fall eine Konzentration von 1 mM verwendet. Es war eine schwache Glycerinaufnahme beider Vesikeltypen meßbar, doch die Schwankungen in den Meßwerten waren extrem. Es konnte ebenfalls keine Abhängigkeit der Transportaktivität von ATP beobachtet werden, was bedeutet, daß die Aufnahme entweder unspezifisch erfolgte oder die entsprechenden Transporter nicht von einem Protonengradienten abhängig sind. Somit können weder über die mögliche Aufnahme von Trehalose noch über die von Glycerin eindeutige Aussagen getroffen werden. Alle erhaltenen Meßwerte zusammengenommen, bestehen Hinweise, daß beide Substanzen in die Vakuole aufgenommen werden. Allerdings waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und Doppeldeletionsstamm (*ybr241c ygl104c*) erkennbar.

Unter den Bedingungen der Messung der Aufnahme von Aminosäuren kann keine Aufnahme von Phosphat bestimmt werden. Phosphat wird nach dem Prinzip des Gegenstroms über die vakuoläre Membran transportiert (Booth und Guidotti, 1997). Daher wurden die vakuolären Vesikel drei Stunden in einer Phosphatlösung (150 mM) inkubiert, dann mit Phosphatlösung, die auch ³³P-Phosphat enthielt, versetzt. Es konnte eine schwache Akkumulation von ³³P-Phosphat in den vakuolären Vesikeln gemessen werden. Jedoch war auch in diesem Fall eine starke Schwankung der Meßwerte zu beobachten. Außerdem waren keine deutlichen Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante festzustellen.

Mit Hilfe der Aufnahmeexperimente konnte nicht aufgeklärt werden, welches der drei putativen Substrate von Ybr241 und Ygl104 transportiert wird, da keine eindeutigen

Unterschiede in den Transportaktivitäten der Proteine für die einzelnen Substanzen festgestellt wurden. Das könnte verschiedene Ursachen haben: 1) Das Substrat war nicht unter den getesteten Substanzen. 2) Die Transporter Ybr241 und Ygl104 wurden unter den Bedingungen der Präparation nicht produziert und konnten aus diesem Grund nicht transportieren. 3) Die Aufnahmebedingungen, die für die Aminosäureaufnahme optimiert sind, waren für die Aufnahme von Trehalose, Glycerin und Phosphat nicht die bestmöglichen. Daher schwankten die Meßwerte zu stark, um Unterschiede zu erkennen.

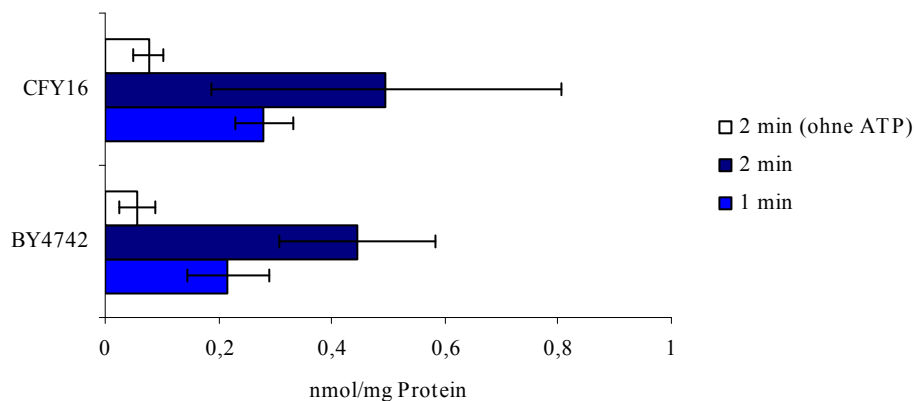


Abb. 3.26: Untersuchung der Lysin/¹⁴C-Lysinaufnahme vakuolärer Vesikel. Vakuoläre Vesikel wurden aus den Stämmen BY4742 und CFY16 präpariert, und die Aufnahme von Lysin wurde in Abhängigkeit von ATP bestimmt. Die Werte sind das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente, wobei die Fehlerbalken die Standardabweichung vom Mittelwert darstellen.

3.1.7.14 Analyse des Phosphat- und Polyphosphatgehalts ganzer Zellen

Da Hinweise auf eine Beziehung zum Phosphatstoffwechsel bestanden, sollte der Einfluß der Deletionen der Gene *YBR241C*, *YGL104C* und *TPS1* auf die Akkumulation von Phosphat- und Polyphosphat untersucht werden. Auch der Polyphosphatgehalt der Mutanten sollte analysiert werden, weil Polyphosphat als Phosphatspeicher und Puffer der Zelle fungiert (Ogawa *et al.*, 2000; Thomas und O'Shea, 2005). Außerdem befindet sich der gesamte Polyphosphatpool der Zelle in der Vakuole (Urech *et al.*, 1978). Möglicherweise haben Ybr241 und Ygl104 ebenso Einfluß auf die intrazelluläre Konzentration an Polyphosphat. Daher wurde in einer Kooperation mit Florian Freimoser von der ETH Zürich der Phosphat- und Polyphosphatgehalt ganzer Zellen analysiert. Nach Überführung von Hefezellen aus einem Medium ohne Phosphat in ein Medium mit hoher Konzentration an Phosphat wird verstärkt Polyphosphat synthetisiert, was als Polyphosphat-„overplus“-Phänomen bezeichnet wird (Harold, 1966). Um das Polyphosphat-„overplus“-Phänomen zu erzeugen, wurden Zellen in YEPD-Medium ohne

Phosphat bis in die stationäre Phase herangezogen, mit frischem YEPD ohne Phosphat auf eine Zelldichte von $OD_{600} = 1$ verdünnt und dann bis zu einer OD_{600} zwischen 5 und 6 inkubiert. Diese Zellsuspension wurde auf eine OD_{600} von 0,5 in YEPD verdünnt und nach vier Stunden wurde der Phosphat- und Polyphosphatgehalt untersucht. Als Nullprobe fungierte die Vorkultur, mit der angeimpft wurde. Das zelluläre Polyphosphat wurde aufgereinigt und mittels Exopolyphosphatase gespalten. Dann wurde das freigesetzte Phosphat spektrophotometrisch bestimmt (Werner *et al.*, 2005). Zur Bestimmung des gesamten Phosphatgehalts der Zellen wurden die Zellen in Schwefelsäure resuspendiert, gekocht und der Phosphatgehalt spektrophotometrisch ermittelt (Freimoser *et al.*, 2006).

Es wurde der Polyphosphat- und Gesamtphosphatgehalt des Wildtyps CEN.PK2-1C und der Deletionsstämme CFY01, CFY02, CFY03 sowie die *tps1*-Mutanten CFY24 und CFY25 untersucht (Abb. 3.27). Wenn *YGL104C* deletiert war, war auch der Polyphosphatgehalt stark reduziert. Besonders die *tps1*-Mutanten wiesen einen geringeren Polyphosphatgehalt auf, wobei die Dreifachmutante (*tps1 ybr241c ygl104c*) die geringste Menge an Polyphosphat akkumulierte. Durch einen stark reduzierten Gesamtphosphatgehalt zeichneten sich vor allem die *tps1*-Mutanten aus, wobei die Dreifachmutante nochmal deutlich weniger Phosphat enthielt als die Einfachmutante. Folglich schien der Wachstumsphänotyp der *tps1*-Mutanten tatsächlich auf einen geringeren Phosphatgehalt der Zellen zurückzuführen zu sein. Da die Dreifachmutante (*tps1 ybr241c ygl104c*) noch weniger Phosphat enthielt, war das höchstwahrscheinlich die Erklärung für den verstärkten Wachstumsdefekt der Mutante auf Glucosemedium. Also beeinflusst besonders Ygl104 den zellulären Gehalt an Phosphat und Polyphosphat.

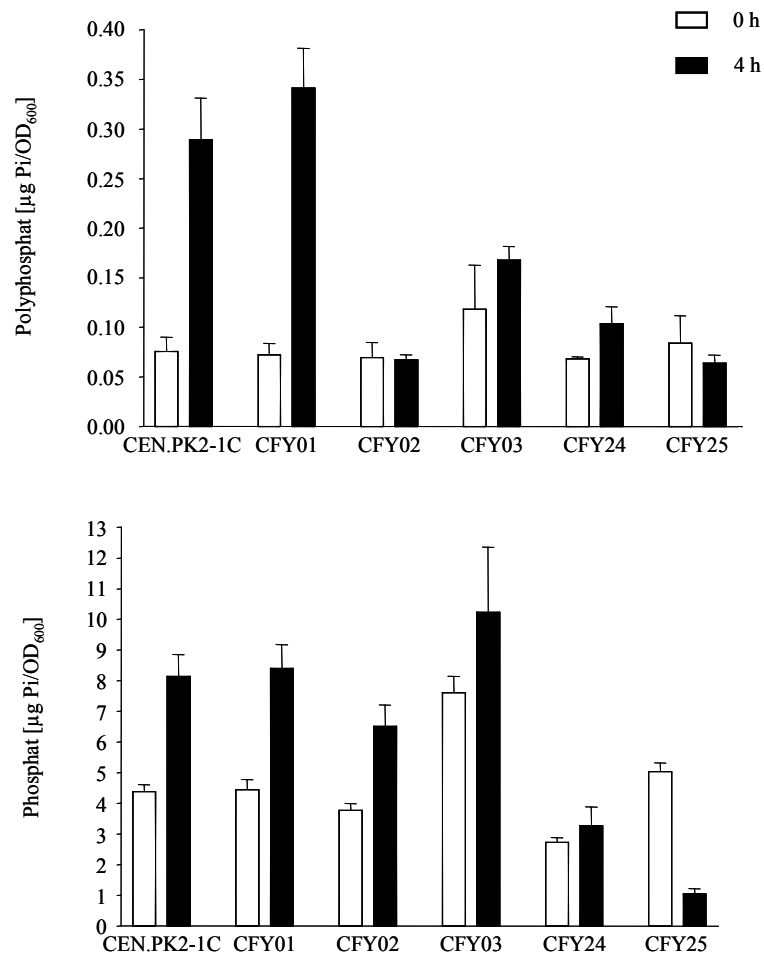


Abb. 3.27: Bestimmung des Polyphosphat- und Gesamtphosphatgehalts von Wildtyp (CEN.PK2-1C) und Deletionsmutanten (CFY01, CFY02, CFY03, CFY24, CFY25). Die Stämme wurden erst in Vollmedium ohne Phosphat herangezogen, dann wurden die Zellsuspensionen in Vollmedium mit Phosphat verdünnt und vier Stunden kultiviert. Auf diese Weise wurde das sogenannte Polyphosphat-, „overplus“-Phänomen erzeugt. Im Anschluß wurde der Polyphosphat- und Gesamtphosphatgehalt spektrophotometrisch bestimmt. Der Nullwert entspricht dem Phosphat- und Polyphosphatgehalt der Stämme vor Inkubation in Medium mit Phosphat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus je drei Messungen und die Standardabweichungen.

3.2 Entwicklung eines genomweiten Screens zur Identifizierung bisher uncharakterisierter ER-Verpackungschaperone

Nach Integration in die ER-Membran erreichen Plasmamembran-Transporter oder andere Membranproteine ihren Bestimmungsort über den sekretorischen Weg. Einige dieser Membranproteine scheinen bislang unbekannte, spezifische Hilfsproteine zu benötigen, um das ER zu verlassen. Solche Hilfsproteine sind essentiell für das Verpacken der entsprechenden Proteine in COPII-Vesikel und werden demgemäß auch als Verpackungschaperone bezeichnet. Mittels COPII-Vesikel werden die Membranproteine dann vom ER zum Golgi-Apparat befördert. Alle bereits in der Literatur beschriebenen Verpackungschaperone sind integrale Membranproteine des ER. Bekannt sind beispielsweise Shr3 für die Aminosäurepermeasen (Ljungdahl *et al.*, 1992), Pho86 für den Phosphattransporter Pho84 (Lau *et al.*, 2000), Chs7 für die katalytische Untereinheit der Chitinsynthase Chs3 (Trilla *et al.*, 1999) und Gsf2 für die Hexosetransporter Hxt1, Hxt3 und Gal2 (Sherwood und Carlson, 1999). Falls diese Verpackungschaperone nicht mehr funktionell sind, akkumulieren deren Substrate im ER.

Bei noch sehr vielen im Hefegenom codierten Plasmamembran-Proteinen ist unklar, ob sie Verpackungschaperone benötigen oder nicht. Daher sollte ein genomweiter Screen entwickelt werden, durch den das für das Plasmamembran-Protein der Fragestellung spezifische Verpackungschaperon identifiziert werden kann. Solche Membranproteine wären zum Beispiel die Hexosetransporter Hxt2 und Hxt7.

3.2.1 Screen basierend auf dem Transkriptionsregulator Htr1 (Mth1)

Eine Variante des Screens sollte auf dem dominanten, mutanten Allel *HTR1-23* des Transkriptionsregulators *HTR1* (*MTH1*) basieren (Schulte *et al.*, 2000). Das Protein Htr1 ist ein negativer Regulator des Glucose-Signalwegs. Bei Abwesenheit von Glucose interagieren die Regulatorproteine Htr1 und Std1 mit dem Transkriptionsfaktor Rgt1 im Nucleus und verhindern die Hyperphosphorylierung von Rgt1 (Flick *et al.*, 2003). Unphosphoryliert ist Rgt1 in der Lage den Tup1-Cyc8-Repressor-Komplex zu rekrutieren, womit die Expression der Gene der Hexosetransporter reprimiert ist (Mosley *et al.*, 2003). Bei Anwesenheit extrazellulärer Glucose wird konzentrationsabhängig über die Sensoren Snf3 oder Rgt2 die Casein-Kinase I (Yck1) aktiviert. Yck1 phosphoryliert darauf Htr1 und Std1, die demzufolge abgebaut werden (Moriya und Johnston, 2004). Somit können Mth1 und Std1 die Hyperphosphorylierung von Rgt1 nicht mehr verhindern. Rgt1 verläßt den Promotor der Hexosetransporter und es kommt zu einer Derepression der Gene. Das

dominante Allel *HTR1-23* führt zu einer dauerhaften Repression der Gene der Hexosetransporter und infolgedessen zu einer stark reduzierten Glucoseaufnahme. Deswegen wachsen die betroffenen Zellen sehr langsam auf Medium mit Glucose als Kohlenstoffquelle.

Es sollte ein System entwickelt werden, mit dem nach Verpackungschaperonen für Hexosetransporter, beispielsweise für den hochaffinen Transporter Hxt7, gesucht werden kann. Die Stammsammlung (EUROSCARF) sollte mit einem Plasmid, das das dominante, mutante Allel *HTR1-23* und das Gen des Hexosetransporter Hxt7 unter Kontrolle des *MET25*-Promotors aufweist, transformiert werden. Das mutierte *HTR1-23*-Allel sollte das Wachstum der Stämme auf Glucosemedium verhindern, jedoch würde durch das Plasmid ebenfalls das Gen des Hexosetransporters Hxt7 in die Zellen gebracht. Da Hxt7 unter Kontrolle eines von Htr1 unabhängigen Promotors steht, sollte Hxt7 wiederum Wachstum mit Glucose vermitteln. In Deletionsstämmen jedoch, bei denen die Translokation von Hxt7 beeinflusst wäre, könnte Hxt7 nicht zur Plasmamembran transportiert werden. Somit würde Hxt7 auch keinen Glucosetransport über die Plasmamembran ermöglichen, folglich würden diese Zellen nicht auf Glucosemedium wachsen. Die in diesen Stämmen deletierten Gene könnten für spezifische Verpackungschaperone des Hexosetransporters Hxt7 codieren.

Um die Auswirkung des *HTR1-23*-Allels im Stamm BY4742 zu testen, wurde dieser mit dem Plasmid pHTR1-23 (Schulte *et al.*, 2000) bzw. als Kontrolle mit dem leeren Vektor pYES2 transformiert. Nach der Transformation wurde auf Galactose-Komplettmedium ohne Uracil selektiert. Im nächsten Schritt wurden die Transformanten auf Komplettmedien ohne Uracil mit den Kohlenstoffquellen Glucose (0,1%, 2%), Raffinose (2%) und Saccharose (2%) ausgestrichen. Alle Transformanten wuchsen auf Glucose (0,1%, 2%) und auf Saccharose, aber nicht auf Raffinose. Da keine Unterschiede im Wachstum zwischen den Zellen, die leere Vektoren aufwiesen, und mit pHTR1-23 transformierten Zellen identifiziert werden konnten, sollte durch Zusatz des Antibiotikums Antimycin A (2 ppm) ins Medium die Zellatmung gehemmt werden. Auf diese Weise sollten Unterschiede feststellbar werden, was jedoch nicht möglich war. Somit war eine dauerhafte Repression der Gene der Hexosetransporter mittels des dominanten *HTR1-23*-Allels des Transkriptionsregulators *HTR1* im BY-Stammhintergrund nicht möglich.

3.2.2 Screen basierend auf hyperaktivem Ras2(V19)

Eine weitere Version des Screens nach Verpackungschaperonen sollte mit Hilfe eines hyperaktiven Ras2-Proteins arbeiten. Zum Einsatz kam das Ras2(V19)-Protein, dessen

Glycin an Position 19 gegen ein Valin ausgetauscht ist (Toda *et al.*, 1985). Ras2 ist ein kleines GTP-bindendes Protein, das an der Plasmamembran lokalisiert ist. In der GTP-gebundenen Form ist es aktiv und stimuliert direkt die Bildung des sekundären Messengers cAMP durch die Adenylatcyklase. Dominante Mutanten von Ras2 hydrolysieren GTP nur noch sehr langsam, d.h. sie sind dauerhaft aktiv. Hefezellen, die *RAS2(V19)* exprimieren, sind sensitiv gegenüber Hitzeschock und wachsen wesentlich langsamer auf Medien mit schlechten Kohlenstoffquellen. Entscheidend für das Auftreten dieser Phänotypen ist die Lokalisation von Ras2(V19) an der Plasmamembran (Dong *et al.*, 2003).

Um die Funktionalität des Screenansatzes zu testen, sollte Ras2V19 mit dem Hexosetransporter Hxt1 fusioniert werden. In Wildtypzellen würde das Hxt1-Ras2(V19)-Fusionsprotein zur Plasmamembran transportiert werden. Somit könnte Ras2(V19) seine Funktion in der Signaltransduktion übernehmen, und die Zellen wären hitzesensitiv. In *gsf2*-Mutanten verbliebe Hxt1-Ras2(V19) im ER, also wäre auch Ras2(V19) nicht an der Plasmamembran lokalisiert und hätte damit keinen Einfluß.

Es sollte ein Plasmid kloniert werden, das für die *HXT1-RAS2(V19)*-Fusion unter Kontrolle des *MET25*-Promotors codiert. Hxt1 und Ras2(V19) sollten über einen Glycin-Alanin-Glycin-Linker verbunden werden. Daher wurde das Plasmid pMET25HXT1RAS2V19 über homologe Rekombination im Stamm EBY.VW4000 konstruiert. Das Wachstum der Rekombinanten wurde direkt auf Glucosemedium untersucht. Aus Rekombinanten, die mit Glucose wachsen konnten, wurden die Plasmide präpariert und mittels Restriktionsanalyse überprüft. Dann wurde das resultierende Plasmid pMET25HXT1RAS2V19 in die Stämme CEN.PK2-1C und THY15 (*gsf2*) transformiert. Als Kontrolle wurden die Stämme noch mit einem Leerplasmid und mit dem Plasmid YCp50RAS2V19, das nur für *RAS2(V19)* codiert, transformiert. Die Transformanten wurden anschließend drei Tage in synthetischem Kompletmedium bei 30°C bis in die stationäre Phase herangezogen, dann wurde ein Hitzeschock bei 55°C für 10 min durchgeführt. Verdünnungsreihen der Zellsuspensionen wurden auf Glucose-Vollmedium getropft, gefolgt von einer dreitägigen Inkubation bei 30°C. Allerdings konnte kein Einfluß des Fusionsproteins Hxt1-Ras2(V19) ausgemacht werden, noch nicht einmal ein Einfluß von Ras2(V19) ohne die Hxt1-Fusion. Da auch das Wachstum auf Medien mit schlechten Kohlenstoffquellen durch Ras2(V19) beeinflusst sein sollte (Howard *et al.*, 2002), wurde das Wachstumsverhalten der Transformanten auf Minimalmedien mit folgenden Kohlenstoffquellen untersucht: Galactose (4%), und Glycerin/Ethanol (jeweils 2%). Es konnten jedoch keine Unterschiede identifiziert werden.

Der Stamm CEN.PK2-1C hat eine Mutation im Gen der Adenylatcyklase, die teilweise den Effekt von *RAS2(V19)* aufheben kann (Vanhalewyn *et al.*, 1999). Aus diesem Grund sollte der Einfluß von Ras2(V19) im BY-Stammhintergrund analysiert werden. Der Stamm BY4742 wurde mit dem Plasmid YCp50RAS2V19 und als Kontrolle mit dem leeren Vektor pYES2 transformiert. Die Transformanten wurden auf Galactose und Glycerin/Ethanol-Minimalmedium ausgestrichen und 2 Tage bei 30°C inkubiert. Es bestand ein minimaler Wachstumsunterschied zwischen Zellen, die *RAS2(V19)* exprimierten, und Zellen, die den leeren Vektor trugen. Allerdings reichte diese geringfügige Differenz für einen genomweiten Screen keinesfalls aus.

3.2.3 Screen mittels einer konstitutiv aktiven Mutante des Glycerintransporters Fps1

Das Protein Fps1 vermittelt den Export von Glycerin über die Plasmamembran (Luyten *et al.*, 1995). Fps1 besitzt eine N-terminale cytoplasmatische Verlängerung, die für die Regulation des Glycerintransports benötigt wird. Daher resultiert die Deletion des N-Terminus bis Aminosäure 230 in einer mutierten Form des Proteins, die konstitutiv aktiv ist. Ein solches Fps1 transportiert ständig Glycerin aus der Zelle. Aufgrund des Glycerinverlusts durch den hyperaktiven Transporter werden die Zellen sensitiv gegenüber hoher Osmolarität, da sie länger brauchen, um hohe intrazelluläre Glycerinlevel aufzubauen. Ein Wachstumsdefekt der entsprechenden Mutanten auf Hochsalzmedium (0,8 M NaCl) ist zu beobachten (Tamas *et al.*, 1999). In einer aktuelleren Studie konnte die regulatorische Domäne (Aminosäure 219 bis 239) in der N-terminalen Verlängerung des Proteins identifiziert werden, die für die Begrenzung des Glycerintransports durch Fps1 verantwortlich ist (Tamas *et al.*, 2003). Ein Fps1-Protein mit verkürztem N-Terminus sollte für einen weiteren Ansatz des Screens nach Verpackungschaperonen verwendet werden.

Ziel war es, das verkürzte Fps1 (Δ N-Fps1) N-terminal mit dem Hexosetransporter Hxt1 zu fusionieren. Das resultierende Fusionsprotein sollte dann in Wildtyp- und *gsf2*-Zellen produziert werden. Im Wildtyp müßte das Fusionsprotein zur Plasmamembran transportiert werden, und das konstitutiv aktive Δ N-Fps1 würde ständig Glycerin exportieren (Abb. 3.28A). Diese Zellen wären sensitiv gegenüber hohen Salzkonzentrationen, würden also sehr langsam auf Hochsalzmedien wachsen. In der *gsf2*-Mutante sollte das Fusionsprotein im ER akkumulieren, somit würde auch Δ N-Fps1 im ER verbleiben und könnte keinen permanenten Glycerinexport vermitteln (Abb. 3.28B), ein Wachstumsdefekt der Zellen unter Hochsalzbedingungen wäre nicht feststellbar. Falls dieses System funktionierte, wäre

es für den Screen anwendbar. Verschiedene Membranproteine (X) einer Fragestellung sollten mit ΔN -Fps1 fusioniert werden. Deswegen sollten Plasmide konstruiert werden, die die codierenden Regionen der Fusionsproteine X- ΔN -Fps1 aufweisen. Dieses Plasmidgemisch würde in jede einzelne Deletionsmutante der Stammsammlung transformiert. Die Selektion auf Hochsalzmedium würde die für die Membranproteine der Fragestellung spezifischen Verpackungschaperone oder andere für die Translokation essentielle Komponenten identifizieren, weil unter Hochsalzbedingungen nur Mutanten wachsen könnten, bei denen X- ΔN -Fps1 nicht zur Plasmamembran gelangt.

Zum Testen des Systems mit Hxt1 und Gsf2 sollte das Plasmid pMET25HXT1dFPS1 kloniert werden. Die codierende Sequenz von *FPS1* sollte am 5'-Ende um 693 Basenpaare verkürzt und mit dem 3'-Ende von *HXT1* fusioniert werden. Ferner sollte das Konstrukt unter der Kontrolle des regulierbaren *MET25*-Promotors exprimiert werden. Das Plasmid wurde über homologe Rekombination im Stamm EBY.VW4000 konstruiert, so konnten die Rekombinanten direkt auf Funktionalität von Hxt1 untersucht werden. Der Großteil der Kolonien wuchs auf Glucose-Komplettmedium, demnach war der Hxt1-Anteil des Fusionsproteins funktionell. Das zeigte außerdem, daß sich das Fusionsprotein in der Plasmamembran befand. Aus diesen Zellen wurden die Plasmide präpariert und in die Stämme EBY.VW4000 und THY14 (*gsf2*) transformiert. Damit konnte über Wachstum auf Glucosemedium analysiert werden, ob das Fusionsprotein in der *gsf2*-Mutante im ER akkumulierte. Das war auch tatsächlich der Fall. Der Wildtyp wuchs auf Glucose, die *gsf2*-Mutante nicht. Das bedeutete, daß der Fps1-Anteil nicht ausreicht, um das Fusionsprotein zur Plasmamembran zu befördern. Im Anschluß daran wurden die Zellen auf Hochsalzmedien mit verschiedenen NaCl- (0,6 und 0,8 M) und Methioninkonzentrationen (0,8, 1, 1,2 mM) ausgestrichen. Als Kohlenstoffquelle wurde Maltose eingesetzt. Es konnte beobachtet werden, daß die Transformanten des Stammes EBY.VW4000 wesentlich langsamer wuchsen als die des Stammes THY14 (Abb. 3.28C). Folglich akkumulierte in den *gsf2*-Mutanten Hxt1- ΔN -Fps1 im ER und konnte keinen Glycerinexport vermitteln, wodurch die Zellen unempfindlich gegenüber hoher Osmolarität waren.

