

**Identifizierung von Protein-Transport-Faktoren  
in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

vorgelegt durch Andreas Kranz  
aus Düsseldorf

Düsseldorf 2000

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Priv. Doz. Dr. R. Kölling-Paternoga

Koreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2000

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Stämme und Medien.....	16
2.1.1	Bakterienstämme.....	16
2.1.2	Medien und Anzucht von <i>E. coli</i> .....	16
2.1.3	Hefestämme .....	16
2.1.4	Medien und Anzucht von Hefestämmen.....	18
2.2	Plasmide.....	18
2.3	Genbanken .....	21
2.4	Synthetische Oligonukleotide.....	21
2.5	Chemikalien und Enzyme .....	24
2.6	Antikörper .....	24
2.7	Transformation.....	25
2.7.1	Transformation von <i>E. coli</i> .....	25
2.7.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	25
2.8	Präparation von DNA.....	25
2.8.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	25
2.8.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	26
2.8.3	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	26
2.9	Enzymatische Modifikation von DNA.....	26
2.9.1	DNA-Restriktion .....	26
2.9.2	Auffüllreaktion von 5'-überstehenden Enden.....	26
2.9.3	Entfernung von 3'-überstehenden Enden .....	26
2.9.4	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	27
2.9.5	Ligation .....	27
2.10	PCR-Amplifizierung von DNA.....	27
2.10.1	Spezifische Amplifikation von Plasmid-DNA.....	27

---

---

2.10.2	Spezifische Amplifikation von chromosomaler DNA.....	28
2.10.3	Semi-Random-PCR (ST-PCR).....	28
2.11	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	29
2.12	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	29
2.13	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	29
2.14	Sequenzierung von DNA.....	29
2.15	Herstellung von Proteinextrakten für Western-Analyse.....	30
2.16	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	30
2.17	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS- Polyacrylamidgelen.....	30
2.18	Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse.....	31
2.19	Zellfraktionierungen.....	31
2.19.1	Differentielle Zentrifugation.....	31
2.19.2	Sucrosegradienten.....	32
2.20	Pulse-Chase-Experimente.....	32
2.21	CPY-Sorting.....	33
2.22	Immunpräzipitation.....	33
2.23	Fast Garnet Plattentest auf Aktivität der Carboxypeptidase Y.....	34
2.24	Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität.....	34
2.24.1	Quantitative Enzymtests.....	34
2.24.2	LacZ Filtertest.....	35
2.24.3	LacZ Overlay-Assay.....	35
2.25	Mikroskopische Untersuchungen.....	35
2.25.1	GFP.....	36
2.25.2	Aufnahme von FM4-64.....	36
2.25.3	Immunfluoreszenz.....	36
2.26	Bestimmung der Paarungs-Aktivität.....	36
2.27	Kreuzung von Hefestämmen und Tetradenanalyse.....	37
2.28	EMS-Mutagenese.....	37

---

---

2.29	Gen-Deletion und Gen-Modifikation in <i>S. cerevisiae</i> .....	37
3	Ergebnisse .....	39
3.1	Identifizierung von Ste6-Interaktionspartnern .....	39
3.1.1	Screen mit Two Hybrid-Genbanken .....	39
3.1.2	Identifizierung der Genbankplasmid-kodierten AD-Fusionen.....	43
3.1.3	Einfluss von Pkc1 auf die Funktion und Stabilität von Ste6 .....	46
3.1.3.1	Two Hybrid-Experimente mit verschiedenen PKC1-Varianten .....	46
3.1.3.2	Einfluss von Pkc1 auf Funktion und Umsatz von Ste6 .....	46
3.1.3.3	Wachstumsdefekt durch Überexpression von PKC R398A.....	47
3.1.4	Einfluss von <i>BLM3</i> , <i>YNL201c</i> und <i>YGL211c</i> auf Ste6 .....	47
3.2	Screening nach Mutanten mit erhöhter Ste6-Stabilität .....	48
3.2.1	Konstruktion eines Mutagenesestammes .....	49
3.2.2	Konstruktion von Ste6-Fusionsproteinen .....	51
3.2.3	Charakterisierung des Ste6-His3-Fusionsproteins.....	52
3.2.3.1	Test auf Funktionalität des Fusionsproteins .....	52
3.2.3.2	Stabilisierung von Ste6-His3 in einer <i>pep4</i> -Mutante.....	52
3.2.3.3	Vergleich der intrazellulären Lokalisation von Ste6 und Ste6-His3 .....	53
3.2.4	Mutageneseversuche mit RKY1050 .....	54
3.2.5	Konstruktion eines verbesserten Mutagenesestammes .....	55
3.2.5.1	„Curing“ von endogenem 2 $\mu$ -Plasmid .....	55
3.2.5.2	Stabile Integration von CUP1 <sub>P</sub> -STE6-HIS3 in SUC2 .....	55
3.2.5.3	Wachstumsvergleich der Mutagenesestämme.....	56
3.2.6	Mutagenese von RKY1393 .....	57
3.3	Identifizierung von Genfunktionen, die bei Überproduktion Ste6 stabilisieren .....	59
3.4	Charakterisierung einer am späten Endosom wirkenden Proteinfamilie .....	63
3.4.1	Stabilisierung von Ste6 in <i>vps4</i> -, <i>snf7</i> -, <i>mos1</i> - und <i>mos2</i> -Stämmen.....	63
3.4.2	Sequenzvergleich der Proteine .....	64

---

---

3.4.3	Wachstumseigenschaften der Deletionsstämmen.....	65
3.4.4	Vergleich des CPY-Transports .....	66
3.4.5	Lokalisation des in den Deletionsstämmen betroffenen Transportschritts .....	68
3.4.5.1	Aufnahme von FM4-64 .....	68
3.4.5.2	Lokalisation von Ste6.....	70
3.4.6	Lokalisation von Mos1 .....	76
3.4.7	Suche nach Interaktionspartnern von Mos1 .....	81
4	Diskussion .....	85
4.1	Identifizierung von Ste6-Interaktionspartnern .....	85
4.2	Suche nach Mutanten mit erhöhter Ste6-Stabilität .....	87
4.3	Charakterisierung einer am späten Endosom wirkenden Familie „coiled-coil“-bildender Proteine .....	88
4.3.1	Lokalisierung von Mos1 .....	89
4.3.2	Mögliche Funktionen von Mos1 .....	90
4.3.3	Die Snf7-Proteinfamilie .....	91
4.3.4	Suche nach Interaktionspartnern von Mos1 .....	92
5	Zusammenfassung .....	94
6	Literaturverzeichnis .....	95
7	Abkürzungsverzeichnis.....	102

---

## 1 EINLEITUNG

Ein wesentliches Merkmal der eukaryontischen Zellen ist die Unterteilung in verschiedene membranumschlossene Reaktionsräume, die es der Zelle erlaubt, spezialisierte physiologische Reaktionen ohne gegenseitige Beeinflussung auf engem Raum zu trennen. Maßgeblich für die Identität eines jeden Kompartiments ist seine Proteinzusammensetzung; es existiert eine komplexe Sortiermaschine, welche die im Zytoplasma synthetisierten Proteine an ihre Bestimmungsorte bringt. Viele Proteine besitzen Sortierungssignale, die eine spezifische Lokalisation vermitteln. Die Existenz solcher Signale konnte inzwischen für verschiedene Kompartimente nachgewiesen werden, z.B. für den nukleären Import (Dingwall und Laskey, 1991), für den Transport in Peroxisomen (Subramani, 1993) und den Proteinimport in Mitochondrien (Bedwell *et al.*, 1989). Die Zelle vermag jedoch noch mehr zu leisten, als den Verbleib von Proteinen an ihrem Zielkompartiment zu garantieren: Die Lokalisation von Proteinen kann dynamisch verändert werden. So wird z.B. die Aktivität von Oberflächenproteinen wie Rezeptoren, Transporter und Kanäle durch eine rasche Aufnahme von der Plasmamembran reguliert. Im Falle der signalvermittelnden Rezeptorproteine wird es der Zelle dadurch ermöglicht, zurück in einen unstimulierten Zustand zu gelangen. Die aufgenommenen Rezeptoren werden entweder im Lysosom abgebaut oder werden wiederverwendet, indem sie erneut zur Plasmamembran transportiert werden.

### Grundprinzipien des vesikulären Proteintransports

Die membranumschlossenen Organellen des endo- und exozytischen Systems tauschen fortwährend Material über Transportvesikel aus, die an der Donormembran durch Knospung und Abschnürung entstehen. Dazu dienen Hüllproteine, die an der zytoplasmatischen Seite der knospenden Membran binden. Sie sind auch verantwortlich für die Selektion der zu transportierenden Proteine, indem sie direkt oder indirekt mit ihnen interagieren (Schenkman und Orci, 1996). Drei Klassen von Hüllen wurden identifiziert: Clathrin, COPI und COPII (Cosson und Letourneur, 1997; Pishvaee und Payne, 1998; Schmid, 1997). Lösen sich diese Hüllen auf, so werden die Vesikel kompetent zur Fusion mit der Zielmembran. Wie kann gewährleistet werden, dass Vesikel ihr Zielkompartiment mit hoher Spezifität erkennen? Laut der SNARE-Hypothese (Söllner, 1995; Woodman, 1997) wird dies durch die spezifische Interaktion von Proteinen der beteiligten Membranen erreicht. Ein membrangebundenes SNARE („SNAP receptor protein“) in der Vesikelmembran (v-SNARE) und der Zielmembran (t-SNARE)

bilden einen Komplex vor der Membranfusion. An dieser Komplexbildung sind weitere lösliche Proteine beteiligt, NSF („NEM-sensitive fusion protein“) und SNAPs („soluble NSF attachment proteins“), Mitglieder der Sec1-Familie (Yang *et al.*, 2000) und Ypt/Rab-GTPasen (Novick und Zerial, 1997). In der Hefe *S. cerevisiae*, deren Genom vollständig sequenziert vorliegt, reicht die Anzahl der identifizierten v- und t-SNAREs aus, um die Spezifität aller vesikulären Transportschritte zu vermitteln (Holthuis *et al.*, 1998). Neuere Erkenntnisse weisen jedoch darauf hin, dass SNAREs nicht allein für die Spezifität der Fusionsereignisse verantwortlich sein können: Die Bildung von SNARE-Paaren kann promisk sein (Yang *et al.*, 1999), und ein einzelnes v-SNARE kann mit verschiedenen t-SNAREs interagieren (von Mollard *et al.*, 1997). Da verschiedene Rab-GTPasen unterschiedlichen Membrankompartimenten zugeordnet werden können (Simons und Zerial, 1993), wurde ihnen die entscheidende Rolle bei der spezifischen Membranfusion zugeschrieben. Dieses Konzept wurde in Frage gestellt durch die Beobachtung, dass ein einziges chimäres Rab-Protein an verschiedenen Transportschritten wirken kann (Brennwald und Novick, 1993; Dunn *et al.*, 1993). Es ist also sehr wahrscheinlich, dass weitere Faktoren zur Spezifität der Membranfusionen beitragen. Dies sind möglicherweise Anheftungsfaktoren, welche vor der eigentlichen SNARE-Interaktion Membranen verbinden. Es handelt sich um lösliche periphere Membranproteine, die mit integralen Membranproteinen interagieren müssen und evolutionär nicht verwandt sind (Waters und Pfeffer, 1999).

### **Proteintransportwege in die Vakuole**

Die Vakuole der Hefezelle ist ein saures Organell zum Abbau von Proteinen und Makromolekülen. Sie dient außerdem als Reservoir für Aminosäuren, für kleine Ionen wie  $\text{Ca}^{2+}$ , für Polyphosphate und spielt eine wichtige Rolle für die Osmoregulation und Ionenhomöostase. Wie das homologe Organell der Säugerzellen, das Lysosom, ist die Vakuole der Endpunkt von zusammenlaufenden Transportwegen (Abb. 1). Sie erhält Proteine von der Zelloberfläche, vom Golgi-Apparat und vom Zytoplasma. Inzwischen konnten über 50 Proteine identifiziert werden, die für die korrekte Lokalisation von vakuolären Proteinen benötigt werden (Bryant und Stevens, 1998; Conibear und Stevens, 1998; Raymond *et al.*, 1992a).



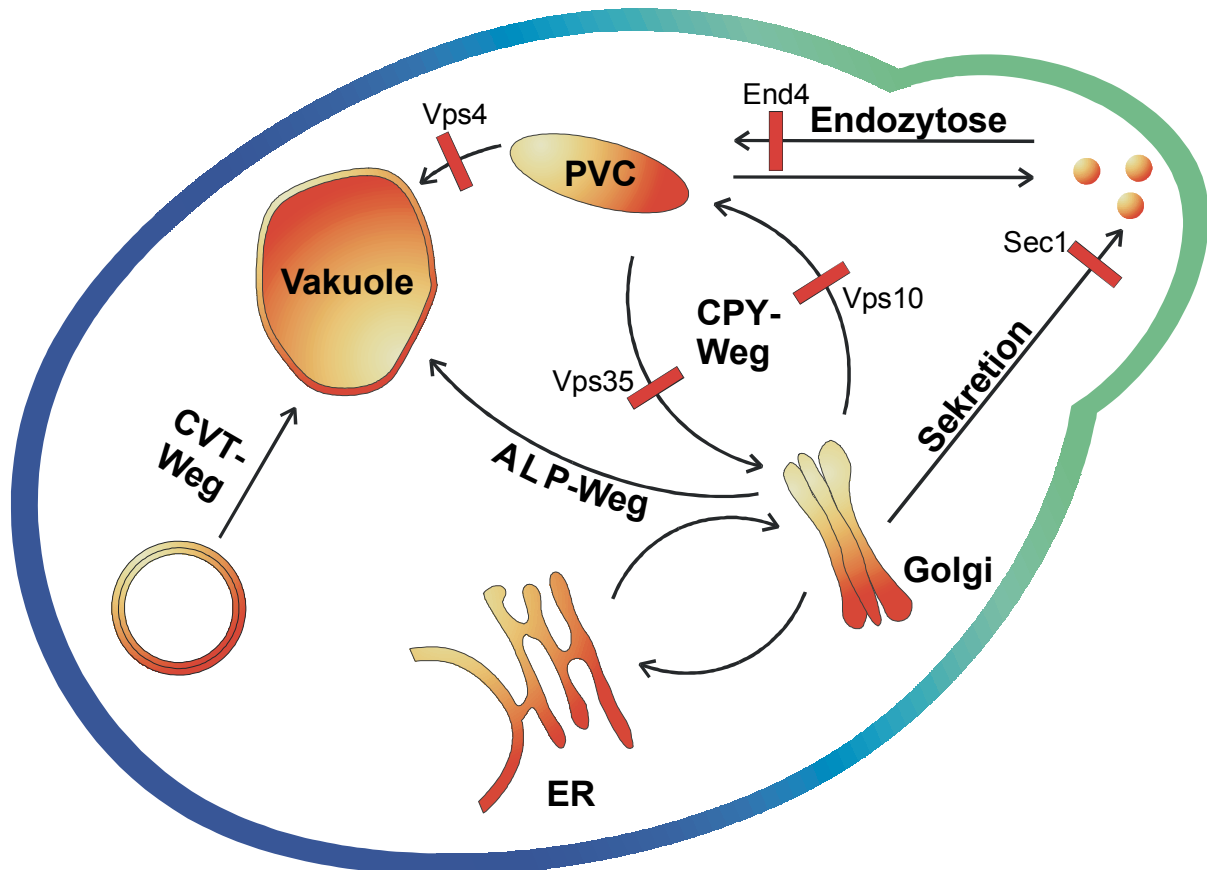


Abb. 1: Vakuoläre Proteintransportwege der Bäckerhefe *S. cerevisiae*. Dargestellt sind vier Wege, auf denen Proteine zur Vakuole gelangen können: Im CPY-Weg gelangen Proteinen vom späten Golgi über ein prävakuoläres Kompartiment (PVC, „pre-vacuolar compartment“) zur Vakuole. Der ALP-Weg als alternative Route umgeht das PVC. Proteine der Plasmamembran können durch Endozytose aufgenommen werden und gelangen ebenfalls über das PVC in die Vakuole. Der CVT-Weg („cytoplasm-to-vacuole targeting“) umfasst die direkte Aufnahme von Proteinen aus dem Zytoplasma und kann in die Autophagozytose und einen biosynthetischen Weg unterteilt werden. Rote Blöcke deuten Transportschritte an, für welche die genannten Proteine benötigt werden.

## Der CPY-Weg

Der CPY-Weg erhielt seinen Namen nach einem wichtigen Modellprotein für vakuolären Transport, der Carboxypeptidase Y (CPY). Es handelt sich hierbei um eine lösliche vakuoläre Hydrolase, die auf ihrem Weg zur Vakuole das Endoplasmatische Reticulum (ER), den Golgi-Apparat und ein endosomales Kompartiment durchläuft (Abb. 1). Bei der Wanderung des Proteins entlang dieses Weges erfährt es posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierung und proteolytische Spaltung, die charakteristisch sind für jedes durchlaufene Kompartiment (Stevens *et al.*, 1982). Diese einfach zu unterscheidenden Formen haben es ermöglicht, eine Skizze des CPY-Transportweges zu entwerfen. Im letzten definierbaren Kompartiment des Golgi-Apparats, dem *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) (Graham und

Emr, 1991) erfolgt die Abtrennung vom sekretorischen Weg über einen Rezeptor- und Sortierungssignal-vermittelten Prozess: Der membrangebundene CPY-Rezeptor, Vps10 („vesicular protein sorting“), bindet an CPY, und beide Proteine werden in spezifische Transportvesikel verpackt. Dabei spielt Clathrin wahrscheinlich eine Rolle, denn sowohl Mutationen in Clathrin selbst als auch in Vps1, einer Komponente der Clathrinhülle, bewirken die Fehllokalisation von CPY zur Plasmamembran (Nothwehr *et al.*, 1995; Seeger und Payne, 1992). Ziel der Transportvesikel ist das prävacuoläre Kompartiment (PVC, „pre-vacuolar compartment“). Für die Fusion der Membranen wird ein SNARE-Komplex benötigt, dessen Komponenten inzwischen weitgehend identifiziert werden konnten, darunter Pep12/Vps6 (t-SNARE), Vps21/Ypt51 (rab) und Vps45, ein Sec1-homologes Protein (Cowles *et al.*, 1994; Horazdovsky *et al.*, 1994; Piper *et al.*, 1994; Singer-Kruger *et al.*, 1994). Nach der Membranfusion kann das lösliche Protein von seinem Rezeptor abdissoziieren. Für den CPY-Rezeptor, Vps10, wurde gezeigt, dass er in einem Kreislauf zurück zum *trans*-Golgi Netzwerk wandern kann, wo er für weitere Transportschritte bereitsteht (Marcusson *et al.*, 1994; Westphal *et al.*, 1996).

Das späte, endosomale bzw. prävacuoläre Kompartiment ist der Schnittpunkt zwischen CPY- und endozytischem Weg. Es ähnelt möglicherweise den späten Endosomen oder prä-Lysosomen von Säugerzellen. Der überzeugendste Hinweis für die Existenz dieses Kompartiments in Hefe ergibt sich aus der Studie von sogenannten „class E“-*vps*-Mutanten. Alle 13 Mutanten dieser Klasse zeigen eine Struktur nahe der Vakuole, das sogenannte „Class E-compartment“, das im elektronenmikroskopischen Bild als ein gekrümmter Stapel zisternaler Membranen erscheint (Babst *et al.*, 1997). In dieser Struktur häufen sich sowohl endozytierte als auch vakuoläre Proteine an (Davis *et al.*, 1993; Raymond *et al.*, 1992a). Dieser Phänotyp wird dahingehend interpretiert, dass diese Vps-Proteine den Austritt der zu transportierenden Proteine aus dem PVC regulieren. Ist der Transport blockiert, häufen sich Proteine und Membranen in einem abweichenden Organell an, das eine vergrößerte Variante des PVC von Wildtypzellen ist. Wahrscheinlich handelt sich bei dem class E-compartment um ein funktionales Transportzwischenprodukt: In einer *vps27*-Nullmutante kolokalisieren die vakuoläre ATPase-Untereinheit Vph1, der CPY-Rezeptor Vps10 und der endozytierte Pheromonrezeptor Ste3 im PVC (Piper *et al.*, 1995). In einer konditionalen *vps27<sup>ts</sup>*-Mutante bildet sich das Kompartiment rasch bei nicht-permissiver Temperatur. Wird die Vps27-Funktion wiederhergestellt, so nehmen die Proteine ihren unterbrochenen Weg wieder auf.

## Der ALP-Weg

Nicht alle vakuolären Proteine werden durch *vps*-Mutanten der Klasse E in ihrem Transport behindert: Die alkalische Phosphatase (ALP), ein Membranprotein, wird weiterhin in die Vakuole befördert, auch bei zusätzlicher Blockierung des späten sekretorischen Weges (Cowles *et al.*, 1997b; Piper *et al.*, 1997; Raymond *et al.*, 1992a). Interessant ist die Tatsache, dass auch das vakuoläre t-SNARE Vam3 dem ALP-Weg folgt (Piper *et al.*, 1997). Diese beiden Proteine müssen im Golgi in eine andere Klasse von Transportvesikeln verpackt werden. Notwendig ist dazu ein Signal im zytosolischen C-Terminus von ALP (Nothwehr *et al.*, 1993) sowie ein AP-3-Adapterkomplex (Cowles *et al.*, 1997a). Der AP-3-Komplex in Säugerzellen ist verwandt mit den AP-1- und AP-2-Clathrinkomplexen, die auf Tyrosin basierende Sortierungssignale von Rezeptormolekülen binden und sie in Clathrin-umhüllte Vesikel einbeziehen (Marks *et al.*, 1996). AP-3 kann allerdings nicht zusammen mit Clathrin-umhüllten Vesikeln aufgereinigt werden und ist möglicherweise mit anderen Proteinen assoziiert, die eine Hülle bilden.

## Der CVT-Weg

Ein Beispiel für den direkten Transport vom Zytoplasma in die Vakuole („cytoplasm-to-vacuole targeting“) stellt die Aminopeptidase I (API) dar. Wie viele andere vakuolären Hydrolasen wird API als inaktive Präform synthetisiert, die durch einen Pep4-abhängigen Prozess in die reife Form überführt wird (Scott *et al.*, 1997). Der Transport sowohl von CPY als auch ALP wird in Mutanten mit Block im frühen sekretorischen Weg verhindert (Stevens *et al.*, 1982), entweder durch Blockade des Transports zwischen Golgi und ER oder innerhalb des Golgi-Apparats. Dies ist jedoch nicht der Fall für API (Klionsky *et al.*, 1992). Stattdessen werden zum Transport von API Komponenten des Autophagozytose-Weges benötigt (Scott *et al.*, 1997), über den als Antwort auf Hungerbedingungen große Mengen an intrazellulärem Protein in der Vakuole abgebaut werden.

## Sekretion

Von löslichen Proteinen wird angenommen, dass sie ohne spezifisches Sortierungssignal am *trans*-Golgi in sekretorische Vesikel verpackt und so zur Plasmamembran transportiert werden. Hinweise hierauf lieferte die Analyse von CPY, die bei Überproduktion oder bei Zerstörung des Sortierungssignals für den CPY-Weg zur Oberfläche gelangt (Stevens *et al.*, 1986). Membrangebundene Golgiproteine werden jedoch bei Überproduktion generell in die Vakuole transportiert (Chang

und Fink, 1995; Roberts *et al.*, 1992). Membranproteine benötigen also eventuell spezifische Signale, damit sie zur Zelloberfläche transportiert werden, aber nicht, um über den CPY-Weg in die Vakuole zu gelangen. Solche definierten Signale konnten noch nicht charakterisiert werden. Allerdings scheint die Länge von Transmembranhelices einen Einfluß auf die Lokalisation auszuüben. Für eine Lokalisation an der Plasmamembran werden längere Helices benötigt als für den Transport zur Vakuole (Rayner und Pelham, 1997). Möglicherweise existieren auch mehrere verschiedene Signale, die in verschiedene sekretorische Wege münden: In Mutanten, die defekt sind in der Fusion der sekretorischen Vesikel mit der Plasmamembran (*sec1*, *sec4* oder *sec6*), häufen sich zwei biochemisch unterscheidbare Arten von Vesikel an (Harsay und Bretscher, 1995).

### **Endozytose: Der ABC-Transporter Ste6 als Modellprotein**

Proteine der Plasmamembran können durch Endozytose wieder aufgenommen werden und gelangen schließlich ins Lysosom bzw. in die Vakuole, wo ihr Abbau erfolgt. Ein gut verstandener endozytischer Prozess ist die Clathrin-abhängige Endozytose (Schmid, 1997), bei dem Markerproteine anfänglich in Einstülpungen der Plasmamembran erscheinen, die als „coated pits“ bezeichnet werden. Diese Einstülpungen sind auf der zytoplasmatischen Seite mit einer Clathrin-Hülle überzogen. In vielen Fällen konnte gezeigt werden, dass Rezeptoren durch eine Interaktion mit Clathrin-Adapterproteinen in den „coated pits“ konzentriert werden (Pearse und Robinson, 1990). In der Hefe kann die Endozytose mit Farbstoffen wie FM4-64 (Vida und Emr, 1995) verfolgt werden, und die Rezeptor-vermittelte Endozytose kann mit den Pheromon-Rezeptoren Ste2 und Ste3 studiert werden. Mit Hilfe von Ste3 als Modell konnte gezeigt werden, dass eine liganden-unabhängige einer liganden-induzierten Endozytose gegenübersteht. In beiden Fällen gelangt das Protein in die Vakuole, wo es abgebaut wird (Davis *et al.*, 1993). Diese beiden Formen der Endozytose scheinen sich mechanistisch zu unterscheiden. Studien an einem weiteren von der Plasmamembran endozytierten Protein lieferten Hinweise auf die Mechanismen, die die Endozytose steuern. Dieses Ste6-Protein gehört zur Familie der ABC-Transporter und wird für die Sekretion des Paarungspheromons  $\alpha$ -Faktor benötigt (Kuchler *et al.*, 1989; McGrath und Varshavsky, 1989). Das Protein besteht aus zwei homologen Hälften aus jeweils sechs Transmembrandomänen und einer hochkonservierten Nukleotidbindungsdomäne (NBD1 bzw. 2, Abb. 2). Ein *ste6*-Deletionsstamm produziert zwar reifen  $\alpha$ -Faktor, ein stark hydrophobes und farnesyliertes Dodekapeptid von 1,6 kDa, kann diesen aber nicht sekretieren. Der Deletionsstamm ist deshalb steril. Die genaue Funktionsweise von Ste6 ist jedoch noch unklar.

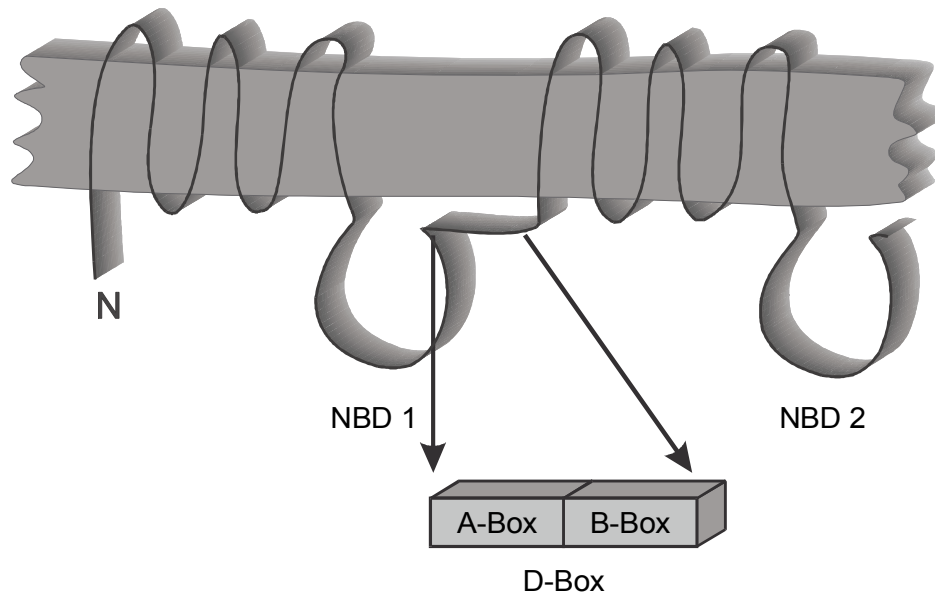


Abb. 2: Vorhergesagte Membrantopologie des ABC-Transporters Ste6 und der Linker-Region, welche die beiden homologen Hälften des Proteins verbindet.

Die Familie der ABC-Transporter umfasst viele Membranproteine, die sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten anzutreffen sind (Higgins, 1992). Typisch für ABC-Transporter ist eine hochkonservierte ATP-Bindungskassette (Abb. 2). Prominente eukaryontische Vertreter der ABC-Familie sind die MDR- und die CFTR-Proteine. MDR-Proteine sind verantwortlich für das Phänomen der „multidrug resistance“, einer breitgefächerten Resistenz gegen zytotoxische Substanzen, die weder eine ähnliche Struktur noch gleiche intrazelluläre Wirkorte aufweisen (Gottesman und Pastan, 1993). Dieses Phänomen bereitet große Probleme bei der Chemotherapie von Krebserkrankungen. Die enge Verwandtschaft des  $\alpha$ -Faktor-Transporters Ste6 zu ABC-Transportern in Säugern wird belegt durch den Befund, dass der Paarungsdefekt in einem *ste6*-Deletionsstamm durch die Expression des *mdr3*-Gens der Maus komplementiert werden kann (Raymond *et al.*, 1992b). Somit stellt Ste6 ein ideales Modell zur Untersuchung eukaryontischer ABC-Transporter dar. Ein Defekt im humanen CFTR-Protein führt zu einer der häufigsten Erbkrankheiten, der Zystischen Fibrose (CF). Die häufigste Mutation ist eine Deletion von Phenylalanin 508, die zu einer temperaturbedingten Misslokation des CFTR-Proteins und damit zum Funktionsverlust führt (Denning *et al.*, 1992). Das CFTR-Protein besitzt eine Chlorid-Kanalfunktion. Außerdem gehören verschiedene prokaryontische Permeasen wie HlyB, OppD, HisP und MalK zur Familie der ABC-Transporter.

Aus der Funktion von Ste6 als  $\alpha$ -Faktor-Transporter könnte man auf eine Lokalisation in der Plasmamembran schließen, dies ist jedoch nicht der Fall. In Fraktionierungsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation von Ste6

nicht mit der Lokalisation des Plasmamembran-Proteins Pma1 (Serrano *et al.*, 1986) übereinstimmt. Auch Immunfluoreszenzexperimente deuten darauf hin, dass Ste6 hauptsächlich mit internen Membransystemen assoziiert vorliegt (Kölling und Hollenberg, 1994). Diese Tatsache schließt jedoch eine transiente Lokalisation von Ste6 an der Plasmamembran nicht aus. Tatsächlich häuft sich Ste6 in den Endozytosemutanten *end3* und *end4* (Raths *et al.*, 1993) in einer ubiquitinierten Form an (Kölling und Hollenberg, 1994). Ste6 war das erste Membranprotein der Hefe, für das eine Ubiquitinierung nachgewiesen werden konnte.

Ubiquitin ist ein hochkonserviertes Polypeptid mit einer Größe von 76 Aminosäuren, das kovalent an das Substratprotein gebunden wird, indem eine Isopeptidbindung zwischen seinem C-terminalen Glycin und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrests geknüpft wird. In der gleichen Weise können an das bereits gebundene Ubiquitin weitere Ubiquitinmoleküle angefügt werden. Die Ubiquitin-Modifikation spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation vieler zellulärer Prozesse (Hochstrasser, 1996). Sie dient u.a. als Markierung zum Abbau zytosolischer Proteine über das 26S-Proteasom, einem komplex aufgebauten proteolytischen Partikel (Hochstrasser, 1995; Jentsch und Schlenker, 1995). Die Ubiquitinierung des Membranproteins Ste6 scheint ebenfalls dessen Halbwertszeit zu beeinflussen, denn das sehr kurzlebige Protein mit einer Halbwertszeit von rund 15 Minuten (Kölling und Hollenberg, 1994) ist in einer Mutante, die Defekte in den Ubiquitin-konjugierenden Proteinen Ubc4 und Ubc5 (Seufert und Jentsch, 1990) aufweist, etwa dreifach stabilisiert (Kölling und Hollenberg, 1994). Anders als bei löslichen Proteinen, spielt das Proteasom jedoch keine Rolle beim Abbau von Ste6, denn Mutationen in proteasomalen Untereinheiten haben keinen Einfluss auf die Halbwertszeit des Proteins (Kölling und Losko, 1997). Stattdessen wird Ste6 in der Vakuole abgebaut: Die proteolytische Aktivität der Vakuole hängt zu über 90% von der Proteinase A (PrA) ab, die vom *PEP4*-Gen kodiert wird (Ammerer *et al.*, 1986; Woolford *et al.*, 1986). Pulse-Chase-Experimente zur Bestimmung der Halbwertszeit haben gezeigt, dass Ste6 in  $\Delta pep4$ -Mutanten praktisch nicht mehr abgebaut wird.

Die beiden homologen Hälften von Ste6 sind durch eine 100 Aminosäuren große Linker-Region verbunden (Abb. 2), die den Namen „D-Box“ für „destabilization-box“ erhielt, weil sie ein Signal enthält, welches die Ubiquitinierung und den schnellen Umsatz von Ste6 vermittelt. Dieses Signal ist auch im Kontext eines anderen Proteins funktional: eine C-terminale Fusion der D-Box an Pma1, die Plasmamembran-ATPase, bewirkt deren Ubiquitinierung und Destabilisierung (Kölling und Losko, 1997). Die geladenen Aminosäuren der D-Box sind ungleich

verteilt: Der N-terminale Bereich enthält vorwiegend saure Aminosäuren („A-Box“ für „acidic box“), der C-terminale Bereich vorwiegend basische Aminosäuren („B-Box“ für „basic box“). Eine Deletion der A-Box führt zu einer starken Stabilisierung und Lokalisation von Ste6 an der Plasmamembran bei gleichzeitigem Erhalt der Proteinfunktion. Die A-Box enthält ein Sequenzmotiv „DAKTI“, welches dem vermuteten Endozytosesignal des  $\alpha$ -Faktor-Rezeptors Ste2, „DAKSS“, ähnelt (Rohrer *et al.*, 1993). Tatsächlich führt eine Deletion der DAKTI-Sequenz zu einer Stabilisierung von Ste6. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass der Ubiquitinierungsgrad der Ste6-Varianten umgekehrt proportional zur Destabilisierung ist: Für die stabilste Variante,  $\Delta$ A-Box-Ste6, ist keine Ubiquitinierung nachzuweisen (Kölling und Losko, 1997).

Die beschriebenen Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Ubiquitinierung von Ste6 ein Aufnahmesignal darstellt. Inzwischen wurde für verschiedene Membranproteine aus Hefe und Säugerzellen ein Zusammenhang zwischen Ubiquitinierung und Endozytose gezeigt, darunter Transporter, ein Ionenkanal und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Die rasche Aufnahme von aktivierten Rezeptoren ist notwendig, damit die Zelle zurück in einen unstimulierten Zustand gelangen kann. So wird zum Beispiel der  $\alpha$ -Faktor-Rezeptor Ste2 nach Ligandbindung rasch aufgenommen und in der Vakuole abgebaut (Hicke und Riezman, 1996). Die Untersuchungen zur Endozytose der Rezeptorproteine erbrachte einen Hinweis auf die Regulation der Ubiquitinierung. Es zeigte sich, dass die Bindung von  $\alpha$ -Faktor nicht nur zu einer Ubiquitinierung von Ste2, sondern auch zu einer Phosphorylierung führt; beide Modifikationen sind notwendig für die Endozytose (Hicke und Riezman, 1996; Hicke *et al.*, 1998). Dies deutet darauf hin, dass die Ubiquitinierung möglicherweise durch Phosphorylierung positiv reguliert wird. Inzwischen ist bekannt, dass auch Ste6 phosphoryliert wird (R. Kölling, persönliche Mitteilung).

Es ist weder bekannt, wie die Ubiquitinierung von Ste6 gesteuert wird, noch wie die spezifische Aufnahme des ubiquitinierten Proteins erfolgt. Es müssen jedoch Faktoren existieren, die mit ubiquitinierten Proteinen interagieren: Eine Kinase, eine Ubiquitin-Ligase sowie Komponenten eines Mechanismus, der letztlich die Aufnahme der Proteine in die Vakuole vermittelt. Ziel dieser Doktorarbeit sollte es deshalb sein, Faktoren zu identifizieren, die mit Ste6 interagieren. Hierzu sollte das Two Hybrid-System Verwendung finden, bei dem sich Protein-Wechselwirkungen durch die Aktivierung von Reportergenen bemerkbar machen. Außerdem sollte ein möglichst effektives Screening-Verfahren entwickelt werden, um bislang unbekannte Faktoren zu entdecken, welche den Umsatz von Ste6 beeinflussen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Stämme und Medien

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Tab. 1: *Escherichia coli* (*E. coli*)

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
DH5 $\alpha$ F'	F'( $\Phi$ 80 ( $\Delta$ lacZ) M15) $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> supE44 thi-1 gyrA relA1	Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA (Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
XL1-Blue	F'::Tn10 proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> lacIq $\Delta$ (lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nalr) thi hsdR17 (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) supE44 relA1 lac	(Bullock <i>et al.</i> , 1987)

#### 2.1.2 Medien und Anzucht von *E. coli*

Vollmedium (LB): 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl

Zur Selektion plasmidhaltiger Zellen wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 50  $\mu$ g/ml Ampicillin zugesetzt (LB-Amp).

Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 2% Agar, die Anzucht erfolgte bei 37°C.

#### 2.1.3 Hefestämme

Tab. 2: *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
#28	MATa his1	R. Kölling, Düsseldorf
#29	MAT $\alpha$ his1	R. Kölling, Düsseldorf
HF7c	MATa ura3-52 his3 $\Delta$ -200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3,112 gal4-542 gal80-538 LYS2::GAL1 <sub>UAS</sub> - GAL1 <sub>TATA</sub> -HIS3 URA3::GAL4 <sub>17mers(x3)</sub> -CyC1 <sub>TATA</sub> -lacZ	(Feilotter <i>et al.</i> , 1994)
JD52	MATa ura3-52 his3 $\Delta$ -200 leu2-3,112 trp1 $\Delta$ -63 lys2-801	J. Dohmen, Düsseldorf
JD53	MAT $\alpha$ ura3-52 his3 $\Delta$ -200 leu2-3,112 trp1 $\Delta$ -63 lys2-801	J. Dohmen, Düsseldorf
PJ69-4A	MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 $\Delta$ gal80-538 LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ	(James <i>et al.</i> , 1996)
RH268-1C	MATa bar1-1 leu2 his4 ura3 end4 <sup>ts</sup>	(Raths <i>et al.</i> , 1993)
RKY0901	MATa ura3-52 his3- $\Delta$ 200 leu2-3,112 trp1- $\Delta$ 63 lys2-801 STE6-lacZ::TRP1	R. Kölling, Düsseldorf



RKY0959	<i>MATa</i>	<i>ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1Δ-63 lys2-801 Δste6::LEU2</i>	R. Kölling, Düsseldorf
RKY0975	<i>MATa</i>	<i>ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1Δ-63 lys2-801 Δpep4::HIS3</i>	R. Kölling, Düsseldorf
RKY1001	<i>MATa</i>	<i>ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1Δ-63 lys2-801 Δste6::HIS3</i>	R. Kölling, Düsseldorf
RKY1203	<i>MATa</i>	<i>ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1Δ-63 lys2-801 Δste6::HIS3 end4<sup>ts</sup></i>	R. Kölling, Düsseldorf
RKY1427	<i>MATa</i>	<i>ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1Δ-63 lys2-801 Δste6::HIS3 Δpep12::URA3</i>	R. Kölling, Düsseldorf

Tab. 3: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Hefestämme; soweit nicht anders genannt, beruhen alle Stämme auf dem Wildtyp-Stamm JD52

Stamm	Genotyp
RKY1039	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 ste6::GAL1<sub>P</sub>-STE6<sub>(c-myc)</sub></i>
RKY1050	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 ste6::GAL1<sub>P</sub>-STE6<sub>(c-myc)</sub> suc2::[TRP1 CUP1<sub>P</sub>-STE6-HIS3]</i>
RKY1053	<i>MATa ura3 trp1 Δste6::HIS3 end4<sup>ts</sup> his3 leu2 gal suc2::[TRP1 CUP1<sub>P</sub>-STE6-HIS3];</i> beruht auf RH268-1C
RKY1241	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1Δ-63 lys2-801 Δste6::HIS3 Δbem3::LEU2</i>
RKY1242	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1Δ-63 lys2-801 Δste6::HIS3 Δygl211c::LEU2</i>
RKY1243	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1Δ-63 lys2-801 Δste6::HIS3 Δynl201c::LEU2</i>
RKY1285	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 ste6::GAL1<sub>P</sub>-STE6<sub>(c-myc)</sub> cir<sup>0</sup></i>
RKY1392	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 ste6::GAL1<sub>P</sub>-STE6<sub>(c-myc)</sub> suc2::[kan<sup>r</sup> CUP1<sub>P</sub>-STE6-HIS3] cir<sup>+</sup></i>
RKY1393	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 ste6::GAL1<sub>P</sub>-STE6<sub>(c-myc)</sub> suc2::[kan<sup>r</sup> CUP1<sub>P</sub>-STE6-HIS3] cir<sup>0</sup></i>
RKY1452	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1Δ-63 lys2-801 MOS1-13myc kanMX</i>
RKY1490	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1Δ-63 lys2-801 snf7-13myc kanMX</i>
RKY1509	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1Δ-63 lys2-801 Δmos1::kan<sup>r</sup></i>
RKY1510	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1Δ-63 lys2-801 Δsnf7::HIS3</i>
RKY1511	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1Δ-63 lys2-801 Δvps4::HIS3</i>
RKY1517	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1Δ-63 lys2-801 Δvps4::HIS3 MOS1-13myc kanMX</i>
RKY1518	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1Δ-63 lys2-801 Δvps4::HIS3 snf7-13myc kanMX</i>
RKY1582	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δpep4::URA3 ste6::GAL1<sub>P</sub>-STE6<sub>(c-myc)</sub> suc2::[kan<sup>r</sup> CUP1<sub>P</sub>-STE6-HIS3] cir<sup>+</sup></i>
RKY1590	<i>MATa ura3-52 his3Δ-200 leu2-3,112 trp1Δ-63 lys2-801 Δmos2::HIS3</i>

### 2.1.4 Medien und Anzucht von Hefestämmen

Vollmedium (YEED):	1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Kohlenstoffquelle
synthetisches Minimalmedium (SM):	0,67% Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, 2% Kohlenstoffquelle Aminosäuren und Basen wurden wie folgt zugegeben:
	Casein-Hydrolysat 1%
	Ura, Ade, His, Trp, 30 µg/ml Met, Lys, Leu

Als Kohlenstoffquellen wurden 2% Glukose, 2% Raffinose oder 2% Galaktose mit 0,2% Glukose verwendet. Feste Nährböden enthielten zusätzlich 2% Agar. Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen wurde die entsprechende Aminosäure oder Base dem Medium nicht zugesetzt. Zur Selektion auf Verlust eines Plasmids mit *URA3*-Marker (*ura<sup>-</sup>*-Zellen) wurden SM-Agarplatten verwendet, die 5,6 µg/ml Uracil und 1 mg/ml 5-FOA enthielten (Boeke *et al.*, 1984). Die Selektion auf Geneticinresistenz erfolgte auf Vollmediumsplatten mit 200 µg/ml G418 (Longtine *et al.*, 1998).

