

**Charakterisierung der endosomalen  
Proteintransportfunktion Vps8 der Hefe  
*Saccharomyces cerevisiae***

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

vorgelegt von  
Agnes Pawelec  
aus Ostrowo

Düsseldorf 2005

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

Referent: Prof. Dr. Ralf Kölling-Paternoga

Koreferent: Prof. Dr. Ulrich Rüter

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 2005

---

1. Einleitung.....	4
1.1 Der CPY-Weg.....	6
1.2 Der ALP-Weg.....	7
1.3 Der CVT-Weg.....	7
1.4 Mechanismen der Vesikelfusion.....	8
1.5 Ste6: ein ABC-Transporter als Modellprotein für Endozytose .....	10
1.6 Transportmechanismen am frühen Endosom .....	12
2. Material und Methoden.....	13
2.1 Stämme und Medien .....	13
2.1.1 Bakterienstämme .....	13
2.1.2 Medien und Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> ( <i>E.coli</i> ) .....	13
2.1.3 Hefestämme .....	13
2.1.4 Medien und Kultivierung von Hefestämmen .....	15
2.2 Plasmide.....	16
2.3 Synthetische Oligonukleotide.....	20
2.4 Chemikalien und Enzyme.....	23
2.5 Antikörper.....	24
2.6 Transformation.....	25
2.6.1 Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	25
2.6.2 Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	25
2.7 Präparation von DNA .....	26
2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	26
2.7.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>S. cerevisiae</i> für Test-PCR .....	26
2.8 Enzymatische Modifikation von DNA .....	26
2.8.1 DNA Restriktion.....	26
2.8.2 Entfernen von überstehenden 3`-Enden.....	27
2.8.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	27
2.8.4 DNA Ligation.....	27
2.9 PCR-Amplifizierung.....	27
2.9.1 Spezifische Amplifizierung von Plasmid-DNA .....	28
2.9.2 Amplifizierung chromosomaler/Plasmid DNA mit Pfu-Ultra-Polymerase ..	28
2.9.3 Test-PCR (Amplifizierung chromosomaler DNA).....	29

---

2.9.4 PCR-Mutagenese .....	29
2.9.5 Gen-Tagging und –Deletionen mit Hilfe von PCR-Kassetten .....	30
2.9.6 Assembly-PCR .....	30
2.10 DNA-Elektrophorese .....	31
2.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	31
2.12 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	32
2.13 Sequenzierung von DNA .....	32
2.14 Herstellung von Proteinextrakten für die Western-Analyse.....	32
2.15 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE .....	32
2.16 Coomassie–Blaufärbung von Proteinbanden im SDS-Gel.....	33
2.17 Immunologischer Proteinnachweis durch Western Analyse .....	33
2.18 Zellfraktionierung .....	34
2.18.1 Differentielle Zentrifugation.....	34
2.18.2 Differentielle Zentrifugation unter unterschiedlichen Salzbedingungen ....	35
2.18.3 Flotation.....	35
2.18.4 Sucrose-Gradienten.....	36
2.19 Pulse-chase Experimente .....	36
2.20 CPY-Sorting.....	37
2.21 Immunopräzipitation.....	38
2.22 Koimmunopräzipitation.....	38
2.23 Immunofluoreszenz-Mikroskopie.....	39
2.24 Wachstumsuntersuchungen mittels serieller Verdünnungstropftests .....	39
2.25 Kreuzung von Hefestämmen und Tetradenanalyse .....	40
2.26 Gendeletionen/-modifikationen in <i>S. cerevisiae</i> .....	40
3. Ergebnisse .....	41
3.1 Einordnung der Vps8-Funktion im endozytischen Weg .....	41
3.2 Das C-terminal 13-myc markierte Vps8 Protein ist funktional.....	45
3.3 Lokalisation von Vps8 in der Zelle .....	47
3.4 Ist die Assoziation von Vps8 mit zellulären Membranen durch Vps21 bedingt?.....	51
3.5 Analyse der Lokalisation von Vps8 in <i>vps21</i> -Mutanten.....	53

---

3.6. Suche nach Faktoren, die für Membranassoziation von Vps8 verantwortlich sind .....	56
3.7 Eingrenzung der Membranbindedomäne von Vps8 .....	60
3.8 Vps8 zeigt homotypische Wechselwirkung.....	62
3.9 Vps8 interagiert mit Vps21 <i>in vivo</i> . .....	64
3.10 Deletionsanalyse von Vps8.....	65
3.11 CPY Transport in Vps8-Deletionsmutanten.....	68
3.12 Lokalisation von Ste6 in Vps8 Deletionsmutanten .....	69
3.13 Das Sedimentationsverhalten von Vps8 ist von bestimmten Bereichen abhängig.....	71
3.14 Eingrenzung der Vps21-Bindestelle im Vps8-Protein .....	74
3.15 Charakterisierung der Bindung von Vps8 an Pep5.....	77
3.16 Regulierte die RING-Domäne die Funktionen von Vps8 durch Ubiquitinierung? .....	78
3.17 Zusammenfassung der Deletionsanalyse.....	80
3.18 In Klasse D Mutanten ist die Modifizierung von Vps9 verstärkt.....	81
3.19 Vps27 ist ubiquitiniert in $\Delta vps8$ -Zellen.....	84
3.20 Funktion von Klasse D Komponenten bei Entfernung von Proteinaggregaten?.....	85
4. Diskussion.....	86
4.1 Transportdefekte in der $\Delta vps8$ -Mutante .....	86
4.2 Lokalisierung von Vps8.....	88
4.3 Die periphere Membranbindung von Vps8 .....	89
4.4 Vps8: ein multifunktionelles Adapterprotein?.....	93
4.4 Ubiquitinierung von Faktoren der Proteinsortierungsmaschinerie.....	95
4.5 Klasse D-Funktionen und Proteinaggregate .....	97
5. Zusammenfassung.....	99
6. Literaturverzeichnis .....	100
7. Abkürzungsverzeichnis.....	106

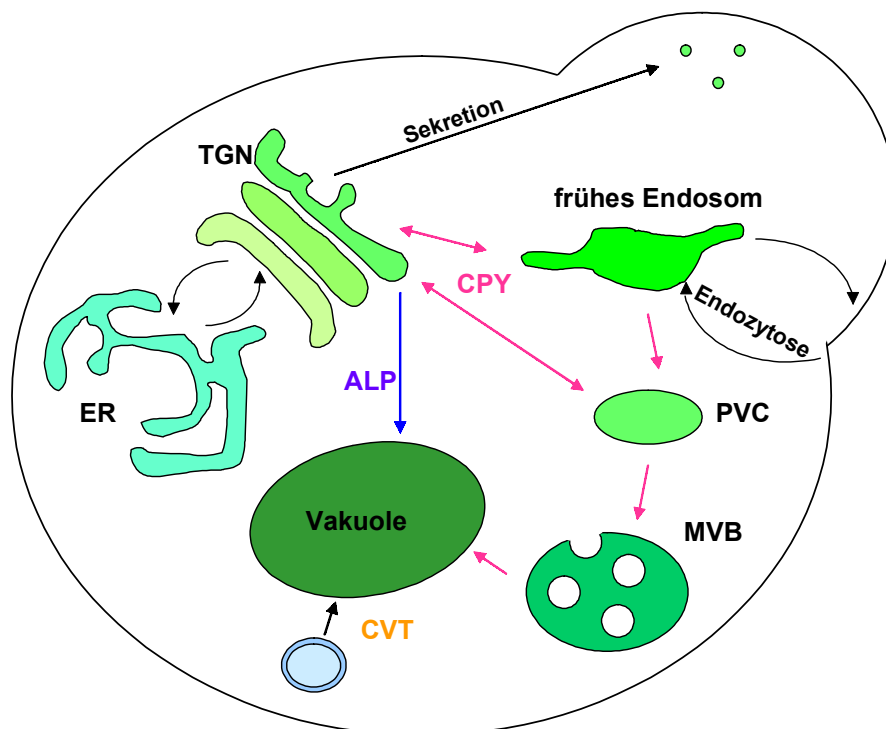
## 1. Einleitung

Charakteristisch für eukaryotische Zellen ist die Unterteilung des Zytoplasmas in membranumschlossene Kompartimente, die Organellen. Dadurch werden funktions-spezifische, wässrige Räume sowie ein ausgedehntes Membransystem, worin spezielle Prozesse räumlich getrennt voneinander ablaufen können, geschaffen. Jedes Kompartiment zeichnet sich durch eine eigene Proteinzusammensetzung aus, welche von komplexen Zielsteuerungs- und Sortierungsmechanismen aufrechterhalten wird. Um die Organellenidentität garantieren zu können, müssen die Komponenten dieser Sortiermaschinerie sich ihrerseits an den richtigen Stellen zusammenfinden.

Im Fokus dieser Arbeit stehen die vakuolären Proteintransportwege in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Abb. 1). Die meisten Proteine entstehen an den Ribosomen im Zytoplasma und verbleiben auch dort, sofern in ihrer Aminosäuresequenz kein Sortiersignal enthalten ist. Viele Proteine besitzen jedoch spezifische Sortiersignale, die ihnen den Weg vom Zytoplasma in den Kern, zum Endoplasmatischen Retikulum (ER), zu den Mitochondrien, den Peroxisomen oder zur Vakuole weisen. Membranproteine werden während ihrer Synthese am ER in die ER-Membran eingefädelt und erfahren teilweise eine Modifizierung durch Zuckerketten. Wenn die Proteine ordentlich gefaltet und zusammengesetzt sind, verlassen sie das ER mit Hilfe des vesikulären Transports in Richtung des Golgi-Apparats, wo weitere Modifizierungen stattfinden. Hier wird die Entscheidung getroffen, ob ein Protein auf sekretorischem Wege zur Plasmamembran transportiert oder aber in den endosomalen Weg geleitet wird. Bei integralen Membranproteinen scheint die Art der Transmembrandomäne darüber zu entscheiden, ob das Protein zur Plasmamembran oder in den vakuolären Weg dirigiert wird (Wilcox *et al.*, 1992, Rayner und Pelham, 1997). Diese Sortierung hängt mit der unterschiedlichen Lipidzusammensetzung von Plasma- und Vakuolenmembran zusammen. Zusätzliche Signale sorgen dafür, dass die Proteine in Zielkompartimenten zurückgehalten werden.

Lösliche Proteine mit Sortierungssignalen, wie beispielsweise die vakuoläre Hydrolase CPY (Carboxypeptidase Y) werden von ihren Transportrezeptoren im Trans-Golgi-Netzwerk aufgegriffen und zum Zielort, der Vakuole, geleitet (Marcusson *et al.*, 1994). Ohne Bindung an den Transportrezeptor würden diese Proteine automatisch sekretiert.

Wie das Lysosom der Säuger, so ist die Vakuole der Pilze ebenfalls ein saures, mit Hydrolasen angereichertes Organell, das dem Abbau von Makromolekülen dient. Darüber hinaus ist sie ein Speicher für Metabolite wie Aminosäuren und Polyphosphate und spielt eine wichtige Rolle bei der Osmoregulation und pH-Homöostase. Die Vakuole bekommt Material zur Erhaltung der eigenen Funktion vom Golgi-Apparat (CPY- und ALP-Weg) und aus dem Zytoplasma (CVT-Weg). Abgebaut werden Proteine, welche durch ubiquitin-vermittelte Endozytose von der Plasmamembran aufgenommen werden, sowie zytoplasmatische Proteine bei Hungerbedingungen (Autophagozytose).



**Abb. 1:** Transportwege zur Vakuole in der Knospenhefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Der CPY-Weg führt vom späten Golgi über ein prävakuoläres Kompartiment zur Vakuole. Durch Endozytose aufgenommene Plasmamembranproteine folgen der endosomalen Transportroute. Der ALP-Weg umgeht alternativ das PVC. Der CVT-Weg umfasst die direkte Aufnahme von Proteinen aus dem Zytoplasma. ER: Endoplasmatisches Retikulum; TGN: Trans-Golgi-Netzwerk; PVC: Prevacuolar Compartment; MVB: Multivesikular Body; CVT: Cytoplasm-to-Vacuole-Transport; CPY: Carboxypeptidase Y; ALP: Alkaline Phosphatase. Pink markiert den CPY-Weg, Blau die ALP-Route.

Die Biogenese der Vakuole der Hefe (oder äquivalent des Lysosoms der Säugerzellen) hat sich zu einem Modellsystem für die Zusammensetzung von Organellen entwickelt. Da viele der vakuolären Funktionen für das vegetative Wachstum nicht essentiell sind,

war es möglich, eine Vielzahl von Mutanten mit Defekten in der Vakuolenzusammensetzung zu isolieren, die so genannten *vps* Mutanten (defekt in der Vakuolären Proteinsortierung). Diese wurden nach morphologischen Gesichtspunkten in 6 Gruppen (Klasse A-F) unterteilt (Raymond *et al.*, 1992) und betreffen unterschiedliche Stationen des vakuolären Transportweges. Beispielsweise zeichnen sich Klasse D *vps* Mutanten unter anderem durch das Vorhandensein einer einzigen großen Vakuole aus, während es in Klasse E *vps* Mutanten zur Ausbildung einer extrem vergrößerten spät-endosomalen Struktur kommt, welche als Klasse E Kompartiment bezeichnet wird. In Klasse C-Mutanten ist die Vakuole als solche nicht mehr erkennbar.

