

Molekulargenetische Charakterisierung der Funktion
der Glukosesensoren Snf3 und Rgt2 in der Hefe
Saccharomyces cerevisiae

Diplomarbeit
von
Maria Widjaja

Institut für Mikrobiologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität

Frankfurt am Main,
im August 2004

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Kohlenhydratmetabolismus in <i>S. cerevisiae</i>	1
1.2	Familie der Hexosetransportproteine in <i>S. cerevisiae</i>	3
1.3	Die Glucosesensoren Snf3 und Rgt2	4
1.4	Mechanismen der Signalwahrnehmung	6
1.5	Komponenten der Signaltransduktion	7
1.6	Das „Split-Ubiquitin“-System	8
1.7	Ziele dieser Arbeit	11
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Material	12
2.1.1	Stämme und Nährmedien von <i>Escherichia coli</i>	12
2.1.2	Stämme und Nährmedien von <i>S. cerevisiae</i>	12
2.2	Chemikalien und Enzyme	13
2.2.1	Chemikalien	13
2.2.2	Enzyme	15
2.2.3	Antikörper	15
2.2.4	Synthetische Oligonukleotide	15
2.2.5	Plasmide	16
2.2.6	Plasmidkonstruktionen	17
2.3	Methoden	20
2.3.1	Transformation von <i>E. coli</i>	20
2.3.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	20
2.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	20
2.3.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	20
2.3.5	Enzymatische Modifikation von DNA	20
2.3.6	PCR-Amplifizierung von DNA	21
2.3.7	Klonierung durch homologe Rekombination	21

2.3.8	DNA-Aufreinigung	21
2.3.9	Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	22
2.3.10	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	22
2.3.11	Präparation von Cytoplasmaproteinextrakten	22
2.3.12	Präparation von Membranproteinextrakten	23
2.3.13	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	23
2.3.14	Nachweis von Proteinen durch Westernblot-Analyse	24
2.3.15	Nachweis von Proteinen mit spezifischen und unspezifischen Antikörpern	25
2.3.16	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	25
2.3.17	Bestimmung der Proteinkonzentration	26
2.3.18	Interaktionstests mit dem „Split-Ubiquitin“-System auf Reportermedien	26
3	ERGEBNISSE	28
3.1	Untersuchung der möglichen direkten Interaktionen zwischen den Proteinen Snf3, Rgt2, Mth1, Std1 und Rgt1 untereinander in der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	28
3.1.1	Konstruktbeschreibungen	28
3.1.1.1	Erzeugen der „Split-Ubiquitin“-Cub-Plasmide	30
3.1.1.1.1	Amplifizieren der Gene <i>SNF3</i> , <i>RGT2</i> , <i>MTH1</i> , <i>STD1</i> und <i>RGT1</i>	30
3.1.1.1.2	Amplifizieren des Met25-Cub-PLV-Vektors	32
3.1.1.1.3	Erzeugen der „Split-Ubiquitin“-Cub-Konstrukte in dem THY.AP4-Stamm (<i>Mata</i>)	32
3.1.1.2	Erzeugen der „Split-Ubiquitin“-Nub-Plasmide	34
3.1.1.2.1	Amplifizieren der Nub-Vektoren	34
3.1.1.2.2	Erzeugen der „Split-Ubiquitin“-Nub-Konstrukte in dem THY.AP5-Stamm (<i>Mata</i>)	34
3.1.2	Interaktionstests zwischen den Cub- und Nub-Fusionsproteinen mit dem „Split-Ubiquitin“-System auf Reportermedien	36
3.1.2.1	Interaktionstests mit den NXgate-32-Plasmid-Konstrukten	37
3.1.2.2	Interaktionstests mit den XNgate-22-Plasmid-Konstrukten	39
3.1.2.3	Interaktionstests mit den NXgate-3HA-Plasmid-Konstrukten	41

3.1.2.4	Interaktionstests mit den XNgate-3HA-Plasmid-Konstrukten	43
3.1.3	Expressionsnachweis der Fusionsproteine in den Nub-Plasmiden NXgate-3HA und XNgate-3HA durch Western-Blot	45
3.1.3.1	Expressionsnachweis der Cytoplasma-Fusionsproteine	46
3.1.3.2	Expressionsnachweis der Membran-Fusionsproteine	47
3.1.4	Interaktionstests mit den Fusionsproteinen Rgt2, Snf3, Mth1, Std1 und Rgt1 der NubX-3HA- und XNub-3HA-Plasmidkonstrukte auf Reportermedien	49
3.1.5	Untersuchung der Interaktionen zwischen Cub-Rgt2, -Snf3 und Nub- Mth1, -Std1,-Rgt1 durch die Bestimmung der β -Galaktosidase- Aktivität	52
3.1.6	Überprüfung der Interaktionen zwischen Rgt2 bzw. Snf3 und Rgt1 auf Reportermedien	54
3.1.7	Überprüfung der Interaktionen zwischen Mth1 bzw. Std1 und Rgt2 bzw. Snf3 in den XNub3HA-Plasmiden auf Reportermedien	56
3.1.8	Überprüfung der Interaktionen zwischen Mth1 bzw. Std1 und Rgt2 bzw. Snf3 durch die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	58
3.1.9	Interaktions-vermittelte <i>in vivo</i> -Abspaltung des PLV-Reporterproteins	60
3.2	Versuch der Umwandlung von Snf3 in einen bifunktionalen Sensor für Glukose und Galaktose	64
3.2.1	Bestimmung der homologen Positionen zur Aminosäuresubstitution im Snf3 Protein	64
3.2.2	Erzeugung der mutierten Form des Snf3 Sensorproteines	65
3.2.3	Untersuchung der Snf3-Mutante auf eine Glukose- und Galaktosesensorfunktion	70
3.2.3.1	Test auf eine Glukose- und Galaktosesensorfunktion von Snf3-Mut durch die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität	70
4	DISKUSSION	73
4.1	Charakterisierung der Glukosesensoren Snf3 und Rgt2	73
4.2	Untersuchung der Plasmidkonstrukte	76
4.3	Ergebnisse der Protein-Interaktionen	78

4.4	Modell zur glukoseinduzierten Signaltransduktion	81
4.5	Charakterisierung des Galaktosetransporters Gal2	83
4.6	Snf3-Mut funktioniert als hoch-affiner Glukoseseensor	84
5	ZUSAMMENFASSUNG	87
6	LITERATURVERZEICHNIS	88
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	99

1 Einleitung

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein niederer einzelliger Eukaryont, der unter anderem die Fähigkeit besitzt, aus Zucker Ethanol und Kohlendioxid zu produzieren. Diese fermentativen Eigenschaften machen sich die Menschen seit Jahrtausenden bei der Brot-, Bier- und Weinherstellung zunutze.

Aufgrund seines relativ kleinen haploiden Genoms (ca. $1,2 \times 10^7$ bp), der kurzen Generationszeit von 90 Minuten und der sehr guten Kultivierbarkeit, entwickelte sich die sogenannte Bäckerhefe zu einem bevorzugten Forschungsobjekt. Erfolgreiche Aufklärung vieler verschiedener physiologischer Prozesse auf molekularer Ebene machte die Hefe zu einem der am besten verstandenen Eukaryonten. Die vollständige Sequenzierung des Genoms der Hefe *S. cerevisiae* war Anfang 1996 abgeschlossen und stellte das erste sequenzierte eukaryontische Genom dar (Goffeau *et al.*, 1996). Viele grundlegende Mechanismen der transkriptionalen und translationalen Kontrolle der Genexpression, der Wachstumssteuerung, der Signaltransduktion sowie des Metabolismus der Hefe sind auch auf Zellen höherer Eukaryonten übertragbar (Peterson und Herskowitz, 1992; Tamkun *et al.*, 1992; Verijzer *et al.*, 1994). Bis dato ist die Hefe *S. cerevisiae* als eukaryontischer Modellorganismus für die Forschung aber auch für industrielle oder medizinische Zwecke von großem Nutzen (Hitzemann *et al.*, 1981; Romanos *et al.*, 1992).

1.1 Kohlenhydratmetabolismus in *S. cerevisiae*

Zucker sind wichtige Nährstoffe für alle auf organische Nahrung angewiesenen Organismen. Glukose ist das am häufigsten in der Natur vorkommende Monosaccharid und die bevorzugte Kohlenstoffquelle für die meisten pro- und eukaryontischen Zellen. Die Hefe *S. cerevisiae* kann eine Vielzahl von Kohlenstoffquellen verwerten (Barnet, 1976, 1997, Entian und Schüller, 1997). Monosaccharide wie Glukose und Fruktose werden direkt in die Glykolyse eingeschleust, während Galaktose und Mannose erst in Glukose-6-phosphat bzw. in Fruktose-6-phosphat umgewandelt werden. Die Disaccharide Saccharose und Melibiose sowie das Trisaccharid Raffinose werden zunächst extrazellulär in die zugrundeliegenden Hexosebausteine hydrolysiert, bevor sie in die Zelle aufgenommen werden. Maltose wird über spezifische Maltose-Protonen-Cotransporter aktiv in die Zelle aufgenommen, bevor sie zu Glukose hydrolysiert wird.

Glukose kann von *S. cerevisiae* unter aeroben wie auch unter anaeroben Bedingungen nahezu komplett zu Ethanol und Kohlendioxid vergoren werden (Lagunas, 1986). Die aerobe Bildung von Ethanol aus vergärbaren Zuckern erfolgt vor allem durch die Repression verschiedener Enzyme des oxidativen Metabolismus (Polakis *et al.*, 1965). Nur bei sehr niedrigen Glukosekonzentrationen oder bei der Verwertung nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquellen wie Ethanol, Pyruvat, Lactat, Acetat oder Glycerin erfolgt ein respiratorischer Abbau über den Citrat-Zyklus und die oxidative Phosphorylierung (Lagunas, 1986).

In Gegenwart von Glukose oder anderen gut fermentierbaren Hexosen sorgt eine Reihe von regulatorischen Signalen im Kohlenstoffmetabolismus der Zelle für eine schnelle und effektive Verwertung dieser Substrate. Neben einer raschen Inaktivierung vorhandener glukoneogener Enzyme, erfolgt die durch Glukose ausgelöste Regulation hauptsächlich auf transkriptionaler Ebene durch den übergeordneten Kontrollmechanismus der Glukose- oder Katabolitrepression (Trumbly, 1992). Durch diese Regulation wird sichergestellt, dass in Gegenwart des am besten zu metabolisierenden Substrates Glukose die Expression vieler Schlüsselenzyme reprimiert ist, die in konkurrierende oder gegenläufige Stoffwechselwege involviert sind (Entian und Barnett, 1992). Hierzu gehören Proteine, die für die Aufnahme und Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen verantwortlich sind (z.B. die Produkte der *GAL*, *SUC* und *MAL* Gene), Enzyme der Glukoneogenese und des Glyoxylatzyklus, sowie mitochondriale Enzyme des Citrat-Zyklus und der oxidativen Phosphorylierung. Die Glukoserepression wird jedoch nicht nur durch Glukose, Fruktose und Mannose ausgelöst, sondern auch durch Zucker wie Maltose (Eraso und Gancedo, 1984) und Galaktose (Polakis und Bartley, 1965).

In *S. cerevisiae* werden Hexosen durch den Mechanismus der erleichterten Diffusion (Kotyck, 1967, Maier *et al.*, 2002) entlang eines Konzentrationsgradienten (van Urk *et al.*, 1989) über die Plasmamembran in die Zelle transportiert. Solche Transportsysteme sind energieunabhängig. Der Transport von Disacchariden wie z.B. Maltose oder Saccharose erfolgt durch aktive Protonen-Zucker-Symportersysteme (Lagunas, 1993).

1.2 Familie der Hexosetransportproteine in *S. cerevisiae*

In der Hefe *S. cerevisiae* wurden aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu Zuckertransportern von verschiedenen Organismen sowie ähnlichen Funktionen im Hexosetransport als auch in der Regulation 19 verschiedene Gene der Familie der Hexosetransporter (*HXT1-11*, *HXT13-HXT17*, *GAL2*, *SNF3* und *RGT2*), plus einem zusätzlichen Pseudogen (*HXT12*), identifiziert (Kruckeberg 1996, Boles und Hollenberg 1997, Ciriacy und Reifenberger 1997). Die Hexosetransporter gehören zu einer Transporter-Superfamilie, bezeichnet als major facilitator superfamily, kurz MFS (Marger und Saier 1993). Alle Proteine dieser Familie weisen eine charakteristische Struktur von vermutlich zwölf Transmembran-Domänen auf, deren Aminosäuresequenz in dieser Region stark konserviert ist (Kruckeberg 1996) und deren Topologie bereits für den Glut1 Glukosetransporter aus menschlichen Erythrocyten vorgeschlagen wurde (Mueckler *et al.* 1985). Dagegen bestehen erhebliche Unterschiede in der Länge und Sequenz ihrer N- und C-terminalen Domänen, die sich auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran befinden. Die Hexosetransporter zeigen unterschiedliche Affinitäten für Zucker und unterschiedliche Expressionsmuster in Anpassung an verschiedene Glukose-Konzentrationen (Boles und Hollenberg, 1997). Mit einem System von mehreren hoch-, mittel- und niedrig-affinen Transportern ist es der Bäckerhefe möglich, die Glukoseaufnahme als Reaktion auf vorherrschende Bedingungen anzupassen, um Zellwachstum und Stoffwechsel zu optimieren.

Über die Eigenschaften der Hefe-Glukosetransporter wurde kürzlich berichtet (Boles, 2002). Dabei sind die Haupthexosetransporter die Proteine Hxt1-Hxt7 und Gal2. Hxt1 ($K_m \sim 100$ mM) und Hxt3 ($K_m \sim 60$ mM) sind Transporter mit einer niedrigen Affinität zu Glukose, wobei die Expression von *HXT1* von hohen extrazellulären Glukosekonzentrationen abhängt und die Expression von *HXT3* konzentrationsunabhängig ist. Dagegen haben Hxt2 und Hxt4 eine annähernd mittlere Affinität zu Glukose ($K_m \sim 10$ mM), während Hxt6 und Hxt7 hoch-affine Glukosetransporter ($K_m \sim 1-2$ mM) darstellen. Die Expression der Gene *HXT2*, *HXT4*, *HXT6* und *HXT7* wird durch niedrige Glukosekonzentrationen induziert und ist in der Gegenwart hoher Konzentrationen reprimiert. *HXT5* ($K_m \sim 7$ mM) wird nur in Abwesenheit von Glukose bzw. unter Hunger- und Stressbedingungen exprimiert (Buziol *et al.*, 2002) und *HXT8-HXT17* kodieren für Hexosetransporter, die eine Hexose-Aufnahme in die Zellen nur nach Überexpression

vermitteln. *GAL2* kodiert für die hoch-affine Galaktose-Permease ($K_m \sim 1-2$ mM), deren Expression durch Galaktose induziert und von Glukose reprimiert wird. Dennoch kann die Permease Galaktose wie auch Glukose mit beinahe der gleichen Affinität transportieren (Reifenberger *et al.*, 1997).

Snf3 und *Rgt2* hingegen grenzen sich als Glukosesensoren gegenüber den anderen Mitgliedern der Hexosetransporterfamilie ab, da sie nur begrenzte Sequenzähnlichkeiten mit ihnen haben. *SNF3* und *RGT2* kodieren für Proteine mit 884 bzw. 763 Aminosäuren, während die Länge der anderen Hexosetransporter zwischen 541 und 592 Aminosäureresten variiert (Kruckeberg, 1996). Ein weiterer Unterschied besteht in den außergewöhnlich langen C-terminalen Domänen von *Snf3* und *Rgt2* auf der cytoplasmatischen Seite der Zellmembran. Außerdem sind die beiden Proteine nur schwach exprimiert (Özcan *et al.*, 1996) und scheinen nicht in der Lage zu sein, Glukose zu transportieren. Denn selbst bei Überexpression waren sie außerstande, ein Wachstum auf Glukosemedium in einem *hxt*-Null Stamm, der keinen Hexosetransport mehr ausübt, wiederherzustellen (Özcan *et al.*, 1998; Dlugai *et al.*, 2001). Sogar umfassende Mutageneseexperimente konnte *Snf3* und *Rgt2* nicht in Glukosetransporter umwandeln (Dlugai *et al.*, 2001). Dennoch besteht die Möglichkeit, dass sie Glukose in nur kleinen und regulierenden Mengen transportieren.

1.3 Die Glucosesensoren *Snf3* und *Rgt2*

Snf3-Mutanten (*sucrose non-fermenting*) wurden erstmals bei einem genetischen screening mutanter Zellen gefunden, die außerstande sind Saccharose und Raffinose zu verwerten (Neighborn und Carlson, 1984). Kinetische Analysen zeigten, dass die *snf3* Mutanten einen Defekt im hoch-affinen Glukosetransport aufwiesen. Daraus resultierte die Unfähigkeit, auf den geringen Mengen an Glukose und Fruktose fermentativ zu wachsen, die nach der Hydrolyse der Saccharose und Raffinose entstehen. Eine nähere Untersuchung des Proteins offenbarte eine starke Ähnlichkeit zu den Zuckertransportern. Deshalb wurde *Snf3* zunächst für einen hoch-affinen Transporter gehalten, der bei geringen Konzentrationen an Glukose bzw. Fruktose diese in die Zelle transportiert (Bisson *et al.*, 1987; Celenza *et al.*, 1988; Marshall-Carlson *et al.*, 1991). Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, dass *Snf3* als hoch-affiner Glukosesensor in die transkriptionale Regulation der hoch- (*Hxt6* und

Hxt7), mittel- (Hxt2 und Hxt4) und niedrig- (Hxt1 und Hxt3) –affinen Glukosetransporter involviert ist (Özcan und Johnston, 1995; Özcan *et al.*, 1998; Schulte *et al.*, 2000).

Rgt2 (*restore glucose transport*) wurde als ein dominanter Suppressor entdeckt, der den Wachstumsdefekt in einer *snf3* Mutante wieder aufhebt (Özcan *et al.*, 1996a, Marshall-Carlson *et al.*, 1991). Das *RGT2* Gen kodiert für ein 763 Aminosäuren langes Protein, das sich 100 kb abwärts von *SNF3* auf Chromosom IV befindet und jedes Gen ist Teil eines duplizierten Blocks von sechs Genen (Wölfl *et al.*, 1996; Van Belle und André, 2001). Rgt2 ist als niedrig-affiner Glukosesensor in die transkriptionale Induktion des niedrig-affinen Glukosetransporters Hxt1 und des glukosekonzentrations-unabhängigen Transporters Hxt3 involviert (Özcan *et al.* 1996a; Schmidt *et al.*, 1999).

Im Vergleich zu anderen Hexosetransportern, enthalten Snf3 und Rgt2 ungewöhnlich lange C-terminale Domänen, die bei Snf3 303 Aminosäuren und bei Rgt2 218 Aminosäuren lang sind (Celenza *et al.*, 1988; Özcan *et al.*, 1996) und die sich auf der cytoplasmatischen Seite der Plasmamembran befinden. Trotz 60% Identität der beiden Proteine zueinander sind diese carboxyterminalen Anhänge nur wenig konserviert. Außer in einem Peptid von 25 Aminosäuren, kommt diese Sequenz zweimal in Snf3 und nur einmal in Rgt2 vor (Celenza *et al.*, 1988; Özcan *et al.*, 1996). In komplett sequenzierten Genomen von anderen Hefen und Pilzen, wurden mehrere Snf3- bzw. Rgt2-homologe Gene gefunden und alle diese Gene enthielten diese konservierte Sequenz von 25 Aminosäuren (Souciet *et al.*, 2000; Cliften *et al.*, 2003; Kellis *et al.*, 2003). Mutationsanalysen ergaben, dass wenigstens eine dieser Sequenzen für eine korrekte Signalweiterleitung und die daraufhin folgende Induktion der *HXT* Expression erforderlich ist (Bisson *et al.*, 1993; Coons *et al.*, 1997; Marshall-Carlson *et al.*, 1990; Boles und Hollenberg, 1997). Im Gegensatz dazu konnten Deletionsmutanten, in denen diese Sequenzen von 25 Aminosäuren entfernt wurden, aber der Rest der Domäne intakt blieb, keine Signalfunktion mehr ausüben (Özcan *et al.*, 1998).

Die Glukosesensoren der Hefen bestehen aus zwei Domänen, dem für die Glukoseerkennung wichtigen, membrandurchspannenden Bereich und der für die Signalübermittlung angehängten C-terminalen Domäne. Entgegen einer Spekulation von Kruckeberg *et al.* (1998) konnten keine Hinweise darauf gefunden werden, dass die C-terminalen Endungen der Sensoren vom Rest der Proteine als Reaktion auf die Gegenwart oder Abwesenheit von Glukose abgespalten werden (C. Cappellaro und E. Boles, unveröffentlichte Ergebnisse).

Das Schlüsselexperiment, das bestätigte, dass Snf3 und Rgt2 regulierende statt katalytische Funktionen ausüben, war die Isolierung der dominant konstitutiv signalisierenden mutanten Formen beider Proteine. Diese Mutanten (Rgt2: Arg-231 →Lys; Snf3: Arg-229 →Lys), verursachten eine höhere *HXT* Genexpressionen, sogar in der Abwesenheit von induzierender Glukose (Özcan *et al.*, 1996a). Da dieser substituierte Arginin-Rest unter Zuckertransportern von verschiedenen Organismen hoch konserviert ist, konnten die durch site-direkt-mutagenese-Experimente ermittelten Ergebnisse von dem Säugetier-GLUT4 Glukosetransporter (Schurmann *et al.*, 1997), auch auf die Hefe-Glukosetransporter übertragen werden. Demnach erfahren die mutierten Proteine eine Unterbrechung in ihrer tertiären Struktur, die ihre Transportaktivität wie auch ihre intra- und extrazelluläre Ligandenbindung beeinflusst. Deshalb wird angenommen, dass die entsprechende Mutation in den Glukosesensoren eine Konformationsänderung bewirkt, die der eigentlichen Glukose-Bindungskonformation ähnelt und die *HXT*-Expression auslöst (Boles und André, 2004).

Da in *snf3* Mutanten auf niedrigen Glukosekonzentrationen keine Induktion der hoch-affinen Glukosetransporter (Hxt6, Hxt7) stattfindet, wurde vorgeschlagen, dass Snf3 ein Sensor für niedrige Glukosekonzentrationen ist. Andererseits scheint Rgt2 ein Sensor für hohe Glukosekonzentrationen zu sein, der die Expression von niedrig-affinen Glukosetransportern (Hxt1, Hxt3) reguliert (Özcan und Johnston, 1999). Folglich ist in *rgt2* Mutanten die Induktion des niedrig-affinen Transporters Hxt1 durch hohe Glukosekonzentrationen stark reduziert.

1.4 Mechanismen der Signalwahrnehmung

Gegenwärtig existieren zwei Modelle, die für eine Signalwahrnehmung und Signalweiterleitung durch Ligandenbindung an die Glukosesensoren denkbar sind. In dem ersten Modell agieren die Sensoren Snf3 und Rgt2 wie Zelloberflächen-Rezeptoren, die durch extrazelluläre Glukosebindung an ihre membrandurchspannenden Domänen eine Konformationsänderung erfahren und ihre Interaktion mit den Empfänger-Proteinen, die in die Transduktion von Nährstoffsignalen involviert sind, beeinflusst. Die Sensoren üben dabei keine Transportaktivität aus, das heißt, die Sensoren binden die Induktoren (Glukose) aber diese müssen die Lipid-Doppelmembran nicht überqueren um die Signalleitung zu aktivieren (Boles und André, 2004).

Das zweite Modell impliziert, dass das Signalisieren mit einem Snf3/Rgt2-vermittelten Substrattransport durch die Lipid-Doppelmembran gekoppelt ist. Dabei wird das Signal durch Konformationsänderungen initiiert, die Snf3 und Rgt2 während der Transportzyklen erfahren und nicht durch die aufgenommenen Moleküle selbst. Denn der Substrattransport allein reicht nicht aus um ein Signal auszulösen, da die Überexpression von normalen Hxt-Transportern die Signalfunktion in *snf3*, *rgt2* Mutanten nicht wiederherstellen konnte (Özcan *et al.*, 1998; Iraqui *et al.*, 1999). Dieses Modell ähnelt dem Vorherigen, in dem die konformationale Änderung der Sensoren die Signalauslösung initiiert, jedoch mit dem Unterschied, dass diese Konformationsänderung aufgrund von Transport und nicht von Substratbindung erfolgt (Boles und André, 2004).

Eine alternative Ansicht zu den bisherigen Modellen ist, dass diese Sensorproteine auch in ihrer ungebundenen Form Signale übermitteln und die resultierenden Effekte der Gentranskription eventuell verschieden sind von denen, die durch Ligandenbindung induziert werden (Boles und André, 2004). Was dieses Modell anregte, war die unerwartete Beobachtung, dass *snf3Δ* Mutanten auch dann eine Auswirkung auf die Gentranskription haben, wenn die Substrate (Glukose) von den Sensoren nicht im Medium anwesend sind (Dlugai *et al.*, 2001). Denn in einer *snf3Δ* Mutante war die Aktivität des *HXT7* Promotors nicht nur abgeschafft unter induzierenden Bedingungen (Glukose), sondern auch auf Ethanol, das heißt in der kompletten Abwesenheit von Glukose (Dlugai *et al.*, 2001). Der vollständige Verlust an sogar basaler *HXT7*-Transkription in einer solchen Mutante schlägt vor, dass Snf3 an einem signaltransduzierenden Prozess teilnimmt, sogar in der Abwesenheit von externer Glukose (Boles und André, 2004).

1.5 Komponenten der Signaltransduktion

Das an der Plasmamembran erzeugte Signal, das als Reaktion auf extrazelluläre Glukose von Snf3 und Rgt2 ausgelöst wird, wird über cytoplasmatische Proteine weitergeleitet. Zu den derzeit bekannten Signalüberträgern gehören die Kaseinkinase 1 (Yck1), Mth1, Std1, der Transkriptionsfaktor Rgt1, der transkriptionale Corepressor-Komplex (Ssn6 und Tup1) und ein Ubiquitin-Ligase-Komplex SCF^{Grr1}, der sich aus dem F-Boxprotein Grr1, Skp1-Cullin und Cdc53 zusammensetzt (Li und Johnston, 1997; Skowyra *et al.*, 1997; Moriya und Johnston, 2003).

1.6 Das „Split-Ubiquitin“-System

Ubiquitin ist ein kleines, hoch-konserviertes Protein von 76 Aminosäuren Länge, das in allen Eukaryontenzellen vorkommt. Es wird mit seinem C-Terminus kovalent an Lysinreste anderer Proteine gebunden und markiert diese dadurch zum intrazellulären proteolytischen Abbau in einem Proteasom.

Das „Split-Ubiquitin“-System (ubiquitin-based split-protein sensor, USPS) wurde 1994 von Johnsson und Varshavsky zur *in vivo* Analyse von Proteininteraktionen in lebenden Hefezellen entwickelt. Die Funktion dieses Systems beruht darauf, dass zwei zu untersuchende Proteine an jeweils eine Hälfte eines geteilten Ubiquitins, Nub und Cub, gebunden sind. Bei gegebener Interaktion der zu untersuchenden Proteine wird die Funktion des Ubiquitins wiederhergestellt, indem sich das Split-Ubiquitin-Heterodimer in seine ursprüngliche, native Proteinkonformation faltet. Dadurch wird das an das Cub fusionierte Reporterprotein von Ubiquitin-spezifischen Proteasen (UBP's) abgespalten und induziert detektierbare Reaktionen.

Das „Split-Ubiquitin“-System bietet gegenüber dem klassischen „Two-Hybrid“-System (Fields und Song, 1989) den Vorteil, zusätzlich zu löslichen Proteinen bzw. löslichen Domänen von Membranproteinen, auch Interaktionen zwischen unlöslichen, integralen Membranproteinen testen zu können. Die Überlegenheit des „Split-Ubiquitin“-Systems gegenüber dem „Two-Hybrid“-System liegt in der Abspaltung eines Reporters von einem Fusionsprotein. Im Gegensatz dazu müssen beim „Two-Hybrid“-System die zu untersuchenden Proteine an Transkriptionsfaktoren gekoppelt sein und in den Zellkern lokalisiert werden, um die Expression eines Reportergens zu induzieren.

Das Ubiquitin-Fusionsprotein kann in zwei Teilen exprimiert werden. Für den N-terminalen Bereich (Nub-WT) codieren die Aminosäuren 1-34 und der C-terminale Bereich (Cub) wird von den Aminosäuren 35-76 codiert, an den ein Reporterprotein (Cub-rep) gebunden wird. Aufgrund hoher Affinitäten des Nub-WT für Cub bzw. Cub-rep reassoziieren beide Teile spontan zu einem Split-Ubiquitin-Heterodimer, bei einem Zusammentreffen in der Zelle (Stagljar *et al.*, 1998). Dieses wird unter der Voraussetzung der korrekten Faltung des Ubiquitins von UBPs erkannt und die Abspaltung des Reporterproteins von Cub erfolgt unmittelbar hinter der letzten Aminosäure des Ubiquitins

an der Ubiquitin-Polypeptid-Verbindung (Eckert *et al.*, 2001). Um die spontane Bildung eines solchen Heterodimers zu vermindern wurde das Nub modifiziert, indem die Aminosäure Isoleucin an Position 13 im Nub-Wildtyp (Nub-WT) gegen Alanin (NubA) bzw. Glycin (NubG) ausgetauscht wurde. Die *in vivo* Assoziation von NubG bzw. NubA mit Cub-rep ist nun abhängig von zusätzlichen Proteinwechselwirkungen, die sich durch die Fusion von Protein 1 mit NubG und Protein 2 mit Cub-rep testen lassen. Interagieren Protein 1 und Protein 2 miteinander, so gelangen auch NubG und Cub-rep in räumliche Nähe und es bildet sich ein Split-Ubiquitin-Heterodimer (Stagljar *et al.*, 1998). Die daraufhin folgende Abspaltung des Reporterproteins ist ein Indiz für die Wechselwirkung zwischen den zu untersuchenden Proteinen und schließlich für die korrekte Faltung des Ubiquitins (Eckert *et al.*, 2001). Das Split-Ubiquitin-System stellt jedoch eine wesentliche Bedingung für Interaktionsstudien von Membranproteinen; da sich die UBP's im Cytosol befinden, müssen Nub und Cub an die in das Cytosol ragenden Bereiche der zu untersuchenden Proteine gebunden sein (Stagljar *et al.*, 1998).

Eine Vielfalt von Reportern, die mit Cub fusionieren können, machen die „Split-Ubiquitin“-Methode zu einem System, das sich auf unterschiedliche Anforderungen einstellen kann (Eckert *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde das modifizierte NubG und als Reporterprotein der modifizierte Transkriptionsfaktor PLV (ProteinA-LexA-Vp16) verwendet. PLV kann nach seiner Abspaltung von Cub in den Zellkern diffundieren und die Transkription eines Reportergens mit *lexA*-Bindestelle induzieren. Das Protein A enthält zwei IgG Bindedomänen, die eine einfache Detektion des Fusionsproteins (Cub-PLV) oder auch des abgespaltenen Reporterproteins (PLV) erlauben. Die LexA-VP16-Kassette besteht aus dem gesamten DNA-bindenden Protein LexA und der transkriptionalen Aktivierungsdomäne von VP16 (Pellet *et al.*, 1985). LexA-VP16 kann Reportergene mit einer *lexA*-Bindestelle in der Promotorregion aktivieren (Stagljar *et al.*, 1998). Für diese Arbeit wurden die Reportergene *HIS3*, *ADE2* und *lacZ* verwendet. Dadurch ließen sich die Protein-Wechselwirkungen zum einen durch die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität und zum anderen durch Wachstumstests von histidin- und adenin-auxotrophen Zellen auf Reportermedien untersuchen.