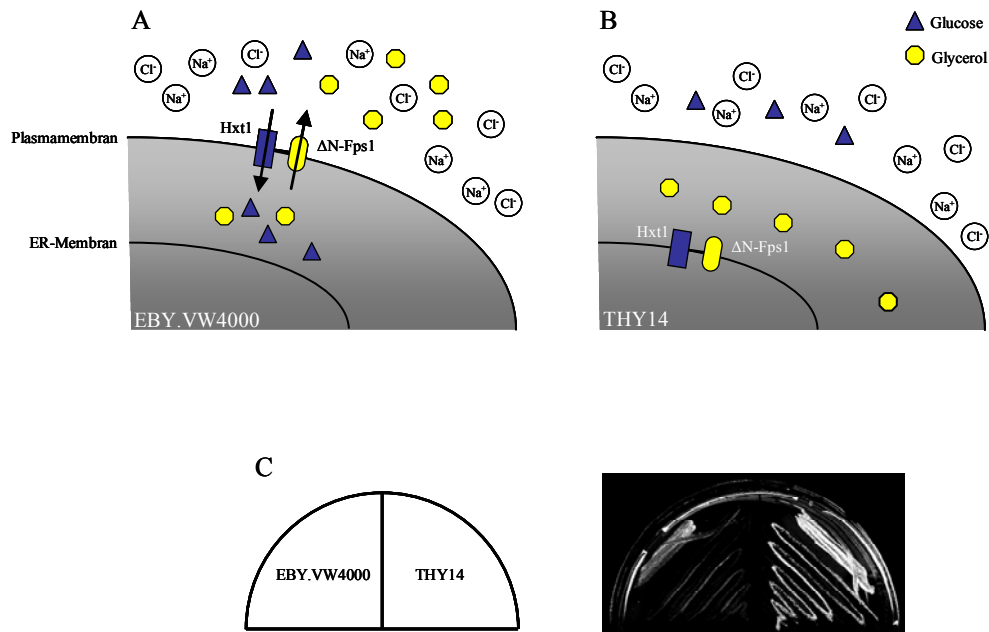


Abb. 3.28: Ansatz des Screens nach Verpackungschaperonen mittels einer konstitutiv aktiven Mutante des Glycerintransporters Fps1. Im Stamm EB.Y.VW4000 wird das Hxt1- Δ N-Fps1-Fusionsprotein zur Plasmamembran transportiert und kann dort Glucose importieren und Glycerin exportieren (A). Im Stamm THY14 (*gsf2*) verbleibt es im ER und kann keinen Transport über die Plasmamembran vermitteln (B). Es wurde ein Wachstumstest auf Hochsalzmedium durchgeführt (C). Die Stämme EB.Y.VW4000 und THY14 wurden mit dem Plasmid pMet25HXT1dFPS1 transformiert und auf synthetischem Komplettmedium mit 1% Maltose ohne Uracil ausgestrichen, das Medium enthielt zusätzlich 1,2 mM Methionin und 0,6 M NaCl. Die Zellen wurden 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Das Testsystem schien demnach zu funktionieren, zumindest im EB.Y.VW4000-Stammhintergrund. Um dieses System jedoch nachher im Screen verwenden zu können, muß es im BY-Stamm arbeiten, da die Stammsammlung im BY-Stammhintergrund konstruiert wurde. Daher sollte das Plasmid pMET25HXT1dFPS1 in die Stämme BY4741 und BY4741 *gsf2* transformiert werden. Vorher wurde das Gen *GSF2* im Stamm BY4741 mittels *loxP-kanMX-loxP*-System deletiert. Die Analyse des Wachstumsverhaltens der Transformanten auf Hochsalzmedium ergab allerdings keine deutlichen Unterschiede zwischen Wildtyp und *gsf2*-Mutante. Die Ursache war wahrscheinlich der andere Stammhintergrund. Des weiteren sollte das gleiche Testsystem mit dem Histidintransporter Hip1 und dessen spezifischem Verpackungschaperon Shr3 erprobt werden. Dazu wurde das Plasmid pMET25HIP1dFPS1 über homologe Rekombination konstruiert. Außerdem mußte *SHR3* im Stamm FY1679 mittels *loxP-kanMX-loxP*-System deletiert werden, da die Deletion im BY-Stamm letal ist. Der BY-Stamm kann die Aminosäuren Histidin, Leucin und Methionin nicht selbst synthetisieren. Die Deletion von *SHR3* führt dazu, daß die

Aminosäurepermeasen nicht zur Plasmamembran befördert werden, daher findet kein Transport der Aminosäuren ins Cytosol statt, demzufolge kann die Deletionsmutante nicht wachsen. Der zum BY-Stamm isogene Stamm FY1679 ist nur Uracil-auxotroph, weshalb die Deletion von *SHR3* möglich ist. Nach Transformation mit dem Plasmid pMET25HIP1dFPS1 konnten auch in diesem Fall keine eindeutigen Unterschiede zwischen Wildtypzellen und *shr3*-Mutanten, die Hip1 Δ N-Fps1 produzierten, identifiziert werden. Das System funktionierte offensichtlich im BY-Stammhintergrund nicht, weder mit der Kombination Hxt1/Gsf2 noch mit Hip1/Shr3. Daher war dieses System für einen Screen ungeeignet.

3.2.4 Screen basierend auf dem Split-Ubiquitin-System

Das Split-Ubiquitin-System (Johnsson und Varshavsky, 1994) wird in der Regel angewandt, um Interaktionen zwischen Membranproteinen nachzuweisen. Zum Einsatz kommen der N-terminale und der C-terminale Teil des Ubiquitinmoleküls. Der N-terminale Teil (N_{ub}) wird mit dem N- oder dem C-Terminus des einen Proteins von Interesse und der C-terminale Teil (C_{ub}) mit dem N-Terminus des anderen Proteins von Interesse fusioniert. C_{ub} ist außerdem mit dem Transkriptionsfaktor PLV verknüpft, der aus Protein A, der DNA-Bindedomäne LexA und dem Transkriptionsaktivator VP16 besteht (Stagljar *et al.*, 1998). Dieses Fusionsprotein wird als $C_{ub}PLV$ oder CPLV bezeichnet. Interagieren die Proteine von Interesse, kommt es zur Assoziation von N_{ub} und C_{ub} . Das dadurch wieder vereinigte Ubiquitinmolekül wird durch Ubiquitin-spezifische Proteasen erkannt, und es erfolgt die Abspaltung des Transkriptionsfaktors PLV. Der gelangt in den Zellkern und induziert die Transkription eines Reportergens, beispielsweise *URA3*. Durch Analyse des Wachstumsverhaltens der Zellen, die die entsprechenden Fusionen produzieren, auf Selektivmedium kann eine eventuelle Interaktion der Proteine von Interesse nachgewiesen werden. Findet eine Interaktion statt, wird das Reportergen induziert, und die Zellen können auf Selektivmedium wachsen. Interagieren die Proteine nicht, kommt es nicht zur Induktion des Reportergens und damit auch nicht zum Wachstum auf Selektivmedium.

Bei einer anderen Variante des Split-Ubiquitin-Systems (Wittke *et al.*, 1999) wird das Protein Ura3 mit C_{ub} fusioniert ($C_{ub}RUra3$). Kommen N_{ub} und C_{ub} in räumliche Nähe, wird das Ura3-Protein durch Ubiquitin-spezifische Proteasen abgespalten. Es wird das sogenannte RUra3-Protein verwendet, dessen N-terminaler Aminosäurerest ein Arginin ist. Da Arginin ein nach der „N-end rule“ (Varshavsky, 1992) instabiler Rest ist, wird RUra3

rasch degradiert. So werden die Zellen, die die Konstrukte tragen, bei Interaktion der Proteine Uracil-auxotroph.

Jedoch interagieren schon N_{ub} und C_{ub} miteinander. Da aber nicht die Interaktion zwischen N_{ub} und C_{ub} detektiert werden soll, sondern die zwischen den Proteinen der Fragestellung, wurden verschiedene Affinitätsvarianten von N_{ub} konstruiert. Eine ist beispielsweise die Variante $N_{ub}G$, die nicht mehr mit C_{ub} interagiert. Daher wird $N_{ub}G$ verwendet, um starke Interaktionen zwischen Proteinen nachzuweisen.

Der genomweite Screen nach Verpackungschaperonen sollte auf dem Split-Ubiquitin-System basieren. Mit Hilfe abgewandelter Versionen des Systems sollte es ermöglicht werden, Proteine, die bis zur Plasmamembran sekretiert wurden, zu detektieren. Gelangt das Membranprotein von Interesse zur Plasmamembran, sollte eine Interaktion mittels Split-Ubiquitin-System nachweisbar werden, wird es im ER zurückgehalten und gelangt nicht zur Plasmamembran, sollte keine Interaktion feststellbar sein. Der Screen sollte anhand des schon identifizierten Verpackungschaperons Gsf2 und dessen Substrat Hxt1 auf seine Funktionalität getestet werden. Falls der Screen funktionieren würde, sollte die Sammlung der Deletionsmutanten (EUROSCARF), unter Anwendung des entwickelten Verfahrens, nach bisher unbekanntem Verpackungschaperonen für Plasmamembran-Proteine von Interesse durchsucht werden.

3.2.4.1 System mit myristoyliertem $C_{ub}R_{Ura3}$ -Fusionsprotein

In dieser Version des Screens sollte das $C_{ub}R_{Ura3}$ Fusionsprotein durch eine Myristoylierung an die Plasmamembran fixiert werden. Dazu wurde $C_{ub}R_{Ura3}$ N-terminal mit der Myristoylierungssequenz des Calcineurin B (Cyert und Thorner, 1992) versehen. Durch eine Myristoylierungssequenz wird die Fettsäure Myristat auf das N-terminale Glycin des betreffenden Proteins transferiert, und der Myristoylrest sorgt dann für die Bindung des Proteins an die Plasmamembran (Resh, 1999). Auch im Fall von $MyrC_{ub}R_{Ura3}$ sollte die Modifikation des Proteins die Lokalisation an der Plasmamembran auslösen. Da die Lokalisation über die Myristoylierung erfolgen würde, wäre sie unabhängig vom sekretorischen Weg. Zudem wurde der Hexosetransporter Hxt1 N-terminal mit $N_{ub}wt$ fusioniert. $N_{ub}wt$ interagiert mit C_{ub} . In Wildtypzellen müßte $N_{ub}wt$ -Hxt1 zur Plasmamembran transportiert werden, dessen $N_{ub}wt$ -Anteil und der C_{ub} -Anteil in $MyrC_{ub}R_{Ura3}$ sollten assoziieren, als Folge würde R_{Ura3} abgespalten und degradiert. Wildtypzellen, die die entsprechenden Konstrukte tragen, müßten Uracil-auxotroph werden (Abb. 3.29A). In *gsf2*-Mutanten würde $N_{ub}wt$ -Hxt1 im ER verbleiben, somit könnte keine Vereinigung von N_{ub} und C_{ub} stattfinden, R_{Ura3} würde nicht degradiert und

die Zellen blieben Uracil-prototroph (Abb. 3.29B). Durch Analyse des Wachstums der entsprechenden Zellen auf Medien, die entweder kein Uracil oder die FOA (5-Fluoroorotic-Säure) enthalten, könnte dann auf die subzelluläre Lokalisation von Hxt1 geschlossen werden. FOA wird durch das Produkt des *URA3*-Gens in das toxische 5-Fluorouracil umgewandelt. Somit können Zellen, die Ura3 aufweisen, nicht auf Medium mit FOA wachsen. Falls kein Wachstum der Zellen auf Medien ohne Uracil festzustellen ist, aber Wachstum der Zellen auf Medien, die FOA enthalten, wäre Hxt1 in der Plasmamembran lokalisiert. Wäre Wachstum auf Medien ohne Uracil, aber kein Wachstum auf Medien mit FOA zu beobachten, verbliebe Hxt1 im ER.

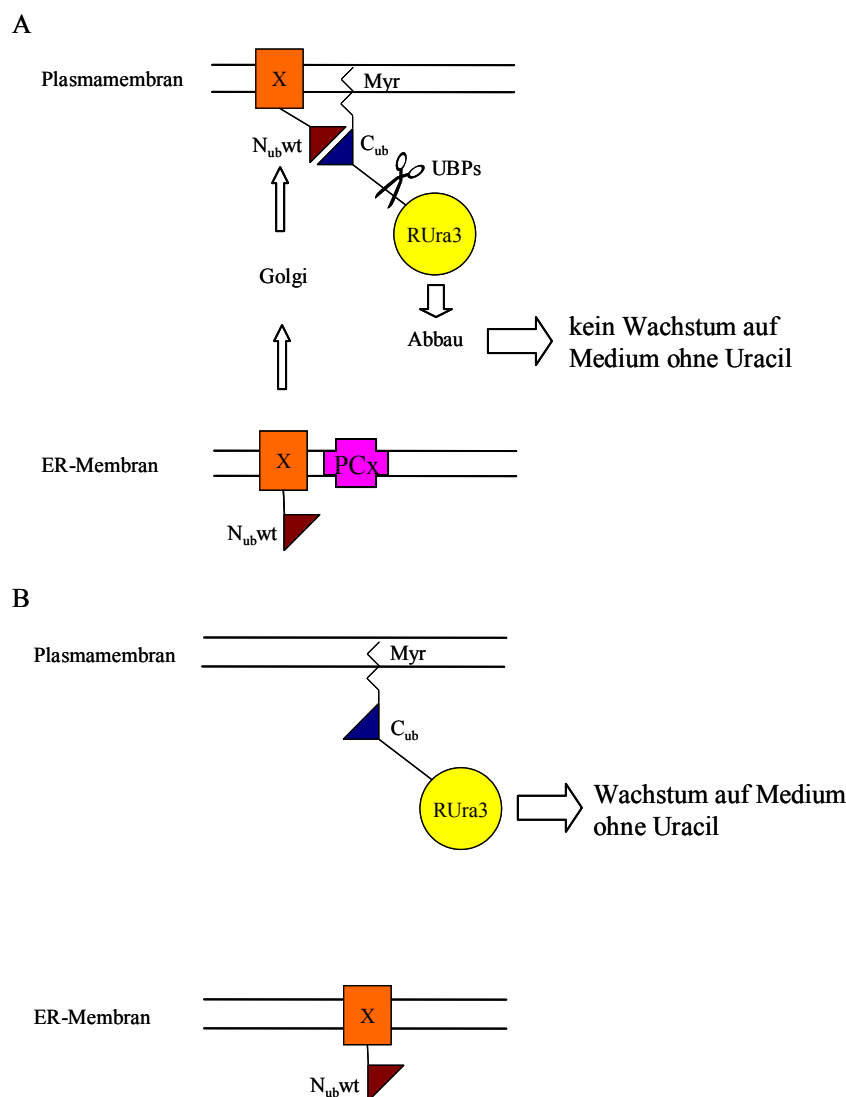


Abb. 3.29: Screen nach ER-Verpackungschaperonen mittels myristoyliertem CubRURA3-Fusionsprotein. Ist das Verpackungschaperon (PCx) vorhanden, wird das Fusionsprotein Nubwt-X zur Plasmamembran transportiert, Nubwt und Cub assoziieren, RURA3 wird abgespalten und degradiert (A). Wenn PCx nicht vorhanden ist, verbleibt Nubwt-X im ER und RURA3 wird nicht abgebaut (B).

Zur Anwendung kamen die Plasmide pNubwt-HXT1 und pMyrCubRURA3 (Hippe, 2003). Allerdings funktionierte das Testsystem mit diesen Plasmiden nicht. Sowohl Wachstum des Wildtyps als auch der *gsf2*-Mutante war auf Medien ohne Uracil festzustellen. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß die Anzahl der gebildeten MyrC_{ub}RUra3-Moleküle im Verhältnis zu den vorhandenen N_{ub}wt-Molekülen zu hoch war. Somit konnte nicht mit jedem C_{ub}RUra3-Molekül eine Interaktion stattfinden und damit verbunden auch kein Abbau von RUra3. Da wahrscheinlich wenige Moleküle des Proteins Ura3 ausreichten, um den Zellen Uracil-Prototrophie zu verleihen, war in jedem Fall Wachstum auf Medien ohne Uracil zu beobachten. Aus diesem Grund sollte die Menge an MyrC_{ub}RUra3 begrenzt werden. Daher wurde die codierende Sequenz des MyrCubRUra3 in CEN-Plasmide, die nur in wenigen Kopien in den Zellen vorliegen, mit regulierbaren Promotoren kloniert. Zum Einsatz kamen der über die Methioninkonzentration regulierbare *MET25*- und der durch Galactose induzierbare bzw. durch Glucose reprimierbare *GAL1*-Promotor. Möglicherweise lag das Problem aber auch in der bisher verwendeten Myristoylierungssequenz des Calmodulins (*CNBI*), eventuell bewirkte diese keine stringente Lokalisation von C_{ub}RUra3 an der Plasmamembran. C_{ub}RUra3-Moleküle könnten dadurch an andere, intrazelluläre Membranen fixiert sein. Somit könnte keine Assoziation mit N_{ub}wt-Hxt1 erfolgen. Deshalb sollte die Myristoylierungssequenz des Calcineurins (*Cnb1*) durch die der Tyrosinkinase v-*Src* ersetzt werden. Als Matrize zum Amplifizieren der Sequenz in der PCR diente das Plasmid pYES-M-dpolya des SRS-Systems (Aronheim *et al.*, 1994).

Die Plasmide pMET25MyrCubRURA3, YCpMET25MyrCubRURA3 und YCpGAL1MyrCubRURA3 wurden über homologe Rekombination kloniert und im Wildtyp CEN.PK2-1C und im *gsf2*-Stamm THY15 (Hamacher, 2004) getestet. Trotz dieser Modifikationen funktionierte das System nicht, sowohl der Wildtyp als auch die Mutanten, die entsprechende Plasmide trugen, wuchsen auf Medien ohne Uracil. Auch bei starkem Herunterregulieren der Menge des gebildeten C_{ub}RURA3 über den *MET25*-Promotor, ließen sich keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *gsf2*-Mutante identifizieren. Sogar durch die Co-Transformation des Plasmids pNubwt, das für lösliches N_{ub}wt codiert, konnte das Wachstum der Transformanten auf Medium ohne Uracil nicht verhindert werden. Zumindest in diesem Fall hätte eine Assoziation von N_{ub}wt und C_{ub}, gefolgt von einer Degradation des Proteins RUra3, stattfinden müssen, da N_{ub}wt-Moleküle in großer Anzahl im Cytosol vorlagen. Somit war dieser Ansatz für einen genomweiten Screen nicht einsetzbar.

3.2.4.2 System mit myristoyliertem CubRHis3-Fusionsprotein

Der Ansatz des Screens, der auf der Umwandlung der Uracil-Prototrophie in eine Uracil-Auxotrophie basierte, funktionierte nicht, weil offenbar die Anzahl der synthetisierten RUra3-Moleküle zu hoch war. Daher sollte eine abgewandelte Version mittels Histidin-Auxotrophie arbeiten. Das Enzym Ura3 sollte durch das Enzym His3 ersetzt werden. Die Synthese der Aminosäure Histidin kann durch Zugabe des Histidin-Analogons 3-Aminotriazol ins Medium gehemmt werden, was auf einer kompetitiven Inhibition der Imidazolglycerin-Phosphat-Dehydratase (His3) beruht (Klopowski und Wiater, 1965). Somit konnte der Zusatz von 3-Aminotriazol in das Selektionsmedium als zusätzliche Regulationskomponente fungieren. Das Testsystem mit Hxt1 und Gsf2 sollte über die 3-Aminotriazol-Konzentration so abgestimmt werden, daß die *gsf2*-Mutante wachsen kann und der Wildtyp nicht mehr. Das Plasmid pMET25MyrCubRHIS3 wurde über homologe Rekombination kloniert. Danach wurde als Kontrolle das Wachstumsverhalten der Wildtypstämme CEN.PK2-1C und BY4742 bei Co-Transformation von pMET25MyrCubRHIS3 und pNubwt analysiert. Zwar konnte das Wachstum auf Medium ohne Histidin durch Zusatz von 3-Aminotriazol gehemmt werden, doch waren zwischen Transformanten, die das Plasmid pMET25MyrCubRHIS3 und die beide Plasmide, pMET25MyrCubRHIS3 und pNubwt, trugen, bei keiner der getesteten 3-Aminotriazol-Konzentrationen Unterschiede festzustellen. Alle Transformanten wuchsen gleich schnell auf Medium ohne Histidin. Aus diesem Grund war auch diese Version des Systems für einen Screen ungeeignet.

3.2.4.3 System mit Transkriptionsfaktor PLV

Da das System, das auf dem direkten Abbau des Proteins RUra3 basierte, nicht funktioniert hatte, sollte das myristoylierte C_{ub} jetzt mit dem Transkriptionsfaktor PLV fusioniert werden (CPLV). Durch die Myristoylierung sollte gewährleistet sein, daß CPLV an der Plasmamembran lokalisiert ist. Falls sich das Testkonstrukt N_{ubwt} -Hxt1 ebenfalls an der Plasmamembran befindet, sollte eine Assoziation von N_{ubwt} und C_{ub} stattfinden. Infolgedessen würde der Transkriptionsfaktor PLV abgespalten (Stagljar *et al.*, 1998), in den Zellkern gelangen und könnte dort die Transkription des Reportergens *URA3* induzieren (Abb. 3.30A). In der *gsf2*-Mutante würde N_{ubwt} -Hxt1 im ER verbleiben, demnach dürfte das Reportergen nicht induziert werden (Abb. 3.30B). Daher könnte der Wildtyp auf Medium ohne Uracil wachsen, die *gsf2*-Mutante jedoch nicht. Gegenteiliges wäre auf Medium zu beobachten, das FOA enthält.

Sofern der Screen mit dem Testkonstrukt $N_{ub}wt$ -Hxt1 funktionieren würde, sollte später ein Gemisch von Plasmiden, die für $N_{ub}wt$ -X-Fusionen verschiedener Membranproteine codieren, und zusätzlich ein Plasmid, das die codierende Sequenz der myristoylierten CPLV-Fusion sowie das *lexA*-kontrollierte *URA3*-Gen aufweist, in jeden einzelnen Stamm der Sammlung der Deletionsmutanten transformiert werden. Durch Selektion auf kein Wachstum auf Medium ohne Uracil oder auf Wachstum auf FOA-Medium, könnten im Endeffekt Mutanten mit Translokationsstörungen identifiziert werden. Darunter müßten

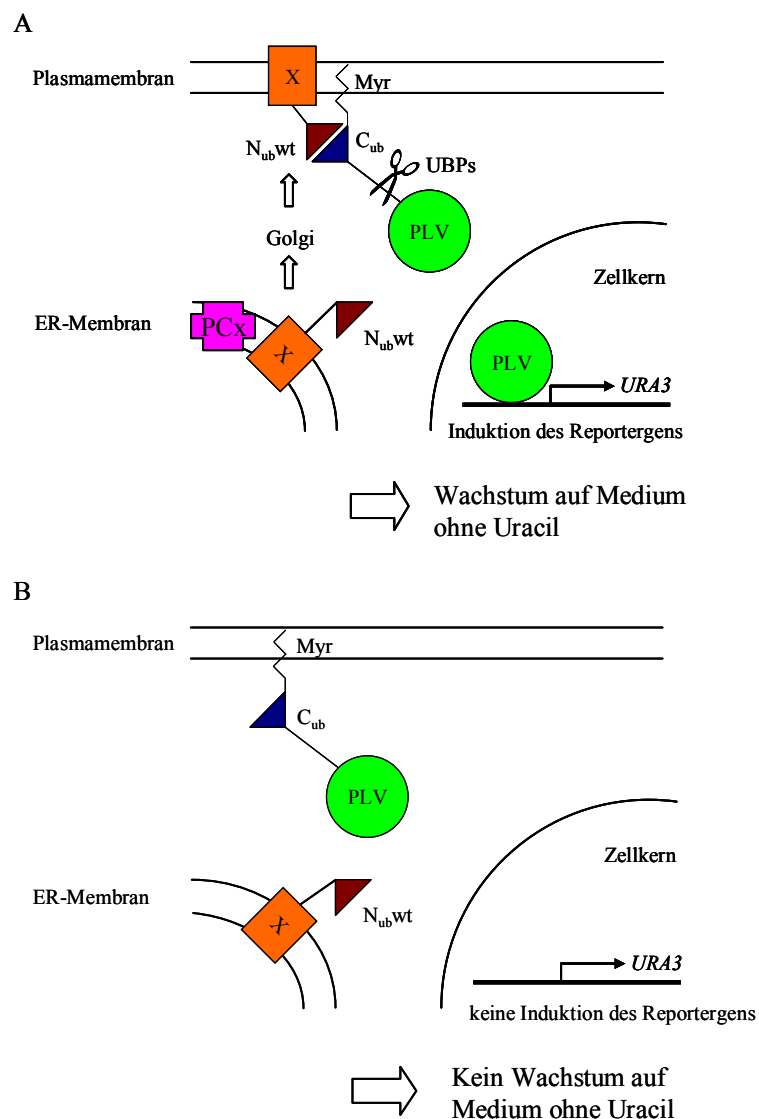


Abb. 3.30: Screen nach ER-Verpackungschaperonen mittels myristoyliertem CubPLV. Ist das Verpackungschaperon (PCx) vorhanden, wird das Fusionsprotein $Nubwt$ -X zur Plasmamembran transportiert, $Nubwt$ und Cub assoziieren, PLV wird abgespalten, wandert in den Kern und aktiviert das Reportergen (A). Wenn PCx nicht vorhanden ist, verbleibt $Nubwt$ -X im ER und es findet keine Induktion des Reportergens statt (B).

dann auch die Deletionsmutanten der für die Proteine der Fragestellung spezifischen Verpackungschaperone zu finden sein. Durch DNA-Sequenzierung des N_{ub}wt-X-Plasmids, das die identifizierte Mutante trüge, könnte auf das Membranprotein X rückgeschlossen werden.

Es wurde das CEN-Plasmid YCpLexAURA3 über homologe Rekombination kloniert, auf diesem Plasmid stand das *URA3*-Gen unter Kontrolle des durch PLV induzierbaren Promotors. Dieser Promotor enthielt die *lexA*-Bindestelle. Im nächsten Schritt wurde die codierende Sequenz der MyrC_{ub}PLV-Fusion inklusive der Sequenz des *MET25*-Promotors in das Plasmid YCpLexAURA3 kloniert. Das resultierende Plasmid wurde als YCpMetMyrCPLVLexAURA3 bezeichnet.

Die Plasmide YCpLexAURA3 und YCpMET25MyrCPLVLexAURA3 wurden in die Stämme CEN.PK2-1C und THY15 (*gsf2*) transformiert, kombiniert mit den Plasmiden p423MET25CPLV bzw. pNubwt-Hxt1, wobei das lösliche CPLV als Positivkontrolle stets induzieren sollte. Die erhaltenen Transformanten wurden auf Kompletmedium ohne Uracil und auf Medium mit FOA ausgestrichen. Ergebnis war, daß die Zellen immer auf Medium ohne Uracil, aber niemals auf Medium mit FOA wachsen konnten, was bedeutete, daß immer Ura3 gebildet wurde. Allein das Plasmid YCpLexAURA3 ohne ein zusätzliches für CPLV-codierendes Plasmid konnte Wachstum auf Medium ohne Uracil vermitteln. Somit konnten diese Zellen hinreichende Mengen des Enzyms Ura3 synthetisieren. Höchstwahrscheinlich war der *lexA*-kontrollierte Promotor undicht. Des weiteren wurde das Plasmid YCpMET25MyrCPLVLexAURA3 im Stamm THY.AP4 (Obrdlik *et al.*, 2004) getestet. In diesem Fall wurde das *ADE2*-Gen induziert. Eigentlich sollte CPLV an der Plasmamembran lokalisiert sein und gar nicht in den Kern wandern, folglich schien die Myristoylierung keine stringente Lokalisation von CPLV an der Plasmamembran zu bewirken. Möglicherweise war das myristoylierte Fusionsprotein zusätzlich oder sogar ausschließlich in der Kernmembran lokalisiert. Vielleicht lag es aber auch in löslicher Form vor. Also auch diese Variante des Systems war für einen genomweiten Screen nicht anwendbar.