## 1.1 Der CPY-Weg

Zwei endosomale Strukturen, die frühen und die späten Endosomen können morphologisch (Hicke *et al.*, 1997, Prescianotto-Baschong und Riezman, 2002) und biochemisch (Singer und Riezman, 1990) unterschieden werden. Beobachtungen aus Säugerzellen haben zu der Vorstellung geführt, dass das frühe Endosom eine Art Sortierstation darstellt, an welcher für das Lysosom bestimmte Proteine von denjenigen getrennt werden, die zwischen Endosom und Plasmamembran pendeln (Recycling) (Gruenberg, 2001, Maxfield und McGraw, 2004). Das frühe Endosom bildet Ausstülpungen aus, von denen Vesikel zur Plasmamembran abgeschnürt werden. Die für den Abbau bestimmten Komponenten hingegen werden aktiv in Domänen fern der Ausstülpungen konzentriert und damit dem degradativen Weg zugeführt.

Im späten Endosom (Pre-Vacuolar Compartment, PVC) findet durch die Bildung interner Vesikel eine Trennung von Proteinen, welche für das Vakuolenlumen bestimmt sind, von denen, die in der begrenzenden Membran verbleiben statt. Das Endosom entwickelt sich unter der Einwirkung der ESCRT-Proteinkomplexe 1-3 zum so genannten MVB (Multivesicular Body).

Der Transport vakuolärer Proteine kann anhand der sehr gut untersuchten löslichen vakuolären Carboxypeptidase Y (CPY) veranschaulicht werden. CPY verläßt das ER als ein kernglykosyliertes Proenzym (p1-Form), das während seiner Passage durch den Golgi-Komplex eine weitere Glykosylierung zur p2-Form erfährt. Im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) wird CPY mit Hilfe einer Sortierungssequenz von seinem Rezeptor (Vps10) in den vakuolären Weg geleitet. Während der CPY-Rezeptor aufgrund seines Zytoplasmatischen Retentionssignals zum Golgi zurückgebracht wird, um für weitere Transportrunden zur Verfügung zu stehen, gelangt CPY durch Fusion des MVBs mit



der Vakuole ins Vakuolenlumen und wird dort zur reifen Form prozessiert. Durch das Auftreten der drei deutlich unterschiedlich großen CPY-Formen in *vps* Mutanten können Rückschlüsse auf Defekte im endozytischen Transportweg gezogen werden. So betreffen Mutationen von Klasse D-Mutanten Fusionsprozesse mit dem PVC, die Klasse E-Mutanten die Entwicklung des MVBs und Klasse C-Mutanten die Fusion mit der Vakuole.

## 1.2 Der ALP-Weg

Ein anderes vakuoläres Enzym, Alkalische Phosphatase (ALP), wird als ein integrales Precursor-Membranprotein synthetisiert und ebenfalls nach der Ankunft in der Vakuole zur reifen Enzymform prozessiert. Die Sortierung zur Vakuole ist abhängig von Informationen, welche innerhalb des cytosolischen N-Terminus und der Transmembrandomäne liegen (Klionsky und Emr, 1990, Cowles *et al.*, 1997b, Piper *et al.*, 1997). Analysen der Biosynthese von ALP haben gezeigt, dass der vakuoläre Transport des Proteins unabhängig von den meisten Komponenten des CPY-Weges erfolgt und damit die Endosomen umgeht. Genetische Screens haben eine Beteiligung von Untereinheiten des AP-3 Komplexes an der ALP Sortierung erwiesen (Cowles *et al.*, 1997a). Der AP-3 Komplex gehört zu den Adapterkomplexen, welche an Signalsequenzen von Frachtproteinen binden und diese mit Hüllenproteinen wie Clathrin zusammenführen, so dass hüllenbedeckte Vesikel sich abschnüren können. AP-3 funktioniert allerdings unabhängig von Clathrin und assoziiert möglicherweise mit anderen Proteinen, um eine neuartige Vesikelhülle zu bilden (Vowels und Payne, 1998). Ein interessanter Kandidat hierfür wäre Vps41, das essentiell für den ALP Transport ist und sowohl mit ALP als auch mit AP-3 interagiert (Darsow *et al.*, 2001). Seine Fähigkeit zur Oligomerisierung weist eine Analogie zu Clathrin auf. Interessanterweise beteiligt sich Vps41 am Klasse C-Komplex, welcher für die Vakuolenfusion unentbehrlich ist. Auch wird das vakuoläre t-SNARE Vam3, ebenfalls ein Fusionsprotein, auf dem ALP und nicht dem CPY-Weg transportiert. (Piper *et al.*, 1997b).

## 1.3 Der CVT-Weg

Der Transport vom Zytoplasma zur Vakuole (Cytoplasm-to-vacuole targeting) stellt einen gesonderten biosynthetischen Weg dar, der unabhängig vom sekretorischen Weg

stattfindet und Komponenten der Autophagozytose nutzt. Das vakuoläre Enzym Aminopeptidase 1 (API) wird an zytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und auf dem CVT-Wege zur Vakuole transportiert (Klionsky *et al.*, 1992, Scott *et al.*, 1997). Nach Oligomerisation assoziiert es mit Membranen und wird Bestandteil der von zwei Membranen umgebenen CVT-Vesikel. Bei der Fusion mit der Vakuole wird das CVT-Vesikel, was nun von einer Membran umgeben ist, ins Vakuolenlumen entlassen. Nach Lyse der CVT-Vesikel wird API freigesetzt und prozessiert.

#### 1.4 Mechanismen der Vesikelfusion

Transportvesikel schnüren sich in der Regel an von Hüllenproteinen bedeckten Membranbereichen ab. Diese Proteinnetzwerke entstehen auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite und führen die Abschnürung des Vesikels herbei. Bevor ein Transportvesikel mit seiner Zielmembran verschmelzen kann, muss diese Beschichtung abgeworfen werden, um eine direkte Wechselwirkung beider Membranen zu ermöglichen. Die Hüllenkomplexe sind hauptsächlich aus Adapterproteinen, welche für die Selektion der zu transportierenden Proteine verantwortlich sind, und gerüstbildenden Proteinen wie Clathrin zusammengesetzt. Für den Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zu frühen und späten Endosomen werden unterschiedliche Adapterkomplexe beansprucht (Black und Pelham., 2000). Während der AP1-Adapterkomplex sowie Clathrin am Transport zu frühen Endosomen beteiligt zu sein scheinen (Deloche *et al.*, 2001), werden für späte Endosomen bestimmte Proteine in clathrinbedeckte Vesikel verpackt, die so genannte GGAs (Golgi-localized,  $\gamma$ -ear-containing, ARF-binding)-Adaptoren enthalten (Boman *et al.*, 2000; Dell'Angelica *et al.*, 2000; Hirst *et al.*, 2000; Poussu *et al.*, 2000; Takatsu *et al.*, 2000). Während der Endozytose entstehen ebenfalls clathrinbedeckte Vesikel unter Mitwirkung des AP-2 Adapterkomplexes. Im Gegensatz hierzu funktioniert der AP-3 Adapter im ALP Transportweg unabhängig von Clathrin (s.o.). Reguliert wird die Zusammensetzung der Hüllenkomplexe durch die monomere GTPase ARF (Übersicht Nie *et al.*, 2003).

Die Fusionsmaschinerie besteht wie die Abschnürungsmaschinerie ebenfalls größtenteils aus peripheren Membranproteinen, die bei Bedarf aus dem Zytoplasma rekrutiert werden. Wenn der Fusionsprozess beendet ist, zerfallen diese Strukturen, und können schnell und einfach wiederverwendet werden.

Zunächst einmal muss die Anheftungsstelle in der Zielmembran für das ankommende Vesikel markiert werden. Die Organisation der Anheftungsstelle durch das Heranbringen von Effektorproteinen wird von den kleinen Rab-GTPasen (Ypts in Hefe) bewerkstelligt (Übersicht Pfeffer, 2003). Diese wechseln zwischen der löslichen, GDP-gebundenen und der aktiven, GTP-gebundenen Membranform. Das GDP-gebundene Ypt liegt im Komplex mit dem GDI (GDP dissociation inhibitor) vor, welcher den Geranylgeranyl-Membrananker am Ypt maskiert und damit dessen Bindung an Membranen verhindert. Endosomale Membranen besitzen höchstwahrscheinlich Membranproteine, GDFs (GDI-displacement factor), welche Ypt/GDI-Komplexe erkennen und diese auflösen können (Svejstrup *et al.*, 1997). Spezifische GDFs leiten die GDP-Ypts zu den entsprechenden Kompartimenten und präsentieren sie dort Guaninukleotid Austauschfaktoren (GEFs), welche dann die Ypts durch den Austausch von GDP zu GTP aktivieren. Das aktive, membrangebundene Ypt rekrutiert nun Effektoren, die sich zu großen Komplexen zusammensetzen und die Fusion einleiten. Nach der Fusion wird GTP durch die Wirkung eines GAPs (GTPase activating protein) gespalten; das jetzt GDP-gebundene Ypt wird sodann vom GDI erkannt und aus der Membran entfernt.

Die Fusion von Vesikeln mit ihrer Zielmembran wird von SNAREs, zytoplasmatisch orientierten Membranproteinen, vermittelt (Söllner *et al.*, 1993, Rothman, 1994). Die zytoplasmatischen Domänen eines Vesikel-SNAREs (v-SNAREs) und drei Zielmembran-SNAREs (t-SNARE) schließen sich zu einem Parallelbündel zusammen, welches die beiden Membranen überbrückt (trans-SNARE Komplex). Diese Formation überwindet die Energiebarriere, welche Membranen von der Fusion abhält. Die Hefe besitzt acht t-SNAREs (auch Syntaxine genannt), die teilweise an gleichen Orten wirken. Am TGN sowie frühen Endosomen sind SNARE-Komplexe mit Tlg1/Tlg2 zu finden, am späten Endosom mit Pep12 und an der Vakuole mit Vam3.

Die Zusammensetzung von SNARE-Komplexen sowie die Verteilung der SNAREs in der Membran sind jedoch zu variabel, um allein die Spezifität von Fusionsprozessen in der Zelle zu garantieren (Pelham, 2001). Dieser Beitrag wird von so genannten Anheftungsfaktoren geleistet, einer Gruppe von langen coiled-coil Proteinen sowie mehreren großen Proteinkomplexen (Übersicht Whyte und Munro, 2002). Bevor SNAREs miteinander in Wechselwirkung treten, werden die zu fusionierenden Membranen oft über größere Distanzen hinweg durch Anheftungsfaktoren miteinander verknüpft. Für Fusionsprozesse mit der Vakuole ist der Klasse C-Komplex, auch als HOPS-Komplex bezeichnet (Homotypic vacuole fusion and vacuole protein sorting) von großer Bedeu-

tung. Ursprünglich wurden vier Komponenten aus der Gruppe der Klasse C *vps* Mutanten als Untereinheiten dieses großen Komplexes identifiziert: Pep3, Pep5, Vps16 und Vps33 (Rieder und Emr, 1997). Auf der vakuolären Oberfläche treten zwei weitere Untereinheiten hinzu, Vps41 sowie Vps39. Das letztere ist ein GEF für das vakuoläre Rab Ypt7; gleichzeitig agiert der gesamte Komplex als Effektor für Ypt7 und bindet das vakuoläre SNARE Vam3 (Seals *et al.*, 2000). Diese Bindung geschieht wahrscheinlich durch Vps33, ein Mitglied der so genannten SM-Familie (Sec1/Munc18) SNARE-bindender Protein (Sato 2000, Jahn *et al.*, 2003). Es wird angenommen, dass SM Proteine Anheftungsfaktoren mit SNAREs verknüpfen und damit zur Initiation der Fusionsreaktion beitragen. In der Modellvorstellung rekrutiert Vps39 den HOPS-Komplex zur Vakuole und zum ankommenden Vesikel. Vps39 aktiviert Ypt7, welches seinerseits durch Einwirkung auf den Proteinkomplex die Verknüpfung beider Membranen herbeiführt. Die nachfolgende Aktivierung von Vam3 erlaubt die Ausbildung des SNARE Komplexes und damit die Fusion.

Vam3 gelangt auf dem ALP-Wege direkt vom Golgi zur Vakuolenmembran, anstatt über den endosomalen CPY-Weg transportiert zu werden. Möglicherweise wird so die Funktion von Vam3 als vakuoläres SNARE gewährleistet, denn es wird ein vorzeitiger Kontakt mit den entsprechenden Partner-SNAREs verhindert.