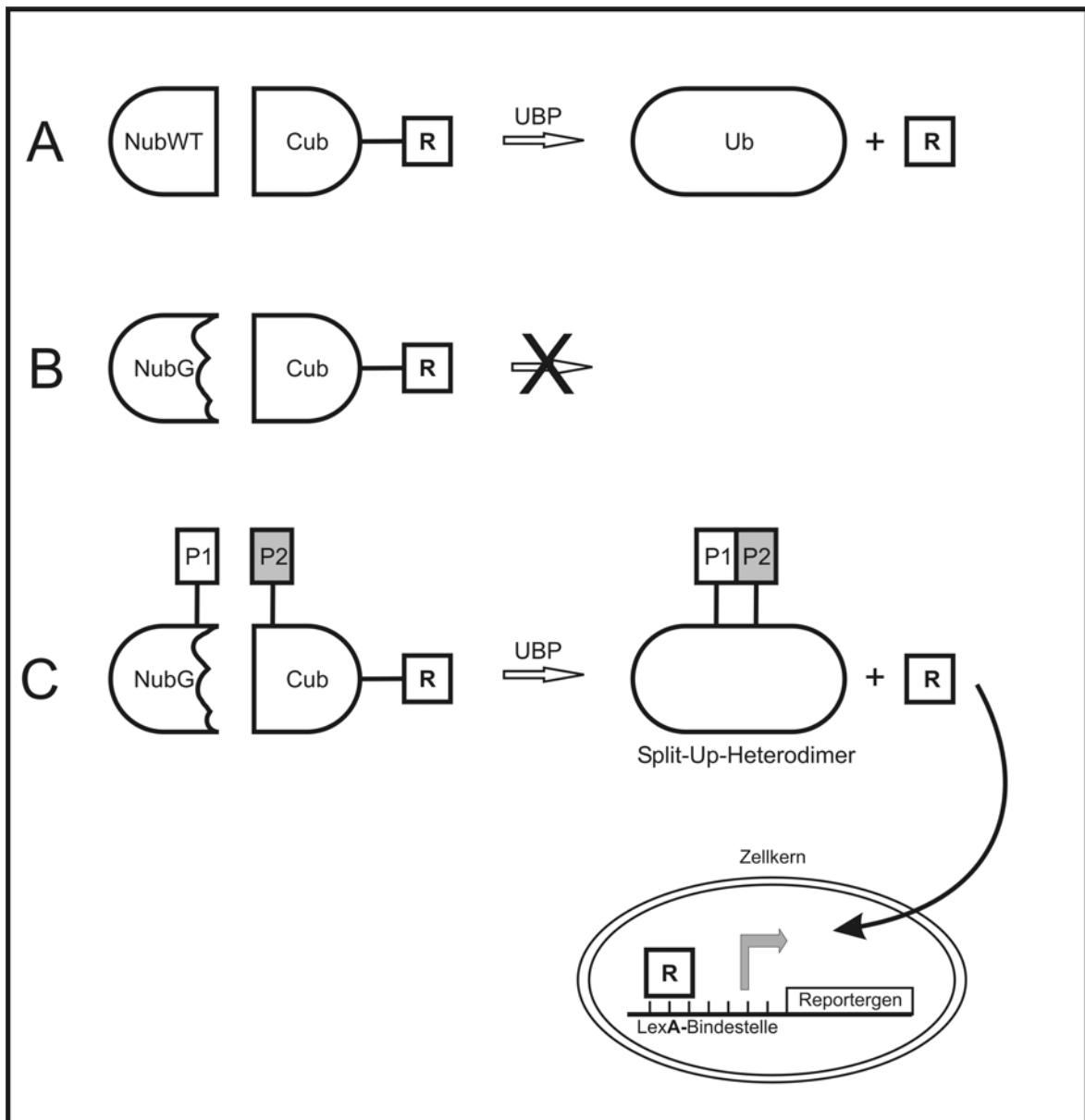


Abb. 1: Schematische Darstellung der Funktion des „Split-Ubiquitin“-Systems

A) Werden die N-terminale Hälfte des Ubiquitins (NubWT) und das Cub-Reporterfusionsprotein koexprimiert, reassoziieren beide Ubiquitin-Peptide zu einem kompletten Ubiquitin-Molekül.

B) Mutationen in der Position 13 des NubWT beeinträchtigen seine Bindung an Cub. Der Reporter wird trotz Koexpression nicht oder nur sehr langsam von Cub abgespalten.

C) Eine Nub-Mutante (NubG) wird an ein Protein 1 (P1) und das Cub-Reporterfusionsprotein (Cub-R) an ein 2. Protein (P2) gebunden. P1 und P2 interagieren in der Zelle miteinander. Dadurch werden NubG und Cub-Reporter zusammengeführt und es folgt eine Abspaltung des Reporters. Der Reporter kann in den Zellkern diffundieren und dort ein *lexA*-gesteuertes Reportergen induzieren.

1.7 Ziele dieser Arbeit

Die, in der Plasmamembran lokalisierten Proteine, Snf3 und Rgt2, agieren als hoch- und niedrig-affine Glukosesensoren, die in Anpassung an externe Glukosekonzentrationen die Expression bestimmter Hexosetransporter induzieren. Die Signaltransduktions-Komponenten Mth1, Std1 und Rgt1 befinden sich im Cytoplasma bzw. im Zellkern und sind an der Signalweiterleitung beteiligt. Der genaue Mechanismus der Signaltransduktion ist bisher jedoch nicht bekannt.

Um Einblicke in den molekularen Mechanismus der Signaltransduktion zu erhalten, sollte in der hier vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob zwischen den einzelnen Proteinen Snf3, Rgt2, Mth1, Std1 oder Rgt1 direkte Interaktionen stattfinden und ob diese Protein-Wechselwirkungen von verschiedenen Glukosekonzentrationen bzw. von der C-Quelle abhängig sind. Für diese Untersuchungen wurde das Split-Ubiquitin-System verwendet, das sich für *in vivo* Interaktionsstudien zwischen löslichen und membrangebundenen Proteinen eignet.

Für den Galaktosetransporter Gal2, der Galaktose wie auch Glukose transportiert, sind die für den Galaktosetransport verantwortlichen Aminosäuren bekannt. Entsprechende Austausche, der für den Galaktosetransport verantwortlichen Aminosäuren, in den homologen Positionen des Hxt2 Transporters führten dazu, dass dieser modifizierte Hexosetransporter ebenfalls diese beiden Zucker transportiert.

In dem zweiten Teil dieser Arbeit wurde geprüft, ob sich aus dem Glukosesensor Snf3 in analoger Weise, ebenfalls durch eine Aminosäuresubstitution, ein bifunktionaler Sensor für Glukose und Galaktose erzeugen läßt. Dazu wurden die für den Galaktostransport verantwortlichen Aminosäuren in den homologen Positionen von Snf3 ausgetauscht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Stämme und Nährmedien von *Escherichia coli*

Tab. 1: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
DH10B	<i>F', mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC), F80dlacZDM15, D lacX74, deoR, recA1, araD139, D(ara, leu)7697, galU, galK, l-, rpsL, end A1, nupG</i>	Gibco BRL Gaithersburg/MD,USA

Vollmedium (LB): 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, pH 7,5
(nach Maniatis *et al.*, 1982)

Für die Selektion auf eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurde dem Vollmedium nach dem Autoklavieren 40 µg/ml Ampicillin (Serva) zugesetzt.

Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 1,5% Agar. Die Anzucht der *E. coli* Zellen erfolgte bei 37°C.

2.1.2 Stämme und Nährmedien von *S. cerevisiae*

Tab. 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae* Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
THY.AP4	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 LexA-Promotor::HIS3, lex-A-Promotor::ADE2, Δtrp1-289::lexA-Promotor::lacZ</i>	Hamacher, Frankfurt
THY.AP5	<i>MATα URA3 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ1 Δade2::loxP</i>	Hamacher, Frankfurt
RWY 28	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8c SUC2 Δhxt7::lacZ-KanMX</i>	Wieczorke, 1998
RWY 29	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8c SUC2 Δsnf3::loxP Δhxt7::lacZ-KanMX</i>	Wieczorke, 1998
FY 1679	<i>MATa/α ura3-52/ura3-52 leu2Δ1/LEU2 trp1Δ63/TRP1 his3Δ200/HIS3</i>	Winston <i>et al.</i> , 1995

Vollmedium (YEP): 1% Hefeextrakt, 2% Bacto-Pepton, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegebenen Konzentration

Minimalmedium (YNB): 0,67% Yeast nitrogen base w/o amino acids, pH 6,3, Aminosäure/Nukleobase-Lösung, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegeben Konzentration

Konzentration der Aminosäuren und Nukleobasen im Minimalmedium:

(nach Zimmermann, 1975):

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)

Bei der Selektion transformierter Zellen auf eine oder mehrere Auxotrophie-Marken wurden die entsprechenden Aminosäuren oder Basen nicht zu dem Medium hinzu gegeben.

Innerhalb dieser Arbeit wurden folgende Kohlenstoffquellen verwendet: Glukose, Maltose und Galaktose. Die Stammlösungen der Kohlenstoffquellen wurden autoklaviert. Feste Nährböden enthielten zusätzlich 2% Agar. Die Anzucht der Hefezellen erfolgte bei 30°C.

2.2 Chemikalien und Enzyme

2.2.1 Chemikalien

Tab. 3: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien

Quelle/Referenz	Chemikalien
Acros Organics	Calciumchlorid, Galaktose, Harnstoff, Kaliumacetat, Lysin, Maltose, Natriumacetat,
Biomers	synthetische Oligonukleotide
Braun-Melsungen	Glasperlen 0,45 mm Ø
Caesar & Loretz	Glukose

Difco	bakteriologischer Agar, Hefeextrakt, Bacto-Pepton, Yeast Nitrogen Base (YNB)
Fluka	Glycin,
Gibco BRL	Agarose,
J.T. Baker	Harnstoff, Kaliumacetat, Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4), Kaliumhydroxid, Magnesiumchlorid (MgCl_2), Natriumchlorid (NaCl), Natriumhydroxid
MBI	Lambda-Phagen-DNA
Merck	Adenin, EDTA, di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4), Leucin, Magnesiumsulfat, di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4), Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4), Uracil
New England Biolabs	Restriktionsendonukleasen, BSA
Oxoid	bakteriologischer Agar, Hefeextrakt, Pepton
Pharmacia	dNTP-Mix
Qiagen	Plasmid Mini Kit, Qiaex II Gel Extraction Kit, Qiaquick PCR Purification Kit
Riedel-de Haen	Essigsäure, Ethanol, Methanol
Roche	alkalische Phosphatase, Expand TM High Fidelity PCR System, Restriktionsendonukleasen, Proteaseinhibitor (PI),
Roth	Ampicillin, Glycin, Isopropanol, Kaliumchlorid, 2-Mercaptoethanol, Phenol, Trichloressigsäure, Tris, Kupfersulfat, Magnesiumsulfat, Ethidiumbromid, PMSF (Polymethylsulfonylfluorid),
Serva	Albumin Bovine Fraction V (BSA), Glycerin, Maltose, Natrium-dodecylsulfat (SDS),
Sigma	Antimycin A, Ethidiumbromid, IPTG, Lithiumacetat, Tris, PEG 3350
Whatman	3 MM Papier,

Nicht einzeln aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Sigma oder Roth bezogen.

2.2.2 Enzyme

Tab. 4: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Enzyme

Enzym	Quelle
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
High fidelity	Roche

Nicht einzeln aufgeführte Enzyme wurden von der Firma Roche bezogen.

2.2.3 Antikörper

Tab. 5: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper (AK)

Antikörper	mono-/polyklonal	Quelle/Referenz
anti-HA High Affinity, primärer AK aus Ratte (1:1.000)	monoklonal	Roche
anti-Ratte-IgG-POD-Konjugat, sekundärer AK vom Schaf (1:10.000)		Roche
anti-Maus VP16 (1-21) IgG, primärer AK aus Maus (1:1.000)	monoklonal	Biotechnologie Inc. Santa Cruz
anti-Maus IgG-POD-Konjugat, sekundärer AK aus Ziege (1:12.500)		Jackson Immuno Research

2.2.4 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (Ulm) synthetisiert. Das Lösungsvolumen der Oligonukleotide in Wasser wurde so gewählt, dass eine Endkonzentration von 100 pmol/μl erreicht wurde.

Tab. 6: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
SNF3-A	aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc atg gat cct aat agt aac ag
SNF3-E	tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta ttt caa atc att att ttc att
RGT2-A	aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc atg aac gat agc caa aac tgc
RGT2-E	tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta ttg ggg gga agt gta ttg gct
MTH1-A	aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc atg ttt gtt tca cca cca cc
MTH1-E	tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta gga tac tga atc cgg ctg cc
STD1-A	aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc atg ttt gtt tca cca cct cc
STD1-E	tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta gga cat tcc atc agg ctt cc
RGT1-A	aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tct cca acc acc atg aac gag ctg aac act gtt
RGT1-E	tcc gcc acc acc aac cac ttt gta caa gaa agc tgg gta ata cca gcc taa ctc gga atc
XbaI/Snf3-A	acc atg att acg cca agc ttg cat gcc tgc agg tcg act ttc tta tta tgt ctt ata gt
Snf3mut-A	tgt cta ttc ata gct gcc tat tct gct aca tgg ggt ggt gtt
EcoRI/Snf3-E	ttc cca gtc acg acg ttg taa aac gac ggc cag tga att cc agt gtt ata cgt ggc tcc
Snf3mut-E	aac acc acc cca tgt agc aga ata ggc agc tat gaa tag aca
Snf3-A(-80)	cta tag cca act tta ttg tg

2.2.5 Plasmide

Tab. 7: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Quelle/Referenz
Met25-CPLV	Petr Obrdlik, Tübingen
NXgate-32	Petr Obrdlik, Tübingen
XNgate-22	Petr Obrdlik, Tübingen
NXgate-3HA	Mohamed Bakkoury, Brüssel
XNgate-3HA	Mohamed Bakkoury, Brüssel
YCplac22	Gietz und Sugino (1988)

2.2.6 Plasmidkonstruktionen

Tab. 8: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
CubMet25/Rgt2	<i>RGT2</i> wurde als 2,3 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Rgt2-A und Rgt2-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>PstI/HindIII</i> geschnittenen Vektor Met25CPLV kloniert
CubMet25/Snf3	<i>SNF3</i> wurde als 2,6 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Snf3-A und Snf3-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>PstI/HindIII</i> geschnittenen Vektor Met25CPLV kloniert
CubMet25/Mth1	<i>MTH1</i> wurde als 1,3 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Mth1-A und Mth1-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>PstI/HindIII</i> geschnittenen Vektor Met25CPLV kloniert
CubMet25/Std1	<i>STD1</i> wurde als 1,3 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Std1-A und Std1-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>PstI/HindIII</i> geschnittenen Vektor Met25CPLV kloniert
CubMet25/Rgt1	<i>RGT1</i> wurde als 3,5 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Rgt1-A und Rgt1-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>PstI/HindIII</i> geschnittenen Vektor Met25CPLV kloniert
NubX32/Rgt2	<i>RGT2</i> wurde als 2,3 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Rgt2-A und Rgt2-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor NX32 kloniert
NubX32/Snf3	<i>SNF3</i> wurde als 2,6 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Snf3-A und Snf3-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor NX32 kloniert
NubX32/Mth1	<i>MTH1</i> wurde als 1,3 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Mth1-A und Mth1-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor NX32 kloniert
NubX32/Std1	<i>STD1</i> wurde als 1,3 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Std1-A und Std1-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor NX32 kloniert
NubX32/Rgt1	<i>RGT1</i> wurde als 3,5 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Rgt1-A und Rgt1-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor NX32 kloniert

XNub22/Rgt2	<i>RGT2</i> wurde als 2,3 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Rgt2-A und Rgt2-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/ClaI</i> geschnittenen Vektor XN22 kloniert
XNub22/Snf3	<i>SNF3</i> wurde als 2,6 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Snf3-A und Snf3-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/ClaI</i> geschnittenen Vektor XN22 kloniert
XNub22/Mth1	<i>MTH1</i> wurde als 1,3 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Mth1-A und Mth1-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/ClaI</i> geschnittenen Vektor XN22 kloniert
XNub22/Std1	<i>STD1</i> wurde als 1,3 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Std1-A und Std1-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/ClaI</i> geschnittenen Vektor XN22 kloniert
XNub22/Rgt1	<i>RGT1</i> wurde als 3,5 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Rgt1-A und Rgt1-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/ClaI</i> geschnittenen Vektor XN22 kloniert
NubX3HA/Rgt2	<i>RGT2</i> wurde als 2,3 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Rgt2-A und Rgt2-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor NX3HA kloniert
NubX3HA/Snf3	<i>SNF3</i> wurde als 2,6 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Snf3-A und Snf3-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor NX3HA kloniert
NubX3HA/Mth1	<i>MTH1</i> wurde als 1,3 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Mth1-A und Mth1-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor NX3HA kloniert
NubX3HA/Std1	<i>STD1</i> wurde als 1,3 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Std1-A und Std1-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor NX3HA kloniert
NubX3HA/Rgt1	<i>RGT1</i> wurde als 3,5 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Rgt1-A und Rgt1-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor NX3HA kloniert
XNub3HA/Rgt2	<i>RGT2</i> wurde als 2,3 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679A) mittels PCR mit den Primern Rgt2-A und Rgt2-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor XN3HA kloniert

XNub3HA/Snf3	<i>SNF3</i> wurde als 2,6 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Snf3-A und Snf3-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor XN3HA kloniert
XNub3HA/Mth1	<i>MTH1</i> wurde als 1,3 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Mth1-A und Mth1-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor XN3HA kloniert
XNub3HA/Std1	<i>STD1</i> wurde als 1,3 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Std1-A und Std1-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor XN3HA kloniert
XNub3HA/Rgt1	<i>RGT1</i> wurde als 3,5 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern Rgt1-A und Rgt1-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>EcoRI/PstI</i> geschnittenen Vektor XN3HA kloniert
YCplac22/ Snf3-WT	<i>SNF3-WT</i> wurde als 3,5 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mittels PCR mit den Primern XbaI/Snf3-A und EcoRI/Snf3-E amplifiziert und durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>XbaI/EcoRI</i> geschnittenen Vektor YCplac22 kloniert
YCplac22/ Snf3-Mut	<i>SNF3-Mut</i> wurde als 1,9 kb Fragment und als 1,6 kb Fragment aus genomischer DNA (FY 1679) mit den Primern XbaI/Snf3-A und Snf3mut-E bzw. Snf3mut-A und EcoRI/Snf3-E mittels je einer PCR amplifiziert. Die beiden Fragmente wurden durch <i>in-vivo</i> -Rekombination in den mit <i>XbaI/EcoRI</i> geschnittenen Vektor YCplac22 kloniert, so dass ein 3,5 kb großes <i>SNF3-PLUS-MUT</i> -Insert entstand.

2.3 Methoden

2.3.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* Zellen wurde mit der Elektroporationsmethode nach Dower *et al.* (1988) und Wirth (1993) mittels eines Easyject-Gerätes der Firma EQUIBIO durchgeführt.

2.3.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Zellen wurden nach der Lithium-Acetat-Methode von Gietz und Woods (1994) mit Plasmid- und Insert-DNA transformiert.

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der Methode von Birnboim und Doly (1979).

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

Die Zellen aus einer stationären Hefekultur (5 ml) wurden geerntet, gewaschen und in 200 µl Puffer 1 (Plasmid Mini Kit, Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer 2 und 2/3 Volumen Glasperlen ($\varnothing = 0,45$ mm) wurden die Zellen innerhalb von 5 min mit einem Vibrax (IKA, Vibrax-VXR) aufgeschlossen. Der Überstand wurde mit 125 µl Puffer 3 versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die Plasmid-DNA (Überstand) mit 400 µl eiskaltem Isopropanol gefällt, mit 70% kaltem Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen. Die Plasmid-DNA wurde anschließend für die Transformation in *E. coli* (Abschnitt 2.3.1) eingesetzt.

2.3.5 Enzymatische Modifikation von DNA

Die sequenzspezifische Spaltung der DNA erfolgte mit 2-5 U Enzym pro µg Plasmid-DNA für 2-3 h bei 37°C.

2.3.6 PCR-Amplifizierung von DNA

Die Amplifizierung der DNA durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl und wurde mit dem „Expand™ High Fidelity PCR System“ (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zu der zu amplifizierenden DNA wurden, soweit nicht anders angegeben, 10 mM dNTP's, 1 x PCR-Puffer (15 mM MgCl₂), 1 x MgCl₂-Lsg. (25 mM), 3,5 U Taq-Polymerase und je 100 pmol der entsprechenden Oligonukleotidprimer gegeben. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler der Firma Techne durchgeführt. Zu Beginn wurde die DNA für 4 min bei 95°C denaturiert, dann erfolgte die Zugabe der Polymerase („Hot Start PCR“). Die folgenden drei Schritte (Denaturierung, Annealing/Primerbindung und Elongation/DNA-Synthese) wurden wie im Ergebnisteil beschrieben durchgeführt. Der letzte Schritt zur DNA-Synthese erfolgte für 7 min bei 72°C.

Nach Beendigung der PCR konnten die PCR-Produkte durch Gelelektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 2.3.9) und gemäß der unter Abschnitt 2.3.8 oder Abschnitt 2.3.10 beschriebenen Methode aufgereinigt und isoliert werden.

2.3.7 Klonierung durch homologe Rekombination

Das zu klonierende Gen wurde mit speziellen Oligonukleotiden über PCR amplifiziert (Abschnitt 2.3.6). Die Oligonukleotide binden an den Anfang bzw. das komplementäre Ende der zu amplifizierenden Sequenz und besitzen Anhänge, die homolog zu den Gensequenzen sind, in die das PCR-Produkt integriert werden sollen. Die homologe Rekombination, auch als *in-vivo* Rekombination bezeichnet, erfolgte nach Transformation in *S. cerevisiae* (Abschnitt 2.3.2) und wurde bei der Integration in ein Plasmid angewendet.

2.3.8 DNA-Aufreinigung

Die DNA wurde mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.3.9 Auftrennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe zwischen 0,2-20 kb erfolgte in 1%igen Agarosegelen. Als Gel- und Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) (nach Maniatis et al., 1982). Als Größenstandard diente eine mit *EcoRI*- und *HindIII*-geschnittene Lambda-Phagen-DNA. Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zu der noch heißen Agarose und durch UV-Bestrahlung (254 nm) nach der Auftrennung sichtbar gemacht.

2.3.10 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel unter langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten und unter Verwendung des „QIAquick-Gel-Extraction Kit (50)-Protokol“ (Qiagen) nach der Anleitung des Herstellers entsprechend isoliert.

2.3.11 Präparation von Cytoplasmaproteinextrakten

Von jedem Nub-Transformanten (Abschnitt 3.1.1.2.2) wurden zwei Kolonien in jeweils 2,5 ml synthetischem Minimalmedium mit 2% Glc/Trp⁻ bis zur stationären Phase kultiviert. Von jeder dieser stationären-phase Kulturen wurden 0,5 ml in 5 ml Minimalmedium mit 2% Glc/Trp⁻ verdünnt und auf log-Phase angezogen. Die Zellen sollten sich zweimal verdoppeln und wurden bei einer OD₆₀₀ ~ 0,5 geerntet (4000 rpm, 3 min, 4°C). Das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem Tris-Puffer gewaschen und erneut pelletiert (13.000 rpm, 1 min, 4°C). Die Zellen wurden in 0,1 ml eiskaltem Triton-Puffer mit 0,004 ml PI aufgenommen und resuspendiert. Der Hefezellaufschluß erfolgte durch Zugabe von 0,2 g Glasperlen (ø 0,45-0,5) und kräftigem Schütteln für 5 min bei 4°C auf Vibrax (IKA, Vibrax-VXR). Anschließend wurde 0,25 ml Triton-Puffer mit 0,01 ml PI (Proteaseinhibitor) zugegeben und gut gemischt. Die Zellwände wurden durch zentrifugieren bei 3000 rpm (!) für 3 min und bei 4°C sedimentiert. Die Cytoplasmaproteinfraktionen wurden mit dem Überstand abgenommen und eingefroren bzw. direkt für SDS-PAGE verwendet (Abschnitt 2.3.13).

Der Triton-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,3 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 0,5% Triton-X100 oder NP-40, 10 %Glycerin, PI) wurde jeweils erst zum Zeitpunkt der Verwendung mit PI (Proteaseinhibitor Mix von Roche) im Verhältnis 1:25 versetzt.

2.3.12 Präparation von Membranproteinextrakten

Von jedem Nub-Transformanten (Abschnitt 3.1.1.2.2) wurden zwei Kolonien in jeweils 2,5 ml synthetischem Minimalmedium mit 2% Glc/Trp⁻ bis zur stationären Phase kultiviert. Je 0,5 ml dieser stationären-phase Kulturen wurden in 5 ml Minimalmedium mit 2% Glc/Trp⁻ verdünnt und auf log-Phase angezogen. Die Zellen sollten sich zweimal verdoppeln und wurden bei einer OD₆₀₀ ~ 0,5 durch zentrifugieren (4000 rpm, 3 min, 4°C) geerntet. Das Sediment wurde in 1 ml eiskaltem Tris-Puffer (50 mM, pH 7,5) aufgenommen und nochmals abzentrifugiert und das Pellet anschließend in 0,1 ml Extraktionspuffer resuspendiert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 0,2 g kalten Glasperlen und kräftigem Schütteln für 8 min bei 4°C auf Vibrax (IKA, Vibrax-VXR) lysiert. Anschließend wurde 0,05 ml Extraktionspuffer zugegeben und gut gemischt. Die Abtrennung der Zellwände erfolgte durch zentrifugieren bei 3000 rpm (!) für 3 min bei 4°C. Die Membranproteinfraktionen wurden mit dem Überstand abgenommen und eingefroren bzw. direkt für SDS-PAGE verwendet (Abschnitt 2.3.13).

Der Extraktions-Puffer (50 mM Tris, pH 7,5, PMSF, PI) wurde jeweils erst zum Zeitpunkt der Verwendung mit PMSF (20 mg Polymethylsulfonylflourid in 1 ml Isopropanol lösen) im Verhältnis 1:500 und mit PI (Proteaseinhibitor Mix von Hofmann La Roche) im Verhältnis 1:25 versetzt.

2.3.13 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) beruht auf der Methode von Laemmli (1970). Zur Auftrennung der Proteine wurden ein 5%iges Sammelgel (5,9 ml H₂O, 2,5 ml Upper Tris, (0,4% SDS, 0,5 M Tris HCl pH 6,8), 1,6 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 75 µl 20% APS, 15 µl TEMED) und ein 10%iges Trenngel (16,2 ml H₂O, 10 ml Lower Tris (0,4% SDS, 1,5 M Tris HCl, pH 8,8), 13,3 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 200 µl APS, 25 µl TEMED) verwendet (Maniatis, 1982). Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 0,192 M Glycin und 0,1% SDS. Die Proben wurden mit 0,2% Bromphenolblau versetzt und die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 50 V über Nacht. Als Molekulargewichtsstandard diente der „Prestained High Molecular Weight Standard“ von Sigma bzw. Precision Plus Protein von BioRad.

Alternativ erfolgte die Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen in einer **BIO-RAD**-Apparatur. Dazu wurden zwei 5%ige Sammelgele (5,2 ml Upper Tris, 0,4% SDS, 0,5 M Tris HCl pH 6,8), 900 µl 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 36 µl 20% APS, 4,5 µl TEMED) und zwei 10%ige Trenngele (2 ml H₂O, 6 ml Lower Tris (0,4% SDS, 1,5 M Tris HCl, pH 8,8), 4 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 120 µl 20% APS, 6 µl TEMED) verwendet. Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 0,192 M Glycin und 0,1% SDS. Die Proben wurden mit 0,2% Bromphenolblau versetzt und die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150 V über 1 ½ Stunden. Als Molekulargewichtsstandard diente der „Dual-Color“ von BioRad.

2.3.14 Nachweis von Proteinen durch Westernblot-Analyse

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Übertragung erfolgte in Blotting-Puffer (25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 0,1% SDS, 20% MeOH) für 2 h bei 55 V (25 mA). Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Membran für 1 h in Blocking-Puffer (50 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl, 0,1% Triton, 1% Milchpulver) blockiert. Zur Präadsorption des primären Antikörpers wurden 5 µl anti-HA zu 50 µl Zellextrakt (ABS) und 445 µl Blocking-Puffer gegeben und anschließend in 10 ml Blocking-Puffer verdünnt. Die Reaktion mit dem Primärantikörper erfolgte für 2-14 h bei RT. Danach wurde die Membran 3x mit Blocking-Puffer gewaschen und anschließend für 1-2 h mit dem Sekundärantikörper (in Blocking-Puffer verdünnt) bei RT inkubiert. Die Membran wurde wiederum 3x mit Blocking-Puffer gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch eine Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenzreaktion. Der Peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper wurde dabei durch die Zugabe eines Chemilumineszenzsubstrates (Super Signal Ultra chemiluminescent substrate) und anschließendem Auflegen eines Röntgenfilms detektiert.

2.3.15 Nachweis von Proteinen mit spezifischen und unspezifischen Antikörpern

Der anti-HA High-Affinity-Antikörper wurde für die Western-Blot-Analyse 1:1.000 verdünnt. Dieser spezifische Antikörper reagiert mit rekombinanten Proteinen, die mit dem HA-Epitop modifiziert wurden, unabhängig von der Position des HA-Peptids innerhalb des Proteins (epitope tagging). Der unspezifische Sekundär-Antikörper anti-Ratte-IgG-POD-Konjugat gegen anti-HA wurde in der Verdünnung 1:10.000 eingesetzt.

Der Primär-Antikörper anti-Maus VP16 (1-21) IgG wurde für die Western-Blot-Analyse 1:1.000 verdünnt. Dieser spezifische Antikörper erkennt die IgG Bindedomänen des Proteins A im PLV-Reporterprotein. Der Sekundär-Antikörper Anti-Maus IgG Peroxidase-Konjugat wurde für die Western-Blot-Analyse 1:12.500 verdünnt verwendet.

2.3.16 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

5 ml Hefekultur wurden bei einer OD_{600} von 0,4–0,8 (log-Phase) geerntet (4000 rpm, 3 min) und mit 1 ml kaltem Kaliumphosphat-Puffer (50 mM K_iPO_4 , pH 7,0) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (13.000 rpm, 1 min) und der Überstand in 0,1 ml kaltem Kaliumphosphat-Puffer resuspendiert. Alle weiteren Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt. Der Zellaufschluß erfolgte durch Zugabe von 0,2 g Glasperlen (\emptyset 0,45-0,5) und kräftigem Schütteln für 5 min bei 4°C (IKA, Vibrax-VXR). Anschließend wurde je 0,25 ml kalter Kaliumphosphat-Puffer zugegeben und gut gemischt. Die Abtrennung der Zellwände und -membranen aus dem Rohextrakt erfolgte durch Zentrifugation für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und eingefroren oder direkt für β -Gal-Messungen und Proteinbestimmungen (Abschnitt 2.3.17) verwendet.

Für Experimente, bei denen die Enzymaktivität auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen gemessen wurden, erfolgte die Kultivierung der Zellen zunächst über Vorkulturen in Selektiv-Medien mit 2% Glukose/Trp⁻ Leu⁻. Anschließend wurden die Zellen in Minimal-Medium mit der entsprechenden Kohlenstoffquelle gewaschen und in dem gleichen Medium bis zu einer OD_{600} von 0,4-0,8 angezogen.

Die Enzymaktivität der β -Galaktosidase wurde nach Miller (1972) bestimmt. Die Reaktion erfolgte abweichend nicht bei 30°C, sondern in einem Heizblock bei 37°C und in einem Gesamtvolumen von 1 ml. 950 μ l lacZ-Puffer (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM

MgSO₄, pH 7,0 eingestellt und 1 mg/ml frisch gelöstem ONPG) wurde für 5-10 min bei 37°C vorgewärmt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Rohextraktes gestartet und bei einer leichten Gelbfärbung nach 0,1-240 min durch Hinzufügen von 0,5 ml einer 1 M Na₂CO₃ Lösung gestoppt. Die Enzymaktivität konnte durch anschließende spektralphotometrische Messung der Extinktion bei 420 nm gegen einen Blindwert (Puffer statt Rohextrakt) berechnet werden. Der Extinktionskoeffizient beträgt unter diesen Bedingungen $4,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.3.17 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit der Mikrobiuret-Methode nach Zamenhoff (1957) bestimmt. Als Standard diente Rinderserumalbumin in Konzentrationen von 0 bis 200 µg/ml. Zu 950 µl Wasser und 0,5 ml Mikrobiuret-Reagenz (150 ml 10 M NaOH + 40 ml 1%iges Kupfersulfat) wurden 50 µl Rohextrakt-Proben gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktionmessung der Proben erfolgte in Quarzküvetten bei 290 nm.