3.2.4.4 „Packaging Chaperone Screening Assay“(PCSA)

In einer weiter optimierten Version des Screens sollte der *lexA*-kontrollierte Promotor genomisch integriert werden, weil dieser Promotor Plasmid-codiert eine starke basale Aktivität besaß. Bei genomischer Integration müßte dieses Problem behoben sein, da schon gezeigt werden konnte, daß der *lexA*-kontrollierte Promotor im Stamm THY.AP4 absolut dicht war (Obrdlik *et al.*, 2004). Als Reportergen sollte weiterhin *URA3* fungieren. Um

CPLV diesmal sicher in der Plasmamembran zu verankern, sollte CPLV mit einem Membranprotein fusioniert werden. Die Wahl fiel auf den Hexosetransporter Hxt1, da dessen Funktionalität und Lokalisation in der Plasmamembran über Wachstumstests mit dem Stamm EBY.VW4000 analysiert werden konnte. Ein weiterer Vorteil von Hxt1 als Fusionspartner war, daß Hxt1 die Plasmamembran über den sekretorischen Weg erreicht. Deshalb würden generelle Defekte im sekretorischen Weg keine falsch positiven Resultate des Screens ergeben, da Hxt1 und das Transportprotein X gleichermaßen davon betroffen wären. Um ein Verfahren mit hohem Durchsatz zu entwickeln, sollte die SGA-Technik (3.1.7.10) mit dem Split-Ubiquitin-System kombiniert werden. Es sollte ein Ausgangsstamm erzeugt werden, der die für das Split-Ubiquitin-System und zusätzlich die für den SGA benötigten Konstrukte genomisch integriert hat. Das wären das *lexA*-kontrollierte Reporter-gen *URA3*, die *HXT1-CPLV*-Fusion sowie das durch den *MFA1*-Promotor regulierte *HIS3*-Gen. Die codierende Region der N_{ub}^{wt} -X-Fusion sollte auf Plasmiden in die Zellen gebracht werden. Alle Konstrukte müßten mit einem dominanten Marker verknüpft werden, auf den später selektiert werden kann. Dieser Ausgangsstamm sollte dann mit der Sammlung der Deletionsmutanten gekreuzt werden, gefolgt von der Selektion auf diploide Zellen. Nach der Sporulation würde auf die haploide Nachkommenschaft und anschließend auf die mit den Konstrukten verbundenen Marker selektiert. Danach würde das Wachstum der Zellen auf Medien ohne Uracil und auf FOA-Medien analysiert. Bei Zellen, die nicht auf Medium ohne Uracil, aber auf Medium mit FOA wachsen könnten, wäre folglich das Reporter-gen nicht induziert. Das wären Zellen, in denen das Transportprotein X, fusioniert mit N_{ub}^{wt} , im ER akkumuliert und nicht zur Plasmamembran transportiert würde. Da Hxt1-CPLV aber weiterhin zur Plasmamembran befördert würde, könnte keine Assoziation von N_{ub} und C_{ub} stattfinden. Somit wären die Zellen Uracil-auxotroph. In den betreffenden Stämmen wären Gene deletiert, deren Produkte spezifisch die Lokalisation der Membranproteine der Fragestellung beeinflussen. Diese Variante des Screens wurde als „Packaging Chaperone Screening Assay“ (PCSA) bezeichnet (Abb. 3.31).

Die codierenden Sequenzen des *lexA*-kontrollierten *URA3*-Gens und des Markergens *natMX* wurden über doppelte homologe Rekombination in den *MET15*-Locus des Stammes BY4742 integriert (Österreicher, 2006). Das Wachstum des resultierenden Stammes AÖY01 wurde hinterher auf Kompletmedium ohne Uracil und auf Medium mit FOA analysiert. Es wurde kein Wachstum auf Medien ohne Uracil, aber Wachstum mit FOA beobachtet. Folglich wurde kein Ura3 gebildet, somit war der Promotor absolut dicht.

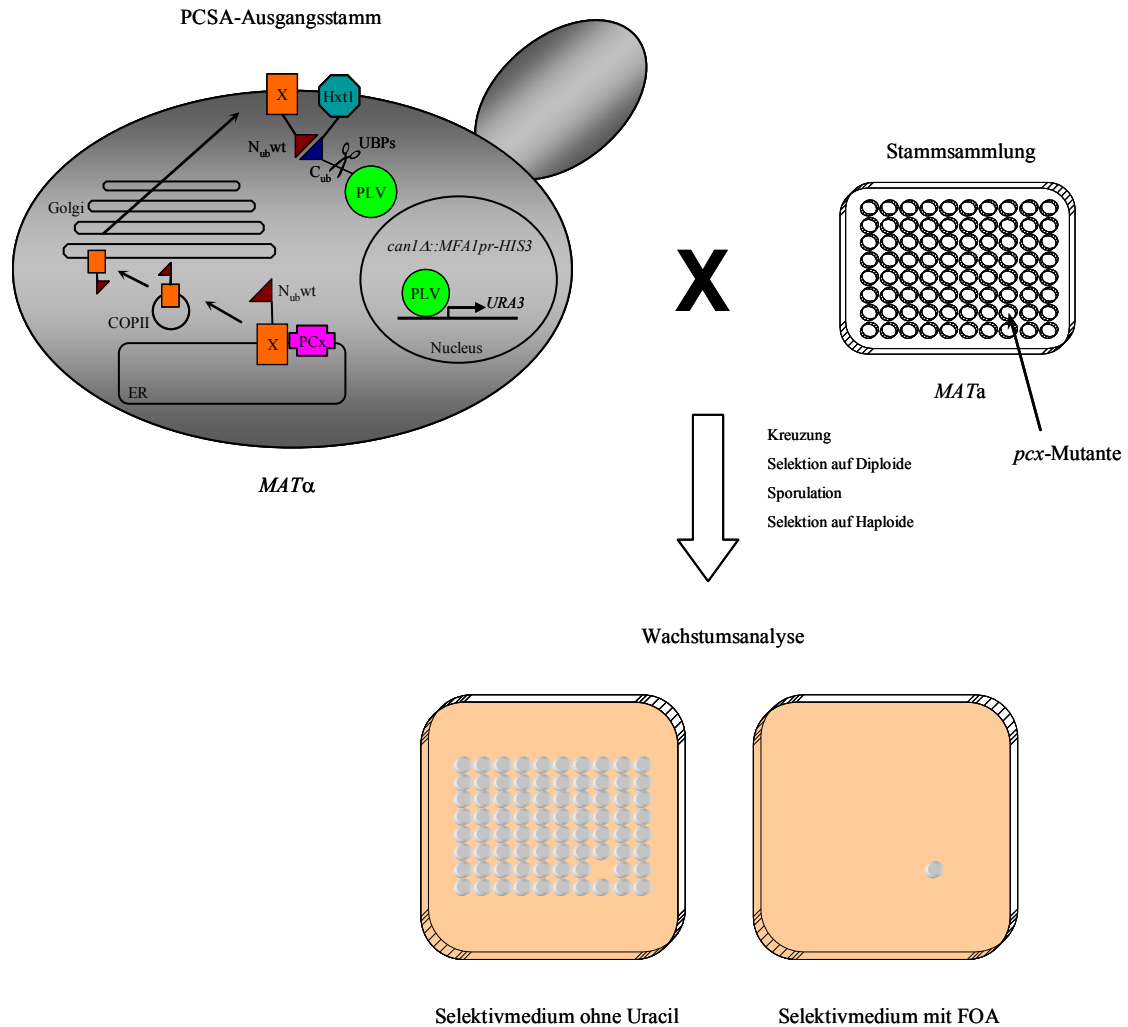


Abb. 3.31: Schematische Darstellung des „Packaging Chaperone Screening Assay“ (PCSA). X ist das Plasmamembran-Protein der Fragestellung, PCx das korrespondierende Verpackungschaperon. In der *pcx*-Mutante aus der Stammsammlung ist das für das Verpackungschaperon PCx codierende Gen deletiert. Nach Durchführung der für den SGA nötigen Schritte werden haploide Zellen selektiert, die die Nubwt- und Cub-Fusionen sowie die Deletionen aus der Stammsammlung tragen. In der *pcx*-Mutante gelangt die X-Nubwt-Fusion nicht zur Plasmamembran, infolgedessen findet keine Induktion der Expression des Reportergens *URA3* statt. Die Zellen der Mutante synthetisieren kein Ura3, sind somit Uracil-auxotroph, können aber auf FOA-Medium wachsen.

Als nächstes konnte die Induzierbarkeit des Promotors durch Transformation des Stammes mit dem Plasmid pCPLV überprüft werden. Die Transformanten zeigten Wachstum auf Medium ohne Uracil und kein Wachstum auf FOA-Medium. Also gelangte lösliches CPLV in den Zellkern und konnte dort den *lexA*-kontrollierten Promotor induzieren. Transformanten, die als Kontrolle mit einem Leerplasmid transformiert waren, wuchsen nicht auf Medium ohne Uracil, aber auf Medium mit FOA.

Im nächsten Schritt wurde das Plasmid pMET25HXT1CPLV im Stamm EBY.VW4000 über homologe Rekombination kloniert. Hxt1 und CPLV waren über den B2-Linker (Obrdlik *et al.*, 2004) verbunden. Durch Wachstumstest der Transformanten auf Komplettnutrientenmedium mit Glucose konnte die Funktionalität des Hxt1-Anteils des Fusionsproteins Hxt1-CPLV überprüft werden. Hxt1 konnte Wachstum vermitteln, war folglich funktionell und in der Plasmamembran lokalisiert. Dann sollte untersucht werden, ob das Plasmid pMET25HXT1CPLV bei Co-Transformation mit pNubwt Wachstum des Stammes AÖY01 und des Stammes THY.AP4 vermitteln kann. Das war der Fall, die Transformanten wuchsen auf synthetischem Komplettnutrientenmedium ohne Uracil bzw. ohne Adenin. Das Plasmid pMET25HXT1CPLV allein ohne ein für N_{ub}wt codierendes Plasmid sollte kein Wachstum ermöglichen. Auch das konnte gezeigt werden. Deswegen sollte *HXT1-B2-CPLV* genomisch in den Stamm AÖY01 integriert werden, und zwar in den *HXT2*-Locus. Somit kam *HXT1-B2-CPLV* unter die Kontrolle des *HXT2*-Promotors und war über die Glucosekonzentration regulierbar. Der resultierende Stamm wurde als AÖY02 bezeichnet (Österreicher, 2006). Daraufhin wurde das Plasmid YCpMET25Nubwt, das für lösliches N_{ub}wt codiert, über homologe Rekombination kloniert. Mit diesem Plasmid wurde der Stamm AÖY02 transformiert, und das Wachstum der Transformanten auf synthetischem Komplettnutrientenmedium ohne Uracil und auf FOA-Medium untersucht. Kontrollzellen hingegen wurden mit dem leeren Vektor transformiert. Die Zellen, die leere Vektoren trugen, wuchsen nicht auf Medium ohne Uracil, aber auf Medium mit FOA. Zellen jedoch, die YCpMET25Nubwt trugen, wuchsen auf Medium ohne Uracil, aber nicht auf Medium mit FOA. Die Induktion des Reportergens funktionierte demnach einwandfrei, nach Assoziation von N_{ub} und C_{ub} wurde PLV abgespalten, wanderte in den Nucleus und konnte dort das Reportergen induzieren.

Der PCSA sollte unter Verwendung der schon bekannten Verpackungschaperone Pho86 für den Transporter Pho84 und Chs7 für die Chitin-Synthase-Untereinheit Chs3 sowie der Komponenten des Eisen-Aufnahmesystems Fet3 und Ftr1 auf seine Funktionalität untersucht werden. Der Fet3-Ftr1-Komplex muß im ER assembliert werden, sonst findet kein Transport der Komponenten zur Plasmamembran statt. Fehlt Fet3, akkumuliert Ftr1 im ER (Stearman *et al.*, 1996).

Der Ausgangsstamm AÖY02 wurde mit den entsprechenden Deletionsmutanten aus der Stammsammlung gekreuzt, also mit der *pho84*-, der *chs7*- und der *fet3*-Mutante. Nach Sporulation der Zellen wurde eine Tetradenanalyse durchgeführt, in der auf die Zellen selektiert wurde, die alle mit den Konstrukten verknüpften Marker (*natMX*, *MET15*) und

die Deletion (*kanMX*) aufwiesen. Des Weiteren wurden zum Erproben des PCSA Plasmide benötigt, von denen die Gene der N_{ub} wt-Fusionen der Membranproteine Pho84, Chs3 und Ftr1 exprimiert werden konnten. Deshalb wurden die Plasmide YCpMET25NubwtPHO84, YCpMET25NubwtCHS3 und YCpMET25NubwtFTR1 über homologe Rekombination kloniert, wobei die N_{ub} wt-Fusionen unter der Kontrolle des über die Methioninkonzentration regulierbaren *MET25*-Promotors stehen. Die Deletionsmutanten AÖY02 *pho84*, AÖY02 *chs7*, AÖY02 *fet3* und der Stamm AÖY02 wurden mit den entsprechenden N_{ub} wt-Plasmiden transformiert. Anschließend wurde das Wachstum der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp auf synthetischem Komplettmedium ohne Uracil und auf Medium mit FOA analysiert. Diese Medien enthielten außerdem kein Leucin, um auf die Plasmide zu selektieren. Trotz Regulation durch verschiedene Methionin- und Glucosekonzentrationen konnten bei keiner der Kombinationen (N_{ub} wt-*PHO84* mit *pho86* bzw. *PHO86*, N_{ub} wt-*CHS3* mit *chs7* bzw. *CHS7*, N_{ub} wt-*FTR1* mit *fet3* bzw. *FET3*) deutliche Unterschiede identifiziert werden.

Ferner war kein Regulationseffekt durch Zusatz von Methionin zu erkennen. Selbst bei einer Konzentration von 5 mM im Medium war kein Unterschied zu Platten zu erkennen, die kein Methionin enthielten. Bei einer Konzentration von 5 mM ist der *MET25*-Promotor normalerweise vollständig reprimiert. Folglich hätten keine N_{ub} wt-Fusionen synthetisiert werden dürfen, daher hätte auch keine Assoziation von N_{ub} und C_{ub} und auch keine Abspaltung des Transkriptionsfaktors stattfinden dürfen. Hingegen funktionierte die Regulation über die Glucosekonzentration mittels *HXT2*-Promotor einwandfrei. Bei einer Konzentration von 5% Glucose im Medium war der Promotor deutlich reprimiert. Die Zellen wuchsen langsamer auf Medium ohne Uracil. Die Regulation der Promotoren war entscheidend, um die Menge der N_{ub} wt- und CPLV-Fusionen einzustellen. Das sollte eine unspezifische Assoziation von N_{ub} und C_{ub} verhindern oder zumindest reduzieren. Vorstellbar wäre eine solche unspezifische Assoziation, wenn sich beide Fusionsproteine in der ER-Membran befinden.

Da der *tetO*-Promotor sehr gut über den Zusatz des Antibiotikums Tetrazyklin ins Medium reprimierbar ist (Gari *et al.*, 1997), sollte der *MET25*-Promotor der N_{ub} wt-X-Plasmide über homologe Rekombination gegen den *tetO*-Promotor und der für die Regulation benötigten codierenden Sequenz des tTA-Transaktivators ausgetauscht werden. Somit sollten die CEN-Plasmide YCptetONubwtPHO84, YCptetONubwtCHS3 und YCptetONubwtFTR1 im Stamm AÖY02 konstruiert werden. Nach der Transformation wurde zuerst auf den *LEU2*-Marker des Plasmids selektiert, anschließend wurde das

Wachstum der Rekombinanten auf Kompletmedium ohne Leucin und ohne Uracil mit verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums Tetrazyklin (0,01, 0,1, 1, 10 µg/ml) untersucht. Ein Großteil der Rekombinanten zeigte ein mit steigender Tetrazyklin-Konzentration reduziertes Wachstum auf Medium ohne Uracil. Aus entsprechenden Kolonien wurden dann die Plasmide präpariert und mittels Restriktionsanalyse überprüft. Nur das Amplifizieren des Plasmids YCptetONubwtPHO84 in *E. coli* war nicht möglich. Die resultierenden Plasmide YCptetONubwtCHS3 und YCptetONubwtFTR1 wurden dann in die *chs7*- und *CHS7*-Stämme bzw. *fet3*- und *FET3*-Stämme transformiert. Im nächsten Schritt wurde das Wachstumsverhalten der Transformanten auf synthetischen Kompletmedien ohne Leucin und ohne Uracil mit verschiedenen Glucose- (2%, 5%) und Tetrazyklin-Konzentrationen (0,1, 1, 10 µg/ml) analysiert. Als Kontrolle diente jeweils der *chs7*- bzw. *fet3*-Stamm, transformiert mit zwei Plasmiden, die nur den *LEU2*- bzw. *URA3*-Marker tragen. Die Wachstumsanalyse zeigte, daß trotz der funktionierenden Regulation durch den *tetO*- und *HXT2*-Promotor ausschließlich beim Vergleich *chs7/CHS7* ein schwacher Effekt zu erkennen war. Der *CHS7*-Stamm wuchs besser als die *chs7*-Mutante auf Medium ohne Uracil (Abb. 3.32A). Das Grundprinzip des Systems funktionierte also. Der Unterschied war allerdings zu gering, um darauf basierend einen genomweiten Screen durchzuführen. Überdies schien das System nicht ausnahmslos bei jedem Faktor, der die Translokation beeinflußt, funktionell zu sein, da bei der Kombination *fet3/FET3* kein Wachstumsunterschied feststellbar war (Abb. 3.32B). Somit war auch dieser Ansatz für einen genomweiten Screen ungeeignet.

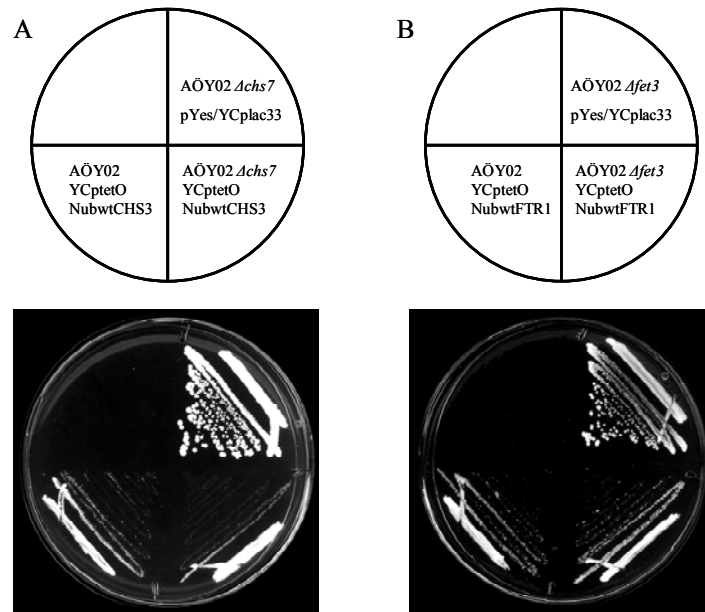


Abb. 3.32: Test der Funktionalität des PCSA. Analyse des Wachstums der Stämme AÖY02, AÖY02 *chs7* Δ (A) und *fet3* Δ (B), die mit den in der Abbildung beschriebenen Plasmiden transformiert waren, auf synthetischem Kompletmedium ohne Leucin und ohne Uracil mit 5% Glucose- und 0,1 μ g/ml Tetrazyklin.

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der Mitglieder der Zuckertransporterfamilie Ybr241 und Ygl104

Die Produkte der Gene *YBR241C* und *YGL104C* konnten anhand computerunterstützter Vergleiche von Sequenzhomologien in die Zuckertransporterfamilie eingeordnet werden (Nelissen *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die physiologische Funktion und subzelluläre Lokalisation der putativen Transportproteine Ybr241 und Ygl104 analysiert werden.

4.1.1 Die Gene *YBR241C* und *YGL104C* codieren für vakuoläre Membranproteine

Die subzelluläre Lokalisation der Proteine Ybr241 und Ygl104 sollte mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation und Western-Blot-Analyse untersucht werden. Dabei wäre die Verwendung spezifischer Antikörper gegen Ybr241 und Ygl104 optimal für den Nachweis der Proteine in der Western-Blot-Analyse. Da es sich bei Ybr241 und Ygl104 aber um bisher nicht näher untersuchte Proteine handelt, sind keine spezifischen Antikörper erhältlich. Da die Herstellung spezifischer Antikörper gegen die beiden Membranproteine zu aufwendig war, mußte die Detektion über einen Epitop-Tag erfolgen, obwohl ein Einfluß des Tags auf die Lokalisation möglich war (Kumar *et al.*, 2002). Sinnvoll war daher der Einsatz eines relativ kleinen Tags, um die natürliche Konformation der Proteine nur geringfügig zu verändern. Um auch das Maß der Genexpression so wenig wie möglich zu beeinflussen, sollten die betreffenden Gene unter Kontrolle des endogenen Promotors bleiben. Daher wurde ein 3xHA-Tag genomisch integriert. Doch war es nicht möglich, die HA-Fusionen von Ybr241 und Ygl104 in einer Western-Blot-Analyse nachzuweisen. Der Grund war wahrscheinlich der hohe Hintergrund, der durch die mangelnde Spezifität des verwendeten Anti-HA-Antikörpers verursacht wurde. Die entsprechenden Banden für Ybr241-HA oder Ygl104-HA zwischen den vielen unspezifischen zu identifizieren, war nicht möglich. Zudem schien die produzierte Proteinmenge, vermutlich aufgrund einer geringen Expressionsrate der Gene, klein zu sein. Folglich könnte das Signal für Ybr241-HA bzw. Ygl104-HA in der Western-Blot-Analyse relativ schwach und bei dem starken Hintergrund nicht erkennbar gewesen sein.

Da die HA-Fusionen nicht detektierbar waren, wurden Stämme mit genomisch integrierten TAP-Tags verwendet. Zum Nachweis von Ybr241 kam ein Stamm aus einer

genomweiten Expressionsanalyse zum Einsatz, welcher im S288C-Stammhintergrund konstruiert worden war (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Obwohl *YBR241C* zu den Genen gehört, die in der genomweiten Analyse nur ein schwaches Expressionslevel aufwiesen, konnte die TAP-Fusion problemlos mittels PAP-Antikörpern in der Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden. Eine Zellfraktionierung durch einen kontinuierlichen Dichtegradienten ergab eine intrazelluläre Lokalisation von Ybr241 sowie eine absolute Co-Lokalisation mit dem Markerprotein der Vakuole ALP. Dagegen war für Ygl104 kein Stamm verfügbar, weil sich dessen TAP-Fusion in der genomweiten Analyse nicht nachweisen ließ (Ghaemmaghami *et al.*, 2003). Eine mögliche Ursache dafür wäre ein äußerst geringes Expressionslevel von *YGL104C* im verwendeten S288C-Stammhintergrund. Daher wurde ein TAP-Tag genomisch in den Stamm CEN.PK2-1C integriert, aber das Fusionsprotein Ygl104-TAP war auch bei Verwendung des konstruierten Stammes nicht detektierbar. Vermutlich wurde Ygl104 unter den Bedingungen, bei denen die Zellen zur Präparation der Rohextrakte herangezogen wurden, nicht produziert oder sehr schnell degradiert. Allerdings sollte nach den Daten einer Expressionsanalyse (Gasch *et al.*, 2000) sowohl *YBR241C* als auch *YGL104C* unter den gewählten Bedingungen exprimiert sein. Da der in dieser Analyse verwendete Stamm ebenfalls auf dem S288C-Stammhintergrund basierte, waren die offensichtlich unterschiedlichen Expressionsraten überraschend.

Eine weitere, aussichtsreiche Möglichkeit um Ygl104 über Western-Blot-Analyse zu detektieren, war die Überexpression einer mit einem Tag versehenen Version. Allerdings war das keine ideale Ausgangsbedingung für die Analyse der subzellulären Lokalisation, da die Gefahr einer Fehllokalisierung bestand. Durch die Überexpression könnten intrazelluläre Transportmechanismen abgesättigt sein, was möglicherweise zu einer falschen Lokalisation führen würde. Andererseits zeigte eine Analyse zur Lokalisation des Proteoms in *S. cerevisiae*, daß der Einfluß der Expressionsrate sowie der Größe und Platzierung der Tags auf die Lokalisation wesentlich geringer war als allgemein angenommen (Kumar *et al.*, 2002). Somit wurden N-terminale 6xHis-Fusionen von *YBR241C* und *YGL104C* von 2 μ -Plasmiden unter Kontrolle des verkürzten *HXT7*-Promotors überexprimiert, mit dem Ergebnis, daß nur 6xHis-Ybr241 nachweisbar war. Dieses Ergebnis deutete auf einen raschen Abbau von Ygl104 hin, da die Expressionslevel unter Kontrolle des konstitutiven Promotors ähnlich sein müßten.

Als nächstes wurden Plasmide aus einer Proteomanalyse (Gelperin *et al.*, 2005) eingesetzt, die für TAP-Fusionen von *YBR241C* und *YGL104C* unter Kontrolle des

induzierbaren *GALI*-Promotors codieren. Es stellte sich heraus, daß beide Proteine gut über Western-Blot nachweisbar waren. Das erhaltene Signal für Ygl104 war im direkten Vergleich etwas stärker als das von Ybr241 (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis steht in Korrelation zum Ergebnis der Proteomanalyse, in der für Ybr241 kein Signal und für Ygl104 nur ein sehr schwaches Signal erhalten wurde, da eine individuelle Western-Blot-Analyse wesentlich spezifischer sein kann als eine „high throughput“-Untersuchung. Somit konnten Zellfraktionierungen über kontinuierliche Dichtegradienten (Kolling und Hollenberg, 1994) durchgeführt werden. Ybr241 und Ygl104 konnten anhand der Vergleiche mit der Lokalisation der Plasmamembran-ATPase Pma1 klar intrazellulären Membranen zugeordnet werden. Allerdings zeigte das Protein des ER Dpm1 eine ähnliche Verteilung und das gleiche Maximum wie das vakuoläre Membranprotein Vph1. Demzufolge war der kontinuierliche Gradient absolut ausreichend, um eine intrazelluläre Lokalisation von einer Lokalisation an der Zelloberfläche zu unterscheiden, jedoch Proteine einzelnen Organellen zuzuordnen, war unmöglich. Daher wurde eine Analyse mittels zehnstufigem Saccharosedichtegradienten durchgeführt (Sorin *et al.*, 1997), der die Separation einzelner Kompartimente realisierbar machen sollte. Die Verteilung der entsprechenden Markerproteine demonstrierte die Trennung von Membranfragmenten der Vakuole, des späten Endosoms, des ER und des Mitochondriums. Das Markerprotein der Vakuolenmembran Vph1 war am deutlichsten in den Fraktionen 3-7 nachweisbar. Auch die Ergebnisse von Sorin *et al.* (1997) zeigten eine Anhäufung der vakuolären Marker in Fraktionen geringer bis mittlerer Dichte. Ybr241-TAP und Ygl104-TAP akkumulierten in den gleichen Fraktionen wie Vph1. Daher konnten die TAP-Fusionen der vakuolären Membran zugeordnet werden. Allerdings zeigte sich zusätzlich eine starke Akkumulation von Ygl104-TAP in Fraktion 1. In dieser Fraktion wies das Markerprotein des späten Endosoms Pep12 sein maximales Signal auf. Somit schien ein Anteil der Proteinmenge von Ybr241-TAP im späten Endosom lokalisiert zu sein. Eine Beeinflussung der Lokalisation von Ygl104-TAP entweder durch die Überexpression oder durch den TAP-Tag, eventuell auch durch beides, wäre möglich. Ygl104-TAP passiert wahrscheinlich auf dem Weg zur Vakuole das späte Endosom, was schon für eine ganze Reihe vakuolärer Proteine beschrieben wurde (Bryant und Stevens, 1998). Daher wäre eine dauerhaft hohe, lokale Konzentration von Ygl104-TAP im späten Endosom, bedingt durch die hohe Proteinmenge bei Überexpression, eine Erklärung. Es würden laufend große Mengen an Protein nachgeliefert und Transportmechanismen könnten abgesättigt sein. Auch eine Fehlsortierung in die lumenalen Vesikel des MVB wäre vorstellbar, müßte aber im

Endeffekt in einer Anreicherung von Ygl104-TAP im Lumen der Vakuole resultieren. Dagegen spricht jedoch, daß bei Überexpression der Ygl104-GFP-Fusion keine Fluoreszenz im Lumen der Vakuole zu beobachten war. Eventuell werden aber auch Sortierungssignale oder Bindungsstellen durch den Tag verdeckt. Da die 6xHis-Fusion von Ygl104 weder unter Kontrolle des verkürzten *HXT7*-Promotors noch unter Kontrolle des *GALI*-Promotors nachweisbar war, konnte der Einfluß eines anderen, N-terminalen Tags nicht analysiert werden. Für Ybr241 hingegen wurde sowohl mit C-terminalem TAP-Tag als auch mit N-terminalem 6xHis-Tag eine ausschließlich vakuoläre Lokalisation festgestellt. Demzufolge schien der C-terminale TAP-Tag keinen Einfluß auf die Lokalisation des Proteins Ybr241 zu haben.