Interessanterweise scheint die Funktion der Klasse C Proteine Pep3 und Pep5 nicht nur auf die Vakuolenmembran beschränkt zu sein; auch beim Transport vom Golgi zu späten Endosomen sowie dem retrograden Transport sind beide Komponenten wahrscheinlich von Bedeutung (Srivastava *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte eine Bindung des Vps33/SM-Proteins an das spätendosomale t-SNARE Pep12 nachgewiesen werden (Subramanian *et al.*, 2004).

Nachdem die Membranfusion abgeschlossen ist, wird das SNARE-Bündel (nun cis-SNARE-Komplex) durch die Wirkung der ATPase NSF (N-ethylmaleimid sensitive factor) und diverser Kofaktoren (SNAPs: soluble NSF-attachment proteins) aufgelöst (Söllner *et al.*, 1993).

### **1.5 Ste6: ein ABC-Transporter als Modellprotein für Endozytose**

Mittels Endozytose nehmen Zellen extrazelluläre und Plasmamembranproteine auf und verpacken diese in Vesikel, welche nachfolgend mit Endosomen fusionieren. Auf diese Weise werden für den Abbau bestimmte Proteine zur Vakuole geleitet. Die Aufnahme flüssiger Substanzen kann in Hefe mit Farbstoffen wie Lucifer Yellow (Riez-

man, 1985) demonstriert werden. Mittels des lipophilen Farbstoffes FM4-64, welcher in die Membran interkaliert, kann der Membrantransport verfolgt werden (Vida und Emr, 1995). Der Umsatz von Zelloberflächenrezeptoren, wie der rasche Abbau nach Ligandenbindung, wurde an den Paarungspheromonrezeptoren der Hefe Ste2 ( $\alpha$ -Faktor-Rezeptor) sowie Ste3 (a-Faktor Rezeptor) analysiert. Für Ste3 konnte sowohl eine liganden-induzierte als auch eine ligandenunabhängige Endozytose beobachtet werden (Davies *et al.* 1993).

Die Knosphefe *S. cerevisiae* tritt in zwei haploiden Formen mit den Paarungstypen *MATa* und *MAT $\alpha$*  auf. Diese beiden Zelltypen treten über entsprechende Peptidpheromone miteinander in Kontakt. Während das  $\alpha$ -Pheromon von  $\alpha$ -Zellen auf sekretorischem Wege im Medium verbreitet wird, nutzen a-Zellen für den a-Faktor die alternative Sekretion über den ABC-Transporter Ste6 (Kuchler *et al.*, 1989; McGarth und Varshavsky, 1989).

Ste6 gehört zu einer großen Familie von Transportern, welche die Energie aus ATP-Hydrolyse zum Durchschleusen von Substraten nutzen, eine Eigenschaft, nach der diese Proteingruppe auch benannt worden ist (ABC = ATP-binding cassette). Die ABC-Proteine können spezifisch für einzelne Substrate sein, wie die Aminosäurepermease in Bakterien oder der Ste6-Pheromontransporter in *S. cerevisiae*. Sie können aber auch ein breites Substratspektrum aufweisen wie das MDR (Multidrug resistance)-Protein der Säugerzellen. Ein typisches ABC-Protein besitzt zwei homologe Membrandomänen, welche jede sechs mal die Membran durchspannen, sowie zwei ATP-Bindungsdomänen, welche dem Zytoplasma zugewandt sind. Die beiden homologen Hälften sind durch die so genannte „Linker“-Region miteinander verbunden.

Trotz seiner Funktion an der Plasmamembran hält sich Ste6 nur vorübergehend dort auf und wird schnell durch Endozytose zur Vakuole transportiert und dort abgebaut (Berkower *et al.*, 1994; Kölling und Hollenberg, 1994). Deswegen wird Ste6 in Immunofluoreszenzexperimenten in internen Strukturen anstatt an der Zelloberfläche beobachtet. Für die Regulation des vakuolären Abbaus von Ste6 (Kölling und Hollenberg, 1994) wie auch von Zelloberflächenrezeptoren (Hicke und Riezman, 1996) hat sich die Modifizierung durch Ubiquitin als unbedingt erforderlich erwiesen. Das kleine (76 AS), hochkonservierte Polypeptid wird kovalent über eine Isopeptidbindung an interne Lysinreste im Substratprotein geknüpft. Bei Ste6 liegt die Ubiquitinierungsstelle innerhalb der „Linker“-Region, in der so genannten A-Box. Gut verstanden ist der Abbau ubiquitiniertes Proteine im Zytoplasma durch das 26S Proteasom, einen großen, ATP-abhängigen, proteolytischen Komplex (Ciechanover, 1994; Hochstrasser, 1996); ein

Abbauweg, über den viele wichtige zelluläre Prozesse gesteuert werden. Ubiquitinierte Membranproteine werden jedoch in der Vakuole abgebaut.

Wie kann die Zelle nun unterscheiden, welche der ubiquitinierten Proteine in der Vakuole und welche vom Proteasom abgebaut werden sollen? Die Proteasom-Erkennung wird durch die Konjugation von Polyubiquitinketten vermittelt. Im Gegensatz dazu scheint der Vakuolentransport lediglich Monoubiuitinierung oder höchstens das Hinzufügen kurzer Ubiquitinketten zu erfordern.

Der intrazelluläre Transport von Ste6 berührt Fragestellungen wie die Regulation des vakuolären Abbaus, die Sortierung in frühen Endosomen und die Aufrechterhaltung der polaren Lokalisation von Zelloberflächenproteinen durch dynamische Prozesse.

## 1.6 Transportmechanismen am frühen Endosom

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Organisation von Komponenten der Transportmechanismen im frühen vakuolären Weg der Knospenhefe. Vps8, eine Klasse D *vps* Funktion, sollte genauer untersucht werden. Die meisten der *vps* Funktionen, welche in Klasse D Mutanten betroffen sind, werden für den Vesikeltransport vakuolärer Proteine vom Golgi-Apparat zu späten Endosomen (PVC) benötigt. Das späte Endosom stellt den Schnittpunkt des Transportweges für vakuoläre Hydrolasen (CPY-Weg) mit dem endozytischen Weg dar. Phänotypisch zeichnet sich ein  $\Delta vps8$  Stamm hauptsächlich durch eine einzige große Vakuole, Defekte in der Sortierung der löslichen vakuolären Hydrolasen CPY und Proteinase A (Pep4) sowie Temperatursensitivität bei 37°C aus. Für den ALP-Weg direkt vom Golgi zur Vakuole wird Vps8 nicht benötigt (Chen und Stevens, 1996). Die Blockierung des CPY-Transportes wird dadurch erklärt, dass Vps10, der CPY-Rezeptor, nicht von den Endosomen zum Trans-Golgi zurückgebracht wird und damit für den CPY-Precursor nicht zur Verfügung steht. Überdies ergaben sich Hinweise auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen Vps8 und der endosomalen Rab-GTPase Vps21 (Horazdovsky *et al.*, 1996). Vps8 könnte daher sowohl für den anterograden als auch den retrograden Transport zwischen Golgi und den Endosomen benötigt werden. Kürzlich publizierte massenspektrometrische Daten (Subramanian *et al.*, 2004) zeigten eine direkte Interaktion von Vps8 mit Komponenten des HOPS-Anheftungskomplexes auf. Im folgenden sollen diese Wechselwirkungen näher beleuchtet und die Rolle von Vps8 bei den endosomalen Transportprozessen charakterisiert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Stämme und Medien

#### 2.1.1 Bakterienstämme

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

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 $\alpha$ F <sup>-</sup>	F <sup>-</sup> ( $\Phi$ 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 <sup>-</sup> ::Tn10 proA <sup>+</sup> B <sup>+</sup> lacIq $\Delta$ (lacZ)M15/recA1 endA1 gy-rA96 (NaIr) 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 Kultivierung von *Escherichia coli* (*E.coli*)

LB-Medium: 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, (bei festen Nährmedien zusätzlich 2% Agar)

Zur Selektion plasmidhaltiger Stämme wurden dem Medium nach dem Autoklavieren 50  $\mu$ g/ml Ampicillin zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C.

#### 2.1.3 Hefestämme

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

Stamm	Genotyp	Referenz / Quelle
#28	MAT $\alpha$ his1	R. Kölling, Düsseldorf
#29	MAT $\alpha$ his1	R. Kölling, Düsseldorf
JD52	MAT $\alpha$ ura3-52 his3- $\Delta$ 200 leu2-3,112 trp1- $\Delta$ 63 lys2-801	Jürgen Dohmen, Köln
JD53	MAT $\alpha$ ura3-52 his3- $\Delta$ 200 leu2-3,112 trp1- $\Delta$ 63 lys2-801	Jürgen Dohmen, Köln
NY0-1	MAT $\alpha$ ura3 his3 leu2 trp1 lys2 ade2::[ARF1 ADE2] arf1::HIS3 arf2::HIS	Aki Nakano (Yahara <i>et al.</i> , 2001)

NY13-1	<i>MATa ura3 his3 leu2 trp1 lys2 ade2::[arf1-13 ADE2] arf1::HIS3 arf2::HIS3</i>	Aki Nakano (Yahara <i>et al.</i> , 2001)
NY16-1	<i>MATa ura3 his3 leu2 trp1 lys2 ade2::[arf1-16 ADE2] arf1::HIS3 arf2::HIS3</i>	Aki Nakano (Yahara <i>et al.</i> , 2001)
NY18-1	<i>MATa ura3 his3 leu2 trp1 lys2 ade2::[arf1-18 ADE2] arf1::HIS3 arf2::HIS3</i>	Aki Nakano (Yahara <i>et al.</i> , 2001)
PJ69-4a	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3, 112 trp1-901 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	(James <i>et al.</i> , 1996)
RKY668	<i>MATa ura3-52 his4 und/oder his6 leu2-3,112 trp1 chc1 ts</i>	Greg Payne
RKY959	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δste6::LEU2</i>	(Losko <i>et al.</i> , 2001)
RKY1510	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 snf7::HIS3</i>	Ralf Kölling, Düsseldorf
RKY1577	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 sec18-1 ts</i>	Ralf Kölling, Düsseldorf
RKY1792	<i>MATa ura3 his3-Δ1 leu2-Δ met15Δ pep5/end1Δ ::kanMX4</i>	EUROSCARF
RKY1843	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 vps8::HIS3</i>	Ralf Kölling, Düsseldorf
RKY1876	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δvps27::kanMX6</i>	Ralf Kölling, Düsseldorf
RKY2088	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 trp1-Δ1 lys2-801a ade2-101 och pik1-63::TRP1</i>	Thorner Lab Strain Collection (JBC, 1999)
RKY2089	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-Δ1 trp1-Δ1 lys2-801a ade2-101 och pik1-83::TRP1</i>	Thorner Lab Strain Collection (JBC, 1999)
RKY1990	<i>MATa ura3 his3-Δ1 leu2-Δ met15Δ Δvps23 (ycl008c) :: kanMX6</i>	EUROSCARF

**Tab. 3:** Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Hefestämme

Stamm	Genotyp
RKY1920	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δvps21::LEU2</i>
RKY1921	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δpep12::kanMX6</i>
RKY1922	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δbro1::kanMX6</i>
RKY1926	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δvps8::HIS3 Δvps21::LEU2</i>
RKY1927	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δvps8::HIS3 Δsnf7::HIS3</i>
RKY1928	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δvps8::HIS3 Δbro1::kanMX6</i>
RKY1930	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δvps8::HIS3</i>



	<i>Δpep12::kanMX6</i>
RKY 1962	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 VPS9-13myc::kanMX6</i>
RKY1963	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 VPS9-13myc::kanMX6</i> <i>Δvps8::HIS3</i>
RKY 2038	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δypt53::kanMX6</i>
RKY2040	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 vps45ts-3</i>
RKY2046	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δvps8::HIS3 PEP5-3HA::kanMX6</i>
RKY2050	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δpep12::kanMX6 VPS9-13myc::HIS3</i>
RKY2051	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δvps21::LEU2 VPS9-13myc::kanMX6</i>
RKY2053	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δvps34::HIS3</i>
RKY2069	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δypt52::HIS3</i> <i>Δypt53::kanMX6</i>
RKY2071	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δypt52::kanMX6</i>
RKY2093	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δvps8::HIS3 Δvps27::kanMX6</i>
RKY2123	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δvps21::LEU2</i>
RKY2124	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δvps21::LEU2 Δypt52::HIS3</i> <i>Δypt53::kanMX6</i>

---

### 2.1.4 Medien und Kultivierung von Hefestämmen

Vollmedium (YEPD)	1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Kohlenstoffquelle
Synthetisches Minimalmedium (SD)	0,67% yeast nitrogen base w/o aminoacids, 2% Kohlenstoffquelle Aminosäuren und Basen wurde wie folgt zugegeben: 1% Casein-Hydrolysat 30 µg/ml Uracil, Adenin, Histidin, Tryptophan, Methionin, Lysin, Leucin

Als Kohlenstoffquelle wurden 2% Glukose, Galaktose, Raffinose oder 2% Glycerin/Ethanol verwendet. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 2% Agar.