Die Anzucht der Hefestämme erfolgte bei 30°C. Eine Ausnahme bildeten *ts*-Stämme, die bei 25°C angezogen und gegebenenfalls 1-2 h bei ihrer nicht-permissiven Temperatur von 37°C inkubiert wurden.

## 2.2 Plasmide

Tab. 4: Verwendete Plasmide; Alle *GAL4-AD*-Plasmide verfügten über einen *LEU2*- und die *GAL4-BD*-Vektoren über einen *TRP1*-Selektionsmarker.

Plasmid	Quelle/Referenz	Beschreibung
pBM272	(Johnston und Davis, 1984)	<i>S. cerevisiae</i> 685 bp <i>GAL1</i> -Promotorfragment
pBM743-PKC1 R398A::HA	(Watanabe <i>et al.</i> , 1994)	Konstitutiv aktive Mutante von Pkc1 mit HA-Epitop unter Kontrolle des <i>GAL1</i> -Promotors auf CEN/ARS-Vektor mit <i>URA3</i> -Marker
pBM743-PKC1::HA	(Watanabe <i>et al.</i> , 1994)	Pkc1 mit HA-Epitop unter Kontrolle des <i>GAL1</i> -Promotors auf CEN/ARS-Vektor mit <i>URA3</i> -Marker
pFA6a-13myc-kanMX6	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)	Template für die PCR-Amplifikation von Fragmenten zur C-terminalen Markierung von Proteinen mit <i>kan<sup>r</sup></i> -Selektionsmarker

---

pFA6a-3HA-kanMX6	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)	Template für die PCR-Amplifikation von Fragmenten zur C-terminalen Markierung von Proteinen mit kan <sup>r</sup> -Selektionsmarker
pFA6a-HisMX6	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)	Template für die PCR-Amplifikation von Fragmenten zur Gendeletion mit <i>S. pombe his5<sup>+</sup></i> -Selektionsmarker
pFA6a-kanMX6	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)	Template für die PCR-Amplifikation von Fragmenten zur Gendeletion mit kan <sup>r</sup> -Selektionsmarker
pFA6-KanMX4	(Wach <i>et al.</i> , 1994)	<i>E. coli</i> Klonierungsvektor mit Disruptionskassette kanMX4 aus <i>E. coli</i> TN 903, flankiert von <i>A. gossypii</i> TEF-Promotor und Terminator.
pGAD-PKC1	J. Heinisch, Düsseldorf	<i>GAL4-AD-PKC1</i> -Fusion im Two Hybrid-Vektor pGAD
pJD $\mu$ P-15.2	J. Dohmen, Düsseldorf	<i>PDC1p-LEU2d</i> , 2 $\mu$ , <i>URA3</i> , Plasmid für "Curing" von endogenem 2 $\mu$ -Plasmid
pNKY51	(Alani <i>et al.</i> , 1987)	Konstrukt zur Gendeletion bei wiederholter Verwendung des <i>URA3</i> Selektionsmarkers
pRK278	R. Kölling, Düsseldorf	<i>S. cerevisiae STE6</i> in YCplac33 ( <i>URA3</i> )
pRK296	R. Kölling, Düsseldorf	2 $\mu$ -Two Hybrid-Plasmid, trägt die mit einem Haemagglutinin-Epitop markierte <i>GAL4</i> -Aktivierungsdomäne ( <i>GAL4-AD-HA</i> )
pRK329	R. Kölling, Düsseldorf	2 $\mu$ Two Hybrid-Plasmid, trägt <i>GAL4</i> -Bindedomäne ( <i>GAL4-BD</i> )
pRK599	R. Kölling, Düsseldorf	<i>STE6-GFP</i> -Fusion im 2 $\mu$ -Vektor
pSE1111	(Fields und Song, 1989)	<i>GAL4-AD-SNF4</i> -Fusion im Two Hybrid-Vektor pACT1
pSE1112	(Fields und Song, 1989)	<i>GAL4-BD-SNF1</i> -Fusion im Two Hybrid-Vektor pAS1
pTD1	(Iwabuchi <i>et al.</i> , 1993)	<i>GAL4-AD-T</i> -Antigen-Fusion im Two Hybrid-Vektor pGAD424
pUC18-.LEU2	R. Kölling, Düsseldorf	<i>S.c. LEU2</i> in pUC18-Polylinker zur Konstruktion von Disruptionsplasmiden
pUC19-STE6	(McGrath und Varshavsky, 1989)	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor, der das chromosomale <i>S. cerevisiae</i> 6,7 kb <i>Sall</i> -Fragment von <i>STE6</i> enthält
pVA3	(Iwabuchi <i>et al.</i> , 1993)	<i>GAL4-BD-p53</i> -Fusion im Two Hybrid-Vektor pGBT9
pYKS2	(Kuchler <i>et al.</i> , 1993)	<i>URA3</i> -markiertes 2 $\mu$ -Plasmid mit epitopmarkiertem <i>S. cerevisiae STE6</i> -Gen. Das verwendete c-Myc-Epitop befindet sich im ersten extrazellulären Loop von Ste6.
YCplac111	(Gietz und Sugino, 1988)	CEN/ARS Vektor mit <i>LEU2</i> Selektionsmarker
YCplac22	(Gietz und Sugino, 1988)	CEN/ARS Vektor mit <i>TRP1</i> Selektionsmarker
YCplac33	(Gietz und Sugino, 1988)	CEN/ARS Vektor mit <i>URA3</i> Selektionsmarker
YEplac352-PKC1::HA	(Watanabe <i>et al.</i> , 1994)	<i>PKC1</i> , mit HA-Epitop markiert, auf 2 $\mu$ -Vektor mit <i>LEU2</i> -Marker
YEplac112	(Gietz und Sugino, 1988)	2 $\mu$ -Vektor mit <i>TRP1</i> Selektionsmarker
YEplac181	(Gietz und Sugino, 1988)	2 $\mu$ -Vektor mit <i>URA3</i> -Selektionsmarker

---

Tab. 5: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pRK328	Integrationsplasmid zur Konstruktion von Ste6-Fusionsproteinen, <i>TRP1</i> -Marker
pRK333	<i>S. cerevisiae</i> 320 bp <i>STE6</i> PCR-Fragment (Primer #102+23) im Two Hybrid-Vektor pRK329 ( <i>GAL4-BD-D-Box</i> -Fusion)
pRK378	Auf pNKY51 basierendes Plasmid zum Ersetzen des chromosomalen <i>STE6</i> -Gens durch ein <i>GAL1<sub>P</sub>-STE6<sub>(c-myc)</sub></i> -Konstrukt, vor der Transformation zu schneiden mit <i>Bam</i> HI und <i>Bgl</i> II
pRK381	<i>S. cerevisiae</i> 1,2 kb <i>STE6</i> PCR-Fragment (Primer #174+23) im Two Hybrid-Vektor pRK329 ( <i>GAL4-BD-NBD1-D-BOX</i> -Fusion)
pRK395	Integrationsplasmid zur Einführung einer <i>Cup1<sub>P</sub>-STE6-HIS3</i> -Fusion am <i>SUC2</i> -Lokus, vor der Integration mit <i>Hpa</i> I zu schneiden; basiert auf pRK328
pRK400	<i>BEM3</i> -Disruptionsplasmid, für Integration mit <i>Sma</i> I/ <i>Eco</i> RV zu schneiden
pRK483	<i>S. cerevisiae</i> 1,2 kb <i>STE6</i> PCR-Fragment (Primer #174+212) im Two Hybrid-Vektor pRK329 ( <i>GAL4-BD-NBD1</i> --Fusion)
pRK494	<i>S. cerevisiae</i> 1,2 kb <i>PPH22</i> PCR-Fragment (Primer #174+212) im Two Hybrid-Vektor pRK329 ( <i>GAL4-BD-PPH22</i> --Fusion)
pRK495	<i>S. cerevisiae</i> 2,6 kb <i>YNL201c</i> PCR-Fragment (Primer #215+216) im Two Hybrid-Vektor pRK296 ( <i>GAL4-AD-YNL201c</i> --Fusion)
pRK502	<i>YNL201c</i> -Disruptionsplasmid, für Integration mit <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III zu schneiden
pRK504	<i>GAL1<sub>P</sub>-STE6<sub>(c-myc)</sub></i> in <i>YCplac33 (URA3)</i>
pRK507	<i>YGL211w</i> -Disruptionsplasmid, für Integration mit <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III zu schneiden
pRK515	<i>S. cerevisiae</i> 3,5 kb <i>PKC1</i> PCR-Fragment (Primer #213+219) im Two Hybrid-Vektor pRK296 ( <i>GAL4-AD-PKC1</i> --Fusion)
pRK517	<i>S. cerevisiae</i> 3,5 kb <i>PKC1 R398A</i> PCR-Fragment (Primer #213+219) im Two Hybrid-Vektor pRK296 ( <i>GAL4-AD-PKC1 R398A</i> --Fusion)
pRK566	<i>S. cerevisiae</i> 450 bp <i>CUP1</i> -Promotorfragment in <i>YCplac22</i> ; Plasmid zur kupferinduzierten Expression von Genen
pRK567	<i>S. cerevisiae</i> 1,8 kb <i>Hind</i> III <i>VPS4</i> -Fragment in <i>YEplac181</i>
pRK577	<i>S. cerevisiae</i> 4 kb <i>PKC1::HA</i> -Fragment im Vektor pRK566
pRK578	<i>S. cerevisiae</i> 4 kb <i>PKC1::HA R398A</i> -Fragment im Vektor pRK566
pRK581	<i>S. cerevisiae</i> 800bp <i>MOS1</i> PCR-Fragment (Primer #295+296) im Two Hybrid-Vektor pRK329 ( <i>GAL4-BD-MOS1</i> --Fusion)
pRK582	auf pFA6-KanMX4 basierendes Plasmid zur Integration von <i>CUP1<sub>P</sub>-STE6-HIS3-kan<sup>r</sup></i> in <i>SUC2</i> , vor Transformation zu schneiden mit <i>Sma</i> I/ <i>Hpa</i> I
pRK584	PCR-generiertes <i>S. cerevisiae</i> 1,2 kb <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI <i>YGR069w</i> -Fragment (Primer #297+298) in <i>YEplac181</i>
pRK585	PCR-generiertes <i>S. cerevisiae</i> 1,8 kb <i>Hind</i> III/ <i>Eco</i> RI <i>SNF7</i> -Fragment (Primer #299+300) in <i>YEplac181</i>
pRK586	PCR-generiertes <i>S. cerevisiae</i> 3,8 kb <i>Pst</i> I/ <i>Eco</i> RI <i>VPS35</i> -Fragment (Primer #301+309) in <i>YEplac181</i>
pRK587	PCR-generiertes <i>S. cerevisiae</i> 1,4 kb <i>Pst</i> I/ <i>Eco</i> RI <i>MOS1</i> -Fragment (Primer #303+304) in <i>YEplac181</i>
pRK630	<i>S. cerevisiae</i> 741bp <i>SNF7</i> PCR-Fragment (Primer #340+341) im Two Hybrid-Vektor pRK329 ( <i>GAL4-BD-MOS1</i> --Fusion)

## 2.3 Genbanken

Verwendet wurde eine *S. cerevisiae* DNA-Bank mit chromosomalen Fragmenten im 2 $\mu$ -Vektor YEp13 (Yoshihisa und Anraku, 1989). Zur Suche nach Proteininteraktionen mit Hilfe des Two Hybrid-Systems wurden drei Genbanken eingesetzt: Eine cDNA-Bank im Lambdavektor  $\lambda$ ACT (Aktivierungsdomäne) (S.J. Elledge, pers. Mitteilung), eine cDNA-Bank der Firma Clontech (Matchmaker Two Hybrid System) sowie eine Genbank mit chromosomalen Fragmenten (James *et al.*, 1996). Zur zufälligen Disruption und Markierung von Genen wurde die „Snyder-Library“ verwendet, welche chromosomale Fragmente von *S. cerevisiae* mit einem integrierten bakteriellen Transposon enthält (Snyder *et al.*, 1986).

## 2.4 Synthetische Oligonukleotide

Tab. 6: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligo	Sequenz (5'→3')	Beschreibung
#023	CCCAGATCTTTTTGTATCTTATGCTT	Downstream-Primer zur PCR-Amplifikation von D-Box-Fragmenten, mit <i>Bgl</i> II-Schnittstelle
#102	CCCGGATCCCGACCACTACATTTAGC	Upstream-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>STE6</i> -Fragmenten, mit <i>Bam</i> HI-Schnittstelle
#110	TCGATGATGAAGATACCC	Sequenzierung von <i>GAL4-AD</i> -Fusionen
#124	GTGCGACATCATCATCGG	Sequenzierung von <i>GAL4-BD</i> -Fusionen
#127	CCCGTCGACCCATGACAGAGCAGAAAGCC	Amplifikation eines <i>HIS3</i> -Fragments, mit <i>Sal</i> I-Schnittstelle
#128	CCCGTCGACCGGAATACCACTTGCCAC	Amplifikation eines <i>HIS3</i> -Fragments, mit <i>Sal</i> I-Schnittstelle
#155	CTGTTCAAACGTTTTAACGC	Amplifikation eines upstream zum <i>STE6</i> -Promotor liegenden Fragments, mit <i>Bgl</i> II-Schnittstelle
#156	CCCGGATCCCGCATTACGAGTGCGATG	Amplifikation eines upstream zum <i>STE6</i> -Promotor liegenden Fragments, mit <i>Bam</i> HI-Schnittstelle
#157	CCCAGATCTTGGATGGACGCAAAGAAG	Assembly-PCR <i>Gal1<sub>P</sub>-STE6<sub>(c-myc)</sub></i> , <i>Bgl</i> II-Schnittstelle
#158	GACGTTAAAGTATAGAGG	Assembly-PCR <i>Gal1<sub>P</sub>-STE6<sub>(c-myc)</sub></i>
#159	CCTCTATACTTTAACGTCATAATGAACTTTTT AAGTTTTAAG	Assembly-PCR <i>Gal1<sub>P</sub>-STE6<sub>(c-myc)</sub></i>
#160	GGATTTGCTTGGATCCATC	Assembly-PCR <i>Gal1<sub>P</sub>-STE6<sub>(c-myc)</sub></i> , mit <i>Bam</i> HI-Schnittstelle
#174	CCCAGATCTCGAATAATACATTACACC	Downstream-Primer zur PCR-Amplifikation von D-Box-Fragmenten, mit <i>Bgl</i> II-Schnittstelle
#178	CCCCCGGGTAACCCAATTGTGGTG	Amplifikation eines <i>BEM3</i> -Upstreamfragments zur Konstruktion eines Disruptionsplasmids, <i>Sma</i> I
#179	CCCGATATCTATGTATGCAAATACAGC	Amplifikation eines <i>BEM3</i> -Upstreamfragments zur Konstruktion eines Disruptionsplasmids, <i>Eco</i> RV
#197	GATGTGCTGCAAGGCGATTAAG	ST-PCR Primer #1

---

#198	GGCCACGGATCCACTTGTGNNNNNNNNNGT AAT	ST-PCR Primer #2
#199	GGTTTTCCAGTCACGACGTTG	ST-PCR Primer #3
#200	GGCCACGGATCCACTTGTG	ST-PCR Primer #4
#212	CCCAGATCTGTCAATTCTGTAGGTGATACC	Upstream-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>STE6</i> - Fragmenten, mit <i>Bgl</i> II -Schnittstelle
#213	CCCAGATCTCGATGAGTTTTTCACAATTGGAG	Upstream-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>PKC1</i> , mit <i>Bgl</i> II -Schnittstelle
#214	CCCAGATCTTCATAAATCCAAATCATCTGG	Downstream-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>PKC1</i> , mit <i>Bgl</i> II -Schnittstelle
#215	CCCGGATCCCGATGTCATTACCGGTACACC	Upstream-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>YNL201c</i> , mit <i>Bam</i> HI -Schnittstelle
#216	CCCAGATCTTCAAGTACTGTCATTCAATTG	Downstream-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>YNL201c</i> , mit <i>Bgl</i> II -Schnittstelle
#217	CCCGGATCCCGATGGATATGGAAATTGATGAC	Upstream-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>PPH22</i> , mit <i>Bam</i> HI -Schnittstelle
#218	CCCAGATCTTTATAAGAAATAATCCGG	Downstream-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>PPH22</i> , mit <i>Bam</i> HI -Schnittstelle
#219	CCTTAACGTGAGTTTTTCG	Sequenzierung von ST-PCR-Produkten (hybridisiert in Tn3)
#220	CCCCCGGGGATTTACCAATATCTTCC	Amplifikation eines <i>BEM3</i> -Downstreamfragments zur Konstruktion eines Disruptionsplasmids, <i>Pst</i> I
#221	CCCAAGCTTTCAGCAGATAGCTCCAGC	Amplifikation eines <i>BEM3</i> -Downstreamfragments zur Konstruktion eines Disruptionsplasmids, <i>Hind</i> III
#222	CCCGGATCCATTGTCGAAGAACTGTGC	Amplifikation eines <i>YNL201c</i> -Upstreamfragments zur Konstruktion eines Disruptionsplasmids, <i>Bam</i> HI
#223	CCCAGATCTTCTACTATACGTAAATCC	Amplifikation eines <i>YNL201c</i> -Upstreamfragments zur Konstruktion eines Disruptionsplasmids, <i>Bgl</i> II
#224	CCCCTGCAGTTTTTCTTGTGGAAAG	Amplifikation eines <i>YNL201c</i> -Downstreamfragments zur Konstruktion eines Disruptionsplasmids, <i>Pst</i> I
#225	CCCAAGCTTCCAAGGCATGCTGAAGG	Amplifikation eines <i>YNL201c</i> -Downstreamfragments zur Konstruktion eines Disruptionsplasmids, <i>Hind</i> III
#230	CCCGGATCCGTCAAAGCCAAATGTTTCTC	Amplifikation eines <i>YGL211w</i> -Upstreamfragments zur Konstruktion eines Disruptionsplasmids, <i>Bam</i> HI
#231	CCCAGATCTGACGGTTCCTTTGCTTTAC	Amplifikation eines <i>YGL211w</i> -Upstreamfragments zur Konstruktion eines Disruptionsplasmids, <i>Bgl</i> II
#232	CCCCTGCAGTGAATATCCTACGTGGTG	Amplifikation eines <i>YGL211w</i> -Downstreamfragments zur Konstruktion eines Disruptionsplasmids, <i>Pst</i> I
#233	CCCAAGCTTCAGTGGTTGCAATTTTCG	Amplifikation eines <i>YGL211w</i> -Downstreamfragments zur Konstruktion eines Disruptionsplasmids, <i>Hind</i> III
#242	GTTGATCATTCTCAGTGG	Nachweis <i>bem3</i> -Disruption
#243	CATTTGGTTTTCCATTGCG	Nachweis <i>ygl211w</i> -Disruption
#244	CATTGCCGGTGCTGCTGG	Nachweis <i>ynl201c</i> -Disruption
#266	ATGCAATTTCTATGCGCAC	Sequenzierung YEp13-Genbank
#267	TGGCGAGCCGATCTTCCCC	Sequenzierung YEp13-Genbank
#275	CAATATCAAAGGAAATGATAGC	2 $\mu$ -Nachweis
#276	ACTTGTTACCCATCATTG	2 $\mu$ -Nachweis

---

#295	CCCCGGATCCCGATGGGATTTTTAGCAAGAG	Upstream-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>MOS1</i> , mit <i>Bam</i> HI–Schnittstelle
#296	CCCAGATCTTCACTGAGCGCTTTCTAAAG	Downstream-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>MOS1</i> , mit <i>Bgl</i> II –Schnittstelle
#297	CCCGAATTCCTTCGAATATTTTTGTTG	Subklonierung von <i>YGR069w</i> , <i>Eco</i> RI-Schnittstelle
#298	CCCAAGCTTCCTAACCAAATCTTACC	Subklonierung von <i>YGR069w</i> , <i>Hind</i> III-Schnittstelle
#299	CCCGAATTCACGTATAAACTGTGTACC	Subklonierung von <i>SNF7</i> , mit <i>Eco</i> RI-Schnittstelle
#300	CCCAAGCTTTTCAAGAACAGGGCGAAG	Subklonierung von <i>SNF7</i> , mit <i>Hind</i> III-Schnittstelle
#301	CCCGAATFCAACCTTCTTGAGTTACTG	Subklonierung von <i>VPS35</i> , mit <i>Eco</i> RI-Schnittstelle
#303	CCCGAATFCTCTTGACACTCTTCCTC	Subklonierung von <i>Mos1</i> , mit <i>Eco</i> RI-Schnittstelle
#304	CCCCTGCAGGGTGCTTTCTGCTTACTG	Subklonierung von <i>Mos1</i> , mit <i>Pst</i> I-Schnittstelle
#309	CCCCTGCAGCTTGTCTTACTTGATTCC	Subklonierung von <i>VPS35</i> , mit <i>Pst</i> I-Schnittstelle
#312	GACCTTTTCTTCTCTATGTTTTTCAGCCAT ACAAAAATCAGCTGAAGCTTCGTACGC	Primer zur PCR-basierten Deletion des <i>MOS1</i> -ORFs
#313	AGAAAAATFCTGAATATGCAACTTGTGTGCT TTTTGTTGCATAGGCCACTAGTGATCTG	Primer zur PCR-basierten Deletion des <i>MOS1</i> -ORFs
#322	GTTTTCCAGTCACGACG	Nachweis der Duplikation der <i>Cup1<sub>P</sub>-STE6-HIS3</i> –Kassette in RKY1050, zu verwenden mit #127
#323	TTAGATACTGAAGACAAAAATAAGCTTTAGA AAGCGCTCAGCGGATCCCCGGTTAATTAA	Primer F2 zur PCR-basierten Modifikation des <i>MOS1</i> -ORFs
#324	AGAAAAATFCTGAATATGCAACTTGTGTGCT TTTTGTTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Primer R1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>MOS1</i> -ORFs
#328	AATAAAGCAGCATAGAGTGCCTATAGTAGATG GGGTACAACGGATCCCCGGTTAATTAA	Primer F1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>VPS4</i> -ORFs
#329	GCAAGAACAGTTCACTAGAGATTTGGTCAAG AAGGTAACCGGATCCCCGGTTAATTAA	Primer F2 zur PCR-basierten Modifikation des <i>VPS4</i> -ORFs
#330	ATGTACAACAAGAAATCTACATTAGCACGTTAA TCAATTGAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Primer R1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>VPS4</i> -ORFs
#331	ACGGAAGCAGCAGAAACATAACAGTATTGATA AATAAGGCCGATCCCCGGTTAATTAA	Primer F1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>SNF7</i> -ORFs
#332	TGAAAAAGCATTAAAGAGAACTACAAGCAGAAA TGGGGCTTCGGATCCCCGGTTAATTAA	Primer F2 zur PCR-basierten Modifikation des <i>SNF7</i> -ORFs
#333	ACCTTTTTTTTTTCTTTTCATCTAAACCGCATA GAACACGTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Primer R1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>SNF7</i> -ORFs
#334	CGGATCCCCGGTTAATTAA	Nachweis PCR-basierter Modifikationen, entspricht F1/F2-Primern
#335	TTAATTAACCCGGGATCCG	Nachweis PCR-basierter Modifikationen, komplementär zu F1/F2-Primern
#340	CCCGGATCCCAATGTGGTCATCACTTTTTT	Upstream-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>SNF7</i> , mit <i>Bam</i> HI–Schnittstelle
#341	CCCAGATCTCAAAGCCCCATTTCTGC	Downstream-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>SNF7</i> , mit <i>Bgl</i> II –Schnittstelle
#388	CCCCGGATCCCGATGAGCACGGGAGATTTT	Upstream-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>VPS4</i> , mit <i>Bam</i> HI–Schnittstelle
#389	CCCGGATCCCTAGTTACCTTCTTGACC	Downstream-Primer zur PCR-Amplifikation von <i>VPS4</i> , mit <i>Bam</i> HI–Schnittstelle
#414	CTGCTGAATTAACCTCCACTTGGTGCTTTTGTA TATATCGACGGATCCCCGGTTAATTAA	Primer F1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>MOS2</i> -ORFs

---

#415	CATTCCCTTTATTTTAAATTTGAAGCTACAT ACAGACATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Primer R1 zur PCR-basierten Modifikation des MOS2-ORFs
#416	GACTTGGAATAACCTGTG	Disruptionsnachweis von $\Delta mos2$
#417	AAAAACCTGGAAGGAACC	Disruptionsnachweis von $\Delta mos2$

---

## 2.5 Chemikalien und Enzyme

Acros	Lysin, Natriumthiosulfat, Natriumcarbonat
Amersham	Amplify, Hybond Nylon Membran
Bio-Rad	Low Range SDS-Page Molekulargewichtsstandard
Braun-Melsungen	Glasperlen 0,45 mm $\varnothing$
Caesar & Loretz	Glukose
Difco	Bacto Agar, Casaminoacids, Pepton, Trypton, Yeast Extract, Yeast Nitrogen Base
GibcoBRL	Agarose, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase
J.T. Baker	CaCl <sub>2</sub> , Kaliumacetat, NaCl, NaOH, PEG4000
Kodak	Röntgenfilme
Life Technologies	G418/Geneticin
Merck	APS, EDTA, Leucin, TEMED, Adenin, Uracil, DMF, Sucrose, Galaktose
Molecular Probes	FM4-64
MWG Biotech	Synthetische Oligonukleotide
New England Biolabs	Restriktionsendonucleasen, BSA
PCR Inc. Florida	5-FOA
Pharmacia	ProteinA-Sepharose, T7-Sequencing-Kit, Cycle Sequencing Kit
Qiagen	QiaAmp Tissue Kit
Riedel-de Haen	Essigsäure, Harnstoff, Natriumazid
Roche	High Pure Plasmid Isolation Kit, PCR Purification Kit, Alkalische Phosphatase, BCIP, Klenow DNA-Polymerase, Restriktionsendonucleasen, Expand Long PCR System
Roth	DTT, Gel30 Acrylamid, Glycin, Sequenziergel-Konzentrat, DMSO
Schleicher & Schuell	Nitrocellulose-Membran
Seikagaku Kogyo Co. Ltd	Zymolyase
Serva	Glycerin, SDS, Ethidiumbromid, Triton X-100, Tween20
Sigma	Ampicillin, Lithiumacetat, BCIP, NBT, PonceauS, „Prestained“ Molekulargewichtsstandard, N-acetyl-dl-phenylalanin- $\beta$ -naphthylester, Fast Garnet GBC Salt, EMS, Sucrose
Sigma	BSA (IgG-frei)
UBS	Tris
Whatman	3 MM Papier

## 2.6 Antikörper

monoklonale Antikörper  
anti-ALP

Molecular Probes



anti-c-myc (9E10)	BAbCO (Berkley Antibodies Co.)
anti-Dpm1	Molecular Probes
anti-Haemagglutinin (HA):	BAbCO (Berkley Antibodies Co.)
anti-Vph1	Molecular Probes

#### polyklonale Antikörper

anti-CPY	K. Köhrer, Düsseldorf
anti-Pep12	Hugh Pelham
anti-Pma1	R. Kölling, Düsseldorf
anti-Ste6	R. Kölling, Düsseldorf

## 2.7 Transformation

### 2.7.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* erfolgte nach dem Protokoll 3 von (Hanahan, 1985)

### 2.7.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von Hefe wurde nach der Lithiumacetat-Methode durchgeführt (Ito *et al.*, 1983). Dazu wurden 10 ml einer Kultur mit OD<sub>600</sub> 0,6-1 abzentrifugiert, die Zellen einmal in H<sub>2</sub>O gewaschen, in 200 µl 0,1 M LiOAc in TE resuspendiert und für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µg Plasmid-DNA und 10 µl denaturierter Heringssperma-DNA (10 mg/ml) zugegeben und erneut für 30 min bei 30°C inkubiert. Nach Zugabe von 1,5 ml 40% PEG4000 in 0,1 M LiOAc in TE und 45-minütiger Inkubation bei 30°C erfolgte ein Hitzeschock über 20 min bei 42°C. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert, in 200 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und auf Selektivmedium ausgebracht. Zur Selektion auf Genitacinresistenz wurden die Zellen erst nach einer weiteren Inkubation über 2 h bei 30°C in Vollmedium auf G418-haltigem Medium ausplattiert. Zur Transformation mit Genbanken wurden die jeweils zehnfachen Mengen an Zellen und Lösungen eingesetzt sowie bis zu 50 µg Genbank-DNA.

## 2.8 Präparation von DNA

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

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde aus 1,5 ml stationärer Kultur nach der Methode der alkalischen Lyse (modifiziert) isoliert (Maniatis *et al.*, 1982). Zur Restriktionsanalyse wurden 200 ng der isolierten Plasmid-DNA in 30 µl Gesamtvolumen geschnitten. Hochreine Plasmid-DNA für Sequenzierungen und Klonierungen

wurden mit dem „High Pure Plasmid Isolation Kit“ der Firma Roche nach Angaben des Herstellers isoliert.

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

Die Zellen aus 2 ml stationärer Kultur wurden geerntet und in 300 µl SCE-Zymolyase-Lösung (1,2 M Sorbitol; 0,1 M Natriumcitrat; 10 mM EDTA; 0,5 mg/ml Zymolyase; pH 7,0) aufgenommen. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C wurden 200 µl P2 (0,2 M NaOH; 1% SDS) zugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde der Ansatz mit 300 µl P3 (3 M KOAc, pH 5,5) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 13 000 rpm wurde die Plasmid-DNA aus dem Überstand mit einer Schleudersäule des „Plasmid Purification Kits“ (Roche) gewonnen. Die Hälfte der DNA wurde für die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

### **2.8.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae***

Um Template für PCR-Reaktionen zu gewinnen, wurde wenig Zellmaterial einer frisch herangewachsenen Kolonie in 20 µl 20 mM NaOH resuspendiert, 90 sec in der Mikrowelle erhitzt und anschließend für mehrere Stunden bei gelegentlichem vortexen bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Gewinnung hochreiner chromosomaler DNA wurde das QiaAmp Tissue Kit der Firma Qiagen verwendet. Entgegen der Herstellerangabe wurden statt stationärer Zellen jeweils die doppelte Menge exponentiell heranwachsender Zellen verwendet.

## **2.9 Enzymatische Modifikation von DNA**

### **2.9.1 DNA-Restriktion**

Die sequenzspezifische Spaltung der DNA erfolgte mit 1 U Enzym pro µg DNA für 2-3 h oder über Nacht bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Es wurde ausschließlich das Puffersystem der Firma New England Biolabs verwendet.

### **2.9.2 Auffüllreaktion von 5'-überstehenden Enden**

5'-überstehende Fragmentenden wurden nach der in (Maniatis *et al.*, 1982) beschriebenen Methode aufgefüllt. Für die Reaktion wurden 1 U Klenow-Polymerase eingesetzt; die Reaktionsdauer betrug 30 min bei 16°C.

### **2.9.3 Entfernung von 3'-überstehenden Enden**

3'-überstehende Enden wurden nach der in (Maniatis *et al.*, 1982) beschriebenen Methode mit T4-DNA-Polymerase (2-5 U pro µg DNA) entfernt. Der Ansatz wurde

für 30 min bei 16° C in T4-Polymerase-Puffer (50 mM Tris-Cl pH 8,0; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT) in Gegenwart von 0,1 mM dNTP's inkubiert.

#### 2.9.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung von DNA-Enden erfolgte mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP). Hierzu wurde nach erfolgter Restriktion 1 U CIP direkt in den Restriktionsansatz gegeben und 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch rasches Einfrieren gestoppt. Die weitere Aufreinigung der dephosphorylierten Fragmente erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel.

#### 2.9.5 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit 100 ng dephosphorylierter Vektor-DNA und der fünffachen molaren Menge Insert-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Ligation erfolgte bei Verwendung des Ligasepuffers der Firma Gibco BRL in Gegenwart von 1 U T4-Ligase (Gibco BRL) über Nacht bei 16°C („sticky ends“) oder bei Raumtemperatur („blunt ends“).

### 2.10 PCR-Amplifizierung von DNA

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde in einem Endvolumen von 20-100 µl unter Verwendung des „Expand High Fidelity“ PCR-Systems der Firma Roche durchgeführt. Die Reaktionen wurden mit einem „Primus 25/96 Thermocycler“ der Firma MWG Biotech durchgeführt.

#### 2.10.1 Spezifische Amplifikation von Plasmid-DNA

Jeder Reaktionsansatz enthielt Puffer 2 (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), je 1 µM der entsprechenden Oligonukleotide, 200 µM dNTP-Mix, 1 ng Plasmid-DNA und 1 U Enzym. Zur Amplifikation wurde folgender Temperaturzyklus verwendet:

- |    |                |   |
|----|----------------|---|
| 1. | 2 min, 94°C    | Denaturierung der DNA                     |
| 2. | 25× 10 s, 94°C | Denaturierung der DNA                     |
|    | 30 s, 55°C     | Bindung der Primer an die DNA (Annealing) |
|    | 3 min, 72°C    | DNA-Synthese (Elongation)                 |
| 3. | 15 min, 72°C   | DNA-Synthese                              |

Die Anzahl der Syntheseschritte, die Annealing-Temperatur und die Elongationszeit wurden an die spezifischen Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide bzw. an die Größe des erwarteten Produkts angepasst.

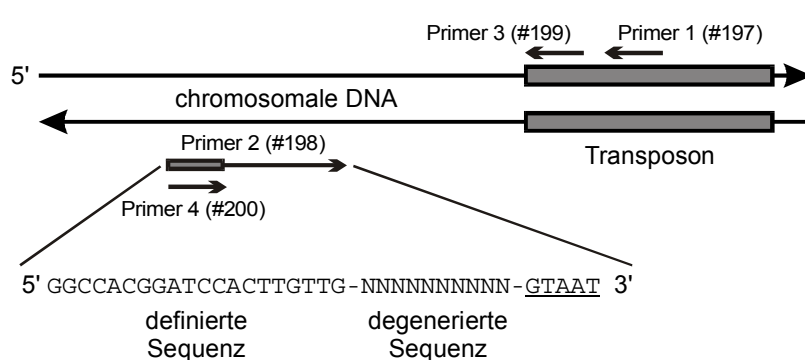
### 2.10.2 Spezifische Amplifikation von chromosomaler DNA

Jeder Reaktionsansatz enthielt Puffer 3 (ohne  $MgCl_2$ ), supplementiert mit 4 mM  $MgCl_2$ , je 2  $\mu M$  der entsprechenden Oligonukleotide, 200  $\mu M$  dNTP-Mix, 1  $\mu l$  chromosomaler DNA (rund 10 ng) und 1 U Enzym. Zur Amplifikation wurde folgender Temperaturzyklus verwendet:

- |    |                 |   |
|----|-----------------|---|
| 1. | 5 min, 96°C     | Denaturierung der DNA                     |
| 2. | 35× 1 min, 96°C | Denaturierung der DNA                     |
|    | 1 min, 55°C     | Bindung der Primer an die DNA (Annealing) |
|    | 3 min, 72°C     | DNA-Synthese (Elongation)                 |
| 3. | 15 min, 72°C    | DNA-Synthese                              |

Auch dieses Protokoll wurde reaktionsspezifisch variiert.

### 2.10.3 Semi-Random-PCR (ST-PCR)



Die spezifische Amplifikation uncharakterisierter Transposonmarkierter DNA-Sequenzen von genomischer DNA erfolgte nach einem veränderten Protokoll von (Chun *et al.*,

Abb. 3: Schema der ST-PCR

1997). Hierbei wird in einer ersten PCR-Reaktion ein Primer verwendet, der im transponierbaren Element hybridisiert (Primer #197) sowie ein degenerierter Primer, der aus 20 definierten Basen besteht, gefolgt von zehn zufälligen Basen und der Sequenz GTAAT (#198). Die Reaktion wurde anschließend 1:5 verdünnt, und 1  $\mu l$  wurde für eine zweite PCR-Reaktion eingesetzt. Hierbei wurde Primer #199 verwendet, der „upstream“ von Primer #197 im transponierbaren Element hybridisiert sowie Primer #200, welcher dem definierten Bereich von Primer #198 entspricht (Abb. 3). Durch die zweite Reaktion werden PCR-Produkte amplifiziert, die in der ersten Reaktion spezifisch durch die Primer #197 und #199 gebildet wurden. Spezifische PCR-Produkte wurden durch elektrophoretische Auftrennung aufgereinigt (2.11) und ggf. nochmals amplifiziert.

Alle Reaktionsvolumina betragen 25  $\mu l$ , alle Ansätze enthielten jeweils 1  $\mu M$  Primer, 200  $\mu M$  dNTP-Mix und 4 mM  $MgCl_2$ . Die folgenden PCR-Programme wurden verwendet:

PCR 1:

1. 5 min, 96°C
2. 6× 30 s, 94°C  
30 s, 42°C (-1°C/Zyklus)  
3 min, 72°C
3. 25× 30 s, 94°C  
30 s, 65°C  
3 min, 72°C

PCR 2:

1. 30 s, 96°C
2. 30× 30 s, 94°C  
30 s, 65°C  
3 min, 72°C
3. 10 min, 72°C

## 2.11 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente von 0,2-10 kb wurden in 0,8-1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt. Als Gel- und Laufpuffer diente 0,5 × TAE (20 mM Tris; 10 mM NaOAc; 1 mM EDTA; pH 8,0). Sowohl dem Gel als auch dem Laufpuffer wurde EtBr mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen Blaumarker (0,2% Bromphenolblau in 25% Glycerol) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei analytischen Gelen bei maximal 200 V, bei präparativen Gelen bis 120 V. Als Längen- und Konzentrationsstandard diente 1 µg *EcoRI/HindIII* geschnittene Lambda-DNA oder pUC218-DNA, die mit dem Restriktionsenzym *HaeIII* geschnitten war.

## 2.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Isolierung wurde mit dem „High Pure PCR-Product Purification Kit“ der Firma Roche nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

## 2.13 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde durch Vergleich der Bandenstärke zum Konzentrationsstandard in einem Agarosegel bestimmt.

## 2.14 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde nach der Methode von (Sanger *et al.*, 1977) mit dem T7-Sequencing Kit von Pharmacia durchgeführt. Zur Sequenzierung linearer DNA wurde das Cycle-Sequencing Kit des gleichen Herstellers benutzt.