2.3.18 Interaktionstests mit dem „Split-Ubiquitin“-System auf Reportermedien

Von jedem Cub-Transformanden (Abschnitt 3.1.1.1.3) wurden jeweils zwei Kolonien in 2,5 ml synthetischem Minimalmedium mit 2% Glc/Leu⁻ bis zur stationären Phase kultiviert. Ebenso wurden von jedem Nub-Transformanden (Abschnitt 3.1.1.2.2) jeweils zwei Kolonien in 2,5 ml synthetischem Minimalmedium mit 2% Glc/Trp⁻ bis zur stationären Phase kultiviert. Die Kreuzung der Haplonden zu einer diploiden Zygote erfolgte, indem 5 µl einer Probe des THY.AP4-Stammes (Cub-Konstrukt) auf eine YPD-Platte getropft wurde. Über die getrockneten Zellen wurde anschließend die gleiche Menge einer Probe des THY.AP5-Stammes (Nub-Konstrukt) aufgetragen und für 7-8 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Replikaplattierung auf Minimalmedium mit 2% Glukose/Trp⁻ Leu⁻ wurden die diploiden Zellen mit den Nub- und Cub-Plasmiden, nach 2-3 Tagen Wachstum bei 30°C, selektiert. Anschließend wurden die Diplonden auf verschiedene Reportermedium-Platten überstempelt und erneut für 2-3 Tage bei 30°C inkubiert. Die Protein-Wechselwirkungen wurden auf folgenden Reportermedien getestet:

2% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻,
2% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met,
1% Maltose/ Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻,
1% Maltose/ Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met.
0,1% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻ und
0,1% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met

Die Kreuzungsversuche wurden stets nach dem gleichen Schema ausgeführt. Die Cub-Transformanden wurden von links nach rechts in der Reihenfolge Rgt2, Snf3, Mth1, Std1 und Rgt1 aufgetragen und die Nub-Transformanden in der gleichen Reihenfolge von oben nach unten.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der möglichen direkten Interaktionen zwischen den Proteinen Snf3, Rgt2, Mth1, Std1 und Rgt1 untereinander in der Hefe *S. cerevisiae*

Die Glukosesensoren Snf3 und Rgt2 sind integrale Membranproteine in der Hefe *S. cerevisiae*. Dabei ist das Snf3-Protein ein hoch-affiner Glukosesensor für niedrige Glukosekonzentrationen im Außenmedium, während Rgt2 als niedrig-affiner Glukosesensor hohe Glukosekonzentrationen im Außenmedium detektiert. Bei entsprechenden Glukosekonzentrationen im externen Medium wird durch diese Sensoren eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Expression bestimmter Hexosetransporter-Proteine führt.

Die Signaltransduktionskomponenten Mth1, Std1 und Rgt1 befinden sich im Cytoplasma bzw. im Zellkern und sind an der Signalweiterleitung beteiligt. Der genaue Mechanismus der Signaltransduktion ist bisher jedoch ungeklärt. Daher sollte untersucht werden, ob unter den einzelnen Proteinen eine direkte Interaktion stattfindet und ob diese Interaktionen von verschiedenen C-Quellen bzw. Glukosekonzentrationen beeinflusst werden. Für die Untersuchungen der Protein-Interaktionen wurde das Split-Ubiquitin-System verwendet. Dieses System eignet sich für *in vivo* Interaktionsstudien zwischen löslichen und membranlokalisierten Proteinen (Johnsson und Varshavsky, 1994).

3.1.1 Konstruktbeschreibungen

Um die Proteine Snf3, Rgt2, Mth1, Std1 und Rgt1 im „Split-Ubiquitin“-System auf direkte Interaktion untereinander überprüfen zu können, wurden die Gene jeweils in Plasmide mit Cub- bzw. Nub-Anhängen kloniert und in haploide *S. cerevisiae* Stämme Mata bzw. Mata α transformiert. Anschließend wurden die Transformanden auf YEPD-Medium gepaart und zur Selektion der diploiden Zellen (Mata/ α) auf Mediumplatten mit 2% Glukose/Trp⁻Leu⁻ausgestrichen. Durch die Replikaplattierung auf Reportermedium konnten dann die Interaktionen zwischen den jeweiligen Cub- und Nub-Fusionsproteinen detektiert werden. Die Protein-Wechselwirkungen wurden zusätzlich durch die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität und durch die interaktions-vermittelte Abspaltung von PLV überprüft.

Für die Interaktionsstudien wurden die zu untersuchenden Gene jeweils in ein Cub-Plasmid und in vier verschiedene Nub-Plasmide kloniert um herauszufinden, welche Plasmidkonstruktionen in Hinsicht auf eine Interaktion funktionell sind. Denn durch die *in vivo* Rekombination könnten die Gene selbst als auch NubG bzw. Cub-PLV in den rekombinanten Plasmiden verändert werden. Denkbar wäre auch, dass Nub- oder Cub durch die Konformation des Fusionsproteins in eine Position gelangen in der sie außerstande sind, mit einem Nub- oder Cub eines anderen Proteins in räumliche Nähe zueinander zu gelangen.

Zur Herstellung der einzelnen Cub-Expressionsvektoren wurden *SNF3*, *RGT2*, *MTH1*, *STD1* und *RGT1* jeweils in das Met25-CPLV-Plasmid und für die Nub-Expressionsvektoren wurden die gleichen Gene jeweils in die Plasmide NXgate-3HA, XNgate-3HA, NXgate-32 und XNgate-22 inseriert. Dabei sind die Cub-Plasmide so konstruiert, dass sich das Cub-PLV am C-Terminus des inserierten Gens befindet und je nach Nub-Plasmid befindet sich das Nub am N- oder C-terminalen Ende des inserierten Gens. Zwei der Nub-Plasmide sind zusätzlich mit einem 3-fachen-HA-Epitop für Antikörperbindungen ausgestattet und unterscheiden sich darin von den anderen beiden Nub-Plasmiden. Im folgenden Schema sind die fünf Varianten der Plasmidkonstruktionen mit dem *SNF3* Gen und den N- oder C-terminalen Cub- bzw. Nub-Anhängen dargestellt. Außer *SNF3* wurden auch *RGT2*, *MTH1*, *STD1* oder *RGT1* verwendet.

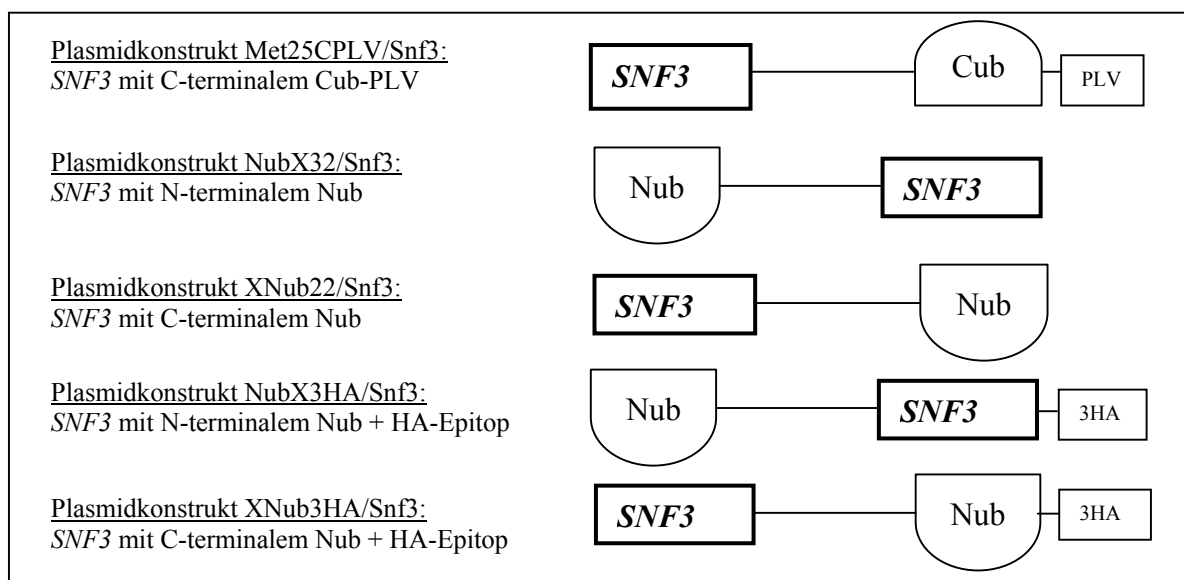


Abb. 2: Darstellung der Gene mit ihren Cub- bzw. Nub-Anhängen in den jeweiligen Plasmidkonstruktionen

SNF3 gilt dabei als Beispiel für die übrigen Gene *RGT2*, *MTH1*, *STD1* und *RGT1*

3.1.1.1 Erzeugen der „Split-Ubiquitin“-Cub-Plasmide

Zur Erzeugung einzelner Cub-Konstrukte wurde jeweils ein Gen in einen Vektor kloniert und in den haploiden THY.AP4-Stamm (*Mata*) transformiert. Durch die Kombination des restriktionsgeschnittenen Met25-CPLV-Plasmid-Fragmentes mit jeweils einem der Gene *SNF3*, *RGT2*, *MTH1*, *STD1* und *RGT1* entstanden fünf neue Cub-Plasmide (Abschnitt 2.2.6).

3.1.1.1.1 Amplifizieren der Gene *SNF3*, *RGT2*, *MTH1*, *STD1* und *RGT1*

Zur Amplifizierung der Gene *SNF3*, *RGT2*, *MTH1*, *STD1* und *RGT1* diente die genomische DNA des Hefestammes FY1679 (Winston, 1995). Die PCR's wurden wie in Abschnitt 2.3.6 beschrieben, unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturieren für 30 sec bei 95°C und Annealing für 35 sec bei 52°C. Da die DNA-Synthesebedingungen jedoch in der Zeit und in den Zyklen variieren, sind sie einzeln aufgeführt.

Zur **Amplifizierung des *SNF3*-Gens** dienten die Oligonukleotidprimern SNF3-A und SNF3-E. Die PCR-Bedingungen für die DNA-Synthese betragen 2 min 50 sec bei 72°C und 28 Zyklen. Die ersten 36 Basen des forward-Primers SNF3-A sind homolog zu den ersten 36 Basen des B1-Linkers des Met25-CPLV-Plasmides. Die restlichen 20 Basen binden im *SNF3*-Gen, beginnend mit dem ATG-Startcodon. Der reverse-Primer SNF3-E ist mit den ersten 39 Basen komplementär zu den ersten 39 Basen des B2-Linkers und mit den folgenden 21 Basen komplementär zum Sequenzende des *SNF3*-Gens (2655 bp) und beginnt vor dem Stopcodon.

Die **Amplifizierung des *RGT2*-Gens** wurde mit den Oligonukleotidprimern RGT2-A und RGT2-E durchgeführt. Die DNA-Synthesebedingungen dazu waren folgende: 2 min 50 sec bei 72°C und 30 Zyklen. Die ersten 36 Basen des forward-Primers RGT2-A sind homolog zu den ersten 36 Basen des B1-Linkers des Met25-CPLV-Plasmides. Die restlichen 21 Basen binden im *RGT2*-Gen, beginnend mit dem ATG-Startcodon. Der reverse-Primer RGT2-E ist mit den ersten 39 Basen komplementär zu den ersten 39 Basen des B2-Linkers und mit den folgenden 21 Basen komplementär zum Sequenzende des *RGT2*-Gens (2292 bp) und beginnt vor dem Stopcodon.

Die **Amplifizierung des *MTH1*-Gens** erfolgte mit dem Oligonukleotidprimerpaar MTH1-A und MTH1-E. Die DNA-Synthese wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 1 min 30 sec bei 72°C und 28 Zyklen. Die ersten 36 Basen des forward-Primers MTH1-A sind homolog zu den ersten 36 Basen des B1-Linkers des Met25-CPLV-Plasmides. Die restlichen 20 Basen binden im *MTH1*-Gen und beginnen mit dem ATG-Startcodon. Der reverse-Primer MTH1-E ist mit den ersten 39 Basen komplementär zu den ersten 39 Basen des B2-Linkers und mit den folgenden 21 Basen komplementär zum Sequenzende des *MTH1*-Gens (1302 bp) und beginnt vor dem Stopcodon.

Die **Amplifizierung des *STD1*-Gens** erfolgte mit dem Oligonukleotidprimerpaar STD1-A und STD1-E. Die PCR-Bedingungen für die DNA-Synthese betragen 1 min 30 sec bei 72°C und 28 Zyklen. Der forward-Primer STD1-A ist mit den ersten 36 Basen homolog zu den ersten 36 Basen des B1-Linkers des Met25-CPLV-Plasmides. Die restlichen 20 Basen binden im *STD1*-Gen und beginnen mit dem ATG-Startcodon. Die ersten 39 Basen des reverse-Primer STD1-E sind zu den ersten 39 Basen des B2-Linkers komplementär und mit den folgenden 21 Basen komplementär zum Sequenzende des *STD1*-Gens (1332 bp) und beginnt vor dem Stopcodon.

Zur **Amplifizierung des *RGT1*-Gens** wurden die Oligonukleotidprimer RGT1-A und RGT1-E verwendet. Die DNA-Synthesebedingungen dazu waren folgende: 4 min bei 72°C und 31 Zyklen. Die ersten 36 Basen des forward-Primers RGT2-A sind homolog zu den ersten 36 Basen des B1-Linkers des Met25-CPLV-Plasmides. Die restlichen 21 Basen binden im *RGT1*-Gen und beginnen mit dem ATG-Startcodon. Die ersten 39 Basen des reverse-Primer RGT1-E sind zu den ersten 39 Basen des B2-Linkers komplementär und mit den folgenden 21 Basen komplementär zum Sequenzende des *RGT1*-Gens (3513 bp) und beginnt vor dem Stopcodon.

Die DNA dieser PCR-Produkte wurde nach einem präparativen Agarosegel (Abschnitt 2.3.9) ausgeschnitten, über der QIAquick Gel Extraktion Kit 50 Säule (Abschnitt 2.3.8) aufgereinigt und die Aufreinigung in einem analytischem Agarosegel (Abschnitt 2.3.9) überprüft.

3.1.1.1.2 Amplifizieren des Met25-Cub-PLV-Vektors

Der Vektor Met25-CPLV wurde zur Amplifizierung in *E. coli* transformiert (Abschnitt 2.3.1), nach der Plasmidpräparation (Abschnitt 2.3.3) einer Restriktionskontrolle unterzogen und mit einem analytischen Agarosegel überprüft. Die präparative Modifikation des Vektors (Abschnitt 2.3.5) erfolgte mit den Restriktionsnukleasen *PstI* und *HindIII* und dessen korrekte Spaltung ließ sich durch die erwartete 9,3 kb Bande im Agarosegel nachweisen. Aus dem präparativen Agarosegel wurde die DNA ausgeschnitten, über der QIAquick Gel Extraktion Kit 50 Säule (Abschnitt 2.3.10) aufgereinigt und der Erfolg der Aufreinigung mit einem Agarosegel bestätigt.

3.1.1.1.3 Erzeugen der „Split-Ubiquitin“-Cub-Konstrukte in dem THY.AP4-Stamm (Mata)

Zur Erzeugung einzelner Cub-Konstrukte, wurde das 9,3 kb große Fragment des Met25-CPLV-Vektors zusammen mit jeweils einem der PCR-Produkte (Abschnitt 3.1.1.1.1) in den *S. cerevisiae* Stamm THY.AP4 transformiert (Abschnitt 2.3.2). Durch die homologe Rekombination (Abschnitt 2.3.7) des PCR-Fragmentes mit dem geschnittenen Vektor entstand ein neues Plasmid. Durch die Kombination des Vektor-Fragmentes mit jeweils einem der Gene *SNF3*, *RGT2*, *MTH1*, *STD1* und *RGT1* entstanden die Cub-Plasmide CubMet25/Snf3, CubMet25/Rgt2, CubMet25/Mth1, CubMet25/Std1 und CubMet25/Rgt1. Als Negativ-Kontrolle wurde der ungeschnittene Met25-CPLV-Vektor ohne Insert verwendet und in den THY.AP4-Stamm transformiert (CubMet25/leer).

Die Transformationsansätze wurden auf Selektivmediumplatten mit 2% Glukose ohne Leucin ausplattiert und für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Der leucin-auxotrophe THY.AP4-Stamm kann alleine nicht auf leucin-freiem-Medium wachsen. Da der Cub-Vektor mit einem *LEU2*-Markergen ausgestattet ist, konnten nur die Zellen wachsen, deren Plasmide erfolgreich in den Hefestamm transformiert wurden und *LEU2* exprimierten.

Die folgende Abbildung zeigt als Beispiel das rekombinante Cub-Plasmid mit einem Snf3-Insert.

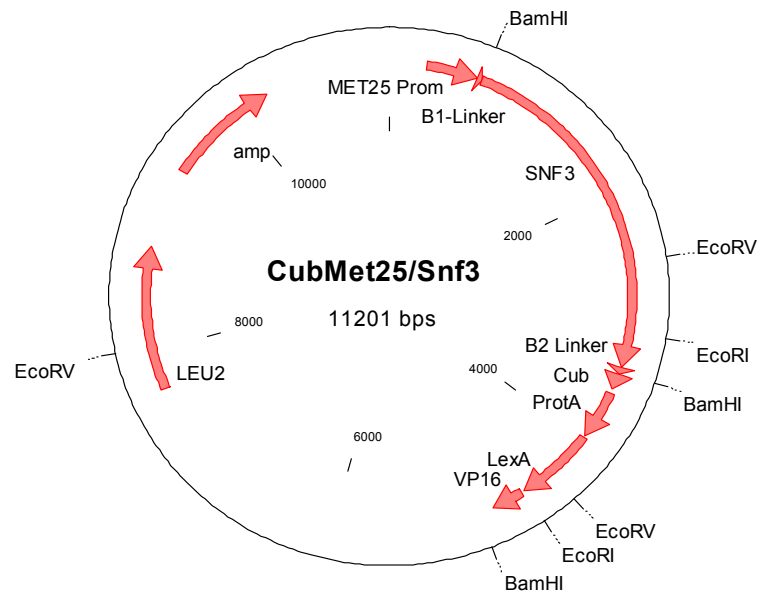


Abb. 3: Plasmidkarte des konstruierten Plasmids CubMet25/Snf3.

Das Cub-PLV-Plasmid enthält das *SNF3*-Fusionsgen unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors und ist mit einem *LEU2*-Markergen ausgestattet.

3.1.1.2 Erzeugen der „Split-Ubiquitin“-Nub-Plasmide

Zur Erzeugung einzelner Nub-Plasmide, wurde jeweils ein Gen in einen der Nub-Vektoren kloniert und in den haploiden THY.AP5-Stamm (*Mata*) transformiert. Durch die Kombination der einzelnen Gene *SNF3*, *RGT2*, *MTH1*, *STD1* und *RGT1* mit je einem der vier Vektoren NXgate-3HA, XNgate-3HA, NXgate-32 und XNgate-22, die jeweils die gleichen Linkersequenzen enthalten, entstanden die neuen Nub-Plasmide. Die PCR-Produkte der in Abschnitt 3.1.1.1.1 amplifizierten Gene wurden dazu verwendet.

3.1.1.2.1 Amplifizieren der Nub-Vektoren

Die Vektoren NXgate-3HA, XNgate-3HA, NXgate-32 und XNgate-22 wurden zur Amplifizierung in *E. coli* transformiert (Abschnitt 2.3.1), nach der Plasmidpräparation (Abschnitt 2.3.3) einer Restriktions-Kontrolle unterzogen und mit einem analytischen Agarosegel überprüft. Die enzymatische Spaltung (Abschnitt 2.3.5) der Vektoren NXgate-3HA, XNgate-3HA, NXgate-32 erfolgte mit den Restriktionsnukleasen *EcoRI* und *PstI* und der des XNgate-22-Vektors mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *ClaI*. Die korrekte Spaltung der Vektor-Fragmente NXgate-3HA (7939 bp), XNgate-3HA (7956 bp), NXgate-32 (7880 bp) und XNgate-22 (7588 bp) wurde durch die entsprechenden Banden im Agarosegel (Abschnitt 2.3.9) nachgewiesen. Aus dem präparativen Gel wurde die DNA ausgeschnitten, über der QIAquick Gel Extraktion Kit 50 Säule aufgereinigt (Abschnitt 2.3.10) und die korrekte Aufreinigung in einem Agarosegel bestätigt.

3.1.1.2.2 Erzeugen der „Split-Ubiquitin“-Nub-Konstrukte in dem THY.AP5-Stamm (*Mata*)

Zur Erzeugung der einzelnen Nub-Konstrukte wurde jeweils eines der PCR-Produkte (Abschnitt 3.1.1.1.1) zusammen mit einem der Nub-Fragmente (Abschnitt 3.1.1.2.1) in den *S. cerevisiae* Stamm THY.AP5 transformiert. Durch die homologe Rekombination (Abschnitt 2.3.7) des PCR-Fragmentes mit dem geschnittenen Vektor wurde das neue Plasmid konstruiert. Durch die Kombination der Gene *SNF3*, *RGT2*, *MTH1*, *STD1* und *RGT1* mit jeweils einem der enzymatisch modifizierten Vektoren (NXgate-3HA, XNgate-3HA, NXgate-32 und XNgate-22) entstanden 20 verschiedene Nub-Plasmide (Abschnitt 2.2.6). Als Negativ-Kontrolle wurde je ein ungeschnittener Vektor in den

THY.AP5-Stamm transformiert (NubX32/leer, XNub22/leer, NubX3HA/leer und XNub3HA/leer).

Die Transformationsansätze wurden auf Selektivmediumplatten mit 2% Glukose ohne Tryptophan ausplattiert und für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Der tryptophan-auxotrophe THY.AP5-Stamm kann alleine nicht auf tryptophan-freiem-Medium wachsen. Da der Nub-Vektor ein *TRP1*-Markergen enthält, konnten nur die Zellen wachsen, deren Plasmide erfolgreich in den Hefestamm transformiert wurden und *TRP1* exprimierten. Die Abbildung unten zeigt als Beispiel das rekombinante NubX3HA-Plasmid mit einem Snf3-Insert.

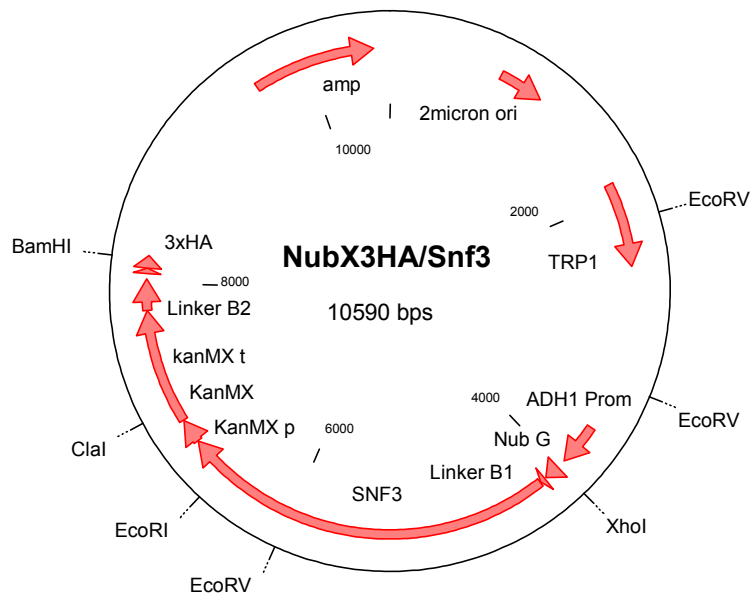


Abb. 4: Plasmidkarte des konstruierten Plasmids NubX3HA/Snf3.

Das Nub-Plasmid enthält das *SNF3*-Fusionsgen unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors und ist mit einem *TRP1*-Markergen ausgestattet.

3.1.2 Interaktionstests zwischen den Cub- und Nub-Fusionsproteinen mit dem „Split-Ubiquitin“-System auf Reportermedien

Die einzelnen Fusionsproteine Rgt2, Snf3, Mth1, Std1 und Rgt1 der Cub- und Nub-Konstrukte sollten in dem „Split-Ubiquitin“-System auf eine direkte Interaktion untereinander überprüft werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob verschiedene Glukosekonzentrationen bzw. verschiedene C-Quellen diese Interaktionen beeinflussen und wie das System bei dereprimiertem bzw. herunterreguliertem *MET25*-Promotor reagiert. Unter Verwendung eines Cub-Konstruktes und vier verschiedener Nub-Konstrukte wurden die Interaktionsstudien durchgeführt. Dabei ist das Cub-PLV stets an den C-terminus eines Fusionsproteins gekoppelt, während Nub- am N- oder C-terminalen Ende eines Proteins angehängt ist und zwei der Nub's zusätzlich ein 3-faches HA-Epitop für Antikörperbindungen besitzen (Abb. 2). Es sollte festgestellt werden, ob und welche Plasmidkonstruktionen in Hinsicht auf eine Interaktion funktionell sind bzw. welche Auswirkung die jeweiligen Nub-Anhänge auf die Protein-Wechselwirkungen haben.

Dazu wurden die Transformanden der Cub (THY.AP4-Mat α)- und Nub (THY.AP5-Mat α)-Konstrukte jeweils auf YEPD-Medium-Platten gepaart. Die Selektion der diploiden Zellen mit den rekombinanten Plasmiden erfolgte entsprechend ihrer Plasmidmarker auf Minimalmedium mit 2% Glukose/ Trp⁻ Leu⁻. Durch Replikaplattierung der Diploiden auf Reportermedien, konnten die Fusionsproteine der Cub- und Nub-Konstrukte auf direkte Wechselwirkungen hin getestet werden.

Die Untersuchungen der Protein-Interaktionen wurden auf sechs verschiedenen Reportermedien durchgeführt. Diese Medien enthielten jeweils die C-Quellen 2% Glukose, 1% Maltose oder 0,1% Glukose und waren vergleichsweise mit 0,3 mM Methionin versetzt. Ohne Methionin im Medium wird der *MET25*-Promotor der Cub-Plasmide dereprimiert und die Fusionsproteine werden dadurch überexprimiert. Im Vergleich dazu, sollte durch die Zugabe von 0,3 mM Methionin zu den Medien, die Stärke des *MET25*-Promotors in den Cub-Plasmiden gedrosselt werden. Dadurch sollte erreicht werden, dass die Anzahl der Cub-Fusionsproteine in einem angemessenen Verhältnis zur Menge der Nub-Fusionsproteine (*ADHI*-Promotor) vorlag und somit die Protein-Wechselwirkungen unter annähernd gleichen Bedingungen zustande kamen.

Der Nachweis der Protein-Interaktionen erfolgte durch Wachstumstests von histidin- und adenin-auxotrophen Zellen auf Reportermedien. Nub-Fusionsproteine, die mit den Rgt2- oder Snf3-Cub-PLV-Fusionsproteinen interagierten, induzierten durch die Abspaltung von PLV die Expression der Reportergene *HIS3* und *ADE2* und lösten dadurch ein Zellwachstum aus. Dagegen diffundierten die löslichen Proteine Mth1-, Std1- und Rgt1-Cub-PLV direkt in den Zellkern und induzierten durch die Bindung an den *lexA*-gesteuerten Promotor die Bildung von Zellkolonien. Nur Snf3-/Rgt2-interagierende Proteine blieben an den Membranproteinen gebunden und infolgedessen war dann je nach Bindungsstärke kein bzw. ein geringes Zellwachstum zu beobachten.

Maltose wurde als alternative Q-Quelle (Kontrolle) zum Wachstum auf Glukose verwendet um zu testen, wie das System reagiert, wenn keine Glukose im externen Medium zur Verfügung steht. Die Maltose gelangt aktiv über Protonen-Symporter-Systeme in die Zellen (Lagunas, 1993) und wird dort in zwei Glukosemoleküle hydolysiert. Somit konnten die Zellen unabhängig von dem Einfluss der Glukosesensor- und Glukosetransportproteine wachsen.

3.1.2.1 Interaktionstests mit den NXgate-32-Plasmid-Konstrukten

Die Interaktionsstudien wurden wie in dem Abschnitt 2.3.18. beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die Cub-Transformanden und die Nub-Transformanden mit den NXgate-32-Plasmiden verwendet. Die Protein-Wechselwirkungen wurden auf vier verschiedenen Reportermedien getestet:

2% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻,

2% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met,

1% Maltose/ Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻ und

1% Maltose/ Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met.

Als Negativ-Kontrolle dienten jeweils Cub- und Nub-Transformanden mit Leer-Vektoren. Die Ergebnisse der Interaktionen sind in den folgenden Abbildungen zu sehen.

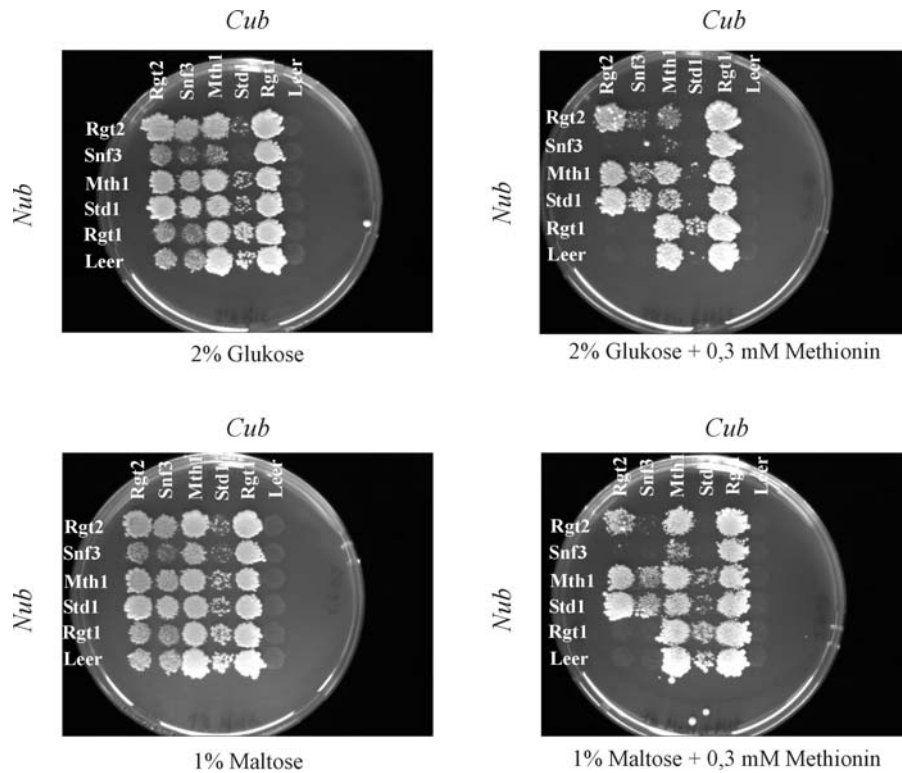


Abb. 5: Interaktionstests der Cub-Fusionsproteine mit den Fusionsproteinen der NXgate-32-Plasmide
 Das Zellwachstum wurde auf den C-Quellen 2% Glukose und 1% Maltose getestet. Auf Medien ohne Methionin kommt es zur Überexpression der Fusionsproteine durch den dereprimierten *MET25*-Promotor, während der Promotor durch die Zugabe von 0,3 mM Methionin herunterreguliert und somit die Anzahl der gebildeten Proteine reduziert wird.

Die Zellen, die auf den C-Quellen mit und ohne Methionin gewachsen waren, wurden miteinander verglichen. Daraus ergab sich, dass die überexprimierten Cub-PLV-Fusionsproteine auf den methionin-freien Medien ein generelles Zellwachstum auslösten, wohingegen auf den methionin-haltigen Medien die Anzahl der exprimierten Cub-PLV-Fusionsproteine reduziert war und unterschiedliche Kolonienbildungen zu beobachten waren. Demzufolge wurden diese Proben zur Analyse der Protein-Interaktionen verwendet.

Auf den Medien mit 2% Glukose + 0,3 mM Methionin fanden folgende Protein-Wechselwirkungen statt. Cub-Rgt2 interagiert mit Nub-Rgt2, -Mth1 und -Std1, während bei Cub-Snf3 Wechselwirkungen mit den Nub-Mth1 und -Std1 Proteinen zu erkennen waren, jedoch in geringerem Maße. Desweiteren waren zwischen den Fusionsproteinen Cub-Mth1 und Nub-Rgt2 sowie Nub-Snf3 Interaktionen zu beobachten. Aufgrund der relativ festen Bindung des löslichen Mth1 Proteins an die Membranproteine, konnten nur

einige wenige Zellkolonien entstehen. Cub-Std1 wurde in Verbindung mit anderen Nub-Proteinen nicht bewertet, da sich selbst in Verbindung mit Nub-Leer (Positivkontrolle) keine Zellkolonien bildeten. Die Rgt1-Cub-PLV Fusionsproteine interagierten nicht mit den in der Membran lokalisierten Nub-Rgt2 bzw. -Snf3 Proteinen, so dass sie durch die Bindung an den *lexA*-gesteuerten Promotor ein Zellwachstum auslösten. Dagegen wurde bei Cub-PLV ohne Insert, wie erwartet, kein Zellwachstum festgestellt.