Zur Selektion auf genetische Marker wurde die entsprechende Aminosäure / Base weggelassen; oder aber es wurden Chemikalien / Antibiotika, gegen die eine Resistenz vorlag hinzugefügt. Zur Selektion auf Kanamycin-Resistenz wurde G418 (Geneticin, Konz. 200 mg/l) eingesetzt.

Die Kultivierung der Hefen erfolgte bei 30°C. Temperatursensitive Stämme wurden in der Regel bei 25°C angezogen und dann kurzzeitig (für bis zu 1h) bei nichtpermissiver Temperatur (meistens 37°C) inkubiert.

## 2.2 Plasmide

**Tab. 4:** Verwendete Plasmide

Plasmid	Quelle / Referenz	Beschreibung
pFA6a-HisMX6	Longtine <i>et al.</i> , 1998	PCR-Template zur Gendeletion, <i>S. pombe his5<sup>+</sup></i> -Marker
pFA6a-kanMX6	Longtine <i>et al.</i> , 1998	PCR-Template zur Gendeletion, <i>kanMX6</i> -Marker
pFA6a-3HA-kanMX6	Longtine <i>et al.</i> , 1998	PCR-Template für C-terminales Tagging mit 3HA, <i>kanMX6</i> -Marker
pFA6a-13myc-kanMX6	Longtine <i>et al.</i> , 1998	PCR-Template für C-terminales Tagging mit 13myc, <i>kanMX6</i> -Marker
p414	Mumberg <i>et al.</i> , 1994	<i>CEN/ARS</i> -Plasmid mit <i>TRP1</i> -Marker, <i>GAL1p</i>
pACT2	Ralf Kölling, Düsseldorf	GAL4-aktivierende Domäne für 2-Hybrid Fusion, <i>LEU2</i> -Plasmid
pRCP56	Tom Stevens (Piper <i>et al.</i> , 1994)	Integrationsplasmid mit <i>vps45-ts-3</i> Allel, <i>URA3</i> -Marker
pRK69	Ralf Kölling, Düsseldorf	6,2 kb chromosomales <i>STE6</i> Fragment <i>BglIII/SalI</i> in den 2 $\mu$ -Vektor YEp429 kloniert( Ma <i>et al.</i> , 1987), <i>TRP1</i>

pRK274	Ralf Kölling, Düsseldorf	Integrationsplasmid für <i>VPS21</i> -Disruption, <i>LEU2</i> -Marker
pRK327	Ralf Kölling, Düsseldorf	Integrationsplasmid für <i>VPS27</i> -Disruption, <i>kan<sup>R</sup></i>
pRK329	Ralf Kölling, Düsseldorf	GAL4-Bindedomäne für 2-Hybrid Fusion, <i>TRP1</i> -Plasmid
pRK717	Ralf Kölling, Düsseldorf	<i>CEN</i> -Vektor (YCplac33) mit 13myc-Tag, <i>URA3</i> -Marker
pRK722	Ralf Kölling, Düsseldorf	$2\mu$ -Vektor (YEplac195) mit 13myc-Tag, <i>URA3</i> -Marker
pRK736	Ralf Kölling, Düsseldorf	<i>S.c.</i> 4,6 kb <i>STE6-3HA</i> Fusion, $2\mu$ -Vektor, <i>URA3</i> -Marker
YCplac33	Gietz and Sugino, 1988	<i>CEN/ARS</i> -Plasmid mit <i>URA3</i> -Marker
YEpl112	Hochstrasser <i>et al.</i> , 1991	<i>CUP1p</i> -HA-Ub in $2\mu$ -Plasmid mit <i>TRP1</i> -Marker
YEplac112	Gietz and Sugino, 1988	$2\mu$ -Plasmid mit <i>TRP1</i> -Marker
YEplac195	Gietz and Sugino, 1988	$2\mu$ -Plasmid mit <i>URA3</i> -Marker
pYKS2	Kuchler <i>et al.</i> , 1993	$2\mu$ - <i>URA3</i> Plasmid mit <i>STE6</i> -c-myc. Das Tag befindet sich intern ( <i>Spe1</i> , erster externer Loop)

**Tab.5:** Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pRK827	<i>S.c.</i> 4,4 kb <i>VPS8</i> PCR-Fragment <i>Sac1/BamH1</i> in pRK717, sequenziert; Vps813myc, <i>CEN</i>
pRK828	<i>S.c.</i> 4,4 kb <i>VPS8</i> PCR-Fragment <i>Sac1/BamH1</i> in 722, sequenziert; Vps813myc, $2\mu$
pRK863	Vps8 $\Delta$ 916-1067-13myc; <i>S.c.</i> 1,3 kb <i>VPS8</i> -PCR-Fragment <i>Xba1/Asp718</i> in pRK827
pRK864	Vps8 $\Delta$ 520-668-13myc, $\Delta$ 916-1067; <i>S.c.</i> 762 <i>VPS8</i> -PCR-Fragment <i>Xba1/Asp718</i> in pRK827
pRK868	Vps8 $\Delta$ 520-668-13myc; <i>S.c.</i> 1,8 kb <i>VPS8</i> -PCR-Fragment <i>Xba1/BamH1</i> in pRK827

---

pRK902	Vps8 $\Delta$ 100-168-13myc; <i>S.c.</i> 2297 bp <i>VPS8</i> $\Delta$ WD40 Assembly-PCR Fragment <i>Xba</i> 1/ <i>Sac</i> 1 in pRK827
pRK906	<i>S.c.</i> 4,6 bp <i>STE6-3HA</i> -Fragment aus pRK736 <i>Sac</i> 1/ <i>Sal</i> 1 in YE-plac112
pRK933	<i>VPS21</i> S21N Mutagenese (Primer #987/ 988), <i>CEN/ARS</i> -Plasmid mit <i>TRP</i> -Marker, sequenziert
pRK934	<i>VPS21</i> S21N-Mutagenese (Primer #987/ 988), 2 $\mu$ -Plasmid mit <i>TRP</i> -Marker, sequenziert
pRK935	<i>VPS21</i> Q66L-Mutagenese (Primer #989/ 990), <i>CEN/ARS</i> -Plasmid mit <i>TRP</i> -Marker, sequenziert
pRK936	<i>VPS21</i> Q66L-Mutagenese (Primer #989/ 990), 2 $\mu$ -Plasmid mit <i>TRP</i> -Marker, sequenziert
pRK972	<i>S.c.</i> 1,7 kb <i>VPS21</i> PCR-Fragment (Primer#985/ 986), <i>Xba</i> 1/ <i>Pst</i> 1 in YCplac22
pRK973	<i>S.c.</i> 1,7 kb <i>VPS21</i> PCR-Fragment (Primer#985/ 986), <i>Xba</i> 1/ <i>Pst</i> 1 in YEplac112
pRK978	<i>GAL-BD-VPS8</i> Fusion für 2-Hybrid; <i>S.c.</i> 4,2 kb <i>VPS8</i> -PCR-Fragment <i>Bam</i> H1/ <i>Sal</i> 1 in pRK329
pRK979	<i>GAL-AD-VPS8</i> -Fusion für 2-Hybrid; <i>S.c.</i> 4,2 kb <i>VPS8</i> -PCR-Fragment <i>Bam</i> H1/ <i>Xho</i> 1 in pACT2
pRK990	Verkürzte Vps8-Form: 1-253 AS; <i>S.c.</i> 1389 bp <i>VPS8</i> -PCR-Fragment, <i>Sac</i> 1/ <i>Sca</i> 1 in pRK717, <i>Sca</i> 1 in <i>Bam</i> H1
pRK992	Verkürzte Vps8-Form: 1-393 AS; <i>S.c.</i> 1809 bp <i>VPS8</i> -PCR-Fragment <i>Sac</i> 1/ <i>Sca</i> 1 in pRK717, <i>Sca</i> 1 in <i>Bam</i> H1
pRK995	<i>S.c.</i> 1872 bp <i>SAC1</i> PCR-Fragment, <i>Sal</i> 1/ <i>Spe</i> 1 in p414- <i>GALI</i> -Vektor
pRK999	Vps8 $\Delta$ 69-162-13myc-Variante; 2-Wege-Ligation von 1: <i>S.c.</i> 841 bp <i>VPS8</i> -PCR-Fragment und 2: 3354- <i>VPS8</i> -PCR-Fragment <i>Sac</i> 1/ <i>Bam</i> H1 in pRK717
pRK1000	Verkürzte Vps8-Form: 1-68 AS; <i>S.c.</i> 841 <i>VPS8</i> -PCR-Fragment <i>Sac</i> 1/ <i>Sca</i> 1 in pRK717 ( <i>Sca</i> 1 in <i>Bam</i> H1)
pRK1002	<i>VPS21-GAL4BD</i> für 2-Hybrid. <i>S.c.</i> 781 bp <i>VPS21</i> PCR-Fragment (Primer #1109, 1110), <i>Bam</i> H1/ <i>Sal</i> 1 in pRK329

---

pRK1003	<i>YPT53-GAL4</i> BD für 2-Hybrid. <i>S.c.</i> 819 bp <i>YPT53</i> -PCR-Fragment (Primer #1113, 1114), <i>Bam</i> H1/ <i>Sal</i> 1 in pRK329
pRK1015	Vps8 „VHS“-Domäne: 164-339 AS. <i>S.c.</i> <i>VPS8</i> Assembly PCR: 1: 624 bp (Primer #797, 1129), 2 : 558 bp (Primer #1130, 1131 ), Fragment 1+2, 1,2 kb ( <i>Sac</i> 1/ <i>Bam</i> H1 in pRK717)
pRK1024	<i>YPT52-GAL4</i> -BD Fusion für 2-Hybrid. 967 bp <i>YPT52</i> PCR-Fragment (Primer #1112, 1128), <i>Bam</i> H1, <i>Sal</i> 1 in pRK329
pRK1030	Vps8 $\Delta$ RING-Gal4AD Fusion für 2-Hybrid. <i>S.c.</i> 3,6 kb <i>VPS8</i> -PCR Fragment (Primer #1077, 1141, template pRK858), <i>Bam</i> H1/ <i>Xho</i> 1 in pACT2
pRK1031	Vps8 $\Delta$ WD40-Gal4AD Fusion für 2-Hybrid. <i>S.c.</i> 3,7 kb <i>VPS8</i> PCR-Fragment (Primer # 1077, 1142, Template pRK902 ), <i>Bam</i> H1/ <i>Xho</i> 1 in pACT2
pRK1032	Vps8 $\Delta$ CHCR1+2-Gal4AD Fusion für 2-Hybrid. <i>S.c.</i> 2,8 kb <i>VPS8</i> PCR-Fragment (Primer # 1077, 1142, Template pRK864), <i>Bam</i> H1/ <i>Xho</i> 1 in pACT2
pRK1033	Vps8 $\Delta$ PX-Gal4AD Fusion für 2-Hybrid. <i>S.c.</i> 3,5 kb <i>VPS8</i> PCR-Fragment (Primer # 1077, 1142, Template 1006), <i>Bam</i> H1/ <i>Xho</i> 1 in pACT2
pRK1034	Vps8 $\Delta$ PXA -Gal4AD Fusion für 2-Hybrid. <i>S.c.</i> 3,3 kb <i>VPS8</i> PCR-Fragment (Primer # 1077, 1142, Template 1007), <i>Bam</i> H1/ <i>Xho</i> 1 in pACT2
pRK1035	Vps8 $\Delta$ EFF-Gal4AD Fusion für 2-Hybrid. <i>S.c.</i> 3,7 kb <i>VPS8</i> PCR-Fragment (Primer # 1077, 1142, Template 1008), <i>Bam</i> H1/ <i>Xho</i> 1 in pACT2
pRK1038	Vps8- $\Delta$ VHS-Variante. 2-Wege Ligation 1: <i>S.c.</i> 1,1 kb <i>VPS8</i> -PCR Fragment (Primer # 797, 1143), <i>Sac</i> 1/ <i>Sal</i> 1 und 2: 2,8 kb <i>VPS8</i> -PCR Fragment (Primer #798, 1144) <i>Sal</i> 1, <i>Bam</i> H1. <i>Sac</i> 1/ <i>Bam</i> H1 in pRK717
pRK1045	Vps8- $\Delta$ CHCR2-Gal4AD für 2-Hybrid. <i>S.c.</i> 3,3 kb <i>VPS8</i> -Fragment (Primer # 1077, 1142, Template pRK863) <i>Bam</i> H1/ <i>Xho</i> 1 in pACT2
pRK1047	Vps8- $\Delta$ 69-162-Gal4AD für 2-Hybrid. <i>S.c.</i> 3,5 kb <i>VPS8</i> -Fragment (Primer # 1077, 1142, Template pRK863) <i>Bam</i> H1/ <i>Xho</i> 1 in pACT2
pRK1051	Vps8- $\Delta$ CHCR1-Gal4AD für 2-Hybrid. <i>S.c.</i> 3,3 kb <i>VPS8</i> -Fragment (Primer # 1077, 1142, Template pRK863) <i>Bam</i> H1/ <i>Xho</i> 1 in pACT2