Des weiteren konnte die vakuoläre Lokalisation noch mittels Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden. Die C-terminalen GFP-Fusionen von Ybr241 und Ygl104 konnten der vakuolären Membran zugeordnet werden.

Doch warum läßt sich Ygl104 bei Expression des korrespondierenden Gens unter Kontrolle des *GALI*-Promotors nachweisen und unter Kontrolle des verkürzten *HXT7*-Promotors nicht? Da beides starke Promotoren sind, kommen größere Unterschiede in der Expressionsrate als Erklärung nicht in Betracht. Also muß eine erhöhte Stabilität des Genprodukts entscheidend sein. Aber worauf ist diese erhöhte Stabilität zurückzuführen? Die starke Produktion der Ygl104-TAP-Fusion nach Induktion durch Galactosezugabe in Verbindung mit dem Zusatz von Nährstoffen (YEP) könnte ausschlaggebend sein, vielleicht kann der Abbau in der Zeitspanne der Überexpression nicht so umfassend erfolgen, wie bei einer konstitutiven Expression unter Kontrolle des verkürzten *HXT7*-Promotors. Degradationsmechanismen könnten durch die hohe Proteinmenge temporär abgesättigt sein. Jedoch ließ sich die 6xHis-Fusion von Ygl104 auch nicht unter Kontrolle des induzierbaren *GALI*-Promotors nachweisen. Somit spricht einiges für Unterschiede in der DNA-Sequenz. Im Fall der Proteomanalyse diente bei der Konstruktion des Plasmids BG-YGL104-TAP als „template“-DNA genomische DNA des BY-Stammes. Bei der Konstruktion des Plasmids p426HXT7-HISYGL104C wurde als „template“-DNA in der PCR genomische DNA des Stammes CEN.PK2-1C verwendet, und eine DNA-Sequenzierung ergab die Übereinstimmung der Sequenz mit der des sequenzierten Stammes FY. Für die Klonierung des Plasmids pGAL1-HISYGL104C wurde genomische DNA des FY-Stammes eingesetzt. Sowohl der Stamm BY als auch der sequenzierte FY-Stamm basieren auf dem Stamm S288C, daher sollten aufgrund des gleichen Stammhintergrunds keine großen Sequenzpolymorphismen bestehen. Die Plasmide aus der

Proteomuntersuchung waren durch Restriktionsanalyse überprüft worden. Außerdem war der ORF von beiden Enden aus sequenziert worden, allerdings nicht ganz vollständig (Gelperin *et al.*, 2005). Somit wäre es möglich, daß Sequenzunterschiede im nicht sequenzierten, mittleren Teil bestehen, die die erhöhte Stabilität des Genprodukts Ygl104 bewirkten. Das kann entweder durch Unterschiede zwischen der DNA-Sequenz des Genoms des BY- und des FY-Stammes erklärt werden oder durch aufgetretene Fehler in der PCR während der Konstruktion der Plasmide. Auf der anderen Seite war die GFP-Fusion von Ygl104 mittels Fluoreszenzmikroskopie nachweisbar. Die Fusion stand ebenfalls unter Kontrolle des *GALI*-Promotors, und als Matrize in der PCR diente genomische DNA des Stammes FY. Da aber auf Klone, die Fluoreszenz zeigten, selektiert worden war, wurden unter Umständen Klone ausgewählt, die eine stabilere, mutierte Version von Ygl104 produzierten. Dagegen war die N-terminale 6xHis-Fusion unter Kontrolle des *GALI*-Promotors nicht zu detektieren. In diesem Fall diente ebenfalls genomische DNA des Stammes FY als „template“ in der PCR. Somit könnten tatsächlich Sequenzunterschiede der DNA entscheidend für die erfolgreiche Detektion des Genprodukts Ygl104 in der Western-Blot-Analyse gewesen sein. Vorstellbar wäre aber auch eine Stabilisierung der Fusionsproteine durch die C-terminalen Tags oder eine Destabilisierung von Ygl104 durch den N-terminalen 6xHis-Tag. Sowohl die C-terminalen TAP-Fusionen als auch die C-terminale GFP-Fusionen beider Proteine waren detektierbar, die N-terminale 6xHis-Fusion von Ygl104 hingegen war unabhängig vom verwendeten Promotor nicht nachzuweisen. Allerdings war unter Kontrolle des endogenen Promotors auch die Detektion der C-terminalen TAP-Fusion nicht möglich. Der Grund könnte in diesem Fall in der geringen Expressionsrate von *YGL104C* gelegen haben.

Zusammengenommen sind die Hinweise auf eine vakuoläre Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 eindeutig. Folglich konnten die Ergebnisse der Lokalisationsstudien die Daten zur Lokalisation von Ybr241 aus der GFP-Analyse von Huh *et al.* (2003) bestätigen, sprechen jedoch gegen eine eventuelle Lokalisation von Ygl104 in den Mitochondrien, was eine Untersuchung des mitochondriellen Proteoms andeutete (Sickmann *et al.*, 2003).

4.1.2 Degradation ist nicht der Grund für die vakuoläre Lokalisation von Ybr241 und Ygl104

Bei Ybr241 und Ygl104 könnte es sich um Plasmamembran-Proteine handeln, die nur kurz in der Plasmamembran lokalisiert sind und dann rasch zur Degradation in die Vakuole transportiert werden. Jedoch ergab die Untersuchung der Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie sowohl für Ybr241 als auch für Ygl104 eine deutliche

Fluoreszenz an der vakuolären Membran und nicht im Lumen der Vakuole. Fluoreszenz im Vakuolenlumen konnte beim Abbau von mit GFP fusionierten Membranproteinen beobachtet werden, da Proteine zum Abbau über den MVB ins Lumen der Vakuole befördert werden und nicht in die vakuoläre Membran (Odorizzi *et al.*, 1998). Beispielsweise konnte für eine GFP-Fusion des Aminosäuretransporters Gap1 Fluoreszenz an der Plasmamembran festgestellt werden. Wird aber der Abbau von Gap1 durch Zugabe von Ammonium ausgelöst, ist Fluoreszenz im Lumen der Vakuole zu beobachten (Nikko und Andre, 2007). Diese Ergebnisse sprechen für eine residente vakuoläre Lokalisation von Ybr241 und Ygl104. Allerdings wurde für Ygl104 bei Zellfraktionierung durch einen zehnstufigen Dichtegradienten eine ungleichmäßige subzelluläre Verteilung gefunden. Zusätzlich zur vakuolären Lokalisation wurde bei Überproduktion des Proteins auch eine Lokalisation im späten Endosom festgestellt. Mit aus diesem Grund sollte durch weitere Experimente eine Lokalisation in der Vakuole nur zum Zweck der Degradation ausgeschlossen werden. Der Einfluß der Deletion der C2-Domäne der Ubiquitin-Ligase Rsp5 (Wang *et al.*, 1999) auf die Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 wurde untersucht, da die Deletion der C2-Domäne die Anwesenheit der Transporter Fur4 und Gap1 in der Plasmamembran verlängern konnte (Springael *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001). Rsp5 wird unter anderem für die Ubiquitinierung von Proteinen an der Plasmamembran benötigt (Dunn und Hicke, 2001b). Die Ubiquitinierung fungiert als Signal, was für die Internalisierung durch Endocytose und Sortierung der Proteine in die luminalen Vesikel des MVB sorgt (Hicke und Dunn, 2003). Da keine veränderte Lokalisation in *rsp5ΔC2*-Mutanten festzustellen war, werden Ybr241 und Ygl104 nicht Rsp5-vermittelt abgebaut. Jedoch ist weder die Ubiquitinierung noch Internalisierung des α -Faktor-Rezeptors Ste2 abhängig von der C2-Domäne des Rsp5-Proteins (Dunn und Hicke, 2001a), weshalb auch die Internalisierung von Ybr241 und Ygl104 von dieser Domäne unabhängig sein könnte. Das wäre eine Erklärung für die unveränderte Lokalisation in der *rsp5ΔC2*-Mutante. Aber auch zusätzliche Lokalisationsstudien in den Endocytose-Mutanten *end3* und *end4* (Raths *et al.*, 1993) demonstrierten, daß Ybr241 und Ygl104 nicht über Endocytose in die Vakuole gelangen. Falls es tatsächlich Plasmamembran-Proteine gewesen wären, die sehr schnell abgebaut werden, hätten Ybr241 und Ygl104 in der Plasmamembran der Endocytose-Mutanten detektierbar sein müssen. Entsprechendes konnte schon für eine ganze Reihe von Plasmamembran-Proteinen gezeigt werden, beispielsweise für den Hexosetransporter Hxt7 in *end4*-Mutanten (Krampe und Boles, 2002) sowie für den ABC-Transporter Ste6 in *end3*- und *end4*-Mutanten (Kolling und Hollenberg, 1994). Allerdings

wurde für Ste6 in *end4*-Mutanten nur ein partieller Defekt in der Endocytose des Proteins festgestellt, was der Grund für die Untersuchung der Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in beiden Mutanten war. Nach diesen Ergebnissen ist es wahrscheinlich, daß Ybr241 und Ygl104 die Vakuole über die Transportwege für vakuoläre Proteine erreichen, was andererseits bestätigt, daß es sich um residente vakuoläre Membranproteine handelt.

4.1.3 Ygl104 wird vermutlich über den Cpy-Weg zur Vakuole transportiert

Die Transporter Ybr241 und Ygl104 gelangen nicht über Endocytose zur Vakuole. Daher sollten Lokalisationsstudien in *vps*-Mutanten die Transportrouten von Ybr241 und Ygl104 zur Vakuole identifizieren. Als wahrscheinliche Transportrouten kamen der CPY- oder der ALP-Weg (Bryant und Stevens, 1998) in Frage. Die Lokalisation von Ybr241-TAP und Ygl104-TAP wurde in Mutanten (*vps1*, *apl5*, *vps27*, *vps45*), bei denen durch Deletion essentielle Schritte im „vacuolar protein sorting“ beeinflusst waren, untersucht. Die Deletion von *VPS1* beeinflusst den CPY- und den ALP-Weg (Nothwehr *et al.*, 1995). Dennoch war in *vps1*-Mutanten kein Einfluß auf die vakuoläre ATPase Vph1 feststellbar, die ein bekanntes Substrat des CPY-Weges ist (Piper *et al.*, 1997). Aus diesem Grund waren die Ergebnisse dieser Lokalisationsstudie nicht aussagekräftig. Der Einfluß der Deletion von *APL5*, dessen Genprodukt essentiell für den Transport über den ALP-Weg ist (Cowles *et al.*, 1997a), auf die Lokalisation von Ybr241-TAP und Ygl104-TAP war zu gering, um daraus Schlüsse zu ziehen. In *vps27*-Mutanten (Piper *et al.*, 1995), die sich durch ein vergrößertes spätes Endosom (Klasse-E-Kompartiment) auszeichnen, stellte es sich als schwierig heraus, mittels Zellfraktionierung über einen zehnstufigen Saccharosedichtegradienten die exakte Lokalisation von Ybr241-TAP und Ygl104-TAP zu ermitteln. Die klare Zuordnung zum Klasse E-Kompartiment oder zur Vakuole war nicht möglich. Es war ein leichter Einfluß der *vps27*-Deletion auf die subzelluläre Verteilung von Ybr241-TAP und Ygl104-TAP erkennbar, der aber für eine Bestimmung des Transportweges nicht ausreichend war. Vermutlich haben die Membranfragmente der Vakuole und des Klasse-E-Kompartiments eine ähnliche Dichte, und die Unterscheidung der beiden Kompartimente mittels Zellfraktionierung durch den verwendeten Gradienten war nicht möglich. Bei den Lokalisationsanalysen in *vps45*-Mutanten ergaben sich allerdings Hinweise auf den Transport von Ygl104 über den CPY-Weg, Ybr241-TAP hingegen war in *vps45*-Mutanten mittels Western-Blot-Analyse nicht detektierbar. Vps45 ist an der Fusion von Vesikeln, die vom Golgi-Apparat stammen, mit dem späten Endosom beteiligt. Daher erreichen in *vps45*-Mutanten vakuoläre Membranproteine wie Vph1 nicht das späte Endosom und akkumulieren in einer Vielzahl cytoplasmatischer Vesikel (Piper *et*

al., 1997). Auch das Protein Ygl104 scheint sich in diesen Vesikeln zu befinden, da Ygl104 und Vph1 in *vps45*-Mutanten die gleiche, vom Wildtyp abweichende, subzelluläre Verteilung aufwiesen. Somit scheint auch Ygl104 über das späte Endosom, folglich über den CPY-Weg, zur Vakuole befördert zu werden.

4.1.4 Sekretion der sauren Trehalase Ath1

Nach Keller *et al.* (1982) ist die saure Trehalase Ath1 in der Vakuole lokalisiert, Trehalose hingegen im Cytosol. Das Vorkommen von Substrat und Enzym in verschiedenen Kompartimenten führte zu der Hypothese, daß Trehalose über Endocytose ins Lumen der Vakuole gelangt, dort bei saurem pH-Wert durch Ath1 gespalten wird, und die resultierenden Glucosemoleküle anschließend ins Cytosol gelangen (Nwaka *et al.*, 1996). Diesen Transport über die vakuoläre Membran könnten die putativen Zuckertransporter Ybr241 und Ygl104 übernehmen. Doch die Hypothese der vakuolären Trehalosespaltung konnte in dieser Doktorarbeit durch Wachstumstests mit zwei Varianten des *hxt*-Null-Stammes sowie mit *HXT1*- und *HXT7*-Einzelexpressionsstämmen eindeutig widerlegt werden. Des weiteren konnte durch Analyse der Zuckerzusammensetzung des Mediums bei Kultivierung von *hxt*-Null-Stämmen mit und ohne *ATH1*-Gen bewiesen werden, daß Trehalose extrazellulär durch Ath1 in Glucosemoleküle hydrolysiert wird. Folglich muß Ath1 sekretiert werden, um diese Hydrolyse zu katalysieren. Somit liegt die Hauptfunktion von Ath1 in der Mobilisation extrazellulärer Trehalose. Die entstehenden Glucosemoleküle werden dann über die Hexosetransporter aufgenommen und dienen als Kohlenstoffquelle. Das konnten dann später auch andere Untersuchungen bestätigen (Basu *et al.*, 2006; Jules *et al.*, 2004). Eine unbedeutende Rolle für das Wachstum mit Trehalose spielt die Aufnahme über den α -Glucosid-Transporter Agt1 und die cytosolische Spaltung durch Nth1, was als zweiter Weg der Trehaloseassimilation vorgeschlagen wurde (Jules *et al.*, 2004). Denn zumindest im CEN.PK-Stammhintergrund wachsen *ath1*-Deletionsmutanten nur sehr langsam auf Trehalose, obwohl der Stamm *MAL*-Loci aufweist, die Voraussetzung für die Präsenz von Agt1 sind (Han *et al.*, 1995). Somit kann der zweite Weg der Trehaloseassimilation die Mobilisierung mittels Ath1 nur in geringem Maße komplementieren. Interessanterweise wuchsen Deletionsmutanten der sauren Trehalase *ATH1*, bei denen noch die Gene der vakuolären Transporter Ybr241 und Ygl104 deletiert waren, noch langsamer mit Trehalose als Kohlenstoffquelle als die *ath1*-Mutante.

4.1.5 Wachstumsphänotypen der Deletionsmutanten

Wachstumsphänotypen von Deletionsmutanten der Gene *YBR241C* und *YGL104C* sollten Hinweise auf die Funktion der Genprodukte im Zellmetabolismus liefern. Doch sowohl die Einzel- als auch die Doppeldeletionsmutanten im CEN.PK-Stammhintergrund zeigten in den zu Beginn der Arbeit durchgeführten Experimenten keinen Phänotyp beim Wachstum auf den Kohlenstoffquellen Glucose, Maltose, Fructose, Mannose, Trehalose, Galactose und Glycerin. Wegen des Verwandtschaftsgrades von Ybr241 und Ygl104 zu den entsprechenden Transportern (Nelissen *et al.*, 1997) hätte es sich bei den gewählten Zuckern um Substrate handeln können. Trotz Lokalisation der Proteine Ybr241 und Ygl104 in der vakuolären Membran wäre ein Einfluß der putativen Transporter auf die Aufnahme der Substrate aus dem Medium vorstellbar. Eventuell verursacht durch eine Änderung der Substratkonzentration im Cytosol der Deletionsmutanten aufgrund einer fehlenden Transportfunktion über die vakuoläre Membran. Vergleichbares konnte schon für die Aminosäureaufnahme intakter Hefezellen aus dem Medium demonstriert werden. Shimazu *et al.* (2005) zeigten, daß die Histidinaufnahme von Deletionsmutanten der Gene vakuolärer Aminosäuretransporter vermindert war.

Durch die Deletion des Glucosesensors *SNF3* im Stamm EBY.VW4000 wird dem *hxt*-Null-Stamm wieder das Wachstum mit Hexosen als Kohlenstoffquelle ermöglicht, daher wird eine reprimierende Wirkung von Snf3 auf unbekannte Hexosetransporter postuliert (Wieczorke *et al.*, 1999). Um eine reprimierende Wirkung von Ybr241 und Ygl104 auf unbekannte Hexosetransporter zu untersuchen, wurden die Gene *YBR241C* und *YGL104C* im Stamm EBY.VW4000 deletiert. Allerdings war kein Wachstum der Deletionsmutanten erkennbar, weshalb eine sensorische Funktion von Ybr241 und Ygl104 im Zusammenhang mit Glucosetransport höchstwahrscheinlich ausgeschlossen werden kann. Gegen die sensorische Funktion sprechen auch Strukturunterschiede zwischen dem Glucosesensor Snf3 und den Proteinen Ybr241 und Ygl104. Snf3 zeichnet sich neben den 12 Transmembrandomänen durch zusätzliche, cytoplasmatische Verlängerungen aus, wobei Ybr241 und Ygl104 derartige Verlängerungen nicht besitzen (Boles und Hollenberg, 1997). Andererseits zeigten Wachstumsversuche mit einem *hxt*-Null-Stamm, der sowohl die Deletion von *YBR241C* und *YGL104C* als auch die von *SNF3* aufwies, daß der Stamm mit Hexosen wachsen konnte. Somit handelt es sich bei Ybr241 und Ygl104 nicht um gesuchte unbekannte Hexosetransporter.

Sogar die Durchführung von Phenotype MicroArrays™ (Biolog, Inc.) ergab keinen Unterschied zwischen Wildtyp und Doppeldeletionsmutante. Bei diesem Verfahren

wurden ca. 2000 verschiedene Wachstumsbedingungen getestet. Somit haben Ybr241 und Ygl104 unter den getesteten Bedingungen keine essentielle Funktion im Metabolismus der Hefezelle. Vermutlich sind ganz spezifische Bedingungen erforderlich, unter denen dann ein Phänotyp detektierbar wäre. Außerdem könnten Proteine mit redundanter Funktion existieren, die unter den untersuchten Bedingungen in den Deletionsmutanten die Aufgabe von Ybr241 und Ygl104 übernommen haben.

Durch Ausstrich von Zellen des Wildtyps und der Deletionsmutanten auf Agarplatten, Inkubation bei 37°C und dem Vergleich des Wachstumsverhaltens konnten keine Phänotypen identifiziert werden. Deshalb ergaben sich auch vorerst keine Hinweise auf die Funktion von Ybr241 und Ygl104. Jedoch konnte im Verlauf der Arbeit nach Auftropfen von Verdünnungsreihen der Zellsuspensionen auf Agarplatten ein wesentlich schnelleres Wachstum der Doppeldeletionsmutante (*ybr241c ygl104c*) sowie der Einfachdeletionsmutante (*ygl104c*) auf Trehalose- und Raffinosemedium bei 37°C beobachtet werden. Die *ybr241c*-Mutante wuchs nur etwas schneller als der Wildtyp, der Unterschied zum Wildtyp war aber deutlich. Somit scheinen beide Proteine am gleichen Prozeß beteiligt zu sein, was aufgrund der hohen Sequenzidentität von 47,4% erwartet worden war. Das Disaccharid Trehalose wird extrazellulär durch die saure Trehalase Ath1 in Glucose gespalten, das Trisaccharid Raffinose in Melibiose und Fructose durch die Invertase. Melibiose wird dann durch die α -Galactosidase in Galactose und Glucose hydrolysiert (Barnett, 1976). Bei der Spaltung von Trehalose und Raffinose entstehen nur relativ geringe Mengen an Glucose. Vermutlich haben die Deletionsmutanten einen Vorteil beim Wachstum mit diesen geringen Glucosemengen. Ein spezifischer Effekt von Trehalose ist wahrscheinlich nicht die Ursache, sonst wäre dieser Wachstumsvorteil der Deletionsmutanten nicht auch mit Raffinose als Kohlenstoffquelle zu beobachten. Allerdings ist der Wachstumsvorteil der Deletionsmutanten nur bei 37°C festzustellen, was durch die bei erhöhten Temperaturen gesteigerte Stoffwechselrate erklärt werden kann. So können sich Unterschiede im Wachstum deutlicher ausprägen. Vorstellbar wäre aber auch ein Zusammenhang mit der bei 37°C ausgelösten Trehalosesynthese oder dem Bedarf der Zelle an Trehalosemolekülen zum Hitzeschutz. Jedoch zeigte die Dreifachmutante (*ybr241c ygl104c tps1*), die keine Trehalose mehr synthetisieren kann, ebenfalls den Phänotyp, weshalb ein solcher Zusammenhang unwahrscheinlich erscheint.

4.1.6 Suche nach Substraten der Proteine Ybr241 und Ygl104

Ein Ziel dieser Doktorarbeit war das Identifizieren der Substrate der vakuolären, putativen Transporter Ybr241 und Ygl104. Zu Beginn der Arbeit wurden keine Phänotypen der

Deletionsmutanten, die Rückschlüsse auf die Substrate erlaubten, gefunden. Daher sollte ein Wachstumstest etabliert werden, mit dessen Hilfe Zucker als Substrate identifiziert werden können. Die Intention war, den Wachstumsdefekt des *hxt*-Null-Stammes EBY.VW4000 beim Wachstum mit Hexosen durch die Transportaktivität von Ybr241 und Ygl104 aufzuheben. Dazu müßten die vakuolären Transporter an der Plasmamembran fehllokalisiert sein. Durch Überexpression und spontane Mutation sowie Überexpression in Verbindung mit Mutationsauslösung durch UV-Licht sollte dies erreicht werden. Vergleichbares konnte schon für den vakuolären Kupfertransporter Ctr2 demonstriert werden. Mehrere Mutationen führten dazu, daß ein Teil der Gesamtmenge von Ctr2 anstatt zur Vakuole zur Plasmamembran transportiert wurde (Rees *et al.*, 2004). So konnte der fehllokalisierte, vakuoläre Transporter den Phänotyp einer Mutante mit stark verminderter Kupferaufnahme komplementieren. Jedoch schien ein Aufheben des Wachstumsdefekts des *hxt*-Null-Stammes weder durch Ybr241 noch durch Ygl104 möglich zu sein. Selbst nach längerer Inkubation der entsprechenden Agarplatten ließ sich keine Bildung von Suppressorkolonien beobachten. Die Durchführung einer Mutagenese mit UV-Licht führte dann zwar zum Wachstum von Suppressorkolonien, doch die Überproduktion der Proteine Ybr241 und Ygl104 war nicht für deren Wachstum verantwortlich.

Als nächstes sollte durch Überexpression in Mutanten mit Defekten in den Transportwegen zur Vakuole eine Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in der Plasmamembran ermöglicht werden. Nach Nothwehr *et al.* (1995) erreichen vakuoläre Membranproteine in *vps1*-Mutanten die Vakuole über die Plasmamembran, und durch eine Überexpression wäre es vielleicht möglich, die lokale Konzentration der Proteine Ybr241 und Ygl104 in der Plasmamembran so hoch zu halten, daß Transport vermittelt werden kann. Doch bei Überexpression sowohl von *YBR241C* als auch von *YGL104C* konnte kein Wachstum des *hxt*-Null-Stammes mit den getesteten Zuckern festgestellt werden. Die gleiche Vorgehensweise wurde erfolglos bei einem *hxt*-Null-Stamm mit *apl5*-Deletion angewandt. Apl5 spielt als Komponente des AP3-Adapterkomplexes eine Rolle beim Transport von Proteinen zur Vakuole über den ALP-Weg (Cowles *et al.*, 1997a). Wahrscheinlich befand sich auch in diesen Mutanten kein Anteil der Proteinmenge in der Plasmamembran, oder dieser Anteil reichte nicht aus, um Transport zu vermitteln. Dementsprechend zeigten auch Lokalisationsstudien von Ybr241 und Ygl104 in einer *vps1*-Mutante und einer *apl5*-Mutante keine Lokalisation in der Plasmamembran. Nur die Lokalisation von Ygl104 war leicht beeinflusst.