Die Ergebnisse der Protein-Interaktionen auf den Medien mit 1% Maltose +0,3 mM Methionin unterscheiden sich im Vergleich zu den Tests auf 2% Glukose +0,3 mM Methionin darin, dass zwischen Cub-Mth1 und Nub-Rgt2 bzw. Nub-Snf3 auf Maltose keine Protein-Wechselwirkungen stattfanden.

3.1.2.2 Interaktionstests mit den XNgate-22-Plasmid-Konstrukten

Die Interaktionsstudien wurden wie in dem Abschnitt 2.3.18 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die Cub-Transformanden und die Nub-Transformanden mit den XNgate-22-Plasmiden verwendet. Die Protein-Wechselwirkungen wurden auf vier verschiedenen Reportermedien getestet:

2% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻,

2% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met,

1% Maltose/ Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻ und

1% Maltose/ Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met.

Als Negativ-Kontrolle dienten jeweils Cub- und Nub-Transformanden mit Leer-Vektoren.

Die Ergebnisse der Interaktionen sind in den folgenden Abbildungen zu sehen.

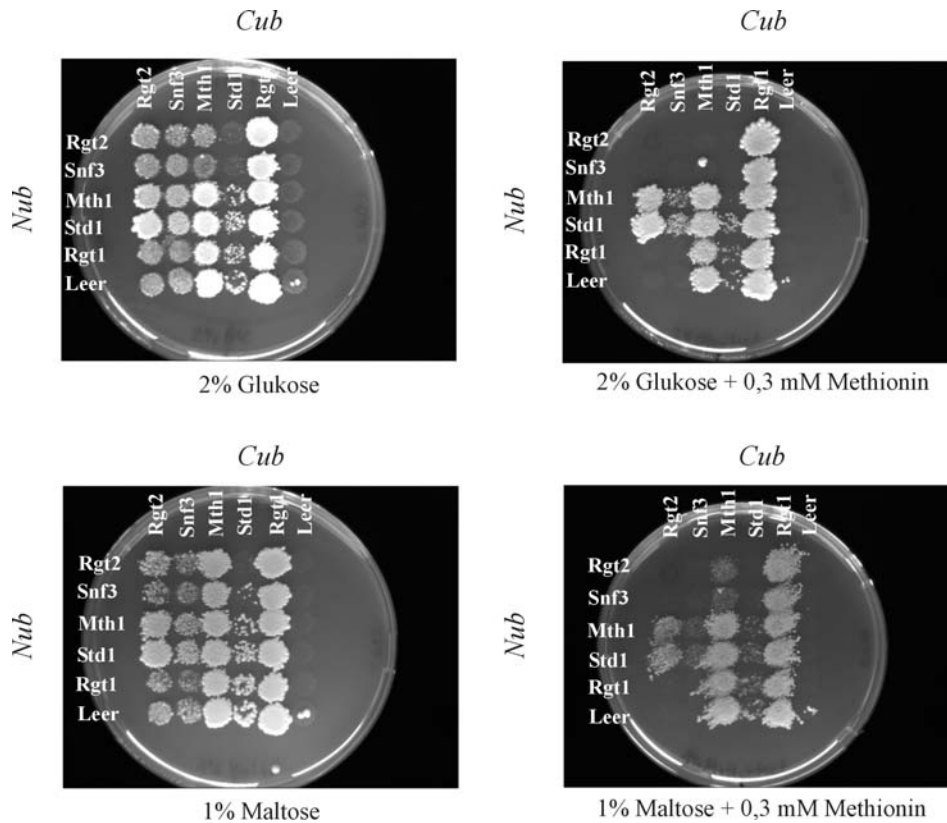


Abb. 6: Interaktionstests der Cub-Fusionsproteine mit den Fusionsproteinen der XNgate-22 Plasmide

Die Protein-Wechselwirkungen wurden auf den C-Quellen mit 2% Glukose und 1% Maltose getestet. Auf den methionin-haltigen Medien wurden Protein-Interaktionen festgestellt, dagegen kommt es auf Medien ohne Methionin zur Überexpression der Cub-PLV-Fusionsproteine.

Wie unter 3.1.2.1 bereits beschrieben, wurden zur Auswertung der Protein-Interaktionen die Zellen, die auf methionin-haltigen Medien gewachsen waren, verwendet.

Auf den Medien mit 2% Glukose +0,3 mM Methionin konnten die Rgt2-Proteine der Cub-Plasmide mit den Mth1- und Std1-Proteinen der Nub-Plasmide interagieren und PLV abspalten, da die Zellen deutlich zu Kolonien herangewachsen waren. Im Gegensatz dazu war das Wachstum der Zellen mit den Cub-Snf3 Proteinen in Verbindung mit den Nub-Mth1- bzw. -Std1-Proteinen sehr viel schwächer, was als eine verminderte Interaktion zwischen den einzelnen Proteinen zu bewerten ist. Bei den Cub-Mth1-Fusionsproteinen, die auf Interaktionen mit Nub-Rgt2 und -Snf3 getestet wurden, waren Protein-Wechselwirkungen zu beobachten. Da Mth1-Cub-PLV mit den Membranproteinen eine feste Bindung eingegangen war, konnten demzufolge keine Zellkolonien entstehen. Cub-Std1 wurde in Verbindung mit den anderen Nub-Proteinen nicht bewertet, denn selbst in Verbindung mit Nub-Leer war kein Zellwachstum zu bemerken und deshalb ist

anzunehmen, dass Cub-Std1 nicht funktionierte. Die Cub-Rgt1-Fusionsproteine waren in Verbindung mit allen Nub-Fusionsproteinen deutlich zu Kolonien heranwachsen, demzufolge ging Rgt1-Cub-PLV keine Protein-Wechselwirkungen ein. Die Cub-Vektoren ohne Insert zeigten wie erwartet keine Protein-Interaktionen und korrekterweise auch kein Zellwachstum.

Die Protein-Wechselwirkungen, die auf den Medien mit 1% Maltose +0,3 mM Methionin stattfanden, unterscheiden sich im Vergleich zu den Tests auf 2% Glukose +0,3 mM Methionin darin, dass zwischen den Cub-Mth1-Proteinen in Verbindung mit den Nub-Rgt2- und Nub-Snf3-Proteinen keine Protein-Wechselwirkungen auf den maltosehaltigen Medien vorkamen.

3.1.2.3 Interaktionstests mit den NXgate-3HA-Plasmid-Konstrukten

Die Interaktionsstudien wurden wie in dem Abschnitt 2.3.18 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die Cub-Transformanden und die Nub-Transformanden mit den NXgate-3HA Plasmiden verwendet. Die Protein-Wechselwirkungen wurden auf Reportermedien mit hohen und niedrigen Glukosekonzentrationen, sowie auf maltosehaltigen Reportermedien getestet:

2% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻,

2% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met,

1% Maltose/ Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻ ,

1% Maltose/ Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met.

0,1% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻ und

0,1% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met

Als Negativ-Kontrolle dienten jeweils Cub- und Nub-Transformanden mit Leer-Vektoren.

Die Ergebnisse der Interaktionen werden in den folgenden Abbildungen vorgestellt.

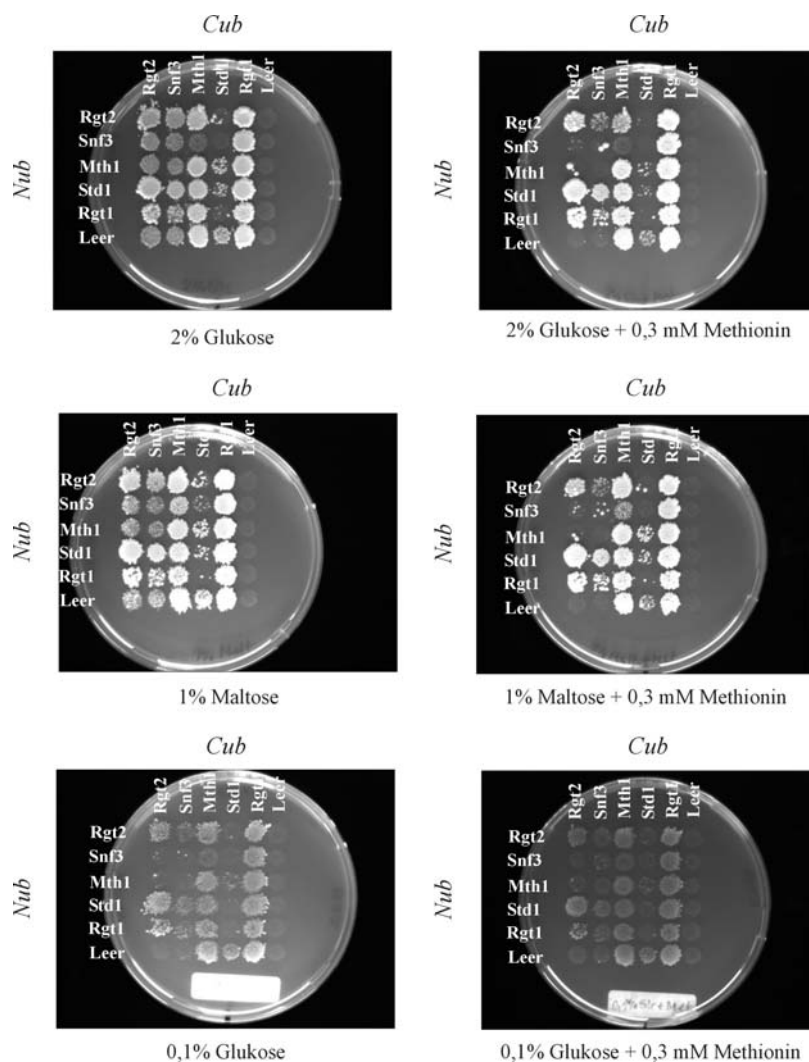


Abb. 7: Interaktionstests der Cub-Fusionsproteine mit den Fusionsproteinen der NXgate-3HA-Plasmide

Die Protein-Wechselwirkungen wurden auf den C-Quellen mit 2% Glukose, 1% Maltose und 0,1% Glukose getestet. Auf den methionin-haltigen Medien wurden Protein-Interaktionen festgestellt, dagegen kommt es auf Medien ohne Methionin zur Überexpression der Cub-PLV-Fusionsproteine.

Die Zellen, die auf methionin-haltigen Medien gewachsen waren, wurden zur Analyse der Protein-Interaktionen verwendet (Abschnitt 3.1.2.1).

Auf den Medien mit 2% Glukose +0,3 mM Methionin konnten die Rgt2-Proteine der Cub-Plasmide mit den Rgt2-, Std1- und Rgt1-Proteinen der Nub-Plasmide interagieren und PLV abspalten, da die Zellen deutlich zu Kolonien herangewachsen waren. Im Vergleich dazu, konnten die Snf3-Proteine der Cub-Plasmide zwar mit den gleichen Nub-Proteinen interagieren, allerdings in reduzierter Form, wie aufgrund des viel geringeren Zellwachstums zu erkennen ist. Desweiteren waren zwischen Cub-Mth1 und Nub-Rgt2

sowie Nub-Snf3 Protein-Wechselwirkungen zu beobachten. Da die meisten der löslichen Mth1 Proteine eine relativ feste Bindung mit den Membranproteinen eingingen, konnten nur wenige Zellkolonien entstehen. Cub-Std1 wurde in Verbindung mit anderen Nub-Proteinen nicht bewertet, da sich in Verbindung mit Nub-Leer (Positivkontrolle) keine Zellkolonien bildeten. Die Rgt1-Cub-PLV Fusionsproteine interagierten nicht mit den Nub-Fusionsproteinen, so dass sie durch die Bindung an den *lexA*-gesteuerten Promotor ein Zellwachstum auslösten. Dagegen wurde bei Cub-PLV ohne Insert, wie erwartet, kein Zellwachstum festgestellt.

Die Ergebnisse der Interaktionen auf den Medien mit 1% Maltose +0,3 mM Methionin unterscheiden sich im Vergleich zu den Tests auf 2% Glukose +0,3 mM Methionin darin, dass zwischen den Cub-Mth1-Proteinen in Verbindung mit den Nub-Rgt2- und Nub-Snf3-Proteinen keine Protein-Wechselwirkungen auf den maltose-haltigen Medien stattfanden. Die gleichen Interaktionen wie auf Maltose, konnten auf Medien mit 0,1% Glukose +0,3 mM Methionin beobachtet werden, jedoch viel schwächer.

3.1.2.4 Interaktionstests mit den XNgate-3HA-Plasmid-Konstrukten

Die Interaktionsstudien wurden wie in dem Abschnitt 2.3.18 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die Cub-Transformanden und die Nub-Transformanden mit dem XNgate-3HA Plasmid verwendet. Die Protein-Wechselwirkungen wurden auf Reportermedien mit hohen und niedrigen Glukosekonzentrationen, sowie auf maltose-haltigen Reportermedien getestet:

2% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻,

2% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met,

1% Maltose/ Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻,

1% Maltose/ Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met

0,1% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻ und

0,1% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met

Als Negativ-Kontrolle dienten jeweils Cub- und Nub-Transformanden mit Leer-Vektoren.

Die Ergebnisse der Interaktionen sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

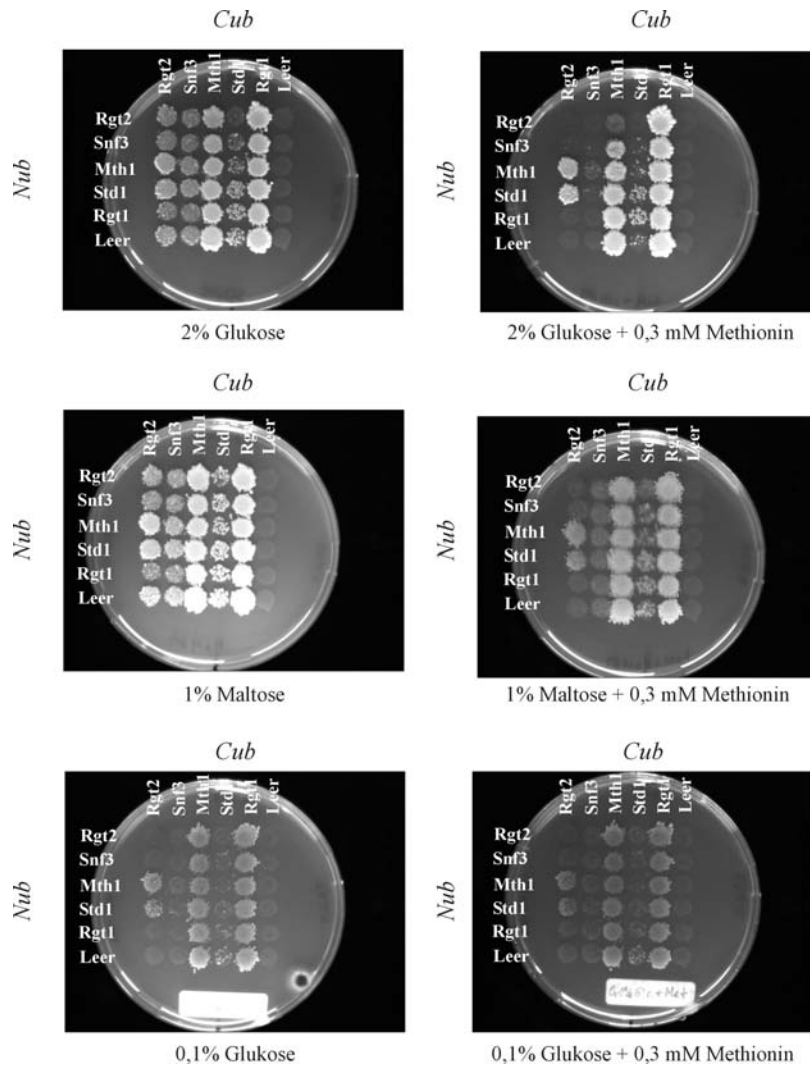


Abb. 8: Interaktionstests der Cub-Fusionsproteine mit den Fusionsproteinen der XNgate-3HA-Plasmide

Die Protein-Wechselwirkungen wurden auf den C-Quellen mit 2% Glukose, 1% Maltose und 0,1% Glukose getestet. Auf den methionin-haltigen Medien wurden Protein-Interaktionen festgestellt, dagegen kommt es auf Medien ohne Methionin zur Überexpression der Cub-PLV-Fusionsproteine.

Zur Analyse der Protein-Interaktionen, wurden wie unter 3.1.2.1 bereits beschrieben, die auf methionin-haltigen-Medien gewachsen Zellen verwendet.

Auf den Medien mit 2% Glukose +0,3 mM Methionin konnten die Rgt2-Proteine der Cub-Plasmide mit den Mth1- und Std1-Proteinen der Nub-Plasmide interagieren, da Zellkolonien herangewachsen waren. Im Gegensatz dazu waren bei den Snf3-Proteinen der Cub-Plasmide keine Protein-Wechselwirkungen mit irgendeinem der Nub Fusionsproteine zu bemerken, da keine Zellkolonien vorhanden waren. Die Mth1-Proteine der Cub-Plasmide interagierten mit Nub-Rgt2 wie auch mit Nub-Snf3 und blieben an den

Membranproteinen mehr oder weniger fest gebunden, so dass kein bzw. ein vermindertes Zellwachstum möglich war. Cub-Std1 wurde in Verbindung mit den Nub-Fusionsproteinen nicht bewertet, da es sogar mit Nub-leer kein Wachstum vorzeigte und deshalb angenommen wurde, dass Cub-Std1 nicht funktionierte. Zwischen den Cub-Rgt1-Fusionsproteinen und den Nub-Rgt2 bzw. -Snf3 Proteinen konnten keine Interaktionen festgestellt werden, wie aufgrund der gebildeten Zellkolonien zu erkennen war. Die Cub-Vektoren ohne Insert zeigten wie erwartet keinerlei Protein-Wechselwirkungen und korrekterweise auch kein Zellwachstum.

Die Protein-Interaktionen auf den Medien mit 1% Maltose +0,3 mM Methionin unterscheiden sich im Vergleich zu den Tests auf 2% Glukose +0,3 mM Methionin darin, dass zwischen den Cub-Mth1 und Nub-Rgt2 Proteinen auf Maltose keine Protein-Wechselwirkungen vorkamen. Die gleichen Interaktionen wie auf Maltose, konnten auf Medien mit 0,1% Glukose +0,3 mM Methionin beobachtet werden, jedoch viel schwächer.

3.1.3 Expressionsnachweis der Fusionsproteine in den Nub-Plasmiden NXgate-3HA und XNgate-3HA durch Western-Blot

Um zu prüfen, ob die Fusionsproteine Rgt2, Snf3, Mth1, Std1 und Rgt1 der rekombinanten Plasmide NXgate-3HA und XNgate-3HA in dem Hefestamm THY.AP5 exprimiert werden, wurden Western-Blot Analysen unter Verwendung der spezifischen Anti-HA-Antikörper durchgeführt.

Für die Präparation der Cytoplasmaproteine Mth1, Std1 und Rgt1 und der Membranproteine Rgt2, Snf3 wurden zwei Methoden angewandt (Abschnitt 2.3.11 und 2.3.12). Anschließend wurden die Proteine in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Durch Hinzufügen des spezifischen anti-HA-Antikörpers, konnten die mit dem HA-Epitop verbundenen Proteine, reagieren. Der peroxidase-gekoppelte Sekundär-Antikörper reagierte dann mit dem ersten anti-HA-Antikörper und wurde durch die Zugabe eines Chemilumineszenzsubstrates und anschließendem Auflegen auf einen Röntgenfilm detektiert.

3.1.3.1 Expressionsnachweis der Cytoplasma-Fusionsproteine

Für die Proteinpräparationen wurden alle Nub-Transformanden mit den NXgate-3HA- und den XNgate-3HA Plasmiden verwendet. Die Anzucht der Transformanden und der Zellaufschluß zur Proteinrohextraktgewinnung erfolgten, wie in dem Abschnitt 2.3.11 beschrieben. Durch die Anwendung dieser Methode, sollten hauptsächlich die Cytoplasma- und Kernproteine isoliert werden. Anschließend wurden die Proteine in annähernd gleicher Konzentration in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.3.13) aufgetrennt. Die Expression der Proteine Mth1, Std1 und Rgt1 in den rekombinanten Plasmiden NXgate-3HA und XNgate-3HA konnte dann durch Western-Blot Analysen (Abschnitt 2.3.14) unter Verwendung des spezifischen Anti-HA-Antikörper und des sekundären Antikörpers anti-Ratte (Abschnitt 2.3.15) nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurde je ein Leer-Vektor verwendet. Zur Detektion der einzelnen Proteine wurden mehrere Versuchsanläufe unternommen. Die Abbildungen zeigen die in den jeweiligen Vektoren exprimierten Fusionsproteine.

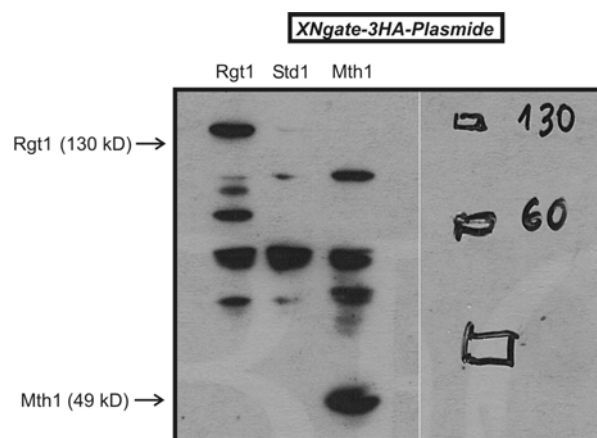


Abb. 9: Westernblot-Analyse zum Nachweis der Expression der Cytoplasma-Fusionsproteine in den XNgate-3HA-Plasmiden in dem THY.AP5-Stamm.

Die Expression des Cytoplasmaproteins Mth1 und des Kernproteins Rgt1 konnte in den Plasmiden, in denen Nub am C-terminalen Ende der Gene angehängt ist, nachgewiesen werden.

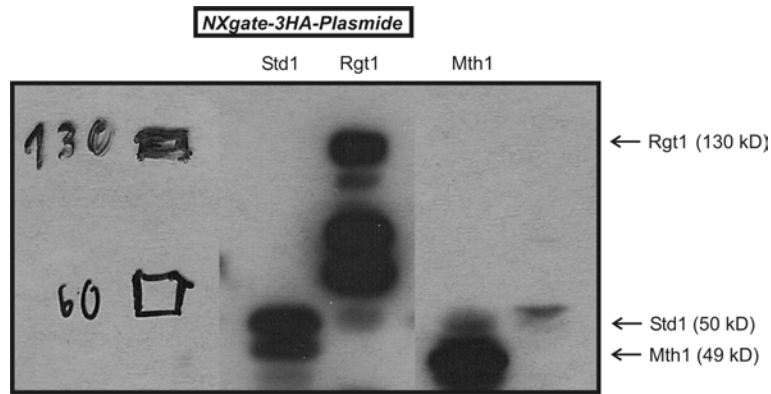


Abb. 10: Westernblot-Analyse zum Nachweis der Expression der Cytoplasma-Fusionsproteine in den NXgate-3HA-Plasmiden in dem THY.AP5-Stamm.

Die Expression der Cytoplasmaproteine Mth1, Std1 und Rgt1 konnte in den Plasmiden, in denen Nub am N-terminalen Ende der Gene angehängt ist, nachgewiesen werden.

In dem THY.AP5-Stamm konnten durch die Westernblot-Analysen die Expressionen der Cytoplasmaproteine Mth1, Std1 sowie des Kernproteins Rgt1 in den Plasmiden NXgate-3HA und die Expression von Mth1 und Rgt1 in den XNgate-3HA-Plasmiden bestätigt werden. Daraus kann man schliessen, dass die *in vivo* Rekombination der Gene in beide Plasmide erfolgreich war, unabhängig von den N- oder C-terminalen Nub bzw. von den angehängten 3-fachen HA-Epitopen an das fusionierte Gen bzw. an Nub (Abb. 2). Der Nachweis der exprimierten Cytoplasmaproteine unterstützt somit die in Abschnitt 3.1.2.3 und 3.1.2.4 beobachteten Protein-Wechselwirkungen, die von funktionierenden Proteinen mit Nub- und Cub-Anhängen abhängig sind.

Die Vorkulturen (stat. Phase) dieser Transformanden, die nachweislich die Fusionsproteine exprimierten, wurden anschließend gezielt für Interaktionsstudien in dem Abschnitt 3.1.4 eingesetzt.

3.1.3.2 Expressionsnachweis der Membran-Fusionsproteine

Für die Proteinpräparationen wurden alle Nub-Transformanden mit den NXgate-3HA- und XNgate-3HA-Plasmiden verwendet. Die Anzucht der Transformanden und der Zellaufschluß zur Proteinrohextraktgewinnung erfolgten, wie in dem Abschnitt 2.3.12 beschrieben. Durch die Anwendung dieser Methode, sollten vorwiegend die Membranproteine isoliert werden. Anschließend wurden die Proteine in annähernd gleicher Konzentration in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abschnitt 2.3.13)

aufgetrennt. Die Expression der Proteine Snf3 und Rgt2 in den rekombinanten Plasmiden konnte dann durch Western-Blot Analysen (Abschnitt 2.3.14) unter Verwendung des spezifischen Anti-HA-Antikörper und des sekundären Antikörpers anti-Ratte (Abschnitt 2.3.15) nachgewiesen werden.

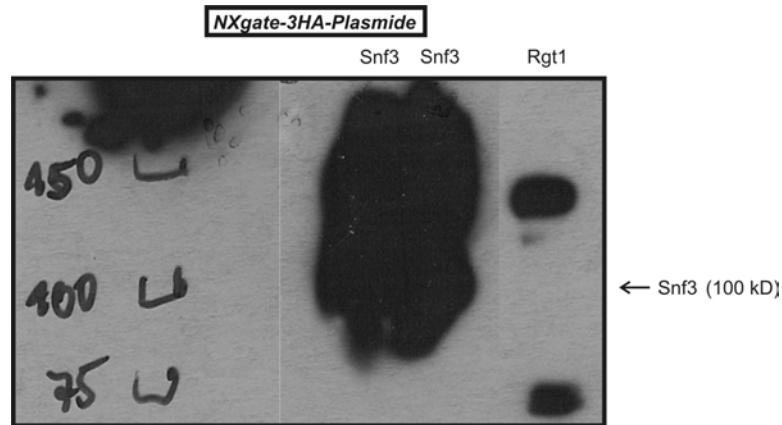


Abb. 11: Westernblot-Analyse zum Nachweis der Expression der Membran-Fusionsproteine in den NXgate-3HA-Plasmiden in dem THY.AP5-Stamm.

Die Expression von Snf3 konnte in dem Plasmid, in dem Nub am N-terminalen Ende des Gens angehängt ist, nachgewiesen werden (zwei Banden). Aufgrund des mit Proteinmenge überladenen Gels konnten die Proteine nicht eindeutig sichtbar aufgetrennt werden.



Abb. 12: Westernblot-Analyse zum Nachweis der Expression des Membran-Fusionsproteins Rgt2 in den NXgate-3HA-Plasmiden in dem THY.AP5-Stamm.

Die Expression des Membranproteins Rgt2 konnte in dem Plasmid, in dem Nub am N-terminalen Ende der Gens angehängt ist, nachgewiesen werden.

Durch die Western-Blot-Analysen konnten in dem THY.AP5-Stamm die Expressionen der Membranproteine Rgt2 und Snf3, in den NXgate-3HA Plasmiden nachgewiesen werden. Die Expression der Proteine bestätigt, dass die homologe Rekombination der Gene, mit dem N-terminalen Nub und dem C-terminalen HA-Epitop, in die Plasmide erfolgreich war.

Die Vorkulturen (stat. Phase) dieser Transformanden, die nachweislich die Fusionsproteine Snf3 und Rgt2 exprimierten, wurden anschließend gezielt für Interaktionsstudien in dem Abschnitt 3.1.4 eingesetzt.

3.1.4 Interaktionstests mit den Fusionsproteinen Rgt2, Snf3, Mth1, Std1 und Rgt1 der NubX-3HA- und XNub-3HA-Plasmidkonstrukte auf Reportermedien

Die bisherigen Interaktionsstudien wurden ohne die nachweisliche Expression der Fusionsproteine der Cub- und Nub-Konstrukte durchgeführt (Abschnitt 3.1.2.1-3.1.2.4). Desweiteren schienen in den bisherigen Tests die Std1-Cub-PLV Proteine nicht zu funktionieren, da selbst bei den Positivkontrollen kein Zellwachstum zu erkennen war. Inzwischen konnte durch Westernblot-Analysen (Abschnitt 3.1.3) die Expression der Proteine Rgt2, Snf3, Mth1, Std1 und Rgt1 in den Nub-Plasmiden mit HA-Epitop (NXgate-3HA und XNgate-3HA) bestätigt werden. Daher wurden die Fusionsproteine der CubMet25-Plasmide und die durch Westernblot-Analysen nachweislich exprimierten und scheinbar funktionellen Fusionsproteine der Nub-Plasmide mit HA-Epitop (Abschnitt 3.1.3.1 und 3.1.3.2) erneut auf Protein-Wechselwirkungen auf methionin-haltigen Medien getestet.

Die Interaktionsstudien wurden wie in dem Abschnitt 2.3.18 beschrieben durchgeführt, jedoch mit dem Unterschied, dass zum Animpfen der Nub-Vorkulturen, die in dem Abschnitt 3.1.3 erzeugten stationäre-Phase-Kulturen anstelle von Platten-Kolonien verwendet wurden.

2% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met,

1% Maltose/ Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met.

0,1% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met

Als Negativ-Kontrolle dienten jeweils Cub- und Nub-Transformanden mit Leer-Vektoren.

Die Ergebnisse der Interaktionen sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

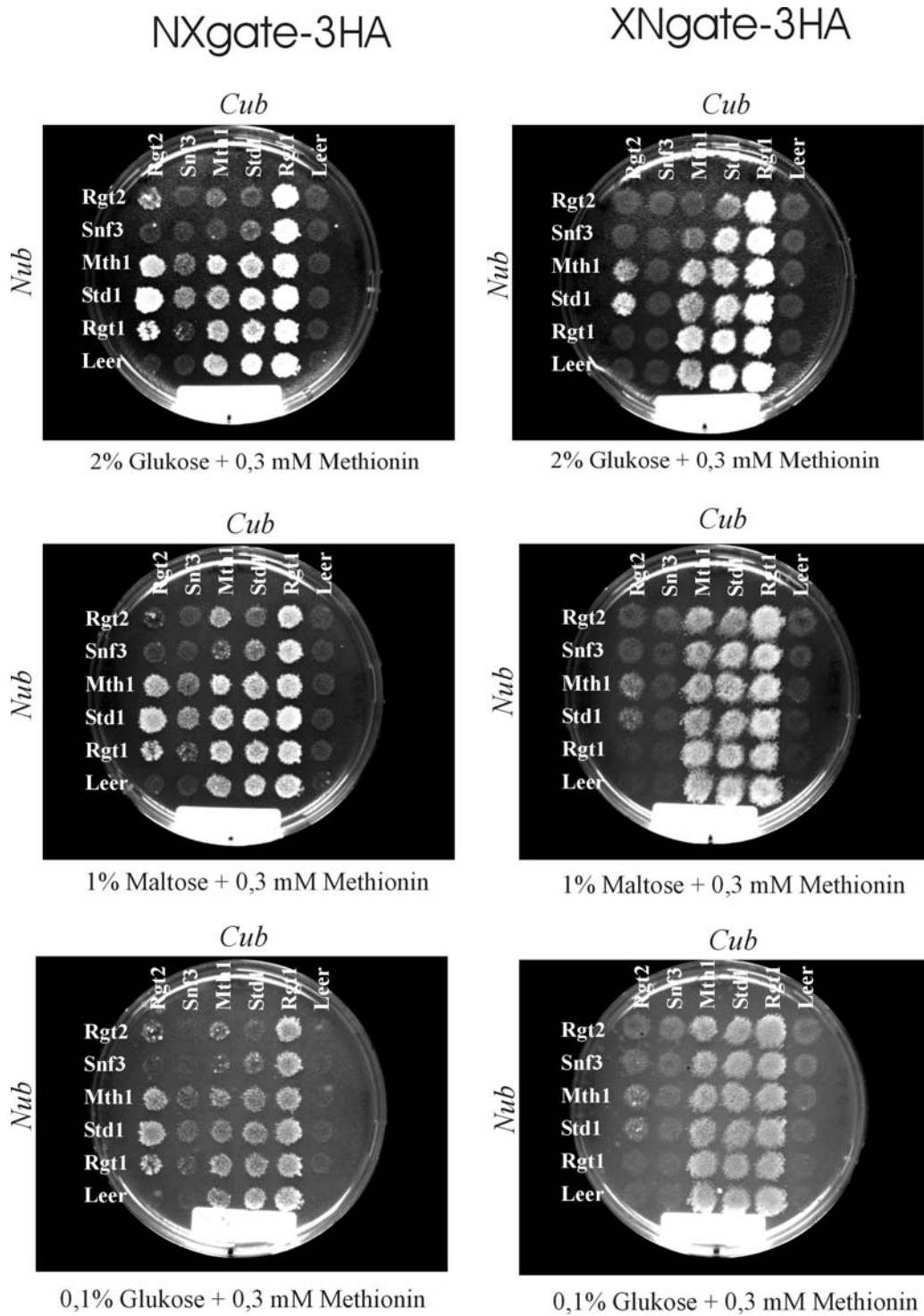


Abb. 13: Interaktionsstudien der Cub-Fusionsproteine mit den Fusionsproteinen der NXgate-3HA- und XNgate-3HA-Plasmide.