---

## 2.3 Synthetische Oligonukleotide

**Tab. 6:** Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligo	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
#797	CCCGAGCTCAAGCATTGAAGAAGACGA	<i>VPS8</i> upstream mit SacI-Schnittstelle
#798	CCCGGATCCCTACTATTTTTGGGTTAGA	<i>VPS8</i> BamHI downstream vor STOP
#844	CTGGGTGCTTATGGAGGGCC	<i>VPS8</i> Sequenzierprimer 1
#845	GAGGCTTTTGGCAGTTGGTG	<i>VPS8</i> Sequenzierprimer 2
#846	GCACCCCAACATGACTTCA	<i>VPS8</i> Sequenzierprimer 3
#847	TGAAGGACAACGCGGTATAT	<i>VPS8</i> Sequenzierprimer 4
#848	TGGCCGTCGAACAGCAATCA	<i>VPS8</i> Sequenzierprimer 5
#849	TCTGGAGTCGCTTTTACCCT	<i>VPS8</i> Sequenzierprimer 6
#850	CAAGAGCAAAAGGAAATGA	<i>VPS8</i> Sequenzierprimer 7
#851	TGAGCACCAAGACGTTATTT	<i>VPS8</i> Sequenzierprimer 8
#852	ACTGGAGCATTACTAGGTTCACTACTCACTGGT-TCTACTCCGGATCCCCGGGTTAATTAA	F1 Deletion <i>BRO1</i>
#853	AAAAAAAAGCTACAATAAAATTAAGAAATAA-GAAATGCACGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 Deletion <i>BRO1</i>
#854	CCTTATGCCTTCCCTTTT	$\Delta bro1$ Verifikation upstream
#855	GATGACGATTGGGAGACA	$\Delta bro1$ Verifikation reverse
#856	AGAAGAATATAACGTAAATTACTACAATAATTG-TGTTGAGCGGATCCCCGGGTTAATTA	F1 Deletion <i>PEP12</i>
#857	TATTATGTATATGATATTTGACGACGTGTGTTG-GTTTGGTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 Deletion <i>PEP12</i>
#858	TTGAGTGCGAAGGGAATA	$\Delta pep12$ Verifikation forward
#859	TCTCTTTGCGGCTGGTTA	$\Delta pep12$ Verifikation reverse
#883	TATTGGGCCCTGTGTTGATGCTCTACTTTCTCT-GTCAGAACGGATCCCCGGGTTAATTAA	<i>VPS9</i> tag F2

#884	TATTGCTAGGCTACTCTATACATGAAATATGTG-CATGAGAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	<i>VPS9</i> tag R1
#885	AAGATGGTTTGCGTTTTG	<i>VPS9</i> tag Verifikation forward
#886	GTTTGCGTTGGTGCTGAA	<i>VPS9</i> tag Verifikation reverse
#911	TTTAGGTAGAGGTGCCATCAGTTATTCTGACAT CACTATTCGGATCCCCGGGTTAATTAA	<i>PEP5</i> tag F2
#912	CATTTGTGACGCGGCGGCGACAATAGATCGTTA TGATCCAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	<i>PEP5</i> tag R1
#913	GAGGGGAAAGAATGCCA	<i>PEP5</i> tag Verifikation forward
#914	TTGCTCAGGCTCTCCACT	<i>PEP5</i> tag Verifikation reverse
#985	CCCCTGCAGGTATCGGCATTGGTAAGT	<i>VPS21 Pst1</i> -forward
#986	CCCTCTAGAAGATGATGCTGGTGAAGA	<i>VPS21 Xba1</i> -reverse
#987	GCAGCAGTTGGTAAAA <b>AACT</b> CAAT <b>AGTACTA</b> AG- GTTTGTATCTAAT	<i>VPS21</i> S21N forward mit <i>Sca1</i> Schnittstelle
#988	ATTAGATACAAACCTTAG <b>TACT</b> ATTGAG <b>TTTT</b> - TACCAACTGCTGC	<i>VPS21</i> S21N reverse mit <i>Sca1</i> Schnittstelle
#989	ATATGGGACACT <b>GCCGGCCTGG</b> GAGAGATTTG- CATCTTA	<i>VPS21</i> Q66L forward mit <i>Nae1</i> Schnittstelle
#990	TAAAGATGCAAATCTCT <b>CCAGGCCGG</b> - CAGTGTCCCATAT	<i>VPS21</i> Q66L reverse mit <i>Nae1</i> Schnittstelle
#1041	GGTTAACTTATTTGGAGTAAACGTATATAT- TATTAACAGCGGATCCCCGGGTTAATTAA	F1 <i>YPT52</i> Deletion
#1042	ACTTCTGTTGTTTTCTCTAAACACAAATCA- TAGGATAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 <i>YPT52</i> Deletion
#1045	AATTATTTATTACATTTTTTTCAGCATCGAAGT- TAAGTAGACGGATCCCCGGGTTAATTAA	F1 <i>YPT53</i> Deletion
#1046	ACGCTGAATATGCCGCGTTTGCTGTTGTTTTGC TTGCAGTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 <i>YPT53</i> Deletion
#1047	CCAACCATACCCTAAAAT	$\Delta$ <i>ypt53</i> Verifikation forward
#1048	TTGCGGCTAATGGAAGTG	$\Delta$ <i>ypt53</i> Verifikation reverse
#1049	AAGCAAGATCGTCGACTT	<i>VPS21</i> seq1
#1069	CATCTCCGTGAAGCATTGAGGGAAGGGTTTAAAC TCCAACACGGATCCCCGGGTTAATTAA	F1 <i>VPS34</i> Deletion
#1070	GTGACGAAATTTAAATTTGAAGCACCAATTAT- CAACCAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAc	R1 <i>VPS34</i> Deletion

---

#1071	ATACGGACTGGCGAATAC	<i>Δvps34</i> Verifikation forward
#1072	TACGATGCTGCCGACTTG	<i>Δvps34</i> Verifikation reverse
#1073	TGAGACCAAACGGCAACT	<i>Δypt52</i> Verifikation forward
#1074	TTGGTGAGTTTGCTGACA	<i>Δypt52</i> Verifikation reverse
#1077	CCC <u>GGATCCC</u> GATGGAGCAAATGGCCTT	<i>VPS8</i> forward <i>BamH1</i> 2-Hybrid
#1078	CCC <u>CTCGAGT</u> CTCGTTTATGGGTGAA	<i>VPS8</i> reverse <i>Xho1</i> 2-Hybrid
#1079	CCC <u>GTCGACT</u> CTCGTTTATGGGTGAA	<i>VPS8</i> reverse <i>Sal1</i> 2-Hybrid
#1088	CCC <u>ACTAGT</u> TATGACAGGTCCAATAGTG	<i>SAC1 pGAL1 Spe1</i> forward
#1089	CCC <u>GTCGACT</u> TAATCTCTTTTTAAAGG	<i>SAC1 pGAL1 Sal1</i> reverse
#1090	CCC <u>AGTACT</u> TACGGATTCGGAGCCTTG	<i>VPS8</i> Fragment für pRK999, <i>Sca1</i> reverse
#1091	CCC <u>AGTACT</u> GTAGGGTATAGAGTGAAA	<i>VPS8</i> Fragment für pRK999, <i>Sca1</i> forward
#1092	CCC <u>AGTACT</u> TGACCTTATTAATTTCTC	<i>VPS8</i> Fragment für pRK990, <i>Sca1</i> reverse
#1109	CCC <u>GGATCCC</u> GAAAATGAACACATCAGTC	<i>VPS21</i> 2-Hybrid-BD <i>BamH1</i> forward
#1110	CCC <u>GTCGAC</u> AGAAAAACAACGATTACG	<i>VPS21</i> 2-Hybrid-BD <i>Sal1</i> reverse
#1112	CCC <u>GTCGACA</u> AATAGGGTGAACGAAAAA	<i>YPT52</i> 2-Hybrid-BD <i>Sal1</i> reverse
#1113	CCC <u>GGATCCC</u> GATGGATAAACATACAGCA	<i>YPT53</i> 2-Hybrid-BD <i>BamH1</i> forward
#1114	CCC <u>GTCGAC</u> GGCTAATGGAAGTGAAAC	<i>YPT53</i> 2-Hybrid-BD <i>Sal1</i> reverse
#1117	CCC <u>GTCGACC</u> ATCAAATCGTGAATCAG	<i>VPS8</i> Px-Deletion <i>Sal1</i> reverse
#1118	CCC <u>GTCGACT</u> CCCCTATCTTTCATAGC	<i>VPS8</i> PxA-Deletion <i>Sal1</i> reverse
#1119	CCC <u>GTCGACA</u> AATGCCGACTACAATAGG	<i>VPS8</i> Px-Deletion <i>Sal1</i> forward
#1120	CCC <u>GTCGACC</u> AGCAAAGTATTTGGAT	<i>VPS8</i> PxA-Deletion <i>Sal1</i> forward
#1121	CCC <u>GTCGACT</u> CGCAAGATCTTGTTCAA	<i>VPS8</i> Effektor-Deletion <i>Sal1</i> forward



#1128	CCCGGATCCCGCAGATGTTGCAATTTAAACTA	<i>YPT52</i> 2-Hybrid-BD <i>BamH1</i> for
#1129	<b>C</b> ATTCTAGGTGTAATGAGTA	VHS-Domäne reverseSTART
#1130	CTCATTACACCTAGA <b>A</b> TGGTAGGGTATAGAGT-GAAA	VHS-Domäne forward START
#1131	CCCGGATCCCGGACTGAACATTGAAGTC	VHS-Domäne reverse ENDE <i>BamH1</i>
#1141	CCCCTCGAGTTATTCGCAGTCGTCGGTGTG	<i>VPS8</i> delRING reverse <i>Xho1</i> 2-Hybrid
#1142	CCCCTCGAGTTATACTATTTTTGGGTT	<i>VPS8</i> Deletionen reverse <i>Xho1</i> -2-Hybrid
#1143	CCCGTCGACGTTCAAGTTCCAAATGCA	VHS Deletion reverse <i>Sal1</i>
#1144	CCCGTCGACGCTAGCCATTCTCCTGAA	VHS Deletion forward <i>Sal1</i>
#1150	CCCGTCGACTACGGATTCCGGAGCCTTG	Vps8 1-67 AS reverse <i>Sal1</i>

## 2.4 Chemikalien und Enzyme

<u>Hersteller</u>	<u>Produkt</u>
Acros	Lysin, Natriumthiosulfat, Natriucarbonat, Glycin
Amersham	Amplify, ProteinA-Sepharose
Axis-Shield	Optiprep™
Bio-Rad	Bio-Rad protein assay reagens (Bradford-Assay)
Braun-Melsungen	Glasperlen 0,45 µm Ø
Caesar & Loretz	Glukose
Calbiochem	G418 (Geneticin)
Difco	Bacto Agar, Casaminoacids, Pepton, Trypton, Yeast Extract, Yeast Nitrogen Base
Fermentas	λ-Phagen DNA
Fluka	Formaldehyd, Histidin
Fuji	X-Ray Filme
Gibco BRL	Agarose, Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase, T4-Ligase-Puffer
ICN	Tran <sup>35</sup> S-Label™, NBT
J.T. Baker	CaCl <sub>2</sub> , NaCl, NaOH, PEG4000, Kaliumacetat
Kodak	X-Ray Filme

Life Technologies	G418/ Geneticin
Merck	APS, EDTA, TEMED, DMF, HEPES, Leucin, Adenin,, Methionin
New England Biolabs	Restriktionsenzyme, BSA
PCR Inc.Florida	5-FOA
Qiagen	QIAprep <sup>®</sup> Spin Miniprep/ Midiprep Kit (250), QIAquick <sup>®</sup> Gel Extraction Kit (250), QIAquick <sup>®</sup> PCR Purification Kit (250)
Ridel-de-Haen	Essigsäure, Harnstoff, Natriumazid
Roche	Alkaline Phosphatase, Restriktionsendonukleasen, BCIP, Expand Long PCR System, Lumi-Light Western Blotting Substrat, Hering Sperm DNA
Roth	DTT, Gel 30 Acrylamid, DMSO, Glycin, Lysin, Tryptophan
Schleicher & Schuell	Nitrocellulosemembran, Membranfilter 45µm
Seikagaku Kogyo	Zymolyase
Co.Ltd	
Serva	Glycerin, SDS, Ethidiumbromid, Triton X-100, Tween 20, Coomassie
Sigma	Ampicillin, Lithiumacetat, Ponceau S, Prestained Molecular Weight Standard, Saccharose, BSA (IgG-frei), TRIS-Base, Sorbitol, Uracil
Thermo Hybaid	Synthetische Oligonukleotide
Whatman	3 MM Papier