## 2.15 Herstellung von Proteinextrakten für Western-Analyse

Zur Herstellung von Proteinextrakten für „Western-Analysen“ wurden 4 OD<sub>600</sub>-Einheiten einer logarithmischen Hefekultur bei 4 000 rpm abzentrifugiert (OD<sub>600</sub>=0,4-07, 2-4×10<sup>7</sup> Zellen/ml), die Zellen wurden gewaschen in 10 mM NaN<sub>3</sub> und in 100 µl Lysispuffer (0,3 M Sorbitol; 50 mM HEPES; 10 mM NaN<sub>3</sub>; pH 7,5) mit Proteaseinhibitoren (0,5 µg/ml von Aprotinin, Antipain, Chymostatin, Leupeptin, Pepstatin A und 1,6 µg/ml Benzamidin, 1 µg/ml Phenanthroline sowie 170 µg/ml Phenylmethylsulfonylfluoride) aufgenommen. Nach Zugabe von Glasperlen (Ø 0,45 mm) bis zum Flüssigkeitsspiegel wurden die Zellen 3 min auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen. Danach wurden 200 µl 2× Probenpuffer (4% SDS; 20% Glycerol; 125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,2% Bromphenolblau; 20 mM DTT) zugegeben. Zum Nachweis von Membranproteinen wurde der Extrakt 60 min bei 37°C solubilisiert, zum Nachweis von löslichen Proteinen wurden die Proben für 5 min bei 95°C inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden anschließend 2 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert und vor dem Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamidgel (2.17) nochmals solubilisiert. Aufgetragen wurden jeweils 15 µl frisch denaturierter Extrakt, dies entspricht einer Menge von 0,2 OD<sub>600</sub>-Einheiten Zellen.

## 2.16 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von (Bradford, 1976) mit dem „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent“ (Bio-Rad). Hierzu wurde 1 µl der Zellextrakte auf ein Gesamtvolumen von 0,8 ml verdünnt mit Wasser und mit 0,2 ml Reagenz versetzt. Nach 20 min wurde die Extinktionsänderung bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen. Eine BSA-Stammlösung bekannter Konzentration diente der Erstellung einer Standardkurve.

## 2.17 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach der Methode von (Laemmli, 1970) in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen. Es wurde ein 5%iges Sammelgel (125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,025% APS; 0,1% TEMED; 5% Acrylamid) und ein 7,5 - 12,5%iges Trenngel (375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,025% APS; 0,1% TEMED; 7,5 - 12,5% Acrylamid) verwendet. Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris; 0,192 M Glycin; 0,1% SDS bei pH 8,3. Die

Auftrennung der Proteine erfolgte bei maximal 250 V und einer maximalen Stromstärke von 35 mA.

## **2.18 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse**

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Übertragung erfolgte in Transferpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% Methanol) für 3 h bei 60 V oder über Nacht bei 40 V. Der Proteintransfer wurde kontrolliert durch reversible Anfärbung der Banden mit PonceauS.

Unspezifische Bindestellen wurden durch Inkubation der Membran für 30 min in PBS/TWEEN (10 mM Natriumphosphat, pH7,2; 150 mM NaCl; 0,05% TWEEN20) mit 1% Magermilchpulver blockiert. Die Reaktion mit dem Primärantikörper erfolgte bei einer für den jeweiligen Antikörper spezifischen Verdünnung in PBS/TWEEN mit 1% Magermilchpulver für 90 min bei Raumtemperatur. Danach wurde der Filter dreimal mit PBS/TWEEN gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus-IgG bzw. anti-Kaninchen-IgG, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase) erfolgte ebenfalls in PBS/TWEEN über 60 min. Die Membran wurde 2× 5 min in PBS/TWEEN und 2× 5 min in Substratpuffer (0,1 M Tris/HCl, pH 8,8; 0,1 M NaCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch eine Phosphatase-katalysierte Farbreaktion in Substratpuffer, dem 0,1 mg/ml BCIP und 1 mg/ml NBT zugesetzt war. Nach abgeschlossener Farbreaktion wurde der Filter in Wasser gewaschen.

Eine Quantifizierung der Banden erfolgte densitometrisch (Howtek Scanmaster 3) mit den Programmen „Imagemaster 1D“ (Pharmacia) oder „NIH Image“.

## **2.19 Zellfraktionierungen**

### **2.19.1 Differentielle Zentrifugation**

4 OD<sub>600</sub>-Einheiten einer logarithmischen Hefekultur wurden abzentrifugiert, in Wasser gewaschen, in Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren (2.15) resuspendiert und mit Glasperlen für 3 min auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen. Intakte Zellen und grobe Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation über 5 min bei 500 g abgetrennt. Um die Löslichkeit mit Detergentien zu testen, wurde die Proben mit 2% Triton X-100 für 30 min vor der anschließenden Zentrifugation auf Eis inkubiert. Die Zellextrakte wurden für 10 min bei 13 000 g

zentrifugiert zum Pelletieren der P13-Fraktion. Die Überstände wurden erneut bei 100 000 g zentrifugiert, wodurch die P100-Fraktion (Pellet) und die S100-Fraktion (Überstand) erhalten wurden. Die Fraktionen wurden in Probenpuffer aufgenommen, und äquivalente Mengen wurden mittels SDS-PAGE und Western-Analyse (2.18) auf die Gegenwart von Proteinen hin analysiert.

### 2.19.2 Sucrosegradienten

Die Zellen von 100 ml Kultur ( $OD_{600}=0,6-0,8$ ) wurden durch Vakuumfiltration auf einer Nitrocellulosemembran gesammelt und rasch in 250  $\mu$ l eiskaltem STED10 (10% Sucrose; 10 mM Tris/HCl, pH 7,6; 10 mM EDTA; 1 mM DTT) mit Proteaseinhibitoren (2.15) resuspendiert. Nun wurden Glasperlen ( $\varnothing$  0,45 mm) bis zur Flüssigkeitsoberkante zugegeben und die Suspension für 3 min auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) geschüttelt. Nach Zugabe von 1 ml STED10 wurde der Ansatz gemischt, und der Überstand wurde für 5 min bei 500 g zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen zu pelletieren. Danach wurden genau 900  $\mu$ l des Überstands auf einen Sucrose-Gradienten gegeben. Dieser wurde hergestellt, indem in einem SW40-Zentrifugationsgefäß (Beckmann) 4 ml STED50 (wie STED10, jedoch mit 53% Sucrose), 4 ml STED34 (wie STED10, jedoch mit 35% Sucrose) und 4 ml STED20 (wie STED10, jedoch mit 20% Sucrose) sorgfältig übereinandergeschichtet werden. Das Gefäß wurde nun mit Parafilm verschlossen und vorsichtig in eine horizontale Lage gebracht. Nach dreistündiger Diffusion bei 4°C wurde der nun annähernd kontinuierliche Gradient aufgerichtet und mit Zellextrakt überschichtet. Nach Zentrifugation für exakt 14 h in einem Beckmann SW40-Rotor bei 114 000 g wurden Fraktionen zu 700  $\mu$ l vom Gradienten abgenommen. Aliquots wurden mit dem gleichen Volumen 2 $\times$  Probenpuffer (2.15) versetzt und 60 min bei 37°C inkubiert. Hiervon wurden jeweils 50  $\mu$ l elektrophoretisch aufgetrennt (2.17). Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte durch Western-Analyse (2.18).

### 2.20 Pulse-Chase-Experimente

Zur Bestimmung der Halbwertszeit von Ste6 wurden Hefezellen über Nacht in Minimalmedium (YNB und Aminosäuren) angezogen. Es wurden 5  $OD_{600}$ -Einheiten logarithmisch wachsender Zellen abzentrifugiert und in 2,5 ml frischem Medium aufgenommen (2  $OD_{600}$ /ml). Die Zellen wurden 15 min bei 30°C inkubiert. Die radioaktive Markierung neu synthetisierter Proteine erfolgte durch Zugabe von 50  $\mu$ Ci [ $^{35}$ S]-Methionin („pulse“). Nach 15 min wurde 1/50 Volumen konzentrierte Chase-Lösung (0,3% Cystein; 0,4% Methionin) beigemischt („chase“). Nach 0, 20, 40 und 60 min wurden Aliquots zu je 500  $\mu$ l abgenommen. Die



Zellen wurden 1 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert und mit 10 mM NaN<sub>3</sub> gewaschen. Die Pellets wurden in 110 µl Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren (2.15) resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 400 mg (±5 mg) Glasperlen (∅ 0,45 mm) überführt. Der Aufschluß erfolgte durch zweiminütiges Schütteln auf einem Vibrax. Nach Zugabe von 100 µl 2× Probenpuffer (2.15) wurden die Zellextrakte über 30 min bei 50°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben zur Immunpräzipitation (2.22) eingesetzt.

Die Versuchsdurchführung zur Bestimmung der CPY-Halbwertszeit war im wesentlichen identisch. Die Zellen wurden nur 5 min radioaktiv markiert, die Probenentnahme erfolgte nach 0, 5, 10 und 20 min.

## 2.21 CPY-Sorting

Zellen wurden über Nacht in Minimalmedium (YNB mit Aminosäuren) exponentiell herangezogen. 0,5 OD<sub>600</sub>-Einheiten wurden im gleichen Medium mit 1 mg/ml IgG-freiem BSA resuspendiert und mit 50 µCi [<sup>35</sup>S]-Trans-Label markiert. Nach 10 min wurde ein Überschuss an nicht-radioaktivem Cystein und Methionin zugegeben. Nach 40 min wurde 0,5 ml 2× S-Puffer (2,4 M Sorbitol; 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5; 20 mM NaN<sub>3</sub>; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 40 µM DTT und Proteaseinhibitoren (2.15) zugegeben. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurden 20 µg Zymolyase beigemischt, und die Zellen über 25 min bei 30°C sphäroplastiert. Um die interne Fraktion zu erhalten, wurden die Sphäroplasten abzentrifugiert (2 min bei 700 g) und in SDS-Probenpuffer (2.15) aufgenommen. Die Proteine des Überstands wurden mit 5% TCA 30 min auf Eis ausgefällt und 30 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert. Sie stellen die externe Fraktion dar und wurden ebenfalls in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation (2.22) durchgeführt.

## 2.22 Immunpräzipitation

Zu den Proben wurde 800 µl IP-Dilutionspuffer (1,25% Triton X-100; 6 mM EDTA; 60 mM Tris/HCl, pH7,6) gegeben. Unlösliches Zellmaterial wurde durch eine fünfminütige Zentrifugation abgetrennt. Nach Inkubation mit 5 µl Ste6-Antiserum bzw. 1 µl CPY-Antiserum über Nacht bei 4°C erfolgte die Zugabe von 100 µl einer 20%igen ProteinA-Sepharose-Lösung, und die Proben wurden weitere 3 h bei 4°C inkubiert. Darauf wurde dreimal mit IP-Puffer (1% Triton X-100; 0,2 % SDS; 150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl, pH7,6; 5 mM EDTA) gewaschen. Das Pellet wurde in 50 µl IP-Puffer aufgenommen und mit 50 µl Probenpuffer (2.15) mit 100 mM DTT versetzt und 30 min bei 50°C inkubiert. Jeweils 50 µl des immunprä-

zipitierten Materials wurde auf ein SDS-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.17). Anschließend wurden die Gele 30 min in Entfärberlösung (20% Methanol; 7% Essigsäure) fixiert, für weitere 30 min mit Amplify behandelt und 2 h bei 80°C getrocknet. Die Proteine wurden durch Autoradiografie mit einem Kodak Röntgenfilm nachgewiesen.

Eine Quantifizierung der Banden erfolgte densitometrisch (Howtek Scanmaster 3) mit den Programmen „Imagemaster 1D“ (Pharmacia) oder „NIH Image“.

## 2.23 Fast Garnet Plattentest auf Aktivität der Carboxypeptidase Y

Zur Verifikation des *pep4*-Phänotyps wurde der Test nach (Jones, 1977) durchgeführt. Für jede Agarplatte mit Hefekolonien wurden 3 ml 0,6%igem Agar bei 50°C mit 2 ml N-acetyl-dl-phenylalanin- $\beta$ -naphthylester in DMF (3 mg/ml) gemischt. Mit diesem Gemisch wurden die Agarplatten überschichtet. Sobald die Mischung erstarrte, wurden 5 ml Fast Garnet (1 mg/ml Fast Garnet GBC Salt; 0,1 M Tris/HCl, pH 7,3) auf die Platte gegeben. Ein Farbumschlag erfolgte nach 5-10 min.

## 2.24 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität

### 2.24.1 Quantitative Enzymtests

Die Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach (Miller, 1972). Dazu wurden 5 ml einer exponentiellen Hefekultur geerntet. Die Zellen wurden einmal mit Phosphat-Puffer (50 mM  $K_i PO_4$ , pH 7,0) gewaschen und anschließend durch Zugabe von Glasperlen ( $\varnothing$  0,45-0,5 mm) und 3 min kräftigem Schütteln (IKA-Vibrax-VXR) bei 4°C aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluß wurden 100  $\mu$ l Phosphat-Puffer zugegeben und gut gemischt. Der Überstand wurde für die Proteinbestimmung (2.16) und die Aktivitätsbestimmung eingesetzt. Dazu wurden 950  $\mu$ l Z-Puffer mit 1 mg/ml ONPG vorgelegt und bei 30°C äquilibriert. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 50  $\mu$ l frisch gewonnenem Rohextrakt, die Inkubation wurde ebenfalls bei 30°C durchgeführt. Nach Gelbfärbung, spätestens aber nach 2 h, wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 1 M Natriumcarbonat gestoppt. Zelltrümmer und denaturiertes Protein wurden 10 min bei 13 000 rpm pelletiert und die Extinktionsänderung des Überstands bei 420 nm gemessen. Zunächst wurde die Volumenaktivität des Rohextrakts nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{V}{\epsilon \times c \times d} \times \frac{\Delta E}{\Delta t} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{min} \times \text{min}} = \frac{\text{U}}{\text{ml}} \right]$$

$V$  = Küvettenvolumen [ $\mu\text{l}$ ];  $v$  = Probenvolumen [ $\mu\text{l}$ ];  $d$  = Schichtdicke des Küvetteninhalts [ $\text{cm}$ ];  $\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient bei 420 nm [ $\epsilon_{420} = 4,5 \text{ ml}/\mu\text{mol}\cdot\text{cm}$ ]

Die endgültige Angabe der Enzymaktivität erfolgte bezogen auf mg Gesamtprotein.

### 2.24.2 LacZ Filtertest

Hierzu wurde eine Nylonmembran auf die Agar-Platte mit den zu testenden Hefekolonien gelegt. Eingesetzt wurden nur Platten mit frisch herangezogenen Kolonien ausreichender Größe. Die Membran wurde vorsichtig abgezogen und zur Permeabilisierung der anhaftenden Zellen für 10 s in flüssigen Stickstoff überführt. Nach Erwärmung der Membran auf Raumtemperatur wurde sie mit der Zellseite nach oben in eine Petrischale gelegt, die ein mit 1 ml Z-Puffer (2.24.1) getränktes Filterpapier enthielt. Der Z-Puffer wurde zuvor mit 10  $\mu\text{l}$  einer frisch angesetzten X-Gal-Stammlösung (100 mg/ml in DMF) versetzt. Anschließend wurde die Membran 4-12 h bei 30°C inkubiert. Kolonien, in denen die  $\beta$ -Galaktosidase aktiv ist, werden blau. Nach abgeschlossener Farbreaktion können die Membranen getrocknet, eingeschweißt und ohne Farbveränderung gelagert werden.

### 2.24.3 LacZ Overlay-Assay

10 ml Wasser und 0,1 g Agarose sowie 10 ml Phosphat-Puffer (1 M  $\text{Na}_2\text{PO}_4$ ; pH 7,0) wurden getrennt in der Mikrowelle erhitzt und rasch gemischt. Nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  10% SDS und 0,5% X-Gal in DMF wurde das Gemisch möglichst heiß über eine Agarplatte mit frisch herangewachsenen Hefekolonien gegeben. Gegebenfalls wurde die Sensitivität des Tests durch Zugabe von einigen Tropfen Toluol gesteigert. Kolonien mit LacZ-Aktivität zeigen nach 2-12 h einen blauen Hof.

## 2.25 Mikroskopische Untersuchungen

Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Zeiss Axioskop durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer CCD-Kamera (Sony) aufgenommen und mit dem Programm „Adobe Photoshop 5.0“ nachbearbeitet.

### 2.25.1 GFP

Hefezellen wurden über Nacht exponentiell herangezogen und auf einem Objektträger durch das Mischen mit „low-melting“-Agarose fixiert. Die GFP-Fluoreszenz wurde mit einem FITC-Filtersatz beobachtet.

### 2.25.2 Aufnahme von FM4-64

FM4-64 ist ein Farbstoff, der in der lebenden Zelle spezifisch Membranen des endozytischen Weges anfärbt. Die Anwendung erfolgte nach (Vida und Emr, 1995): Die Zellen wurden exponentiell in Vollmedium (YEPD) herangezogen, 0,2 OD<sub>600</sub>-Einheiten wurden abzentrifugiert und in 90 µl frischem Medium aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µl 40 mM FM4-64 (in Wasser) wurden die Ansätze bei 30°C und guter Belüftung inkubiert. Nach 15 min wurden die Zellen pelletiert und in der gleichen Menge frischem Medium aufgenommen. Nach 30-60 min wurden die Zellen mit „low-melting“-Agarose vermischt und so auf einem Objektträger fixiert. Um die Energieabhängigkeit der FM4-64-Aufnahme zu testen, wurde Vollmedium mit 10 mM NaN<sub>3</sub> und 10 mM NaF verwendet. Die Beobachtung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Rhodamin-Filtersatz.

### 2.25.3 Immunfluoreszenz

Hefezellen einer logarithmisch über Nacht herangewachsenen Kultur wurden durch Zugabe von Formaldehyd (5% Endkonzentration) zum Kulturmedium für vier Stunden fixiert. Das Sphäroplastieren der Zellen sowie die Antikörperreaktion wurden wie bei (Pringle *et al.*, 1989) beschrieben durchgeführt. Zum Nachweis des c-Myc-Epitop markierten Ste6 wurde der anti-c-Myc Antikörper 9E10 verwendet. Zur Färbung der DNA wurde der DNA-bindende Farbstoff DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) benutzt (Sigma Chemicals, St. Louis).

## 2.26 Bestimmung der Paarungs-Aktivität

Nach Bestimmung der Zelldichte logarithmisch wachsender Hefekulturen wurden jeweils 10<sup>7</sup> MAT<sub>a</sub>- und MAT<sub>α</sub>-Zellen vermischt, abzentrifugiert und mit frischem Vollmedium überschichtet. Nach erneuter Zentrifugation wurde 4 h bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Zelldichte nochmals bestimmt und nach geeigneter Verdünnung 10<sup>2</sup> Zellen auf Vollmedium und jeweils 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup> und 10<sup>2</sup> Zellen auf geeignetes Selektivmedium ausgebracht, auf dem nur diploide Zellen wachsen können. Die Angabe der Paarungsaktivität erfolgte in Prozent der Kolonien auf Minimalmedium zu Kolonien auf Vollmedium.

## 2.27 Kreuzung von Hefestämmen und Tetradenanalyse

Die haploiden Kreuzungspartner wurden auf einer YPD-Platte miteinander gemischt und 5 h bei 25°C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf Minimalmedium ausgestrichen, auf dem durch geeignete Wahl der hinzugegebenen Aminosäuren nur diploide *MATa/α*-Zellen wachsen können. Zur Sporulation wurden die Zellen in YPD-Flüssigmedium über Nacht herangezogen, dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und in 3 ml Sporulationsmedium (1% KOAc mit essentiellen Aminosäuren) aufgenommen. Nach dreitägiger Inkubation bei 25°C wurde 1 ml des Ansatzes abzentrifugiert und die Zellen in 1 ml sterilem Wasser aufgenommen. Zur Entfernung der Ascuswand wurden 20 µl der Suspension mit 20 µl Zymolyaselösung (0,2 mg/ml) gemischt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Sporen mit einem Mikromanipulator auf einer YPD-Platte zum Auskeimen abgelegt.

## 2.28 EMS-Mutagenese

Zellen wurden über Nacht bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 herangezogen. 7 ml der Kultur wurden abzentrifugiert, gewaschen mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) und in 1,7 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Die Zellzahl wurde durch Zählung in einer Thoma-Kammer bestimmt. Nach Zugabe von 3% EMS (Endkonzentration) erfolgte eine Inkubation über 40 min bei 30°C. Nun wurden 100 µl des Mutagenesegemischs mit 4 ml 5%igem Natriumthiosulfat gemischt und weitere 20 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit Kaliumphosphatpuffer auf eine Zellzahl von  $8 \cdot 10^3$ /ml verdünnt und jeweils 100 µl auf eine YEPD-Platte ausgebracht. Unter den gewählten Bedingungen betrug die Überlebensrate 30%.

## 2.29 Gen-Deletion und Gen-Modifikation in *S. cerevisiae*

Gen-Deletionen von *S. cerevisiae* wurden durch homologe Rekombination von Markern in die chromosomale DNA bei gleichzeitiger Deletion des gewünschten Gens erzielt. Dazu wurden Disruptionsplasmide konstruiert, die eine Amplifikation der Disruptionskassette in *E. coli* erlaubten. Mit PCR (2.10.2) wurden geeignete Up- und Downstreamfragmente der jeweiligen Leserahmen mit einer Länge von bis zu 1 kb erzeugt, welche durch die vorgegebene Primersequenz singuläre Restriktionsschnittstellen enthielten. Diese erlaubten die Klonierung in einen Vektor, einen Selektionsmarker flankierend.

Alternativ wurde die von (Longtine *et al.*, 1998) beschriebene, auf PCR basierende Methode der Gendeletion benutzt. Hierbei wurden 60mere Oligonukleotide verwendet, deren 20 3'-ständigen Basen die Amplifikation eines Selektionsmarkers erlauben, der auf einem Plasmid vorliegt. Die 40 5'-ständigen Basen sind genspezifisch und erlauben die homologe Rekombination. Diese Methode wurde ebenfalls verwendet, um Proteine C-terminal mit einem Epitop zu markieren.

Der Erfolg der Genmanipulationen wurde mit mindestens zwei unabhängigen PCR-Reaktionen verifiziert, indem sowohl die Disruptionskassette flankierende Primer als auch interne Primer verwendet wurden. Dadurch konnten nur bei gelungener Manipulation spezifische PCR-Produkte der erwarteten Größe entstehen.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Identifizierung von Ste6-Interaktionspartnern

##### 3.1.1 Screen mit Two Hybrid-Genbanken

Wie in der Einleitung dargestellt wurde, vermittelt die D-Box von Ste6 die Ubiquitierung und den schnellen Turnover von Ste6. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass Proteine mit diesem Bereich wechselwirken. Zur Suche nach solchen Proteinen wurde das Two Hybrid-System eingesetzt.

Beim Two Hybrid-System handelt es sich um ein genetisches System zur Detektion von Proteinwechselwirkungen *in vivo* (Fields und Song, 1989). Das Prinzip beruht auf dem modularen Charakter eukaryontischer Transkriptionsfaktoren, wie Gal4. Die Funktion des Volllängenproteins kann rekonstituiert werden, wenn die Gal4-DNA-Bindedomäne (BD) und die Gal4-DNA-Aktivierungsdomäne (AD) in räumliche Nähe gelangen. Dazu werden im Two-Hybrid-System ein Protein X an die AD und ein Protein Y an die BD fusioniert. Bei physischer Interaktion von X mit Y werden Aktivierungs- und DNA-Bindedomäne zusammengebracht, sodass sie wieder als Transkriptionsfaktor fungieren können; dies geschieht nicht, wenn X und Y nicht miteinander interagieren.

Zur Expression solcher Hybridproteine wurden 2 $\mu$ -Vektoren verwendet, welche für die Gal4-AD bzw. BD unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors kodieren. Ein Polylinker am 3'-Ende der Gene mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen erlaubt die

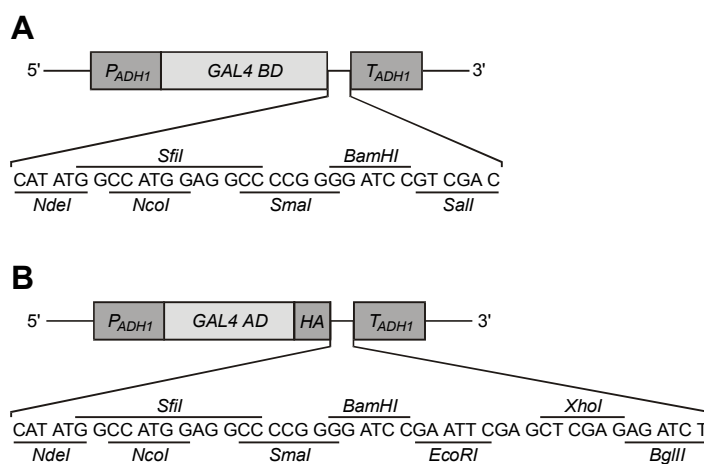


Abb. 4: Die *GAL4-BD*-Kassette von pRK329 (A) und die *GAL4-AD*-Kassette von pRK296 (B): Polylinker am 3'-Ende der *GAL4*-Domänen erlauben die Konstruktion von Fusionsproteinen.

Integration von PCR-Fragmenten, welche für die zu untersuchenden Proteinen kodieren (Abb. 4). Die *GAL4-AD*-Domäne von pRK296 ist mit einem Haemagglutinin-Epitop (HA-tag) markiert, welches die Detektion des Hybridproteins durch Western-Analyse erlaubt. Alle konstruierten Plasmide wurden im Bereich der Fusionsstelle sequenziert, um sicherzustellen, dass die Fusion im korrekten Leseras-

ter erfolgt war. Zum Test auf Interaktion wurden die Plasmide in Testerstämme transformiert, welche integrierte Gal4-abhängige Reportergene besitzen wie *lacZ*, *HIS3* und *ADE2*, vor deren Promotoren sich *GAL4*-Bindestellen befinden. Die Expression des *HIS3*-Reportergens und des *ADE2*-Reportergens bewirkten Wachstum der Zellen auf Medium ohne Histidin bzw. Adenin, die Expression der  $\beta$ -Galaktosidase vom *lacZ*-Gen erlaubt die exakte Quantifizierung der Interaktionsstärke. Transformanten wurden zunächst unter plasmidselektiven Bedingungen herangezogen und anschließend auf Medien mit und ohne Histidin bzw. Adenin getropft. Als Negativkontrolle dienten Einzeltransformanten oder Transformanten mit den Vektoren, pRK296 bzw. pRK329. Als Positivkontrollen dienten Doppeltransformanten mit den Plasmiden pSE1111 und pSE1112 (Fields und Song, 1989) bzw. pVA3 und pTD1 (Iwabuchi *et al.*, 1993)

Zur Suche nach Ste6-Interaktionspartnern wurden zunächst Teile von Ste6 mit der Gal4-BD fusioniert. Es handelte sich um die Nukleotidbindedomäne (NBD) des ersten „Ste6-repeats“ (Abb. 2, AS 308-608, pRK483) und die D-Box (AS 593-713, pRK333). Außerdem wurde eine Fusion konstruiert, die beide Teile enthält (NBD1-D-Box, AS 308-713, pRK381). Zur Durchführung eines Genbankscreens wurde der Two Hybrid-Testerstamm PJ69-4A mit dem *GAL4-BD*-Plasmid pRK381 und einer Genbank in einem *GAL4-AD*-Vektor transformiert. Es wurden drei Genbanken benutzt: Eine cDNA-Bank im Lambdavektor  $\lambda$  ACT (S.J. Elledge, pers. Mitteilung), eine cDNA-Bank der Firma Clontech (Matchmaker Two Hybrid System) sowie eine Genbank mit chromosomalen DNA-Fragmenten (James *et al.*, 1996). Transformanten, die in der Lage waren, ohne Histidin zu wachsen (Tab. 7), wurden vereinzelt und mit Positiv- und Negativkontrollen verglichen.

Tab. 7: Two Hybrid-Genbankscreens

Genbank	Anzahl der Transformanten	Anzahl der Transformanten mit erhöhter HIS3-Aktivität
Clontech	$\approx 10^6$	18
Elledge	$\approx 10^6$	14
James	$\approx 6 \cdot 10^5$	32

Im Folgenden wurden nur die Genbankplasmide weiter untersucht, die für eine „in frame“-Fusion mit einem offenen Leseraster (ORF) kodieren, die allein, also ohne Gegenwart einer BD-Fusion, keine Aktivierung der Reportergene bewirken und in Verbindung mit einer BD-Ste6-Fusion mindestens zwei Reportergene aktivieren. Die *HIS3*-Kassette erwies sich in Kontrollexperimenten als nur wenig stringent, die



*ADE2*-Kassette dagegen als sehr stringent, d.h. sie ist nur bei sehr starken Interaktionen aktiv. Diese Kriterien wurden von 13 der insgesamt 64 isolierten Genbankplasmide erfüllt. Da die drei positiven Klone der James-Genbank identisch waren, wurden somit 11 verschiedene Plasmide erhalten. Um den Bereich weiter einzugrenzen, der für die beobachtete Interaktion verantwortlich ist, wurden die Genbankplasmide aus den Hefe-Transformanten isoliert und zusammen mit verschiedenen Gal-BD-Fusionsplasmiden in PJ694A retransformiert. Abb. 5 zeigt die Aktivität der Reportergene in Transformanten mit den Genbankplasmiden in Kombination mit den BD-Plasmiden pRK333, pRK381 und pRK483 im Vergleich zu Positiv- und Negativkontrollen. Die Interaktionen sind in Tab. 8 zusammengefasst.

Tab. 8: Reporterogenaktivität mit verschiedenen Genbankplasmiden. Die Genbankplasmide erhielten als Bezeichnung einen Buchstaben je nach verwendeter Genbank (pE, pC bzw. pJ) sowie eine fortlaufende Nummer.

Genbankplasmid	stärkste Interaktion <sup>a</sup>	Aktivität der Reporter-kassetten		
		<i>HIS3</i>	<i>ADE2</i>	LacZ
pJ13	pRK381	++	++	++
pC2	pRK381	++	+	-
pC3	pRK381	++	++	++
pC8	pRK381	++	+	-
pC10	pRK381	++	+	-
pC17	pRK381	++	++	++
pE4	pRK381	++	+	+
pE6	pRK333	++	+	+
pE9	pRK381	++	+	-
pE11	pRK381	++	-	+
pE12	pRK381	++	+	-

<sup>a</sup> Angegeben sind die Reporterogenaktivitäten in Kombination mit dem BD-Plasmid, welches im direkten Vergleich die stärkste Interaktion bewirkte.

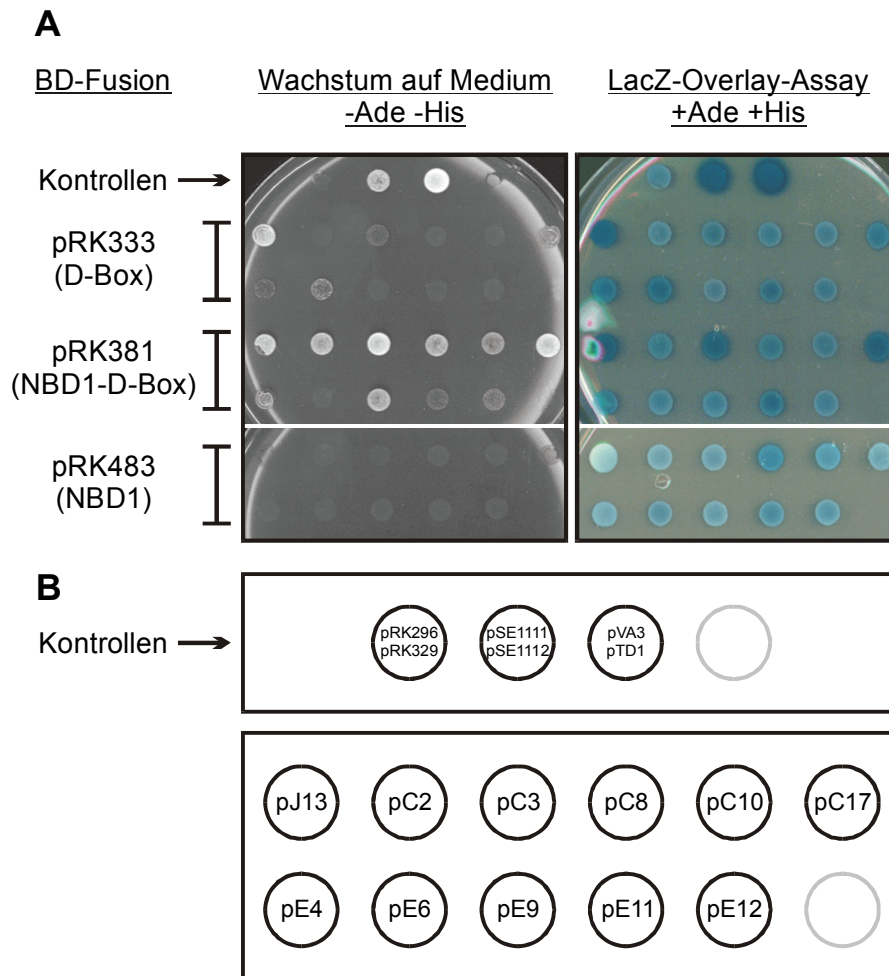


Abb. 5: Two Hybrid-Interaktion zwischen BD-Ste6-Fusionen und Genbankplasmiden. Gleiche Mengen Zellsuspension wurden auf selektive Platten getropft und drei Tage bei 30°C inkubiert. (A) Aktivität der Reporter-kassetten in Kombination mit verschiedenen *BD-STE6*-Fragmenten: *D-Box* (pRK333), *NBD1-D-Box* (pRK381) und *NBD1* (pRK483). Interaktion der Gal4-Hybridproteine vermittelt Wachstum ohne Histidin und Adenin (linke Tafel) und LacZ-Aktivität (rechte Tafel, die Aktivität führt in einem LacZ-Overlay-Assay zur Bildung eines blauen Farbstoffs). (B) Auftragungs-schemata der Kontrollen (obere Reihe) sowie der Transformanten mit Genbankplasmiden. Als Negativkontrolle dienten Transformanten mit Vektoren (pRK296 und pRK329) sowie als Positivkontrolle Transformanten mit den Plasmiden pSE1111 und pSE1112 (Interaktion zwischen Snf1 und Snf4) bzw. pVA3 und pTD1 (Interaktion zwischen T-Antigen und p53).

Auffällig ist hierbei die Beobachtung, dass in Kombination mit pRK483, welches für die BD-NBD1-Fusion kodiert, keine Aktivität der Reportergene zu beobachten ist. Maßgeblich für eine Interaktion mit den genbankkodierten AD-Fusionen ist also die Präsenz der D-Box. Andererseits ist die Interaktion mit der D-Box allein in der Regel schwächer als mit der NBD1-D-Box; Transformanten mit pRK381 liefern die jeweils stärkeren Interaktionen als die Kombination mit pRK333. Gründe hierfür können in der Faltung der Fusionsproteine oder in deren räumlichen Zugänglichkeit liegen. Möglicherweise liegen für die Interaktion mit der D-Box wesentliche Erkennungssequenzen im Bereich der NBD1. Einzige Ausnahme

hierbei ist das Genbankplasmid pE6, welches in Kombination mit der BD-D-Box die stärkste Aktivierung zeigte.

### 3.1.2 Identifizierung der Genbankplasmid-kodierten AD-Fusionen

Zur Identifikation der genbankkodierten Interaktionspartner wurde die an die *GAL4-AD* fusionierte DNA-Sequenz ermittelt und durch eine Datenbanksuche (NCBI Blast search) einem offenen Leserahmen zugeordnet. Die Ergebnisse dieser Suche sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Identifikation der Genbankplasmid-kodierten Gal4-AD-Fusionen. Angegeben ist der jeweils identifizierte ORF mit seiner Gesamtlänge in Aminosäuren und das jeweils erste sequenzierte Codon nach der AD-Domäne.

Genbank-plasmid	ORF	Gesamtlänge	erstes sequenziertes Codon nach Gal4-AD	Beschreibung
pJ13	<i>YFL007w/BLM3</i>	1804 AS	1	Vermittelt Bleomycinresistenz
pC2	<i>SMT4</i>	1034 AS	194	Ähnlichkeit zu Ubiquitin-ähnlicher Protein-Protease
pC3	<i>YNL201c</i>	858 AS	308	Unbekannt, schwache Ähnlichkeit zu <i>RTS1</i>
pC8	<i>RTS1</i>	757 AS	527	B' regulatorische Unter-einheit des PP2A-Komplexes
pC10	<i>PKC1</i>	1151 AS	626	Reguliert MAP-Kinaseweg zur Zellwandintegrität
pC17	<i>YGL211w</i>	193 AS	25	Unbekannt
pE4	<i>STM1</i>	273 AS	1	DNA-bindendes Protein
pE6	<i>GCR3</i>	858 AS	787	Hat eine Funktion beim Splicing
pE9	<i>YDL097c/RPN6</i>	434 AS	181	Bestandteil der regulatorischen (19S)-Unter-einheit des Proteasoms
pE11	<i>YGR168c</i>	376 AS	5	Unbekannt
pE12	<i>SRP54</i>	540 AS	174	Bestandteil des Signalerkennungspartikels

Im Two Hybrid-System gemessene Interaktionen sind nicht unbedingt von physiologischer Relevanz. Für einige Interaktionen ist es sehr unwahrscheinlich, dass sie *in vivo* eine Rolle spielen, so z.B. die Wechselwirkungen mit *Stm1* (ein DNA-bindendes Protein, das im Zellkern lokalisiert sein sollte), mit *Gcr3* (spielt

eine Rolle beim Splicing) oder mit SRP54 (Untereinheit des „signal recognition particle“, das zur Translokation neu-synthetisierter Proteine in das ER gebraucht wird).

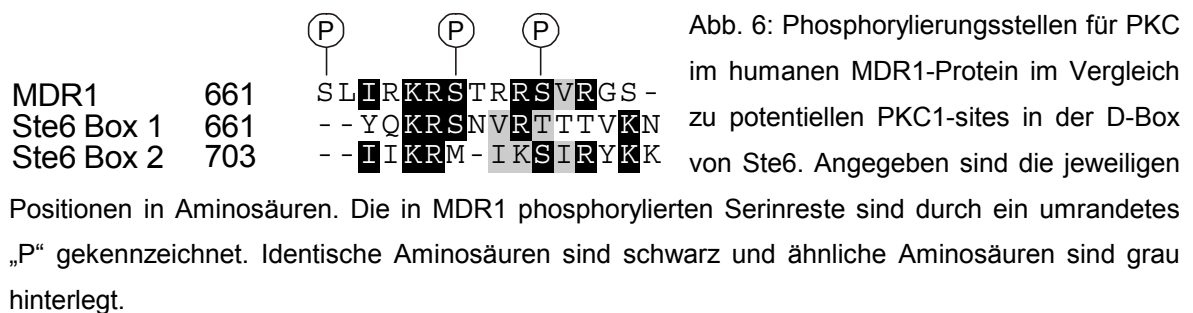
Andere Interaktionspartner könnten von Bedeutung sein. Blm3, das 1803 AS lang ist und 7-10 Transmembrandomänen aufweist, wird der „Major Facilitator“-Familie zugeordnet (Nelissen *et al.*, 1997). Es könnte sich daher um einen Transporter handeln. Mutationen in diesem Gen führen zu einer Hypersensitivität gegenüber Bleomycin, einem DNA-schädigenden Agens (Moore, 1991). Ein weiterer möglicher Interaktionspartner von Ste6 ist Smt4. Dieses Protein zeigt Ähnlichkeit zu Ulp1 (Li und Hochstrasser, 1999), welches Smt3, ein Ubiquitin-ähnliches Protein, aus Protein-Konjugaten abspaltet. Es konnte jedoch keine Interaktion zwischen Ste6 und dem Volllängenprotein Smt4 nachgewiesen werden (Ingrid Schwienhorst, persönliche Mitteilung). Dieses Protein wurde daher nicht weiter untersucht.

Interessant ist die Interaktion von Ste6 mit dem Protein Ynl201c. Über dessen Funktion ist noch nichts bekannt, es zeigt aber eine Ähnlichkeit zu dem Protein Rts1, das ebenfalls als Interaktionspartner von Ste6 identifiziert wurde. Rts1 ist eine Untereinheit der Serin/Threonin-Phosphatase PP2A. Es handelt sich dabei um einen in Eukaryonten hochkonservierten Komplex, der regulatorisch in den Metabolismus, die Replikation, die Translation und den Zellzyklus eingreift. Er besteht aus drei Untereinheiten: Aus einer katalytischen, einer regulatorischen und einer variablen B'-Untereinheit. Bei Rts1, und möglicherweise auch bei Ynl201c, handelt es sich um eine solche B'-Untereinheit, die das Holoenzym zu verschiedenen zellulären Funktionen dirigiert (Stark, 1996; Zhao *et al.*, 1997). Im Falle von Rts1 sind dies regulatorische Aufgaben bei der Expression von Proteinen, die eine Funktion ausüben bei der zellulären Stressantwort (Evangelista *et al.*, 1996). Der isolierte Genbankklon kodiert nur für eine Fusion mit den letzten 230 Aminosäuren des Proteins, die beobachtete Interaktion ist daher mit Vorsicht zu bewerten. Allerdings scheint ein N-terminal verkürztes Protein die meisten Defekte einer *rts1*-Mutante zu supprimieren. Es wird vermutet, dass der C-terminale Teil des Proteins eine Funktion bei der Stressantwort übernimmt, während der N-terminale Teil eine Rolle im Zusammenhang mit der Zellzykluskontrolle spielt (Shu *et al.*, 1997). Die Konstruktion einer Volllängenfusion von *YNL201c* an *GAL4-AD* (pRK495) konnte die mit dem Genbankplasmid erzielte Aktivierung der Reportergene im Two Hybrid-System in Kombination mit *BD-STE6*-Fragmenten nicht reproduzieren. Allerdings lieferte das Plasmid pRK495 in Kombination mit pRK494, welches eine *GAL4-BD-PPH22*-Fusion kodiert, eine schwache Aktivierung aller Reportergene des Testerstamms PJ69-4A (nicht gezeigt); *PPH22* ist eines der Gene von *S. cerevisiae*, das für katalytische

Untereinheiten des PP2A-Komplexes kodiert. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass es sich bei Ynl201c tatsächlich um eine bisher nicht berücksichtigte regulatorische Untereinheit des PP2A-Komplexes handelt.