Die Doppeldeletion *vps1 end4* ist letal, aber in *vps1 end4^{ts}*-Doppelmutanten akkumulieren vakuoläre Membranproteine bei restriktiver Temperatur in der Plasmamembran (Nothwehr *et al.*, 1995). Somit wäre die Verwendung einer solchen Mutante wahrscheinlich eine Möglichkeit gewesen, um eine Anhäufung von Ybr241 und Ygl104 in der Plasmamembran zu erreichen. Doch die Konstruktion einer temperatursensitiven *end4*-Mutante des Stammes CFY10 war zu aufwendig. Daher wurde ein Can1-Ybr241-Fusionsprotein konstruiert, das eine Lokalisation von Ybr241 in der Plasmamembran bewirken sollte. Durch die Transportaktivität des Arginin-Transporters Can1 konnte festgestellt werden, daß zumindest ein Teil der Gesamtmenge des Fusionsproteins in der Plasmamembran lokalisiert war. Das Fusionsprotein verlieh den Transformanten Sensitivität gegenüber Canavanin. Die Positiv-Kontrolle, ein Can1-Hxt1-Fusionsprotein, konnte Wachstum des *hxt*-Null-Stammes mit Hexosen vermitteln. Folglich war es möglich, daß ein solches Fusionsprotein die Transportaktivitäten beider Ausgangsproteine besitzt. Somit müßte das Verfahren prinzipiell funktionieren. Allerdings verursachte das Can1-Ybr241-Fusionsprotein anfangs auf den getesteten Kohlenstoffquellen kein Wachstum. Es bildeten sich jedoch ausschließlich auf Trehalosemedium nach ca. 10 Tagen Suppressorkolonien, die sehr gut mit Trehalose als Kohlenstoffquelle wachsen konnten. Das Wachstum war abhängig vom Plasmid, das für Can1-Ybr241 codierte. Nach Isolation und Retransformation in den Stamm EBY.VW4000 ermöglichten die isolierten Plasmide dem *hxt*-Null-Stamm nicht das Wachstum auf Trehalosemedium, was nicht überraschend war, da Trehalosetransport über die Plasmamembran nicht ausreichend für das Wachstum mit Trehalose als Kohlenstoffquelle ist. Das wurde für den Stamm EBY.VW1000 demonstriert, der keine Hexosetransporter, aber den Trehalosetransporter Agt1 aufweist. Der Stamm konnte trotz der Präsenz von Agt1 nicht mit Trehalose als Kohlenstoffquelle wachsen. Somit schien jedenfalls für die *hxt*-Null-Stämme die Aufnahme von Trehalose über Agt1 nicht hinreichend zu sein, um Wachstum zu ermöglichen. Wurde *ATH1* allerdings im Stamm CEN.PK2-1C deletiert, war sehr langsames Wachstum mit Trehalose erkennbar. Entsprechendes konnten auch Jules *et al.* (2004) ebenfalls im CEN.PK-Hintergrund beobachten, und ein Transport von Trehalose ins Cytosol über Agt1 gefolgt von der Hydrolyse durch Nth1 wurde von den Autoren vorgeschlagen. Im *hxt*-Null-Stamm schienen weitere genomische Mutationen nötig zu sein, möglicherweise solche, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens der neutralen Trehalase Nth1 bewirken. So könnte der Umsatz von Trehalose ermöglicht oder verstärkt werden. Allerdings konnte auch die Retransformation in verschiedene Klone der

Suppressormutante, die keine Plasmide mehr aufwies, das Wachstum auf Trehalose nicht wiederherstellen. Somit konnte durch die Verwendung einer Can1-Fusion von Ybr241 keine Informationen über Zucker als Substrate des Proteins gewonnen werden, daher wurde auf die Konstruktion eines Can1-Ygl104-Fusionsproteins verzichtet. Mögliche Erklärungen für das Scheitern des Experiments wären: 1) Das Substrat von Ybr241 befand sich nicht unter den getesteten Substanzen. Vielleicht ist das Substrat auch gar kein Zucker. 2) Der Transporter Ybr241 war nicht an der Plasmamembran lokalisiert oder nicht funktionell. 3) Bei Ybr241 handelt es um einen Exporter, der seine Substrate aus dem vakuolären Lumen ins Cytosol transportiert. Somit könnte selbst bei Lokalisation in der Plasmamembran keine Aufnahme der Substrate vermittelt werden. Diese Hypothesen erklären andererseits aber nicht das Wachstum der Suppressormutanten mit Trehalose.

4.1.7 Mögliche Funktionen von Ybr241 und Ygl104 im Trehalose-, Glycerin- oder Phosphatstoffwechsel

4.1.7.1 Eventuelle Rolle im Trehalosestoffwechsel

Datenbankanalysen (SGD) ergaben die Co-Expression von *YBR241C* und *YGL104C* mit den Komponenten des Trehalosesynthase-Komplexes *TPS1*, *TPS2* und *TS1I*. Somit deutete die Co-Expressionsanalyse auf eine Beziehung zum Trehalosesynthase-Komplex hin. Dennoch wurde anfangs eine Rolle bei der Mobilisation von Trehalose als Kohlenstoffquelle in Verbindung mit Ath1 postuliert, was aber nicht der Fall war. Da Trehalose als „chemisches Chaperon“ Proteine und Membranen unter widrigen Bedingungen schützt (Elbein *et al.*, 2003), wurde das Wachstumsverhalten der Deletionsmutanten von *YBR241C* und *YGL104C* bei hohen Temperaturen analysiert. Jedoch war kein Einfluß der Deletionen auf das Wachstum der Zellen bei moderat erhöhter Temperatur (37, 40°C) feststellbar. Aber eine Funktion von Ybr241 und Ygl104 bei der Vermittlung von Resistenz gegenüber schwerem Hitzestress (52°C) konnte identifiziert werden. Der Trehalosegehalt der Hefezellen korreliert direkt mit deren Thermotoleranz (De Virgilio *et al.*, 1994), was zur Hypothese führte, daß ein Herabsetzen des Gesamttrehalosegehalts der Zellen aufgrund der Deletion der vakuolären Transporter Ybr241 und Ygl104 die erhöhte Hitzeempfindlichkeit auslöste. Das konnte jedoch durch eine Analyse des intrazellulären Trehalosegehalts nicht bestätigt werden. Der Wildtyp, beide Einzeldelentionsmutanten und die Doppeldelentionsmutante enthielten nach Hitzeschock gleiche Mengen an Trehalose. Insofern schienen eher Unterschiede in der subzellulären Verteilung der Trehalose entscheidend zu sein oder Differenzen im Abbau

der akkumulierten Trehalose nach Hitzeschock. Wenn eine Akkumulation von Trehalose in der Vakuole für das Überdauern von Hitzestrebbedingungen notwendig wäre, könnte diese durch die vakuolären Transporter Ybr241 und Ygl104 vermittelt werden. Somit würde die Funktion von Ybr241 und Ygl104 im Transport der Trehalosemoleküle vom Ort der Synthese, dem Cytosol, in die Vakuole liegen. Dort würde Trehalose die vakuolären Proteine vor Hitze schützen, analog zur Funktion von Trehalose im Cytosol (Hottiger *et al.*, 1994). Außerdem wäre auch der Schutz der vakuolären Membran durch Trehalosemoleküle von beiden Seiten aus gewährleistet, genau wie die Plasmamembran ebenfalls beidseitigen Schutz benötigt, jedenfalls bei Vermittlung von Resistenz gegenüber Austrocknung (Eleutherio *et al.*, 1993). Falls die Vakuole Hitzeschutz durch Trehalose braucht, scheint dieser Schutz aber erst bei extremen Temperaturen für die Zellen essentiell zu werden. Denn bei moderat erhöhter Temperatur war kein Wachstumsdefekt der Mutanten erkennbar.

Durch eine Fraktionierung der Zellen des Wildtyps und der Mutanten in Vakuolen und Cytosol mittels Kupferionen (Ohsumi *et al.*, 1988) sollten Aussagen über die subzelluläre Verteilung von Trehalose getroffen werden. Das Verfahren der Zellfraktionierung mittels Kupferionen wurde allerdings für Aminosäuren entwickelt und nicht für Zucker. Es stellte sich heraus, daß die subzelluläre Trehaloseverteilung stark von der eingesetzten Kupferkonzentration abhängig war. Bei der Kupferkonzentration, die für Analyse des vakuolären Aminosäurepools verwendet wurde, befand sich Trehalose in der vakuolären Fraktion. Im Gegensatz zur Menge der Aminosäuren (Ohsumi *et al.*, 1988) nahm mit steigender Konzentration an Kupferionen die Trehalosemenge in der cytosolischen Fraktion zu, bis sich die Gesamtmenge an Trehalose in dieser Fraktion befand. Vermutlich funktionierte das Verfahren, das auf dem Permeabilisieren der Plasmamembran durch die Kupferionen basierte, für die Bestimmung der vakuolären Trehalosekonzentration nicht. Gründe dafür könnten im etwa dreifach höheren Molekulargewicht der Trehalose im Vergleich zu Aminosäuren liegen. Außerdem besitzt Trehalose ein großes Hydratationsvolumen (Sola-Penna und Meyer-Fernandes, 1998), was die freie Diffusion über die Poren der permeabilisierten Plasmamembran verhindern könnte. Mit steigender Kupferkonzentration wurde die Plasmamembran wahrscheinlich immer stärker permeabilisiert, was dann auch den Trehalosemolekülen das Passieren ermöglichte. Jedoch könnte sich auch wirklich Trehalose in der Vakuole befunden haben, und die hohen Kupferkonzentrationen hatten auch Einfluß auf die Permeabilität der vakuolären Membran.

Somit konnte die subzelluläre Trehaloseverteilung mit diesem Verfahren nicht näher analysiert werden.

Im Verlauf der Arbeit konnte ein im Vergleich zum Wildtyp schnelleres Wachstum der Deletionsmutanten von *YBR241C* und *YGL104C* mit Trehalose als Kohlenstoffquelle bei 37°C festgestellt werden. Daher ist eher unwahrscheinlich, daß ein verminderter Trehalosegehalt der Vakuole aufgrund der Deletionen die direkte Ursache des Hitzeschockphänotyps gewesen ist. Zwar war in diesem Fall die Temperatur nur moderat auf 37°C erhöht, jedoch steht der beobachtete Wachstumsvorteil im Widerspruch zur oben aufgestellten Hypothese.

Eventuell werden durch die Deletion von *YBR241C* und *YGL104C* auch ganz andere Stoffwechselwege beeinflusst, was dann durch generelle Effekte auf den Zellmetabolismus die verminderte Thermotoleranz gegenüber stark erhöhten Temperaturen bewirkte. Allerdings sind die wichtigsten physiologischen Antworten der Hefezelle auf Hitzeschock das Anhalten des Zellzyklus (Trotter *et al.*, 2001), die Expression von Hitzeschockproteinen (Morano *et al.*, 1998) und die Akkumulation von Trehalose (De Virgilio *et al.*, 1994). Somit bleibt die verminderte Thermotoleranz trotz gleichen Trehalosegehalts von Wildtyp und Mutanten als Hinweis auf eine Beteiligung am Trehalosestoffwechsel, besonders weil es sich bei Ybr241 und Ygl104 um putative Zuckertransporter handelt. Da die subzelluläre Verteilung von Trehalose nicht bestimmt werden konnte, wäre tatsächlich eine Funktion beim intrazellulären Trehalosetransport vorstellbar. Aber vielleicht eher im Zusammenhang mit dem Abbau der akkumulierten Trehalose nach Hitzeschock als mit der direkten Funktion von Trehalose als Streßschutzmolekül der Vakuole. Beispielsweise zeigen *nth1*-Mutanten, die einen Defekt in der Degradation der Trehalose nach Hitzeschock haben, den sogenannten „heat shock recovery“-Phänotyp (Nwaka *et al.*, 1995a). Weitere Hinweise auf eine Beteiligung am Trehalosestoffwechsel kamen von Wachstumsexperimenten mit Deletionsmutanten der sauren Trehalase Ath1 und der neutralen Trehalase Nth1. 1) Es konnte ein minimaler Wachstumsdefekt der *ath1 ybr241c ygl104c*- und der *nth1 ybr241c ygl104c*-Dreifachmutanten bei Wachstum auf Glucosemedium bei 40°C festgestellt werden. 2) Die *ath1 ybr241c ygl104c*-Dreifachmutante wuchs noch langsamer als die *ath1*-Mutante mit Trehalose als Kohlenstoffquelle. Diese schwachen Wachstumsphänotypen sind allerdings schwer einzuordnen, und beruhen möglicherweise auf sekundären Effekten.

Experimente mit isolierten vakuolären Vesikeln ergaben, daß eventuell eine Aufnahme von Trehalose in die Vakuole stattfindet, da bei mehreren Präparationen Radioaktivität in

den Vesikeln nachweisbar war. Ob diese Aufnahme über spezifische Transporter erfolgte, konnte aber nicht aufgeklärt werden. Allerdings waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und Deletionsmutante zu beobachten.

Zusammengenommen bestehen Hinweise auf eine Beziehung von *YBR241C* und *YGL104C* zum Trehalosestoffwechsel, die genaue Funktion der Proteine bleibt aber weiterhin unklar.

4.1.7.2 Eventuelle Rolle im Glycerin- oder Phosphatstoffwechsel

Die Durchführung eines SGA (Tong *et al.*, 2001) ergab eine synthetisch kranke Interaktion der Gene *YBR241C* und *YGL104C* mit dem Gen der Trehalose-6-Phosphat-Synthase *TPS1*. Diese Interaktion spricht gegen eine Beteiligung der Proteine Ybr241 und Ygl104 am Trehalosestoffwechsel. Da *tps1*-Mutanten keine Trehalose mehr synthetisieren können und die verwendeten Medien keine Trehalose enthielten, akkumulierten die Mutanten unter diesen Bedingungen keine Trehalose. Sofern keine intrazelluläre Trehalose vorhanden ist, kann auch keine transportiert werden. Das bedeutet, daß Ybr241 und Ygl104 nicht am Trehalosetransport beteiligt sind. Jedenfalls kann eine eventuelle Funktion von Ybr241 und Ygl104 beim Trehalosetransport nicht für den Phänotyp der Dreifachmutante (*tps1 ybr241c ygl104c*) entscheidend sein. Diese synthetisch kranke Interaktion ist ein Hinweis auf einen anderen zellulären Prozeß, durch den der defekte Trehalosestoffwechsel zum Teil kompensiert werden kann. Wenn aufgrund der *tps1*-Deletion keine Trehalose mehr synthetisiert werden kann, und zusätzlich noch die Proteine Ybr241 und Ygl104 fehlen, kann die Kompensation durch den unbekanntem Prozeß nicht mehr so umfassend erfolgen. Deswegen zeigten die Zellen einen deutlich verstärkten Wachstumsdefekt. Der Defekt war besonders auffällig nach Inkubation bei 37°C. Ein Hinweis auf den kompensierenden Prozeß kommt von der synthetisch kranken Interaktion von *YBR241C* und *YGL104C* mit dem Gen des Glycerintransporters *FPS1*. Auch die intrazelluläre Glycerinkonzentration spielt eine Rolle bei der Vermittlung von Resistenz gegenüber Hitzestress. Siderius *et al.* (2000) zeigten, daß Deletionsmutanten der Gene *GPD1* und *GPD2*, die kein Glycerin mehr synthetisieren, nicht mehr bei 37°C wachsen können. Zudem ist der Glycerintransporter Stl1 ebenfalls ein Mitglied der Zuckertransporterfamilie (Ferreira *et al.*, 2005). Daher wäre eine Funktion beim Glycerintransport über die vakuoläre Membran vorstellbar. Die Proteine Ybr241 und Ygl104 könnten als vakuoläre Glycerinimporter oder -exporter fungieren. Somit wäre ein Einfluß auf das intrazelluläre Glycerinlevel möglich. Ein neben dem Fehlen von Trehalose verminderter Glycerin Gehalt des Cytosols oder der Vakuole könnte die Sensitivität der Dreifachmutante (*tps1 ybr241c ygl104c*) gegenüber erhöhten

Temperaturen bewirkt haben. Das scheint aber von der Kohlenstoffquelle abhängig zu sein, denn auf Trehalose- und Raffinosemedium bei 37°C zeigte die Dreifachmutante sogar einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp und der *tps1*-Mutante. Allerdings war dieser Wachstumsphänotyp unabhängig von der Deletion des Gens *TPS1*.

Der Wachstumsdefekt der *tps1*-Mutante bei erhöhter Temperatur konnte durch Zusatz extrazellulärer Trehalose aufgehoben werden. In diesem Fall wird Trehalose über den Transporter Agt1 aufgenommen und kann so die Funktion als Stressschutzmolekül erfüllen (Plourde-Owobi *et al.*, 2000). Fehlen die Proteine Ybr241 und Ygl104, ist das nur noch teilweise möglich, was wiederum auf eine Funktion der beiden Proteine beim Trehalosetransport hinweist. Allerdings kann mit einer Funktion beim Trehalosetransport nicht der Wachstumsdefekt der Dreifachmutante *tps1 ybr241 ygl104* in Medium ohne Trehalose erklärt werden. In *tps1*-Mutanten kann möglicherweise durch extrazelluläre Trehalose nur der Hitzeschockphänotyp, verursacht durch das Fehlen der Trehalose an sich, aufgehoben werden. Dagegen ist in der Dreifachmutante der unbekannte Defekt, der unter Hitzestress deutlicher hervortritt, zu schwerwiegend und daher nur abschwächbar. Dieser unbekannte Defekt könnte eher mit dem Einfluß der *tps1*-Deletion auf die Glycolyse in Verbindung stehen. Somit scheint eine Rolle von Ybr241 und Ygl104 beim Trehalosetransport nicht die Erklärung für das nur noch teilweise mögliche Aufheben des Wachstumsdefekts der Dreifachmutante bei 37°C zu sein.

Deletionsmutanten des Gens *TPS1* wachsen nicht mehr mit den schnell fermentierbaren Kohlenstoffquellen Glucose und Fructose, aber mit Galactose (Thevelein und Hohmann, 1995). Dieser Phänotyp ist abhängig vom genetischen Hintergrund des verwendeten Stammes (Neves *et al.*, 1995). Im BY- und CEN.PK-Stammhintergrund war nur ein leichter Wachstumsdefekt auf synthetischem Glucosemedium festzustellen. Die Ursache für den Wachstumsdefekt der *tps1*-Mutanten ist möglicherweise eine verminderte Regulation der Glycolyse (Thevelein und Hohmann, 1995). Daher wird der Fluß von Glucose in diesen Stoffwechselweg nicht begrenzt, was in einer übermäßigen Produktion und intrazellulären Akkumulation von Zuckerphosphaten resultiert (Van Aelst *et al.*, 1991). Jedoch ist noch nicht im Detail aufgeklärt, wie die *tps1*-Deletion den Glucosekatabolismus beeinflusst. Eine weitere Hypothese ist, daß der Trehalose-Biosyntheseweg eine Rolle bei der Regeneration von freiem Phosphat spielt. Überschüssige, durch die Hexokinase gebildete Zuckerphosphate werden zur Trehalosesynthese verwendet. Nach der Bildung von T6P durch Tps1 wird anorganisches Phosphat bei der von Tps2 katalysierten Reaktion freigesetzt, was in der Glycolyse beim

Schritt der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase benötigt wird. Findet die Phosphatregeneration nicht statt, ist dieser Schritt limitierend für die Glycolyse. In Übereinstimmung damit zeigen *tps1*-Mutanten geringere intrazelluläre Phosphatkonzentrationen als der Wildtyp (Navon *et al.*, 1979). Außerdem kann die Stimulation der Glycerinproduktion den Wachstumsdefekt von *tps1*-Mutanten aufheben. Das kann durch die Überexpression des Gens des Glycerintransporters *Fps1* oder die des Gens *GPD1* (Luyten *et al.*, 1995), das für die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase codiert (Albertyn *et al.*, 1994), verursacht werden. Bei Überexpression von *FPS1* und *GPD1* findet eine verstärkte Glycerinsynthese statt, wodurch wiederum vermehrt anorganisches Phosphat freigesetzt wird. Somit kann auch die durch die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase katalysierte Reaktion der Glycolyse ablaufen (Abb. 4.1).

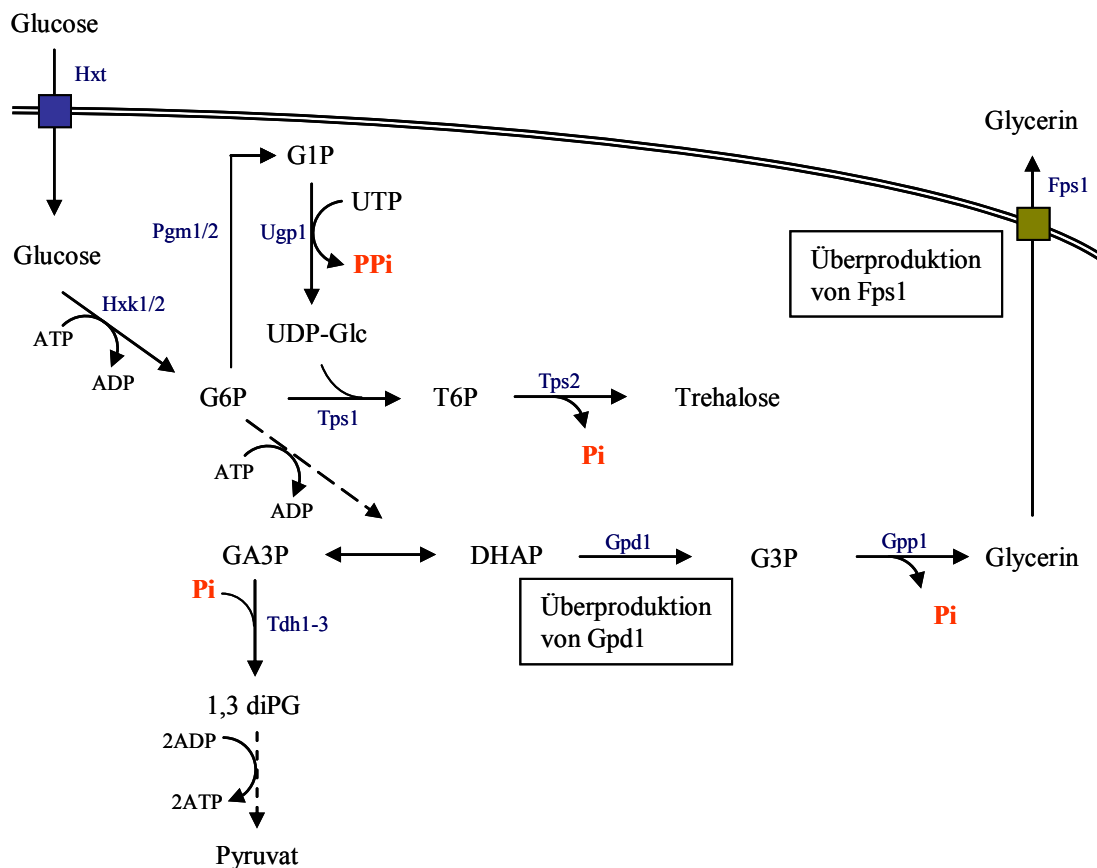


Abb. 4.1: Eine Hypothese zur Erklärung des Wachstumsdefekts von *tps1*-Mutanten mit der Kohlenstoffquelle Glucose ist die mögliche Rolle des Trehalosestoffwechsels bei der Regeneration von freiem Phosphat (Thevelein und Hohmann, 1995). Nach der Bildung von T6P durch Tps1 wird anorganisches Phosphat bei der von Tps2 katalysierten Reaktion freigesetzt. Zusätzlich wird bei der Synthese von UDP-Glucose Pyrophosphat frei. Anorganisches Phosphat wird in der Glycolyse bei der Bildung von 1,3-Diphosphoglycerat (1,3 diPG) durch die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Tdh1-3) benötigt.

Findet keine Phosphatregeneration statt, wird dieser Schritt limitierend für die Glycolyse. Die Stimulation der Glycerinproduktion kann den Wachstumsdefekt von *tps1*-Mutanten aufheben. Das kann durch die Überexpression des Gens des Glycerintransporters *Fps1* oder die des Gens *GPD1* (Luyten *et al.*, 1995), das für die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase codiert, verursacht werden. Bei Überproduktion von *Fps1* und *Gpd1* findet eine verstärkte Glycerinsynthese statt, wodurch wiederum vermehrt anorganisches Phosphat durch die Glycerin-3-phosphatase (*Gpp1*) freigesetzt wird. Somit kann auch die durch die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*Tdh1-3*) katalysierte Reaktion der Glycolyse ablaufen. (Pi = anorganisches Phosphat, PPi = Pyrophosphat, G1P = Glucose-1-phosphat, G6P = Glucose-6-phosphat, T6P = Trehalose-6-phosphat, GA3P = Glycerinaldehyd-3-phosphat, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, G3P = Glycerin-3-phosphat, 1,3 diPG = 1,3-Diphosphoglycerat, UTP = Uridintriphosphat, UDP-Glc = Uridindiphospho-Glucose, Pgm1/2 = Phosphoglucomutase, Ugp1 = UDP-Glucose-Pyrophosphorylase)

Eventuell haben auch *Ybr241* und *Ygl104* einen Einfluß auf die intrazelluläre Konzentration an freiem Phosphat. Da sich große Mengen an Phosphat in der Vakuole befinden (Okorokov *et al.*, 1980) und bidirektionaler Phosphattransport über die vakuoläre Membran gemessen wurde (Booth und Guidotti, 1997), wäre eine Rolle von *Ybr241* und *Ygl104* beim Import oder Export von Phosphat in bzw. aus der Vakuole vorstellbar. Besonders da noch kein spezifischer Transporter bekannt ist und der Phosphattransporter *Pho84* ebenfalls ein Mitglied der Zuckertransporterfamilie ist (Bun-Ya *et al.*, 1991; Nelissen *et al.*, 1997). Ferner wurde die Deletionsmutante des Gens *YGL104C* unter 255 Deletionsstämmen in einem genomweiten Screen nach Mutanten mit verändertem Polyphosphatgehalt gefunden, wobei der Stamm eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Menge an Polyphosphat aufwies (Freimoser *et al.*, 2006). Da 90 bis 99% des gesamten Polyphosphats in der Vakuole lokalisiert sind (Urech *et al.*, 1978), außerdem Mutanten mit reduziertem Polyphosphatlevel auch im Gesamtgehalt an Phosphat beeinflusst sein können (Freimoser *et al.*, 2006), ist das ein weiterer Hinweis auf eine Funktion beim Phosphattransport. Daher wurde in Kooperation mit Florian Freimoser von der ETH Zürich der Polyphosphat- und Gesamtphosphatgehalt der Stämme, die die Deletionen von *YBR241C*, *YGL104C*, *YBR241C* und *YGL104C*, *TPS1* sowie *YBR241C*, *YGL104C* und *TPS1* aufweisen, bestimmt. Wie auch schon das Ergebnis des genomweiten Screens zeigte, war der Polyphosphatgehalt von allen *ygl104c*-Mutanten stark herabgesetzt. Ebenfalls stark reduziert war der Polyphosphatgehalt der *tps1*-Mutante und der Dreifachmutante (*tps1 ybr241c ygl104c*), wobei die Dreifachmutante noch weniger Polyphosphat enthielt. Bei Analyse des Gesamtphosphatgehalts war auffällig, daß die *tps1*-Mutante wesentlich geringere Mengen an Phosphat enthielt und die Dreifachmutante noch geringere. Somit scheint sich die Hypothese zu bestätigen, *tps1*-Mutanten enthalten weniger Phosphat, was der Grund für den Wachstumsdefekt auf Glucosemedium ist. Die Ursache des verstärkten

Wachstumsdefekts der Dreifachmutante ist dann ein noch geringerer Phosphatgehalt. Somit scheint vor allem Ygl104 eine Beziehung zum Phosphatstoffwechsel zu haben. Ein solcher Einfluß könnte entweder direkt über eine Funktion beim Phosphattransport bestehen oder sekundär über den Einfluß auf andere Prozesse, die dann wiederum eine Beziehung zum Phosphatstoffwechsel haben. Beispielsweise wurden durch den Screen nach Mutanten, die im Polyphosphatgehalt beeinflußt waren, 20 Deletionsmutanten der Gene vakuolärer Proteine identifiziert. Diese zeigten den am stärksten verminderten Polyphosphatgehalt (Freimoser *et al.*, 2006). Da das Gen *YGL104C* auch in einem Screen nach *vps*-Mutanten gefunden wurde (Bonangelino *et al.*, 2002), wäre auch ein Zusammenhang mit einer möglichen Funktion von Ygl104 bei der vakuolären Proteinsortierung denkbar. Die Deletion von *YGL104C* würde in diesen Fall eine Fehllokalisierung von Proteinen bewirken, die wichtig für Polyphosphatsynthese und Speicherung sind. Allerdings ergaben sich in dieser Arbeit keine Hinweise auf eine Funktion von Ygl104 beim „vacuolar protein sorting“.