## 2.5 Antikörper

<u>Monoklonale Antikörper (Maus)</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Quelle</u>
anti-ALP	1 : 200	Molecular Probes
anti-c-myc (9E10)	1 : 1000	BAbCO (Berkley Antibodies Co.)
anti-Dpm1	1 : 500	Molecular Probes
anti-Hämagglutinin (HA)	1 : 500	BAbCO (Berkley Antibodies Co.)
anti-Ubiquitin	1 : 200	Covance
anti-Pep12	1 : 1000	Molecular Probes
anti-Gal4-AD	1 : 1000	BD Biosciences

### Polyklonale Antikörper (Kaninchen)

anti-CPY	1 : 1000	D. Wolff, Stuttgart
anti-Pma1	1 : 1000	R. Kölling, Düsseldorf
anti-Ste6	1 : 200	R. Kölling, Düsseldorf
anti-Emp47	1 : 5000	S. Schröder-Köhne
anti-Vps27	1 : 500	S. Losko, Düsseldorf

anti-PFK	1 : 5000	J. Heinisch, Osnabrück
anti-PGK	1 : 5000	Molecular Probes

### Sekundärantikörper

anti-Maus, Phosphatase-konjugiert	1:5000	Dianova
anti-Kaninchen, Phosphatase-konjugiert	1:5000	Dianova
anti-Maus, Peroxidase-konjugiert	1:5000	Dianova
anti-Kaninchen, Peroxidase-konjugiert	1:5000	Dianova
anti-Maus, FITC konjugiert	1:5000	Dianova

## 2.6 Transformation

### 2.6.1 Transformation von *Escherichia coli*

Die Transformation RbCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde nach Hanahan, 1985 durchgeführt.

### 2.6.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation von Hefezellen wurde nach der Lithiumacetat-Methode durchgeführt (Ito *et al.*, 1983). 5 ml einer Kultur mit OD<sub>600</sub> von 0,5-1,0 wurden abzentrifugiert, mit 0,1 M LiOAc-Lsg. gewaschen und in 100 µl 0,1 M LiOAc resuspendiert. Daraufhin wurden 300 µl 50%igen PEG4000 und 40 µl 1 M LiOAc-Lsg. zugegeben. Die Zugabe von Plasmid-DNA (etwa 1 µg) erfolgte zusammen mit Carrier-DNA (Heringssperma DNA, 10 mg/ml). Die Ansätze wurden für 30 min bei 30°C inkubiert, dann einmal mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gewaschen, in 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aufgenommen und auf Selektivmedium ausgestrichen.

Bei Transformationen für Genomintegration (meist PCR-Fragmente) wurde den Zellen nach der Inkubation ein 20 min Hitzeschock (42°C) gegeben.

Zellen, die eine Kanamycin-Resistenz erwerben sollten, wurden vor dem Ausplattieren im Vollmedium aufgenommen und für weitere 2 h bei 30°C inkubiert.

## **2.7 Präparation von DNA**

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

Die Plasmidisolierung erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse (Maniatis *et al.*, 1982, modifiziert).

Für die Restriktionsanalyse wurden 200 ng der isolierten Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl geschnitten (37°C, 4 h bis ÜN).

Hochreine Plasmid-DNA für Klonierungen und Sequenzierungen wurde mit dem QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (250) nach Angaben des Herstellers isoliert.

### **2.7.2 Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae* für Test-PCR**

Eine mittelgroße Hefekolonie wurde gepickt und in 25 µl einer 20 mM NaOH resuspendiert. Der Aufschluß erfolgte durch 1 min Erhitzen in der Mikrowelle und anschließendes kräftiges Schütteln (vibrax). Nachdem sich die Zellreste abgesetzt haben, konnte der Überstand (meist 1 µl davon) für die PCR-Reaktion eingesetzt werden.

## **2.8 Enzymatische Modifikation von DNA**

### **2.8.1 DNA Restriktion**

Das Schneiden von DNA erfolgte mit 1 U Enzym pro µg DNA. Der Ansatz wurde 4 h oder ÜN bei 37°C (wenn vom Hersteller nicht anders empfohlen) inkubiert. Die benötigten Restriktionspuffer stammen ausschließlich von der Firma New England Biolabs.

### **2.8.2 Entfernen von überstehenden 3`-Enden**

3`-Überhänge wurden nach der von Maniatis *et al.* (1982) beschriebenen Methode mit T4-DNA Polymerase (2,5 U pro  $\mu\text{g}$  DNA) entfernt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 16°C in T4 Polymerasepuffer mit 0,1 mM dNTPs inkubiert.

### **2.8.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP). Hierzu wurde nach erfolgter Restriktion 1 U CIP zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. Meist folgte darauf eine Aufreinigung über ein Agaro-segel (2.10); andernfalls wurde der Ansatz bei -20°C eingefroren.

### **2.8.4 DNA Ligation**

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit 100 ng dephosphorylierter Vektor-DNA und der zweifachen molaren Menge Insert-DNA in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$ . Für die Ligation wurde Ligasepuffer der Firma Gibco BRL sowie 1 U T4-Ligase verwendet. Der Ansatz wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

Für 2-Wege-Ligationen wurden äquimolare Mengen des Vektors und der zu klonierenden Insertfragmenten eingesetzt.

## **2.9 PCR-Amplifizierung**

Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde das „Expand High Fidelity“ System der Firma Roche sowie der „Primus 25/96 Thermocycler“ der Firma MWG Biotech verwendet. Die Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 25-50  $\mu\text{l}$  durchgeführt. Die Amplifikation von Genen für Klonierungen erfolgte durch die PfuUltra DNA-Polymerase von Stratagene, welche eine besonders hohe Genauigkeit verspricht.

### 2.9.1 Spezifische Amplifizierung von Plasmid-DNA

Jeder Reaktionsansatz enthielt 1/10 10x 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.

Es wurde folgender Temperaturzyklus verwendet:

- |    |          |                                |             |
|----|----------|--------------------------------|-------------|
| 1. |          | Denaturieren der DNA           | 4 min 94°C  |
| 2. | 25 - 35x | Denaturieren der DNA           | 30 sec 94°C |
|    |          | Bindung der Primer (Annealing) | 1 min 55°C  |
|    |          | DNA-Synthese (Elongation)      | X min 68°C  |
| 3. |          | DNA-Synthese (Elongation)      | 10 min 68°C |

Die Annealing-Temperatur, die Elongationszeit sowie die Anzahl der Syntheseschritte wurde an die spezifischen Schmelztemperaturen der Primer und an die Größe des erwarteten PCR Produktes angepaßt (1 min/kb).

### 2.9.2 Amplifizierung chromosomaler/Plasmid DNA mit Pfu-Ultra-Polymerase

Jeder Reaktionsansatz enthielt 1/10 10x Pfu-Ultra-Puffer, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, je 2 μM der entsprechenden Oligonukleotide, 200 μM dNTP-Mix, 1 ng chromosomale DNA und 1 U Enzym.

Es wurde folgender Temperaturzyklus verwendet:

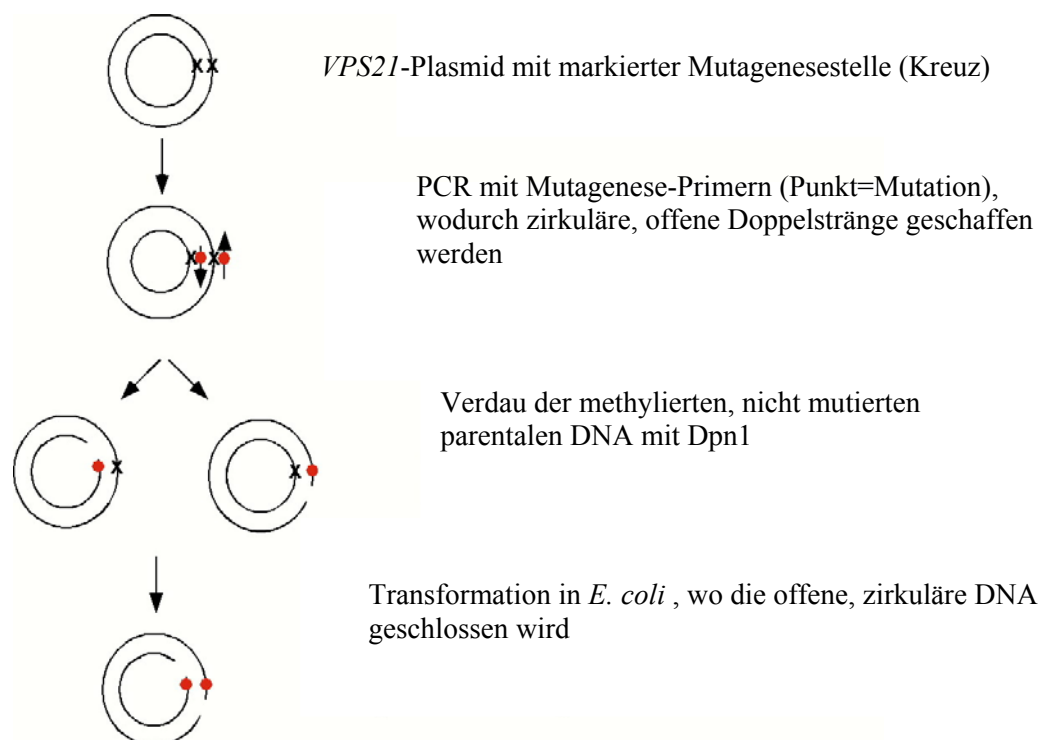
- |    |         |                                |             |
|----|---------|--------------------------------|-------------|
| 1. |         | Denaturieren der DNA           | 4 min 94°C  |
| 2. | 20-30 x | Denaturieren der DNA           | 1 min 94°C  |
|    |         | Bindung der Primer (Annealing) | 1 min 55°C  |
|    |         | DNA-Synthese (Elongation)      | X min 72°C  |
| 3. |         | DNA-Synthese (Elongation)      | 10 min 72°C |

Auch bei diesem Protokoll wurden die Bedingungen reaktionsspezifisch angepaßt. Für die Elongationszeit gilt: 2 min/kb)

### 2.9.3 Test-PCR (Amplifizierung chromosomaler DNA)

Die PCR-Reaktionen wurden mit Puffer 2, unter Zugabe von 4 mM MgCl<sub>2</sub>, je 2 µM der entsprechenden Oligonukleotide, 200 µM dNTP-Mix, 1 ng chromosomale DNA und 1 U Enzym durchgeführt. Als Template diente der Überstand der „NaOH“-Zellen (2.7.2). Das Programm entsprach dem aus (2.9.1), die Elongationszeit und die Annealing-Temperatur wurden reaktionsspezifisch angepaßt.

### 2.9.4 PCR-Mutagenese



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der QuickChange™-Punktmutagenese.

Das QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit wird für die Erzeugung von Punktmutationen, Aminosäure-Austauschen und die Deletion oder Insertion einzelner

Aminosäuren eingesetzt. In einer PCR-Reaktion wird das doppelsträngige Plasmid mit entsprechendem Insert amplifiziert. Dabei werden Oligonukleotide verwendet, welche die gewünschte Mutation besitzen. Als Produkte entstehen Plasmide mit der entsprechenden Mutation. Durch Restriktion mit *DpnI*, welches nur methylierte DNA schneidet, wird die parentale, nicht mutagenisierte DNA entfernt. Die durch die PCR-Amplifikation entstandenen Lücken der mutagenisierten Plasmide werden nach einer Transformation in *E. coli* repariert. Durch eine zusätzlich eingefügte Schnittstelle an der Mutagenese-Stelle können schließlich korrekte Plasmide identifiziert werden.

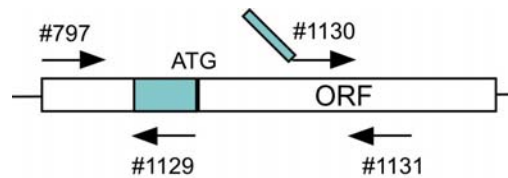
### 2.9.5 Gen-Tagging und –Deletionen mit Hilfe von PCR-Kassetten

Die Deletion bzw. das Tagging von Genen erfolgte durch die von Longtine *et al.* (2002) beschriebene Methode. Dazu wurden 60mere Oligonukleotide konstruiert, deren 3'-Enden die Amplifikation eines Selektionsmarkers erlaubten, der auf einem Plasmid vorliegt. Die 5'-Enden wurden so gewählt, dass sie genspezifisch waren und eine homologe Rekombination des synthetisierten PCR-Fragments in Hefe erlaubten. Die PCR-Reaktion wurde laut Angaben durchgeführt (Longtine *et al.*, 2002). Zur Rekombination wurden die PCR-Produkte direkt in Hefe transformiert.