Im Screen konnten weitere Interaktionspartner von Ste6 identifiziert werden, über deren Funktion nichts bekannt ist, darunter Ygl211w, ein kleines Protein mit einer Größe von 193 AS und Ygr168c. Dieses Protein hat eine Größe von 376 AS, besitzt drei vorhergesagte Transmembrandomänen und zeigt Ähnlichkeit zu einem humanen Peptidrezeptor. Da die Aktivierung der *ADE2*- und LacZ-Reporterkassetten nur schwach ist, wurde dieser Interaktionspartner bei den weiteren Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt. Über das Gen *RPN6* war zum Zeitpunkt des Genbankscreens ebenfalls nichts bekannt. Da im Two Hybrid Assay auch in quantitativen Enzymtests keinerlei Aktivität des lacZ-Repotergens nachzuweisen war, wurde es nicht weiter berücksichtigt. Inzwischen wurde Rpn1 als Bestandteil des regulatorischen Partikels (19S) des Proteasoms identifiziert (Glickman *et al.*, 1998).

Ein weiterer Klon kodiert für eine Fusion mit der C-terminalen Hälfte der Proteinkinase C (*Pkc1*). Dieses Protein reguliert einen MAP-Kinaseweg, der für die Zellintegrität von Bedeutung ist (Ammerer, 1994). Obwohl die im Two Hybrid-System beobachtete Interaktion zwischen Ste6 und *Pkc1* nicht stark war (schwache Aktivität des *ADE2*-Reporters und keine Aktivität des LacZ-Reporters), könnte es sich dabei trotzdem um eine echte Interaktion handeln. Ein indirektes Indiz für eine physiologische Bedeutung liefert das humane MDR1-Protein, das eng mit Ste6 verwandt ist. MDR1 wird durch PKC phosphoryliert, was in Zusammenhang mit der Regulation eines Chloridkanals steht (Fine *et al.*, 1996). Es ist deshalb möglich, dass auch Ste6 von *Pkc1* phosphoryliert wird. Abb. 6 zeigt die Phosphorylierungsstellen von MDR1 im Sequenzvergleich mit zwei Bereichen der D-Box, bei denen es sich möglicherweise ebenfalls um Phosphorylierungsstellen handelt. Aus diesem Grund wurden weitere Experimente zum Einfluss von *Pkc1* auf Ste6 durchgeführt.



### 3.1.3 Einfluss von Pkc1 auf die Funktion und Stabilität von Ste6

#### 3.1.3.1 Two Hybrid-Experimente mit verschiedenen PKC1-Varianten

Die Ergebnisse der Two Hybrid-Genbanksuche sollten unabhängig vom ursprünglich isolierten Genbankplasmid nachvollzogen werden. Dazu stand das Plasmid pGAD-PKC1 zur Verfügung, das für eine *GAL4-AD-PKC1*-Fusion kodiert (J. Heinisch, persönliche Mitteilung). Eine Eigenschaft von Pkc1 kann jedoch die Two Hybrid-Interaktionen mit Substraten beeinflussen: Das Protein besitzt eine Region, die als Pseudosubstrat fungiert und wichtig für die Regulation der Aktivität und die Bindung an das zu phosphorylierende Protein ist. Ein Austausch eines Arginins der Pseudosubstratstelle zu einem Alanin (R398A) führt zu einem hyperaktiven Protein (Watanabe *et al.*, 1994). Im Two Hybrid-System konnte jedoch auch mit dem hyperaktiven Allel von Pkc1 keine Interaktion mit Ste6 gezeigt werden.

#### 3.1.3.2 Einfluss von Pkc1 auf Funktion und Umsatz von Ste6

Wenn Ste6 Pkc1-vermittelt phosphoryliert wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass Ste6 dadurch entweder in seiner Funktion und/oder in seinem Turnover beeinflusst wird. Deshalb sollten die Effekte der hyperaktiven Pkc1-Variante auf das Paarungsverhalten der Hefe sowie auf die Halbwertszeit von Ste6 untersucht werden. Hierzu wurden die Plasmide pRK577 und pRK578 konstruiert, mit deren Hilfe die *PKC1*-Varianten kupferinduziert exprimiert werden können. Es konnte jedoch im Vergleich zu einer Vektorkontrolle kein Effekt auf die Paarungseffizienz von Zellen beobachtet werden, die während der Paarung *PKC1* oder *PKC1 R398A* exprimieren (Daten nicht gezeigt). Zur Bestimmung der Halbwertszeit von Ste6 wurden Gal-Depletion-Experimente durchgeführt: Hierbei wurden die zu testenden Zellen in Galaktose-haltigem Medium für mehrere Generationen angezogen, wobei die Expression von Ste6 über den *GAL1*-Promotor erfolgt. Werden die Zellen in Medium mit 5% Glukose aufgenommen, so wird die Neubildung reprimiert. Wird nun zu verschiedenen Zeitpunkten die jeweils vorhandene Proteinmenge durch eine Western-Analyse bestimmt, so kann auf die Proteinstabilität zurückgeschlossen werden. Dazu wurden die Plasmide pRK577 und pRK578 in den Stamm RKY1039 transformiert, dessen chromosomale *STE6*-Kopie unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors steht. Die Induktion der Pkc1-Varianten erfolgte eine Stunde vor dem Experiment mit 500  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ . Auch aus diesem Experiment ergab sich kein Hinweis auf eine Beeinflussung von Ste6, die Halbwertszeit von Ste6 war in allen Transformanten gleich (Daten nicht gezeigt). Ste6-Mutanten, in denen die potentiellen PKC1-Phosphorylierungsstellen ausgeschaltet sind, zeigten ebenfalls ein unverändertes Paarungsverhalten und eine unveränderte Proteinstabilität.

### 3.1.3.3 Wachstumsdefekt durch Überexpression von PKC R398A

Die starke Überexpression des hyperaktiven Allels von *PKC1*, z.B. durch den *GAL1*-Promotor, bewirkt einen Wachstumsdefekt, dessen Ursache noch unverstanden ist (Watanabe *et al.*, 1994). Die Wachstumseigenschaften von Transformanten mit pBM743-*PKC1*::HA bzw. pBM743-*PKC1*::HA R398A sind in Abb. 7 gezeigt: Auf Platten mit Raffinose als einziger Kohlenstoffquelle, also unter Bedingungen, unter denen der *GAL1*-Promotor nicht induziert ist, zeigen alle Transformanten ein gleiches Wachstumsvermögen (Abb. 7A). Transformanten des Wildtyps zeigen ein deutlich verringertes Wachstumsvermögen, wenn die hyperaktive *PKC1*-Variante auf Galaktose durch Induktion des *GAL1*-Promotors überexprimiert wird (Abb. 7B). Der isogenetische *ste6*-Deletionsstamm RKY1001 vermag jedoch die Expression von *PKC1* R398A zu tolerieren: Auch auf Galaktose wird sein Wachstum nicht beeinträchtigt.

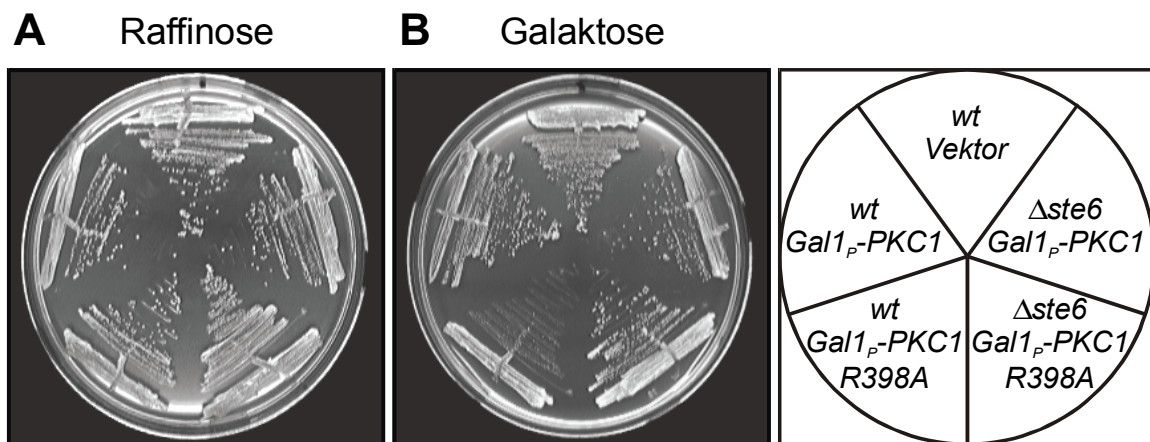


Abb. 7: Wachstumseigenschaften bei Überexpression von *PKC1*-Varianten. JD52 (*wt*) und der isogenetische *ste6*-Deletionsstamm RKY1001 wurden transformiert mit YCplac33 (Vektor), mit pBM743-*PKC1*::HA und pBM743-*PKC1*::HA R398A und ausgestrichen auf Minimalmedium mit (A) Raffinose und (B) Galaktose.

### 3.1.4 Einfluss von *BLM3*, *YNL201c* und *YGL211c* auf *Ste6*

Als mögliche Interaktionspartner von *Ste6* wurden die Proteine *Blm3*, *Ynl201c* und *Ygl211c* identifiziert. Wenn diese Proteine mit *Ste6* interagieren und dabei eine noch unbekannte Funktion ausüben, so sollten die korrespondierenden Deletionsstämme eine Veränderung bezüglich *Ste6*-Umsatz oder Funktion zeigen. Um diese Vorhersage zu testen, wurden die Gene im Ausgangsstamm RKY1001 ( $\Delta ste6::HIS3$ ) disruptiert. Dazu wurden Deletionskassetten konstruiert, in denen der Selektionsmarker *LEU2* von Sequenzen flankiert wird, die oberhalb und unterhalb des zu deletierenden Gens liegen. Durch homologe Rekombination über diese Bereiche kommt es im Genom zu einem Austausch des Leserasters durch den Selektionsmarker. Alle Deletionsstämme erwiesen sich unter Stan-

dardbedingungen als lebensfähig. Zur Durchführung von Paarungsexperimenten wurden die Disruptanten mit pRK278 transformiert (*STE6*-Gen auf Vektor YCplac33). Hierbei zeigte sich bei mehrmaliger Wiederholung des Experiments kein Einfluss der Deletionen auf die Paarungshäufigkeit (Daten nicht gezeigt). Zur Durchführung von Gal-Depletion-Experimenten wurden die Deletionsstämme mit pRK504 (*GAL1<sub>P</sub>-STE6<sub>(c-myc)</sub>*) transformiert. Die Kulturen wurden über Nacht bei 30°C exponentiell in galaktosehaltigem Minimalmedium zur Selektion auf Plasmidherhalt herangezogen. Jeweils gleiche Zellmengen wurden in Medium mit 5% Glukose aufgenommen, was zur Repression des *GAL1*-Promotors führte. In regelmäßigen Abständen wurden gleiche Kulturmengen geerntet und die enthaltene Ste6-Menge durch SDS-PAGE und anschließender Western-Analyse bestimmt (Abb. 8). Die densitometrische Analyse erbrachte keinen Hinweis auf eine Veränderung der Halbwertszeit von Ste6.

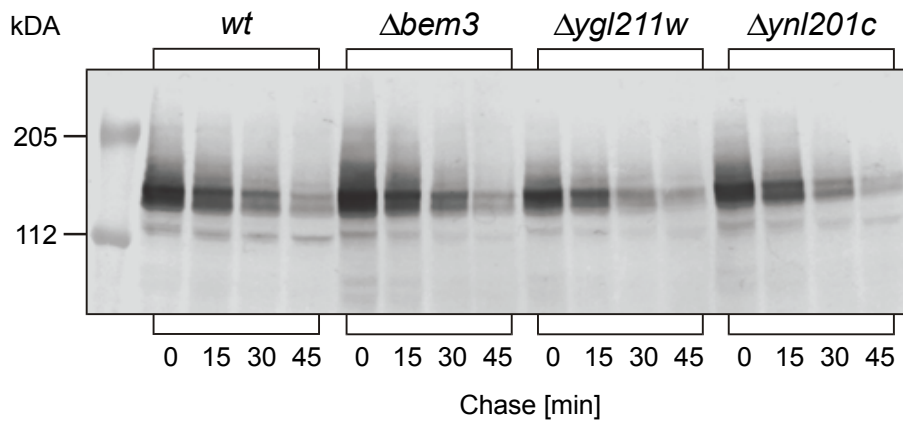


Abb. 8: Stabilität von Ste6 in Deletionsstämmen. Zur Durchführung von Gal-Depletion-Experimenten wurden die Stämme RKY1001 (*wt*), RKY1241 ( $\Delta bem3$ ), RKY1242 ( $\Delta ygl211w$ ) und RKY1243 ( $\Delta ynl201c$ ) mit pRK504 (*GAL1<sub>P</sub>-STE6<sub>(c-myc)</sub>*) transformiert. Die Zellen wurden für mehrere Generationen auf Galaktose herangezogen. Nach Aufnahme der Zellen in Medium mit 5% Glukose wurde äquivalente Mengen in 15minütigen Abstand geerntet und die noch vorhandene Ste6-Menge durch SDS-Page und Western-Blot-Analyse bestimmt. Der Nachweis des Proteins erfolgte mit c-myc-Antikörpern.

### 3.2 Screening nach Mutanten mit erhöhter Ste6-Stabilität

Um Genfunktionen zu identifizieren, die am raschen Transport von Ste6 in die Vakuole beteiligt sind, sollte nach Genen gesucht werden, deren Mutation Ste6 stabilisiert. Ist der Transportweg in die Vakuole blockiert, so sollte die Halbwertszeit von Ste6 verlängert werden, was wiederum zu einem erhöhten „Steady-State-Level“ führt. Da die Proteinmenge aufgrund der Ste6-Aktivität, dem *a*-Faktor-Transport, nur schwerlich zu quantifizieren ist, wurden Reportergene an den C-Terminus von Ste6 fusioniert. Bereits zur Verfügung stand der Mutagene-



sestamm RKY901, dessen chromosomale *STE6*-Kopie mit *E. coli*  $\beta$ -Galactosidase (LacZ) fusioniert ist, deren Aktivität leicht bestimmt werden kann. Das Ste6-LacZ-Fusionsprotein erwies sich als voll funktional in Paarungsexperimenten, und es akkumulierte in einer Endozytosemutante an der Plasmamembran. Dies deutet darauf hin, dass das Protein korrekt zur Zelloberfläche transportiert wird. Tatsächlich konnten, wie Pulse-Chase-Experimente zeigten, eine Reihe von Mutanten mit diesem Stamm isoliert werden, die Ste6 stabilisieren. Das Testsystem zeigte jedoch in der Praxis zwei entscheidende Schwächen, die den Einsatz für einen Screen mit hohem Durchsatz erschwerten: Zum einen war die Eliminierung von falsch-positiven Mutanten zeitaufwendig, weil nur Pulse-Chase-Experimente durchgeführt werden konnten, um die mögliche Ste6-Stabilisierung zu verifizieren. Andererseits war die Identifizierung der betroffenen Gene in den Mutantenstämmen schwierig, da die *STE6-LacZ*-Fusion unter Kontrolle des *MATa*-spezifischen *STE6*-Promotors stand. Wurden die Mutanten mit einer Genbank transformiert, um nach Kolonien mit verringerter LacZ-Aktivität zu suchen, zeigten diejenigen Transformanten die geringste Enzymaktivität, deren Genbankplasmide den *MAT $\alpha$* -Locus enthielten: In diesen Transformanten wird das *STE6-LacZ*-Gen reprimiert.

Ein verbesserter Mutagenesestamm sollte daher die folgenden Anforderungen erfüllen: Der erhöhte Steady-State-Level eines Ste6-Fusionsproteins sollte zu einem verbesserten Wachstum gegenüber dem nicht-stabilisierenden Ausgangsstamm führen. Die Expression des Fusionsproteins sollte dabei unabhängig vom *STE6*-Promotor erfolgen. Der Mutagenesestamm sollte außerdem eine *GAL1<sub>P</sub>-STE6*-Kassette enthalten, damit die Ste6-Halbwertszeitbestimmung auch mit Gal-Depletion-Experimenten als Alternative zu Pulse-Chase-Experimenten erfolgen kann. Damit die unterschiedlich modifizierten Ste6-Proteine bei einem immunologischen Nachweis klar unterscheidbar sind, sollte das *GAL1<sub>P</sub>*-abhängige *STE6*-Allel mit einem c-myc-Epitop markiert werden.

### 3.2.1 Konstruktion eines Mutagenesestammes

Zur Einführung einer *GAL1<sub>P</sub>-STE6*-Kassette am *STE6*-Locus wurde der „URA-Blaster“ pNKY51 verwendet (Alani *et al.*, 1987). Dieser besteht aus dem *URA3*-Gen der Hefe, flankiert von 1,1 kb großen *hisG*-Sequenzen aus *Salmonella*. Wird dieses Konstrukt, flankiert von geeigneten Sequenzen, in Hefe transformiert, so können durch homologe Rekombination stabile Integrianten durch Selektion auf den Ura<sup>+</sup>-Phänotyp isoliert werden. Durch die direkte Wiederholung von *hisG* kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ( $\approx 10^{-4}$ ) Rekombination zwischen diesen Sequenzen erfolgen. Dadurch geht das *URA3*-Gen wieder verloren, und dieser

Selektionsmarker steht für weitere Manipulationen zur Verfügung. Zur Konstruktion des Plasmids pRK378, aus dem die *GAL1<sub>P</sub>-STE6*-Kassette herausgeschnitten werden kann, wurde zunächst ein *GAL1*-Promotorfragment und ein N-terminales *STE6*-Fragment einzeln mit PCR amplifiziert. Als Template für das *STE6*-Fragment wurde ein Plasmid verwendet, das für eine Ste6-Variante kodiert, die ein c-myc-Epitop im ersten extrazellulären Loop trägt (Abb. 2). Da der am Startcodon von *STE6* hybridisierende Primer zusätzlich Sequenzen enthält, die komplementär zum „downstream“-Primer des *GAL1*-Fragments sind, konnten die beiden Fragmente anschließend mit einer „Assembly-PCR“ verknüpft werden (Abb. 9A).

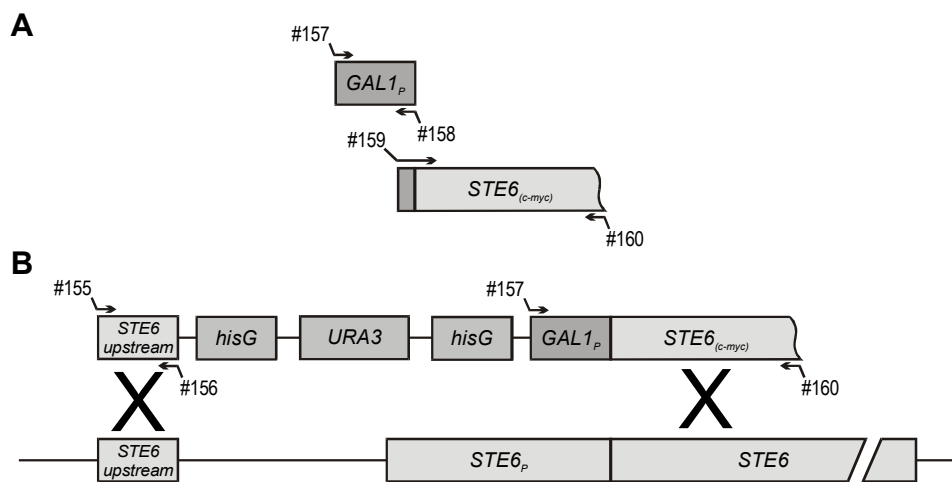


Abb. 9: Konstruktion des Stammes RKY1039. (A) Mit Hilfe einer „Assembly-PCR“ wurden einzeln amplifizierte DNA-Fragmente verknüpft, indem durch Primer #159 homologe Sequenzen zum *GAL1*-Promotorfragment in das *STE6*-Fragment eingeführt wurden. (B) Durch homologe Rekombination mit der Integrationskassette aus pRK378 kann das chromosomale *STE6*-Gen durch eine epitop-markierte Variante, die unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors steht, ersetzt werden. Die *hisG*-Repeats, die den *URA3*-Selektionsmarker flankieren, erlauben dessen nachträglichen Verlust durch Rekombination. Pfeile markieren die Hybridisierungsstellen der verwendeten Primer.

Die Integration der Kasette ins Genom erfolgte durch homologe Rekombination über das Fragment des *STE6*-Leserasters und ein Fragment „upstream“ vom *STE6*-Promotor (Abb. 9B). Die Integrationskassette wurde aus pRK378 herausgeschnitten und in den Stamm JD52 transformiert. Eine Transformante mit der gewünschten Integration der Kasette wurde durch spezifische PCR-Reaktionen identifiziert, außerdem wurde das Expressionsmuster von Ste6 durch Western-Blot-Experimente bestimmt: Ste6 konnte nur in solchen Zellen nachgewiesen werden, die auf Galaktose heranwachsen; dieses Protein konnte sowohl mit anti-Ste6- als auch mit anti-c-myc-Antikörpern nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Auf 5-FOA-haltigen Platten wurde auf den Verlust des *URA3*-Markers selektioniert. Der so erhaltene Stamm erhielt die Bezeichnung RKY1039.

### 3.2.2 Konstruktion von Ste6-Fusionsproteinen

Es sollten Ste6-Fusionsproteine gefunden werden, deren erhöhter Steady-State-Level zu einem verbesserten Wachstumsvermögen führt. Um verschiedene Fusionsproteine testen zu können, wurde das Plasmid pRK328 konstruiert; es dient der Integration von Fusionsproteinen in den chromosomalen *SUC2*-Lokus, womit Kopienzahleffekte, wie sie bei der Verwendung von Plasmiden auftreten können, minimiert werden (Abb. 10). Das unter Kontrolle des *CUP1*-Promotor stehende *STE6*-Gen besitzt am C-Terminus eine singuläre *Sall*-Restriktionsstelle, wodurch die Fusion mit PCR-Fragmenten ermöglicht wird.

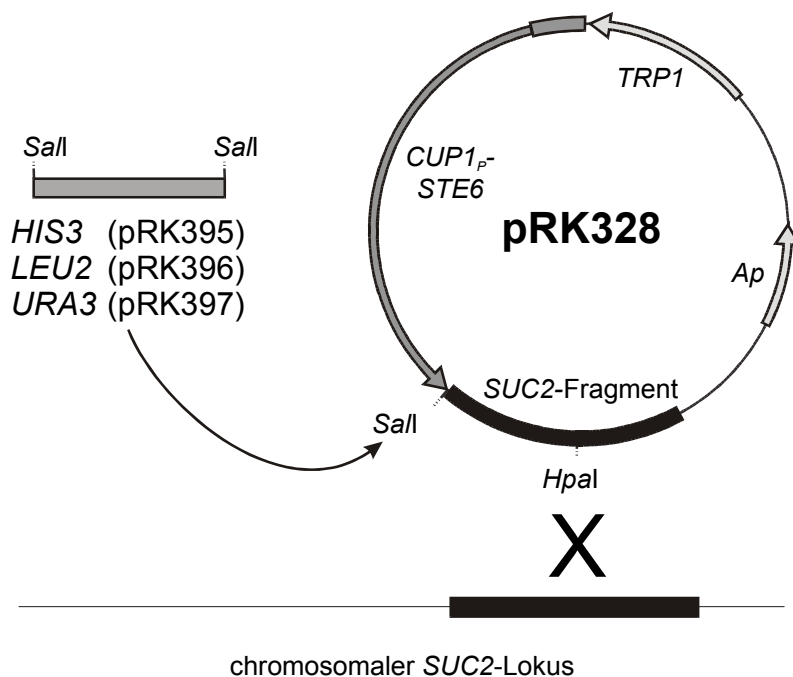


Abb. 10: Integration von *CUP1<sub>P</sub>-STE6*-Fusionsgenen am chromosomalen *SUC2*-Lokus. Hierzu diente das Plasmid pRK328, welches für ein kupferinduzierbares *Ste6*-Gen mit einer *Sall*-Restriktionsstelle am C-Terminus des Gens kodiert. Diese Schnittstelle diente der Konstruktion von Fusionen mit *HIS3* (pRK395), *LEU2* (pRK396) oder *URA3* (pRK397). Eine singuläre *Hpal*-Schnittstelle im *SUC2*-

Fragment der Plasmide erlaubt die Linearisierung vor der Transformation, wodurch die Integration des Plasmids am *SUC2*-Lokus begünstigt wird.

Fusionen mit den Proteinen His3, Leu2 und Ura3 wurden auf ihre Verwendbarkeit hin getestet: Die Fusionsproteine sollten die Auxotrophien entsprechender Deletionsstämme komplementieren und somit das Wachstum in Abwesenheit der entsprechenden Aminosäuren bzw. Basen ermöglichen, wenn der *CUP1*-Promotor stark induziert wird. Eine niedrige Kupferkonzentration könnte dann für einen Screen nach stabilisierenden Bedingungen benutzt werden. Dies traf nur auf die Fusion mit *HIS3* zu. Der auf RKY1039 basierende Stamm mit der am *SUC2*-Lokus integrierten *CUP1<sub>P</sub>-STE6-HIS3*-Kassette erhielt die Bezeichnung RKY1050.

### 3.2.3 Charakterisierung des Ste6-His3-Fusionsproteins

#### 3.2.3.1 Test auf Funktionalität des Fusionsproteins

Notwendige Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz der Ste6-His3-Fusion bei der Suche nach Ste6-stabilisierenden Mutanten ist, dass sich das Fusionsprotein bezüglich Funktion und intrazellulärem Transport wie das Wildtypprotein verhält. Einen ersten Hinweis auf die korrekte Faltung des Fusionsproteins lieferte die Beobachtung, dass der Stamm RKY1050 in Gegenwart von Glukose und 500  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  mit annähernd Wildtypaktivität paart; der Ausgangsstamm RKY1039 paart unter diesen Bedingungen etwa um den Faktor 100 schlechter, da das *GAL1<sub>P</sub>-STE6<sub>(c-myc)</sub>*-Konstrukt in Gegenwart von Glukose nicht exprimiert wird und daher auch kein Ste6 vorhanden ist.

#### 3.2.3.2 Stabilisierung von Ste6-His3 in einer pep4-Mutante

Ste6 wird in *pep4*-Mutanten stabilisiert. Erreicht auch das Fusionsprotein die Vakuole, sollte der „Steady-State-Level“ des Fusionsproteins in dieser Mutante ebenfalls erhöht sein. Um den Steady-State-Level des Fusionsproteins in einem *pep4*-Hintergrund untersuchen zu können, wurde im Stamm RKY1392, der eine ins Genom integrierte *CUP1<sub>P</sub>-STE6-HIS3*-Kassette besitzt (3.2.5.2), *pep4* disruptiert. Die Disruption wurde phänotypisch mit einem Fast-Garnet-Plattentest verifiziert; der Stamm erhielt die Bezeichnung RKY1582. Zellextrakte wurden hergestellt und die Ste6-Menge wurde durch quantitative Western-Blot-Experimente bestimmt (Abb. 11). Deutlich zu erkennen ist die höhere Signalintensität der Ste6-Bande in der *pep4*-Mutante RKY975 gegenüber dem isogenetischen wt-Stamm JD52. Gleiches gilt für das Ste6-His3-Fusionsprotein: Im *pep4*-Stamm RKY1582 ist das Signal deutlich stärker als im ansonsten isogenetischen Stamm RKY1392. Dies kann als Hinweis darauf gewertet werden, dass Ste6-His3 die Vakuole erreicht.

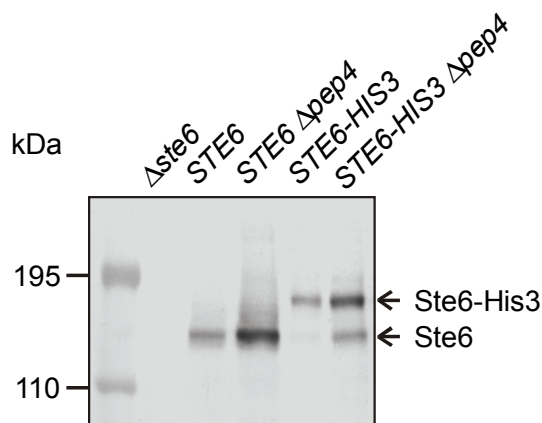


Abb. 11: Western-Analyse zur Bestimmung des Steady-State-Niveaus von Ste6-Varianten im wt- und  $\Delta pep4$ -Zellen. Es wurden jeweils äquivalente Mengen Zellextrakt elektrophoretisch aufgetrennt, der Nachweis von Ste6 erfolgte mit Hilfe von Ste6-Antikörpern. Alle Zellen wuchsen exponentiell in Gegenwart von 300  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  heran. Die eingesetzten Stämme waren RKY1001 ( $\Delta ste6$ ), JD52 (*STE6*), RKY975 (*STE6*  $\Delta pep4$ ), RKY1392 (*CUP1<sub>P</sub>-STE6-HIS3*) und RKY1582 (*CUP1<sub>P</sub>-STE6-HIS3*  $\Delta pep4$ ).

### 3.2.3.3 Vergleich der intrazellulären Lokalisation von Ste6 und Ste6-His3

Zum Vergleich der intrazellulären Lokalisation von Ste6 und Ste6-His3 wurden Fraktionierungsexperimente durchgeführt. Dazu wurde aus Zellen, die über mehrere Generationen exponentiell herangezogen wurden, ein Rohextrakt hergestellt. Dieser wurde mit Sucrosegradienten fraktioniert, und die Fraktionen wurden über SDS-PAGE und Western-Blot-Experimente immunologisch auf die Verteilung von Ste6 und Ste6-His3 hin getestet. Abb. 12A zeigt die Verteilung von Ste6 im Vergleich zu Ste6-His3: Beide zeigen die für Ste6 typische Anhäufung im mittleren Bereich des Gradienten (Kölling und Hollenberg, 1994). Die große Signalstärke der Ste6-Bande rührt von der starken Expressionsrate des *GAL1*-Promotors her, unter dessen Kontrolle das *STE6<sub>(c-myc)</sub>*-Gen steht; die Überproduktion hat jedoch keinen Einfluss auf die Lokalisation.

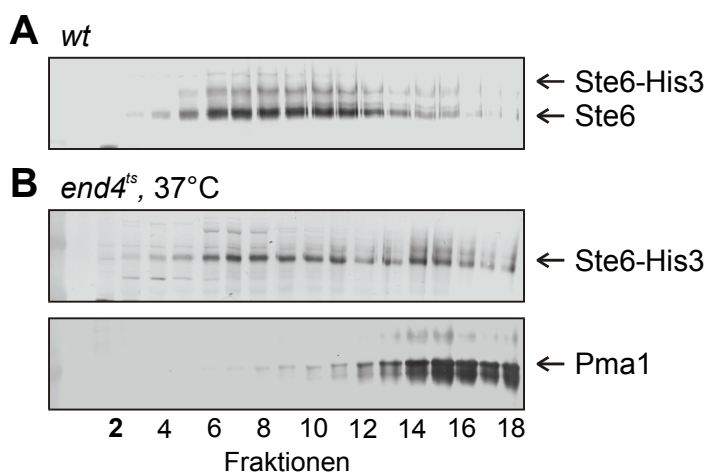


Abb. 12: Fraktionierung von Ste6 und Ste6-His3. Zellextrakte von (A) RKY1050 (wt) und (B) RKY1053 (*end4<sup>ts</sup>*) wurden mit Sucrose-Gradienten fraktioniert (20-50% Sucrose, Fraktion 1: niedrige Dichte). Aliquots der Fraktionen wurden mit Western-Blot-Experimenten analysiert. Die Zellen wuchsen auf galaktosehaltigem Medium heran, Ste6-His3 wurde mit 500  $\mu$ M  $\text{Cu}^{2+}$  induziert. RKY1053 wurde bei 25°C herangezogen und 1 h vor dem Zellaufschluß bei 37°C inkubiert, bevor die Extrakte hergestellt wurden.

In *end4<sup>ts</sup>*-Mutanten akkumuliert Ste6 bei nicht-permissiver Temperatur in ubiquitinerter Form in der Plasmamembran (Kölling und Hollenberg, 1994). Um zu klären, ob sich das Ste6-His3-Fusionsprotein ebenso verhält, wurde der  $\Delta$ *ste6* *end4<sup>ts</sup>*-Stamm RKY1053 konstruiert, der ebenfalls die *STE6-HIS3*-Kassette enthält. Der Stamm wurde bei 25°C herangezogen, und der Block der Endozytose wurde durch eine Inkubation für 1 h bei 37°C etabliert. In Übereinstimmung mit der Verteilung von Ste6 in *end4*-Mutanten ist eine Verschiebung der Ste6-His3-Signale zu den Fraktionen mit höherer Dichte zu beobachten (Abb. 12B, obere Tafel), in denen das Plasmamembranprotein Pma1 nachgewiesen werden kann (Abb. 12B, untere Tafel).

Zusammen mit der Beobachtung, dass das Fusionsprotein voll funktional ist und in *pep4*-Mutanten stabilisiert ist, lässt sich aus diesem Experiment folgern, dass Ste6-His3 dieselben intrazellulären Transportwege wie das Wildtypprotein Ste6 beschreitet und somit alle gestellten Voraussetzungen für die Verwendbarkeit in einem Screen erfüllt.

### 3.2.4 Mutageneseversuche mit RKY1050

Mit dem Stamm RKY1050 wurden mehrere Mutagenesen durchgeführt. Zur Selektion wurden die Zellen auf einem Medium ausgebracht, welches 150  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  enthielt. Bei dieser Kupferkonzentration wies der Stamm RKY1050 kein Wachstum ohne Histidin auf. Zur Mutagenese wurde sowohl EMS verwendet als auch die Transformation mit einer Transposon-Genbank, der „Snyder-Library“. Diese enthält chromosomale Fragmente von *S. cerevisiae* mit einem integrierten bakteriellen Transposon (Snyder *et al.*, 1986). Werden diese Fragmente zur Mutagenese transformiert, so bewirken sie nicht nur die Disruption von Genen, sondern auch die gleichzeitige Markierung mit einer in der Hefe natürlich nicht vorkommenden Nukleotidsequenz. Dies ermöglicht die spezifische Amplifikation der Transposon-markierten DNA-Sequenzen mit einer zweistufigen PCR-Reaktion (ST-PCR), bei der degenerierte Primer zum Einsatz kommen (Chun *et al.*, 1997). Die erhaltenen linearen Reaktionsprodukte können direkt zu einer Sequenzierung herangezogen werden.

Beide Methoden der Mutagenese erbrachten eine hohe Zahl von Kolonien mit einem gesteigerten, kupferabhängigen Wachstumsvermögen. Diese Zellen wuchsen ohne Induktion des *CUP1*-Promotors in Abwesenheit von Histidin nicht, nur in Gegenwart von 150  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$ . Die gesteigerte His3-Aktivität hing also sehr wahrscheinlich mit einem erhöhten Steady-State-Level des kupferinduzierten Ste6-His3-Proteins zusammen. Die durchgeführten Gal-Depletion-Experimente zeigten jedoch, dass nur rund 10% dieser Zellen Ste6 tatsächlich stabilisierten. Kontrollexperimente zeigten, dass der Stamm RKY1050 unter bestimmten Bedingungen falsch-positive Kolonien mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu  $5 \times 10^{-4}$  hervorbringt; diese Rate liegt weit über der natürlichen Mutationsrate. Ihr Auftreten wurde vor allem durch die Transformationsprozedur gefördert. Dieses Phänomen erschwerte außerdem die Identifikation der betroffenen Gene von Ste6-stabilisierenden Mutanten, die mit EMS-Mutagenese erhalten wurden, da dazu die Transformation mit einer Genbank notwendig ist.

Mit Hilfe von spezifischen PCR-Reaktionen konnte nachgewiesen werden, dass die *CUP1<sub>P</sub>-STE6-HIS3*-Kassette bereits im Ausgangsstamm RKY1050 mindestens verdoppelt vorliegt. Die Verdopplung wird durch die Integration ins Genom

ermöglicht, bei der flankierende „direct repeats“ entstehen (Abb. 10). Die Entstehung von „Falsch-positiven“ beruht also sehr wahrscheinlich auf einem Gendosiseffekt durch Amplifikation der Reporter-kassette. Die Verwendung der „Snyder-Library“ erwies sich ebenfalls als problematisch. Zwar konnten die Insertionsstellen der Transposon-markierten Genbankfragmente oftmals durch ST-PCR identifiziert werden, häufig war die Integration jedoch in endogene 2 $\mu$ -DNA erfolgt. Dies machte die Konstruktion eines neuen Mutagenesestammes notwendig, bei dem keine Amplifikation der Reporter-kassette mehr erfolgen kann und der keine endogene 2 $\mu$ -DNA mehr enthält.

### **3.2.5 Konstruktion eines verbesserten Mutagenesestammes**

#### **3.2.5.1 „Curing“ von endogenem 2 $\mu$ -Plasmid**

Zur Eliminierung endogener 2 $\mu$ -Plasmide wurde das 2 $\mu$ -Plasmid pJD $\mu$ P-15.2 eingesetzt. Dieses Plasmid enthält einen *URA3*-Selektionsmarker sowie ein *LEU2d*-Allel. Dieses Allel besitzt einen stark verkürzten Promotor, wodurch die Expression des Gens stark herabgesetzt wird. Bei der Selektion auf leucinfreiem Minimalmedium erfolgt deshalb die Amplifikation des Plasmids, wodurch endogene 2 $\mu$ -Plasmide verdrängt werden können. Der *URA3*-Marker erlaubt anschließend die Selektion auf Verlust des eingesetzten Plasmids auf 5-FOA-haltigem Medium.

Transformanten von RKY1039 mit pJD $\mu$ P-15.2 wurden dreimal in Folge in Minimalmedium ohne Leucin und Uracil herangezogen und anschließend auf Vollmedium vereinzelt. Nach Ausstrich auf 5-FOA erfolgte der Nachweis eventuell zurückgebliebener 2 $\mu$ -Sequenzen per PCR. Zeigten die Transformanten kein spezifisches PCR-Produkt, so wurden sie mit einem 2 $\mu$ -Vektor transformiert, und die spontane Plasmidverlustrate wurde abgeschätzt: Da die Standardvektoren endogene 2 $\mu$ -Funktionen *in trans* zur stabilen Replikation benötigen, ist die Verlustrate in Zellen ohne endogenes 2 $\mu$  besonders hoch. Der so erhaltene Stamm (*circle*<sup>0</sup>) erhielt die Bezeichnung RKY1285.

#### **3.2.5.2 Stabile Integration von CUP1<sub>p</sub>-STE6-HIS3 in SUC2**

Für eine alternative Integrationsstrategie der *STE6-HIS3*-Kassette, bei der keine „direct repeats“ entstehen können, wurde ein „one-step gene replacement“ gewählt, basierend auf der Disruptionskassette des Vektors pFA6-kanMX4 (Wach *et al.*, 1994). Diese Kassette ermöglicht die Selektion von Transformanten durch Resistenz gegen Geneticin (G418). Die Integration erfolgt durch homologe Rekombination mit *SUC2*-Sequenzen (Abb. 13). Das Integrationsplasmid erhielt die Bezeichnung pRK582, die Integration erfolgte in den Stämmen RKY1039

(circle<sup>+</sup>) und RKY1285 (circle<sup>0</sup>), die Mutagenesestämme erhielten die Bezeichnung RKY1392 bzw. RKY1393.

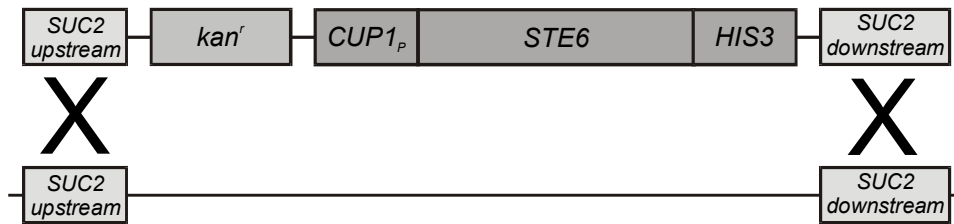


Abb. 13: Die Integrationskassette aus pRK582 erlaubt die Integration einer *CUP1<sub>p</sub>-STE6-HIS3*-Kassette durch homologe Rekombination in den *SUC2*-Lokus. Durch das „one-step gene replacement“ wird dabei die Bildung von rekombinogenen „direct repeats“ vermieden. Zur Selektion auf das Integrationsereignis dient das Kanamycinresistenzgen *kan<sup>r</sup>*.