Bei Ybr241 und Ygl104 könnte es sich um vakuoläre Phosphattransporter handeln, die Phosphat über die vakuoläre Membran transportieren. In der Vakuole würde dann aus Phosphat direkt Polyphosphat synthetisiert. An der Synthese könnte der Vtc-Komplex beteiligt sein, da Mutanten der Gene dieses Komplexes stark in der Akkumulation von Polyphosphat beeinträchtigt waren (Ogawa *et al.*, 2000). Jedoch ergaben sich in einer anderen Untersuchung Hinweise, daß der Einfluß des Vtc-Komplexes auf die Polyphosphatspeicherung auf eine Störung des sekretorischen Weges in *vtc*-Mutanten zurückzuführen ist (Muller *et al.*, 2003). Daher bleiben die Proteine, die für die Polyphosphatsynthese verantwortlich sind, vermutlich unbekannt. Wenn die Proteine Ybr241 und Ygl104 fehlen, könnte weniger Phosphat in die Vakuole transportiert werden. Somit würde weniger Polyphosphat synthetisiert werden. Das könnte der Grund dafür sein, daß die Deletionsmutanten, zumindest die von *YGL104C*, weniger Polyphosphat enthalten. Die *tps1*-Mutanten scheinen einen Großteil ihres Phosphatvorrats zu verwenden, um Zuckerphosphate herzustellen. Da Phosphat in der Form von Polyphosphat gespeichert wird, verbrauchen sie eventuell dafür auch ihre Polyphosphatreserven. Deswegen weisen diese Mutanten einen geringeren Phosphat- und Polyphosphatgehalt auf. Die Dreifachmutante hat durch die Deletion von *YGL104C* schon Probleme bei der Polyphosphatsynthese und Speicherung und hat daher weniger Phosphatreserven. Im Endeffekt ist dann weniger Phosphat vorhanden, was noch stärker limitierend für den Ablauf der Glycolyse ist.

Würde es sich um vakuoläre Phosphatexporter handeln, müßte die Deletion zu einer Erhöhung der vakuolären und zu einer Verminderung der cytosolischen Phosphatkonzentration führen. Allerdings müßte dann Phosphat, wahrscheinlich in der Form von Polyphosphat, in der Vakuole akkumulieren. Deswegen würde sich der Gesamtgehalt der Zellen an Polyphosphat erhöhen. Das Gegenteil war aber der Fall, daher spricht einiges für eine Funktion beim Phosphatimport.

In Aufnahmemessungen mit vakuolären Vesikeln konnte eine eventuelle Funktion von Ybr241 und Ygl104 beim Phosphattransport nicht bestätigt werden. Es konnte eine schwache Phosphataufnahme sowohl von Vesikeln, die aus Wildtypzellen isoliert wurden, als auch von Vesikeln der Doppeldeletionsmutante nachgewiesen werden. Allerdings schwankten die Meßwerte relativ stark, so daß aus diesen Ergebnissen keine wirklichen Schlußfolgerungen gezogen werden können. Die Bedingungen, unter denen die Aufnahmemessungen durchgeführt wurden, hätten noch weiter für die Phosphataufnahme optimiert werden müssen. Ein sinnvoller Versuch wäre auch die konstitutive Expression der Gene *YBR241C* und *YGL104C*, um sicherzugehen, daß die Proteine in der Wachstumsphase, in der sich die Zellen zur Vesikelpräparation befinden, produziert werden.

Die *tps1*-Deletionsmutante des Stammes M5 zeigt keinen Defekt beim Wachstum mit Glucose als Kohlenstoffquelle. Nach der zusätzlichen Deletion des Gens *FPS1* konnten Luyten *et al.* (1995) allerdings kein Wachstum der Doppelmutante auf Glucose mehr feststellen. Die *fps1 tps1*-Doppeldeletion resultierte also im M5-Stammhintergrund in einem Wachstumsphänotyp auf Glucosemedium, wobei die *fps1*-Einfachdeletion keinen Phänotyp zeigte. Bei der zusätzlichen Deletion von *YBR241C* und *YGL104C* war im BY- und CEN.PK-Stammhintergrund ein ähnlicher Effekt zu beobachten. In diesem Fall zeigte die Dreifachmutante im Vergleich zur Einfachmutante einen wesentlich deutlicheren Wachstumsdefekt auf synthetischem Glucosemedium. Prozesse, die die intrazelluläre Glycerinproduktion erhöhen, schwächen gleichzeitig den Effekt der *tps1*-Deletion ab. Auf der anderen Seite verstärken Prozesse, die die intrazelluläre Glycerinproduktion vermindern, den Effekt. Somit könnte die Deletion von *YBR241C* und *YGL104C* eine hemmende Wirkung auf die Glycerinproduktion haben. Der Transporter Fps1 beispielsweise exportiert Glycerin. Falls Fps1 nicht vorhanden ist, wird weniger Glycerin exportiert. Deshalb ist die intrazelluläre Glycerinkonzentration höher und aufgrund des chemischen Gleichgewichts wird weniger Glycerin produziert (Luyten *et al.*, 1995). Wegen der verminderten Glycerinproduktion wird dann weniger Phosphat freigesetzt.

Demnach könnte es sich bei Ybr241 und Ygl104 um vakuoläre Glycerinimporter handeln. Durch die Deletion von *YBR241C* und *YGL104C* würde kein Transport von Glycerin in die Vakuole mehr stattfinden, was wiederum eine stärkere Akkumulation von Glycerin im Cytosol bewirken könnte. Somit würde weniger Glycerin produziert und weniger Phosphat freigesetzt. Infolgedessen müßte sich der Wachstumsdefekt der *tps1*-Mutante verstärken. Zudem konnte eine schwache, synthetisch kranke Beziehung von *YBR241C* und *YGL104C* zu *FPS1* festgestellt werden, die durch hypoosmotischen Schock verstärkt werden konnte, was auch mit der erhöhten Glycerinkonzentration im Cytosol erklärbar ist. Durch das Fehlen von Fps1 kann das bei hoher Osmolarität akkumulierte Glycerin nicht schlagartig freigesetzt werden. Deswegen sinkt bei einem hypoosmotischen Schock die Überlebensrate der Mutante. In der Dreifachmutante (*fps1 ybr241c ygl104c*) ist die Menge an Glycerin vermutlich noch größer, weshalb noch weniger Zellen die Schockbedingungen überleben.

Durch Aufnahmemessungen mit radioaktiv markiertem Glycerin konnte keine Funktion von Ybr241 und Ygl104 beim Glycerintransport nachgewiesen werden. Jedoch waren auch in diesem Fall die Messungen nicht aussagekräftig, da die erhaltenen Werte zu starke Schwankungen aufwiesen.

4.1.7.3 Mögliche Funktion von Ybr241 und Ygl104 beim Glycerintransport und vakuolärer Osmoregulation

Über die Speicherung von Glycerin in der Vakuole ist bisher in der Literatur nichts beschrieben. Da Glycerin im Cytosol als kompatibles Solut fungiert, käme es auch als kompatibles Solut der Vakuole in Betracht. Jedoch scheint der osmotische Druck der Vakuole eher über die Ionenkonzentration geregelt zu werden (Nass und Rao, 1999). Auch Trehalose könnte, wie Glycerin im Cytosol, als kompatibles Solut der Vakuole fungieren. Hounsa *et al.* (1998) demonstrierten, daß Zellen mit hoher intrazellulärer Trehalosekonzentration resistenter gegenüber schwerem osmotischem Streß sind, und die Autoren schlugen eine Funktion von Trehalose als kompatibles Solut vor. Aber eine Funktion beim Trehalosetransport von Ybr241 und Ygl104 scheint nach den Ergebnissen der Versuche mit den *tps1*-Mutanten eher unwahrscheinlich. Des weiteren zeigte eine Untersuchung (Prudent *et al.*, 2005), daß die heterologe Expression des Gens des pflanzlichen Aquaporins BobTIP1;1 den Effekt der *fps1*-Deletion in Hefe aufheben kann. Zellen, die das Aquaporin exprimierten, waren wieder resistent gegenüber hypoosmotischem Schock. Interessanterweise handelt es sich um ein Aquaporin des Tonoplasten, und auch in Hefe ist es in der vakuolären Membran lokalisiert. Ein Transport

von Glycerin durch das Aquaporin in die Vakuole wird von den Autoren postuliert. So könnte die hohe Glycerinkonzentration im Cytoplasma verringert werden. Analoges wäre auch wie oben beschrieben für die Proteine Ybr241 und Ygl104 vorstellbar, weshalb deren Deletion zu einer weiter verminderten Toleranz der Dreifachmutante (*tps1 ybr241c ygl104c*) gegenüber hypoosmotischem Schock führte.

4.1.8 Hypothetisches Modell der Funktion von Ybr241 und Ygl104

Die Gesamtheit der erhaltenen Ergebnisse weist auf eine Funktion von Ybr241 und Ygl104 beim Phosphat- oder Glycerintransport über die vakuoläre Membran hin. Gegen die anfangs angenommene Rolle von Ybr241 und Ygl104 im Trehalosestoffwechsel sprechen die Ergebnisse der Wachstumstests mit den *tps1*-Mutanten. Zumindest kann Trehalose nicht das alleinige Substrat dieser vakuolären Transporter sein. Neue Hinweise auf eine Funktion von Ygl104 beim „vacuolar protein sorting“, von der in zwei Studien (Bonangelino *et al.*, 2002; Gonzalez *et al.*, 2006) ausgegangen wird, ergaben sich in dieser Arbeit nicht.

Die Proteine Ybr241 und Ygl104 könnten anorganisches Phosphat über die vakuoläre Membran in die Vakuole transportieren (Abb. 4.2). Der Phosphattransport über die vakuoläre Membran ist ein essentieller Schritt im Phosphatmetabolismus, da die Vakuole der Ort der Speicherung von Phosphat (Okorokov *et al.*, 1980) und Polyphosphat (Urech *et al.*, 1978) ist. Bisher ist nur bekannt, daß Phosphat in die Vakuole aufgenommen wird, ein spezifischer Transporter konnte aber noch nicht identifiziert werden (Booth und Guidotti, 1997). Aus dem Phosphat wird dann vermutlich durch einen unbekanntem Synthesekomplex an der vakuolären Membran direkt Polyphosphat hergestellt (Muller *et al.*, 2003; Ogawa *et al.*, 2000). Die Speicherung von Phosphat in Form von Polyphosphat ermöglicht es den Zellen, sich an Änderungen in der Phosphatverfügbarkeit anzupassen. In Zeiträumen schlechter Phosphatverfügbarkeit mobilisieren die Zellen die intrazellulären Polyphosphatvorräte, was temporär die Konzentration an freiem Phosphat erhöht (Thomas und O'Shea, 2005). Vor allem in *ygl104c*-Mutanten war die Menge an intrazellulärem Polyphosphat stark herabgesetzt, was auf eine Beeinträchtigung des Phosphattransports in die Vakuole zurückzuführen sein könnte. Die Verfügbarkeit an freiem Phosphat hängt aber auch mit dem Glycerinstoffwechsel zusammen, da dieser wie der Trehalosemetabolismus eine Rolle bei der Regeneration von Phosphat spielt (Luyten *et al.*, 1995). Deshalb wäre auch eine Funktion beim Glycerintransport und damit sekundärer Einfluß auf die intrazelluläre Phosphatkonzentration vorstellbar. Die Proteine Ybr241 und Ygl104 könnten Glycerin in die Vakuole befördern (Abb. 4.2). Somit würde die Deletion der beiden

Transporter zu einer Erhöhung der intrazellulären Glycerinkonzentration führen, wodurch wiederum die Glycerinsynthese und die damit verbundene Phosphatfreisetzung vermindert würde. Folglich nähmen in beiden Varianten der Hypothese die vakuolären Transporter Ybr241 und Ygl104 negativen Einfluß auf die intrazelluläre Phosphatkonzentration, was sich dann in der Verstärkung des Wachstumsdefekts der *tps1*-Mutanten auf Glucosemedium äußerte. Dementsprechend ergab eine Analyse, daß der intrazelluläre Phosphatgehalt der *tps1*-Mutanten, vor allem der Dreifachmutante (*tps1 ybr241c ygl104c*), stark herabgesetzt war. Somit leiden *tps1*-Mutanten unter einem Mangel an freiem Phosphat, fehlen noch zusätzlich Ybr241 und Ygl104, ist intrazellulär noch weniger freies Phosphat vorhanden. Da das intrazelluläre Glycerinlevel in Verhältnis zur Resistenz der Zellen gegenüber osmotischem Streß (Albertyn *et al.*, 1994) und Hitzestreß (Siderius *et al.*, 2000) steht, werden auch die beobachteten Defekte der Deletionsmutanten unter den entsprechenden Bedingungen mit einer Funktion beim Glycerintransport erklärbar. Wie allerdings der Wachstumsvorteil der Deletionsmutanten der Gene *YBR241C* und *YGL104C* bei 37°C auf Trehalose- und Raffinosemedium im Vergleich zum Wildtyp in Beziehung zum Glycerin- oder Phosphatstoffwechsel steht, bleibt unklar. Nachdem die genetischen Daten deutliche Hinweise auf die Substrate geben, sollte durch Aufnahmemessungen mit isolierten vakuolären Vesikeln geklärt werden, ob tatsächlich Phosphat oder Glycerin unter den Substraten von Ybr241 und Ygl104 ist. Jedoch war es im Zeitrahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, mit Aufnahmeexperimenten eindeutige Daten zum Phosphat- und Glycerintransport zu ermitteln.

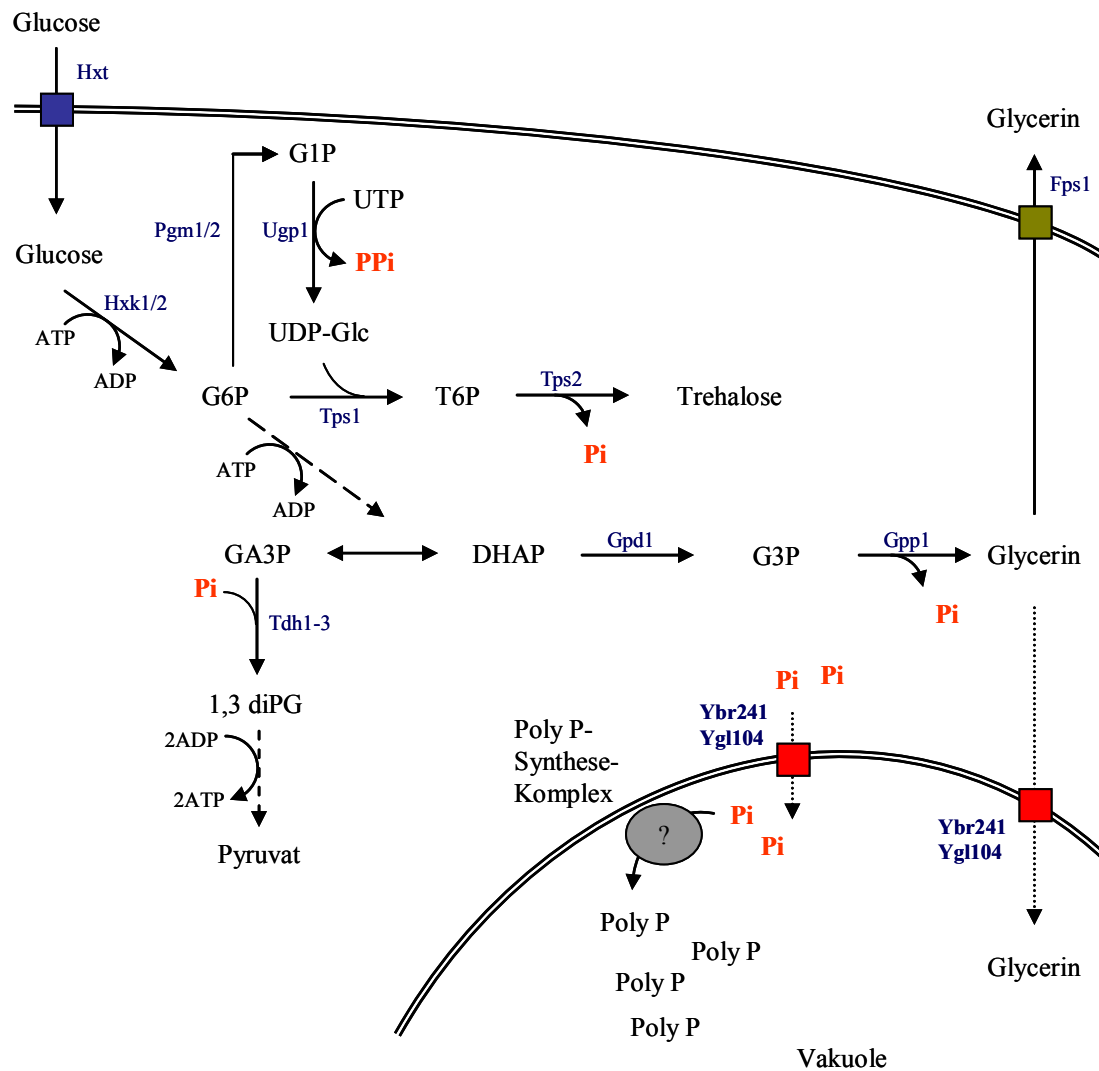


Abb. 4.2: Hypothetisches Modell der Funktion von Ybr241 und Ygl104. Die Proteine Ybr241 und Ygl104 könnten anorganisches Phosphat über die vakuoläre Membran transportieren. In der Vakuole würde dann aus Phosphat Polyphosphat durch einen unbekanntem Synthesekomplex produziert. Fehlen die beiden Proteine, gelangt weniger Phosphat in die Vakuole, und weniger Phosphat würde in Form von Polyphosphat gespeichert. Daher enthält zumindest die *ygl104c*-Mutante deutlich weniger Polyphosphat. Ist das Gen *TPS1* deletiert, fehlt den Mutanten der Weg der Phosphatregeneration über den Trehalosestoffwechsel. Daher enthalten solche Mutanten weniger freies Phosphat. Die Verfügbarkeit an freiem Phosphat hängt auch mit dem Glycerinstoffwechsel zusammen. Deshalb wäre eine Rolle von Ybr241 und Ygl104 beim Glycerintransport in die Vakuole und damit Änderung der Glycerinkonzentration im Cytosol denkbar. Das könnte wiederum die Glycerinsynthese negativ beeinflussen, wodurch weniger Phosphat freigesetzt würde. Folglich nähmen in beiden Fällen die vakuolären Transporter Ybr241 und Ygl104 Einfluß auf die intrazelluläre Phosphatkonzentration, was sich dann in der Verstärkung des Wachstumsdefekts der *tps1*-Mutanten auf Glucosemedium äußerte. Dieser Defekt ist auf den Mangel an freiem Phosphat zurückzuführen, der limitierend für den Ablauf der Glycolyse am Schritt der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (Tdh1-3) ist. (Pi = anorganisches Phosphat, PPi = Pyrophosphat, G1P = Glucose-1-phosphat, G6P = Glucose-6-phosphat, T6P = Trehalose-6-phosphat, GA3P = Glycerinaldehyd-3-phosphat, DHAP =

Dihydroxyacetonphosphat, G3P = Glycerin-3-phosphat, 1,3 diPG = 1,3-Diphosphoglycerat UTP = Uridintriphosphat, UDP-Glc = Uridindiphospho-Glucose, Pgm1/2 = Phosphoglucomutase, Ugp1 = UDP-Glucose-Pyrophosphorylase)

4.2 Entwicklung eines genomweiten Screens zur Identifizierung bisher uncharakterisierter ER-Verpackungschaperone

Im zweiten Teil dieser Dissertation sollte ein genomweiter Screen zum Auffinden bisher unbekannter ER-Verpackungschaperone etabliert werden. Ziel war es, ein Verfahren zu entwickeln, mit dessen Hilfe die Stammsammlung (EUROSCARF) nach Deletionsmutanten von Genen durchsucht werden kann, die für spezifische Verpackungschaperone des Membranproteins einer Fragestellung codieren. Die Lokalisation dieses Membranproteins in den verschiedenen Deletionsstämmen sollte mittels Wachstumstest bestimmt werden, da eine Wachstumsanalyse eine ideale Möglichkeit für ein Verfahren mit hohem Durchsatz ist. Der Vorteil gegenüber anderen Methoden, wie zum Beispiel einer fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung im großen Maßstab, liegt im Zeitfaktor. Es lassen sich schnell, ohne hohen technischen Aufwand, die positiven Klone identifizieren und so Rückschlüsse auf die verantwortlichen Proteine ziehen. Das Prinzip aller getesteten Versionen war, daß durch die Lokalisation des Membranproteins von Interesse in der Plasmamembran ein dominanter Wachstumsphänotyp bewirkt werden sollte. Zur Anwendung kamen das Allel *HTRI-23* des Transkriptionsregulators *HTRI*, hyperaktives Ras2(V19), eine konstitutiv aktive Mutante des Glycerintransporters Fps1 und das Split-Ubiquitin-System. Die entwickelten Systeme sollten jeweils mit schon bekannten Kombinationen von Membranprotein (Hxt1, Chs3, Pho84) und spezifischem Verpackungschaperon (Gsf2, Chs7, Pho86) auf Funktionalität untersucht werden.

Durch Einsatz des dominanten *HTRI-23* sollte eine dauerhafte Repression der Gene der Hexosetransporter bewirkt werden. Somit sollte es möglich werden, beispielsweise die Lokalisation des Hexosetransporters Hxt7, dessen Gen unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors stände, über Wachstumstests zu ermitteln. Nur bei Lokalisation in der Plasmamembran wäre Wachstum feststellbar, weil die Gene anderer Hexosetransporter reprimiert wären. Doch der auf *HTRI-23* basierende Ansatz des Screens scheiterte an einer nicht funktionierenden Repression der Gene der Hexosetransporter im BY-Stammhintergrund. Im Stamm MC971A allerdings wurde eine stark verminderte Transkription dieser Gene beobachtet, was zu einem sehr langsamen Wachstum auf Glucosemedium führte (Schulte *et al.*, 2000). Somit scheint der Effekt von *HTRI-23* stammabhängig zu sein.

Durch Fusion des Membranproteins von Interesse mit hyperaktivem Ras2(V19) sollte die Lokalisation des betreffenden Proteins in der Plasmamembran ermittelt werden. Da

Ras2(V19) nur bei Lokalisation an der Plasmamembran einen Einfluß auf das Wachstum der Zelle hat (Dong *et al.*, 2003), sollte dieser Wachstumsdefekt nur auftreten, wenn das Fusionsprotein in der Plasmamembran lokalisiert ist. Im CEN.PK-Stammhintergrund war aufgrund der mutierten Adenylatcyklase (Vanhalewyn *et al.*, 1999) kein Einfluß auf das Wachstum mit den Kohlenstoffquellen Galactose oder Glycerin/Ethanol feststellbar, im BY-Hintergrund war ein Effekt erkennbar. Dieser schwache Wachstumsdefekt der Zellen, die *RAS2(V19)* exprimierten, war jedoch für einen genomweiten Screen nicht ausreichend. Für einen solchen Screen mußte der Wachstumsunterschied schon sehr eindeutig ausfallen, damit später bei Anwendung des Verfahrens im großen Maßstab die Mutanten mit Translokationsdefekten leicht identifiziert werden können. Da schon Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Deletionsmutanten der Stammsammlung bestehen, würde es schwierig werden, zusätzliche, minimale Unterschiede im Wachstum zu erkennen.

Eine konstitutiv aktive Mutante des Transporters Fps1 exportiert fortwährend Glycerin (Tamas *et al.*, 1999). Dadurch werden Zellen, die diese Variante des Proteins produzieren, sensitiv gegenüber hoher Osmolarität, da die Zellen länger für die Akkumulation des kompatiblen Solut Glycerin brauchen. Auf diesem Effekt sollte eine weitere Version des Screens basieren. Ein Fusionsprotein aus hyperaktivem Fps1 und dem Membranprotein von Interesse würde bei Lokalisation in der Plasmamembran Glycerin exportieren, beim Verbleiben im ER nicht. Somit wären Deletionsmutanten der Gene, in denen kein Transport des Fusionsproteins zur Plasmamembran stattfindet, unempfindlich gegenüber hoher Osmolarität. Der Test des Systems mittels Hxt1- Δ N-Fps1 und Gsf2 funktionierte gut im Stamm EBY.VW4000, doch nicht im Stamm BY4741. Der Stamm EBY.VW4000 weist aufgrund der Deletionen der Gene der Hexosetransporter und weiterer Transporter erhebliche Unterschiede zum Wildtyp auf. Auch das Gen des Glycerintransporters Stl1 ist deletiert. Diese Deletion könnte den Effekt des hyperaktiven Δ N-Fps1 verstärkt haben. Es wäre vorstellbar, daß Stl1 im Stamm BY4741 übermäßig exportiertes Glycerin direkt wieder importiert. Somit würde ein Gleichgewicht zwischen Import und Export bestehen, das den Effekt neutralisiert. Dafür spricht auch, daß Stl1 bei osmotischem Schock stark induziert wird (Ferreira *et al.*, 2005), was auf den verwendeten Hochsalzmedien der Fall wäre. Jedoch konnten Tamas *et al.* (2003; 1999) zeigen, daß Zellen, die Δ N-Fps1 produzierten, auf Hochsalzmedien einen deutlichen Wachstumsdefekt aufwiesen. Allerdings wurde der Stamm W303 verwendet und nicht der Stamm BY4741. Vielleicht war die Aktivität von Δ N-Fps1 aber auch durch die Fusion mit Hxt1 stark herabgesetzt,

und nur aus diesem Grund konnte es zur Neutralisierung des Phänotyps durch Stl1 kommen. Da die Stammsammlung im BY-Stammhintergrund konstruiert wurde, konnte diese Variante des Screens nicht zur Anwendung kommen. Interessanterweise konnte in einem auf dem EBY.VW4000 basierenden Stamm, der die Deletion des Gens des Verpackungschaperons Gsf2 aufwies, durch Wachstumsanalyse auf Hochsalzmedium und auf Glucosemedium gezeigt werden, daß das Fusionsprotein nicht die Plasmamembran erreichte. Somit war Gsf2 nötig, damit das Fusionsprotein zur Plasmamembran befördert wird. Wahrscheinlich bewirkte Gsf2 die Verpackung des Fusionsproteins in COPII-Vesikel. Diese Beobachtung deutete andererseits an, daß entweder für Fps1 kein Verpackungschaperon existiert oder es nicht ausreichend für die Verpackung des Fusionsproteins in COPII-Vesikel war.