Das Zellwachstum wurde auf Medien mit den C-Quellen 2% Glukose, 1% Maltose und 0,1% Glukose mit jeweils 0,3mM Methionin getestet.

Auf den Medien mit 2% Glukose +0,3 mM Methionin interagierten die Rgt2-Proteine der Cub-Plasmide mit den Rgt2-, Mth1-, Std1- und Rgt1-Fusionsproteinen der **NubX3HA-Plasmide**, infolgedessen wurde durch die Abspaltung von PLV ein deutliches Zellwachstum ausgelöst. Im Gegensatz dazu konnten die Cub-Snf3-Proteine in Verbindung mit den Mth1- bzw. Std1-Proteinen nur wenige Protein-Wechselwirkungen eingehen, wie an der verminderten Kolonienbildung zu erkennen ist. Desweiteren interagierten die Cub-Mth1 und Cub-Std1-Fusionsproteine mit den Nub-Rgt2 und -Snf3 Fusionsproteinen. Dabei blieben die meisten der löslichen Proteine an den Membranproteinen hängen, so dass nur äußerst schwache Zellkolonien entstanden. Dagegen waren zwischen Cub-Rgt1 und Nub-Rgt2 bzw. Nub-Snf3 keine Protein-Wechselwirkungen feststellbar, da Rgt1-Cub-PLV an den *lexA*-gesteuerten Promotor binden und ein Zellwachstum auslösen konnte. Die Cub-Vektoren ohne Insert bildeten wie erwartet, keine Zellenkolonien.

Die Ergebnisse der Protein-Interaktionen auf den Medien mit 1% Maltose +0,3 mM Methionin unterscheiden sich im Vergleich zu den Tests auf 2% Glukose +0,3 mM Methionin darin, dass zwischen Cub-Mth1 bzw. -Std1 und Nub-Rgt2 bzw. -Snf3 keine Protein-Wechselwirkungen auf 1% Maltose beobachtet wurden und dass die übrigen Protein-Wechselwirkungen auf 1% Maltose schwächer waren, als auf 2% Glukose. Auf Medien mit 0,1% Glukose +0,3 mM Methionin wurden im Vergleich zu Maltose die gleichen, jedoch viel schwächeren Interaktionen beobachtet.

Eine Abhängigkeit der Interaktionen konnte für die Cub-Mth1 und Cub-Std1-Fusionsproteine mit den Nub-Rgt2 und -Snf3 Fusionsproteinen von der C-Quelle mit 2% Glukose festgestellt werden.

Auf den Medien mit 2% Glukose +0,3 mM Methionin konnten die Rgt2-Proteine der Cub-Plasmide mit den Mth1- und Std1-Proteinen der **XNub3HA-Plasmide** interagieren, während die Snf3-Proteine der Cub-Plasmide nicht bewertet wurden, da generell kein Zellwachstum zu erkennen war. Weitere Protein-Wechselwirkungen wurden zwischen Cub-Mth1 und Nub-Rgt2 bzw. -Snf3, wie auch zwischen Cub-Std1 und Nub-Rgt2 beobachtet. Dagegen waren zwischen Cub-Std1 und Nub-Snf3, wie auch zwischen Cub-Rgt1 und anderen Nub-Fusionsproteinen keine Protein-Wechselwirkungen aufgrund der vorhandenen Zellkolonien feststellbar. Die Cub-Vektoren ohne Insert zeigten, wie erwartet, kein Zellwachstum.

Die Protein-Interaktionen, die auf den Medien mit 1% Maltose +0,3 mM Methionin stattfanden, unterscheiden sich im Vergleich zu den Tests auf 2% Glukose

+0,3 mM Methionin nur darin, dass zwischen Cub-Mth1 und Nub-Rgt2 bzw. -Snf3 und zwischen Cub-Std1 und Nub-Rgt2 keine Protein-Wechselwirkungen auf 1% Maltose beobachtet wurden und dass die übrigen Protein-Wechselwirkungen auf 1% Maltose schwächer waren, als auf 2% Glukose. Auf Medien mit 0,1% Glukose +0,3 mM Methionin wurden die gleichen Interaktionen wie auf den maltosehaltigen Medien beobachtet, nur in abgeschwächter Form.

Eine Abhängigkeit der Interaktionen konnte für die Fusionsproteine Cub-Mth1 mit Nub-Rgt2 und -Snf3 und für Cub-Std1 mit Nub-Rgt2 von der C-Quelle mit 2% Glukose festgestellt werden.

3.1.5 Untersuchung der Interaktionen zwischen Cub-Rgt2, -Snf3 und Nub-Mth1, -Std1,-Rgt1 durch die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Die Fusionsproteine Rgt2 und Snf3 der CubMet25-Plasmide sollten jeweils auf eine direkte Interaktion mit den Fusionsproteinen Rgt2, Snf3, Mth1, Std1 und Rgt1 der NubX3HA-Plasmide überprüft und die Protein-Wechselwirkungen durch die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität nachgewiesen werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob verschiedene Glukosekonzentrationen bzw. verschiedene C-Quellen diese Interaktionen beeinflussen. Für die Untersuchung der Protein-Wechselwirkungen wurden die in Abschnitt 2.3.14 erzeugten Mata/ α -Stämme mit den entsprechenden Cub- und Nub-Konstrukten verwendet. Als Negativ-Kontrolle dienten die Stämme, deren CubMet25-Plasmide die Inserts Rgt2 bzw. Snf3 enthielten und deren NubX3HA-Plasmide ohne Insert (leer) waren. Die Ergebnisse sollten dann mit den in Abb. 13 vorgenommenen Tests auf Zellwachstum korrelieren.

Zur Anzucht der Vorkulturen wurden jeweils einige Kolonien der Selektivmedium-Platten mit 2% Glc/Trp⁻Leu⁻ (Abschnitt 2.3.14) in 5 ml des gleichen Mediums angeimpft und bis zur stationären Phase kultiviert. Anschließend wurden je 3x1 ml von diesen Kulturen geerntet und die Pellets auf drei verschiedene Minimalmedien mit 2% Glukose/Trp⁻Leu⁻Met⁻ +0,3 mM Met, 1% Maltose/Trp⁻Leu⁻Met⁻ +0,3 mM Met und 0,1% Glukose/Trp⁻Leu⁻Met⁻ +0,3 mM Met aufgeteilt. Die Zellen wurden anschließend darin gewaschen und in dem gleichen Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,8 angezogen. Auf diesen Medien konnten nur die Zellen wachsen, deren Cub-Fusionsproteine (Rgt2, Snf3) mit den Nub-Fusionsproteinen interagierten. Dadurch kommt es zur Bildung eines

Split-Ub-Heterodimers und der Abspaltung von PLV, das an die *lexA*-gesteuerte Promotorregion des Reportergens *lacZ* bindet und somit die Expression der β -Galaktosidase induziert. Die Aufarbeitung der Proteinrohextrakte und die Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivitäten erfolgten wie in dem Abschnitt 2.3.16 beschrieben. Die Proteinbestimmung wurde entsprechend dem Abschnitt 2.3.17 durchgeführt. Die für die spezifischen Enzymaktivitäten (U/mg) ermittelten Werte sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

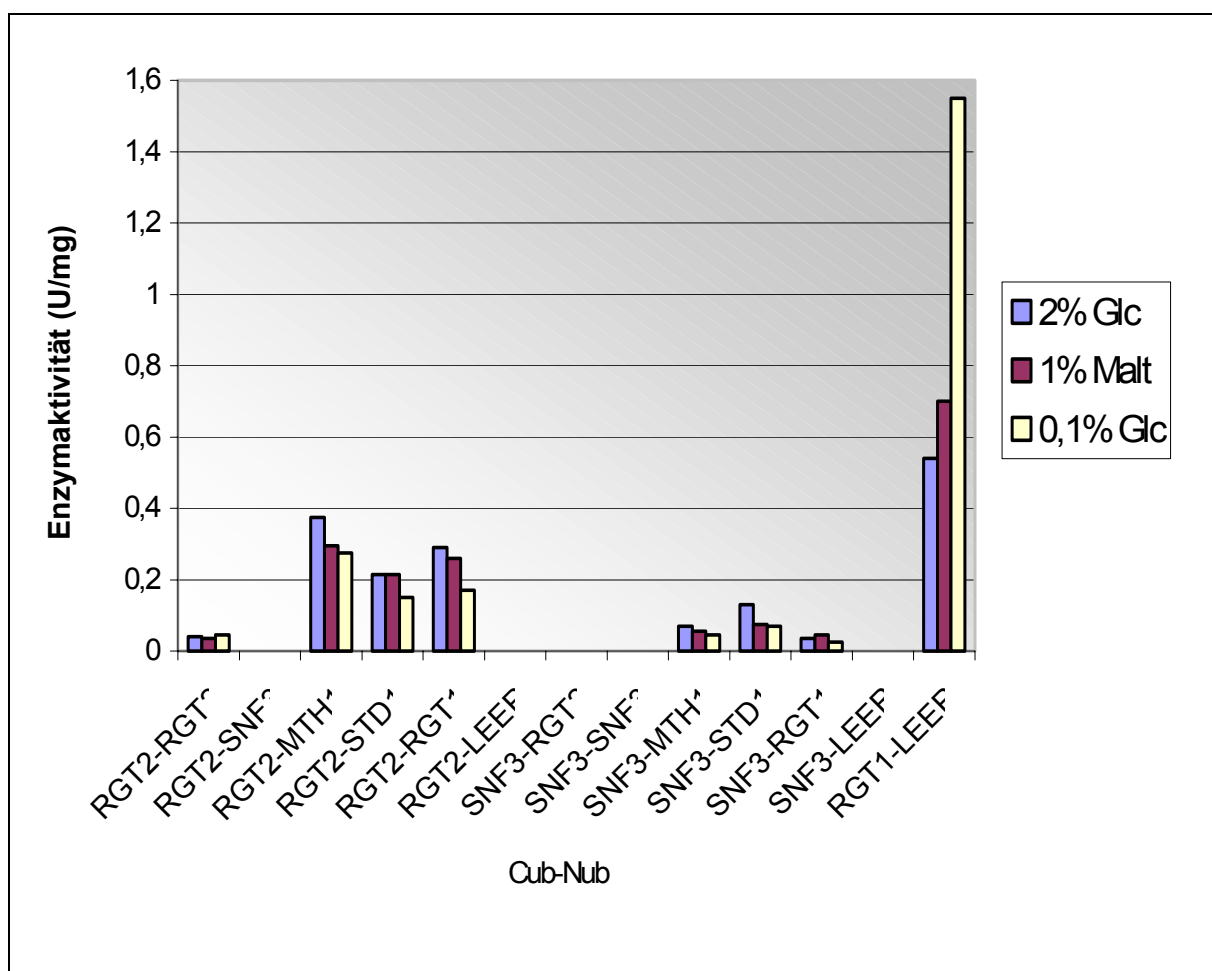


Abb. 14: Untersuchung der Protein-Wechselwirkungen mit den NXgate3HA-Plasmidkonstrukten auf verschiedenen C-Quellen durch Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivitäten (U/mg)

Die Angaben beziehen sich jeweils auf die Fusionsproteine der CubMet25- (Cub) bzw. NubX3HA- (Nub) Plasmide, die in dem Mata/ α -Stamm coexprimiert wurden. Durch Wachstum der Zellen auf 2% Glukose/ Trp⁻ Leu⁻ Met⁻ +0,3 mM Met (2% Glc), 1% Maltose/ Trp⁻ Leu⁻ Met⁻ +0,3 mM Met (1% Malt) und 0,1% Glukose/ Trp⁻ Leu⁻ Met⁻ +0,3 mM Met (0,1% Glc) wurde der Einfluss der verschiedenen C-Quellen auf die Induktion der β -Galaktosidase bestimmt. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen.

Die Ergebnisse deuten auf eine Interaktion des Cub-Proteins Rgt2 mit den Nub-Proteinen Mth1, Std1 sowie Rgt1 hin. Wobei die spezifischen Enzymaktivitäten bei 2%igen Glukosekonzentrationen am höchsten, auf den maltose-haltigen Medien (1%) meistens niedriger und bei 0,1%igen Glukosekonzentrationen am niedrigsten waren. Somit wurde für die untersuchten Interaktionen eine geringe Abhängigkeit der Expression des *lacZ* Reportergens von den jeweiligen Medien festgestellt. Äußerst schwache Interaktionen waren zwischen Cub-Snf3 und Nub-Mth1, -Std1 sowie -Rgt1 zu verzeichnen. Ebenso scheint unter den Rgt2-Proteinen eine äußerst schwache Interaktionen stattgefunden zu haben. Wie erwartet, konnten Rgt2 und Snf3 nicht mit Vektoren ohne Insert interagieren (Negativ-Kontrolle). Auffallend sind die besonders hohen Werte zwischen Rgt1 und dem Leer-Vektor. Dieser gewaltige Anstieg ist auf das im Kern lokalisierte Rgt1-Cub-PLV zurückzuführen, dass durch Bindung an den *lexA*-gesteuerten Promotor die Expression des *lacZ* Gens induziert. Die beobachteten Interaktionen der β -Galaktosidase-Bestimmungen korrelieren mit den Ergebnissen in Abb. 13.

3.1.6 Überprüfung der Interaktionen zwischen Rgt2 bzw. Snf3 und Rgt1 auf Reportermedien

Aufgrund des schwachen Zellwachstums zwischen den Cub-Rgt2- bzw. Cub-Snf3-Fusionsproteinen und dem Rgt1-Fusionsprotein in den NubX3HA-Plasmiden (Abb. 7, Abb. 13 und Abb. 14), sollten diese Proteine erneut auf ihre Wechselwirkungen hin überprüft werden. Da die Glukosesensoren Rgt2 und Snf3 normalerweise fest in der Plasmamembran verankert sind und Rgt1 quasi im Zellkern lokalisiert ist, ist eine Proteinwechselwirkung zwischen diesen Proteinen eher unwahrscheinlich.

Die Untersuchungen dazu wurden wie bereits in dem Abschnitt 3.1.4 durchgeführt und mit den entsprechenden Proben wiederholt. Für die Vorkulturen wurden je zwei Kolonien der Transformanden (Abschnitt 3.1.1.1.3) mit den CubMet25/Rgt2 bzw. CubMet25/Snf3 Plasmiden, sowie jeweils vier Einzelkolonien der Transformanden (Abschnitt 3.1.1.2.2) mit dem NubX3HA/Rgt1 Plasmid verwendet. Als Positiv-Kontrolle diente der Transformand mit dem Mth1-Fusionsprotein des NubX3HA-Plasmides. Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt.

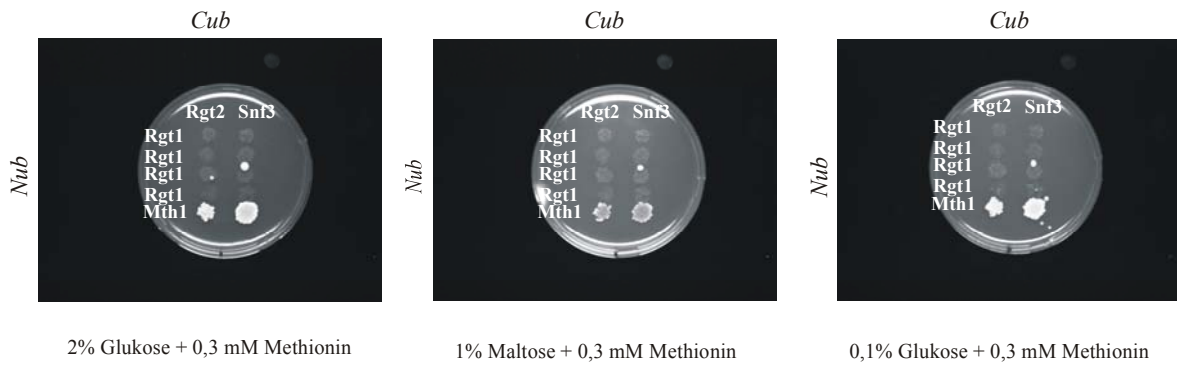


Abb. 15: Test auf Protein-Wechselwirkungen zwischen Rgt2 bzw. Snf3 und Rgt1

Als Positiv-Kontrolle wurden die Transformanden mit dem Mth1-Fusionsprotein in Kombination mit den Transformanden der Rgt2- bzw. Snf3-Fusionsproteine verwendet

Wie in den Abbildungen zu erkennen ist, waren zwischen den Proteinen Rgt2 bzw. Snf3 und Rgt1 keine Wechselwirkungen zu beobachten. Während bei der Positivkontrolle die Zellen, wie erwartet, zu Kolonien gewachsen waren und demgemäß Protein-Interaktionen zwischen Rgt2 bzw. Snf3 und Mth1 stattgefunden haben.

In der Annahme, dass die Zellen des NubX3HA-Plasmides mit dem Rgt1-Insert nicht mehr voll funktionsfähig waren, wurde das PCR-Produkt von Rgt1 (Abschnitt 3.1.1.1.1) zusammen mit dem geschnittenen Vektor NXgate-3HA (Abschnitt 3.1.1.2.1) erneut in den THY.AP5-Stamm transformiert. Mit diesen Transformanden wurde der Test auf Interaktionen, wie in diesem Abschnitt bereits vorgenommen, wiederholt. Auch diesmal war kein Zellwachstum zwischen den Probanden zu beobachten, während die Positiv-Kontrollen wiederum gewachsen waren.

Die Frage, ob nun Protein-Wechselwirkungen stattgefunden haben oder nicht, bleibt weiterhin ungeklärt. Da erstens, im Gegensatz zu den soeben ermittelten Ergebnissen, in den Abb. 7, Abb. 13 und in Abb. 14 Interaktionen zwischen den Proteinen Rgt2 und Rgt1 als auch zwischen den Proteinen Rgt1 und Snf3, aufgrund von Zellwachstum (Abb. 7 und Abb. 13) und von β -Galaktosidase-Aktivitäts-Bestimmungen (Abb. 14), zu beobachten waren. Zweitens, da die in dem Abschnitt 3.1.5 mittels β -Galaktosidase-Bestimmungen ermittelten Werte der Positiv-Kontrollen, nur etwas über den Werten der zu untersuchenden Proteine lagen, aber deren Zellen zu Kolonien herangewachsen waren.

3.1.7 Überprüfung der Interaktionen zwischen Mth1 bzw. Std1 und Rgt2 bzw. Snf3 in den XNub3HA-Plasmiden auf Reportermedien

Bei einem Vergleich der Zellen die auf 2% Glukose +0,3 mM Methionin bzw. 1% Maltose +0,3 mM Methionin gewachsen waren, wurden unterschiedlich starke Kolonienbildungen in Abhängigkeit von diesen Medien beobachtet. Auf Medien mit 2% Glukose konnte ein schwaches Zellwachstum zwischen den Cub-Mth1- bzw. Cub-Std1-Fusionsproteinen und den Rgt2- bzw. Snf3-Fusionsproteinen in dem XNub3HA-Plasmid festgestellt werden, während auf Medien mit 1% Maltose zwischen Mth1 bzw. Std1 und Rgt2 bzw. Snf3 ein gleichmäßig deutliches Zellwachstum zu erkennen war (Abb.13). Zur Überprüfung dieser C-Quellen-abhängigen Interaktionen, sollten diese Proteine erneut auf ihre Wechselwirkungen hin überprüft werden.

Die Interaktionsstudien wurden wie in dem Abschnitt 2.3.18 beschrieben durchgeführt. Dazu wurden die in dem Abschnitt 3.1.1.1.3 erzeugten Cub-Transformanden mit den Mth1- und Std1-Inserts und die in Abschnitt 3.1.1.2.2 erzeugten Nub-Transformanden mit den Rgt2- und Snf3-Inserts in den XNub3HA-Plasmiden, verwendet. Als Negativ-Kontrolle dienten Transformanden mit Cub- und XNub3HA-Plasmiden ohne Insert (Leer-Vektoren). Die Protein-Wechselwirkungen wurden auf folgenden Reportermedien getestet: 2% Glukose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met und 1% Maltose/ Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met.

Die Ergebnisse der Interaktionen sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

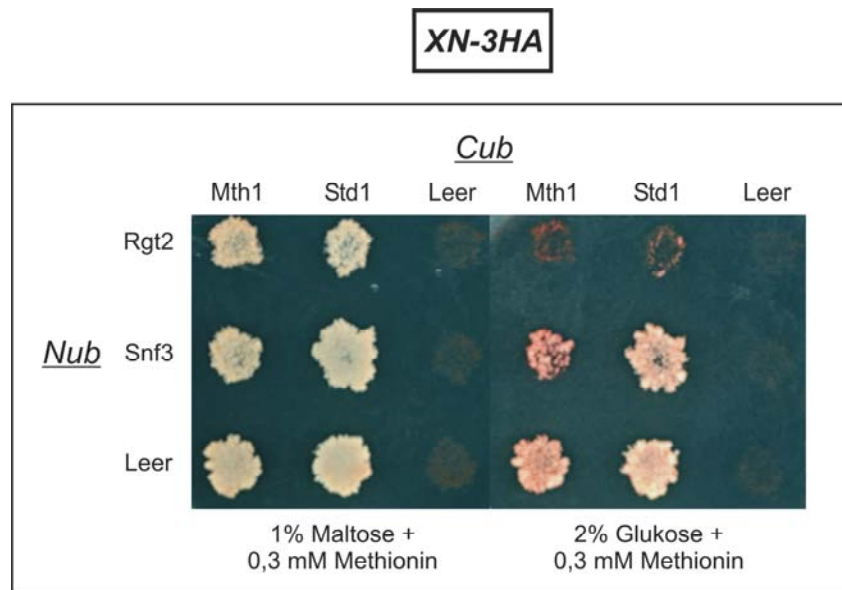


Abb. 16: Wachstumstests zur Untersuchung der Protein-Wechselwirkungen zwischen Mth1 bzw. Std1 und Rgt2 bzw. Snf3 in Abhängigkeit von den C-Quellen Maltose und Glukose

Die Tests wurden auf Reportermedien mit 1% Maltose/Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met und 2% Glukose/ Trp⁻Leu⁻Ade⁻His⁻Met⁻+0,3 mM Met durchgeführt. Die Rosa-Farbe der Zellen, kommt durch die Expression des Reportergens *ADE1* zustande.

Auf Medien mit 1% Maltose +0,3 mM Methionin konnten zwischen Cub-Mth1 bzw. -Std1 und Nub-Rgt2 bzw. -Snf3 keine Protein-Wechselwirkungen beobachtet werden. Die löslichen Proteine Mth1-Cub-PLV und Std1-Cub-PLV diffundierten in den Zellkern und induzierten durch die Bindung an den *lexA*-gesteuerten Promotor die Bildung von Zellkolonien. Im Gegensatz dazu waren auf Medien mit 2% Glukose +0,3 mM Methionin Interaktionen zwischen den löslichen Proteinen Mth1-Cub-PLV bzw. Std1-Cub-PLV und Nub-Rgt2 bzw. Nub-Snf3 festzustellen. Dabei blieben Mth1-Cub-PLV bzw. Std1-Cub-PLV fest an das Membranprotein Rgt2 gebunden und konnten infolgedessen kein Zellwachstum auslösen, wohingegen deren Bindung zu Snf3 weniger fest war und deshalb einige Zellkolonien entstanden. Bei den Cub-Vektoren ohne Insert, war wie erwartet, kein Zellwachstum zu erkennen (Negativ-Kontrolle), während bei den Nub-Leer-Vektoren (Positiv-Kontrolle) korrekterweise ein Zellwachstum festzustellen war.

Diese Ergebnisse bestätigen die bereits in Abb. 13 gemachten Beobachtungen (XNub-3HA-Plasmid), dass die Interaktionen zwischen den löslichen Proteinen Mth1 bzw. Std1 und den Membranproteinen Rgt2 bzw. Snf3 von der C-Quelle mit 2% Glukose abhängig sind, da sie auf Maltose nicht stattfinden.

3.1.8 Überprüfung der Interaktionen zwischen Mth1 bzw. Std1 und Rgt2 bzw. Snf3 durch die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Zwischen den Proteinen Mth1 bzw. Std1 und Rgt2 bzw. Snf3 wurden in Abhängigkeit von der C-Quelle mit 2% Glukose +0,3 mM Methionin Protein-Interaktionen festgestellt, während die gleichen Proteine auf 1% Maltose +0,3 mM Methionin keine Wechselwirkungen eingehen konnten (Abb.16). Diese Ergebnisse sollten zusätzlich durch die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden.

Für die Untersuchungen wurden die in Abschnitt 3.1.7 erzeugten *Mata/α*-Stämme mit den entsprechenden Cub- und Nub-Konstrukten verwendet. Als Negativ-Kontrollen dienten die Stämme, deren CubMet25-Plasmide ohne Insert (leer) waren und deren NubX3HA-Plasmide die Proteine Rgt2 und Snf3 enthielten bzw. ebenfalls ohne Insert (leer) waren. Zur Anzucht der Vorkulturen wurden jeweils einige der entsprechenden Kolonien, der Selektivmedium-Platten mit 2% Glc/Trp⁻Leu⁻, in 5 ml des gleichen Mediums angeimpft und bis zur stationären Phase angezogen. Anschließend wurden je 2x1 ml von diesen Kulturen geerntet und die Pellets auf die Reportermedien mit 2% Glukose/Trp⁻Leu⁻Met⁻ +0,3 mM Met und 1% Maltose/Trp⁻Leu⁻Met⁻ +0,3 mM Met aufgeteilt. Die Zellen wurden anschließend darin gewaschen und in dem gleichen Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,8 angezogen. Die Aufarbeitung der Proteinrohextrakte und die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivitäten erfolgte wie in dem Abschnitt 2.3.16 beschrieben. Die Proteinbestimmung wurde entsprechend dem Abschnitt 2.3.17 durchgeführt.

Die Induktion des *lacZ* Reportergens und die Expression der β -Galaktosidase wird durch die löslichen Proteine Mth1- bzw. Std1-Cub-PLV hervorgerufen, insofern sie nicht mit Rgt2 und Snf3 interagierten und an die Membranproteine gebunden blieben. Je nach Bindungsstärke sollte dann kein oder nur ein geringes Zellwachstum bzw. β -Galaktosidase-Aktivität zu beobachten sein.

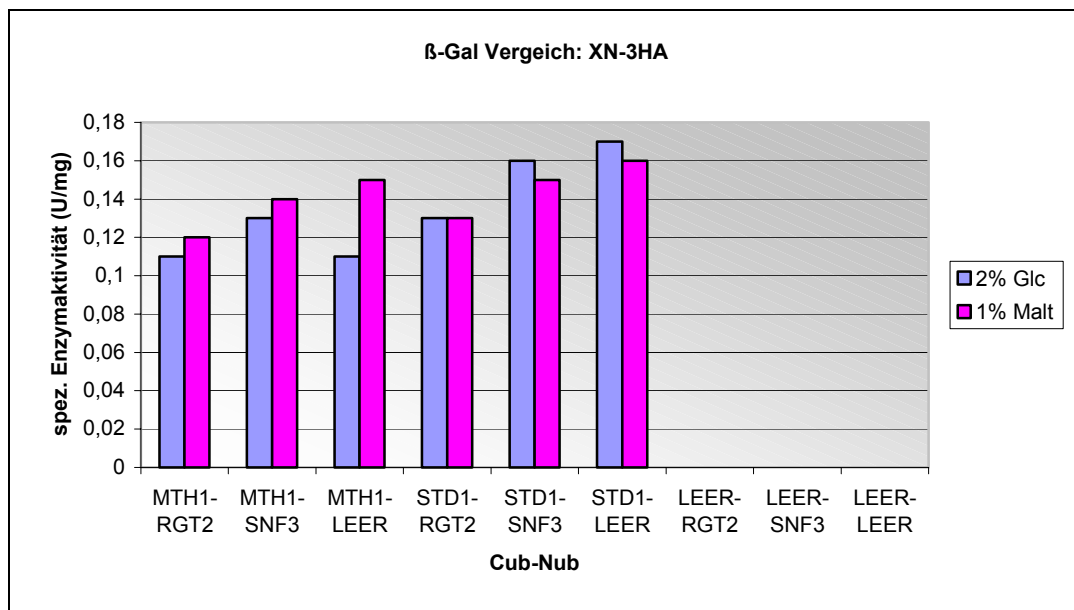


Abb. 17: Bestimmung der β-Galaktosidase-Aktivitäten zur Untersuchung von Protein-Wechselwirkungen zwischen Mth1 bzw. Std1 und Rgt2 bzw. Snf3 in Abhängigkeit von den C-Quellen Glukose oder Maltose.

Die Tests wurden auf Medien mit 2% Glukose/Trp⁻Leu⁻Met⁻+0,3 mM Met (2% Glc) und 1% Maltose/Trp⁻Leu⁻Met⁻+0,3 mM Met (1% Malt) durchgeführt.

Auf glukose- wie auch auf maltose-haltigen Medien konnten zwischen Mth1- und Std1-Cub-PLV in Verbindung mit Nub-Rgt2, -Snf3 β-Galaktosidase-Aktivitäten festgestellt werden. Eine glukose-abhängige Protein-Wechselwirkung zwischen Mth1- und Std1-Cub-PLV und Nub-Rgt2, wie sie bereits Abb. 16 bereits nachgewiesen wurden, konnte im Gegensatz dazu nicht festgestellt werden, da die Werte zwischen Glukose und Maltose beinahe gleich sind.

3.1.9 Interaktions-vermittelte *in vivo*-Abspaltung des PLV-Reporterproteins

Aufgrund von Wachstumstests (Abschnitt 3.1.7) konnten zwischen Cub-Mth1 bzw. Cub-Std1 und Nub-Rgt2 glukose-abhängige Protein-Interaktionen beobachtet werden. Nun sollte geprüft werden, ob diese Interaktionen eventuell mit einer *in vivo* Abspaltung des PLV-Reporterproteins von den Cub-Fusionsproteinen Mth1 und Std1 korrelieren. Zu diesem Zweck wurden die Proteine in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und einer Western-Blot-Analyse unterzogen.

Für die Untersuchungen wurden die in Abschnitt 3.1.7 erzeugten Mata/ α -Stämme verwendet, deren Cub-Inserts Mth1, Std1 bzw. leer (ohne Insert) bereits auf Protein-Interaktionen mit dem Nub-Inserts Rgt2 bzw. leer getestet wurden. Zur Anzucht der Vorkulturen wurden jeweils einige Kolonien der Selektivmedium-Platten (2% Glc/Trp⁻Leu⁻) in 5 ml des gleichen Mediums angeimpft und bis zur stationären Phase angezogen. Anschließend wurden je 2x1 ml von diesen Kulturen geerntet und die Pellets auf die Reportermedien mit 2% Glukose/ Trp⁻ Leu⁻ Met⁻ +0,3 mM Met und 1% Maltose/ Trp⁻ Leu⁻ Met⁻ +0,3 mM Met verteilt. Die Zellen wurden anschließend darin gewaschen und in dem gleichen Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,8 angezogen. Die Proteinrohextraktgewinnung erfolgte, wie in dem Abschnitt 2.3.12 beschrieben. Anschließend wurden die Proteine in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (Abschnitt 2.3.13) und zum Nachweis der Antikörper auf eine PVDF-Membran geblottet (Abschnitt 2.3.14). Dabei erkennt der spezifische anti-Maus-VP16 Antikörper die IgG Bindedomänen des Proteins A im PLV-Reporterprotein und der peroxidase-gekoppelte Sekundär-Antikörper anti-Maus IgG-POD, reagiert dann mit dem primären Antikörper.