### 3.2.5.3 Wachstumsvergleich der Mutagenesestämme

Vor der Durchführung eines neuen Genbankscreens wurde die Wachstumsfähigkeit beider Mutagenesestämme, RKY1050 und RKY1392, in Abhängigkeit von Histidin und Kupferzugabe verglichen. Da *Ste6* in *pep4*-Mutanten bis zu zehnfach stabilisiert wird, wurde außerdem der zu RKY1392 isogene *pep4*-Deletionsstamm RKY1582 konstruiert und ebenfalls für den Vergleich herangezogen.

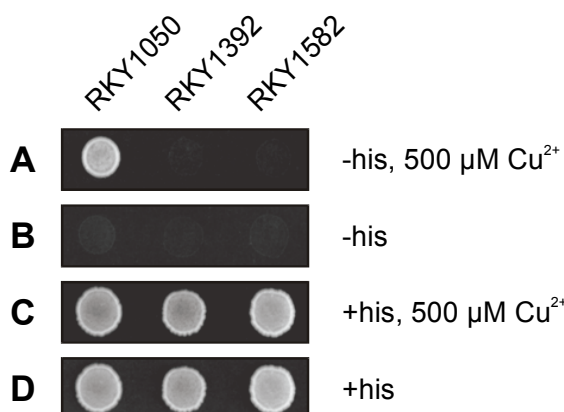


Abb. 14: His3-Aktivität in den Mutagenesestämmen RKY1050 und RKY1392 sowie in RKY1582 (RKY1392  $\Delta pep4$ ) Gleiche Zellmengen wurden auf Minimalmedium mit verschiedenen Supplementen (benötigte Nährstoffe  $\pm$  Histidin und  $\pm$  0,5 mM  $\text{CuSO}_4$ ) getropft. Platten mit Histidin wurden drei Tage und Platten ohne Histidin vier Tage bei 30°C inkubiert.

Wie aus Abb. 14 ersichtlich ist, wachsen alle Stämme in Gegenwart von Histidin gut (Abb. 14D); die zusätzliche Zugabe von 0,5 mM  $\text{Cu}^{2+}$  schränkt das Wachstumsvermögen der Zellen kaum ein (Abb. 14C). Fehlen sowohl Histidin als auch Kupfer, ist keine His3-Aktivität vorhanden: Die Zellen wachsen nicht (Abb. 14B). Auffällig ist das unterschiedliche Wachstumsvermögen der Mutagenesestämme auf Medium ohne Histidin bei Zugabe von 0,5 mM  $\text{Cu}^{2+}$ : Während RKY1050 unter diesen Bedingungen gut wächst, scheint die His3-Aktivität von RKY1392 dazu nicht auszureichen (Abb. 14A). In quantitativen Western-Blot-Experimenten konnte gezeigt werden, dass bei Zugabe jeweils gleicher Kupfermengen der „Steady-State-Level“ des Fusionproteins in RKY1050 generell größer ist als in



RKY1392. Ursache hierfür ist möglicherweise die Amplifikation der Reporterkas-  
sette in RKY1050.

Obwohl der *pep4*-Deletionsstamm RKY1582 im Vergleich mit dem kongenen  
Wildtypstamm RKY1392 deutlich mehr Fusionsprotein anhäuft (Abb. 11), weist er  
trotzdem kein erhöhtes Wachstumsvermögen auf (Abb. 14A). Der His3-Anteil des  
Hybridproteins, der an den C-Terminus von Ste6 fusioniert ist, sollte nach dem  
topologischen Modell von Ste6 (Abb. 2) zum Zytoplasma hin orientiert sein und  
kann dort die Auxotrophie des *his3*-Stammes komplementieren. In einer *pep4*-  
Mutante häuft sich Ste6 jedoch in der Vakuole an (Kölling und Hollenberg, 1994),  
wodurch der His3-Anteil keinen Kontakt mehr mit dem Zytoplasma hat und  
demzufolge keine His3-Aktivität vermitteln kann. Wird die Ste6-His3-Fusion für  
eine Suche nach Ste6-stabilisierenden Mutanten benutzt, so können also keine  
Funktionen erwartet werden, deren Einfluss auf die Ste6-Stabilität einzig auf einer  
Veränderung der proteolytischen Aktivität der Vakuole beruht.

### 3.2.6 Mutagenese von RKY1393

Da der Stamm RKY1393 (*circle*<sup>0</sup>) erwartungsgemäß keine falsch-positiven  
Mutantenstämme hervorbrachte, konnte er für eine Mutagenese eingesetzt  
werden. Dazu erfolgte die Transformation mit der „Snyder-Library“. Die Selektion  
erfolgte auf Medium ohne Leucin (die Transposon-markierten Fragmente der  
Library enthalten einen *LEU2*-Selektionsmarker) und ohne Histidin in Gegenwart  
von 500 µM CuSO<sub>4</sub> zur Induktion des *STE6-HIS3*-Reportergens. Von insgesamt  
rund 20 000 Transformanten zeigten nach mehrmaliger Vereinzelnung insgesamt  
19 Deletionsstämme eine deutlich verbesserte His3-Aktivität (Abb. 15): Das  
Wachstum der Transformanten auf Platten ohne Histidin war eindeutig kupferab-  
hängig, d.h. die Transformanten wuchsen nur, wenn Kupfer zugegeben wurde.  
Dabei war das Wachstumsvermögen der Transformanten gegenüber der Negativ-  
kontrolle (RKY1392 mit YEplac181) deutlich verbessert, was sich besonders  
deutlich bei längerer Inkubation zeigte (Abb. 15D). Als Positivkontrolle diente in  
diesem Versuch RKY1392 mit dem 2µ-*VPS4*-Plasmid pRK567, welches einen  
stabilisierenden Effekt auf Ste6 ausübt (3.3).

Mit Hilfe der ST-PCR konnte bereits für einige Stämme der Integrationsort der  
Transposon-markierten Snyder-Kassette bestimmt werden (Tab. 10). So wurde  
z.B. vom Stamm RKY1393-S8, der eine mit der Positivkontrolle vergleichbare  
His3-Aktivität zeigt, ein spezifisches ST-PCR-Produkt sequenziert. In diesem  
Stamm erfolgte die Integration der Transposon-markierten Genbankkassette in  
das Gen *YOR343c*, über dessen Funktion bislang nichts bekannt ist. Es kodiert  
für ein kleines, hydrophobes Protein von 108 AS ohne Sequenzähnlichkeiten zu

bekanntenen Proteinen. In der Mutante 1393-S7, die ebenfalls eine hohe His3-Aktivität aufweist, ist das Gen *SNX4* (*YJL036w*) disruptiert. Es kodiert für ein mutmaßliches „sorting nexin“ und weist Homologien zu den humanen Genen *SNX1*, 2 und 4 auf (Haft *et al.*, 1998). Verwandte Proteine in *S. cerevisiae* sind *Mvp1* und *Vps5*, die beide für den Transport von CPY zur Vakuole benötigt werden (Ekena und Stevens, 1995; Horazdovsky *et al.*, 1997) und *Grd19*, das eine Rolle beim Rücktransport von Golgiproteinen aus dem prävakuolären Kompartiment spielt (Voos und Stevens, 1998). Über die Funktion von *Snx4* in Hefe ist noch nichts bekannt.

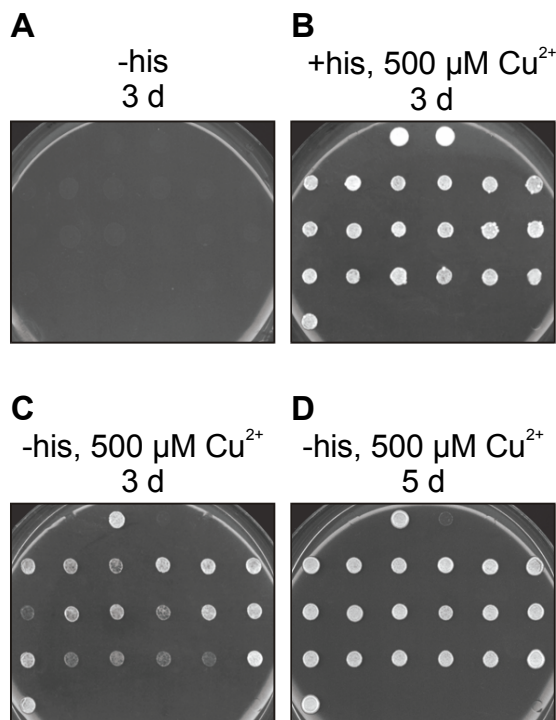


Abb. 15: Erhöhte His3-Aktivität in Snyder-Library-Transformanten. Jeweils gleiche Zellmengen wurden auf SM-Agarplatten mit verschiedenen Supplementen getropft (benötigte Nährstoffe,  $\pm$  Histidin,  $\pm$  Kupfersulfat) und 3 bzw. 5 Tage bei 30°C inkubiert. In der oberen Reihe links wurden als Positivkontrolle RKY1392 mit dem  $2\mu$ -*VPS4*-Plasmid pRK567 sowie oben rechts als Negativkontrolle RKY1392 mit dem Vektor YEplac181 aufgebracht. Bei den Transformanten handelt es sich um (ab der 2. Reihe, von links oben nach rechts unten) RKY1393-S1, -S2, -S3, -S5, -S7, -S8, -S9, -S10, -S11, -S15, -S17, -S19, -S20, -S22, -S24, -S27, -S30, -S31 und -S33.

Tab. 10: Transformanten der „Snyder-Library“ mit erhöhter His3-Aktivität.

Transformante	His3-Aktivität	spezifisches ST-PCR-Produkt <sup>a</sup>
S1	++	Vektorsequenzen
S2	++	n.d.
S3	+	$2\mu$ , <i>PPH22</i>
S5	+++	n.d.
S7	+++	<i>SNX4</i>
S8	+++	<i>YOR343c</i>
S9	+	n.d.
S10	++	+
S11	++	$2\mu$
S15	+	+

S17	+++	+
S19	+++	n.d.
S20	++	+
S22	+	+
S24	+	+
S27	+	+
S30	+	+
S31	+++	n.d.
S33	++	+

<sup>a</sup> n.d. = nicht detektierbar; + = spezifisches ST-PCR-Produkt wurde erhalten, aber noch nicht sequenziert

### 3.3 Identifizierung von Genfunktionen, die bei Überproduktion Ste6 stabilisieren

Nicht nur der Verlust von Proteinen kann zu einer Blockade des Ste6-Transports führen, sondern auch deren Überexpression. Mit einem solchen Screen könnten Komponenten von multimeren Proteinkomplexen isoliert werden, da Komplexe sensitiv auf die Veränderung der Stöchiometrie ihrer Komponenten reagieren. So kann z.B. die Überproduktion eines Bestandteils die Komplexbildung behindern, indem Bindungspartner weggefangen werden.

Um solche Funktionen zu suchen, wurde eine auf dem „multy copy“-Plasmid YEp13 basierende Genbank eingesetzt (Yoshihisa und Anraku, 1989) und in die Reporterstämme RKY901 (*STE6-lacZ* unter Kontrolle des *STE6*-Promotors) und RKY1050 (*STE6-HIS3* unter Kontrolle des *CUP1*-Promotors) transformiert. Transformanten von RKY901 wurden auf Nitrozellulosemembranen übertragen und durch Inkubation mit X-Gal auf LacZ-Aktivität hin untersucht. X-Gal wird durch die Enzymaktivität in einen blauen Farbstoff umgesetzt. Von rund 25 000 Transformanten mit einer gelb-grünen Färbung im LacZ-Filtertest wurden von 16 verschiedenen Transformanten Plasmide isoliert, die auch nach Retransformation eine stärkere Blaufärbung hervorriefen. Transformanten von RKY1050 wurden auf ein verbessertes Wachstumsvermögen auf Medium ohne Histidin mit 150 µM CuSO<sub>4</sub> hin selektioniert. Obwohl der Stamm zur Bildung von falsch-positiven Kolonien neigt (3.2.4), konnten von insgesamt 50 000 Transformanten drei Plasmide isoliert werden, die dem Testerstamm auch nach Retransformation ein erhöhtes Wachstumsvermögen vermittelten.

Alle Genbankplasmide wurden einer Restriktionsanalyse zur Identifikation mehrfach isolierter, aber identischer Plasmide unterzogen. Unterschiedliche Plasmide wurden zur Bestimmung der plasmidkodierten Funktionen ansequenziert. Die Ergebnisse sind in Tab. 11 zusammengefasst. Von insgesamt 19 isolierten Plasmiden wiesen sechs das Gen *STE5* auf. Da bekannt ist, dass die Überproduktion von Ste5 zu einer Induktion des Signalweges zur Pheromonantwort führt (Akada *et al.*, 1996) und da die Expression von *STE6* erhöht wird durch Pheromongabe (Erdman *et al.*, 1998), ist die erhöhte Ste6-lacZ-Aktivität in diesem Fall sehr wahrscheinlich durch eine Induktion des *STE6*-Promotors bedingt. *STE5* wurde deshalb im Folgenden nicht weiter berücksichtigt.

Tab. 11: Übersicht der isolierten YEp13-Genbankplasmide.

Genbankplasmid	Testerstamm	separate Isolationen	enthaltene Gene
YEp13-I 2.2	RKY901	1×	<i>YGR068w, YGR069w</i>
YEp13-I 8	RKY901	2×	<i>BMH2, YDR100w, YDR101c, YDR102c, STE5</i>
YEp13-I 9	RKY901	2×	<i>YDR485c, YDR486c/MOS1, RIB3</i>
YEp13-I 16	RKY901	2×	<i>YDR100w, YDR101c, YDR102c, STE5</i>
YEp13-I 24	RKY901	3×	<i>SNF7, YLR024c</i>
YEp13-I 26	RKY901	1×	<i>SNF7, YLR024c</i>
YEp13-I 27	RKY901	1×	<i>YDR100w, YDR101c, YDR102c, STE5</i>
YEp13-I 28	RKY901	1×	<i>BMH2, YDR100w, YDR101c, YDR102c, STE5</i>
YEp13-I 29	RKY901	1×	<i>FBP26, VPS35, INO1, YJL151c, YJL152w, YJL150w, YJL149w</i>
YEp13-I 30	RKY1050	2×	<i>YPR172w, VPS4, YPR174c</i>
YEp13-I 32	RKY901	1×	<i>SNF7</i>
YEp13-I 44	RKY901	1×	<i>YPR172w, VPS4, YPR174c</i>
YEp13-I 53	RKY1050	1×	<i>YPR172w, VPS4, YPR174c</i>

Die übrigen Leserahmen, die verantwortlich für die erhöhte Ste6-lacZ- bzw. Ste6-His3-Aktivität waren, wurden durch Subklonierung identifiziert. Dazu wurden basierend auf dem 2 $\mu$ -Vektor YEp13lac181 Plasmide erstellt, die jeweils nur einen ORF enthielten. Diese wurden in die Testerstämme RKY1392 (*STE6-HIS3*) und RKY901 (*STE6-LacZ*) zur Bestimmung der jeweiligen Fusionsproteinaktivität transformiert. So konnten die Gene *VPS4*, *YGR069w*, *SNF7*, *VPS35* und *YDR486c* identifiziert werden, die gegenüber der Vektorkontrolle bei Überexpres-

sion zu einer erhöhten LacZ-Aktivität im Testerstamm RKY901 führten (Abb. 16B). Besonders hoch war die Aktivität in Transformanten mit  $2\mu$ -*VPS4*,  $2\mu$ -*SNF7* und  $2\mu$ -*YDR486c*. Transformanten von RKY1392 zeigten eine erhöhte His3-Aktivität im Vergleich mit der Vektorkontrolle (Abb. 16B) mit Ausnahme von  $2\mu$ -*YGR069w* (Abb. 16A).

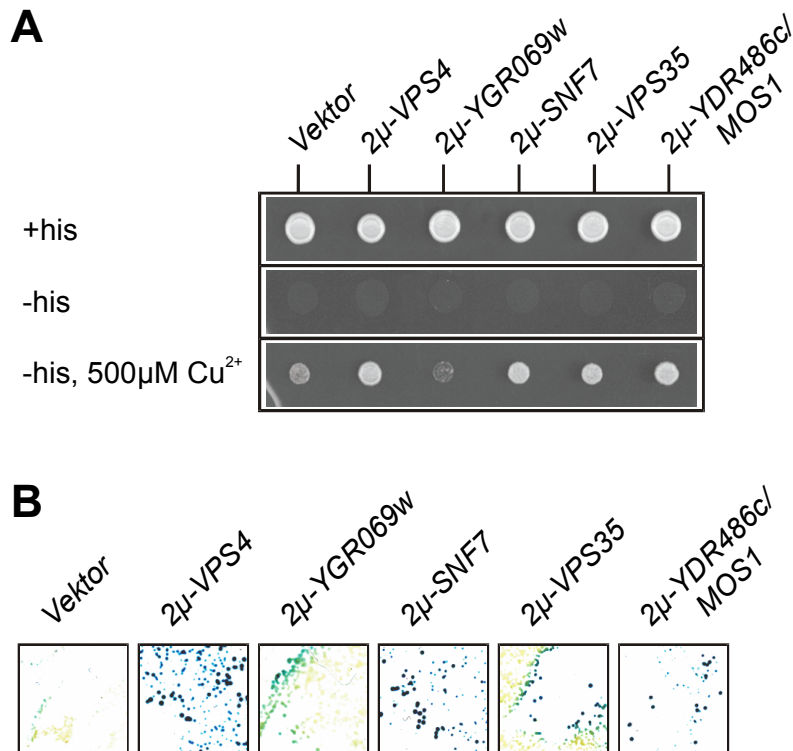


Abb. 16: Erhöhte Aktivität von Ste6-Fusionsproteinen durch Überproduktion von Genprodukten. (A) Der Testerstamm RKY1392 wurde mit  $2\mu$ -Plasmiden transformiert, die verschiedene Gene tragen. Transformanten wurden auf Minimalmedium getropft (mit den benötigten Nährstoffen,  $\pm$  Histidin und Kupfer wie angegeben) und vier Tage bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. Ste6-His3-Aktivität führt zu einem von der Kupferzugabe abhängigen Wachstum auf Medium ohne Histidin (untere Tafel). (B) Der

Testerstamm RKY901 (*STE6-LacZ*) wurde mit den gleichen  $2\mu$ -Plasmiden transformiert, und die LacZ-Aktivität wurde mit einem LacZ-Filtertest bestimmt: Erhöhte Aktivität führt zur Bildung eines blauen Farbstoffs. Die verwendeten Plasmide waren YEplac181 (Vektor), pRK567 ( $2\mu$ -*VPS4*), pRK584 ( $2\mu$ -*YGR069w*), pRK 585 ( $2\mu$ -*SNF7*), pRK586 ( $2\mu$ -*VPS35*) und pRK587 ( $2\mu$ -*YDR486c*).

Ein erhöhter Steady-State-Level der Ste6-Fusionsproteine kann entweder durch eine erhöhte Expression oder durch einen verlangsamten Abbau hervorgerufen werden. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde die Halbwertszeit von Ste6 mit Pulse-Chase-Experimenten bestimmt. Hierzu wurde der Wildtypstamm JD52 mit den identifizierten Genen auf multi-copy-Plasmiden transformiert. Die Zellen wurden über Nacht exponentiell in Minimalmedium herangezogen und 15 Minuten mit [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin radioaktiv markiert („pulse“). Nach Zugabe eines Überschusses an nicht-radioaktivem Methionin („chase“) wurden in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und durch Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Autoradiographie auf die Anwesenheit von Ste6 hin untersucht. Wie bereits beschrieben (Kölling und Hollenberg, 1994), wurde mit der Vektorkontrolle eine sehr kurze Halbwertszeit von 13 Minuten beobachtet (Abb. 17A). Überexpression von *VPS4* (Abb. 17B), *SNF7* (Abb. 17D) oder *YDR486c*

(Abb. 17F) stabilisiert Ste6 etwa 2-5fach. Transformanten mit  $2\mu$ -*VPS35* zeigten keine signifikante Stabilisierung von Ste6 (Abb. 17E). Es scheint jedoch ein sehr starker Selektionsdruck gegen eine hohe Kopienzahl des Plasmids zu bestehen: Ein wiederholtes Ausstreichen führte zu einer deutlichen Verringerung der LacZ-Aktivität im Filtertest von Transformanten des Stammes RKY901. Gute Ergebnisse konnten nur mit frischen Transformanten erreicht werden. In Transformanten von RKY1392 wird hingegen auf eine hohe Kopienzahl selektioniert, wenn die His3-Aktivität des Reporterproteins limitierend für das Wachstum ist. Keinen Einfluss auf die Ste6-Halbwertszeit hat die Überexpression von *YGR069w* (Abb. 17C). Da Transformanten des Testerstamms RKY1392 keine erhöhte His3-Aktivität aufwiesen, der Testerstamm RKY901 aber eine höhere LacZ-Aktivität, könnte der erhöhte Steady-State-Level auf einer erhöhten Expression durch den *STE6*-Promotor beruhen. Die Funktion von *YGR069w* wurde deshalb nicht näher untersucht.

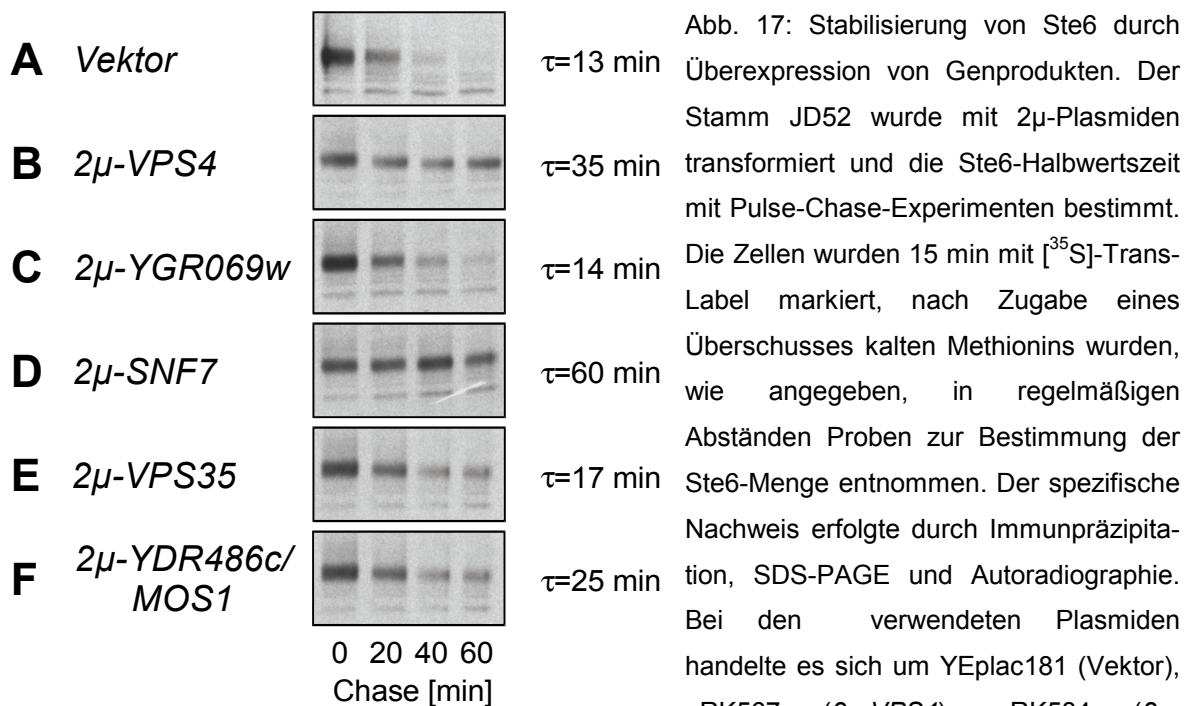


Abb. 17: Stabilisierung von Ste6 durch Überexpression von Genprodukten. Der Stamm JD52 wurde mit  $2\mu$ -Plasmiden transformiert und die Ste6-Halbwertszeit mit Pulse-Chase-Experimenten bestimmt. Die Zellen wurden 15 min mit [ $^{35}$ S]-Trans-Label markiert, nach Zugabe eines Überschusses kalten Methionins wurden, wie angegeben, in regelmäßigen Abständen Proben zur Bestimmung der Ste6-Menge entnommen. Der spezifische Nachweis erfolgte durch Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Autoradiographie. Bei den verwendeten Plasmiden handelte es sich um YEplac181 (Vektor), pRK567 ( $2\mu$ -*VPS4*), pRK584 ( $2\mu$ -*YGR069w*), pRK585 ( $2\mu$ -*SNF7*), pRK586 ( $2\mu$ -*VPS35*) und pRK587 ( $2\mu$ -*YDR486c*). Die Signalintensitäten wurden densitometrisch quantifiziert, die daraus berechneten Halbwertszeiten von Ste6 sind auf der linken Seite der Abbildung angegeben.

Für drei der ursprünglich sechs isolierten Gene, *VPS4*, *SNF7/VPS32* und *VPS35* (Babst *et al.*, 1998; Seaman *et al.*, 1998), ist eine Funktion im intrazellulären Transport zur Vakuole bekannt. Zusätzlich zu den bekannten Genen konnte ein bislang uncharakterisiertes Gen isoliert werden, *YDR486c*, welches den Namen *MOS1* erhielt (für „more of Ste6“).

### 3.4 Charakterisierung einer am späten Endosom wirkenden Proteinfamilie

#### 3.4.1 Stabilisierung von Ste6 in *vps4*-, *snf7*-, *mos1*- und *mos2*-Stämmen

Die weiteren Experimente hatten zum Ziel, die Funktionen von Snf7, Vps4 und Mos1 beim Transport von Ste6 zu charakterisieren. Um die Effekte auf den Umsatz von Ste6 bei Verlust dieser Genfunktionen zu untersuchen, wurden ansonsten isogenetische Deletionsstämme konstruiert; alle Deletionsmutanten erwiesen sich als lebensfähig unter Standardbedingungen (Abb. 20). Die Halbwertszeit von Ste6 in den Mutantenstämmen wurde mit Pulse-Chase-Experimenten bestimmt. Wie in Abb. 18 ersichtlich, ist Ste6 in  $\Delta mos1$ - und  $\Delta vps4$ -Zellen rund zehnfach stabilisiert ( $\tau \approx 100$  min), der  $\Delta snf7$ -Stamm stabilisiert Ste6 etwa fünffach ( $\tau = 49$  min). Diese Experimente zeigen, dass nicht nur die Überproduktion dieser Gene Ste6 stabilisieren, sondern auch deren Deletion.

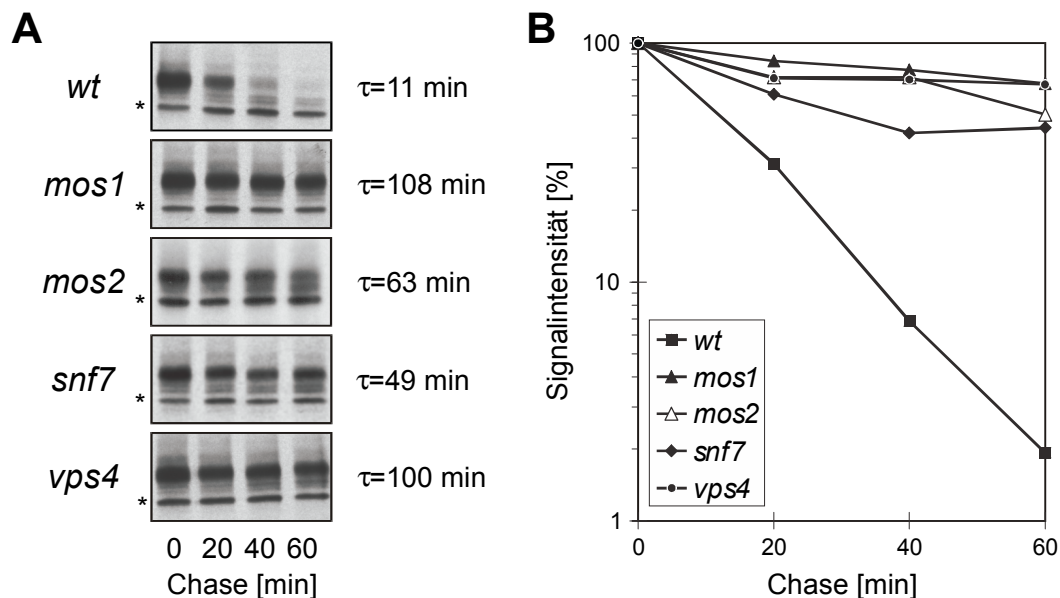


Abb. 18: Ste6-Stabilität in Deletionsstämmen. (A) Die Halbwertszeit von Ste6 wurde in einem Wildtyp- und in diversen Deletionsstämmen mit Pulse-Chase-Experimenten bestimmt. Die Zellen wurden mit radioaktiv markiertem Methionin für 15 Minuten markiert, ein Überschuss an nicht-radioaktiven Methionin wurde zugegeben. Danach wurden in den angegebenen Abständen Proben entnommen. Der spezifische Nachweis von Ste6 erfolgte durch Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Autoradiographie. Verwendet wurden die Stämme (von oben nach unten): JD52 (*wildtyp*), RKY1509 ( $\Delta mos1$ ), RKY1590 ( $\Delta mos2$ ), RKY1510 ( $\Delta snf7$ ) und RKY1511 ( $\Delta vps4$ ). Eine unspezifische Hintergrundbande ist mit einem Stern markiert. (B) Halblogarithmische Auftragung der densitometrisch quantifizierten Signalstärken. Die daraus kalkulierten Halbwertszeiten sind in (A) gezeigt.



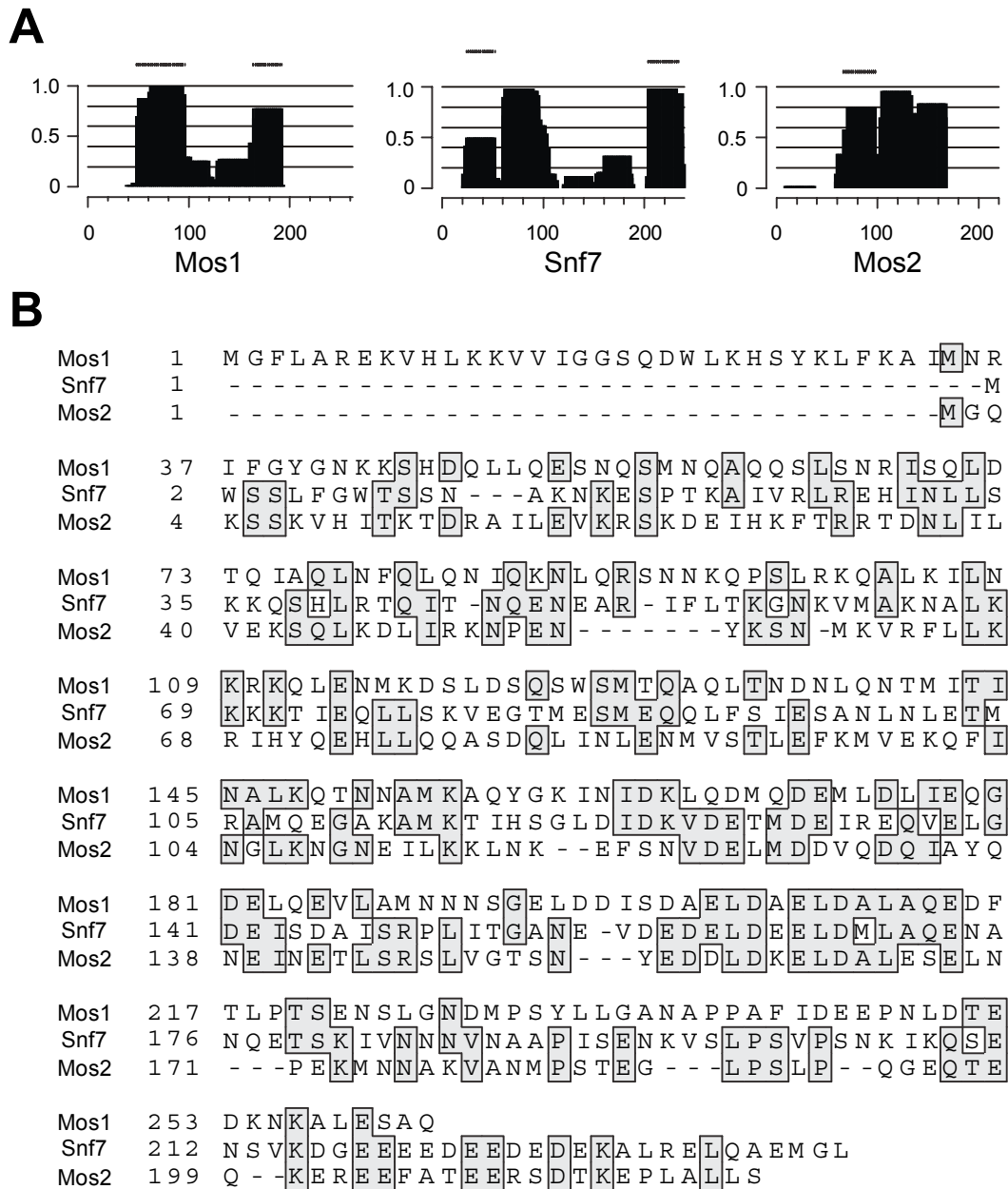


Abb. 19: Angehörige der „Snf7-Familie“ im Sequenzvergleich und deren Fähigkeit zur Bildung von superspiralisierten  $\alpha$ -Helices („coiled-coils“). (A) Mos1 (Ydr486c), Snf7 und Mos2 (Ymr077c) wurden mit dem Programm Macstripe 2.0a1 von Alex Knight analysiert, das auf dem Coils-Algorithmus von Andrei Lupas basiert (Lupas, 1996). Gezeigt wird die Wahrscheinlichkeit der „coiled-coil“-Bildung. Die Balken über den Diagrammen geben den möglichen Rahmen der Heptadenwiederholung an. (B) Mit ClustalX generierter Sequenzvergleich der Proteine. Identische Aminosäuren in zwei der drei Sequenzen sind eingerahmt.

### 3.4.2 Sequenzvergleich der Proteine

Das *MOS1*-Gen kodiert für ein 29,7 kDa großes, hydrophiles Protein. Ein „BLAST“ Datenbankvergleich zeigte eine signifikante Ähnlichkeit zu Snf7, das ebenfalls in dem Screen isoliert worden war, und zu einem weiteren noch uncharakterisierten Protein, das von dem ORF *YMR077c* kodiert wird. Da die Deletion dieses Gens



ebenfalls zu einer Stabilisierung von Ste6 führt (Abb. 18), erhielt es den Namen *MOS2*.

Der Sequenzvergleich zeigt, dass sich die Ähnlichkeit der Proteine über deren gesamte Länge hin erstreckt ( Abb. 19B). Zwischen Snf7 und den anderen Proteinen ergibt sich eine Ähnlichkeit von rund 30%, die Ähnlichkeit zwischen Mos1 und Mos2 beträgt aber nur rund 15%. Dies deutet darauf hin, dass Snf7 der Urvater dieser kleinen Proteinfamilie ist und dass sich Mos1 und Mos2 von der Snf7-Sequenz ableiten. Ein auf Basis des COILS-Algorithmus arbeitendes Computerprogramm (Lupas, 1996) sagt für alle drei Proteine „coiled-coil“-bildende Bereiche voraus ( Abb. 19A). Im Allgemeinen spielt dieses Proteinmotiv eine Rolle bei Protein-Protein-Wechselwirkungen mit anderen „coiled-coil“-bildenden Proteinen. Dies deutet an, dass die Mitglieder der „Snf7-Familie“ einen Komplex mit sich selbst oder mit anderen Proteinen bilden. Die „coiled-coil“-Motive befinden sich bei den drei Proteinen interessanterweise nicht an exakt der gleichen Position. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass jeweils verschiedene Bereiche der Proteine an der Wechselwirkung mit Interaktionspartnern beteiligt sind.

### 3.4.3 Wachstumseigenschaften der Deletionsstämme

*SNF7* („sucrose non-fermenting“) wurde ursprünglich als eine Mutante isoliert, die unter glukoselimitierenden Bedingungen nicht mehr in der Lage ist, *SUC2* (Invertase) vollständig zu dereprimieren. Die Zellen können deshalb nicht mehr auf Medium mit Raffinose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen (Tu *et al.*, 1993). Außerdem wurde eine Temperatursensitivität beschrieben. Es wurde untersucht, ob auch die Deletionen von *MOS1*, *MOS2* und *VPS4* zu ähnlichen Phänotypen führen. Die Deletionsstämme wurden dazu auf Vollmediumsplatten mit Glukose oder Raffinose als einzige Kohlenstoffquellen ausgestrichen und bei 30°C oder 37°C inkubiert (Abb. 20). Hierbei zeigte der  $\Delta mos2$ -Stamm ähnliche Wachstumseigenschaften wie der  $\Delta snf7$ -Stamm: Beide zeigten Temperatursensitivität und ein schwaches Wachstum auf raffinosehaltigem Medium (Abb. 20B, C). Der  $\Delta mos1$ -Stamm zeigte jedoch die Wachstumseigenschaften des Wildtyps. Trotz ihrer Ähnlichkeit scheinen Snf7 und Mos1 also unterschiedliche Funktionen auszuüben. Diese Interpretation wird durch die Beobachtung unterstützt, dass eine Überproduktion von Mos1 die  $\Delta snf7$ -Wachstumsphänotypen nicht supprimieren kann (nicht gezeigt). Der  $\Delta vps4$ -Stamm zeigte intermediäre Wachstumseigenschaften, seine Wachstumsrate ist bei hohen Temperaturen sowie auf Raffinose leicht verringert.

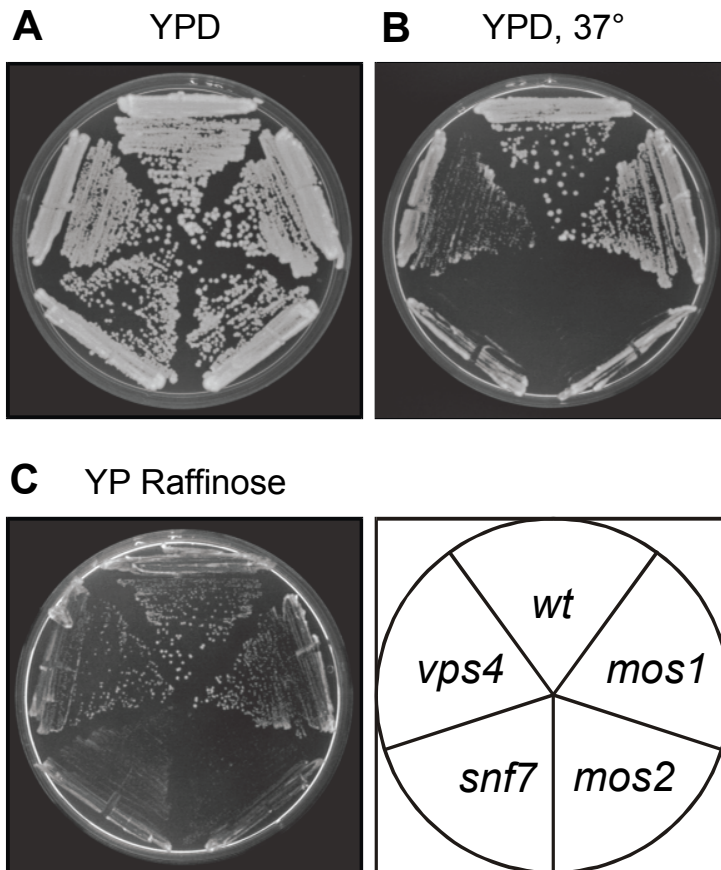


Abb. 20: Wachstumseigenschaften der Deletionsstäme. Die Stämme JD52 (*wildtyp*), RKY1509 ( $\Delta mos1$ ), RKY1590 ( $\Delta mos2$ ), RKY1510 ( $\Delta snf7$ ) und RKY1511 ( $\Delta vps4$ ) wurden auf Vollmediumsplatten mit (A, B) Glukose oder Raffinose (C) als Kohlenstoffquelle ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über drei Tage bei 30°C (A, C) oder 37°C (B).