Verschiedene Versionen des Screens, die auf einer Verwendung des Split-Ubiquitin-Systems (Johnsson und Varshavsky, 1994) basierten, wurden getestet. Da im Endeffekt keine zufriedenstellend funktioniert hatte, wird hier nur die am weitesten optimierte Variante, der „Packaging Chaperone Screening Assay“ (PCSA), diskutiert. *CPLV* wurde mit *HXT1* fusioniert, diese Fusion wurde genomisch integriert und stand unter Kontrolle des über die Glucosekonzentration regulierbaren *HXT2*-Promotors. Das Genprodukt, die Hxt1-CPLV-Fusion, sollte an der Plasmamembran lokalisiert sein. Außerdem wurde der *lexA*-kontrollierte Promotor samt Reportergen *URA3* genomisch integriert. Des weiteren sollte noch für den Einsatz im großen Maßstab das durch den *MFA1*-Promotor regulierte *HIS3*-Gen genomisch integriert werden, was für die Selektion auf haploide Zellen erforderlich war. Auf Plasmiden würden dann die N_{ub}^{wt} -Fusionen der Membranproteine X der Fragestellung in den Ausgangsstamm gebracht werden. Im nächsten Schritt sollte dieser Ausgangsstamm mit jedem einzelnen Stamm der Stammsammlung gekreuzt werden. Anschließend würde über das Verfahren des SGA wieder auf Haploide selektiert. Falls die Translokation des Proteins X in bestimmten Deletionsmutanten beeinflusst wäre, würde die N_{ub}^{wt} -X-Fusion im ER akkumulieren. Hxt1-CPLV hingegen würde weiterhin zur Plasmamembran transportiert. Demzufolge könnte aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation der Fusionen keine Assoziation von N_{ub} und C_{ub} stattfinden, und es käme nicht mehr zur Induktion des Reportergens. Die Analyse des Wachstums auf Selektivmedien ohne Uracil oder mit FOA sollte die entsprechenden Mutanten identifizieren. Eine vereinfachte Version dieses System wurde im kleinen Maßstab für folgende Kombinationen getestet: Phosphattransporter Pho84 und Verpackungschaperon Pho86, Chitin-Synthase Chs3 und Verpackungschaperon Chs7, Komponenten des

Eisentransportsystems Ftr1 und Fet3. Doch nur bei der Kombination Chs3/Chs7 war ein merklicher Wachstumsunterschied zwischen Deletionsmutante des Verpackungschaperons und Wildtyp feststellbar. Somit funktionierte in diesem Fall das Grundprinzip des Systems, aber die Wachstumsdifferenz reichte für einen Screen im großen Maßstab bei weitem nicht aus. Die Ursache für den geringen Wachstumsunterschied schien in einer vorzeitigen Assoziation von N_{ub} und C_{ub} zu liegen, während sich die Fusionen in der ER-Membran befanden. Möglicherweise kamen N_{ub} und C_{ub} aufgrund einer zu hohen lokalen Konzentration der Fusionen im ER in räumliche Nähe, N_{ub} und C_{ub} assoziierten, infolgedessen wurde PLV abgespalten und konnte das Reportergen aktivieren. Deshalb fand die Induktion des Reportergens auch statt, wenn die N_{ub} wt-X-Fusion im ER akkumulierte. Da eine schwache, unspezifische Assoziation erwartet worden war, wurden die Gene der N_{ub} - und C_{ub} -Fusionen unter Kontrolle von regulierbaren Promotoren gebracht. Aber auch durch starkes Herunterregulieren der Proteinmenge ließ sich die lokale Konzentration der Fusionen im ER nicht so begrenzen, daß keine Assoziation von N_{ub} und C_{ub} mehr möglich war. Ein weiterer Faktor könnte sein, daß wahrscheinlich wenige Moleküle Ura3 ausreichten, um die Zellen Uracil-prototroph zu machen. So führte die Deletion des Gens des Verpackungschaperons in den entsprechenden Mutanten zwar möglicherweise zu einer stark verminderten Induktion des Reportergens, da aber eine geringe Menge Ura3 ausreichte, wurde trotzdem Wachstum auf Selektivmedium beobachtet. Aufgrund der Ergebnisse der Tests wäre bei Anwendung des PCSA mit einer hohen Rate an falsch negativen Ergebnissen zu rechnen, weshalb auch diese Variante des Screens nicht zum Einsatz kommen konnte.

5 Zusammenfassung

Die Zuckertransporterfamilie ist eine Unterfamilie der MFS („major facilitator superfamily“), wobei die MFS wiederum als Überfamilie von Transportproteinen definiert wurde, die sich aus Proteinen mit 12 Transmembran-Domänen zusammensetzt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die subzelluläre Lokalisation und physiologische Funktion der uncharakterisierten Mitglieder der Zuckertransporterfamilie Ybr241 und Ygl104 untersucht werden. Mittels Zellfraktionierung durch Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation und Fluoreszenzmikroskopie konnte eine Lokalisation von Ybr241 und Ygl104 in der vakuolären Membran festgestellt werden. Da Plasmamembran-Proteine zur Degradation ubiquitiniert, über Endocytose internalisiert und in der Vakuole abgebaut werden, wurden weitere Lokalisationsstudien sowohl in Endocytose-Mutanten als auch in einer Mutante mit Defekten in der Ubiquitinierung durchgeführt. Diese ergaben, daß die vakuoläre Lokalisation nicht auf Degradation zurückzuführen war. Somit handelt es sich bei Ybr241 und Ygl104 um residente vakuoläre Membranproteine. Lokalisationsstudien in *vps*-Mutanten erbrachten Hinweise darauf, daß zumindest Ygl104, wie die meisten vakuolären Proteine, über den CPY-Weg zur Vakuole befördert wird.

Weder durch Wachstumsanalysen noch mit Hilfe von Phenotype MicroArrays™ (Biolog, Inc.) konnten Phänotypen der Deletionsmutanten von Ybr241 und Ygl104 identifiziert werden. Allerdings zeigte sich im Verlauf der Arbeit, daß die Deletionsmutanten einen Vorteil beim Wachstum mit geringen Glucosekonzentrationen bei 37°C haben. Des Weiteren bestanden aufgrund von Datenbankanalysen Anhaltspunkte auf eine Beteiligung am Trehalosestoffwechsel. Durch Hitzeschockexperimente konnte eine essentielle Rolle von Ybr241 und Ygl104 bei der Resistenz von Zellen gegenüber schwerem Hitzestress identifiziert werden. Die verminderte Thermotoleranz der Deletionsmutanten war aber nicht auf einen geringeren Gehalt der Zellen am Stressschutzmolekül Trehalose zurückzuführen. Zudem deckte ein SGA („synthetic genetic array“) eine synthetisch kranke Interaktion von *YBR241C* und *YGL104C* mit dem Gen der Trehalose-6-Phosphat-Synthase *TPS1* auf. Diese Interaktion sprach gegen eine Beteiligung der Genprodukte am Trehalosestransport, da *tps1*-Mutanten keine Trehalose enthalten. *tps1*-Mutanten haben einen Wachstumsdefekt mit schnell fermentierbaren Kohlenstoffquellen, der höchstwahrscheinlich auf einen Mangel an freiem Phosphat zurückzuführen ist. Somit scheinen die Proteine Ybr241 und Ygl104 die intrazelluläre Phosphatkonzentration zu beeinflussen. Eine Analyse ergab, daß der Phosphat- und Polyphosphatgehalt der Mutanten teilweise stark herabgesetzt war. Der Einfluß könnte

direkt durch Phosphatimport in die Vakuole stattfinden oder sekundär über eine Verminderung der Glycerinproduktion, da durch die Synthese von Glycerin wieder Phosphat freigesetzt wird. Somit handelt es sich bei Ybr241 und Ygl104 möglicherweise um vakuoläre Phosphat- oder Glycerintransporter.

Ferner konnte gezeigt werden, daß die saure Trehalase Ath1 sekretiert wird und Trehalose extrazellulär in Glucose hydrolysiert. Die Glucosemoleküle werden dann von der Hefezelle aufgenommen und verstoffwechselt. Somit spielt Ath1 eine essentielle Rolle beim Wachstum der Hefe mit Trehalose als Kohlenstoffquelle.

Ziel des zweiten Teils dieser Doktorarbeit war die Entwicklung eines genomweiten Screens nach ER-Verpackungschaperonen, durch den bisher unbekannte Verpackungschaperone identifiziert werden sollten. Durch Testen verschiedener Varianten des Screens konnte ein Verfahren entwickelt werden, das prinzipiell funktionierte. Für den Einsatz im genomweiten Maßstab war es jedoch ungeeignet, da mit einer hohen Rate an falsch negativen Ergebnissen zu rechnen gewesen wäre.

6 Literatur

- Achstetter, T. and Wolf, D.H. (1985) Proteinases, proteolysis and biological control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **1**, 139-157.
- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J.M. and Prior, B.A. (1994) *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol*, **14**, 4135-4144.
- Aluri, S. and Buttner, M. (2007) Identification and functional expression of the *Arabidopsis thaliana* vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 2537-2542.
- Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L. and Schekman, R. (2001) Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol*, **3**, 531-537.
- App, H. and Holzer, H. (1989) Purification and characterization of neutral trehalase from the yeast ABYS1 mutant. *J Biol Chem*, **264**, 17583-17588.
- Appling, D.R. (1999) Genetic approaches to the study of protein-protein interactions. *Methods*, **19**, 338-349.
- Aronheim, A., Engelberg, D., Li, N., al-Alawi, N., Schlessinger, J. and Karin, M. (1994) Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell*, **78**, 949-961.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E. and Moore, D.P. (1994-1997) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M. and Schekman, R. (1994) COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, **77**, 895-907.
- Barlowe, C. and Schekman, R. (1993) *SEC12* encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature*, **365**, 347-349.
- Barnett, J.A. (1976) The utilization of sugars by yeasts. *Adv Carbohydr Chem Biochem*, **32**, 125-234.
- Basu, A., Bhattacharyya, S., Chaudhuri, P., Sengupta, S. and Ghosh, A.K. (2006) Extracellular trehalose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1760**, 134-140.
- Bell, W., Klaassen, P., Ohnacker, M., Boller, T., Herweijer, M., Schoppink, P., Van der Zee, P. and Wiemken, A. (1992) Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of *CIF1*, a regulator of carbon catabolite inactivation. *Eur J Biochem*, **209**, 951-959.
- Bell, W., Sun, W., Hohmann, S., Wera, S., Reinders, A., De Virgilio, C., Wiemken, A. and Thevelein, J.M. (1998) Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J Biol Chem*, **273**, 33311-33319.
- Benaroudj, N., Lee, D.H. and Goldberg, A.L. (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J Biol Chem*, **276**, 24261-24267.
- Bi, X., Corpina, R.A. and Goldberg, J. (2002) Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature*, **419**, 271-277.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Blazquez, M.A., Lagunas, R., Gancedo, C. and Gancedo, J.M. (1993) Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett*, **329**, 51-54.
- Bochner, B.R., Gadzinski, P. and Panomitros, E. (2001) Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res*, **11**, 1246-1255.
- Boeke, J.D., LaCrute, F. and Fink, G.R. (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet*, **197**, 345-346.
- Boles, E., de Jong-Gubbels, P. and Pronk, J.T. (1998) Identification and characterization of *MAE1*, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme. *J Bacteriol*, **180**, 2875-2882.
- Boles, E. and Hollenberg, C.P. (1997) The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev*, **21**, 85-111.
- Bonangelino, C.J., Chavez, E.M. and Bonifacino, J.S. (2002) Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **13**, 2486-2501.
- Booth, J.W. and Guidotti, G. (1997) Phosphate transport in yeast vacuoles. *J Biol Chem*, **272**, 20408-20413.
- Bowers, K. and Stevens, T.H. (2005) Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1744**, 438-454.

- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. and Boeke, J.D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, **14**, 115-132.
- Bryant, N.J. and Stevens, T.H. (1998) Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 230-247.
- Bun-Ya, M., Nishimura, M., Harashima, S. and Oshima, Y. (1991) The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol Cell Biol*, **11**, 3229-3238.
- Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, **112**, 195-203.
- Buziol, S., Becker, J., Baumeister, A., Jung, S., Mauch, K., Reuss, M. and Boles, E. (2002) Determination of in vivo kinetics of the starvation-induced Hxt5 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, **2**, 283-291.
- Cabib, E. and Leloir, L.F. (1958) The biosynthesis of trehalose phosphate. *J Biol Chem*, **231**, 259-275.
- Chow, T.H., Sollitt, P. and Marmur, J. (1989) Structure of the multigene family of MAL loci in *Saccharomyces*. *Mol Gen Genet*, **217**, 60-69.
- Conibear, E. and Stevens, T.H. (1995) Vacuolar biogenesis in yeast: sorting out the sorting proteins. *Cell*, **83**, 513-516.
- Cosson, P. and Letourneur, F. (1994) Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science*, **263**, 1629-1631.
- Coury, L.A., Hiller, M., Mathai, J.C., Jones, E.W., Zeidel, M.L. and Brodsky, J.L. (1999) Water transport across yeast vacuolar and plasma membrane-targeted secretory vesicles occurs by passive diffusion. *J Bacteriol*, **181**, 4437-4440.
- Cowles, C.R., Odorizzi, G., Payne, G.S. and Emr, S.D. (1997a) The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell*, **91**, 109-118.
- Cowles, C.R., Snyder, W.B., Burd, C.G. and Emr, S.D. (1997b) Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component. *Embo J*, **16**, 2769-2782.
- Cunningham, K.W. and Fink, G.R. (1994) Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking *PMCl*, a homolog of plasma membrane Ca²⁺ ATPases. *J Cell Biol*, **124**, 351-363.
- Cyert, M.S. and Thorner, J. (1992) Regulatory subunit (*CNBl* gene product) of yeast Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to pheromone. *Mol Cell Biol*, **12**, 3460-3469.
- Darsow, T., Burd, C.G. and Emr, S.D. (1998) Acidic di-leucine motif essential for AP-3-dependent sorting and restriction of the functional specificity of the Vam3p vacuolar t-SNARE. *J Cell Biol*, **142**, 913-922.
- Day, R.E., Higgins, V.J., Rogers, P.J. and Dawes, I.W. (2002) Characterization of the putative maltose transporters encoded by *YDL247w* and *YJR160c*. *Yeast*, **19**, 1015-1027.
- De Virgilio, C., Burckert, N., Bell, W., Jenö, P., Boller, T. and Wiemken, A. (1993) Disruption of *TPS2*, the gene encoding the 100-kDa subunit of the trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, causes accumulation of trehalose-6-phosphate and loss of trehalose-6-phosphate phosphatase activity. *Eur J Biochem*, **212**, 315-323.
- De Virgilio, C., Hottiger, T., Dominguez, J., Boller, T. and Wiemken, A. (1994) The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur J Biochem*, **219**, 179-186.
- De Virgilio, C., Piper, P., Boller, T. and Wiemken, A. (1991) Acquisition of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* without heat shock protein hsp 104 and in the absence of protein synthesis. *FEBS Lett*, **288**, 86-90.
- Deloche, O., Yeung, B.G., Payne, G.S. and Schekman, R. (2001) Vps10p transport from the trans-Golgi network to the endosome is mediated by clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell*, **12**, 475-485.
- Destruelle, M., Holzer, H. and Klionsky, D.J. (1995) Isolation and characterization of a novel yeast gene, *ATH1*, that is required for vacuolar acid trehalase activity. *Yeast*, **11**, 1015-1025.
- Dong, X., Mitchell, D.A., Lobo, S., Zhao, L., Bartels, D.J. and Deschenes, R.J. (2003) Palmitoylation and plasma membrane localization of Ras2p by a nonclassical trafficking pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **23**, 6574-6584.
- Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*, **16**, 6127-6145.
- Dunn, R. and Hicke, L. (2001a) Domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase required for receptor-mediated and fluid-phase endocytosis. *Mol Biol Cell*, **12**, 421-435.
- Dunn, R. and Hicke, L. (2001b) Multiple roles for Rsp5p-dependent ubiquitination at the internalization step of endocytosis. *J Biol Chem*, **276**, 25974-25981.

- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I. and Carroll, D. (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, **13**, 17R-27R.
- Eleutherio, E.C., Araujo, P.S. and Panek, A.D. (1993) Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1156**, 263-266.
- Eleutherio, E.C., Ribeiro, M.J., Pereira, M.D., Maia, F.M. and Panek, A.D. (1995) Effect of trehalose during stress in a heat-shock resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Mol Biol Int*, **36**, 1217-1223.
- Endler, A., Meyer, S., Schelbert, S., Schneider, T., Weschke, W., Peters, S.W., Keller, F., Baginsky, S., Martinoia, E. and Schmidt, U.G. (2006) Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach. *Plant Physiol*, **141**, 196-207.
- Esnault, Y., Blondel, M.O., Deshaies, R.J., Scheckman, R. and Kepes, F. (1993) The yeast *SSSI* gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of the endoplasmic reticulum. *Embo J*, **12**, 4083-4093.
- Esnault, Y., Feldheim, D., Blondel, M.O., Schekman, R. and Kepes, F. (1994) *SSSI* encodes a stabilizing component of the Sec61 subcomplex of the yeast protein translocation apparatus. *J Biol Chem*, **269**, 27478-27485.
- Espenshade, P., Gimeno, R.E., Holzmacher, E., Teung, P. and Kaiser, C.A. (1995) Yeast *SEC16* gene encodes a multidomain vesicle coat protein that interacts with Sec23p. *J Cell Biol*, **131**, 311-324.
- Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M.C., Lucas, C. and Brandt, A. (2005) A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **16**, 2068-2076.
- Flick, K.M., Spielewoy, N., Kalashnikova, T.I., Guaderrama, M., Zhu, Q., Chang, H.C. and Wittenberg, C. (2003) Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from *HXT* gene promoters. *Mol Biol Cell*, **14**, 3230-3241.
- Freimoser, F.M., Hurlimann, H.C., Jakob, C.A., Werner, T.P. and Amrhein, N. (2006) Systematic screening of polyphosphate (poly P) levels in yeast mutant cells reveals strong interdependence with primary metabolism. *Genome Biol*, **7**, R109.
- Fusco, C., Guidotti, E. and Zervos, A.S. (1999) In vivo construction of cDNA libraries for use in the yeast two-hybrid system. *Yeast*, **15**, 715-720.
- Galitski, T., Saldanha, A.J., Styles, C.A., Lander, E.S. and Fink, G.R. (1999) Ploidy regulation of gene expression. *Science*, **285**, 251-254.
- Gancedo, C. and Flores, C.L. (2004) The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res*, **4**, 351-359.
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M. and Herrero, E. (1997) A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **13**, 837-848.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D. and Brown, P.O. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*, **11**, 4241-4257.
- Gelperin, D.M., White, M.A., Wilkinson, M.L., Kon, Y., Kung, L.A., Wise, K.J., Lopez-Hoyo, N., Jiang, L., Piccirillo, S., Yu, H., Gerstein, M., Dumont, M.E., Phizicky, E.M., Snyder, M. and Grayhack, E.J. (2005) Biochemical and genetic analysis of the yeast proteome with a movable ORF collection. *Genes Dev*, **19**, 2816-2826.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E.K. and Weissman, J.S. (2003) Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, **425**, 737-741.
- Gietz, R.D. and Sugino, A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**, 527-534.
- Gilstring, C.F., Melin-Larsson, M. and Ljungdahl, P.O. (1999) Shr3p mediates specific COPII coatomer-cargo interactions required for the packaging of amino acid permeases into ER-derived transport vesicles. *Mol Biol Cell*, **10**, 3549-3565.
- Gimeno, R.E., Espenshade, P. and Kaiser, C.A. (1995) *SED4* encodes a yeast endoplasmic reticulum protein that binds Sec16p and participates in vesicle formation. *J Cell Biol*, **131**, 325-338.
- Gimeno, R.E., Espenshade, P. and Kaiser, C.A. (1996) COPII coat subunit interactions: Sec24p and Sec23p bind to adjacent regions of Sec16p. *Mol Biol Cell*, **7**, 1815-1823.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 546, 563-547.
- Goldberg, J. (1998) Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell*, **95**, 237-248.
- Goldstein, A.L. and McCusker, J.H. (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**, 1541-1553.

- Gonzalez, A., Ruiz, A., Serrano, R., Arino, J. and Casamayor, A. (2006) Transcriptional profiling of the protein phosphatase 2C family in yeast provides insights into the unique functional roles of Ptc1. *J Biol Chem*, **281**, 35057-35069.
- Griffiths, G. and Simons, K. (1986) The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science*, **234**, 438-443.
- Guedener, U., Heinisch, J., Koehler, G.J., Voss, D. and Hegemann, J.H. (2002) A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, **30**, e23.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinbauer, J. and Hegemann, J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2519-2524.
- Hamacher, T. (2004) Molekulargenetische und physiologische Charakterisierung des intrazellulären Transportes von Hexosetransportern in *gsf2*-Mutanten der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Han, E.K., Cotty, F., Sottas, C., Jiang, H. and Michels, C.A. (1995) Characterization of *AGT1* encoding a general alpha-glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Mol Microbiol*, **17**, 1093-1107.
- Harold, F.M. (1966) Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism, and function. *Bacteriol Rev*, **30**, 772-794.
- Haugen, A.C., Kelley, R., Collins, J.B., Tucker, C.J., Deng, C., Afshari, C.A., Brown, J.M., Ideker, T. and Van Houten, B. (2004) Integrating phenotypic and expression profiles to map arsenic-response networks. *Genome Biol*, **5**, R95.
- Herrmann, J.M., Malkus, P. and Schekman, R. (1999) Out of the ER--outfitters, escorts and guides. *Trends Cell Biol*, **9**, 5-7.
- Hicke, L. (1997) Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins. *Faseb J*, **11**, 1215-1226.
- Hicke, L. and Dunn, R. (2003) Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **19**, 141-172.
- Hippe, A. (2003) Molekulargenetische Charakterisierung der Rolle von *Gsf2* bei dem intrazellulären Transport von Hexosetransportern in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Hohmann, S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev*, **66**, 300-372.
- Hottiger, T., Boller, T. and Wiemken, A. (1987) Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Lett*, **220**, 113-115.
- Hottiger, T., De Virgilio, C., Hall, M.N., Boller, T. and Wiemken, A. (1994) The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. II. Physiological concentrations of trehalose increase the thermal stability of proteins in vitro. *Eur J Biochem*, **219**, 187-193.
- Hounsa, C.G., Brandt, E.V., Thevelein, J., Hohmann, S. and Prior, B.A. (1998) Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*, **144** (Pt 3), 671-680.
- Howard, S.C., Budovskaya, Y.V., Chang, Y.W. and Herman, P.K. (2002) The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II is required for stationary phase entry and functionally interacts with the Ras/PKA signaling pathway. *J Biol Chem*, **277**, 19488-19497.
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S. and O'Shea, E.K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, **425**, 686-691.
- Huibregtse, J.M., Yang, J.C. and Beaudenon, S.L. (1997) The large subunit of RNA polymerase II is a substrate of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3656-3661.
- Hutchins, M.U. and Klionsky, D.J. (2001) Vacuolar localization of oligomeric alpha-mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **276**, 20491-20498.
- Inuma, T., Shiga, A., Nakamoto, K., O'Brien M, B., Aridor, M., Arimitsu, N., Tagaya, M. and Tani, K. (2007) Mammalian Sec16/p250 plays a role in membrane traffic from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*.
- Jackson, M.R., Nilsson, T. and Peterson, P.A. (1990) Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Embo J*, **9**, 3153-3162.
- Jensen, L.T., Ajua-Alemanji, M. and Culotta, V.C. (2003) The *Saccharomyces cerevisiae* high affinity phosphate transporter encoded by *PHO84* also functions in manganese homeostasis. *J Biol Chem*, **278**, 42036-42040.
- Johnsson, N. and Varshavsky, A. (1994) Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 10340-10344.
- Johnston, M., Hillier, L., Riles, L., Albermann, K., Andre, B., Ansoerge, W., Benes, V., Bruckner, M., Delius, H., Dubois, E., Dusterhoft, A., Entian, K.D., Floeth, M., Goffeau, A., Hebling, U., Heumann, K., Heuss-Neitzel, D., Hilbert, H., Hilger, F., Kleine, K., Kotter, P., Louis, E.J., Messenguy, F., Mewes,

- H.W., Hoheisel, J.D. and et al. (1997) The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome XII. *Nature*, **387**, 87-90.
- Jules, M., Guillou, V., Francois, J. and Parrou, J.L. (2004) Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 2771-2778.
- Kakinuma, Y., Masuda, N. and Igarashi, K. (1992) Proton potential-dependent polyamine transport by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, **1107**, 126-130.
- Kandror, O., Bretschneider, N., Kreydin, E., Cavalieri, D. and Goldberg, A.L. (2004) Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol Cell*, **13**, 771-781.
- Keller, F., Schellenberg, M. and Wiemken, A. (1982) Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch Microbiol*, **131**, 298-301.
- Kirby, K.S. (1957) A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids; evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. *Biochem J*, **66**, 495-504.
- Kitamoto, K., Yoshizawa, K., Ohsumi, Y. and Anraku, Y. (1988) Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **170**, 2683-2686.
- Klionsky, D.J., Cueva, R. and Yaver, D.S. (1992) Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J Cell Biol*, **119**, 287-299.
- Klionsky, D.J., Herman, P.K. and Emr, S.D. (1990) The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol Rev*, **54**, 266-292.
- Klopotoski, T. and Wiater, A. (1965) Synergism of aminotriazole and phosphate on the inhibition of yeast imidazole glycerol phosphate dehydratase. *Arch Biochem Biophys*, **112**, 562-566.
- Kolling, R. and Hollenberg, C.P. (1994) The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *Embo J*, **13**, 3261-3271.
- Kontoyiannis, D.P. (1999) Genetic analysis of azole resistance by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**, 2731-2735.
- Kopp, M., Muller, H. and Holzer, H. (1993) Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **268**, 4766-4774.
- Kota, J., Gilstring, C.F. and Ljungdahl, P.O. (2007) Membrane chaperone Shr3 assists in folding amino acid permeases preventing precocious ERAD. *J Cell Biol*, **176**, 617-628.
- Kota, J. and Ljungdahl, P.O. (2005) Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. *J Cell Biol*, **168**, 79-88.
- Kotyk, A. and Michaljanicova, D. (1979) Uptake of trehalose by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*, **110**, 323-332.
- Krampe, S. (2001) Molekularbiologische und physiologische Untersuchungen zum Hexosetransport unter Hungerbedingungen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Krampe, S. and Boles, E. (2002) Starvation-induced degradation of yeast hexose transporter Hxt7p is dependent on endocytosis, autophagy and the terminal sequences of the permease. *FEBS Lett*, **513**, 193-196.
- Kruckeberg, A.L. (1996) The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*, **166**, 283-292.
- Kuan, J. and Saier, M.H., Jr. (1993) The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional, and evolutionary relationships. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **28**, 209-233.
- Kuehn, M.J., Schekman, R. and Ljungdahl, P.O. (1996) Amino acid permeases require COPII components and the ER resident membrane protein Shr3p for packaging into transport vesicles in vitro. *J Cell Biol*, **135**, 585-595.
- Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J.A., Matson, S., Heidtman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y., Cheung, K.H., Miller, P., Gerstein, M., Roeder, G.S. and Snyder, M. (2002) Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev*, **16**, 707-719.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lagunas, R. (1993) Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, **10**, 229-242.
- Latterich, M. and Watson, M.D. (1993) Evidence for a dual osmoregulatory mechanism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, **191**, 1111-1117.
- Lau, W.T., Howson, R.W., Malkus, P., Schekman, R. and O'Shea, E.K. (2000) Pho86p, an endoplasmic reticulum (ER) resident protein in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for ER exit of the high-affinity phosphate transporter Pho84p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1107-1112.
- Lederkremer, G.Z., Cheng, Y., Petre, B.M., Vogan, E., Springer, S., Schekman, R., Walz, T. and Kirchhausen, T. (2001) Structure of the Sec23p/24p and Sec13p/31p complexes of COPII. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10704-10709.
- Lemmon, S.K. and Traub, L.M. (2000) Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr Opin Cell Biol*, **12**, 457-466.