### 2.9.6 Assembly-PCR

Um zwei getrennt liegende Sequenzbereiche zu einem Konstrukt zusammenzuführen wird die Assembly-PCR verwendet. In einer Primär-PCR werden die beiden Fragmente amplifiziert, so dass eines der Fragmente ein zum anderen Fragment komplementäres Ende erhält. Auf diese Weise ist es möglich, dass in der darauffolgenden Sekundär-PCR ein Fragment als Primer für das andere dient und somit ein Hybrid aus beiden Fragmenten amplifiziert wird. Beispielhaft ist die Konstruktion der „VHS“-myc Variante von *Vps8* dargestellt (Abb. 3).





**Abb. 3:** Konstruktion der VHS-myc-Variante von Vps8. Mit Hilfe einer „Assembly PCR“ wurden einzeln amplifizierte DNA-Fragmente verknüpft, indem durch Primer #1130 ein homologer Bereich am VHS-Fragment angebracht wurde. Die eigentliche Verknüpfungs-PCR fand mit den Primern #797 und #1131 statt.

Hier wurde für die Primär-PCR eines der Fragmente ein Primer mit zusätzlichen 18 Nukleotiden verwendet, welche mit der Sequenz des anderen Fragmentes überlappen. Für die Sekundär-PCR ist zu beachten, dass der Reaktionsmix 10% Glycerin enthält und die Primer erst nach 10 Zyklen zugegeben werden (damit sich das Hybrid aus den beiden Fragmenten ausbilden kann).

## 2.10 DNA-Elektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1%igen Agarosegelen. Als Gel- und Laufpuffer diente 0,5 x TAE-Puffer (20 mM Tris; 10 mM NaOAc; pH 8,0). Zum Nachweis der DNA wurden sowohl dem Gel als auch dem Laufpuffer 0,5 µg/ml EtBr zugesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Blaumarker (0,2% Bromphenolblau in 25% Glycerol) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei maximal 250 V. Als Größen- und Konzentrationsstandard diente 1 µg mit *EcoRI/HindIII* geschnittene Lambda-DNA.

## 2.11 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Isolierung aus Agarose-Gelen wurde mit dem QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (250) der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

## 2.12 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration einer Probe wurde durch Vergleiche der Bandenstärke mit dem  $\lambda$ -Größenstandard in einem Agarose-Gel bestimmt.

## 2.13 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA-Proben erfolgte durch die Firma Seq-Lab oder GATC.

## 2.14 Herstellung von Proteinextrakten für die Western-Analyse

Zur Herstellung von Proteinextrakten für die Western-Blot-Analyse wurden 5 ml einer logarithmischen Hefekultur bei 4000 rpm abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 0.01 M Natriumazid gewaschen und in 150  $\mu$ l Lysispuffer (0,3 M Sorbitol; 50 mM HEPES; 10 mM  $\text{NaN}_3$ ; pH 7,5) mit Proteaseinhibitoren (0,5  $\mu$ g/ml von Aprotinin, Antipain, Chymostain, Leupeptin, Pepstatin A; 1,6  $\mu$ g/ml Benzamidin; 1  $\mu$ g/ml Phenanthroline; 170  $\mu$ g/ml Phenylmethylsulfonylfluorid) aufgenommen. Nach Zugabe von Glasperlen ( $\varnothing$  0,45 mm) wurden die Zellen 5 min auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde mit 200  $\mu$ l Probenpuffer (4% SDS; 20% Glycerin; 125 mM Tris-Cl, pH 6,8; 0,2% Bromphenolblau; 40 mM DTT) versetzt. Anschließend wurden die Proben zur Solubilisierung der Proteine 30 min bei 50°C inkubiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden im Anschluss kurz (<1 min) bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert und vor dem Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamidgel (2.16) erneut solubilisiert. Aufgetragen wurden jeweils 0,2  $\text{OD}_{600}$ -Einheiten der frisch denaturierten Extrakte.

## 2.15 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970) in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen. Es wurde ein 5%iges Sammelgel (5% Acrylamid; 125 mM Tris-Cl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,025% APS; 0,1% TEMED) und je nach Größe der untersuchten Proteine ein 7,5 - 10%iges

Trenngel (7,5 - 10% Acrylamid; 375 mM Tris-Cl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,025% APS; 0,1% TEMED) verwendet. Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 0,192 M Glycin und 0,1% SDS (pH 8,3). Der Gellauf erfolgte bei maximal 250 V und einer maximalen Stromstärke von 35 mA pro Gel.

## 2.16 Coomassie–Blaufärbung von Proteinbanden im SDS-Gel

Das nach Neuhoff *et al.* (1985) veränderte Protokoll gewährleistet eine hohe Färbungssensitivität. Als Färbelösung wurde angesetzt: 0,1% w/v Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva), 2% w/v Phosphorsäure, 5% w/v  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ , 20% Methanol. Wichtig hierbei ist, zunächst das Aluminiumsulfat in der Säure aufzulösen und den Farbstoff in Methanol, da sich Coomassie sonst schlecht löst. Ein Entfärben ist nicht notwendig.

## 2.17 Immunologischer Proteinnachweis durch Western Analyse

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran 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 durch reversibles Anfärben der Proteinbanden mit Ponceau S (0,2% Ponceau S, 3% TCA) kontrolliert.

Unspezifische Bindestellen wurden durch Inkubation der Membran für 30 min in PBS/TWEEN (10 mM Natriumphosphat pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,05% TWEEN20) mit 1% Magermilchpulver blockiert. Die Reaktion mit dem Primärantikörper erfolgte bei einer für den Antikörper spezifischen Verdünnung in PBS/TWEEN mit 1% Magermilchpulver für 90 min bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran dreimal mit PBS/TWEEN gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper in PBS/TWEEN (anti-Maus-IgG bzw. anti-Kaninchen-IgG, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase oder Peroxidase) erfolgte über 60 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran zweimal in PBS/TWEEN gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte entweder über die alkalische Phosphatase oder die Peroxidase. Für den Nachweis über alkalische Phosphatase wurde die Membran einmal in Substratpuffer (0,1 M Tris-Cl, pH 8,8; 0,1 M NaCl; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ) gewaschen. Der Anti-

körpernachweis erfolgte durch die Farbreaktion des Enzyms in Substratpuffer bei Anwesenheit von 0,1 mg/ml BCIP und 1 mg/ml NBT. Die Farbreaktion wurde in Wasser gestoppt.

Der Nachweis der Peroxidase-gekoppelten Antikörper erfolgte durch das Lumi Light Kit der Firma Roche nach Herstellerangaben. Zum Nachweis wurde das Gerät LAS-1000 der Firma Fuji Film mit zugehöriger Software eingesetzt.

Eine densitometrische Quantifizierung der Bandenintensität erfolgte mit dem Programm „NIH Image“.

## **2.18 Zellfraktionierung**

### **2.18.1 Differentielle Zentrifugation**

Für die differentielle Zentrifugation wurden 10 OD<sub>600</sub>-Einheiten einer exponentiellen Hefekultur (OD<sub>600</sub> ≤ 0,8) abzentrifugiert, einmal mit Wasser gewaschen und in 250 µl Lysispuffer (0,3 M Sorbitol; 50 mM HEPES, pH 7,5; 10 mM NaN<sub>3</sub>) mit Proteaseinhibitoren (s. 2.15) resuspendiert. Nach Zugabe von Glasperlen (Ø 0,45 mm) wurden die Zellen 5 min auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen und anschließend weitere 400 µl Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren zugegeben. Nach kurzem Mischen wurde der Überstand 5 min bei 500 g zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer zu pelletieren. Als Kontrolle für den Western Blot wurden 100 µl des Zellextraktes abgenommen und mit dem gleichen Volumen 2x Probenpuffer (2.14) versetzt. Für die folgenden Zentrifugationsschritte wurden zwei Aliquots à 150 µl verwendet, von denen eine zum Test auf Detergenz-Löslichkeit mit 1% Triton X-100 versetzt wurde. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben 10 min bei 13.000 g zentrifugiert, woraus die P13 Pellet-Fraktion und der S13-Überstand resultierte. Der S13-Überstand wurde erneut 1 h bei 100.000 g zentrifugiert und dadurch in die P100 Pellet-Fraktion und den S100-Überstand getrennt. Die Pellet-Fraktionen wurde in je 150 µl Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren resuspendiert, um ein gleiches Volumen aller Proben zu erhalten. Anschließend wurden die Proben mit dem gleichen Volumen 2x Probenpuffer versetzt und 30 min bei 50°C inkubiert. Von jeder Fraktion wurde ein 0,2 OD<sub>600</sub>-Einheiten entsprechendes Probenvolumen durch SDS-PAGE (2.16) aufgetrennt und im Western Blot (2.17) analysiert.

### 2.18.2 Differentielle Zentrifugation unter unterschiedlichen Salzbedingungen

100 ml logarithmisch wachsender Hefekultur ( $OD_{600} \leq 0,8$ ) wurden über einen Nitrozellulosefilter (Porengröße: 0,45  $\mu\text{m}$ ) mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Zellen in 2,5 ml Lysis-Puffer (2.14) gewaschen. Die Lyse erfolgte in 250  $\mu\text{l}$  Lysis-Puffer durch kräftiges Schütteln (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) mit einem Zellvolumen Glassperlen ( $\varnothing$  0,45 mm). Hiernach wurde der Ansatz mit 1,5 ml Lysispuffer aufgefüllt und gemischt. Der Rohextrakt wurde gereinigt (5 min, 500 g) und ein 50  $\mu\text{l}$  Aliquot für weitere Analyse aufgehoben. Für die folgenden Ansätze wurden jeweils 250  $\mu\text{l}$  Zellextrakt und 250  $\mu\text{l}$  Lysis-Puffer mit Zusätzen verwendet: 1) 0,25% Triton X-100, 2,5%  $\beta$ -D-Maltosid; 2) 1 M NaCl; 3) 0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Um die Proteine zu extrahieren wurden die Ansätze 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin folgte 1 h Zentrifugation bei 100.000 g (Beckmann Ultrazentrifuge, Rotor TLA45, 42.000 rpm). Die Pellets wurden in je 500  $\mu\text{l}$  Lysis-Puffer aufgenommen und 30 min bei 50 °C solubilisiert.

### 2.18.3 Flotation

10  $OD_{600}$ -Einheiten einer exponentiellen Hefekultur ( $OD_{600} \leq 0,8$ ) wurden abzentrifugiert, einmal mit Wasser gewaschen und in 100  $\mu\text{l}$  TNE-Puffer (50 mM Tris, pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA) mit Proteaseinhibitoren (2.14) resuspendiert. Nach Zugabe von Glasperlen ( $\varnothing$  0,45 mm) wurden die Zellen 5 min bei 4°C auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen und anschließend weitere 150  $\mu\text{l}$  TNE-Puffer mit Proteaseinhibitoren zugegeben. Um nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer zu pelletieren, wurde der Überstand nach kurzem Mischen 5 min bei 500 g zentrifugiert. 125  $\mu\text{l}$  Überstand wurden abgenommen. Hiernach wurden die Proben mit 250  $\mu\text{l}$  60%iger Optiprep-Lösung vermischt, in ein 11x34 mm Polycarbonat-Zentrifugengefäß (Beckman) gegeben und vorsichtig mit 600  $\mu\text{l}$  30% Optiprep-Lösung in TNE überschichtet. Zuletzt wurde mit 100  $\mu\text{l}$  TNE überschichtet. Nach einer Zentrifugationszeit von 2 h bei 260.000 g im TLA100-Rotor (Beckmann) wurden 6 Fraktionen à 180  $\mu\text{l}$  abgenommen und mit dem gleichen Volumen 2x Probenpuffer (2.14) + 40 mM DTT versetzt. Jeweils 50  $\mu\text{l}$  der Proben wurden durch SDS-PAGE (2.16) aufgetrennt und im Western Blot (2.15) analysiert.

Sollte Detergenzlöslichkeit getestet werden, so wurde die Zell- sowie die Puffermenge verdoppelt. Nach dem Aufschluß wurde der Ansatz geteilt, eine Probe mit 1% Tx-100 versetzt und alles 30 min auf Eis inkubiert. Im Falle der Triton behandelten Probe wurde für den Optiprep-Gradienten TxNE (TNE + 0,1% Tx-100) verwendet.