#### 3.4.4 Vergleich des CPY-Transports

In *snf7*- und *vps4*-Mutanten ist der Transportschritt vom Endosom zur Vakuole blockiert, und die Zellen bilden ein „class E“-Kompartiment aus, welches einem vergrößerten, spät-endosomalen Organell entspricht (Babst *et al.*, 1998). Um zu untersuchen, ob auch die *mos1*-Mutation zu einem Block im vakuolen Biogeneseweg führt, wurde der intrazelluläre Transport von CPY in den Deletionsstämmen untersucht. Diese vakuoläre Hydrolase erfährt verschiedene kompartiment-spezifische Modifikationen bei ihrem Transport zur Vakuole: Die Präpro-Form wird im ER kernglykosyliert zur p1-Form, die Golgi- oder p2-Form zeichnet sich durch eine noch geringere Mobilität durch fortschreitende Glykosylierung aus, die reife oder m-Form entsteht schließlich durch Abspaltung der Prosequenz beim Erreichen der Vakuole. Die ineinander übergehenden CPY-Formen können mit einem Pulse-Chase-Experiment eines Wildtypstamms (Abb. 21, Spur 1-4) gezeigt werden. In weiteren Experimenten wurden die Reifung und Lokalisation von CPY in den Deletionsstämmen mit dem Wildtyp verglichen. Dazu wurden die Zellen 10 Minuten lang mit radioaktivem Methionin markiert. Nach einem Chase von 40 Minuten wurden die Zellen zur Unterscheidung zwischen intrazellulärer und sekretierter CPY sphäroplastiert. Die Sphäroplasten stellen die interne Fraktion dar, die Proteine des Kulturüberstands stellen die externe Fraktion dar. Im

Wildtypstamm findet sich ausschließlich reife CPY in der internen Fraktion (Abb. 21, Spur 5 und 6). Das bedeutet, dass CPY vollständig in die Vakuole transportiert wurde. Der  $\Delta snf7$ - und der  $\Delta vps4$ -Stamm zeigten jedoch eine Fehlsortierung von CPY, ein bestimmter Anteil des Proteins findet sich in der golgispezifischen p2-Form in den externen Fraktionen (Abb. 21, Spur 9-12), wie bereits zuvor beschrieben (Babst *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1988). Der größte Anteil des Proteins ist jedoch weiterhin in seiner reifen Form in den internen Fraktionen zu finden; p1-modifizierte CPY kann nicht nachgewiesen werden. Auch der  $\Delta mos1$ -Stamm zeigt eine Fehlsortierung von CPY, es kommt zu einer Anhäufung der p2-Form und einer intermediären Form, die in der Abbildung mit einem Stern markiert ist (Abb. 21, Spur 7 und 8). Diese Formen finden sich jedoch ausschließlich in der internen Fraktion, eine Sekretion der unreifen Formen ist im Gegensatz zu dem  $\Delta snf7$ - oder dem  $\Delta vps$ -Stamm nicht zu beobachten. Die intermediäre CPY-Form unterscheidet sich geringfügig in ihrer Mobilität von der kernglykosylierten p1-Form; es gibt Hinweise, dass diese Form durch eine abweichende Spaltung der p2-Form in späten Endosomen entsteht, wenn der Transport vom Endosom in die Vakuole blockiert ist (Babst *et al.*, 1997). Es ist möglich, dass die intermediäre CPY-Form ein solches Spaltungsprodukt darstellt.

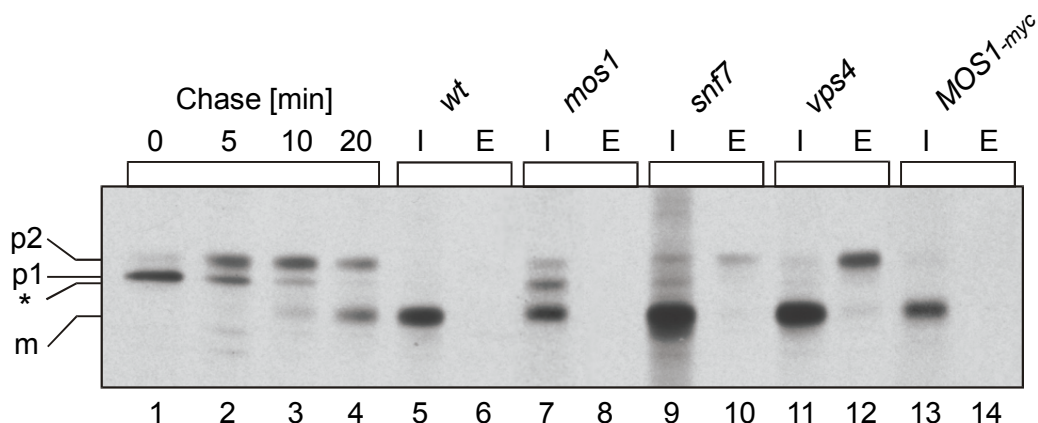


Abb. 21: CPY-Sorting in Deletionsstämmen. Die Zellen wurden 10 min lang mit [ $^{35}$ S]Trans-Label markiert. 40 min nach Zugabe eines Überschusses an nichtmarkiertem Methionin und Cystein wurde CPY von Sphäroplasten (I, interne Fraktion) und vom Kulturüberstand (E, externe Fraktion) immunpräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Eingesetzt wurden die Stämme JD52 (Wildtyp, Spuren 5, 6), RKY1509 ( $\Delta mos1$ , Spuren 7, 8), RKY1510 ( $\Delta snf7$ , Spuren 9, 10), RKY1511 ( $\Delta vps4$ , Spuren 11, 12) und RKY1452 ( $MOS1-13myc$ , Spuren 13, 14). Zum Vergleich wurde die Reifung von CPY im Wildtypstamm JD52 über 20 min hinweg verfolgt. Dazu wurden die Zellen fünf Minuten lang radioaktiv markiert, nach Zugabe von nicht-radioaktivem Methionin wurde CPY nach den angegebenen Zeiten von ganzen Zellextrakten präzipitiert. Die Positionen der verschiedenen CPY-Formen sind markiert. Eine Form mit intermediärer Mobilität ist mit einem Stern markiert.

### 3.4.5 Lokalisation des in den Deletionsstämmen betroffenen Transportschritts

#### 3.4.5.1 Aufnahme von FM4-64

Die Anhäufung von unreifen CPY-Formen deutet darauf hin, dass der Transport vom Golgi zur Vakuole in diesen Stämmen blockiert ist, auf die genaue Lokalisation des Transportblocks kann jedoch nicht geschlossen werden. Die Stabilisierung von Ste6 deutet darauf hin, dass der Transportblock sowohl den endozytischen als auch den vakuolären Transport betrifft, also eine Funktion zwischen prävakuolärem Kompartiment und Vakuole. Ist dies der Fall, so sollte auch der Transport anderer endozytischer Marker eingeschränkt sein. Eine Möglichkeit, die Integrität des endozytischen Transports zu testen, ist die Aufnahme von FM4-64 fluoreszenzmikroskopisch zu verfolgen. Dieser lipophile Farbstoff folgt der Aufnahme von Membranen und dem Transport zur Vakuole in der lebenden Zelle (Vida und Emr, 1995). Andere membranumschlossene Kompartimente werden dabei nicht angefärbt. Wildtypzellen nehmen den Farbstoff rasch auf, wo er sich spezifisch an der Vakuolenmembran anhäuft (Abb. 22A): Die Färbung umgibt die Vakuolen gleichmäßig, die im Nomarsky-Bild als flache Vertiefungen erscheinen. Der Transport zur Vakuole ist energieabhängig. Werden die Zellen in Gegenwart von Azid, das die Atmung blockiert, mit FM4-64 inkubiert, so akkumuliert der Farbstoff in kleinen punktförmigen, peripheren Strukturen, die wahrscheinlich frühen Endosomen entsprechen (Abb. 22B). Die Vakuole erscheint in einer typischen „class D“-Mutante,  $\Delta pep12$ , besonders groß und gleichmäßig intensiv gefärbt (Abb. 22C). Ein völlig anderes Bild zeigen  $\Delta snf7$ - und  $\Delta vps4$ -Stämme. Wie bereits bekannt, gehören sie zu den „class E“-*vps*-Mutanten mit einem Block im endozytischen Weg. FM4-64 häuft sich asymmetrisch an der Vakuolenmembran an, entweder in Form eines Halbmondes oder in Form einer kleinen runden Struktur nahe der Vakuole. Diese Struktur kann in einigen Fällen auch im Nomarsky-Bild erkannt werden (Abb. 22F, G). Diese Struktur entspricht sehr wahrscheinlich dem „class E-compartment“, welches einem vergrößerten späten Endosom entspricht (Raymond *et al.*, 1992a). Ein ähnliches Färbungsmuster weisen die  $\Delta mos1$ - und die  $\Delta mos2$ -Zellen auf (Abb. 22D, E), was darauf hindeutet, dass in diesen Zellen der gleiche Transportschritt betroffen ist wie in den  $\Delta snf7$ - und  $\Delta vps4$ -Zellen.

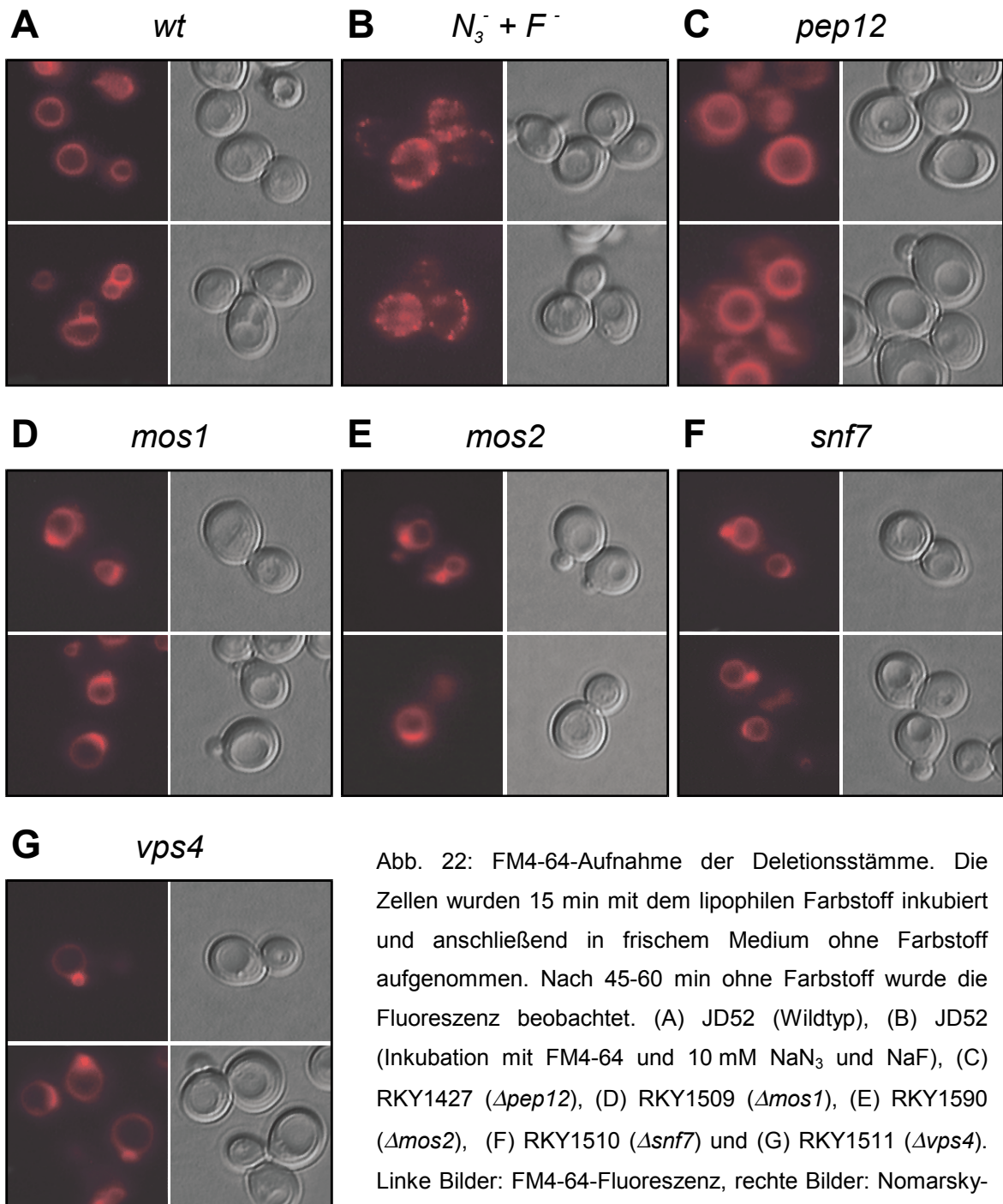


Abb. 22: FM4-64-Aufnahme der Deletionsstäme. Die Zellen wurden 15 min mit dem lipophilen Farbstoff inkubiert und anschließend in frischem Medium ohne Farbstoff aufgenommen. Nach 45-60 min ohne Farbstoff wurde die Fluoreszenz beobachtet. (A) JD52 (Wildtyp), (B) JD52 (Inkubation mit FM4-64 und 10 mM  $\text{NaN}_3$  und NaF), (C) RKY1427 ( $\Delta pep12$ ), (D) RKY1509 ( $\Delta mos1$ ), (E) RKY1590 ( $\Delta mos2$ ), (F) RKY1510 ( $\Delta snf7$ ) und (G) RKY1511 ( $\Delta vps4$ ). Linke Bilder: FM4-64-Fluoreszenz, rechte Bilder: Nomarsky-Optik.



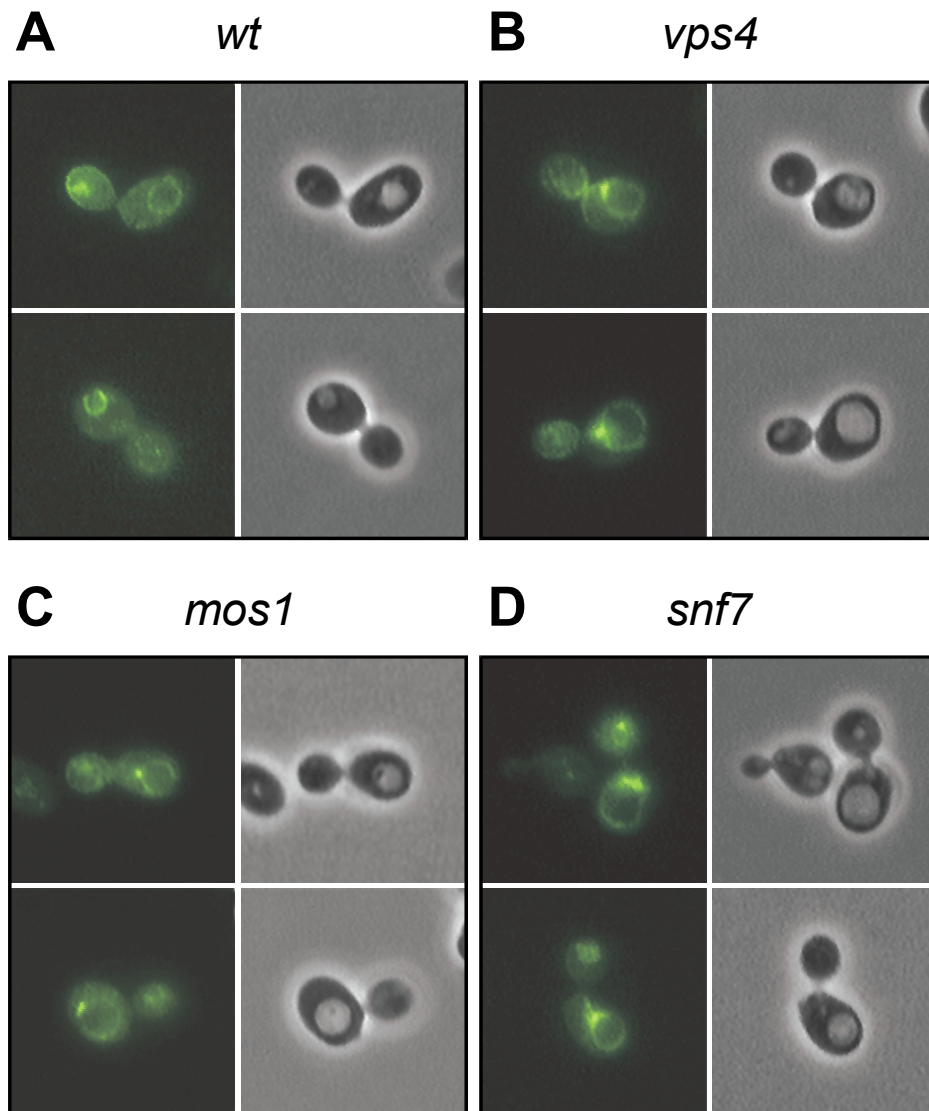


Abb. 23: Immunfluoreszenz zur Lokalisation von Ste6. Die Stämme wurden mit dem Plasmid pYKS2 ( $2\mu$ -*STE6*<sub>(c-myc)</sub>) transformiert und über Nacht exponentiell herangezogen. Die Zellen wurden für vier Stunden mit Formaldehyd fixiert, als Primärantikörper wurde der anti-c-myc-Antikörper 9E10 verwendet, als Sekundärantikörper dienten FITC-gekoppelte anti-Mausantikörper. (A) JD52 (wildtyp), (B) RKY1511 ( $\Delta$ *vps4*), (C) RKY1509 ( $\Delta$ *mos1*) und (D) RKY1510 ( $\Delta$ *snf7*). Rechte Bilder: FITC-Fluoreszenz, linke Bilder: Phasenkontrast.

#### 3.4.5.2 Lokalisation von Ste6

Auch Ste6 folgt dem endozytischen Transportweg und gelangt in die Vakuole, wo es abgebaut wird (Kölling und Hollenberg, 1994; Kölling und Losko, 1997). Ste6 selbst kann deshalb als endozytisches Markerprotein herangezogen werden. Die intrazelluläre Lokalisierung von Ste6 wurde deshalb mit Immunfluoreszenzexperimenten in den Deletionsstämmen bestimmt. Dazu wurde ein c-myc-epitopmarkiertes Ste6-Protein von einem  $2\mu$ -Plasmid exprimiert. Die erhöhte Expressionsrate des  $2\mu$ -Plasmids sowie die Verwendung von Antikörpern gegen das Epitop erwiesen sich als unvermeidlich, um ein deutliches Signal zu erhalten.

Beides hat jedoch keinen Einfluss auf die Stabilität und die Verteilung von Ste6 in Sucrose-Dichtegradienten, das Protein verhält sich also wie das Wildtypprotein bei normaler Expression. Wie bereits beschrieben (Kölling und Losko, 1997), erscheint die Färbung von Ste6 als ein Ring um die Vakuole (Abb. 23A). Die Vakuolen erscheinen im Phasenkontrast hell auf dem dunklen Hintergrund des Zellkörpers. Der Umriß der Vakuole ist ebenfalls in den anderen Stämmen,  $\Delta mos1$ ,  $\Delta snf7$  und  $\Delta vps4$  angefärbt. Zusätzlich ist eine helle Struktur nahe der Vakuole zu erkennen (Abb. 23B, C, D), die Signale waren insgesamt stärker (zur besseren Darstellung wurden die Bilder auf eine vergleichbare Signalstärke hin angeglichen). Bei dieser Struktur handelt es sich sehr wahrscheinlich um diejenige, die auch mit FM4-64 angefärbt werden kann, nämlich das „class E“-Kompartiment.

Die Darstellung von vakuolären Strukturen mit Hilfe der Immunfluoreszenz hängt in großem Maße von der Art und Dauer der Fixierung ab. Um mögliche Fixierungsartefakte zu vermeiden, wurde die intrazelluläre Ste6-Verteilung in lebenden Zellen mit Hilfe einer Ste6-GFP-Fusion, die von einem „multicopy“-Plasmid exprimiert wird, untersucht. Auch diese Fusion verhält sich bezüglich des intrazellulären Transports wie das Wildtyp-Protein: Wird die Endozytose blockiert, z.B. durch eine  $end4^{ts}$ -Mutante bei restriktiver Temperatur, so zeigt sich eine Anhäufung der GFP-Fluoreszenz an der Zelloberfläche (Abb. 24A). Bei einem Block der vakuolären Degradation des Proteins in einer  $\Delta pep4$ -Mutante zeigt sich ein diffuses Leuchten des Vakuolenlumens (Abb. 24B). Das Fluoreszenzmuster der Säme  $\Delta vps4$ ,  $\Delta snf7$ , und  $\Delta mos1$  entspricht weitestgehend dem Bild der Immunfluoreszenzexperimente: Es zeigt sich eine schwache und gleichmäßige Färbung der Vakuolenmembran sowie ein hell leuchtender Fleck in direkter Nähe der Vakuole (Abb. 24C, D, E). Das gleiche Verteilungsmuster findet sich auch im  $\Delta mos2$ -Stamm (Abb. 24F). Die GFP-Fusion eignet sich jedoch nicht zu Lokalisationsstudien im Wildtypstamm, da die Halbwertszeit von Ste6 zu kurz ist im Vergleich zu der langen Zeit, die zur Ausbildung des Chromophors von GFP benötigt wird (Tsien, 1998).

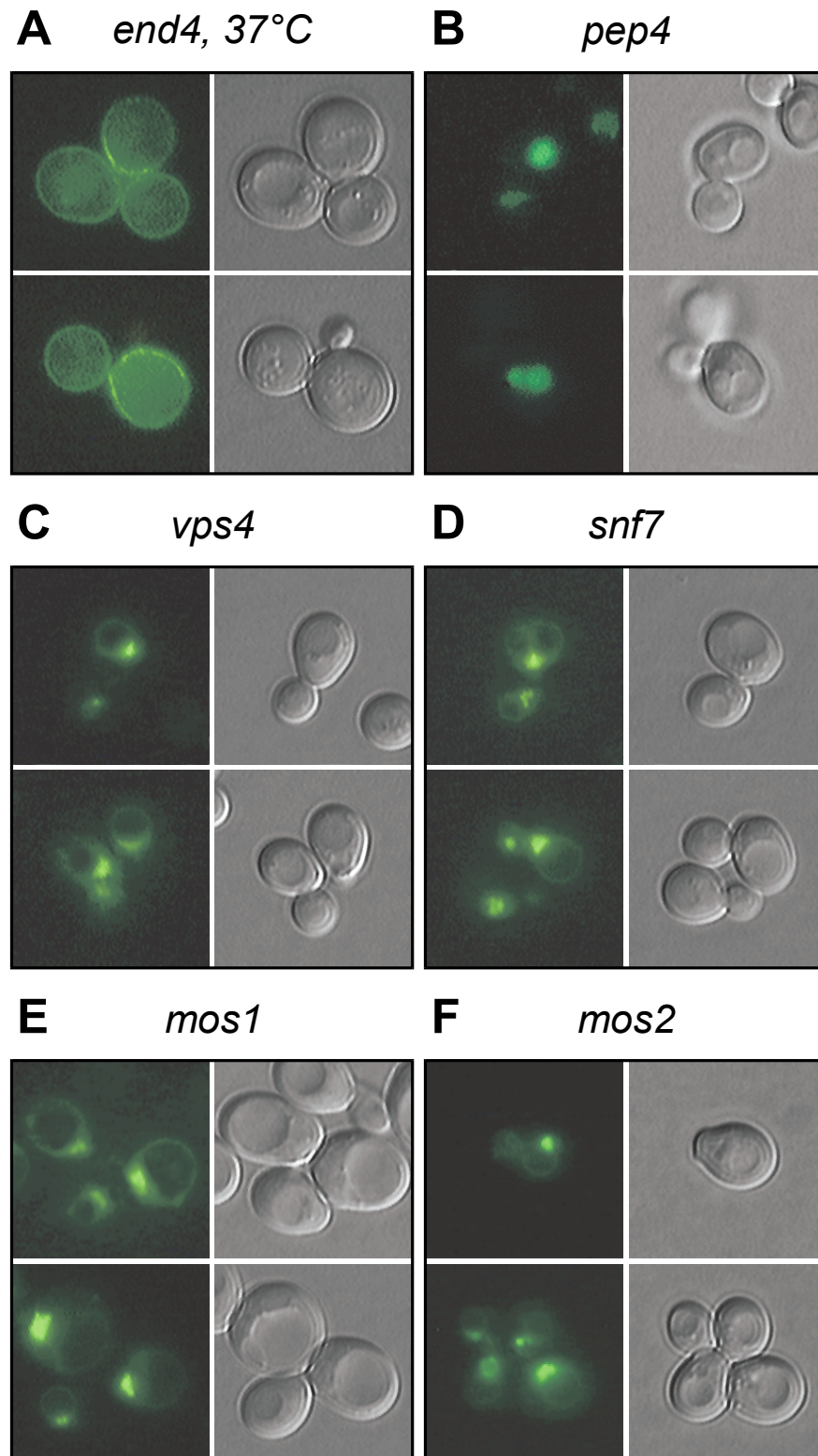


Abb. 24: Intrazelluläre Verteilung von Ste6-GFP. Eingesetzt wurden exponentiell herangewachsene Transformanten mit dem Plasmid pRK599 ( $2\mu$ -STE6-GFP) der Stämme (A) RKY1203 ( $end4^{ts}$ ), (B) RKY975 ( $\Delta pep4$ ), (C) RKY1511 ( $\Delta vps4$ ), (D) RKY1510 ( $\Delta snf7$ ), (E) RKY1509 ( $\Delta mos1$ ) und (F) RKY1590 ( $\Delta mos2$ ). Mit Ausnahme von RKY1203 wurden alle Zellen bei 30°C herangezogen: Dieser Stamm wuchs bei 25°C und wurde eine Stunde vor dem Experiment auf die restriktive Temperatur von 37°C überführt. Links: GFP-Fluoreszenz, Rechts: Nomarsky-Optik.



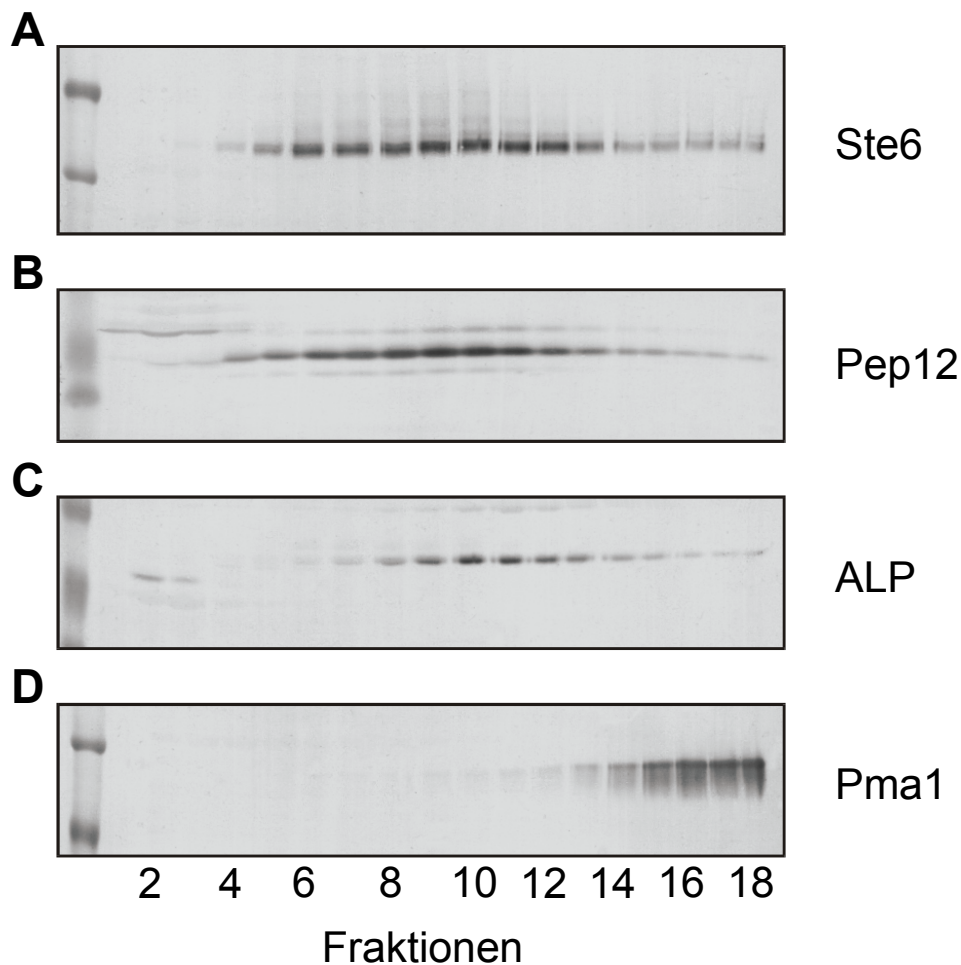


Abb. 25: Fraktionierung von Ste6 durch Dichtegradientenzentrifugation. Ein Zellextrakt vom Wildtypstamm JD52 wurde mit einem Sucrosegradienten (20-50% Sucrose, geringste Dichte in Fraktion 1) fraktioniert. Mittels SDS-PAGE und Western-Analyse wurden die Fraktionen auf die Anwesenheit von Markerproteinen hin untersucht. Eingesetzt wurden spezifische Antikörper gegen (A) Ste6, (B) Pep12, (C) ALP und (D) Pma1. Eine densitometrische Analyse der Signalintensitäten ist in Abb. 27 gezeigt.

Die bisherigen Experimente wurden mit verschiedenen überexprimierten Ste6-Varianten durchgeführt. Zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung von Ste6, das von der chromosomalen Kopie des *STE6*-Gens exprimiert wird, wurden Fraktionierungsexperimente durchgeführt. Zellextrakte von exponentiell herangezogenen Kulturen wurden mit Sucrosegradienten fraktioniert und durch Western-Blotting auf die Anwesenheit von Markerproteinen hin untersucht. Die Verteilung der Proteine im Wildtypstamm JD52 ist in Abb. 25 gezeigt, Abb. 26 zeigt exemplarisch die Verteilung der Proteine im  $\Delta mos1$ -Stamm RKY1509. Eine densitometrische Quantifizierung der Signalstärken im Western-Blot ist in Abb. 27 gezeigt. Bei der Betrachtung der Blots fällt zunächst das diffuse Laufverhalten von Ste6 im Fraktionierungsexperiment mit dem  $\Delta mos1$ -Stamm auf (Abb. 26A). Erfahrungsgemäß entsteht dieses Laufverhalten durch die Ubiquitinierung von Ste6 und ist besonders ausgeprägt bei einem Block der Endozytose (Kölling und Hollenberg,

1994). Zur Quantifizierung des Ubiquitinierungsgrades wurde in den Stämmen ein HA-epitopmarkiertes Ubiquitin exprimiert. Dieses erlaubte nach einer Immunpräzipitation mit Ste6-spezifischen Antikörpern den Nachweis von kovalent an Ste6 gebundenem Ubiquitin mit HA-spezifischen Antikörpern. Das Verhältnis zwischen den Signalstärken von Ste6 und Ubiquitin ist hierbei ein Maß für den Ubiquitinierungsgrad von Ste6. Aus diesen Experimenten ergab sich jedoch kein Hinweis auf eine veränderte Ubiquitinierung im  $\Delta mos1$ -Stamm gegenüber dem Wildtypstamm (nicht gezeigt). Ursache für das diffuse Laufverhalten ist wahrscheinlich der erhöhte Steady-State-Level des Proteins.

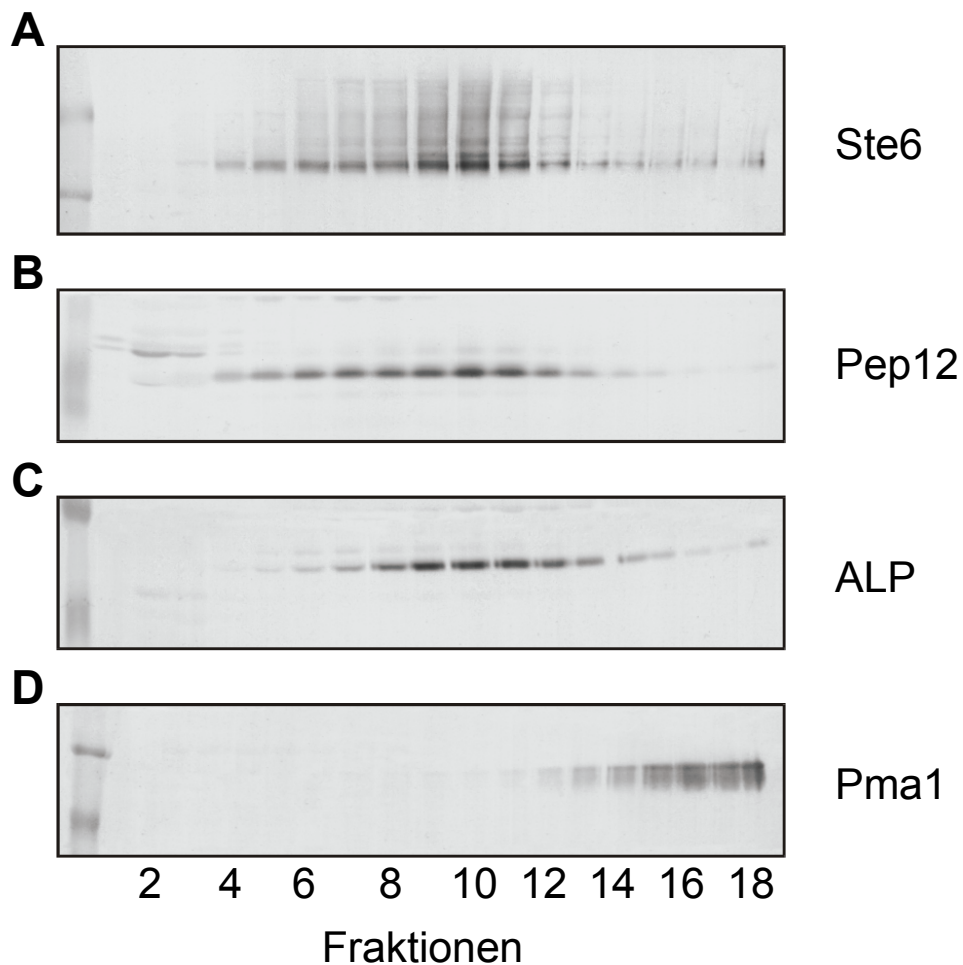


Abb. 26: Fraktionierung von Ste6 durch Dichtegradientenzentrifugation. Ein Zellextrakt vom  $\Delta mos1$ -Stamm RKY1509 wurde mit einem Sucrosegradienten (20-50% Sucrose, geringste Dichte in Fraktion 1) fraktioniert. Mittels SDS-PAGE und Western-Analyse wurden die Fraktionen auf die Anwesenheit von Markerproteinen hin untersucht. Eingesetzt wurden spezifische Antikörper gegen (A) Ste6, (B) Pep12, (C) ALP und (D) Pma1. Eine densitometrische Analyse der Signalintensitäten ist in Abb. 27 gezeigt.

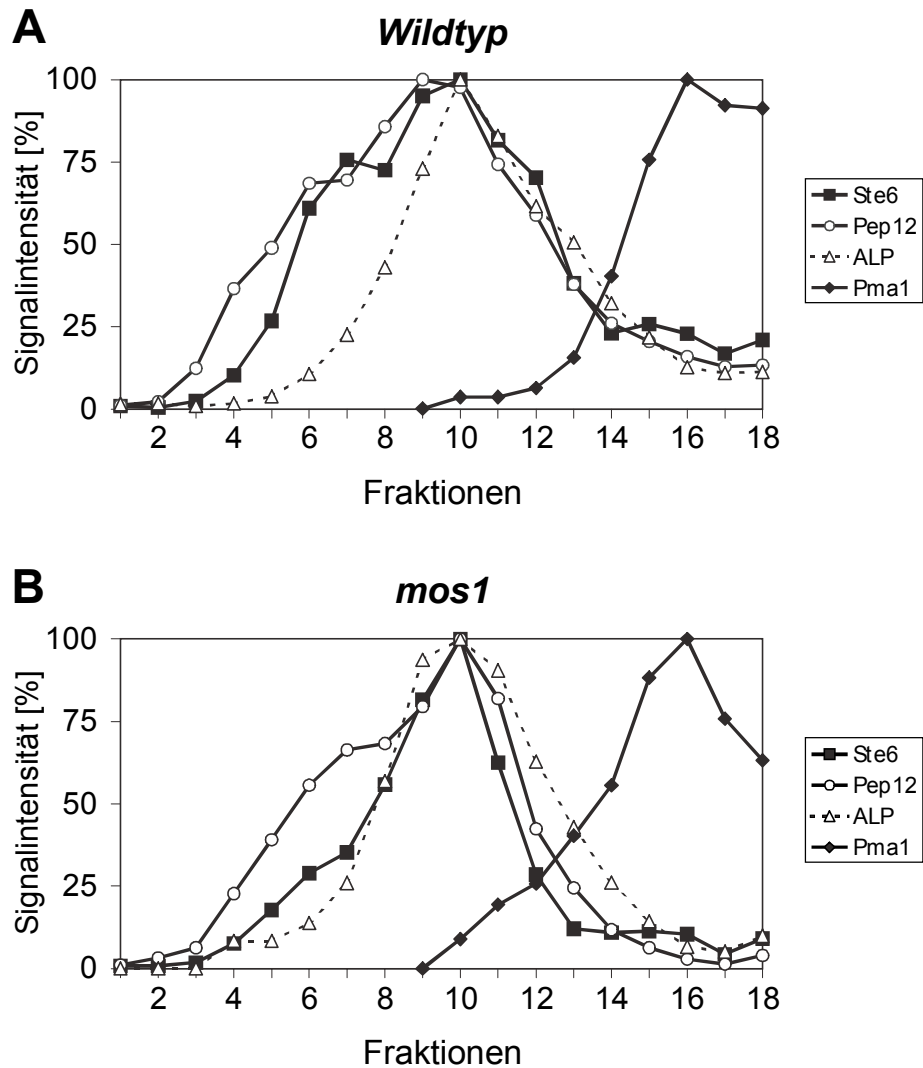


Abb. 27: Fraktionierungsprofile der Markerproteine vom Wildtypstamm JD52 (A) und  $\Delta mos1$ -Stamm RKY1509 (B). Zellextrakte wurden mit Sucrosegradienten (20-50% Sucrose, geringste Dichte in Fraktion 1) fraktioniert und mittels Western-Blotting auf die Anwesenheit von Markerproteinen hin mit spezifischen Antikörpern untersucht. Die Western-Blots wurden gescannt und die Signalstärken mit dem Programm „NIH Image“ quantifiziert. Das jeweils stärkste Signal wurde als 100% definiert. Gezeigt werden Ste6 (Quadrate), Pep12 (Kreise), ALP (Dreiecke) und Pma1 (Rauten).

Das Fraktionierungsprofil vom Wildtypextrakt zeigt, dass Ste6 in der Mitte des Gradienten fraktioniert und dabei zwei überlappende Peaks in den Fraktionen 7 und 10 bildet (Abb. 27A). Dieses Profil deckt sich weitgehend mit dem Profil des endosomalen t-SNAREs Pep12. Der Peak in Fraktion 10 deckt sich mit dem einzelnen Peak des vakuolären Markers ALP (alkalische Phosphatase). Beides zusammen spricht für eine endosomale/vakuoläre Lokalisation von Ste6. Ein Markerprotein für die Plasmamembran, Pma1 (Plasmamembran-ATPase), fraktioniert deutlich getrennt von den anderen betrachteten Proteinen in den dichtesten Fraktionen des Gradienten. Das Verteilungsmuster der Proteine ALP, Pep12 und Pma1 aus dem Fraktionierungsexperiment eines aus dem  $\Delta mos1$ -

Stamm präparierten Zellextrakts ähnelt im wesentlichen den Profilen aus dem Wildtypstamm (Abb. 27B). Das Ste6-Profil ist jedoch verändert, es zeigt nur noch einen Peak in Fraktion 10, der mit dem Signal von ALP weitgehend übereinstimmt. In dieser Fraktion findet sich ebenfalls der „schwere“ Anteil des Pep12-Peaks. Da ALP unabhängig vom CPY-Weg bzw. unabhängig vom endozytischen Weg in die Vakuole transportiert wird (Cowles *et al.*, 1997b), ist ALP auch bei einem Block des endozytischen Weges in der  $\Delta mos1$ -Mutante ein zuverlässiges Markerprotein zum Nachweis von Fraktionen mit vakuolären Anteilen. Die Verteilung des endosomalen Pep12-Proteins zeigt zwei Peaks, wobei der „schwere“ Peak in Fraktion 10 mit dem vakuolären Marker ALP kolokalisiert. Dies deutet darauf hin, dass in diesen Fraktionierungsexperimenten endosomale Strukturen nicht klar von der Vakuole zu unterscheiden sind. Die Kofraktionierung von Ste6 mit dem vakuolären Marker sowie mit einem Peak des endosomalen Markers stimmt jedenfalls mit den Fluoreszenzexperimenten überein, die ebenfalls eine Anhäufung von Ste6 an der Vakuolenmembran bzw. in einer mit der Vakuole assoziierten Struktur zeigen. Das Fraktionierungsprofil der Proteine von Zellextrakten der Stämme  $\Delta snf7$  (RKY1510) und  $\Delta vps4$  (RKY1511) unterschied sich nur unwesentlich von der Verteilung in RKY1509, weshalb diese Daten hier nicht gezeigt wurden.

Zusammengenommen deuten die FM4-64-Aufnahme und die Versuche zur Lokalisation von Ste6 darauf hin, dass in der  $\Delta mos1$ -Mutante der Transport vom Endosom in die Vakuole gestört ist. Der Deletionsstamm zeigt in Hinsicht auf diese Marker einen „class E“-Phänotyp. Die Aufnahme von FM4-64 und die Verteilung von Ste6-GFP wurde ebenfalls in der  $\Delta mos2$ -Mutante untersucht, die Verteilungsmuster waren dabei nicht zu unterscheiden von denen der  $\Delta snf7$ - und  $\Delta vps4$ -Zellen. Folglich scheinen alle drei Angehörigen der „snf7-Familie“ eine Funktion am spätem Endosom zu erfüllen.