Unter der Voraussetzung, dass jeweils beide Cub- und Nub-Insert-Proteine coexprimiert wurden und untereinander Interaktionen mit nachfolgender PLV-Abspaltung stattfanden, sollte nach Zugabe eines Chemilumineszenzsubstrates und anschließendem Auflegen auf einen Röntgenfilm, die *in vivo* Abspaltung des PLV-Reporterproteins von den Cub-Fusionsproteinen Mth1 und Std1 nachgewiesen werden. Dazu sollten auf dem Film je Probe zwei Banden vorhanden sein, die des Cub-PLV-Fusionsproteins und die des Reporterproteins PLV (Abschnitt 1.6). Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 18 und 19 vorgestellt.

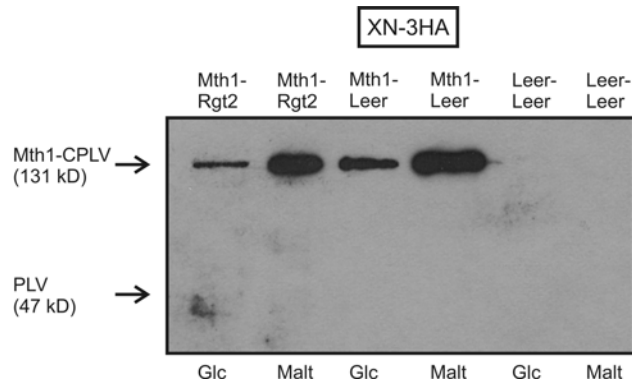


Abb. 18 Western-Blot-Analysen zum Nachweis der Expression von Mth1-Cub-PLV und der interaktions-vermittelten Abspaltung des PLV von Mth1-Cub-PLV *in vivo*

Für die Untersuchungen wurden Medien mit 2% Glukose/ $\text{Trp}^- \text{Leu}^- \text{Met}^- +0,3 \text{ mM Met}$ (Glc) und 1% Maltose/ $\text{Trp}^- \text{Leu}^- \text{Met}^- +0,3 \text{ mM Met}$ (Malt) verwendet. Die Proteine sind in der Reihenfolge Cub-Nub angegeben, z.B. Cub-Mth1-Nub-Rgt2.

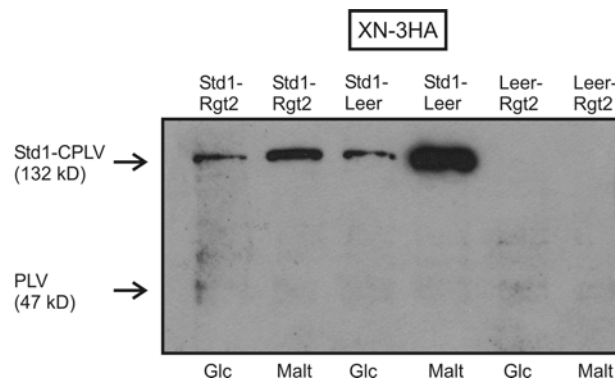


Abb. 19: Western-Blot-Analysen zum Nachweis der Expression von Std1-Cub-PLV und der interaktions-vermittelten Abspaltung des PLV von Std1-Cub-PLV *in vivo*

Für die Untersuchungen wurden Medien mit 2% Glukose/ $\text{Trp}^- \text{Leu}^- \text{Met}^- +0,3 \text{ mM Met}$ (Glc) und 1% Maltose/ $\text{Trp}^- \text{Leu}^- \text{Met}^- +0,3 \text{ mM Met}$ (Malt) verwendet. Die Proteine sind in der Reihenfolge Cub-Nub angegeben, z.B. Cub-Std1 - Nub-Rgt2.

Die Proteine Mth1-Cub-PLV und Std1-Cub-PLV konnten in Verbindung mit Nub-Rgt2, wie erwartet, auf Medien mit Glukose und Maltose detektiert werden. Ebenso konnten die Positiv-Kontrollen, Mth1-Cub-PLV und Std1-Cub-PLV in Verbindung mit Nub-Leer, auf beiden Medien nachgewiesen werden, während bei den Negativ-Kontrollen (Cub-Leer in Verbindung mit Nub-Leer bzw. Nub-Rgt2) korrekterweise keine Banden mehr zu erkennen waren.

Eine C-Quellen-abhängige *in vivo* Abspaltung des Reporterproteins PLV von Mth1-Cub-PLV bzw. Std1-Cub-PLV aufgrund von Interaktionen mit Nub-Rgt2, war auf glukosehaltigen Medien nicht eindeutig nachzuweisen, da auf dem Film in Höhe des PLV Proteins nur äußerst schwache Banden zu erkennen waren. Im Gegensatz dazu war auf maltosehaltigen Medien eindeutig keine PLV Abspaltung festzustellen.

Auf den maltosehaltigen Medien waren im Vergleich zu den glukosehaltigen Medien jedoch größere Proteinmengen zu bemerken, was auf eine generell stärkere Expression der Proteine auf Maltose hinweist.

Zusätzlich wurde überprüft, ob außer den Mth1-Cub-PLV und Std1-Cub-PLV Proteinen, auch die Nub-Fusionsproteine Rgt2 in dem jeweiligen Stamm koexprimiert wurden, um für Protein-Interaktionen präsent zu sein. Dazu wurden Western-Blot-Analysen vorgenommen. Zum Nachweis von Nub-Rgt2 diente der primäre anti-HA High-Affinity-Antikörper und der sekundär-Antikörper anti-Ratte (Abschnitt 2.3.15). Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 20 vorgestellt.

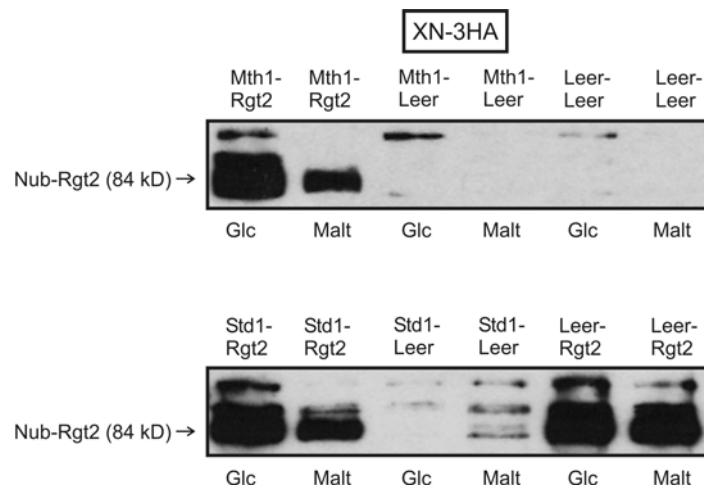


Abb. 20: Western-Blot-Analysen zum Nachweis der Expression des Nub-Rgt2-Fusionsproteins.

Die Untersuchungen wurden auf Medien mit 2% Glukose/ Trp⁻ Leu⁻ Glukosekonzentrationen Met⁻ + 0,3 mM Met (Glc) und 1% Maltose/ Trp⁻ Leu⁻ Met⁻ + 0,3 mM Met (Malt) durchgeführt.

Nachweislich konnte das Rgt2-Insert in allen Stämmen, in denen es als Nub-Fusionsgen vorhanden war, exprimiert werden. Dementsprechend waren zumindest alle Proteine, die auf Interaktionen hin getestet wurden, vorhanden.

Einer der möglichen Gründe, weshalb keine PLV-Abspaltung trotz Koexpression der Proteine Mth1 und Rgt2 bzw. Std1 und Rgt2 auf Glukose nachzuweisen war könnte sein, dass keine Protein-Interaktionen stattgefunden haben. Denkbar wäre auch, dass die Konformationen von NubG bzw. Cub-PLV durch die Fusion an Rgt2 bzw. Mth1 oder Std1 verändert wurden, so dass sie nicht mehr miteinander interagieren können. Andererseits könnten auch die Fusionsproteine selbst Konformationsänderungen erfahren haben, durch die Bindung von NubG bzw. Cub-PLV an deren N- bzw. C-Terminus.

Am wahrscheinlichsten ist jedoch der Grund, dass die Cytoplasmaproteine Mth1-Cub-PLV und Std1-Cub-PLV mit dem in der Membran verankerten Nub-Rgt2 interagierten und dabei eine sehr stabile Bindung miteinander eingingen und sich deshalb von Rgt2 nicht mehr ablösten. Wobei es zu keiner PLV-Abspaltung kam, weil Nub und Cub aufgrund ihrer Proteinkonformationen nicht in räumliche Nähe zueinander gelangen konnten. Dieses Ergebnis würde mit den Ergebnissen der glukose-abhängigen Interaktionen in Abb. 16 übereinstimmen.

Sollten trotz der schwachen Banden, PLV-Abspaltungen stattgefunden haben, dann konnten Mth1 bzw. Std1 mit Rgt2 interagieren und Nub und Cub sich idealerweise zu einem Heterodimer formieren. Dieses Ergebnis würde dann mit den Ergebnissen der β -Galaktosidase-Aktivitäts-Bestimmungen in Abb. 17 korrelieren, wobei es eher unwahrscheinlich ist, da Mth1 bzw. Std1 mit Nub-leer ebenfalls Galaktosidase-Aktivitäten vorzeigten.

3.2 Versuch der Umwandlung von Snf3 in einen bifunktionalen Sensor für Glukose und Galaktose

Kasahara *et al.* (1997) zeigten bei einem Vergleich zweier Mitglieder der Familie der Hexosetransporter in *S. cerevisiae*, dass bei dem Galaktosetransporter Gal2, der sowohl Galaktose wie auch Glukose transportiert, die Aminosäuren Tyr-446 und Trp-455 für den Galaktosetransport entscheidend sind. Entsprechende Austausch der Aminosäuren Phe-431 gegen Tyr und Tyr-440 gegen Trp in den homologen Positionen des Glukosetransporters Hxt2, der ausschließlich Glucose transportiert, führten zu einem modifizierten Hxt2, der ebenfalls die beiden Zucker transportieren kann (Kasahara *et al.*, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob sich aus dem Glukosesensor Snf3 in analoger Weise, ebenfalls durch Aminosäuresubstitution, eine entsprechende bifunktionale Sensorvariante erzeugen lässt. Dazu wurden in einem Sequenzvergleich von Snf3 und Gal2 die Codons für die Substitution im *SNF3*-Gen ermittelt und entsprechend ausgetauscht. Um das mutante-Snf3 Protein auf seine Funktionalität hin zu testen, wurde das Gen in ein Plasmid inseriert und in einen *snf3*-Deletionsstamm mit *HXT7::lacZ* Reporterkonstrukt transformiert. Die Fähigkeit des mutanten-Snf3 Proteins, eventuell als Glukose- und Galaktosesensor zu funktionieren, konnte durch die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität des auf unterschiedlichen Glukose- und Galaktosekonzentrationen gewachsenen Stammes nachgewiesen werden.

3.2.1 Bestimmung der homologen Positionen zur Aminosäuresubstitution im Snf3 Protein

In Analogie zu den für den Galaktosetransport verantwortlichen Codons wurden in einem Sequenzvergleich von Snf3 und Gal2 die Codons Phe-462 und Trp-471 für die Substitution im *SNF3*-Gen ermittelt. Im Gegensatz zu den von Kasahara *et al.* (1997) publizierten Austauschen am Hxt2 musste bei dem Snf3 Protein statt zwei Aminosäuren nur eine einzelne ersetzt werden. Die folgende Abbildung zeigt das nähere Umfeld des veränderten Bereiches von Snf3 im Kontext zu Gal2 und den bereits vorgenommenen Veränderungen am Hxt2.

Snf3 (462+471):	VMIAFICLFIAA F SATWGGV VW VISAELYPLGVRS
Snf3 (462+471) modifiziert:	VMIAFICLFIAA Y SATWGGV VW VISAELYPLGVRS
Gal2 (446+455):	CMIVFTCFYIFC Y ATTWAPVA W VITAESFPLRVKS
Hxt2 (431+440) modifiziert:	VMIVFTCLFIFF Y AI S WAPIA W VIVAESYPLRVKN
Hxt2 (431+440):	VMIVFTCLFIFF F AI S WAPIA Y VIVAESYPLRVKN

Abb. 21: Darstellung des näheren Umfeldes der homologen Positionen von Snf3, Gal2 und Hxt2

Fett dargestellt sind die für die Substitution relevanten Aminosäuren, die in Gal2 als verantwortlich charakterisiert wurden, um Hxt2 zum bifunktionalen Transporter zu machen. Die Zahlen in den Klammern geben jeweils die Positionen der fett dargestellten Sequenzen an. Die in Gal2 und Hxt2 dargestellten Sequenzen von 35 Aminosäuren entsprechen dem zehnten von insgesamt zwölf Transmembransegmenten (Kasahara *et al.*, 1998).

3.2.2 Erzeugung der mutierten Form des Snf3 Sensorproteines

Um aus dem Glukosesensor Snf3 einen möglichen bifunktionalen Glukose- und Galaktosesensor zu konstruieren, wurde eine entsprechende Mutation im *SNF3*-Gen vorgenommen. Der Einbau der Mutation in *SNF3* erfolgte mit Hilfe der synthetischen Oligonukleotidprimer Snf3mut-A und Snf3mut-E. Das Oligonukleotid Snf3mut-A wurde so konstruiert, dass das Codon Phe-462 gegen Tyr-462 ausgetauscht wurde, während die genetische Information für Trp-471 bestehen blieb. Das Oligonukleotid Snf3mut-E ist dabei komplementär zu Snf3mut-A.

Als DNA-Vorlage zur Amplifizierung des mutierten Genes *SNF3-Mut* diente die genomische DNA des Hefestammes FY 1679 (Winston *et al.*, 1995). *SNF3-Mut* wurde in zwei Fragmenten amplifiziert. Dabei wurden die homologen Sequenzen der vier Primer so ausgewählt, dass die Enden der PCR-Produkte der Primer 2 und 3 (Snf3mut-A und Snf3mut-E) miteinander rekombinieren und die Enden der PCR-Produkte der Primer 1 und 4 (*Xba*I/Snf3-A und *Eco*RI/Snf3-E) jeweils mit den restriktionsgeschnittenen Vektorenden rekombinieren.

Der forward Primer 1 *Xba*I/Snf3-A ist mit seinen ersten 39 Basen homolog zu den letzten 39 Basen vor der *Xba*I-Schnittstelle des YCplac22-Vektors und die restlichen 20 Basen sind homolog zu den ersten 20 Basen des *SNF3*-Gens. Der reverse Primer 4 *Eco*RI/Snf3-E ist mit seinen ersten 39 Basen komplementär zu den ersten 39 Basen vor der *Eco*RI-Schnittstelle des YCplac22-Vektors und mit den folgenden 20 Basen komplementär zur

Sequenz der letzten 20 Basen des *SNF3*-Gens, ausgenommen des Stopcodons. Der forward Primer 2 Snf3mut-A ist homolog zu den Basensequenzen 1866-1907 im *SNF3*-Gen und trägt eine TTT:TAT-Substitution in der 1885. Basensequenz. Der reverse Primer 3 Snf3mut-E ist komplementär zu dem forward Primer 2 Snf3mut-A und trägt daher eine AAA:ATA-Substitution.

Durch die Primerkombination 1 und 3, *XbaI*/Snf3-A für forward und Snf3mut-E für reverse, wurde das erste Fragment mit einer Größe von 1,9 kb, des insgesamt 3,5 kb großen Gens, amplifiziert. Der forward Primer 2 Snf3mut-A und der reverse Primer 4 *EcoRI*/Snf3-E amplifizierten ein zweites 1,6 kb großes Fragment. Die PCR (Abschnitt 2.3.6) für das 1,9 kb-Fragment wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturieren für 30 sec bei 95°C; Annealing für 35 sec bei 50°C; DNA-Synthese für 2 min bei 72°C; 28 Zyklen. Die PCR-Bedingungen für das 1,6 kb-Fragment waren die gleichen, jedoch betrug die DNA-Synthesezeit hier 1,6 min. Die DNA der beiden PCR-Produkte wurde nach einem präparativen Agarosegel (Abschnitt 2.3.9) ausgeschnitten, über der QIAquick Gel Extraktion Kit 50 Säule aufgereinigt (Abschnitt 2.3.8) und die Aufreinigung in einem analytischen Agarosegel überprüft.

Als Kontrolle für die Mutation wurde zusätzlich die Wildtyp-DNA von Snf3 amplifiziert und in den *XbaI*/*EcoRI*-geschnittenen Vektor YCplac22 kloniert. Als DNA-Vorlage zur Amplifizierung des Genes *SNF3-WT* diente die genomische DNA des Hefestammes FY 1679 (Winston, 1995). Durch die Primerkombination *XbaI*/Snf3-A für forward und *EcoRI*/Snf3-E für reverse wurde das vollständige 3,5 kb große Gen amplifiziert. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Denaturieren für 30 sec bei 95°C; Annealing für 35 sec. bei 50°C; DNA-Synthese für 3,5 min bei 72°C; 28 Zyklen. Die DNA des PCR-Produktes wurde nach einem präparativen Agarosegel ausgeschnitten, über der QIAquick Gel Extraktion Kit 50 Säule aufgereinigt und die Aufreinigung in einem analytischem Agarosegel überprüft.

Der Vektor YCplac22 wurde zur Amplifizierung in *E. coli* transformiert (Abschnitt 2.3.1), nach der Plasmidpräparation (Abschnitt 2.3.3) einem Kontrollverdau unterzogen und mit einem analytischen Agarosegel überprüft. Die präparative Modifikation des Vektors erfolgte mit den Restriktionsnukleasen *XbaI* und *EcoRI* und dessen korrekte Spaltung ließ sich durch die erwartete 4,8 kb Bande im Agarosegel nachweisen. Aus dem präparativen Agarosegel wurde die DNA ausgeschnitten, über der QIAquick Gel Extraktion

Kit 50 Säule aufgereinigt (Abschnitt 2.3.10) und der Erfolg der Aufreinigung in einem Agarosegel bestätigt.

Das 4,8 kb große Fragment des Vektors YCplac22 wurde zusammen mit den beiden 1,9 kb und 1,6 kb großen Fragmenten der PCR in den *S. cerevisiae* Stamm THY.AP5 transformiert (Abschnitt 2.3.2). Durch die homologe Rekombination (Abschnitt 2.3.7) der beiden PCR-Fragmente untereinander, als auch mit dem geschnittenen Vektor, entstand das neue Plasmid YCplac22/Snf3-Mut mit dem 3,5 kb-großen Snf3-Mut Insert.

Als Kontrolle für die Mutation wurden zusätzlich das 3,5 kb große PCR-Insert der Wildtyp-DNA von Snf3 (Snf3-WT) und das 4,8 kb große Fragment des Vektors YCplac22 zusammen in den *S. cerevisiae* Stamm THY.AP5 transformiert. In diesem wurde über homologe Rekombination das neue YCplac22/Snf3-WT Plasmid konstruiert.

Zusätzlich wurden als Kontrolle ein linearisierter Vektor ohne Insert (Rückligation) und ein ungeschnittener Vektor jeweils in den THY.AP5-Hefestamm transformiert. Als Kontaminationskontrolle diente der Hefestamm ohne Plasmid, auf dem keine Kolonien wachsen durften. Die Transformationsansätze wurden, entsprechend ihrer Plasmidmarker, zur Selektion auf Minimalmediumsplatten mit 2% Glukose ohne Tryptophan ausgestrichen und für zwei Tage bei 30°C inkubiert.

Um festzustellen, ob das Plasmid YCplac22/Snf3-Mut das mutierte 3,5 kb große Insert Snf3-Mut enthält bzw. ob das YCplac22/Snf3-WT-Plasmid das natürliche gleich große Snf3-WT-Insert enthält, wurden die Plasmide isoliert, amplifiziert und zweimal restriktionskartiert.

Zum Animpfen der Vorkulturen wurden jeweils mehrere Einzelkolonien von den Transformanden in Flüssigmedium mit 2% Glukose/Trp⁻ überführt. Anschließend wurden die Plasmide aus *S. cerevisiae* isoliert (Abschnitt 2.3.4) und zur Amplifizierung in *E. coli* transformiert (Abschnitt 2.3.1). Die Plasmide der Transformanden wurden nach Wachstum in ampicillinhaltigem LB-Medium erneut isoliert (Abschnitt 2.3.3) und zweimal durch Restriktionskartierung mit dem Enzym *EcoRV* und mit den Enzymen *XhoI/PstI* überprüft. Nach Auftrennung der enzymatisch geschnittenen Plasmide in einer Gelelektrophorese (Abschnitt 2.3.9), zeigten beide Plasmide die erwarteten DNA-Banden mit 3,3 kb und 5 kb bzw. 3,3 kb und 4,8 kb (0,2 kb Bande war nicht mehr sichtbar).

Die folgende Abbildung zeigt das in das Plasmid YCplac22 inserierte Fusionsgen *SNF3-MUT*.

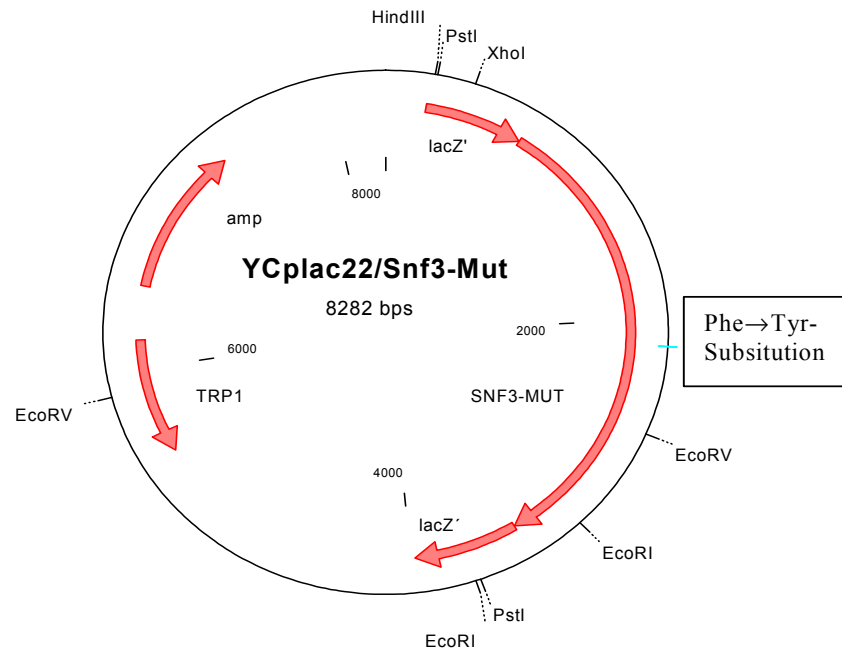


Abb. 22: Plasmidkarte des konstruierten Plasmids YCplac22/Snf3-Mut.

Das Plasmid enthält das *SNF3-MUT*-Fusionsgen unter der Kontrolle des *SNF3*-Promotors und ist mit einem *TRP1*-Markergen ausgestattet. Eingezeichnet sind die Position der Aminosäuresubstitution und die Restriktionsschnittstellen der Enzyme *EcoRV* sowie *XhoI/PstI*, die zur Restriktionskontrolle des Plasmids verwendet wurden.

Um sicherzustellen, dass die YCplac22/Snf3-Mut Plasmide die gewünschte Mutation enthalten bzw. die YCplac22/Snf3-WT Plasmide keine Mutation tragen, wurden die relevanten Bereiche zusätzlich durch Sequenzierung überprüft. Die Sequenzierung wurde von der Fa. SRD-GmbH nach der Kettenabbruchmethode von F. Sanger (1977) durchgeführt und mittels fluoreszenzmarkierter Nukleotide detektiert. Der dazu notwendige Oligonukleotidprimer Snf3-A (-80) ist mit seinen ersten 20 Basen homolog zu dem Bereich 80 Basen vor dem forward-Primer 2 Snf3mut-A. Die folgende Abbildung zeigt die vorgenommene Aminosäuresubstitution Phe-462:Tyr-462 im Snf3-Mut Protein, die durch den Austausch der Basen TTT:TAT in der 1885. Sequenz in Snf3 erfolgte. Im Kontext zu dem mutierten Protein wird das Snf3-WT Protein dargestellt.

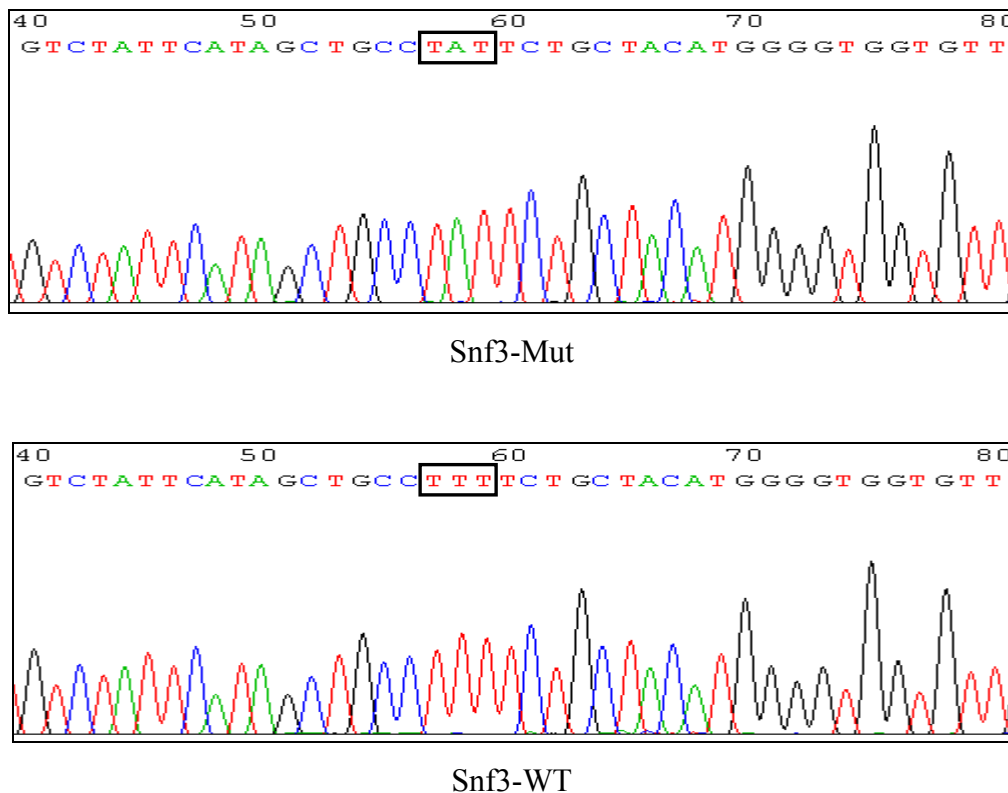


Abb. 23: Ausschnitte aus der Sequenzierung durch Fluoreszenztechnik.

Die Aminosäuresubstitution Phe:Tyr, die durch den Austausch der Basen TTT:TAT in der 1885. Sequenz erfolgte, konnte im Snf3-Mut Protein durch Sequenzierung nachgewiesen werden (siehe Rechteck). Als Vergleich diente die Sequenz des Snf3-WT Proteins, die nachweislich keine Mutation trägt.

3.2.3 Untersuchung der Snf3-Mutante auf eine Glukose- und Galaktosesensorfunktion

Das mutante *Snf3*-Mut Protein sollte auf seine Fähigkeit, als Glukose- und Galaktosesensor zu funktionieren, überprüft werden.

Dazu wurden die aus *E. coli* isolierten (Abschnitt 3.2.2) und durch Sequenzierung überprüften Plasmide YCplac22/*Snf3*-Mut und YCplac22/*Snf3*-WT in die *S. cerevisiae* Stämme RWY29 (*snf3*-Deletionsstamm) und RWY28 (Wildtypstamm) mit dem *HXT7::lacZ* Reporterkonstrukt transformiert (Abschnitt 2.3.2). Zusätzlich wurde als Kontrolle ein ungeschnittener Vektor YCplac22/leer in die beiden Hefestämme transformiert. Zur Selektion wurden die Transformationsansätze auf Minimalmedium-Platten mit 2% Glukose ohne Tryptophan ausgestrichen und für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in Medien mit 3% Glukose, 0,1% Glukose, 3% Galaktose und 0,1% Galaktose kultiviert und eine eventuelle Glukose- oder Galaktose-Sensorfunktion der Mutante, konnte dann durch die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität nachgewiesen werden.

3.2.3.1 Test auf eine Glukose- und Galaktosesensorfunktion von Snf3-Mut durch die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Um zu prüfen, ob das mutante-Protein *Snf3*-Mut als Glukose bzw Galaktosesensor funktioniert, wurden für die β -Galaktosidase-Messungen die in Abschnitt 3.2.3 erzeugten Transformanden zur Anzucht der Vorkulturen verwendet. Je eine Kolonie der Stämme RWY28 und RWY29, mit jeweils einem der Plasmide YCplac22/*Snf3*-Mut, YCplac22/*Snf3*-WT und YCplac22/leer, wurde in 5 ml Minimalmedium mit 2% Glukose/Trp⁻ angeimpft und bis zur stationären Phase kultiviert. Anschließend wurden jeweils 2x1ml von diesen Kulturen geerntet und die Pellets in vier verschiedene Minimalmedien mit 3% Glukose, 0,1% Glukose, 3% Galaktose und 0,1% Galaktose aufgenommen. Nachfolgend wurden die Zellen jeweils darin gewaschen und in dem gleichen Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,8 angezogen. Die Aufarbeitung der Proteinrohextrakte und die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivitäten erfolgten wie in dem Abschnitt 2.3.16 beschrieben. Die Proteinbestimmungen wurden entsprechend dem Abschnitt 2.3.17 durchgeführt.

Durch die Induktion des *HXT7*-Promotors, dessen nachfolgendes Strukturgen in beiden Stämmen durch das *lacZ*-Gen ersetzt war, konnte die spezifische Enzymaktivität der β -Galaktosidase jeweils bestimmt und somit die Sensorfunktionen nachgewiesen werden. Die für die spezifischen Enzymaktivitäten (U/mg) ermittelten Werte sind in der Abbildung unten dargestellt.

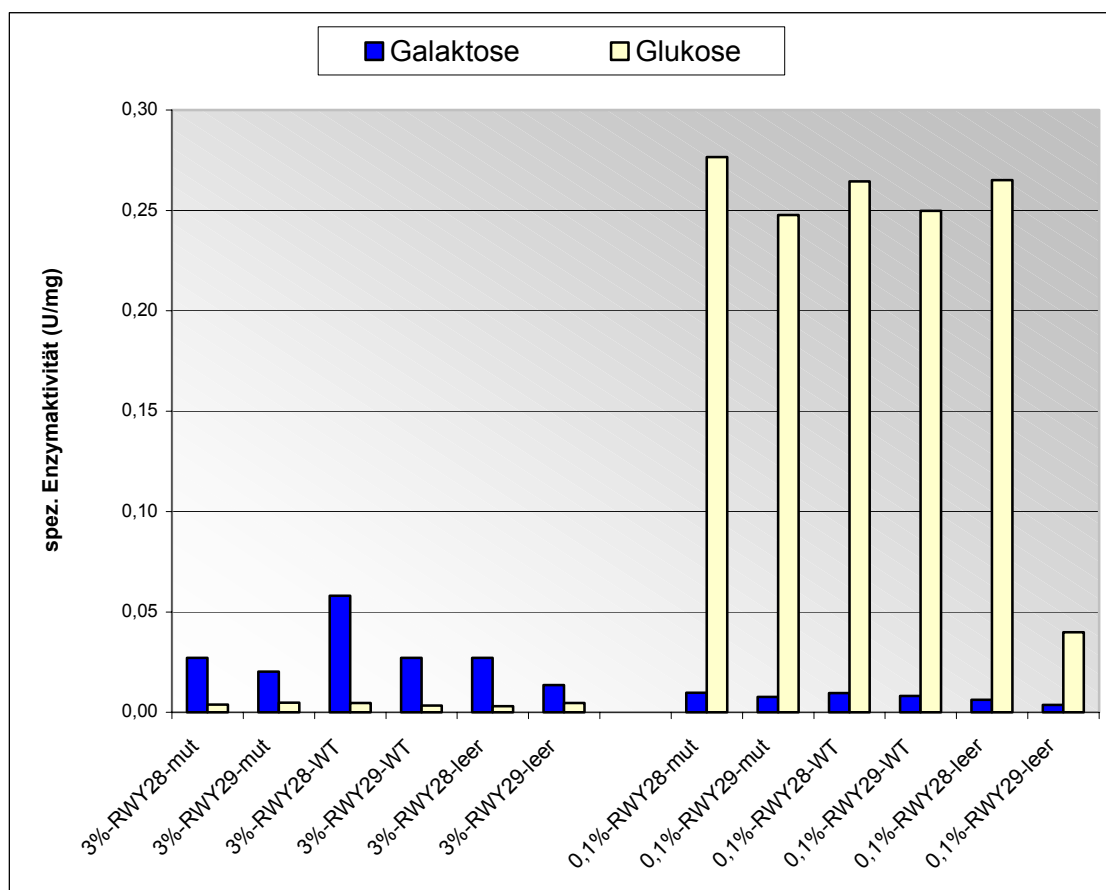


Abb. 24: Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität (U/mg) im Wildtyp- (RWY28) und im Reporterstamm (RWY29, *snf3*-Deletionsstamm) nach Wachstum auf 3% Glukose, 0,1% Glukose, 3% Galaktose und 0,1% Galaktose.