- Lewis, J.G., Learmonth, R.P. and Watson, K. (1995) Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, **141** (Pt 3), 687-694.
- Li, L., Chen, O.S., McVey Ward, D. and Kaplan, J. (2001) CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J Biol Chem*, **276**, 29515-29519.
- Li, Z.S., Szczycka, M., Lu, Y.P., Thiele, D.J. and Rea, P.A. (1996) The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J Biol Chem*, **271**, 6509-6517.
- Lian, J.P. and Ferro-Novick, S. (1993) Bos1p, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum to Golgi transport vesicles, is required for their fusion competence. *Cell*, **73**, 735-745.
- Lillie, S.H. and Pringle, J.R. (1980) Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J Bacteriol*, **143**, 1384-1394.
- Ljungdahl, P.O., Gimeno, C.J., Styles, C.A. and Fink, G.R. (1992) *SHR3*: a novel component of the secretory pathway specifically required for localization of amino acid permeases in yeast. *Cell*, **71**, 463-478.
- Londesborough, J. and Varimo, K. (1984) Characterization of two trehalases in baker's yeast. *Biochem J*, **219**, 511-518.
- Losev, E., Reinke, C.A., Jellen, J., Strongin, D.E., Bevis, B.J. and Glick, B.S. (2006) Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature*, **441**, 1002-1006.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**, 265-275.
- Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W.F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M. and Hohmann, S. (1995) Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *Embo J*, **14**, 1360-1371.
- MacDiarmid, C.W., Gaither, L.A. and Eide, D. (2000) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **19**, 2845-2855.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Marcusson, E.G., Horazdovsky, B.F., Cereghino, J.L., Gharakhanian, E. and Emr, S.D. (1994) The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the *VPS10* gene. *Cell*, **77**, 579-586.
- Marger, M.D. and Saier, M.H., Jr. (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci*, **18**, 13-20.
- Matsuoka, K., Schekman, R., Orci, L. and Heuser, J.E. (2001) Surface structure of the COPII-coated vesicle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 13705-13709.
- Matsuura-Tokita, K., Takeuchi, M., Ichihara, A., Mikuriya, K. and Nakano, A. (2006) Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature*, **441**, 1007-1010.
- Maurel, C. and Chrispeels, M.J. (2001) Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol*, **125**, 135-138.
- Miller, E.A., Beilharz, T.H., Malkus, P.N., Lee, M.C., Hamamoto, S., Orci, L. and Schekman, R. (2003) Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell*, **114**, 497-509.
- Mittenbuhler, K. and Holzer, H. (1988) Purification and characterization of acid trehalase from the yeast *suc2* mutant. *J Biol Chem*, **263**, 8537-8543.
- Morano, K.A., Liu, P.C. and Thiele, D.J. (1998) Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol*, **1**, 197-203.
- Moriya, H. and Johnston, M. (2004) Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 1572-1577.
- Mosley, A.L., Lakshmanan, J., Aryal, B.K. and Ozcan, S. (2003) Glucose-mediated phosphorylation converts the transcription factor Rgt1 from a repressor to an activator. *J Biol Chem*, **278**, 10322-10327.
- Mossessova, E., Bickford, L.C. and Goldberg, J. (2003) SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell*, **114**, 483-495.
- Muller, O., Neumann, H., Bayer, M.J. and Mayer, A. (2003) Role of the Vtc proteins in V-ATPase stability and membrane trafficking. *J Cell Sci*, **116**, 1107-1115.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-273.
- Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M. (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5767-5768.
- Nakano, A., Brada, D. and Schekman, R. (1988) A membrane glycoprotein, Sec12p, required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in yeast. *J Cell Biol*, **107**, 851-863.
- Nass, R. and Rao, R. (1999) The yeast endosomal Na⁺/H⁺ exchanger, Nhx1, confers osmotolerance following acute hypertonic shock. *Microbiology*, **145** (Pt 11), 3221-3228.

- Navon, G., Shulman, R.G., Yamane, T., Eccleshall, T.R., Lam, K.B., Baronofsky, J.J. and Marmor, J. (1979) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of wild-type and glycolytic pathway mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, **18**, 4487-4499.
- Nelissen, B., De Wachter, R. and Goffeau, A. (1997) Classification of all putative permeases and other membrane plurispansers of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, **21**, 113-134.
- Neves, M.J., Hohmann, S., Bell, W., Dumortier, F., Luyten, K., Ramos, J., Cobbaert, P., de Koning, W., Kaneva, Z. and Thevelein, J.M. (1995) Control of glucose influx into glycolysis and pleiotropic effects studied in different isogenic sets of *Saccharomyces cerevisiae* mutants in trehalose biosynthesis. *Curr Genet*, **27**, 110-122.
- Ng, D.T., Brown, J.D. and Walter, P. (1996) Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*, **134**, 269-278.
- Nikawa, J., Tsukagoshi, Y. and Yamashita, S. (1991) Isolation and characterization of two distinct myo-inositol transporter genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **266**, 11184-11191.
- Nikko, E. and Andre, B. (2007) Evidence for a Direct Role of the Doa4 Deubiquitinating Enzyme in Protein Sorting into the MVB Pathway. *Traffic*, **8**, 566-581.
- Nilsson, T., Jackson, M. and Peterson, P.A. (1989) Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **58**, 707-718.
- Nothwehr, S.F., Conibear, E. and Stevens, T.H. (1995) Golgi and vacuolar membrane proteins reach the vacuole in *vps1* mutant yeast cells via the plasma membrane. *J Cell Biol*, **129**, 35-46.
- Nwaka, S. and Holzer, H. (1998) Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **58**, 197-237.
- Nwaka, S., Kopp, M. and Holzer, H. (1995a) Expression and function of the trehalase genes *NTH1* and *YBR0106* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **270**, 10193-10198.
- Nwaka, S., Mechler, B., Destruelle, M. and Holzer, H. (1995b) Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **360**, 286-290.
- Nwaka, S., Mechler, B. and Holzer, H. (1996) Deletion of the *ATH1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. *FEBS Lett*, **386**, 235-238.
- Nyman, T., Kota, J. and Ljungdahl, P.O. (2004) Ancillary proteins in membrane targeting of transporters. In Boles, E., Krämer, R. (ed.), *Molecular Mechanisms Controlling Transmembrane Transport*. Springer Verlag, Heidelberg, Vol. 9, pp. 207-234.
- Obrdlik, P., El-Bakkoury, M., Hamacher, T., Cappellaro, C., Vilarino, C., Fleischer, C., Ellerbrok, H., Kamuzinzi, R., Ledent, V., Blaudez, D., Sanders, D., Revuelta, J.L., Boles, E., Andre, B. and Frommer, W.B. (2004) K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 12242-12247.
- Odorizzi, G., Babst, M. and Emr, S.D. (1998) Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell*, **95**, 847-858.
- Ogawa, N., DeRisi, J. and Brown, P.O. (2000) New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell*, **11**, 4309-4321.
- Ohsumi, Y. and Anraku, Y. (1981) Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **256**, 2079-2082.
- Ohsumi, Y., Kitamoto, K. and Anraku, Y. (1988) Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *J Bacteriol*, **170**, 2676-2682.
- Oka, T., Nishikawa, S. and Nakano, A. (1991) Reconstitution of GTP-binding Sar1 protein function in ER to Golgi transport. *J Cell Biol*, **114**, 671-679.
- Okorokov, L.A., Lichko, L.P. and Kulaev, I.S. (1980) Vacuoles: main compartments of potassium, magnesium, and phosphate ions in *Saccharomyces carlsbergensis* cells. *J Bacteriol*, **144**, 661-665.
- Ooi, S.L., Shoemaker, D.D. and Boeke, J.D. (2003) DNA helicase gene interaction network defined using synthetic lethality analyzed by microarray. *Nat Genet*, **35**, 277-286.
- Ortiz, D.F., St Pierre, M.V., Abdulmessih, A. and Arias, I.M. (1997) A yeast ATP-binding cassette-type protein mediating ATP-dependent bile acid transport. *J Biol Chem*, **272**, 15358-15365.
- Österreicher, A. (2006) Entwicklung einer genetischen Methode zur Identifizierung von neuen ER-Verpackungschaperonen in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit. Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt.
- Ozcan, S., Dover, J. and Johnston, M. (1998) Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **17**, 2566-2573.
- Ozcan, S. and Johnston, M. (1999) Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 554-569.
- Panek, H.R., Stepp, J.D., Engle, H.M., Marks, K.M., Tan, P.K., Lemmon, S.K. and Robinson, L.C. (1997) Suppressors of *YCK*-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. *Embo J*, **16**, 4194-4204.

- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S. and Rapoport, T.A. (1995) Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell*, **81**, 561-570.
- Patton-Vogt, J.L. and Henry, S.A. (1998) *GIT1*, a gene encoding a novel transporter for glycerophosphoinositol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **149**, 1707-1715.
- Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Nelissen, B., Goffeau, A. and Saier, M.H., Jr. (1998) Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **430**, 116-125.
- Petrovic, S., Pascolo, L., Gallo, R., Cupelli, F., Ostrow, J.D., Goffeau, A., Tiribelli, C. and Bruschi, C.V. (2000) The products of YCF1 and YLL015w (BPT1) cooperate for the ATP-dependent vacuolar transport of unconjugated bilirubin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **16**, 561-571.
- Piper, R.C., Bryant, N.J. and Stevens, T.H. (1997) The membrane protein alkaline phosphatase is delivered to the vacuole by a route that is distinct from the VPS-dependent pathway. *J Cell Biol*, **138**, 531-545.
- Piper, R.C., Cooper, A.A., Yang, H. and Stevens, T.H. (1995) *VPS27* controls vacuolar and endocytic traffic through a prevacuolar compartment in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **131**, 603-617.
- Pishvae, B. and Payne, G.S. (1998) Clathrin coats--threads laid bare. *Cell*, **95**, 443-446.
- Plourde-Owobi, L., Durner, S., Goma, G. and Francois, J. (2000) Trehalose reserve in *Saccharomyces cerevisiae*: phenomenon of transport, accumulation and role in cell viability. *Int J Food Microbiol*, **55**, 33-40.
- Plourde-Owobi, L., Durner, S., Parrou, J.L., Wieczorke, R., Goma, G. and Francois, J. (1999) *AGT1*, encoding an alpha-glucoside transporter involved in uptake and intracellular accumulation of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **181**, 3830-3832.
- Pozos, T.C., Sekler, I. and Cyert, M.S. (1996) The product of *HUM1*, a novel yeast gene, is required for vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchange and is related to mammalian Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *Mol Cell Biol*, **16**, 3730-3741.
- Prescianotto-Baschong, C. and Riezman, H. (1998) Morphology of the yeast endocytic pathway. *Mol Biol Cell*, **9**, 173-189.
- Prudent, S., Marty, F. and Charbonnier, M. (2005) The yeast osmosensitive mutant *fps1*Delta transformed by the cauliflower BobTIP1;1 aquaporin withstand a hypo-osmotic shock. *FEBS Lett*, **579**, 3872-3880.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Seraphin, B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods*, **24**, 218-229.
- Raguzzi, F., Lesuisse, E. and Crichton, R.R. (1988) Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **231**, 253-258.
- Ramsay, L.M. and Gadd, G.M. (1997) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. *FEMS Microbiol Lett*, **152**, 293-298.
- Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F. and Riezman, H. (1993) *end3* and *end4*: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **120**, 55-65.
- Ratnakumar, S. and Tunnacliffe, A. (2006) Intracellular trehalose is neither necessary nor sufficient for desiccation tolerance in yeast. *FEMS Yeast Res*, **6**, 902-913.
- Rees, E.M., Lee, J. and Thiele, D.J. (2004) Mobilization of intracellular copper stores by the *ctr2* vacuolar copper transporter. *J Biol Chem*, **279**, 54221-54229.
- Rehling, P., Darsow, T., Katzmann, D.J. and Emr, S.D. (1999) Formation of AP-3 transport intermediates requires Vps41 function. *Nat Cell Biol*, **1**, 346-353.
- Reifenberger, E., Boles, E. and Ciriacy, M. (1997) Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur J Biochem*, **245**, 324-333.
- Reifenberger, E., Freidel, K. and Ciriacy, M. (1995) Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol Microbiol*, **16**, 157-167.
- Resh, M.D. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta*, **1451**, 1-16.
- Rexach, M.F., Latterich, M. and Schekman, R.W. (1994) Characteristics of endoplasmic reticulum-derived transport vesicles. *J Cell Biol*, **126**, 1133-1148.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. and Seraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*, **17**, 1030-1032.
- Roberts, C.J., Nothwehr, S.F. and Stevens, T.H. (1992) Membrane protein sorting in the yeast secretory pathway: evidence that the vacuole may be the default compartment. *J Cell Biol*, **119**, 69-83.
- Roberts, C.J., Raymond, C.K., Yamashiro, C.T. and Stevens, T.H. (1991) Methods for studying the yeast vacuole. *Methods Enzymol*, **194**, 644-661.

- Russnak, R., Konczal, D. and McIntire, S.L. (2001) A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. *J Biol Chem*, **276**, 23849-23857.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.
- Saito-Nakano, Y. and Nakano, A. (2000) Sed4p functions as a positive regulator of Sar1p probably through inhibition of the GTPase activation by Sec23p. *Genes Cells*, **5**, 1039-1048.
- Salinovich, O. and Montelaro, R.C. (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem*, **156**, 341-347.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Sato, T., Ohsumi, Y. and Anraku, Y. (1984) Substrate specificities of active transport systems for amino acids in vacuolar-membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence of seven independent proton/amino acid antiport systems. *J Biol Chem*, **259**, 11505-11508.
- Schmid, S.L. (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem*, **66**, 511-548.
- Schulte, F., Wiczorke, R., Hollenberg, C.P. and Boles, E. (2000) The *HTR1* gene is a dominant negative mutant allele of *MTH1* and blocks Snf3- and Rgt2-dependent glucose signaling in yeast. *J Bacteriol*, **182**, 540-542.
- Schussler, A., Martin, H., Cohen, D., Fitz, M. and Wipf, D. (2006) Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature*, **444**, 933-936.
- Seaman, M.N., Marcusson, E.G., Cereghino, J.L. and Emr, S.D. (1997) Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the *VPS29*, *VPS30*, and *VPS35* gene products. *J Cell Biol*, **137**, 79-92.
- Sebollela, A., Louzada, P.R., Sola-Penna, M., Sarone-Williams, V., Coelho-Sampaio, T. and Ferreira, S.T. (2004) Inhibition of yeast glutathione reductase by trehalose: possible implications in yeast survival and recovery from stress. *Int J Biochem Cell Biol*, **36**, 900-908.
- Sharma, K.G., Mason, D.L., Liu, G., Rea, P.A., Bachhawat, A.K. and Michaelis, S. (2002) Localization, regulation, and substrate transport properties of Bpt1p, a *Saccharomyces cerevisiae* MRP-type ABC transporter. *Eukaryot Cell*, **1**, 391-400.
- Shaywitz, D.A., Espenshade, P.J., Gimeno, R.E. and Kaiser, C.A. (1997) COPII subunit interactions in the assembly of the vesicle coat. *J Biol Chem*, **272**, 25413-25416.
- Sherman, F. (1991) Getting started with yeast. *Methods Enzymol*, **194**, 3-21.
- Sherman, F. and Hicks, J. (1991) Micromanipulation and dissection of asci. *Methods Enzymol*, **194**, 21-37.
- Sherwood, P.W. and Carlson, M. (1999) Efficient export of the glucose transporter Hxt1p from the endoplasmic reticulum requires Gsf2p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 7415-7420.
- Shimazu, M., Sekito, T., Akiyama, K., Ohsumi, Y. and Kakinuma, Y. (2005) A family of basic amino acid transporters of the vacuolar membrane from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **280**, 4851-4857.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 13207-13212.
- Siderius, M., Van Wuytswinkel, O., Reijenga, K.A., Kelders, M. and Mager, W.H. (2000) The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature. *Mol Microbiol*, **36**, 1381-1390.
- Singer, M.A. and Lindquist, S. (1998) Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol Cell*, **1**, 639-648.
- Sivadon, P., Peypouquet, M.F., Doignon, F., Aigle, M. and Crouzet, M. (1997) Cloning of the multicopy suppressor gene *SUR7*: evidence for a functional relationship between the yeast actin-binding protein Rvs167 and a putative membranous protein. *Yeast*, **13**, 747-761.
- Sola-Penna, M. and Meyer-Fernandes, J.R. (1998) Stabilization against thermal inactivation promoted by sugars on enzyme structure and function: why is trehalose more effective than other sugars? *Arch Biochem Biophys*, **360**, 10-14.
- Sorin, A., Rosas, G. and Rao, R. (1997) PMR1, a Ca²⁺-ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. *J Biol Chem*, **272**, 9895-9901.
- Southern, E. (1979) Gel electrophoresis of restriction fragments. *Methods Enzymol*, **68**, 152-176.
- Springael, J.Y., De Craene, J.O. and Andre, B. (1999) The yeast Npi1/Rsp5 ubiquitin ligase lacking its N-terminal C2 domain is competent for ubiquitination but not for subsequent endocytosis of the Gap1 permease. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 561-566.

- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. and te Heesen, S. (1998) A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 5187-5192.
- Stearman, R., Yuan, D.S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R.D. and Dancis, A. (1996) A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science*, **271**, 1552-1557.
- Stefan, C.J. and Blumer, K.J. (1999) A syntaxin homolog encoded by *VAM3* mediates down-regulation of a yeast G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, **274**, 1835-1841.
- Strathern, J.N. and Higgins, D.R. (1991) Recovery of plasmids from yeast into *Escherichia coli*: shuttle vectors. *Methods Enzymol*, **194**, 319-329.
- Tamas, M.J., Karlgren, S., Bill, R.M., Hedfalk, K., Allegri, L., Ferreira, M., Thevelein, J.M., Rydstrom, J., Mullins, J.G. and Hohmann, S. (2003) A short regulatory domain restricts glycerol transport through yeast Fps1p. *J Biol Chem*, **278**, 6337-6345.
- Tamas, M.J., Luyten, K., Sutherland, F.C., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H., Li, H., Prior, B.A., Kilian, S.G., Ramos, J., Gustafsson, L., Thevelein, J.M. and Hohmann, S. (1999) Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol Microbiol*, **31**, 1087-1104.
- Thevelein, J.M. and Hohmann, S. (1995) Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem Sci*, **20**, 3-10.
- Thom, M., Komor, E. and Maretzki, A. (1982) Vacuoles from Sugarcane Suspension Cultures : II. CHARACTERIZATION OF SUGAR UPTAKE. *Plant Physiol*, **69**, 1320-1325.
- Thomas, M.R. and O'Shea, E.K. (2005) An intracellular phosphate buffer filters transient fluctuations in extracellular phosphate levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9565-9570.
- Thumm, M. (2000) Structure and function of the yeast vacuole and its role in autophagy. *Microsc Res Tech*, **51**, 563-572.
- Toda, T., Uno, I., Ishikawa, T., Powers, S., Kataoka, T., Broek, D., Cameron, S., Broach, J., Matsumoto, K. and Wigler, M. (1985) In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell*, **40**, 27-36.
- Tomitori, H., Kashiwagi, K., Asakawa, T., Kakinuma, Y., Michael, A.J. and Igarashi, K. (2001) Multiple polyamine transport systems on the vacuolar membrane in yeast. *Biochem J*, **353**, 681-688.
- Tomitori, H., Kashiwagi, K., Sakata, K., Kakinuma, Y. and Igarashi, K. (1999) Identification of a gene for a polyamine transport protein in yeast. *J Biol Chem*, **274**, 3265-3267.
- Tong, A.H., Evangelista, M., Parsons, A.B., Xu, H., Bader, G.D., Page, N., Robinson, M., Raghibizadeh, S., Hogue, C.W., Bussey, H., Andrews, B., Tyers, M. and Boone, C. (2001) Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science*, **294**, 2364-2368.
- Trilla, J.A., Duran, A. and Roncero, C. (1999) Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **145**, 1153-1163.
- Trotter, E.W., Berenfeld, L., Krause, S.A., Petsko, G.A. and Gray, J.V. (2001) Protein misfolding and temperature up-shift cause G1 arrest via a common mechanism dependent on heat shock factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7313-7318.
- Uemura, T., Tomonari, Y., Kashiwagi, K. and Igarashi, K. (2004) Uptake of GABA and putrescine by UGA4 on the vacuolar membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, **315**, 1082-1087.
- Urbanowski, J.L. and Piper, R.C. (1999) The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. *J Biol Chem*, **274**, 38061-38070.
- Urech, K., Durr, M., Boller, T., Wiemken, A. and Schwencke, J. (1978) Localization of polyphosphate in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*, **116**, 275-278.
- Van Aelst, L., Hohmann, S., Zimmermann, F.K., Jans, A.W. and Thevelein, J.M. (1991) A yeast homologue of the bovine lens fibre MIP gene family complements the growth defect of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant on fermentable sugars but not its defect in glucose-induced RAS-mediated cAMP signalling. *Embo J*, **10**, 2095-2104.
- van de Poll, K.W., Kerkenaar, A. and Schamhart, D.H. (1974) Isolation of a regulatory mutant of fructose-1,6-diphosphatase in *Saccharomyces carlsbergensis*. *J Bacteriol*, **117**, 965-970.
- Vanden Bossche, H., Koymans, L. and Moereels, H. (1995) P450 inhibitors of use in medical treatment: focus on mechanisms of action. *Pharmacol Ther*, **67**, 79-100.
- Vanhalewyn, M., Dumortier, F., Debast, G., Colombo, S., Ma, P., Winderickx, J., Van Dijck, P. and Thevelein, J.M. (1999) A mutation in *Saccharomyces cerevisiae* adenylate cyclase, Cyr1K1876M, specifically affects glucose- and acidification-induced cAMP signalling and not the basal cAMP level. *Mol Microbiol*, **33**, 363-376.
- Varshavsky, A. (1992) The N-end rule. *Cell*, **69**, 725-735.

- Vater, C.A., Raymond, C.K., Ekena, K., Howald-Stevenson, I. and Stevens, T.H. (1992) The VPS1 protein, a homolog of dynamin required for vacuolar protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*, is a GTPase with two functionally separable domains. *J Cell Biol*, **119**, 773-786.
- Voss, D. (2005) Funktionsanalyse des *Saccharomyces cerevisiae* Proteins Fgy1 und dessen Einfluss auf die heterologe Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 aus Säugetieren. Dissertation. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Vowels, J.J. and Payne, G.S. (1998) A dileucine-like sorting signal directs transport into an AP-3-dependent, clathrin-independent pathway to the yeast vacuole. *Embo J*, **17**, 2482-2493.
- Vuorio, O.E., Kalkkinen, N. and Londesborough, J. (1993) Cloning of two related genes encoding the 56-kDa and 123-kDa subunits of trehalose synthase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, **216**, 849-861.
- Wang, G., McCaffery, J.M., Wendland, B., Dupre, S., Haguenaer-Tsapis, R. and Huibregtse, J.M. (2001) Localization of the Rsp5p ubiquitin-protein ligase at multiple sites within the endocytic pathway. *Mol Cell Biol*, **21**, 3564-3575.
- Wang, G., Yang, J. and Huibregtse, J.M. (1999) Functional domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol*, **19**, 342-352.
- Wang, H.X., Weerasinghe, R.R., Perdue, T.D., Cakmakci, N.G., Taylor, J.P., Marzluff, W.F. and Jones, A.M. (2006) A Golgi-localized hexose transporter is involved in heterotrimeric G protein-mediated early development in *Arabidopsis*. *Mol Biol Cell*, **17**, 4257-4269.
- Weitzhandler, M., Rohrer, J., Thayer, J.R. and Avdalovic, N. (1998) HPAEC-PAD analysis of monosaccharides released by exoglycosidase digestion using the CarboPac MA1 column. *Methods Mol Biol*, **76**, 71-78.
- Werner, T.P., Amrhein, N. and Freimoser, F.M. (2005) Novel method for the quantification of inorganic polyphosphate (iPoP) in *Saccharomyces cerevisiae* shows dependence of iPoP content on the growth phase. *Arch Microbiol*, **184**, 129-136.
- Wickersham, L. (1951) Taxonomy of Yeasts. In *United States Department of Agriculture Technical Bulletin*, Washington DC: US Department of Agriculture Vol. 1029.
- Wieczorke, R., Dlugai, S., Krampe, S. and Boles, E. (2003) Characterisation of mammalian GLUT glucose transporters in a heterologous yeast expression system. *Cell Physiol Biochem*, **13**, 123-134.
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P. and Boles, E. (1999) Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **464**, 123-128.
- Wiemken, A. (1990) Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **58**, 209-217.
- Winderickx, J., de Winde, J.H., Crauwels, M., Hino, A., Hohmann, S., Van Dijck, P. and Thevelein, J.M. (1996) Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? *Mol Gen Genet*, **252**, 470-482.
- Winston, F., Dollard, C. and Ricupero-Hovasse, S.L. (1995) Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast*, **11**, 53-55.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S.H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D.J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J.L., Riles, L., Roberts, C.J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Veronneau, S., Voet, M., Volckaert, G., Ward, T.R., Wysocki, R., Yen, G.S., Yu, K., Zimmermann, K., Philippsen, P., Johnston, M. and Davis, R.W. (1999) Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*, **285**, 901-906.
- Wirth, R., Friesenegger, A. and Fiedler, S. (1989) Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol Gen Genet*, **216**, 175-177.
- Wittke, S., Lewke, N., Muller, S. and Johnsson, N. (1999) Probing the molecular environment of membrane proteins in vivo. *Mol Biol Cell*, **10**, 2519-2530.
- Yoshihisa, T., Barlowe, C. and Schekman, R. (1993) Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science*, **259**, 1466-1468.
- Zimmermann, F.K. (1975) Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, **31**, 71-86.

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ALP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel (Zerfälle pro Sekunde)
cAMP	3'-5'-cyclo-AMP
CEN	Centromersequenz
CGN	cis-Golgi-Netzwerk
cpm	Zerfälle pro Minute (counts per minute)
CPY	Carboxypeptidase Y
Cvt	„cytoplasm-to-vacuole targeting“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonukleotid
EDTA	N,N,N',N'-Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FOA	5-Fluoroorotic-Säure
GABA	4-Aminobutansäure
GAP	„GTPase activating protein“
GFP	„green fluorescent protein“
GMP	Guanosinmonophosphat
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
3xHA	3x Hämagglutinin-Epitop
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LC	„liquid chromatography“
MCF	„mitochondrial carrier family“
Mes	„2-Morpholinoethanesulfonic acid“
MFS	„major facilitator superfamily“
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600nm
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCSA	„Packaging Chaperone Screening Assay“

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SGD	„saccharomyces genome database“
SDS	„sodium dodecyl sulfate“
SRP	„signal recognition particle“
TAP	Tandem-Affinitäts-Aufreinigung
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ts	temperatursensitiv
U	Units, Einheit der Enzymaktivität (entspricht $\mu\text{mol}/\text{min}$)
vps	„vacuolar protein sorting“

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Eckhard Boles für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die Betreuung sowie für die Übernahme des Referates.

Herrn HD Dr. Torsten Stein möchte ich für die Übernahme des Koreferates danken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit. Besonders Doreen Ochmann, Marco Keller und Dr. Birgitte Regenberg danke ich für ihre stete Diskussionsbereitschaft.

Diana Schnella, Andrea Österreicher und Christine Essl danke ich für ihre Mitarbeit an einigen Teilprojekten dieser Doktorarbeit.

Dr. Florian Freimoser danke ich für die Durchführung der Phosphatmessungen.

Lebenslauf von Carsten Frühbeis

geboren am 03.06.1976

in Frankfurt am Main

Promotion

2003 – 2007

Institut für Molekulare Biowissenschaften

bei Prof. Dr. Eckhard Boles

Johann Wolfgang Goethe-Universität

Frankfurt am Main

Hochschulausbildung

1999 – 2003

Studium Diplom-Biologie

Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Diplomarbeit am Institut für Molekulare Genetik bei
PD Dr. Gabriele Petersen:

„Modifikation der rezeptorspezifischen Bindung des
adenoviralen Knob-Proteins“

1997 – 1999

Studium Diplom-Biologie

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

1996 – 1997

Studium Maschinenbau

Technische Hochschule Darmstadt

Ersatzdienst

1995 – 1996

Kreiskrankenhaus Bad Soden

Schulbildung

1982 – 1995

Grundschule, Gesamtschule und Gymnasiale
Oberstufe in Kelkheim