#### 3.4.6 Lokalisation von Mos1

Um Hinweise auf die intrazelluläre Lokalisation von Mos1 zu erhalten, wurde Mos1 zum Nachweis durch Integration einer PCR-Kassette hinter dem chromosomalen *MOS1*-ORF mit 13 c-myc-Epitopen an seinem C-Terminus markiert. CPY-Sorting (Abb. 21) und Ste6-Stabilität ( $\tau=19$  min, nicht gezeigt) in dem so erzeugten Stamm RKY1452 waren normal, wodurch die Funktionalität des markierten Proteins demonstriert wurde.

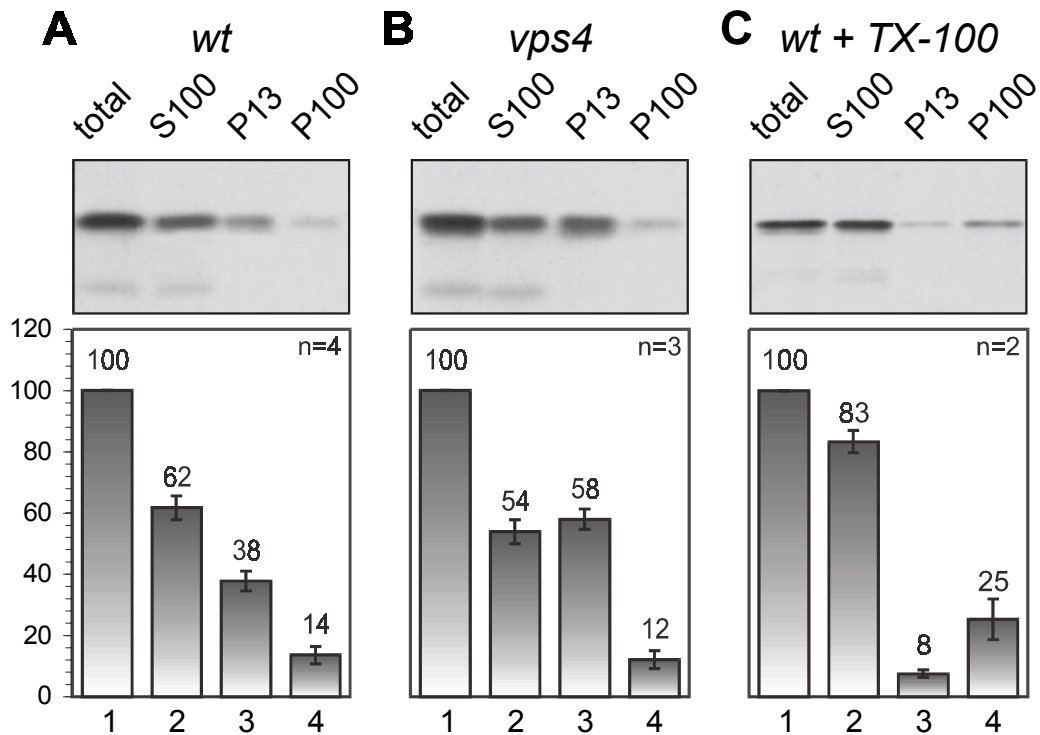


Abb. 28: Fraktionierung von Mos1 durch differentielle Zentrifugation. Zellextrakte wurden zur Abtrennung intakter Zellen für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Anschließend wurden sie zentrifugiert bei 13 000 g für 10 min zum pelletieren der P13-Fraktion. Der Überstand wurde durch erneute Zentrifugation für eine Stunde bei 100 000 g weiter in ein P100-Pellet und einen S100-Überstand fraktioniert. Gleiche Anteile der Fraktionen wurden durch Western-Blotting mit anti-c-myc-Antikörpern (9E10) auf die Anwesenheit von Mos1-13myc hin analysiert. (A) RKY1452 (*MOS1-13myc*), (B) RKY1517 (*MOS1-13myc Δvps4*) und (C) RKY1452 (*MOS1-13myc* mit 2% Triton-X100). Obere Tafeln: Western-Blots, untere Tafeln: Quantifizierung der Signalstärken im Western-Blot. Die Signalintensität des Gesamtextrakts wurde als 100% definiert. Gezeigt werden die durchschnittlichen Signalintensitäten mit Standardabweichungen mehrerer Experimente (n=2-4).

Zunächst wurden differentielle Zentrifugationen mit Zellextrakten aus diesem Stamm durchgeführt. Die Extrakte wurden durch eine Zentrifugation bei 13 000 g für 10 min in ein P13-Pellet und einen S13-Überstand getrennt. Der S13-Überstand wurde erneut für eine Stunde bei 100 000 g zentrifugiert, wobei das P100-Pellet und der S100-Überstand erhalten wurden. Etwa die Hälfte des hydrophilen Proteins Mos1 konnte pelletiert werden (Abb. 28A). Dies bedeutet, dass Mos1 entweder mit Membranen assoziiert ist oder Bestandteil eines sedimentierbaren Proteinkomplexes ist. Da der P13-Anteil des Proteins durch Behandlung mit dem Detergenz Triton X-100 solubilisiert werden kann, konnte gezeigt werden, dass Mos1 tatsächlich membranassoziiert ist; die P100-Fraktion (rund 15% des Proteins) erwies sich als resistent gegen die Behandlung mit Detergenzien (Abb. 28C).

Für Snf7 wurde ein ähnliches Verteilungsmuster beschrieben. Die Membranassoziation von Snf7 erwies sich als abhängig von der Vps4-Aktivität: Ist Vps4 inaktiv,

so findet sich der überwiegende Anteil von Snf7 in der P13-Fraktion. Dies wird dahingehend interpretiert, dass Vps4 verantwortlich ist für die Dissoziation des Proteins von der Membran (Babst *et al.*, 1998). Um zu untersuchen, ob auch die Membranassoziation von Mos1 von der Vps4-Aktivität abhängig ist, wurde der Zellextrakt eines  $\Delta vps4$  *MOS-13myc*-Stamms in gleicher Weise durch differentielle Zentrifugation fraktioniert. Hierbei konnte eine kleine, aber signifikante Veränderung der Verteilung beobachtet werden: Der Anteil von Mos1 in der P13-Fraktion erhöhte sich von 38% im Wildtypstamm auf 58% im *vps4*-Hintergrund (Abb. 28B). Zum Vergleich wurden in analoger Weise *SNF7-13myc*-Stämme konstruiert und mit deren Zellextrakten differentielle Zentrifugationsexperimente durchgeführt. Mit diesen Stämmen konnte eine ähnliche Verschiebung der Proteinverteilung zur P13-Fraktion im *vps4*-Hintergrund beobachtet werden (nicht gezeigt). Da sich die epitop-markierte Snf7-Variante jedoch als nicht funktional erwies (nicht gezeigt), muss dieses Kontrollexperiment mit Vorsicht bewertet werden. Obwohl der Effekt auf die Verteilung von Mos1 kleiner ist als für Snf7 beschrieben (Babst *et al.*, 1998), deuten die Experimente doch darauf hin, dass die Funktion von Vps4 eine Rolle bei der Membranassoziation von Mos1 spielt.

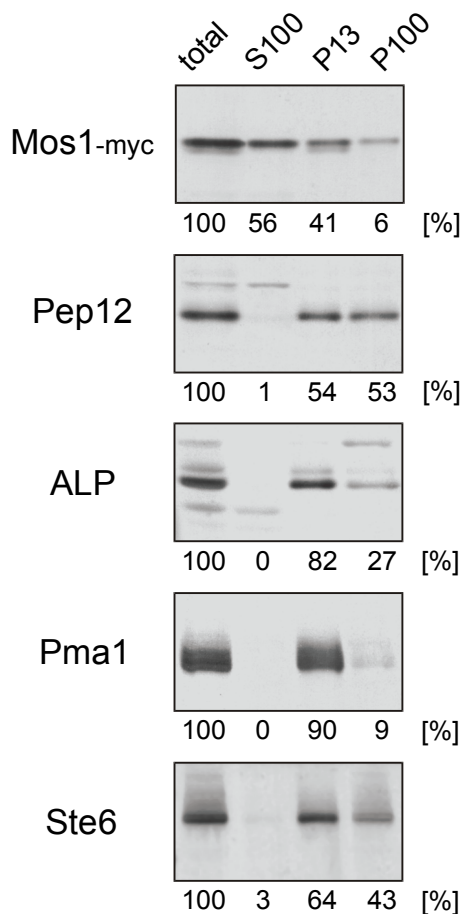


Abb. 29: Fraktionierung von Mos1 im Vergleich mit anderen zellulären Markern. Zellextrakte des Stamms RKY1452 (*MOS1-13myc*) wurden für 5 min bei 500 g zentrifugiert zur Abtrennung intakter Zellen und grober Zelltrümmer. Anschließend wurden sie bei 13 000 g für 10 min zentrifugiert zum pelletieren der P13-Fraktion. Der Überstand wurde durch erneute Zentrifugation für eine Stunde bei 100 000 g weiter in ein P100-Pellet und einen S100-Überstand fraktioniert. Jeweils gleiche Anteile der Fraktionen wurden durch Western-Blotting mit spezifischen Antikörpern wie angegeben auf die Präsenz von Markerproteinen hin untersucht. Die Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der Signalstärken sind unter den jeweiligen Western-Blots angegeben. Die Signalintensität des Gesamtextrakts wurde als 100% definiert.

Die gemachten Beobachtungen erlauben jedoch allein noch keine Aussage über die intrazelluläre Lokalisation von Mos1. Im Allgemeinen finden sich in der P13-Fraktion Proteine der Plasmamembran, der Vakuole, des endoplasmatischen Retikulums, der Mitochondrien und des Zellkerns. Die P100-Fraktion enthält Proteine des Golgi-Apparats und von Transportvesikeln. Durch Western-Blotting wurde die Verteilung von Mos1 zwischen den verschiedenen Fraktionen mit der Verteilung von Markerproteinen verglichen (Abb. 29). Der vakuoläre Marker ALP und das Plasmamembranprotein Pma1 finden sich dabei, wie erwartet, hauptsächlich in der P13-Fraktion. Wie bereits beschrieben wurde, verteilt sich der endosomale Marker Pep12 gleichmäßig zwischen der P13- und der P100-Fraktion (Becherer *et al.*, 1996). Die Verteilung von Ste6 ähnelt der Verteilung von Pep12, was im Einklang mit den Erkenntnissen der Fraktionierung mit Dichtegradienten steht, dass Ste6 und Pep12 kolokalisieren (Abb. 27). Es ist unklar, ob die Verteilung von Pep12 zwischen den beiden Fraktionen durch eine Lokalisation von Pep12 in zwei verschiedenen Kompartimenten mit unterschiedlichen Sedimentationseigenschaften verursacht wird oder durch eine teilweise Sedimentation des Pep12-Kompartiments bei der 13 000 g-Zentrifugation. Das Fraktionierungsprofil im Sucrose-Gradienten, das zwei Peaks zeigt (Abb. 27), spricht jedoch für die erste Annahme. Wie bereits beschrieben, sedimentiert Mos1 hauptsächlich im P13-Pellet. Die Phänotypen der *mos1*-Deletion lassen es unwahrscheinlich erscheinen, dass Mos1 auf der Ebene des ER oder der Plasmamembran wirkt und dort lokalisiert ist; höchstwahrscheinlich kolokalisiert Mos1 entweder mit der vakuolären Membran, die ebenfalls im P13-Pellet zu finden ist, oder mit einem von mehreren „Pep12“-Kompartimenten, dessen Sedimentationseigenschaften denen der Vakuole entsprechen. Hierbei könnte es sich um eine späte endosomale Struktur handeln.



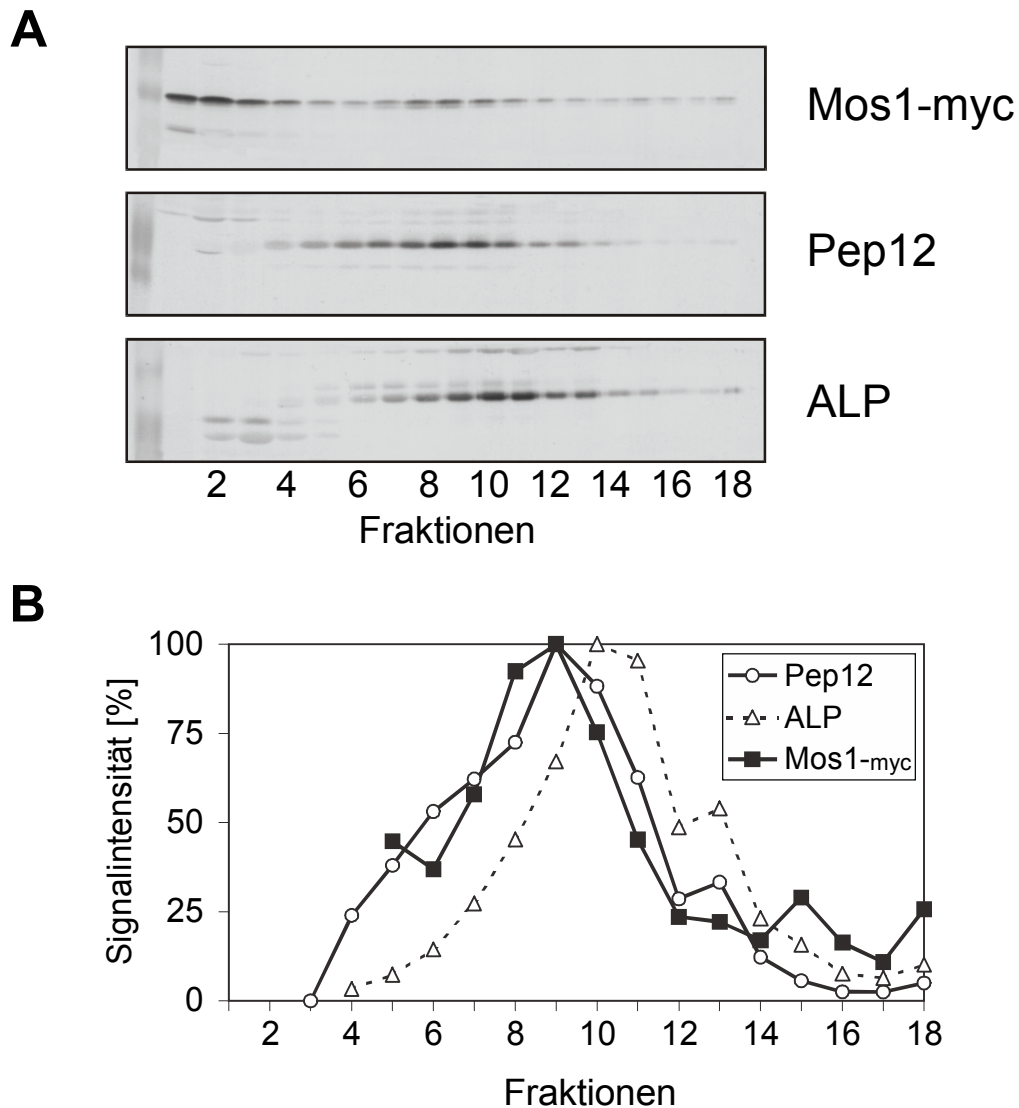


Abb. 30: Fraktionierung von Mos1 durch Sucrosegradienten. Ein Zellextrakt des Stamms RKY1452 (*MOS1-13myc*) wurde mit einem Sucrosegradienten (20-50% Sucrose, geringste Dichte in Fraktion 1) fraktioniert. (A) Mittels SDS-PAGE und Western-Analyse wurden die Fraktionen auf die Anwesenheit von Markerproteinen hin untersucht. (B) Densitometrische Quantifizierung der Signalstärken im Western-Blot. Die Blots wurden eingescannt und mit dem Programm „NIH Image“ quantifiziert. Das jeweils stärkste Signal wurden als 100% definiert. Gezeigt werden Mos1 (gefüllte Quadrate), Pep12 (offene Kreise) und ALP (offene Dreiecke).

Um genauere Informationen über die intrazelluläre Verteilung von Mos1 zu erhalten, wurden Fraktionierungsexperimente mit Sucrosedichtegradienten durchgeführt. Die so erhaltenen Fraktionen wurden durch Western-Blotting auf die Anwesenheit von Mos1, Pep12 und ALP hin analysiert (Abb. 30). Wie bereits beschrieben, zeigt das Fraktionierungsprofil von Pep12 eine Schulter, was darauf hindeutet, dass Pep12 in zwei verschiedenen Kompartimenten lokalisiert ist. Der Peak von Pep12 ist klar vom Fraktionierungsprofil des vakuolären Markers ALP zu unterscheiden. Das Profil des membranassoziierten Anteils von Mos1 stimmt



weitgehend mit dem Pep12-Peak überein. Dies deutet darauf hin, dass membran-gebundenes Mos1 an einem „Pep12-Kompartiment“ lokalisiert, das heißt an einer prävakuolären oder spät-endosomalen Struktur, die klar unterscheidbar ist von der ALP-enhaltenden vakuolären Membran. Ein Teil des Mos1-Proteins ist in den Fraktionen 1-4 enthalten, in denen die löslichen Proteine gefunden werden. Diese Aufspaltung steht in Einklang mit den differentiellen Zentrifugationen, mit denen gezeigt werden konnte, dass rund die Hälfte von Mos1 löslich ist.

### 3.4.7 Suche nach Interaktionspartnern von Mos1

Der stabilisierende Effekt bei Überproduktion von Mos1 und Snf7 deutet darauf hin, dass die Proteine Bestandteile eines Proteinkomplexes sein könnten, dessen Zusammensetzung und Funktion sensitiv auf die Stöchiometrie der beteiligten Komponenten reagiert. Die Ausbildung von „coiled-coils“ könnte Grundlage der Protein-Protein-Wechselwirkungen sein. Ein „coiled-coil“-Protein, mit dem die Proteine der „Snf7-Familie“ möglicherweise interagieren, ist das ebenfalls im Screen isolierte Vps4, dessen Deletion zum gleichen Phänotyp führt wie der Funktionsverlust von Mos1, Mos2 und Snf7. Hierfür sprechen die Beobachtungen, dass das lösliche Snf7 teilweise membranassoziiert vorliegt, wobei der Anteil an membrangebundenem Snf7 bei Inaktivierung von Vps4 steigt (Babst *et al.*, 1998). Vps4 selbst kann in Assoziation mit Membranen vorliegen, wobei das „coiled-coil“-Motiv hierfür notwendig ist (Babst *et al.*, 1998).

Zur Untersuchung möglicher Protein-Interaktionen wurde das Two Hybrid-System (3.1) eingesetzt. Dazu wurden *MOS1* und *SNF7* an die *GAL4-BD* fusioniert. Die gleichzeitige Expression eines dieser BD-Hybridproteine und einer *GAL4-AD-VPS4*-Fusion führte jedoch zu keinerlei Reporteraktivität im Two Hybrid-Testerstamm PJ69-4A (Daten nicht gezeigt). Um unbekannte Interaktionspartner von Mos1 zu finden, wurden Genbanksuchen durchgeführt. In den Testerstamm PJ69-4A wurden das Plasmid pRK581 (*GAL4-BD-MOS1*) und eine Genbank transformiert. Verwendet wurden eine cDNA-Bank der Firma Clontech (Matchmaker Two Hybrid System) und eine Genbank mit chromosomalen Fragmenten (James *et al.*, 1996). Von rund 15 000 Transformanten jeder Genbank zeigten insgesamt 30 Transformanten eine erhöhte Aktivität des wenig stringenten *HIS3*-Reportergens. Im Folgenden wurden nur die Genbankplasmide weiter untersucht, die für eine „in frame“-Fusion mit einem offenen Leseraster (ORF) kodierten, und die allein, also ohne Gegenwart einer BD-Fusion, keine Aktivierung der Reportergene bewirkten. Diese Kriterien erfüllten nur vier von den ursprünglich 30 isolierten Genbankplasmiden.

Abb. 31 zeigt die durch die Genbankplasmide hervorgerufene Reporterogenaktivität im Vergleich zu Positiv- und Negativkontrollen. Weder die Genbankplasmide noch pRK581 bewirkten in Kombination mit einem Vektor die Aktivität eines Reporter-gens. Nur Doppeltransformanten von pRK581 mit einem Genbankplasmid zeigten eine Aktivierung von Reporter-genen, die beobachteten Interaktionen sind also spezifisch (mittlere Reihe, Abb. 31B, C, D). Alle Transformanten zeigten eine Aktivierung des wenig stringenden *HIS3*-Reporters, Transformanten mit pMC1 und pMJ2 zeigten darüber hinaus eine schwache Aktivität des *ADE2*-Reporters (Abb. 31C). Keine Transformante zeigte eine deutliche Erhöhung der LacZ-Aktivität (Abb. 31D). Die Interaktionen sind in Tab. 12 zusammengefasst.

Zur Identifizierung der vier genbankkodierte Interaktionspartner wurde der an die *GAL4-AD*-Sequenz fusionierte Genbankanteil ansequenziert und mittels einer Datenbanksuche (NCBI Blast search) einem ORF zugeordnet. Die Ergebnisse dieser Recherche sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Tab. 12: Reporterogenaktivität mit verschiedenen Genbankplasmiden.

Genbankplasmid	Aktivität der Reporter-kassetten		
	<i>HIS3</i>	<i>ADE2</i>	LacZ
pMC1	++	+	-
pMJ1	++	-	-
pMJ2	++	++	-
pMJ5	++	-	(+)

Tab. 13: Identifizierung der Genbankplasmid-kodierten Gal4-AD-Fusionen. Angegeben ist der jeweils identifizierte ORF mit seiner Gesamtlänge in Aminosäuren und das jeweils erste sequenzierte Codon nach der AD-Domäne.

Genbank-plasmid	ORF	Gesamt-länge	erstes sequenziertes Codon nach Gal4-AD	Beschreibung
pMC1	<i>APG1</i>	897 AS	794	Serin/Threonin-Kinase, involviert in Autophagie
pMJ1	<i>EMP47</i>	445 AS	258	Protein des ER und Golgi mit unbekannter Funktion
pMJ2	<i>YFL042c</i>	674 AS	325	Membranprotein unbekannter Funktion
pMJ5	<i>TLG1</i>	224 AS	132	t-SNARE

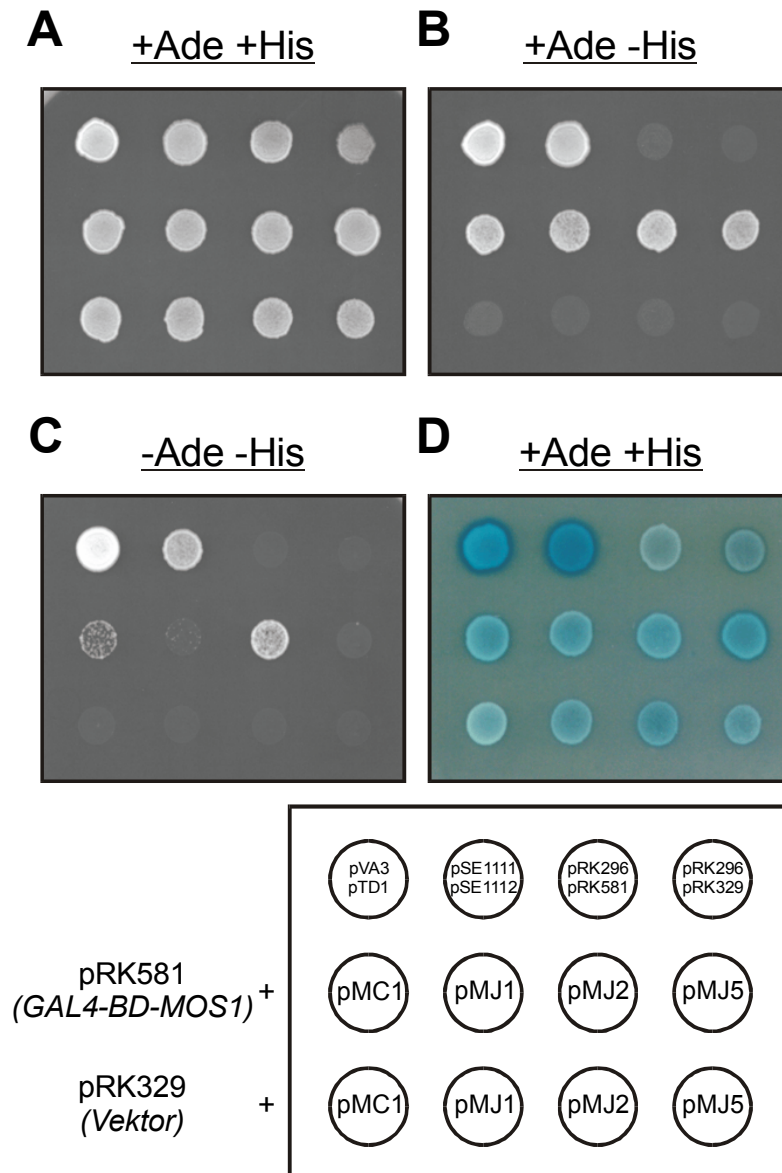


Abb. 31: Two Hybrid-Interaktion zwischen *MOS1* und Genbankplasmiden. Die Genbankplasmide erhielten als Bezeichnung einen Buchstaben je nach verwendeter Genbank (pMC bzw. pMJ) sowie eine fortlaufende Nummer. Gleiche Mengen Zellsuspension wurden auf selektive Platten getropft und drei Tage bei 30°C inkubiert. (A) Wachstum in Gegenwart von Histidin und Adenin erfordert keine Aktivierung der Reporter-kassetten. (B) In Abwesenheit von Histidin ist Wachstum nur bei Aktivität des *HIS3*-Reportergens möglich. (C) Ohne Histidin und Adenin erfordert Wachstum die Aktivität des *HIS3*- und des *ADE2*-Reportergens. (D) Bestimmung der LacZ-Aktivität (die Aktivität führt in einem LacZ-

Overlay-Assay zur Bildung eines blauen Farbstoffs). In der oberen Reihe wurden als Positiv- und Negativkontrollen Doppeltransformanten aufgebracht (von links nach rechts) mit den Plasmiden pVA3 und pTD1 (Interaktion zwischen T-Antigen und p53) bzw. pSE1111 und pSE1112 (Interaktion zwischen Snf1 und Snf4) sowie als Negativkontrollen pRK581 (*GAL4-BD-MOS1*) mit dem AD-Vektorplasmid pRK296 und den Plasmiden pRK296 und 329 (Vektoren). In der mittleren Reihe wurden Doppeltransformanten der jeweils angegebenen Genbankplasmide mit pRK581 (*BD-MOS1*) aufgebracht, die untere Reihe zeigt Doppeltransformanten der Genbankplasmide in Kombination mit dem Vektorplasmid pRK329.

Es ist unklar, ob die beobachteten Interaktionen von physiologischer Bedeutung sind. Da Mos1 eine Funktion am späten Endosom erfüllt, ist es unwahrscheinlich, dass Mos1 mit dem Protein Emp47 interagiert, bei dem es sich um ein Protein unbekannter Funktion mit einem C-terminalen Dilysinmotiv handelt, das den Rücktransport vom Golgi-Apparat in das ER vermittelt (Schröder *et al.*, 1995). Es

konnten jedoch zwei Interaktionspartner identifiziert werden, die eine Funktion beim Proteintransport in die Vakuole spielen: Die Serin/Threonin-Kinase Apg1, die eine Rolle bei der Autophagie und der vakuolären Proteindegradation bei Stickstoffmangelbedingungen spielt (Matsuura *et al.*, 1997; Straub *et al.*, 1997) und Tlg1, dem eine Funktion beim intra-Golgi-Transport (Coe *et al.*, 1999) und bei der Endozytose zugeschrieben wird: Es handelt sich um ein frühes endosomales t-SNARE, dessen Verlust zu einer verringerten Aufnahme des endozytischen Markers Ste2 führt (Holthuis *et al.*, 1998). Hochkonserviert bei allen Mitgliedern der Syntaxin-Familie ist ein C-terminal an den Membrananker angrenzendes „coiled-coil“-Motiv, welches im isolierten Genbankplasmid vollständig enthalten ist. Um eine mögliche Interaktion zwischen den beiden Proteinen durch eine zweite Methode zu verifizieren, wurde der hydrophile C-terminale Bereich von Tlg1 an GST fusioniert, in *E. coli* exprimiert und mit Hilfe von Glutathion-Sepharose-Beads aufgereinigt. An das so immobilisierte Tlg1 konnte jedoch eine epitopmarkierte Variante von Mos1 nicht spezifisch gebunden werden (Daten nicht gezeigt).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Identifizierung von Ste6-Interaktionspartnern

Im Rahmen dieser Arbeit konnten Faktoren identifiziert werden, die im Two Hybrid-System mit der Ste6-Linker-Region interagieren, welche die Ubiquitinierung und den schnellen Turnover von Ste6 vermittelt (Kölling und Hollenberg, 1994; Kölling und Losko, 1997). Es bleibt jedoch unklar, ob die im Two Hybrid-System gemessenen Interaktionen von physiologischer Bedeutung sind. Bedeutsam für die Funktion und den Turnover von Ste6 könnten jedoch die identifizierten Faktoren sein, bei denen man annimmt, dass sie den Phosphorylierungsgrad von Proteinen bestimmen. Wie bei zytosolischen Proteinen, die ubiquitiniert und anschließend am Proteasom abgebaut werden, scheint die Ubiquitinierung von Plasmamembranproteinen durch Phosphorylierung positiv reguliert zu werden. Hierfür sprechen mehrere Beobachtungen: Das Protein Ste2 ist ein G-Protein gekoppelter Sieben-Transmembranrezeptor, der bei Kontakt mit Pheromon phosphoryliert wird. In einer verkürzten Version des  $\alpha$ -Faktor-Rezeptors werden drei Serine, die für die Phosphorylierung des C-terminalen Teils benötigt werden, auch für die Ubiquitinierung und den raschen Abbau gebraucht (Hicke und Riezman, 1996; Hicke *et al.*, 1998). Außerdem zeigen Mutanten mit Defekten in den beiden Kinasen Yck1 und Yck2 eine drastische Reduzierung in der Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Internalisierung. Ein Zusammenhang zwischen Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Aufnahme von Zelloberfläche wurde u.a. für die Proteine Ste3 und Fur4 gezeigt (Marchal *et al.*, 1998; Roth und Davis, 2000). Es gibt Hinweise, dass der Phosphorylierungsgrad von ABC-Transportern auch durch Phosphatasen reguliert werden kann: Das humane CFTR-Protein wird aktiviert durch Phosphorylierung und inaktiviert durch Dephosphorylierung. Die Aktivierung kann durch die Kinasen PKA und PKC erfolgen, die Inaktivierung durch die Phosphatase 2B (PP2B) (Fischer *et al.*, 1998). Im Two Hybrid-System konnte eine regulatorische Untereinheit der Phosphatase 2A (PP2A), Rts1, als Interaktionspartner der D-Box identifiziert werden sowie ein weiteres, noch unbekanntes Protein, Ynl201c. Da Ynl201c Ähnlichkeit zu Rts1 aufweist und im Two Hybrid-System mit einer katalytischen Untereinheit des PP2A-Komplexes (Pph22) interagiert, ist es sehr wahrscheinlich, dass beide Proteine regulatorische Untereinheiten von PP2A sind. Diese Untereinheiten bestimmen die Substratspezifität und die zelluläre Lokalisation des Holoenzym (Kamibayashi *et al.*, 1994), das außerdem eine katalytische und eine strukturelle Untereinheit enthält. Bei Ynl201c, das im Two Hybrid-System stärker mit Ste6 interagiert als Rts1, könnte es sich daher um einen Spezifitätsfaktor handeln, der die Dephosphorylierung von

Ste6 durch PP2A vermittelt. Die Deletion von *ynl201c* hatte keinen Einfluss auf die Paarungseffizienz der Zellen oder den Turnover von Ste6. Nach dem derzeitigen Modell fördert Phosphorylierung die Ubiquitinierung und damit die Endozytose und den raschen Abbau von Proteinen der Plasmamembran. Die Aktivität einer Phosphatase würde diesem Prozess entgegenwirken und die Stabilisierung der Proteine bewirken. Wird die Phosphataseaktivität z.B. durch Deletion der regulatorischen Untereinheit Ynl201c verringert, so würde man deshalb keine Stabilisierung, sondern eine Destabilisierung erwarten. Es ist jedoch fraglich, ob eine Destabilisierung des ohnehin kurzlebigen Ste6-Proteins mit den durchgeführten Experimenten erkannt werden könnte. Umgekehrt müsste eine Erhöhung der PP2A-Aktivität zu einer Stabilisierung von Ste6 führen. Erste Experimente deuten darauf hin, dass die Überexpression von Ynl201c in einem Testerstamm mit einer *STE6-HIS3*-Fusion zu einer erhöhten His3-Aktivität führt, was auf einen erhöhten Steady-State-Level des Fusionsproteins hindeutet.

Es ist unbekannt, durch welche Kinase Ste6 phosphoryliert wird. Die Kinase PKC spielt eine Rolle bei der Phosphorylierung eines nahe verwandten Proteins von Ste6, dem humane P-Glykoprotein oder MDR1. Ein Sequenzvergleich zwischen Ste6 und MDR1 zeigt, dass Ste6 mit MDR1 näher verwandt ist als mit irgendeinem anderen der insgesamt 29 ABC-Transporter der Hefe. Der hohe Verwandtschaftsgrad wird durch die Komplementation der *ste6*-Deletionsmutante durch die Expression des zu MDR1 homologen Proteins der Maus, *mdr3*, belegt (Raymond *et al.*, 1992b). Im Two Hybrid-System interagierte die C-terminale Hälfte der Proteinkinase C (Pkc1) mit der D-Box von Ste6. Pkc1 reguliert einen MAP-Kinaseweg, der für die Zellintegrität von Bedeutung ist (Ammerer, 1994). Die Interaktion konnte allerdings mit selbstkonstruierten Two Hybrid-Konstrukten nicht reproduziert werden, und die Expression einer hyperaktiven Variante hatte keinen Einfluss auf die Aktivität und den Turnover von Ste6. Trotzdem könnte ein physiologischer Zusammenhang zwischen Ste6 und Pkc1 bestehen, denn bei einer erhöhten Pkc1-Aktivität würde Ste6 stärker phosphoryliert und damit schneller ubiquitiniert und abgebaut werden. Das ohnehin kurzlebige Ste6 würde also weiter destabilisiert werden. Um einen solchen Zusammenhang deutlich zeigen zu können, müssen Experimente in einem *pkc1*-Deletionsstamm durchgeführt werden, oder es müssen Bedingungen gefunden werden, unter denen die Endozytose von Ste6 herunterreguliert wird.

Die Überexpression einer hyperaktiven Pkc1-Variante führte in einem Wildtypstamm zu einem Wachstumsdefekt, der isogenetische *ste6*-Deletionsstamm war davon jedoch nicht betroffen. Dieser Effekt deutet an, dass ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von Pkc1 und Ste6 besteht. Dieser Zusammenhang muss

sich jedoch nicht in einer Veränderung der Ste6-Funktion, also der  $\alpha$ -Faktor-Sekretion und der Paarung, oder in einem veränderten Turnover bemerkbar machen. Sowohl CFTR als auch die MDR-Proteine sind nicht nur Transporter, sie regulieren auch die Funktion anderer Membranproteine: Die PKC-vermittelte Phosphorylierung des humanen MDR1 reguliert die Aktivität von Chloridkanälen (Hardy *et al.*, 1995), und die Phosphorylierung von CFTR durch die Proteinkinase A (PKA) reguliert einen Natriumkanal (Ismailov *et al.*, 1996). Für die Interaktion mit dem Natriumkanal wird die erste Nucleotidbindedomäne (NBD) von CFTR benötigt (Schreiber *et al.*, 1999). Es ist nicht bekannt, ob Ste6 ein anderes Protein reguliert, aber im Two Hybrid-System interagiert das Protein Blm3 mit einem Fragment von Ste6, das die NBD1 und die Linker-Region umfasst. Blm3 ist möglicherweise ein Transportprotein und besitzt 7-10 Transmembrandomänen. Ein weiterer Interaktionspartner mit Transmembrandomänen ist das noch unbekannte Protein Ygr168c.

Von physiologischer Bedeutung könnte die Interaktion von Ste6 mit Rpn6 sein. Rpn6 ist Bestandteil des regulatorischen Partikels (19S) des Proteasoms (Glickman *et al.*, 1998), der wichtigsten nicht-lysosomalen Protease eukaryontischer Zellen. Das Proteasom ist verantwortlich für den Abbau von löslichen ubiquitinierten Proteinen. Man geht davon aus, dass die 19S-Untereinheit verantwortlich für die Erkennung des polyubiquitinierten Substrats und für die Abspaltung der Ubiquitinmoleküle vor seinem Abbau ist (Ferrell *et al.*, 2000). Das Proteasom spielt keine Rolle beim Abbau von Ste6, denn Mutationen in den proteasomalen Untereinheiten Pre1 und Pre2 (Heinemeyer *et al.*, 1993; Heinemeyer *et al.*, 1991) haben keinen Einfluss auf die Halbwertszeit von Ste6 (Kölling und Losko, 1997). Studien am humanen „growth hormone receptor“ (GHR) haben jedoch gezeigt, dass das Proteasom trotzdem eine Rolle bei der Endozytose von Oberflächenproteinen spielen könnte: Obwohl das Protein im Lysosom abgebaut wird, wird das Proteasom für die Internalisierung nach Ligandbindung benötigt (van Kerkhof *et al.*, 2000). Wenn das Proteasom mit Membranproteinen der Oberfläche interagiert und deren Aufnahme auslöst, so erfolgt die Interaktion wahrscheinlich über den 19S-regulatorischen Partikel. Dabei könnte Rpn6 eine Rolle spielen.

## 4.2 Suche nach Mutanten mit erhöhter Ste6-Stabilität

Ste6 ist ein extrem kurzlebige Protein mit einer Halbwertszeit von rund 15 Minuten. Das Protein gelangt über den sekretorischen Weg zur Plasmamembran, wo es ubiquitiniert und endozytiert wird. Der Abbau erfolgt schließlich in der

Vakuole. Der Verlust von Genfunktionen, die am raschen Transport von Ste6 in die Vakuole beteiligt sind, sollte zu einem erhöhten Steady-State-Level von Ste6 führen. Zur Suche nach solchen Funktionen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Hefestamm konstruiert, bei dem die Erhöhung des Steady-State-Levels eines funktionalen Ste6-Fusionsproteins zur Komplementation einer Auxotrophie und damit zu einem verbesserten Wachstum führt. Die Transformation mit einer Genbank, die zur gleichzeitigen Disruption und Markierung von Genen führt, ermöglichte die Isolation von Deletionsstämmen mit einer erhöhten Aktivität des Ste6-Fusionsproteins. Erste Versuche zur Identifikation der betroffenen Gene hatten gezeigt, dass das Gen *SNX4* in einem dieser Stämme deletiert ist. Über die Funktion von Snx4 in Hefe ist noch nichts bekannt. Es gehört zur sogenannten „sorting nexin“-Familie, einer kleinen Familie hydrophiler Proteine. Alle sonstigen Angehörigen dieser Familie in der Bäckerhefe, Vps5, Mvp1 und Grd19, sind Bestandteile von Komplexen, können mit Membranen assoziieren und spielen eine Rolle beim Proteintransport (Ekena und Stevens, 1995; Horazdovsky *et al.*, 1997; Voos und Stevens, 1998). Einen Hinweis auf die mögliche Funktion von Snx4 liefern Studien zur Funktion von Nexinen in Säugerzellen. Dort konnte gezeigt werden, dass die Nexine an verschiedene Rezeptoren der Plasmamembran binden können (Haft *et al.*, 1998). Es ist denkbar, dass die Nexine dabei regulierend bei der Aufnahme eingreifen, denn die Überproduktion des humanen Nexins SNX1 führt zu einem beschleunigten Abbau des Rezeptors für den „epidermal growth factor“ EGF (Kurten *et al.*, 1996). Weiterführende Experimente sind nötig, um zu untersuchen, an welchem Transportschritt Snx4 in der Hefe eingreift, und ob der Transport anderer Proteine durch den Funktionsverlust des Nexins betroffen ist.

#### **4.3 Charakterisierung einer am späten Endosom wirkenden Familie „coiled-coil“-bildender Proteine**

Es konnten Genfunktionen identifiziert werden, deren Überproduktion zu einer erhöhten Aktivität von Ste6-His3- und Ste6-LacZ-Fusionsproteinen führt. Mit Hilfe von Pulse-Chase-Experimenten konnte gezeigt werden, dass der erhöhte Steady-State-Level der Proteine durch die Beeinträchtigung des raschen Abbaus von Ste6 hervorgerufen wird. Da die Funktion multimerer Komplexe von der Stöchiometrie der beteiligten Proteine abhängt, sollten sich solche Proteine unter den gefundenen Funktionen befinden. Diese Vorhersage wurde bestätigt durch die Identifizierung von Proteinen, deren Rolle beim intrazellulären Transport bekannt ist: Snf7/Vps32, Vps4 und Vps35 („vesicular protein sorting“). So ist z.B. Vps35 Bestandteil eines „Retromer-Komplexes“, der am Rücktransport von Proteinen



aus dem Endosom in den *trans*-Golgi (TGN) beteiligt ist (Seaman *et al.*, 1998). Unklar ist, warum die Störung des Rücktransports vom Endosom in den Golgi zu einer Stabilisierung von Ste6 führt. Eine mögliche Erklärung ist, dass ein Faktor im TGN für den vorwärtsgerichteten Transport von Ste6 benötigt wird, der vom Endosom zurück in das TGN transportiert werden muss. Für die Carboxypeptidase Y (CPY) wurde gezeigt, dass der Transport von CPY gestört ist, wenn der Rücktransport des CPY-Rezeptors Vps10 vom Endosom in das TGN durch „Retromer-Mutanten“ verhindert wird (Seaman *et al.*, 1997). Eine weitere Erklärung für den Ste6-stabilisierenden Effekt der Vps35-Überproduktion könnte eine reduzierte proteolytische Aktivität der Vakuole sein, hervorgerufen durch die Misslokalisierung der vakuolären Hydrolasen. Sehr wahrscheinlich sind auch Vps4 und Snf7 Komponenten von hetero-oligomeren Proteinkomplexen (Babst *et al.*, 1998).