Die Stämme enthalten jeweils die Plasmide mit den Inserts -mut (mutiertes *snf3*) oder -WT (*Snf3*-WT) bzw. -leer (kein Insert). Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen.

Bei einem Wachstum auf hohen Glukosekonzentrationen (3%) waren weder für den WT-Stamm noch für den *snf3*-Deletionsstamm bzw. das WT-Insert oder das mutante-Insert, Glukose-Sensorfunktionen nachzuweisen. Diese Ergebnisse wurden für den WT-Stamm als auch für das WT-Insert erwartet, da auf hohen Glukosekonzentrationen die durch *Snf3*

regulierte *HXT7* Expression reprimiert bzw. der *HXT7* Promotor nicht angeschaltet ist (Ciriacy und Reifenberger, 1997; Özcan und Johnston, 1999). Für das mutierte Insert konnten ebenso, weder im *snf3*-Deletionsstamm noch im WT-Stamm, auf hohen Glukosekonzentrationen Sensorfunktionen festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass der *HXT7* Promotor von dem mutierten Snf3 Protein ebenfalls nicht angeschaltet wurde.

Dagegen waren auf niedrigen Glukosekonzentrationen (0,1%) in beiden Stämmen RWY28 und RWY29, unabhängig von dem Plasmid-Insert, Glukose-Sensorfunktionen zu beobachten. Diese Sensorfunktion konnte ebenfalls für den WT-Stamm mit Leer-Vektor festgestellt werden. Wobei die spezifischen Enzymaktivitäten der WT-Stämme, unabhängig von dem jeweiligen Plasmid-Insert bzw. dem Plasmid ohne Insert, nahezu gleich waren. Im Vergleich dazu waren die spezifischen Enzymaktivitäten der *snf3*-Deletionsstämme mit dem mutierten- als auch mit dem WT-Insert zwar etwas niedriger, aber im Prinzip identisch. Lediglich der *snf3*-Deletionsstamm ohne Plasmid-Insert konnte so gut wie keine Sensorfunktion vorzeigen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die mutierte Form des Snf3 Proteins exprimiert wurde und darüberhinaus auch als hoch-affiner Sensor auf niedrigen Glukosekonzentrationen mit nahezu der gleichen Intensität funktionierte, wie das unmodifizierte Snf3-Wildtypprotein.

Im Gegensatz dazu waren weder auf hohen noch auf niedrigen Galaktosekonzentrationen, Galaktose-Sensorfunktionen festzustellen, unabhängig von den Stämmen oder von den jeweiligen Insert-Proteinen.

4 Diskussion

Nährstoffwahrnehmen ist für Zellen entscheidend, um angemessen auf sich ändernde Nahrungsbedingungen reagieren zu können. Aus neuesten Studien geht hervor, dass bestimmte Mitglieder der großen Transporterfamilien keine detektierbare Transportaktivität vorzeigen und vielmehr als Nährstoffsensoren dienen. Transporterähnliche Sensoren wurden zuerst in der Hefe *S. cerevisiae* gefunden, aber es häufen sich Beweise, dass ähnliche Systeme in höheren Eukaryonten existieren. Die Glukosesensoren Snf3 und Rgt2 sind Prototypen dieser neuen Kategorie von Nährstoffsensoren in *S. cerevisiae*. Diese Proteine aktivieren Signalleitungen als Reaktion auf Glukose im externen Medium und sind in die transkriptionale Regulation von Genen involviert, die für Transporter dieser Nährstoffe kodieren.

Die molekulargenetische Charakterisierung der Funktion der Glukosesensoren Snf3 und Rgt2 in der Hefe *S. cerevisiae*, war Ziel der vorliegenden Arbeit.

4.1 Charakterisierung der Glukosesensoren Snf3 und Rgt2

Snf3 und Rgt2 gehören zur Familie der Hexosetransporter, da sie wie alle Proteine dieser Familie die charakteristische Struktur von vermutlich zwölf Transmembran-Domänen aufweisen, deren Aminosäuresequenz in dieser Region stark konserviert ist (Kruckeberg, 1996). Allerdings zeigen sie gegenüber den anderen Mitgliedern der Hexosetransporterfamilie nur begrenzte Sequenzähnlichkeiten (etwa 30%) (Celenza *et al.*, 1988; Marshall-Carlson *et al.*, 1990; Özcan *et al.*, 1996; Wölfl *et al.*, 1996) und unterscheiden sich von ihnen zusätzlich in drei wichtigen Aspekten. Erstens, sie scheinen keinen Glukose-Transport auszuüben, da selbst durch die Überexpression von Snf3 und Rgt2 kein Wachstum auf Glukosemedien in einem *hxt*-Null Stamm möglich war (Özcan *et al.*, 1998; Dlugai *et al.*, 2001). Auch konnten umfassende Mutagenesexperimente diese beiden Proteine nicht in Glukosetransporter umwandeln (Dlugai *et al.*, 2001). Zweitens besitzen sie ungewöhnlich lange C-terminale Domänen und drittens werden Snf3 und Rgt2 nur zu sehr niedrigen Niveaus exprimiert, etwa 100- bis 300-mal weniger als die *HXT1* bis *HXT4* Gene (Özcan *et al.*, 1996).

Die außergewöhnlich langen C-terminalen Anhänge von Snf3 (303 Aminosäuren) und Rgt2 (218 Aminosäuren) sind verschieden, außer in einem Peptid von 25 Aminosäuren,

dass zweimal in Snf3 und nur einmal in Rgt2 auftritt. Auch in anderen Hefen und Pilzen konnten diese konservierten Sequenzen gefunden werden (Souciet *et al.*, 2000; Cliften *et al.*, 2003; Kellis *et al.*, 2003). Mutationsanalysen ergaben, dass wenigstens eine dieser Sequenzen für eine korrekte Signalweiterleitung und die daraufhin folgende Induktion der *HXT* Expression erforderlich ist (Bisson *et al.*, 1993; Coons *et al.*, 1997; Marshall-Carlson *et al.*, 1990; Boles und Hollenberg, 1997). Dagegen konnten Deletionsmutanten, in denen diese konservierte Sequenz entfernt wurde, keine Signalfunktion mehr ausüben (Özcan *et al.*, 1998).

Die membrandurchspannenden Bereiche von Snf3 und Rgt2 sind auch für die Glukosesensorfunktion erforderlich und scheinen verantwortlich zu sein, damit diese Proteine unterschiedlich auf externe Glukosekonzentrationen reagieren (Dlugai *et al.*, 2001). Demnach funktionieren die Glukosesensoren wie zwei interagierende Domänen, mit dem für die Glukoseerkennung membrandurchspannenden Bereich und dem C-terminalen Bereich für die Signalweiterleitung.

Inzwischen konnte gezeigt werden, dass Snf3 in die transkriptionale Regulation der hoch- (Hxt6 und Hxt7), mittel- (Hxt2 und Hxt4) und niedrig- (Hxt1 und Hxt3) affinen Glukosetransporter involviert ist (Özcan und Johnston, 1995; Özcan *et al.*, 1998; Schulte *et al.*, 2000), während *RGT2* in die transkriptionale Induktion der niedrig-affinen Glukosetransporter Hxt1 und Hxt3 involviert ist (Özcan *et al.*, 1996a; Schmidt *et al.*, 1999). Übereinstimmend mit der Rolle als hoch-affiner Glukosesensor, der niedrige Konzentrationen im externen Medium detektiert, wird die *SNF3* Transkription bei hohen Glukosekonzentrationen im Außenmedium reprimiert (Marshall-Carlson *et al.*, 1990; Neigeborn *et al.*, 1986; Özcan und Johnston, 1995), während die Expression des niedrig-affinen Glukosesensors Rgt2 unabhängig von der externen Glukosekonzentration ist (Özcan *et al.*, 1996).

Die Bestätigung der regulierenden statt katalytischen Funktion von Snf3 und Rgt2, wurde durch die Isolierung von dominanten konstitutiv signalisierenden mutanten Formen beider Proteine sichergestellt, die eine viel höhere Genexpression verursachten, sogar in der Abwesenheit von induzierender Glukose (Özcan *et al.*, 1996a). Diese Mutanten sind in einem Arginin-Rest substituiert (Rgt2: Arg-231 →Lys; Snf3: Arg-229 →Lys), der vermutlich wie bei den Glut4 Transportern (Schurmann *et al.*, 1997), eine

Konformationsänderung herbeiführt, die der eigentlichen Glukose-Bindungskonformation ähnelt und die *HXT*-Expression auslöst (Boles und André, 2004).

Die Überexpression von *SNF3* oder *RGT2* verursacht konstitutive *HXT* Expression. Dies wurde zunächst als Folge der Zunahme der Snf3 bzw. Rgt2 Rezeptoren in der glukosegebundenen Form ausgelegt (Özcan *et al.*, 1998). Die Expression könnte jedoch auch durch die Entfernung eines negativen Faktors der Glukosesignalleitung verursacht sein. Demnach wären die beiden nahezu homologen Proteine Mth1 und Std1 negative Regulatoren der *HXT* Expression. Mth1 und Std1 wurden als mögliche Ziele für glukoseinduzierte Inaktivierung durch SCF^{Grr1} identifiziert (Flick *et al.*, 2003) und in Two-Hybrid-Experimenten konnte gezeigt werden, dass beide Proteine an die C-terminalen Domänen von Snf3 und Rgt2 binden (Schmidt *et al.*, 1999; Lafuente *et al.*, 2000). Durch die Überexpression der C-terminalen Domäne allein wurde ein kleines und konstitutives Signal produziert, dass viel stärker wurde, wenn die Domäne über Farnesylation oder Palmitoylation an die Plasmamembran gebunden war (Dlugai *et al.*, 2001).

Der molekulare Mechanismus der Signaltransduktion, der als Reaktion auf extrazelluläre Glukose von Snf3 und Rgt2 ausgelöst wird, ist bisher noch unbekannt. Einige Komponenten der Glukoseinduktionsleitung, die zur *HXT* Genexpression erforderlich sind wurden bereits identifiziert. Dazu gehören die Glukosesensoren Snf3 und Rgt2, die für die Wahrnehmung von extrazellulärer Glukose und die für Erzeugung von intrazellulären Signalen verantwortlich sind (Özcan *et al.*, 1996; Özcan *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Mth1 und Std1 mit den C-terminalen Domänen von Snf3 und Rgt2 interagierten (Schmidt *et al.*, 1999; Lafuente *et al.*, 2000) und dass diese Interaktion teilweise von der C-Quelle abhängig sind. Beide Proteine, Mth1 und Std1, scheinen an der Signaltransduktion des Glukosesignals von der Plasmamembran in den Kern involviert zu sein, da sie mit dem Rgt1 Transkriptionsfaktor, dem endgültigen Ziel des Glukosesignals, interagierten (Tomas-Cobos und Sanz, 2002; Lakshmanan *et al.*, 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden die vollständigen Proteine Snf3, Rgt2, Mth1, Std1 und Rgt1 auf direkte Interaktionen untereinander getestet, um Einblicke in den molekularen Mechanismus der Signaltransduktion zu erhalten, der als Reaktion auf extrazelluläre Glukose von Snf3 und Rgt2 ausgelöst wird. Desweiteren sollte festgestellt werden, ob die Protein-Wechselwirkungen von der C-Quelle abhängig sind. Unter Verwendung des Split-

Ubiquitin-Systems, dass sich für *in vivo* Interaktionsstudien zwischen löslichen (Mth1, Std1, Rgt1) und membrangebundenen Proteinen (Rgt2, Snf3) eignet, wurden die Tests durchgeführt.

4.2 Untersuchung der Plasmidkonstrukte

Um die Proteine Snf3, Rgt2, Mth1, Std1 und Rgt1 auf direkte Interaktion untereinander überprüfen zu können, wurden die Gene jeweils in Plasmide mit Cub- bzw. Nub-Anhängen kloniert und in haploide *S. cerevisiae* Stämme Mata bzw. Mat α transformiert. Anschließend wurden die Cub- und Nub-Transformanten zu diploiden Zellen (Mata/ α) gepaart und die Interaktionen, zwischen den jeweiligen Cub- und Nub-Fusionsproteinen, durch Wachstumstests auf Reportermedien detektiert.

Für die Interaktionsstudien wurden zunächst fünf Plasmidvarianten verwendet, ein Cub-Plasmid und vier verschiedene Nub-Plasmide, von denen zwei mit einem 3-fachen-HA-Epitop für Antikörperbindungen ausgestattet waren. Denn durch die *in vivo* Rekombination könnten die Gene selbst als auch NubG bzw. Cub-PLV in den rekombinanten Plasmiden verändert werden. Denkbar wäre auch, dass Nub- oder Cub durch die Konformation des Fusionsproteins in eine Position gelangen in der sie außerstande sind, mit einem Nub- oder Cub eines anderen Proteins in räumliche Nähe zueinander zu gelangen.

Nachfolgend sollte herausgefunden werden, ob bzw. welche der verschiedenen Plasmidkonstruktionen in Hinsicht auf eine Interaktion funktionieren und welche Auswirkungen die jeweiligen N- oder C-terminalen Nub-Anhänge, mit und ohne HA-Epitop, auf die Protein-Wechselwirkungen haben. Die Tests wurden auf sechs verschiedenen Reportermedien durchgeführt, um festzustellen ob verschiedene Glukosekonzentrationen oder C-Quellen diese Interaktionen beeinflussen und wie das System bei dereprimiertem bzw. herunterreguliertem *MET25*-Promotor reagiert.

Eine Gegenüberstellung der Interaktionen zwischen den Cub-Fusionsproteinen und den Fusionsproteinen der Nub-Plasmide mit N- oder C-terminalem Nub zeigte, dass die Proteine mit N-terminalem Nub gegenüber denen mit C-terminalem Nub zusätzliche Protein-Wechselwirkungen zwischen Cub-Rgt2 bzw. Cub-Snf3 und Nub-Rgt2 bzw. Nub-

Rgt1 vorzeigten (Abb. 5, 7, 13). Es konnten also geringe Unterschiede im Interaktionsverhalten bei Proteinen mit N- bzw. C-terminalem Nub festgestellt werden. Das Membranprotein Rgt2 konnte demnach mit sich selbst und mit dem ebenfalls in der Membran-lokalisiereten Snf3 Protein Wechselwirkungen eingehen. Die Interaktionen beider Membranproteine, Rgt2 und Snf3, mit dem löslichen aber im Kern-lokalisiereten Protein Rgt1 sind nicht gesichert, da eine Überprügung dieser Interaktionen negativ war (Abb.15).

Für die Proteine mit N-terminalem Nub und angehängtem C-terminalem 3-fachen-HA-Epitop wurden zusätzliche Protein-Wechselwirkungen zwischen Cub-Rgt2 bzw. -Snf3 mit Nub-Rgt1 im Vergleich zu den übrigen Nub-Konstrukten beobachtet. Da die genannten Interaktionen die einzigen waren und wie bereits oben erwähnt in einem zweiten Test nicht bestätigt wurden, wird angenommen, dass die an die Proteine gekoppelten HA-Epitope die Protein-Wechselwirkungen generell nicht beeinflussten.

Die Zellen, die auf den C-Quellen mit und ohne Methionin gewachsen waren, wurden miteinander verglichen. Daraus ergab sich, dass auf den methionin-freien Medien ein generelles Zellwachstum aufgrund der überexprimierten Cub-PLV-Fusionsproteine durch den dereprimierten *MET25*-Promotor ausgelöst wurde. Im Gegensatz dazu wurden auf den methionin-haltigen Medien unterschiedliche Kolonienbildungen, also Interaktionen, beobachtet, denn durch den gedrosselten Promotor war die Menge der exprimierten Cub-PLV-Fusionsproteine reduziert und konnte mit den Nub-Fusionsproteinen interagieren. Dementsprechend wurden Interaktionen nur auf Medien mit 0,3mM Methionin ausgewertet bzw. solche Medien in weiteren Studien verwandt.

Eine Abhängigkeit der Protein-Wechselwirkungen von der C-Quelle, konnte auf Medien mit 2% Glukose zunächst für Interaktionen zwischen Mth1-Cub-PLV und Nub-Rgt2 bzw. Nub-Snf3 beobachtet werden (Abb. 5, 6, 7 und 8).

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse und unter Verwendung von Nub-Konstrukten mit nachweislich exprimierten Fusionsproteinen (Westernblot-Analysen) wurden neue Interaktions-Tests auf Reportermedien, durch β -Galaktosidase-Bestimmungen und durch interaktions-vermittelte PLV-Abspaltung vorgenommen. Die Ergebnisse werden im Abschnitt 4.3 vorgestellt.

4.3 Ergebnisse der Protein-Interaktionen

Aus den Untersuchungen der Protein-Wechselwirkungen die auf Reportermedien, durch β -Galaktosidase-Bestimmungen oder durch interaktions-vermittelte PLV-Abspaltung erfolgten, lassen sich folgende Ergebnisse zusammenfassen.

Für Rgt2 und Snf3 wurden Protein-Wechselwirkungen mit Rgt2, Mth1, Std1 und Rgt1 festgestellt und für die Interaktionen zwischen Rgt2 und Mth1 bzw. Std1 sowie auch zwischen Snf3 und Mth1 bzw. Std1 ließ sich eine Abhängigkeit von der C-Quelle auf Medien mit 2% Glukose nachweisen.

Die Interaktionen des Membranproteins Rgt2 mit sich selbst bzw. mit dem ebenfalls in der Membran-lokalisierten Snf3 ereigneten sich nur bei Plasmidkonstrukten mit N-terminalem Nub (Abb. 5, 7, 13). Da beide Proteine jeweils in der Plasmamembran verankert sind, konnte nur durch die Abspaltung von PLV ein Zellwachstum ausgelöst und so die Proteinwechselwirkung detektiert werden. Das stärkere Zellwachstum auf 2% Glukose von Rgt2 gegenüber Snf3 läßt sich dadurch erklären, dass Rgt2 konstitutiv exprimiert wird, während die Expression von Snf3 auf hohen Glukosekonzentrationen reprimiert ist (Marshall-Carlson *et al.*, 1990; Neigeborn *et al.*, 1986; Özcan und Johnston, 1995). Die beobachteten Interaktionen zwischen diesen Proteinen sind warscheinlich eher zufällig und nicht von Bedeutung.

Die Protein-Wechselwirkungen zwischen dem kernlokalisierten, löslichen Protein Rgt1 und den Membranproteinen Rgt2 und Snf3 sind fraglich, da sie nicht konstant nachweisbar waren (Abb. 7, 13, 14, 15). Der Grund für das unterschiedliche Interaktionsverhalten könnte sein, dass sich die Proteine unmittelbar nach ihrer Synthese im Cytoplasma begegneten und dann in Wechselwirkung miteinander traten oder aber bereits im Kern bzw. in der Plasmamembran lokalisiert waren und dann keine Interaktionen zustande kamen. Die beobachteten Interaktionen ereigneten sich ebenso nur bei Plasmidkonstrukten mit N-terminalem Nub.

Dagegen waren die Protein-Wechselwirkungen zwischen Rgt2 und Mth1 bzw. Std1 wie auch zwischen Snf3 und Mth1 bzw. Std1 höchst aufschlussreich. Die genannten Interaktionen wurden unterschiedlich nachgewiesen.

Die löslichen Nub-Mth1- bzw. -Std1-Fusionsproteine, die mit den membran-gebundenen Rgt2- bzw. Snf3-Cub-PLV Fusionsproteinen interagierten, induzierten durch die Abspaltung von PLV und durch Bindung an den *lexA*-gesteuerten Promotor die Expression von Reportergenen und lösten dadurch ein Zellwachstum aus. Diese interaktionsvermittelte PLV-Abspaltung wurde auf allen drei Medien, 2% Glukose, 1% Maltose und 0,1% Glukose beobachtet, wobei die Stärke der Interaktion in der angegebenen Reihenfolge der jeweiligen Medien abnimmt, wie aufgrund der schwächeren Kolonienbildungen bemerkt wurde (Abb. 6, 8, 13).

Dagegen blieben auf Medien mit 2% Glukose die löslichen Mth1- und Std1-Cub-PLV Proteine bei Interaktionen mit Nub-Snf3 bzw. -Rgt2 an die in der Membran verankerten-Proteine gebunden und infolgedessen war dann je nach Bindungsstärke kein bzw. ein geringes Zellwachstum zu beobachten (Abb. 13, 16). Rgt2 konnte mit Mth1 und Std1 eine besonders feste Bindung eingehen, da keine Zellkolonien gewachsen waren und Snf3 konnte mit Mth1 eine festere Bindung als mit Std1 eingehen, wie aufgrund des geringen Zellwachstums bemerkt wurde. Im Gegensatz dazu diffundierten nicht-Snf3/Rgt2-interagierende lösliche Mth1- und Std1-Cub-PLV Proteine auf Medien mit 1% Maltose und 0,1% Glukose direkt in den Zellkern und induzierten durch die Bindung an den *lexA*-gesteuerten Promotor die Bildung von Zellkolonien. Dieses unterschiedliche Interaktionsverhalten auf den jeweiligen Medien zeigt deutlich die Abhängigkeit der genannten Interaktionen von der Glukose (2%) und ließ sich besonders gut in den Plasmidkonstrukten mit C-terminalem Nub nachweisen (Abb.16).

Für die C-terminalen Domänen von Snf3 und Rgt2, konnte bereits gezeigt werden, dass sie mit Mth1 und Std1 interagierten (Schmidt *et al.*, 1999; Lafuente *et al.*, 2000) und dass diese Interaktionen teilweise von der C-Quelle abhängig waren. In dieser Arbeit wurden jedoch im Gegensatz dazu, die Interaktionen der vollständigen Proteine nachgewiesen. Eine Abhängigkeit der Protein-Wechselwirkungen von der C-Quelle auf Medien mit 2% Glukose, wurde zunächst nur für Interaktionen zwischen Mth1-Cub-PLV und Nub-Rgt2 bzw. -Snf3 beobachtet, da in den ersten Tests Std1-Cub-PLV nicht funktionierte (Abb. 5-8). In den darauf folgenden Versuchen wurden dann die gleichen Abhängigkeit ein zweites mal und zusätzlich für Interaktionen zwischen Std1-Cub-PLV und Nub-Rgt2 bzw. -Snf3 festgestellt (Abb.13 und Abb.16).

Aufgrund dieser C-Quellen-abhängigen Protein-Wechselwirkungen wird angenommen, dass Mth1 und Std1 in die Signaltransduktion involviert sind, die als Reaktion auf extrazelluläre Glukose von Snf3 und Rgt2 ausgelöst wird.

Std1 (Msn3) wurde als ein high-copy-number Suppressor von einer dominant negativen Mutation des TATA-Bindeprotein isoliert (Ganster *et al.*, 1993). Das Mth1 Protein ist zu 61% homolog zu Std1. Es wurde als ein dominant negativ mutantes Allel (HTR1) gefunden, das Snf3- und Rgt2-abhängige Glukosesignale blockiert (Schulte *et al.*, 2000). Für Mth1, aber nicht für Std1 wurde gezeigt, rasch als Antwort auf Glukose entfernt zu werden, durch einen Mechanismus der den Ubiquitin-Ligase-Komplex (SCF^{Grr1}) erfordert (Flick *et al.* 2003). Die Phosphorylierung des Zielproteins ist eine Voraussetzung für die Erkennung und Ubiquitinierung von Substrat-Proteinen durch SCF^{Grr1}, die sie für den Abbau durch Proteasomen markiert (Deshaies, 1999). Als Ziele für glukose-induzierte Inaktivierung durch SCF^{Grr1} wurden inzwischen die beiden eng miteinander verwandten Proteine Mth1 und Std1 identifiziert (Flick *et al.*, 2003). In dieser Arbeit wurden auf Glukose zwischen Mth1- bzw. Std1-Cub-PLV mit Rgt2 und zwischen Mth1- bzw. Std1-Cub-PLV mit Snf3 Interaktionen beobachtet, bei denen kein Zellwachstum bzw. ein geringes Zellwachstum zu erkennen war (Abb.16). Das keine bzw. wenige Zellkolonien vorhanden waren, könnte demnach auch durch das Entfernen von Mth1 bzw. die Inaktivierung von Std1 erklärt werden. Beide Proteine, Mth1 und Std1, scheinen an der Signaltransduktion des Glukosesignals von der Plasmamembran in den Kern involviert zu sein, da sie auch mit dem Transkriptionsfaktor Rgt1, dem endgültigen Ziel des Glukosesignals, interagierten (Tomas-Cobos und Sanz, 2002; Lakshmanan *et al.*, 2003). Diese Interaktionen, an der auch der Corepressor-Komplex Ssn6/Tup1 beteiligt ist, finden in der Abwesenheit von Glukose statt und verhindern die Phosphorylierung von Rgt1 durch eine noch unbekannte Proteinkinase, während die Phosphorylierung von Rgt1 in der Gegenwart von Glukose erfolgt und zur Derepression der *HXT* Expression führt (Lakshmanan *et al.*, 2003; Flick *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Mth1- und Std1-Cub-PLV in der Abwesenheit von Glukose (Maltose) in den Kern diffundierten, da sie dort durch die Bindung an den *lexA*-gesteuerten Promotor die Expression von Reportergenen induzierten und ein Zellwachstum auslösten (Abb.16). Andere vermutlich an der Signaltransduktion beteiligten Komponenten sind die membrangebundene Kaseinkinase 1 (Yck1), für die berichtet wurde, dass sie mit Snf3/Rgt2 abhängigen Glukosesignalen verbunden war und der Corepressor-Komplex Ssn6/Tup1 (Moriya und Johnston, 2003). Das gegenwärtige Modell für die

glukoseinduzierte Signaltransduktion wurde von Moriya und Johnston (2003) erstellt und wird im Abschnitt 4.4 vorgestellt.

4.4 Modell zur glukoseinduzierten Signaltransduktion

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen, C-Quellen-abhängigen Interaktionen, zwischen Rgt2 bzw. Snf3 und Mth1 bzw. Std1, korrelieren mit dem gegenwärtigen Modell für eine glukoseinduzierte *HXT* Genexpression. Darin wird vorgeschlagen, dass Glukose an die Sensoren Snf3 und Rgt2 bindet und somit deren Konformationsänderung herbeiführt. Dadurch wird die Kaseinkinase 1 (Yck1) aktiviert und möglicherweise die Bindung von Mth1 und Std1 zu den C-terminalen Domänen der Glukosesensoren verstärkt. Nachfolgend wird Mth1 von der Kaseinkinase 1 phosphoryliert und ist dadurch für seine Ubiquitinierung durch SCF^{Grr1} und seinen endgültigen Abbau markiert. SCF^{Grr1} wird auch benötigt für die Inaktivierung der Funktion des stabilen Std1-Proteins durch einen unbekanntem Mechanismus. Auch in dieser Arbeit konnten die glukose-abhängigen Protein-Wechselwirkungen zwischen Mth1-Cub-PLV bzw. Std1-Cub-PLV und Nub-Rgt2 bzw. Nub-Snf3 festgestellt werden (Abb.16). Bei den Interaktionen zwischen Mth1 und Std1 mit Rgt2 konnten keine Zellkolonien entstehen, während bei den gleichen Interaktionen mit Snf3 einige Kolonien vorhanden waren. Dieses Wachstumsverhalten könnte entgegen der bisherigen Annahme, dass die löslichen Proteine an den Membranproteinen mehr oder weniger fest gebunden bleiben, auch durch das Entfernen von Mth1 bzw. die Inaktivierung von Std1 erklärt werden. Dies würde auch die geringeren Proteinmengen von Mth1-Cub-PLV bzw. Std1-Cub-PLV auf den Medien mit Glukose gegenüber denen auf Maltose erklären, die aufgrund von Westernblots beobachtet wurden (Abb. 18, 19). Die Blockierung der Funktionen von Mth1 und Std1 führen zur Phosphorylierung des Rgt1 Repressors (durch eine bisher unbekannte Kinase) und seiner Dissoziation von den *HXT*-Promotoren, die in der Derepression der *HXT* Transkription resultiert (Moriya und Johnston, 2003). Niedrige Glukosekonzentrationen aktivieren Snf3, um schließlich die Expression von *HXT* 2, -3, -6 und -7 zu induzieren und hohe Glukosekonzentrationen aktivieren Rgt2 um die *HXT*1 und -3 Expression herbeizuführen (Boles und André, 2004).

In der Abwesenheit von Glukose interagieren Mth1 und Std1 sowie der Corepressor-Komplex (Ssn6 und Tup1) mit dem transkriptionalen Repressor Rgt1 und verhindern seine

Phosphorylierung durch eine noch unbekannte Proteinkinase (Lakshmanan *et al.*, 2003; Flick *et al.*, 2003). Das Mth1- und Std1-Cub-PLV in der Abwesenheit von Glukose (Maltose) in den Zellkern diffundieren, konnte in der vorliegenden Arbeit ebenso nachgewiesen werden, da sie dort durch die Bindung an den *lexA*-gesteuerten Promotor die Expression von Reportergenen induzierten und ein Zellwachstum auslösten (Abb.16). Auch die Beobachtung, dass die Proteinmengen von Mth1- und Std1-Cub-PLV auf Maltose größer als auf Glukose sind, deuten darauf hin, dass sie in der Abwesenheit von Glukose (Maltose) nicht abgebaut werden und damit für die Bindung an Rgt1 im Zellkern vorhanden sind. Rgt1 ist ein Zn(II)₂-Cys₆-Cluster-Typ Transkriptionsfaktor (Özcan *et al.*, 1996b), der direkt an die *HXT1*, -2, -3 und -4 Promotoren bindet (Flick *et al.*, 2003; Mosley *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003) und genetische Daten schlagen vor, dass es auch mit *HXT6* und -7 Promotoren agiert (Schulte *et al.*, 2000). Demnach funktioniert Rgt1 als Repressor in der Abwesenheit von Glukose und wird in Gegenwart von Glukose durch seine Phosphorylierung zu einem Transkriptionsaktivator umgewandelt (Lakshmanan *et al.*, 2003). Die folgende Abbildung zeigt das von der Glukose ausgelöste Signal und die damit verbundenen Proteine.

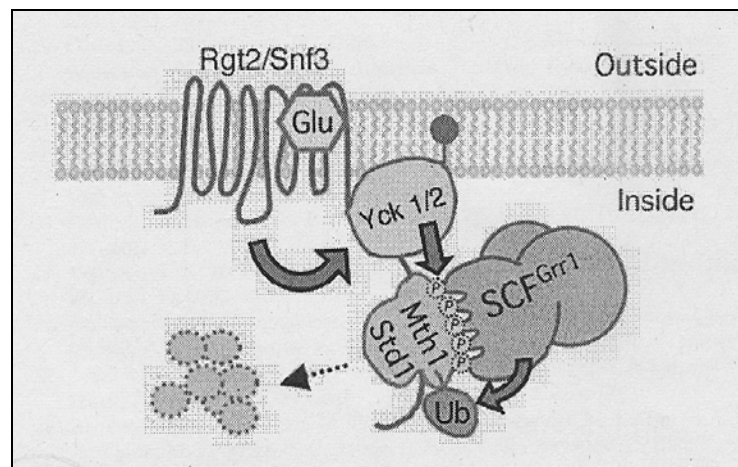


Abb. 25: Gegenwärtiges Modell zur glukoseinduzierten Signaltransduktion von Snf3 bzw. Rgt2 zu Mth1 und Std1

Die Bindung von Glukose (Glu) an Rgt2 bzw. Snf3 aktiviert die Kaseinkinase 1 (Yck1), die die Phosphorylierung von Mth1 und Std1 katalysiert, die am C-Terminus der Glukosesensoren gebunden sind. Die phosphorylierten Mth1 und Std1 werden von SCF^{Grr1} erkannt und sind dadurch für ihre Ubiquitinierung und ihren endgültigen Abbau markiert. Der weitere Verlauf der Signalweiterleitung (nicht dargestellt) ist, dass der Abbau von Mth1 bzw. Std1 zur Phosphorylierung von Rgt1 führt, wodurch seine Bindung an die *HXT*-Promotoren verhindert wird und somit zur Derepression der *HXT* Genexpression führt.