In den Screens konnte ein bislang uncharakterisiertes Genprodukt, Ydr486c, identifiziert werden, das bei Überproduktion zu einer Stabilisierung von Ste6 führt. Da CPY bei einer Deletion des Gens nicht mehr effizient in die Vakuole transportiert wird, handelt es sich um eine bislang unbekannte VPS-Funktion. Da der Verlust dieser Genfunktion zu einer Stabilisierung von Ste6 führt, erhielt das Gen die Bezeichnung *MOS1* („more of Ste6“). In einem *mos1*-Deletionsstamm häuft sich der lipophile Farbstoff FM4-64, der spezifisch Membranen des endozytischen Systems anfärbt, in einer halbmond-, punkt- oder ringförmigen Struktur in direkter Nähe der Vakuole an. Immunfluoreszenzexperimente und die Verteilung eines Ste6-GFP-Fusionsproteins haben gezeigt, dass sich Ste6 in der gleichen Struktur anhäuft. Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich um eine vergrößerte Form des späten Endosoms, die das Kennzeichen der sogenannten „class E“-*vps*-Mutanten ist (Raymond *et al.*, 1992a). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der *mos1*-Deletionsstamm in einem späten Transportschritt defekt ist, der zur Aufnahme des Materials in die Vakuole führt, und sowohl den endozytischen als auch den CPY-Weg betrifft. Ein ähnliches Verteilungsmuster endozytischer Marker wurde bei den  $\Delta snf7$  and  $\Delta vps4$ -Stämmen beobachtet, die bereits zuvor als „class E“-Mutanten klassifiziert wurden und im durchgeführten Screen ebenfalls als Funktionen identifiziert wurden, die bei Überproduktion Ste6 stabilisieren.

#### 4.3.1 Lokalisierung von Mos1

Bei der Fraktionierung von Zellextrakten mit Sucrose-Dichtegradienten zeigt der endosomale Marker Pep12 einen breiten Peak mit einer Schulter zu den weniger dichten Fraktionen. Dies deutet darauf hin, dass das Verteilungsmuster von Pep12 aus der Überlagerung von zwei Pep12- enthaltenden Kompartimenten

entsteht. Mos1 fraktioniert zusammen mit dem „schweren“ Pep12-Peak. Da es sich bei Pep12 um ein endosomales t-SNARE handelt (Becherer *et al.*, 1996), entspricht der „schwere“ Pep12-Peak, bei dem es sich um den Hauptpeak handelt, sehr wahrscheinlich endosomalen Membranen. Die Fraktionierungsexperimente deuten deshalb darauf hin, dass Mos1 an endosomalen Membranen lokalisiert ist.

Durch die Fusion von Endosomen mit der Vakuole sollte Pep12 in vakuoläre Membranen gelangen. Es konnte jedoch keine Kofraktionierung von Pep12 mit dem vakuolären Marker ALP beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass Pep12 sehr effizient von der vakuolären Membran zum Endosom zurücktransportiert wird. Der „leichte“ Pep12-Peak bzw. die Schulter zu den weniger dichten Fraktionen könnte daher Transportvesikeln entsprechen, die am Rücktransport von Pep12 aus der Vakuole in das Endosom beteiligt sind. Im *mos1*-Deletionsstamm fraktioniert der schwere Pep12-Peak zusammen mit dem vakuolären Marker ALP. Dies könnte bedeuten, dass sich Pep12 durch einen Defekt im Rücktransport zum Endosom in der Vakuole anhäuft. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Dichte des späten Endosoms und die Dichte der Vakuole im  $\Delta mos1$ -Stamm gleich sind, weswegen die Kompartimente mit Hilfe von Dichtegradienten nicht mehr aufgetrennt werden können. Immunfluoreszenzexperimente anderer Gruppen zeigen, dass Pep12 in „class E“-Mutanten noch immer mit endosomalen Strukturen (dem „class E“-Kompartiment) assoziiert ist (Conibear und Stevens, 2000).

#### 4.3.2 Mögliche Funktionen von Mos1

Die Experimente zur Lokalisierung von Mos1 sind ein Anhaltspunkt, dass Mos1 peripher mit der endosomalen Membran assoziieren kann. Die Anhäufung endozytischer Marker im „class E“-Kompartiment und die ineffiziente Reifung von CPY in einem *mos1*-Deletionsstamm deutet darauf hin, dass ein Transportschritt zwischen dem prävakuolären Kompartiment und der Vakuole betroffen ist. Wahrscheinlich ist es Bestandteil eines größeren Proteinkomplexes, denn wie bereits dargestellt, begünstigt der durchgeführte Screen die Isolierung von Faktoren, die ihre Funktion innerhalb eines Komplexes erfüllen. Die Existenz von „coiled-coil“-Regionen ist ein weiteres Indiz für die Fähigkeit von Mos1, homo- oder heteromere Komplexe mit anderen Proteinen bilden zu können. Der Triton-resistente Anteil von Mos1, der in differentiellen Zentrifugationen erst bei 100 000 g sedimentiert, könnte in einem solchen Komplex gebunden sein. Mos1 könnte Bestandteil einer vesikulären Hülle sein, die wichtig für die Vesikelbildung

und die Selektion der zu transportierenden Proteine ist, oder es könnte eine Funktion bei der Bindung und Fusion von Vesikeln mit ihrer Zielmembran erfüllen.

### 4.3.3 Die Snf7-Proteinfamilie

Mos1 erwies sich als Angehöriger einer kleinen Familie sequenzverwandter Proteine, die alle „coiled-coil“-Regionen aufweisen. Diese Familie umfasst die Proteine Mos1, Snf7 und das bislang unbekanntes Protein Ymr077c. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Deletion dieses Gens zu einer Stabilisierung von Ste6 führt. Dieses Gen erhielt deshalb den Namen Mos2.

Alle drei Angehörigen dieser Proteinfamilie scheinen eine Funktion auf der Ebene des Endosoms zu erfüllen, denn die Inaktivierung jedes einzelnen Gens führt zur Bildung eines „class E“-Phänotyps, was darauf hindeutet, dass alle drei Proteine für den normalen Transport vom Endosom in die Vakuole benötigt werden. Sie sind entweder Bestandteil einer gemeinsamen Struktur, wie z.B. einer Proteinhülle, oder sie funktionieren unabhängig voneinander am gleichen Transportschritt.

Die entsprechenden Deletionsstämme zeigten jedoch auch phänotypische Unterschiede, die nur schwer mit einer gemeinsamen oder gleichen Funktion der drei Proteine in Einklang zu bringen sind. Für Snf7 defekte Mutanten zeigen einen „sucrose non-fermenting“-Phänotyp, können also auf Sucrose als einziger Kohlenstoffquelle nicht wachsen. Dies wird verursacht durch einen Defekt in der Derepression von Invertase, wenn Glukose in limitierender Menge vorhanden ist (Tu *et al.*, 1993). Offensichtlich ist in dieser Mutante die Wahrnehmung von Glukose im umgebenden Milieu gestört. Der „Snf-Phänotyp“ kann mit einem gestörten Abbau eines Glukosesensors wie z.B. Snf3 erklärt werden. In ähnlicher Weise könnte der Wachstumsdefekt von  $\Delta snf7$ -Zellen bei hohen Temperaturen durch einen Block beim Abbau von hitzebeschädigten Proteinen der Zelloberfläche hervorgerufen werden. Während der  $\Delta mos2$ -Stamm unter diesen Bedingungen sehr ähnliche Wachstumsphänotypen wie der  $\Delta snf7$ -Stamm aufweist, ist der  $\Delta mos1$ -Stamm weder temperatursensitiv, noch zeigt er Probleme bei der Derepression von Invertase. Dies lässt auf eine Art von Selektivität bezüglich der zu transportierenden Proteine schließen. Es könnte sich bei den Angehörigen der „Snf7-Familie“ um Spezifitätsfaktoren handeln, welche die Bindung und Fusion unterschiedlicher Transportvesikel mit dem Endosom steuern. Wenn jedes der drei Proteine die Fusion einer anderen Art von Transportvesikeln mit dem Endosom reguliert, sollte sich die Proteinzusammensetzung des „class E“-Kompartiments in jedem Mutantenstamm unterscheiden. Dieses Modell wird durch die unterschiedliche Anhäufung von CPY-Formen im  $\Delta mos1$ - und im  $\Delta snf7$ -

Stamm unterstützt. Wie bereits zuvor beschrieben, kann das endosomale Kompartiment der „class E“-Mutanten proteolytische Aktivität aufweisen: In *vps4*-Zellen erfolgt die Reifung CPY in Endosomen über eine intermediäre Form (Babst *et al.*, 1997). Diese Form ähnelt der im  $\Delta mos1$ -Stamm beobachteten Zwischenform. Da diese Zwischenform im  $\Delta mos1$ -Stamm deutlicher hervortritt als im  $\Delta snf7$ -Stamm, könnte dies ein Indiz für die unterschiedliche Aktivität von Hydrolasen in den „class E“-Kompartimenten der verschiedenen Stämme sein.

Alternativ könnten die Proteine eine Funktion im MVB („multivesicular body“) – Weg (Odorizzi *et al.*, 1998) ausüben. Der MVB-Weg trennt im Endosom Membranproteine, die für den Abbau in der Vakuole bzw. im Lysosom bestimmt sind, von Proteinen, die im Endosom verbleiben sollen. Erstere gelangen über einen rezeptorvermittelten Prozess in röhrenförmige Strukturen oder Vesikel, die sich in das Endosom hinein abschnüren. Zurückbleibende Proteine in der äußeren Membran werden stufenweise zu früheren Transportzwischenprodukten befördert, wodurch ein „multivesicular body“ zurückbleibt. Dabei handelt es sich um ein membranumschlossenes Partikel, das mit Vesikeln angefüllt ist und schließlich seinen Inhalt in die Vakuole entleert. Da sich im „class E“-Kompartiment keine solchen Vesikel anhäufen, geht man davon aus, dass die „class E“-Vps-Proteine an der Bildung von MVBs beteiligt sind. Die Proteine der „Snf7“-Familie könnten Teil einer allgemeinen Hüllstruktur zur MVB-Bildung sein, dann würde der Verlust einer Komponente allerdings zur völligen Unterbindung des Transports vom Endosom zur Vakuole führen. Wenn die Proteine der „Snf7-Familie“ jedoch die spezifische Aufnahme von Proteinen in MVBs regulieren, indem sie transient an endosomale Membranen und an verschiedene zu transportierende Proteine binden, könnten die verbliebenen Untereinheiten den Transport von einzelnen Substraten weiterhin vermitteln. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Wachstumsphänotypen dieser Deletionsstämmen sein.

#### **4.3.4 Suche nach Interaktionspartnern von Mos1**

Mit differentiellen Zentrifugationen konnte gezeigt werden, dass das hydrophile Protein Mos1 mit Membranen assoziieren kann. In einem *vps4*-Deletionsstamm steigt der Anteil an membrangebundenem Mos1. Ein ähnliches Verteilungsmuster wurde unter anderem für das Protein Snf7 beschrieben (Babst *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Vps4 die Dissoziation verschiedener VPS-Proteine von Membranen steuert. Eine direkte Interaktion zwischen Vps4 und Mos1 oder Snf7 konnte mit dem Two Hybrid-System jedoch nicht nachgewiesen werden. Wie bereits dargestellt, begünstigt der durchgeführte Screen den Erhalt von Proteinen, die Bestandteile multimerer Komplexe sind. Möglicherweise erfolgt

die Wechselwirkung mit Vps4 indirekt über andere Bestandteile eines Proteinkomplexes.

Zur Suche nach Interaktionspartnern von Mos1 wurde ein Two Hybrid-Screen durchgeführt. Dabei konnten keine anderen bekannten „class E“-vps-Proteine identifiziert werden. Zwei der identifizierten Interaktionspartner spielen eine Rolle beim Proteintransport in die Vakuole, Tlg1 und Apg1. Tlg1 ist ein früh-endosomales t-SNARE, dessen Verlust zu einer verringerten Aufnahme des endozytischen Markers Ste2 führt (Holthuis *et al.*, 1998). Die Interaktion konnte jedoch mit einer unabhängigen Methode nicht reproduziert werden. Apg1 ist eine Serin/Threonin-Kinase die eine Rolle bei der Autophagie und der vakuolären Proteindegradation bei Stickstoffmangelbedingungen spielt. In *apg1*-Mutanten ist jedoch weder die Aufnahme endozytischer Marker noch das CPY-Sorting beeinträchtigt (Matsuura *et al.*, 1997; Straub *et al.*, 1997). Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass die Interaktion von Apg1 und Mos1 von physiologischer Bedeutung ist.

Die stärkste Two Hybrid-Interaktion wurde mit dem Protein Yfl042c beobachtet. Es gehört zusammen mit drei weiteren Proteinen, Ylr072w, Yhr080c und Ydr326c zu einer Familie von Membranproteinen, über deren Funktion noch nichts bekannt ist. Möglicherweise handelt es sich bei Yfl042c um ein Protein, das als Bindungspartner von Mos1 dessen Membranassoziation ermöglicht.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Um Funktionen zu identifizieren, die am intrazellulären Transport und Turnover von Membranproteinen beteiligt sind, wurde ein Screen nach Funktionen durchgeführt, welche den Transport von Ste6 in die Vakuole bei Überproduktion blockieren. Ste6 ist ein kurzlebiges, ubiquitiniertes Membranprotein, das in der Vakuole abgebaut wird. Dabei konnten bekannte *VPS*-Gene („vacuolar protein sorting“) identifiziert werden, die Bestandteile von Proteinkomplexen sind: *VPS35*, *VPS32/SNF7* und *VPS4*. Außerdem wurde ein noch unbekanntes Gen isoliert, welches den Namen *MOS1* („more of Ste6“) erhielt. *SNF7* und *VPS4* gehören zu den sogenannten „class E“-*VPS*-Genen, bei denen der Transport zwischen einem spät-endosomalen Kompartiment und der Vakuole blockiert ist. Es konnte gezeigt werden, dass auch ein *mos1*-Deletionsstamm einen „class E“-Phänotyp aufweist: Die Reifung der vakuolären Hydrolase CPY ist verzögert, und der endozytische Marker FM4-64 häuft sich in einer halbmond-, punkt- oder ringförmigen Struktur in direkter Nähe der Vakuole an. Immunfluoreszenzexperimente und die Verteilung eines Ste6-GFP-Fusionsproteins zeigten, dass sich Ste6 in der gleichen Struktur anhäuft. In Fraktionierungsexperimenten wurde gezeigt, dass rund die Hälfte des hydrophilen Proteins Mos1 mit Membranen assoziiert. In Fraktionierungsexperimenten mit Sucroседichtegradienten kofraktioniert Mos1 mit dem endosomalen t-SNARE Pep12, was auf eine endosomale Lokalisation von Mos1 hindeutet. Im Two Hybrid-System konnte ein bislang unbekanntes Membranprotein identifiziert werden, das als Interaktionspartner von Mos1 möglicherweise dessen Membranassoziation erlaubt. Sequenzanalysen haben gezeigt, dass Snf7 und Mos1 zu einer Familie von „coiled-coil“-bildenden Proteinen gehören. Zu dieser Familie gehört noch ein weiteres bislang unbekanntes Protein, das den Namen Mos2 erhielt. Der Verlust der *MOS2*-Funktion führte ebenfalls zu einem „class E“-Phänotyp und zur Stabilisierung von Ste6. Verschiedene Mutanten der „Snf7-Familie“ zeigten unterschiedliche Wachstumsphänotypen. Dies deutet darauf hin, dass die einzelnen Proteine den Transport unterschiedlicher Substrate vermitteln.

Weitere Faktoren, die möglicherweise an der Regulation des Ste6-Transports und Turnovers beteiligt sind, konnten mit dem Two Hybrid-System identifiziert werden. Sie interagieren mit einem Bereich von Ste6, der die Ubiquitinierung von Ste6 vermittelt. Einige dieser Faktoren, eine Kinase und zwei Untereinheiten einer Phosphatase, könnten die Phosphorylierung von Ste6 beeinflussen. Da für andere Oberflächenproteine eine positive Regulation der Ubiquitinierung durch Phosphorylierung berichtet wird, handelt es sich bei den gefundenen Proteinen möglicherweise um Regulatoren des schnellen Turnovers von Ste6.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Akada, R., Kallal, L., Johnson, D.I. und Kurjan, J. (1996) Genetic relationships between the G protein beta gamma complex, Ste5p, Ste20p and Cdc42p: investigation of effector roles in the yeast pheromone response pathway. *Genetics*, **143**, 103-117.
- Alani, E., Cao, L. und Kleckner, N. (1987) A method for gene disruption that allows repeated use of *URA3* selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics*, **116**, 541-5.
- Ammerer, G. (1994) Sex, stress and integrity: the importance of MAP kinases in yeast. *Curr Opin Genet Dev*, **4**, 90-5.
- Ammerer, G., Hunter, C.P., Rothman, J.H., Saari, G.C., Valls, L.A. und Stevens, T.H. (1986) *PEP4* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. *Mol. Cell Biol.*, **6**, 2490-2499.
- Babst, M., Sato, T.K., Banta, L.M. und Emr, S.D. (1997) Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *Embo J*, **16**, 1820-31.
- Babst, M., Wendland, B., Estepa, E.J. und Emr, S.D. (1998) The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J.*, **17**, 2982-2993.
- Becherer, K.A., Rieder, S.E., Emr, S.D. und Jones, E.W. (1996) Novel syntaxin homologue, Pep12p, required for the sorting of luminal hydrolases to the lysosome-like vacuole in yeast. *Mol. Biol. Cell*, **7**, 579-594.
- Bedwell, D.M., Strobel, S.A., Yun, K., Jongeward, G.D. und Emr, S.D. (1989) Sequence and structural requirements of a mitochondrial protein import signal defined by saturation cassette mutagenesis. *Mol Cell Biol*, **9**, 1014-25.
- Boeke, J.D., Lacroute, F. und Fink, G.R. (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.*, **197**, 345-346.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- Brennwald, P. und Novick, P. (1993) Interactions of three domains distinguishing the Ras-related GTP-binding proteins Ypt1 and Sec4. *Nature*, **362**, 560-3.
- Bryant, N.J. und Stevens, T.H. (1998) Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 230-47.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M. und Short, J.M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques*, **5**, 376-378.
- Chang, A. und Fink, G.R. (1995) Targeting of the yeast plasma membrane [H<sup>+</sup>]ATPase: a novel gene *AST1* prevents mislocalization of mutant ATPase to the vacuole. *J Cell Biol*, **128**, 39-49.
- Chun, K.T., Edenberg, H.J., Kelley, M.R. und Goebel, M.G. (1997) Rapid amplification of uncharacterized transposon-tagged DNA sequences from genomic DNA. *Yeast*, **13**, 233-40.
- Coe, J.G., Lim, A.C., Xu, J. und Hong, W. (1999) A role for Tlg1p in the transport of proteins within the Golgi apparatus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **10**, 2407-23.
- Conibear, E. und Stevens, T.H. (1998) Multiple sorting pathways between the late Golgi and the vacuole in yeast. *Biochim Biophys Acta*, **1404**, 211-30.
- Conibear, E. und Stevens, T.H. (2000) Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late golgi. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 305-323.

- Cosson, P. und Letourneur, F. (1997) Coatamer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 484-7.
- Cowles, C.R., Emr, S.D. und Horazdovsky, B.F. (1994) Mutations in the *VPS45* gene, a *SEC1* homologue, result in vacuolar protein sorting defects and accumulation of membrane vesicles. *J Cell Sci*, **107**, 3449-59.
- Cowles, C.R., Odorizzi, G., Payne, G.S. und Emr, S.D. (1997a) The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell*, **91**, 109-18.
- Cowles, C.R., Snyder, W.B., Burd, C.G. und Emr, S.D. (1997b) Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component. *Embo J*, **16**, 2769-82.
- Davis, N.G., Horecka, J.L. und Sprague, G.F., Jr. (1993) Cis- and trans-acting functions required for endocytosis of the yeast pheromone receptors. *J Cell Biol*, **122**, 53-65.
- Denning, G.M., Anderson, M.P., Amara, J.F., Marshall, J., Smith, A.E. und Welsh, M.J. (1992) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature*, **358**, 761-4.
- Dingwall, C. und Laskey, R.A. (1991) Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci*, **16**, 478-81.
- Dunn, B., Stearns, T. und Botstein, D. (1993) Specificity domains distinguish the Ras-related GTPases Ypt1 and Sec4. *Nature*, **362**, 563-5.
- Ekena, K. und Stevens, T.H. (1995) The *Saccharomyces cerevisiae MVP1* gene interacts with *VPS1* and is required for vacuolar protein sorting. *Mol Cell Biol*, **15**, 1671-8.
- Erdman, S., Lin, L., Malczynski, M. und Snyder, M. (1998) Pheromone-regulated genes required for yeast mating differentiation. *J. Cell Biol.*, **140**, 461-483.
- Evangelista, C.C., Jr., Rodriguez Torres, A.M., Limbach, M.P. und Zitomer, R.S. (1996) Rox3 and Rts1 function in the global stress response pathway in baker's yeast. *Genetics*, **142**, 1083-93.
- Feilotter, H.E., Hannon, G.J., Ruddell, C.J. und Beach, D. (1994) Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res*, **22**, 1502-3.
- Ferrell, I., Wilkinson, C.R., Dubiel, I. und Gordon, I. (2000) Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci*, **25**, 83-8.
- Fields, S. und Song, O.-k. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- Fine, R.L., Chambers, T.C. und Sachs, C.W. (1996) P-Glycoprotein, Multidrug Resistance and Protein Kinase C. *Oncologist*, **1**, 261-268.
- Fischer, H., Illek, B. und Machen, T.E. (1998) Regulation of CFTR by protein phosphatase 2B and protein kinase C. *Eur J Physiol*, **436**, 175-81.
- Gietz, R.D. und Sugino, A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**, 527-534.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V.A. und Finley, D. (1998) The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol*, **18**, 3149-62.
- Gottesman, M.M. und Pastan, I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem*, **62**, 385-427.
- Graham, T.R. und Emr, S.D. (1991) Compartmental organization of Golgi-specific protein modification and vacuolar protein sorting events defined in a yeast *sec18* (NSF) mutant. *J Cell Biol*, **114**, 207-18.



- Haft, C.R., de la Luz Sierra, M., Barr, V.A., Haft, D.H. und Taylor, S.I. (1998) Identification of a family of sorting nexin molecules and characterization of their association with receptors. *Mol Cell Biol*, **18**, 7278-87.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In Glover, P.M. (ed.) *DNA Cloning Col. I*. IRL Press Oxford.
- Hardy, S.P., Goodfellow, H.R., Valverde, M.A., Gill, D.R., Sepulveda, V. und Higgins, C.F. (1995) Protein kinase C-mediated phosphorylation of the human multidrug resistance P-glycoprotein regulates cell volume-activated chloride channels. *Embo J*, **14**, 68-75.
- Harsay, E. und Bretscher, A. (1995) Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J Cell Biol*, **131**, 297-310.
- Heinemeyer, W., Gruhler, A., Mohrle, V., Mahe, Y. und Wolf, D.H. (1993) *PRE2*, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked *RING10* gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chrymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.*, **268**, 5115-20.
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Saidowsky, J., Escher, C. und Wolf, D.H. (1991) Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *EMBO J.*, **10**, 555-562.
- Hicke, L. und Riezman, H. (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell*, **84**, 277-287.
- Hicke, L., Zanolari, B. und Riezman, H. (1998) Cytoplasmic tail phosphorylation of the  $\alpha$ -factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J. Cell. Biol.*, **141**, 349-358.
- Higgins, C.F. (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **8**, 67-113.
- Hochstrasser, M. (1995) Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 215-223.
- Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.*, **30**, 405-439.
- Holthuis, J.C., Nichols, B.J., Dhruvakumar, S. und Pelham, H.R. (1998) Two syntaxin homologues in the TGN/endosomal system of yeast. *Embo J*, **17**, 113-26.
- Horazdovsky, B.F., Busch, G.R. und Emr, S.D. (1994) *VPS21* encodes a rab5-like GTP binding protein that is required for the sorting of yeast vacuolar proteins. *Embo J*, **13**, 1297-309.
- Horazdovsky, B.F., Davies, B.A., Seaman, M.N., McLaughlin, S.A., Yoon, S. und Emr, S.D. (1997) A sorting nexin-1 homologue, Vps5p, forms a complex with Vps17p and is required for recycling the vacuolar protein-sorting receptor. *Mol Biol Cell*, **8**, 1529-41.
- Ismailov, I., Awayda, M.S., Jovov, B., Berdiev, B.K., Fuller, C.M., Dedman, J.R., Kaetzel, M. und Benos, D.J. (1996) Regulation of epithelial sodium channels by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem*, **271**, 4725-32.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murada, K. und Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. und Fields, S. (1993) Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene*, **8**, 1693-6.
- James, P., Halladay, J. und Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-36.
- Jentsch, S. und Schlenker, S. (1995) Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell*, **82**, 881-884.

- Johnston, M. und Davis, R.W. (1984) Sequences that regulate the divergent *GAL1-GAL10* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molec. Cell. Biol.*, **4**, 1440-1448.
- Jones, E.W. (1977) Proteinase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **85**, 23-33.
- Kamibayashi, C., Estes, R., Lickteig, R.L., Yang, S.I., Craft, C. und Mumby, M.C. (1994) Comparison of heterotrimeric protein phosphatase 2A containing different B subunits. *J Biol Chem*, **269**, 20139-48.
- Klionsky, D.J., Cueva, R. und Yaver, D.S. (1992) Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J Cell Biol*, **119**, 287-99.
- Kölling, R. und Hollenberg, C.P. (1994) The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *Embo J*, **13**, 3261-71.
- Kölling, R. und Losko, S. (1997) The linker region of the ABC-transporter Ste6 mediates ubiquitination and fast turnover of the protein. *Embo J*, **16**, 2251-61.
- Kuchler, K., Dohlman, H.G. und Thorner, J. (1993) The a-factor transporter (*STE6* gene product) and cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **120**, 1203-15.
- Kuchler, K., Sterne, R.E. und Thorner, J. (1989) *Saccharomyces cerevisiae STE6* gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *EMBO J.*, **8**, 3973-3984.
- Kurten, R.C., Cadena, D.L. und Gill, G.N. (1996) Enhanced degradation of EGF receptors by a sorting nexin, SNX1. *Science*, **272**, 1008-10.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Li, S.J. und Hochstrasser, M. (1999) A new protease required for cell-cycle progression in yeast. *Nature*, **398**, 246-51.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. und Pringle, J.R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 953-961.
- Lupas, A. (1996) Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol.*, **266**, 513-525.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Marchal, C., Haguenaer-Tsapis, R. und Urban-Grimal, D. (1998) A PEST-like sequence mediates phosphorylation and efficient ubiquitination of yeast uracil permease. *Mol Cell Biol*, **18**, 314-21.
- Marcusson, E.G., Horzodovsky, B.F., Cereghino, J.L., Gharakhanian, E. und Emr, S.D. (1994) The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the *VPS10* gene. *Cell*, **77**, 579-86.
- Marks, M.S., Woodruff, L., Ohno, H. und Bonifacino, J.S. (1996) Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J Cell Biol*, **135**, 341-54.
- Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y. und Ohsumi, Y. (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **192**, 245-50.
- McGrath, J.P. und Varshavsky, A. (1989) The yeast *STE6* gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature*, **340**, 400-404.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Moore, C.W. (1991) Further characterizations of bleomycin-sensitive (blm) mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with implications for a radiomimetic model. *J Bacteriol*, **173**, 3605-8.

- Nelissen, B., De Wachter, R. und Goffeau, A. (1997) Classification of all putative permeases and other membrane plurispansers of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, **21**, 113-34.
- Nothwehr, S.F., Conibear, E. und Stevens, T.H. (1995) Golgi and vacuolar membrane proteins reach the vacuole in *vps1* mutant yeast cells via the plasma membrane. *J. Cell. Biol.*, **129**, 35-46.
- Nothwehr, S.F., Roberts, C.J. und Stevens, T.H. (1993) Membrane protein retention in the yeast Golgi apparatus: dipeptidyl aminopeptidase A is retained by a cytoplasmic signal containing aromatic residues. *J Cell Biol*, **121**, 1197-209.
- Novick, P. und Zerial, M. (1997) The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 496-504.
- Odorizzi, G., Babst, M. und Emr, S.D. (1998) Fab1p PtdIns(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. *Cell*, **95**, 847-858.
- Pearse, B.M. und Robinson, M.S. (1990) Clathrin, adaptors, and sorting. *Annu Rev Cell Biol*, **6**, 151-71.
- Piper, R.C., Bryant, N.J. und Stevens, T.H. (1997) The membrane protein alkaline phosphatase is delivered to the vacuole by a route that is distinct from the VPS-dependent pathway. *J Cell Biol*, **138**, 531-45.
- Piper, R.C., Cooper, A.A., Yang, H. und Stevens, T.H. (1995) VPS27 controls vacuolar and endocytic traffic through a prevacuolar compartment in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **131**, 603-17.
- Piper, R.C., Whitters, E.A. und Stevens, T.H. (1994) Yeast Vps45p is a Sec1p-like protein required for the consumption of vacuole-targeted, post-Golgi transport vesicles. *Eur J Cell Biol*, **65**, 305-18.
- Pishvaei, B. und Payne, G.S. (1998) Clathrin coats--threads laid bare. *Cell*, **95**, 443-6.
- Pringle, J.R., Preston, R.A., Adams, A.E.M., Stearns, T., Drubin, D.G., Haarer, B.K. und Jones, E.W. (1989) Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol.*, **31**, 357-434.
- Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F. und Riezman, H. (1993) *end3* and *end4*: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **120**, 55-65.
- Raymond, C.K., Howald-Stevenson, I., Vater, C.A. und Stevens, T.H. (1992a) Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E *vps* mutants. *Mol Biol Cell*, **3**, 1389-402.
- Raymond, M., Gros, P., Whiteway, M. und Thomas, D.Y. (1992b) Functional complementation of yeast *ste6* by a mammalian multidrug resistance *mdr* gene. *Science*, **256**, 232-4.
- Rayner, J.C. und Pelham, H.R. (1997) Transmembrane domain-dependent sorting of proteins to the ER and plasma membrane in yeast. *Embo J*, **16**, 1832-41.
- Roberts, C.J., Nothwehr, S.F. und Stevens, T.H. (1992) Membrane protein sorting in the yeast secretory pathway: evidence that the vacuole may be the default compartment. *J. Cell Biol.*, **119**, 69-83.
- Robinson, J.S., Klionsky, D.J., Banta, L.M. und Emr, S.D. (1988) Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol Cell Biol*, **8**, 4936-48.
- Rohrer, J., Bénédicti, H., Zanolari, B. und Riezman, H. (1993) Identification of a novel sequence mediating regulated endocytosis of the G protein-coupled alpha-pheromone receptor in yeast. *Mol. Biol. Cell*, **4**, 511-521.
- Roth, A.F. und Davis, N.G. (2000) Ubiquitination of the PEST-like Endocytosis Signal of the Yeast  $\alpha$ -Factor Receptor. *J Biol Chem*, **275**, 8143-8153.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4735-4739.

- Schekman, R. und Orci, L. (1996) Coat proteins and vesicle budding. *Science*, **271**, 1526-1533.
- Schmid, S.L. (1997) Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem*, **66**, 511-48.
- Schreiber, R., Hopf, A., Mall, M., Greger, R. und Kunzelmann, K. (1999) The first-nucleotide binding domain of the cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator is important for inhibition of the epithelial Na<sup>+</sup> channel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 5310-5.
- Schröder, S., Schimmoller, F., Singer-Kruger, B. und Riezman, H. (1995) The Golgi-localization of yeast Emp47p depends on its di-lysine motif but is not affected by the ret1-1 mutation in alpha-COP. *J Cell Biol*, **131**, 895-912.
- Scott, S.V., Baba, M., Ohsumi, Y. und Klionsky, D.J. (1997) Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism. *J Cell Biol*, **138**, 37-44.
- Seaman, M.N., Marcusson, E.G., Cereghino, J.L. und Emr, S.D. (1997) Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the VPS29, VPS30, and VPS35 gene products. *J. Cell Biol.*, **137**, 79-92.
- Seaman, M.N., McCaffery, J.M. und Emr, S.D. (1998) A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J. Cell. Biol.*, **142**, 665-681.
- Seeger, M. und Payne, G.S. (1992) A role for clathrin in the sorting of vacuolar proteins in the Golgi complex of yeast. *Embo J.*, **11**, 2811-8.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C. und Fink, G.R. (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature*, **319**, 689-693.
- Seufert, W. und Jentsch, S. (1990) Ubiquitin-conjugating enzymes UBC4 and UBC5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. *EMBO J.*, **9**, 543-550.
- Shu, Y., Yang, H., Hallberg, E. und Hallberg, R. (1997) Molecular genetic analysis of Rts1p, a B' regulatory subunit of *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A. *Mol Cell Biol*, **17**, 3242-53.
- Simons, K. und Zerial, M. (1993) Rab proteins and the road maps for intracellular transport. *Neuron*, **11**, 789-99.
- Singer-Kruger, B., Stenmark, H., Dusterhoff, A., Philippsen, P., Yoo, J.S., Gallwitz, D. und Zerial, M. (1994) Role of three rab5-like GTPases, Ypt51p, Ypt52p, and Ypt53p, in the endocytic and vacuolar protein sorting pathways of yeast. *J Cell Biol*, **125**, 283-98.
- Snyder, M., Elledge, S. und Davis, R.W. (1986) Rapid mapping of antigenic coding regions and constructing insertion mutations in yeast genes by mini-Tn10 "transplason" mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 730-734.
- Söllner, T. (1995) SNAREs and targeted membrane fusion. *FEBS Lett*, **369**, 80-3.
- Stark, M.J. (1996) Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast*, **12**, 1647-75.
- Stevens, T., Esmon, B. und Schekman, R. (1982) Early stages in the yeast secretory pathway are required for transport of carboxypeptidase Y to the vacuole. *Cell*, **30**, 439-48.
- Stevens, T.H., Rothman, J.H., Payne, G.S. und Schekman, R. (1986) Gene dosage-dependent secretion of yeast vacuolar carboxypeptidase Y. *J Cell Biol*, **102**, 1551-7.
- Straub, M., Bredschneider, M. und Thumm, M. (1997) AUT3, a serine/threonine kinase gene, is essential for autophagocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **179**, 3875-83.
- Subramani, S. (1993) Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu Rev Cell Biol*, **9**, 445-78.

- Tsien, R.Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 509-544.
- Tu, J., Vallier, L.G. und Carlson, M. (1993) Molecular and genetic analysis of the *SNF7* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **135**, 17-23.
- van Kerkhof, P., Govers, R., Alves dos Santos, C.M. und Strous, G.J. (2000) Endocytosis and degradation of the growth hormone receptor are proteasome-dependent. *J Biol Chem*, **275**, 1575-80.
- Vida, T.A. und Emr, S.D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol*, **128**, 779-92.
- von Mollard, G.F., Nothwehr, S.F. und Stevens, T.H. (1997) The yeast v-SNARE Vti1p mediates two vesicle transport pathways through interactions with the t-SNAREs Sed5p and Pep12p. *J. Cell Biol.*, **137**, 1511-1524.
- Voos, W. und Stevens, T.H. (1998) Retrieval of resident late-Golgi membrane proteins from the prevacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on the function of Grd19p. *J Cell Biol*, **140**, 577-90.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. und Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**, 1793-1808.
- Watanabe, M., Chen, C.Y. und Levin, D.E. (1994) *Saccharomyces cerevisiae* *PKC1* encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. *J Biol Chem*, **269**, 16829-36.
- Waters, M.G. und Pfeffer, S.R. (1999) Membrane tethering in intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 453-9.
- Westphal, V., Marcusson, E.G., Winther, J.R., Emr, S.D. und van den Hazel, H.B. (1996) Multiple pathways for vacuolar sorting of yeast proteinase A. *J Biol Chem*, **271**, 11865-70.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. und Graham, M.W. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res*, **17**, 3469-78.
- Woodman, P.G. (1997) The roles of NSF, SNAPs and SNAREs during membrane fusion. *Biochim Biophys Acta*, **1357**, 155-72.
- Woolford, C.A., Daniels, L.B., Park, F.J., Jones, E.W., Van, A.J. und Innis, M.A. (1986) The *PEP4* gene encodes an aspartyl protease implicated in the posttranslational regulation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar hydrolases. *Mol. Cell Biol.*, **6**, 2500-10.
- Yang, B., Gonzalez, L., Jr., Prekeris, R., Steegmaier, M., Advani, R.J. und Scheller, R.H. (1999) SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity. *J. Biol. Chem.*, **274**, 5649-5653.
- Yang, B., Steegmaier, M., Gonzalez, L.C., Jr. und Scheller, R.H. (2000) nSec1 binds a closed conformation of syntaxin1A. *J Cell Biol*, **148**, 247-252.
- Yoshihisa, T. und Anraku, Y. (1989) Nucleotide sequence of *AMS1*, the structure gene of vacuolar alpha-mannosidase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*, **163**, 908-15.
- Zhao, Y., Boguslawski, G., Zitomer, R.S. und DePaoli-Roach, A.A. (1997) *Saccharomyces cerevisiae* homologs of mammalian B and B' subunits of protein phosphatase 2A direct the enzyme to distinct cellular functions. *J Biol Chem*, **272**, 8256-62.

## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<sup>35</sup> S	radioaktives Schwefelisotop
5-FOA	5-Fluoro-Orotic-Acid
Ade	Adenin
AK	Antikörper
ALP	„alkaline phosphatase“
ARS	Autonom replizierende Sequenz
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
Bp	Basenpaare
CEN	Centromersequenz
CFTR	“cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“
Ci	Curie
CPY	Carboxypeptidase Y
CVT	„cytoplasm-to-vacuole targeting“
Cys	Cystein
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTAF	Dichlorotriazinylamino-Fluorescein
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtBr	Ethidiumbromid
GFP	„green fluorescent protein“
Glu	Glutamat
GST	Glutathion-S-Transferase
H	Stunde
His	Histidin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
Leu	Leucin
LiOAc	Lithiumacetat
Lys	Lysin
MDR	„multi drug resistance“
Met	Methionin
min	Minuten
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NBD	„nucleotide binding domain“
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid

---

OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
ONPG	2-Nitrophenyl-β-d-galaktopyranosid
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethyldisulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
<i>S. c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
ts	temperatursensitiv
U	Einheit der Enzymaktivität
UAS	„upstream activating sequence“
Ura	Uracil
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid
YNB	„yeast nitrogen base“
z.B.	zum Beispiel

## Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Dr. Ralf Kölling für die Bereitstellung des Themas und die aufmerksame Betreuung dieser Arbeit. Er war immer bemüht, seinen Mitarbeitern nicht nur Arbeitstechniken, sondern auch wissenschaftliches Verständnis zu vermitteln.

Herrn Prof. Dr. Hollenberg danke ich für die Überlassung der Arbeitsstelle.

Herrn Prof. Dr. Wagner danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ich möchte ebenfalls den derzeitigen, ehemaligen und Ehrenmitgliedern der AG Kölling, Sascha Losko, Darius Buchczyk, Thomas Dehmel, Bettina Axler, Frauke Bühring, Frank Kopp, Daniel Fein, Andrea Kinner und Ira Melchheier für die gute Zusammenarbeit und vielen hilfreichen Diskussionen danken. Frau Anna Nagy danke ich für die unzähligen bereitgestellten Utensilien und Uli Kleinhans für die Beseitigung technischer Probleme („druckt nicht!“).

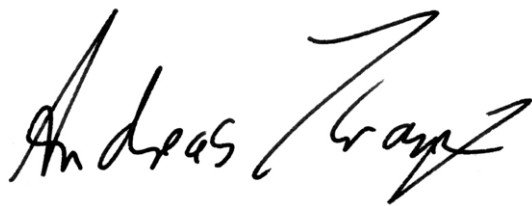
Allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die viele alltägliche Probleme von mir fernhielt und auch in schwierigen Situationen Geduld aufbrachte und mich moralisch unterstützte.



Eidesstattliche Erklärung

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

A handwritten signature in black ink, reading "Andreas Franz". The signature is written in a cursive style with a large, sweeping initial 'A' and 'F'.

Düsseldorf, den 21.04.2000