4.5 Charakterisierung des Galaktosetransporters Gal2

In der Hefe *S. cerevisiae* wird der Transport von extrazellulärer Galaktose von der Galaktose Permease Gal2 vermittelt. Sie ist zu mehr als 60% homolog zu den Hxt-Proteinen und gehört somit zur Familie der Hexosetransporter Proteine, wobei die hoch-affinen Glukosetransporter Hxt6 und Hxt7 sogar zu 71,8% identisch zu Gal2 sind. Das *GAL2* Gen ist auf dem Chromosom XII lokalisiert und besteht aus 574 Aminosäuren. *Gal2* Deletionsmutanten waren kaum fähig auf Medien mit Galaktose als einziger Kohlenstoff-Quelle zu wachsen (Tschopp *et al.*, 1986). Galaktose wird wie Glukose, entlang eines Konzentrationsgradienten mittels erleichterter Diffusion über die Plasmamembran in die Zelle transportiert. Galaktoseaufnahmekinetiken von Wildtyp- oder *hxt1-hxt7*-deletierten Zellen, die auf Galaktose gewachsenen waren, sind nicht linear und zeigten biphasische Aufnahme mit hoch- und niedrig-affinen Komponenten (Reifenberger *et al.*, 1997; Ramos *et al.*, 1989). Dies läßt vermuten, daß die Aufnahme von Galaktose durch die Galaktose Permease von anderen Proteinen beeinflusst wird. Der Gal2 Transporter ist auch fähig Glukose mit beinahe derselben Kapazität und Affinität ($K_m \sim 2\text{mM}$) wie Galaktose zu transportieren, wenn dem *Gal2* Gen ein konstitutiver Promotor vorgeschaltet ist (Liang und Gaber, 1996; Nishizawa *et al.*, 1995; Reifenberger *et al.*, 1997). Dies erklärt, warum der Glukosetransport in Galaktose-gewachsenen Zellen durch Galaktose streng inhibiert ist (Nevado *et al.*, 1993).

Wie bei den meisten *GAL* Genen, ist die *GAL2* Expression durch intrazelluläre Galaktose induziert und durch Glukose reprimiert (Lagunas, R., 1993; Huibregtse *et al.*, 1993; Johnston und Carlson, 1992). Gal2 ist auch Subjekt der glukose-induzierten Inaktivierung. Dieser Inaktivierungsprozess involviert die durch Glukose hervorgerufene Internalisierung von Gal2 durch Endozytose und seinen proteolytischen Abbau in der Vakuole (Horak und Wolf, 1997). Während die Galaktoseinduktion unter der Kontrolle der Gal1/3-Gal80p-Gal4 Signalleitung ist (Meyer *et al.*, 1991) und direkt durch die Bindung von intrazellulärer Galaktose zu Gal1 oder Gal3 (Bhat und Murthy, 2001) aktiviert wird.

Zur Identifizierung der Substraterkennungs-Domäne des Gal2 Galaktosetransporters, wurden Serien von Chimären zwischen dem Gal2 und dem Hxt2 Glukosetransporter konstruiert (Nishizawa *et al.*, 1995; Kasahara *et al.*, 1996). Dabei wurde das Transmembransegment 10 (TM10) als die Domäne identifiziert, die für die

unterschiedliche Erkennung von Galaktose und Glukose verantwortlich ist. Dieses Transmembransegment umfasst 35 Aminosäurereste, von denen sich interessanterweise in dieser Region nur 12 Aminosäuren zwischen Gal2 und Hxt2 unterscheiden (Kasahara *et al.*, 1997). In weiteren Versuchen wurden innerhalb dieser Region für Gal2 als auch für Hxt2 je zwei Aminosäuren gefunden, die für deren Substraterkennung entscheidend sind. Kasahara *et al.* (1998) zeigten, dass die beiden Aminosäuren Tyr⁴⁴⁶ essentiell und Trp⁴⁵⁵ wichtig für die Galaktoseerkennung durch Gal2 im TM 10 sind, während für Hxt2 die zwei Aminosäurereste Phe⁴³¹ entscheidend und Tyr⁴⁴⁰ wichtig für die Glukoseerkennung sind und sich ebenfalls im TM 10 befinden. Desweiteren wurde herausgefunden, dass entsprechende Austausche der Aminosäuren Phe-431 gegen Tyr und Tyr-440 gegen Trp in den homologen Positionen des Glukosetransporters Hxt2, der ausschließlich Glucose transportiert, zu einem modifizierten Hxt2 führten, der ebenfalls die beiden Zucker transportieren kann (Kasahara *et al.*, 1998).

Aufgrund dieses Ergebnisses und da Snf3 ebenfalls ein Mitglied der Hexosetransporterfamilie ist, wurde die Überlegung angestellt, ob sich aus dem Glukosesensor Snf3, durch eine entsprechende analoge Aminosäuresubstitution, ein bifunktionaler Glukose- und Galaktosesensor erzeugen lässt. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde diese Fragestellung überprüft.

4.6 Snf3-Mut funktioniert als hoch-affiner Glukosesensor

Zur Erzeugung einer entsprechenden, eventuell bifunktionalen Sensorvariante, wurden zunächst Sequenzvergleiche zwischen den homologen Positionen von Snf3, Gal2 und Hxt2 angestellt. Dabei wurden in Analogie zu den für den Galaktosetransport verantwortlichen Codons, die für Snf3 relevanten Codons (Phe⁴⁶² und Trp⁴⁷¹) ermittelt. Im Gegensatz zu dem modifizierten Hxt2, musste zur Modifikation von Snf3 nur eine Aminosäure (Phe⁴⁶² → Tyr⁴⁶²) ersetzt werden. Der Einbau der Mutation in das *SNF3* Gen erfolgte mit Hilfe von synthetischen Oligonukleotidprimern. Um das mutante-snf3 Protein auf seine Funktionalität hin zu testen, wurde *SNF3-MUT* in ein Plasmid inseriert und in einen *snf3*-Deletionsstamm mit *HXT7::lacZ* Reporterkonstrukt transformiert. Durch die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität, des auf hohen und niedrigen Galaktose- und Glukosekonzentrationen gewachsenen Stammes, konnte für das mutante Protein eine hoch-affine Glukosesensorfunktion auf niedrigen Glukosekonzentrationen (0,1 %) festgestellt

werden, die sich in der spezifischen Enzymaktivität nur minimal von dem unmodifizierten Snf3-Wildtypprotein unterscheidet.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die im Snf3 Protein vorgenommene Substitution scheinbar keine gravierende Veränderung für das Protein bedeutet. Der Grund für die etwas geringere spezifische Enzymaktivität der Mutante gegenüber dem Wildtypprotein könnte sein, dass der Austausch der einzigen Aminosäure dazu führt, dass die Glukose nicht mehr mit der gleichen Affinität gebunden wird wie in dem unmodifizierten Protein und infolgedessen die Signalweiterleitung reduziert ist. Auch auf hohen Glukosekonzentrationen verhielt sich das mutante Snf3 Protein wie das Wildtypprotein und scheint ebenfalls die *HXT7* bzw. *lacZ* Transkription bei hohen externen Glukosekonzentrationen zu reprimieren.

Im Gegensatz dazu waren entgegen den Erwartungen, weder auf hohen noch auf niedrigen Galaktosekonzentrationen, Galaktose-Sensorfunktionen festzustellen. Einer der Gründe dafür könnte sein, dass, obwohl alle Proteine Gal2, Hxt2 und Snf3 zur Familie der Hexosetransporter gehören, die Homologien zwischen Gal2 und Snf3 mit nur 28,7% zu gering waren, während im Gegensatz dazu Gal2 und Hxt2 immerhin zu 67,8% homolog zueinander sind. Diese Homologie-Unterschiede wurden auch im TM10 gefunden, wo sich von den insgesamt 35 Aminosäuren zwischen Gal2 und Hxt2 nur 12 (34,3%) unterscheiden, während zwischen Gal2 und Snf3 18 Aminosäuren (51,4%) nicht identisch sind. Diese Unterschiede könnten sich auch auf die Proteinkonformation auswirken, so dass die Liganden-Bindungsstellen zwischen den Transportern und dem Sensor wahrscheinlich verschieden sind und von Snf3-Mut keine Galaktose detektiert wird.

Kasahara *et al.*, (1998) fanden heraus, dass Tyr⁴⁴⁶ von Gal2 essentiell für die Erkennung von Galaktose ist, da anstelle von Tyr keine andere von den übrigen 19 Aminosäuren fähig war, einen Galaktosetransport auszuüben. Die Wichtigkeit von Trp⁴⁵⁵ in Gal2 konnte ebenfalls durch Austausche mit irgendeiner der anderen 19 Aminosäuren festgestellt werden, da dann die Transporteigenschaften für Galaktose auf 20% reduziert waren. Obwohl die für die bifunktionalen Transporteigenschaften von Gal2 und Hxt2 verantwortlichen Aminosäuren Tyr und Trp in dem modifizierten Snf3 in den homologen Positionen vorhanden waren, konnte in dem modifizierten Snf3 die bisherige Glukosesensorfunktion des Snf3 zwar erhalten bleiben aber keine zusätzliche

Galaktosesensoreigenschaft festgestellt werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der mutierte Sensor eventuell in einen Transporter umgewandelt wurde, da die für die Glukose- und Galaktoseerkennung identifizierten Aminosäuren stets für den Transport von Glukose und Galaktose nachgewiesen wurden. Dies bleibt eventuell zu überprüfen. Eine andere Möglichkeit wäre auch größere Fragmente im TM10 von Snf3 auszutauschen, oder gar das komplette TM10 von dem modifizierten Hxt2 bzw. des Gal2 mit dem von Snf3.

Ein anderer Aspekt der für die Galaktose- und Glukoseerkennung noch erwähnenswert scheint ist, dass sich die Aminosäuren Tyr⁴⁴⁶ in Gal2 und Phe⁴³¹ in Hxt2 in der Mitte des TM10 befinden und Trp⁴⁵⁵ in Gal2 und Tyr⁴⁴⁰ in Hxt2 auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert sind (Kasahara *et al.*, 1998). Unklar ist jedoch, ob sich die substituierte Aminosäure von Snf3-Mut, ebenfalls im TM10 befindet, bzw. ob sie dann die gleiche, scheinbar wichtige Position wie die Homologen in Gal2 und Hxt2 einnimmt.

Ebenso ist auch ein anderer Mechanismus des „Sensing“ denkbar. Eventuell werden Glukose und auch Galaktose gar nicht von Snf3 erkannt. Weder die Bindung von Glukose an die Sensoren noch die Aktivierung durch Glukose wurden jemals nachgewiesen. Da Snf3 fähig ist ein Signal zu transduzieren, sogar in der Abwesenheit von extrazellulärer Glukose (auf Ethanol), könnte es in Proteinkomplexe involviert sein, die auch durch andere Signale als durch extrazelluläre Glukose aktiviert werden. Es wurde beobachtet, dass der *HXT7* Promotor in einem WT-Stamm auf niedrigen Hexosekonzentrationen (Galaktose, Glukose und Fruktose durch Hydrolyse von Raffinose) induziert und in einer *snf3* Deletionsmutante die Induktion des Promotors abgeschafft war. Auch auf alternativen C-Quellen wie Ethanol, also unter nicht-induzierenden Bedingungen, zeigte der *HXT7* Promotor im WT-Stamm eine grundlegende Aktivität und in der *snf3* Deletionsmutante war die Induktion des Promotors auf Ethanol ebenso abgeschafft wie auf Raffinose (Dlugai *et al.*, 2001). Der vollständige Verlust an selbst grundlegender *HXT7* Transkription führt zu der Annahme, dass Snf3 an einem signaltransduzierenden Prozess teilnimmt, sogar in der Abwesenheit von externer Glukose. Demnach könnten die Sensoren, Snf3 und Rgt2, zu Untereinheiten von membrangebundenen Protein-Komplexen gehören, in denen sie nicht primär an der Glukoseerkennung beteiligt sind, sondern sekundär agieren, indem sie Signale empfangen und weiterleiten und so die Gen Transkription in der Gegenwart und Abwesenheit von externen Nährstoffen regulieren.

5 Zusammenfassung

Das Thema der vorliegenden Arbeit war die molekulargenetische Charakterisierung der Funktion der Glukosesensoren Snf3 und Rgt2 in der Hefe *S. cerevisiae*. Snf3 und Rgt2 gehören zur Familie der Hexosetransporter. Sie unterscheiden sich von ihnen jedoch in ihrer Funktion als Glukosesensoren wie auch durch ihre ungewöhnlich langen C-terminalen Domänen. Snf3 und Rgt2 sind integrale Membranproteine, die als Reaktion auf extrazelluläre Glukose Signale auslösen, die zur Expression bestimmter Hexosetransporter führt. Einige Komponenten, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, wurden bereits identifiziert. Jedoch ist der genaue Mechanismus, der zur Expression der Hexostransporter führt, noch nicht vollständig aufgeklärt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Proteine Snf3, Rgt2, Mth1, Std1 und Rgt1 auf direkte Interaktionen untereinander getestet, um Einblicke in den molekularen Mechanismus der Signaltransduktion zu erhalten. Desweiteren sollte festgestellt werden, ob die Protein-Wechselwirkungen von der C-Quelle abhängig sind. Es konnte gezeigt werden, dass zwischen den Membranproteinen Rgt2 bzw. Snf3 und den löslichen Proteinen Mth1 bzw. Std1 Interaktionen in Abhängigkeit von Glukose stattfanden. Diese Ergebnisse unterstützen das von Moriya und Johnston aufgestellte, gegenwärtige Modell für eine glukoseinduzierte *HXT* Genexpression.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde geprüft, ob sich aus dem Glukosesensor Snf3 durch eine Aminosäuresubstitution ein bifunktionaler Sensor für Glukose und Galaktose erzeugen läßt. Dazu wurden die für den Galaktosetransport verantwortlichen Aminosäuren in den homologen Positionen von Snf3 ausgetauscht. Die Bestimmungen der Regulation des Snf3-kontrollierten *HXT7* Promotors ergaben, dass das mutierte Snf3 Protein, wie das Wildtyp-Snf3 Protein, eine normale Glukosesensorfunktion ausübt aber keine Galaktosesensorfunktion vorzeigt.

6 Literaturverzeichnis

Barnett, J.A. (1976)

The utilization of sugars by yeast

Adv. Carbohydrate Chem. Biochem. **32**: 125-234

Barnett, J.A. (1997)

Sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. In: Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, genetics, biotechnology, and applications (Zimmermann, F.K. und Entian, K.-D., eds.)

Technomic Publishing Company, Lancaster PA, 45-65

Bhat, P. J. und Murthy, T. V. (2001)

Transcriptional control of the *GAL/MEL* regulon of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of galactose-mediated signal transduction

Mol. Microbiol. **40**:1059-1066

Birnboim, H.C. und Doly J. (1979)

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA

Nucl. Acids Res. **7**: 1513-1523

Bisson, L.F., Neigeborn, L., Carlson, M. und Fraenkel, D.G. (1987)

The *SNF3* gene is required for high-affinity glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae*

J. Bacteriol. **169**: 1656-1662

Bisson, L.F.; Coons, D.M., Kruckeberg, A.L. und Lewis, D.A. (1993)

Yeast sugar transporters

Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. **28**: 259-308

Boles, E. und Hollenberg C.P. (1997)

The molecular genetics of hexose transporter in yeasts

FEMS Microbiol. Rev. **21**: 85-111

Boles, E. und Krämer, R. (2004)

Molecular Mechanisms controlling transmembrane transport

Springer Verlag, Berlin/Heidelberg

Role of transporter-like sensors in glucose and amino acid signalling in yeast

Boles, E. und André, B. (pp.121-153)

Boles, E., (2002)

Yeast as a model system for studying glucose transport. In Quick MW, ed.
Transmembrane transporters
Wiley, Inc. 19-36

Buziol, S., Becker, J., Baumeister, A., Jung S., Mauch, K., Reuss, M., Boles, E. (2002)

Determination of in vivo kinetics of the starvation-induced Hxt5 glucose transporter of
Saccharomyces cerevisiae
FEM Yeast Res. **2**: 283-291

Celenza, J.L., Marshall-Carlson, L. und Carlson, M. (1988)

The yeast *SNF3* gene encodes a glucose transporter homologous to the mammalian protein
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**: 213-2134

Ciriacy, M. und Reifenberger E. (1997)

Hexose transport. In: Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, genetics, biotechnology, and
applications (Zimmermann, F.K. and K.-D. Entian, K.-D., eds.), pp. 45-65
Technomic Publishing Company, Lancaster PA, 45-65

**Cliften, P., Sudarsanam, P., Desikan, A., Fulton, L., Fulton, B., Majors, J.,
Waterston, R., Cohen, B.A., Johnston, M. (2003)**

Finding functional features in *Saccharomyces* genomes by phylogenetic footprinting
Science **301**: 71-76

Coons, D.M., Vagnoli, P. und Bisson, L.F. (1997)

The C-terminal domain of Snf3 is sufficient to complement the growth defect of snf3 null
mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: *SNF3* functions in glucose recognition
Yeast **13**: 9-20

Deshais, R. J. (1999)

SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases
Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **15**:435-467

Dlugai, S., Hippler, S., Wieczorke, R., Boles, E. (2001)

Glucose-dependent and -independent signalling functions of the yeast glucose sensor Snf3
FEBS Lett. **505**: 389-392

Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W. (1988)

High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation
Nucl. Acids Res. **16**: 6127-6145

Eckert, J. H., Wittke, S. und Johnsson, N. (2001)

Split-Ubiquitin: Ein Sensor für Interaktionen und Konformationsänderungen von Proteinen *in vivo*

Biospektrum **1**: 36-39

Entian K.D. und Schüller, H.J. (1997)

Genetics of di- and trisaccharide utilization. In: Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, genetics, biotechnology, and applications (Zimmermann, F.K. und Entian, K.-D., eds.)

Technomic Publishing Company, Lancaster PA, 45-65

Entian, K.D. und Barnett, J.A. (1992)

Regulation of sugar utilization by *Saccharomyces cerevisiae*

Trends Biochem. Sci. **17**: 506-510

Eraso, O. und Gancedo, J.M. (1984)

Catabolite repression in yeast is not associated with low levels of cAMP

Eur. J. Biochem. **141**: 195-198

Fields, S. und Song, O. (1989)

A novel genetic system to detect protein-protein interactions

Nature **340**: 245-246

Flick, K. M., Spielwoy, N., Kalashnikova, T.I., Guaderrama, M., Zhu, Q., Chang, H.C., Wittenberg, C. (2003)

Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from *HXT* gene promoters

Mol. Biol. Cell **14**: 3230-3241

Ganster, R.W., Shen, W., Schmidt, M. C. (1993)

Isolation of *STD1*, a high-copy-number suppressor of a dominant negative mutation in the yeast TATA-binding protein

Mol. Cell Biol. **13**:3650-3659

Gietz, R.D. und Woods R.A. (1994)

High efficiency transformation in yeast. In: Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches, ed. J. A. Johnston,

Oxford University Press pp. 121-134

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C. und Johnston, M. (1996)

Life with 6000 genes

Science **274**: 563-567

Hitzemann, R. A., Hagie, F. E., Hayflick, J. S., Chen, C.Y., Seeburg, P.H. und Derynck, R. (1982)

The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for 3-phosphoglyceratkinase
Nucl. Acids Res. **10**: 7791-7808

Horak, J. und Wolf, D. H. (1997)

Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*:
ubiquitination, endocytosis, and degradation in the vacuole

J. Bacteriol. **179**:1541-1549

Huibregtse, J. M., Good, P.D., Marczynski, G.T., Jaehning J.A. und Engelke, D. R. (1993)

Gal4 protein binding is required but not sufficient for derepression and induction of *GAL2*
expression.

J. Biol. Chem. **268**: 22219-22222

Iraqui, I., Vissers, S., Bernard, F., De Craene, J.O., Boles, E., Urrestarazu, A., André, B. (1999)

Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external
amino acids and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the
AGP1 gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease

Mol. Cell Biol. **19**: 989-1001

Johnsson, N. und Varshavsky, A. (1994)

Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91**: 10340-10344

Johnston, M. und Carlson, M. (1992)

Regulation of carbon and phosphate utilization. In: The molecular and cellular biology of
the yeast *Saccharomyces* (Broach, J., E.W. Jones and J. Pringle, Eds.)

Vol. 2, pp. 193-281. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Kasahara, M. und Maeda, M. (1998)

Contribution to substrate recognition of two aromatic amino acid residues in putative
transmembrane segment 10 of the yeast sugar transporters Gal2 and Hxt2

Journal of Boil. Chemistry USA **44**: 29106-29112

Kasahara, M., Shimoda, E. und Maeda, M. (1996)

Transmembrane segment 10 is important for substrate recognition in Gal2 and Hxt2 sugar
transporters in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

FEBS Lett. **389**:174-178

Kasahara, M., Shimoda, E. und Maeda, M. (1997)

Amino acid residues responsible for galactose recognition in yeast Gal2 transporter
Journal of Boil. Chemistry USA **27**: 16721-16724

Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B., Lander, E.S. (2003)

Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements
Nature **423**: 241-254

Kim, J.H., Polish, J., Johnston, M. (2003)

Specificity and regulation of DNA binding by the yeast glucose transporter gene repressor Rgt1
Mol. Cell Biol. **23**:5208-5216

Kotyk, A. (1967)

Properties of the sugar carrier in baker's yeast. II. Specificity of transport
Folia Microbiol. **12**: 121-131

Kruckeberg, A.L. (1996)

The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*
Arch. Microbiol. **166**: 283-292

Kruckeberg, A.L., Walsh, M.C., van Dam, K., (1998)

How do yeast cells sense glucose?
Bioessays **20**: 972-976

Laemmli, U.K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature **227**: 680-685

Lafuente, M.J., Gancedo, C., Jauniaux, J. C., Gancedo, J. M. (2000)

Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Microbiol. **35**:161-172

Lagunas, R. (1986)

Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*
Yeast **2**: 221-228

Lagunas, R. (1993)

Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*.
FEMS Microbiol. Rev. **104**: 229-242

Lakshmanan J, Mosley AL, Ozcan S. (2003)

Repression of transcription by Rgt1 in the absence of glucose requires Std1 and Mth1
Curr. Genet. **44**:19-25

Li, F.N. and Johnston, M. (1997)

Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle.
EMBO J. **16**:5629-5638

Liang, H. und Gaber, R.F. (1996)

A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of *HXT6*.
Mol. Biol. Cell **7**: 1953-1966

Maier, A., Volker, B., Boles, E., Fuhrmann, G.F. (2002)

Charakterization of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 oder Gal2 transportern
FEM Yeast Res. **2**: 539-550

Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982)

Molecular cloning. A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York

Marger, M.D. und Saier, M.H. (1993)

A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport.
Trends Biochem. Sci. **18**: 13-20

Marshall-Carlson, L., Celenza, J.L., Laurent, B.C. und Carlson, M. (1990)

Mutational analysis of the *SNF3* glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Cell Biol. **10**: 1105-1115

Marshall-Carlson, L., Neigeborn, L., Coons, D., Bisson, L. und Carlson, M. (1991)

Dominant and recessive suppressors that restore glucose transport in a yeast *snf3* mutant
Genetics **128**: 505-512

Meyer, J., Walker-Jonah, A. und Hollenberg, C. P. (1991)

Galactokinase encoded by *GAL1* is a bifunctional protein required for the induction of the *GAL* genes in *Kluyveromyces lactis* and is able to suppress the *gal3* phenotype of *Saccharomyces cerevisiae*
Mol. Cell Biol. **11**: 5454-5461

Miller, J. H. (1972)

Experiments in molecular genetics
Cold Spring Harbor Laboratory, New York, Ed. 3rd.

Moriya, H. und Johnston, M. (2003)

Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**: 1572-1577

Mosley, A.L., Lakshmanan, J., Aryal, B.K., Özcan, S. (2003)

Glucose-mediated phosphorylation converts the transcription factor Rgt1 from a repressor to an activator
J. Biol. Chem. **278**:10322-10327

Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E. und Lodish, H.F. (1985)

Sequence and structure of a human glucose transporter
Science **229**: 941-945

Neigeborn, L. und Carlson, M. (1984)

Genes affecting the regulation of *SUC2* gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*
Genetics **108**: 845-858

Neigeborn, L., Schwartzberg, P., Reid, R. und Carlson, M. (1986)

Null mutations in the *SNF3* gene of *Saccharomyces cerevisiae* cause a different phenotype than do previously isolated missense mutations
Mol. Cell Biol. **6**:3569-3574

Nevado, J., Navarro, M. A. und Heredia, C. F. (1993)

Galactose inhibition of the constitutive transport of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*
Yeast **9**: 111-119

Nishizawa, K., Shimoda, E. und Kasahara, M. (1995)

Substrate recognition domain of the Gal2 galactose transporter in yeast *Saccharomyces cerevisiae* as revealed by chimeric galactose-glucose transporters
J. Biol. Chem. **270**: 2423-2426

Özcan S, Leong T, Johnston M (1996b)

Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription
Mol. Cell Biol. **16**: 6419-6426

Özcan, S. und Johnston M. (1995)

Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (*HXT*) genes to be induced by different levels of glucose

Mol. Cell Biol. **15**: 1564-1572

Özcan, S. und Johnston M. (1999)

Function and regulation of yeast hexose transporters

Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**: 554-569

Özcan, S., und Johnston, M. (1996)

Two different repressors collaborate to restrict expression of the yeast glucose transporter genes *HXT2* and *HXT4* to low levels of glucose

Mol. Cell Biol. **16**:5536-5545

Özcan, S., Dover, J. und Johnston, M. (1998)

Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

EMBO J. **17**: 2566-2573

Özcan, S., Dover, J., Rosenwald, A.G., Wölfl, S. und Johnston M. (1996a)

Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**: 12428-12432

Pellett, P.E., McKnight, J.L.C., Jenkins, F.J. und Roizman, B. (1985)

Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of a protein encoded in a small herpes simplex virus DNA fragment capable of trans-inducing α genes

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 5870-5874

Peterson, C.L. und Herskowitz, I. (1992)

Characterization of the yeast *SWI1*, *SWI2* and *SWI3* gene, which encode a global activator of transcription

Cell **68**: 573-583

Polakis, E.S. und Bartley, W. (1965)

Changes in the enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic growth on different carbon sources

Biochem. J. **97**: 284-297

Ramos, J., Szkutnicka, K. und Cirillo, V. P. (1989)

Characteristics of galactosetransport in *Saccharomyces cerevisiae* cells and reconstituted lipid vesicles

J. Bacteriol. **171**: 3539-3544

Reifenberger, E., Boles, E. und 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. **145**: 324-333

Romanos M.A., Scorer C.A. und Clare J.J. (1992)

Foreign gene expression in yeast: a review

Yeast **8**: 423-488

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977)

DNA sequencing with chain termination inhibitors

Proc. Nat. Acad. Sci. USA **74**: 5463-5467

Schmidt, M.C., McCartney, R.R., Zhang, X., Tillmann, T.S., Solimeo H., Wöfl, S., Almonte, C. und Watkins, S.C. (1999)

Std1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*

Mol. Cell Biol. **19**: 4561-4571

Schule, T., Rose, M., Entian, K.-D., Thumm, M., Wolf, D.H. (2000)

Ubc8p functions in a catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast

EMBO J. **19**: 2161-2167

Schulte, F., Wieczorke, R., Hollenberg, C.P., 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

Schurmann, A., Doege, H., Ohnimus, H., Monser, V., Buchs, A., Joost, H.G. (1997)

Rule of conserved arginin and glutamate residues on the cytosolic surface of glucose transporters for transporter function

Biochemistry **36**: 12897-12902

Skowyra, D., Craig, K.L., Tyers, M. Elledge, S.J. und Harper, J.W. (1997)

F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex

Cell **91**: 209-219

Souciet, J., Aigle, M., Artiguenave, F., Blandin, G., Bolotin-Fukuhara, M., Bon, E., Brottier, P., Casaregola, S., de Montigny, J., Dujon, B., Durrens, P., Gaillardin, C., Lepingle, A., Llorente B., Malpertuy, A., Neuveglise, C., Ozier-Kalageropoulos, O., Potier, S., Saurin, W., Tekaiia, F., Toffano-Nioche, C., Wesolowski-Louvel, M., Wincker, P., Weissenbach, J. (2000)

Genomic exploration of the hemiascomycetous yeast: 1. A set of yeast species for molecular evolution studies

FEBS Lett **487**:3-12

Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. und 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. USA **95**: 5187-5192

Tamkun, J.W., Deuring, R., Scott, M.P., Kissinger, M., Pattatucci, A.M., Kaufmann, T.C. und Kennison J.A. (1992)

brahma: a regulator of Drosophila homeotic genes structurally related to the yeast transcriptional activator *SNF2/SWI2*

Cell **68**: 561-572

Tomas-Cobos, L. und Sanz, P. (2002)

Active Snf1 protein kinase inhibits expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *HXT1* glucose transporter gene

Biochem. J. **368**:657-663

Trumpley, R.J., (1992)

Glucoserepression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Mol. Mikrobiol. **6**: 15-21

Tschopp, J.F., Emr, S. D., Field, C. und Schekman, R. (1986)

GAL2 codes for a membrane-bound subunit of the galactose Permease in *Saccharomyces cerevisiae*

J. Bacteriol. **166**: 313-318

Van Belle D und André B (2001)

A genomic view of yeast membrane transporters

Curr. Opin.Cell Biol. **13**: 389-398

van Urk, H., E. Postma, W.A. Scheffers und van Dijken J.P. (1989)

Glucose transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts.

J. Gen. Microbiol. **135**: 2399-2406

Verijzer, C.P., Yokomori, K., Chen, J.L. und Tjian, R. (1994)

Drosophila TAFII150: similarity to yeast gene *TSM-1* and specific binding to core promoter DNA

Science **264**: 933-941

Wirth, R. (1993)

Elektroporation: Eine alternative Methode zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA.

Forum Mikrobiologie **11**: 507-515

Wöfl, S., Hanemann, V. und Saluz, H.P. (1996)

Analysis of a 26756 bp segment from the left arm of yeast chromosom IV

Yeast **12**: 1549-1554

Zamenhoff, S. (1957)

Preparation and assay of desoxyribonucleic acids from animals tissue

Methods Enzymol. **3**: 696-704

7 Abkürzungsverzeichnis

%	Massenprozent
Ø	Durchmesser
°C	Temperatur in Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Ade	Adenin
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cm	Zentimeter
C-Quelle	Kohlenstoffquelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
g	Gramm
Gal	Galaktose
Glc	Glukose
h	Stunde(n)
HA	Hämagglutinin
His	Histidin
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
K _m	Michaelis-Konstante
LB	<i>Lucia-Broth</i> , Vollmedium für Bakterien
Leu	Leucin
Lys	Lysin
M	Molar

mA	Milliampere
Malt	Maltose
Met	Methionin
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mg	Milligramm
mM	Millimolar
Mut	Mutante
nM	Nanometer
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ONPG	o-Nitrophenyl-β-D-galactosid
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	potentia Hydrogenii (lat.), Säurestärke
Phe	Phenylalanin
PI	Proteaseinhibitor-Mix
pmol	Pikomol
PMSF	Polymethylsulfonylflourid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidentdifluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	„unit“ (Enzymeinheit)
UV	Ultraviolett

V	Volt
WT	Wildtyp
YEP(D)	Yeast Extract Peptone(Dextrose)
YNB	Yeast Nitrogen Base
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. E. Boles danke ich ganz herzlich für die Möglichkeit, meine Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie durchführen zu können. Seine Geduld und Unterstützung haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. T. Stein möchte ich danken, dass er sich freundlicherweise bereit erklärt hat, das Korreferat zu übernehmen.

Für das freundliche Arbeitsklima und die spontane Hilfebereitschaft, möchte ich mich ganz besonders bei den Mitarbeitern von Herrn Prof. Dr. E. Boles bedanken.

Ein spezieller Dank geht an Herrn Prof. Dr. Dr. H. Fasold (emeritiert), der mich dazu ermutigt hat, nach einer Familienpause mein Studium abzuschließen.

Ohne meine Familie, die mir während der Dauer der Diplomarbeit mit Rat und Tat zur Seite stand und die Bereitschaft, insbesondere meines kleinen Sohnes Andreas, auf gemeinsam verbrachte Zeit zu verzichten, wäre die Arbeit nicht möglich gewesen. Deshalb möchte ich mich ganz besonders herzlich auch bei meinen „drei Männern“ bedanken, die mich immer wieder liebevoll unterstützt und zum Weitermachen ermutigt haben.

Allen Freundinnen/Freunden und Familienmitgliedern die bisher nicht erwähnt wurden, die aber dennoch dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit zustande kam, gilt ebenfalls ein großes Dankeschön.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Maria Widjaja

Frankfurt am Main, 26. August 2004