#### **2.18.4 Sucrose-Gradienten**

100 ml einer exponentiellen Hefekultur ( $OD_{600} \leq 0,8$ ) wurden über einen Nitrozellulosefilter (Porengröße: 0,45  $\mu\text{m}$ ) mit Hilfe einer Vakuumpumpe abgesaugt und in 250  $\mu\text{l}$  eiskaltem 10% STE-Puffer (10% Sucrose; 10 mM Tris-Cl, pH 7,6; 10 mM EDTA) mit Proteaseinhibitoren (2.14) resuspendiert. Nach Zugabe von Glasperlen ( $\emptyset$  0,45 mm) wurden die Zellen für 5 min auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen. Der Überstand wurde 5 min bei 500 g zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer zu pelletieren. Danach wurde der klare Zellüberstand auf einen Sucrose-Gradienten gegeben.

Zur Herstellung der Sucrose-Gradienten wurden STE-Puffer verschiedener Sucrose-Konzentrationen sorgfältig in einem SW40-Zentrifugationsgefäß (Beckman) übereinandergeschichtet. Für einen 53%igen Gradienten wurden STE-Puffer mit 53% (4 ml), 35% (4 ml) und 20% (~ 5 ml, bis zum Gefäßrand) Sucrose übereinandergeschichtet. Um einen annähernd kontinuierlichen Gradienten zu erhalten, wurde das Gefäß mit Parafilm verschlossen und für 3 - 4 h bei 4°C in horizontaler Lage gelagert, was eine größere Diffusionsfläche bietet. Vor Zugabe des Zellextrakts wurde der Gradient aufgerichtet und 1,5 ml von oben abgenommen. Nach einer Zentrifugationszeit von 14 h im Beckmann SW40-Rotor bei 114.000 g wurden 18 Fraktionen zu je 700  $\mu\text{l}$  vom Gradienten abgenommen. 250  $\mu\text{l}$  Aliquots wurden mit dem gleichen Volumen 2 x Probenpuffer (2.14) versetzt und 30 min bei 50°C inkubiert. Jeweils 50  $\mu\text{l}$  wurden durch SDS-PAGE (2.15) aufgetrennt und im Western Blot (2.17) analysiert.

#### **2.19 Pulse-chase Experimente**

Zur Bestimmung der Halbwertszeit von Proteinen wurden Hefezellen über Nacht im synthetischen Minimalmedium mit den benötigten Aminosäuren/Basen, aber ohne

Methionin angezogen. 10 OD<sub>600</sub> logarithmisch wachsender Zellen wurden geerntet und in 2,5 ml frischem Medium (4 OD<sub>600</sub> / ml) resuspendiert. Nach 15 min Inkubation bei 30°C erfolgte die radioaktive Markierung durch Zugabe von 100-200 µCi Tran<sup>35</sup>S-label („Pulse“). Nach 15 min wurde 1/50 Volumen konzentrierter Chase-Lösung (0,3% Cystein, 0,4% Methionin) beigemischt, wodurch der „Chase“ initiiert wird. Die Probenahme (je 500 µl, 2 OD<sub>600</sub>) fand nach 0, 20, 40 und 60 min statt. Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem 10 mM NaN<sub>3</sub> gewaschen und in 120 µl Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren (2.14) mit 400 mg (+/- 5 mg) Glasperlen (Ø 0,45 mm) durch dreiminütiges Schütteln auf dem Vibrax aufgeschlossen. Nach Zugabe von 100 µl 2x Probenpuffer (2.14) wurden die Proteine über 30 min bei 50°C denaturiert. Anschließend wurde eine Immunopräzipitation (2.22) durchgeführt.

## 2.20 CPY-Sorting

Logarithmische Hefekulturen (OD<sub>600</sub> ≤ 0,8) wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5/ml in frischem Medium mit 1 mg/ml BSA (Fällungshilfe) resuspendiert. Nach 30 min Inkubation (schütteln) erfolgte die radioaktive Markierung (50-80 µCi Tran<sup>35</sup>S-label, 5 min). Der „Chase“ wurde mit der Zugabe von 1/50 Volumen konzentrierter Chase-Lösung (2.20) gestartet und dauerte 40 min. Danach wurden den Zellen ein gleiches Volumen S-Puffer (2,4 M Sorbitol, 0,1 M Tris/HCl pH 7,6 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM DTT, 10 mM NaN<sub>3</sub>/NaF und Proteaseinhibitoren (2.14)) zugefügt und der Ansatz für 5 min auf Eis gestellt. Nach Sphäroplastierung (20 µg Zymolyase, 25 min, 30°C) wurde zweimal jeweils 5 min/ 13000 g zentrifugiert, um die extrazelluläre Fraktion (Überstand) zu erhalten. Die Sphäroplasten wurden in 100 µl 1 M Tris/HCl pH 6,8 aufgenommen und im 2x-Probenpuffer (2.14) denaturiert (5 min 95°C).

Um Proteine aus der extrazellulären Fraktion zu fällen, wurden 100 µl 50%iger (w/v) TCA zugegeben und der Ansatz bis 1 h auf Eis stehen gelassen. Es folgten 30 min Zentrifugation (13000 g). Die Pellets wurden in 100 µl 1 M Tris/HCl pH 6,8 aufgelöst und im 2x-Probenpuffer denaturiert. Hiernach schloß sich die Immunpräzipitation an (2.22).

## 2.21 Immunopräzipitation

Zellextrakte wurden mit 4 Volumen IP-Dilutionspuffer (1,25% Triton X-100, 6 mM EDTA, 60 mM Tris/HCl pH 7,6) verdünnt. Unlösliches Zellmaterial wurde durch eine 5-minütige Zentrifugation (13000 rpm) abgetrennt. Die Inkubation mit Antikörpern fand über Nacht bei 4°C statt. Zugegeben wurden: 9E10 anti-myc 3 µl; anti Ste6 5 µl; anti-HA 3 µl, anti-CPY 10 µl. Die Protein/Antikörper-Komplexe wurden an ProteinA-Sepharose immobilisiert (50-100 µl einer 20%igen Lösung, Inkubation 3-6 h bei 4°C). Die ProteinA-Beads wurden dreimal mit IP-Puffer (1% Triton X-100, 0,2% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 5 mM EDTA) gewaschen, um unspezifische Wechselwirkungen zu entfernen und schließlich in 50 µl IP-Puffer und 50 µl 2x-Probenpuffer mit 100 mM DTT (2.14) aufgenommen. Durch Denaturieren bei 50°C / 95°C (bei CPY) wurden die Proteine von den Beads entfernt.

Für Ubiquitinierungsnachweise wurden 10-50 µl der IPs auf ein SDS-Gel geladen und mittels Western-Blots (2.15, 2.17) untersucht.

Bei radioaktiv markierten IPs wurden 50 µl geladen. Die SDS-Gele wurden in 20% Methanol/7% Essigsäure fixiert (30 min) und anschließend mit Amplify behandelt (mindestens 30 min), um die Signale zu verstärken. Die Gele wurden dann für 2 h bei 80°C getrocknet. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Autoradiographie (Kodak/Fuji-Röntgenfilme)

Autoradiogramme und Blots wurden für Quantifizierungen aufgenommen (DUOS-CAN f40-Scanner, AGFA). Die Quantifizierung erfolgte densitometrisch mit dem Programm „NIH-Image“.

## 2.22 Koimmunopräzipitation

Ziel ist es, durch eine Immunopräzipitation unter nicht denaturierenden Bedingungen das Protein von Interesse zusammen mit seinen Bindungspartnern zu fällen. 10 OD<sub>600</sub> logarithmisch wachsender Hefekultur (OD<sub>600</sub> ≤ 0,8) wurden geerntet und mit 10 mM kaltem NaN<sub>3</sub> gewaschen. Die Zellpellets wurden in 100 µl Lysis-Puffer (PBS pH 7,0, 10 mM EDTA, Proteaseinhibitoren (2.14)) resuspendiert und mit einem Zellvolumen Glasperlen (Ø 0,45 mm) 5 min bei 4°C auf einem Vibrax (2.14) kräftig geschüttelt (Lyse). Dem Aufschluß wurden hiernach noch 150 µl Lysis-Puffer und 2 mg/ml β-D-Maltosid zugemischt. Die Proteinextraktion erfolgte 30 min auf Eis. Die Extrakte wur-



den von groben Zellresten gereinigt (5 min, 500 g) und ein 20 µl Aliquot für weitere Analyse entnommen. Das Lysat wurde verdünnt (+ 500 µl Lysis-Puffer) und 5 µl anti-myc Antikörper zugegeben. Nach einstündiger Inkubation auf einem Schüttler/ 4°C wurde ProteinA-Sepharose (100 µl einer 20%igen Lösung) zugegeben. Es folgte eine weitere Stunde Schütteln bei 4°C. Die ProteinA-Beads wurden durch zweimal Zentrifugieren mit Lysis-Puffer bei 100 g/ 4°C von unspezifischen Wechselwirkungen gereinigt. Die Elution fand in 50 µl Lysis-Puffer und 2x-Probenpuffer/100 mM DTT (2.14) durch 5 min kochen bei 95°C statt.

### **2.23 Immunofluoreszenz-Mikroskopie**

Hefezellen einer logarithmisch wachsenden Kultur wurden durch Zugabe von 5% Formaldehyd zum Kulturmedium für 4 h fixiert. Das Sphäroplastieren der Zellen sowie die nachfolgende Antikörperbehandlung wurden wie bei Pringle *et al.* (1989) durchgeführt. Die Sphäroplasten wurden für 5 min mit 0,1% TX-100 inkubiert und anschließend auf einen mit 0,1% Polylysin behandelten Multiwell-Objektträger gebracht. Der Erstantikörper (anti-myc oder anti HA) wurde in einer Verdünnung von 1:100 in PBS + 1 mg/ml BSA eingesetzt. Nach 90 min Inkubationszeit wurde 4 mal mit PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein FITC-gekoppelter anti-Maus Antikörper verwendet (1:300 Verdünnung in PBS/BSA). Um DNA anzufärben wurde der DNA-bindende Farbstoff DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) benutzt (1 mg/ml in PBS). Die Zellen wurden mit einem Zeiss Axioskop Mikroskop untersucht (FITC Filterset) und die Aufnahmen mit der CCD (charge-coupled device) Kamera (Axiocam, Zeiss) gemacht.

### **2.24 Wachstumsuntersuchungen mittels serieller Verdünnungstropftests**

Um Unterschiede im Wachstumsverhalten näher untersuchen zu können, wurden serielle 10fach Verdünnungen von stationär gewachsenen Zellen auf selektive Agarplatten getropft. Die Inkubationszeit betrug in der Regel 2-3 Tage.

## 2.25 Kreuzung von Hefestämmen und Tetradenanalyse

Die haploiden Kreuzungspartner wurden auf einer YPD-Platte miteinander gemischt und 5-7h bei 25°C inkubiert. Danach wurden die Zygoten mit einem Mikromanipulator auf einer YPD-Platte vereinzelt und für 3 Tage bei 25°C inkubiert. Diploide Kolonien wurden über Nacht in YPD-Medium angezogen, zweimal in sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und in 2% Kaliumacetat mit essentiellen Aminosäuren resuspendiert. Nach drei Tagen Sporulation wurden die Zellen pelletiert, einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in 1 ml H<sub>2</sub>O resuspendiert. Zur Entfernung der Ascuswand wurden 25 µl der Suspension mit 2 µl Zymolyase (2,5 mg/ml) für 7 min/37°C behandelt. Anschließend wurden die Sporen mit einem Mikromanipulator auf einer YPD-Platte zum Auskeimen abgelegt.

## 2.26 Gendeletionen/-modifikationen in *S. cerevisiae*

Gendeletionen oder Modifikationen mit einem Epitop (Tag) wurden nach der von Longtine *et al.* (1998) beschriebenen Methode durchgeführt. Hierbei wird eine mittels PCR hergestellte, genspezifische Deletions/Modifikationskassette durch homologe Rekombination in die Zielregion eingebaut, so dass entweder das Zielgen gegen die Kassette ausgetauscht wird (Deletion) oder nur der zu verändernde Bereich (Modifikation). Der Erfolg der Genmanipulationen wurde mittels PCR (meist flankierende und interne Primer verwendet) verifiziert.

Um das *VPS21*-Gen zu disruptieren wurde das Integrationsplasmid pRK274 mit *Bam*H1/*Pst*I linearisiert, in die Hefe transformiert und die Transformanten auf den LEU-Marker hin selektiert. Die Disruption wurde durch Test-PCR bestätigt.

Für die Mutagenese wurde *VPS21* zunächst in die Plasmide YCplac22 und YEplac112 kloniert. Mit diesen Plasmiden wurde dann die Quick-Change-PCR durchgeführt (2.9.4). Serin21 wurde hierbei gegen Asparagin (S21N) und Glutamin66 gegen Leucin (Q66L) ausgetauscht. Die Mutagenese wurde mittels einer neu eingebauten Restriktionsstelle (S21N, *Sca*I; Q66L, *Nae*I) nachgewiesen. Die Richtigkeit der Mutation wurde durch Sequenzierung bestätigt. CPY-Sorting-Experimente (Ergebnisse, 3.5) zeigten, dass die mutierten Vps21-Formen exprimiert werden.

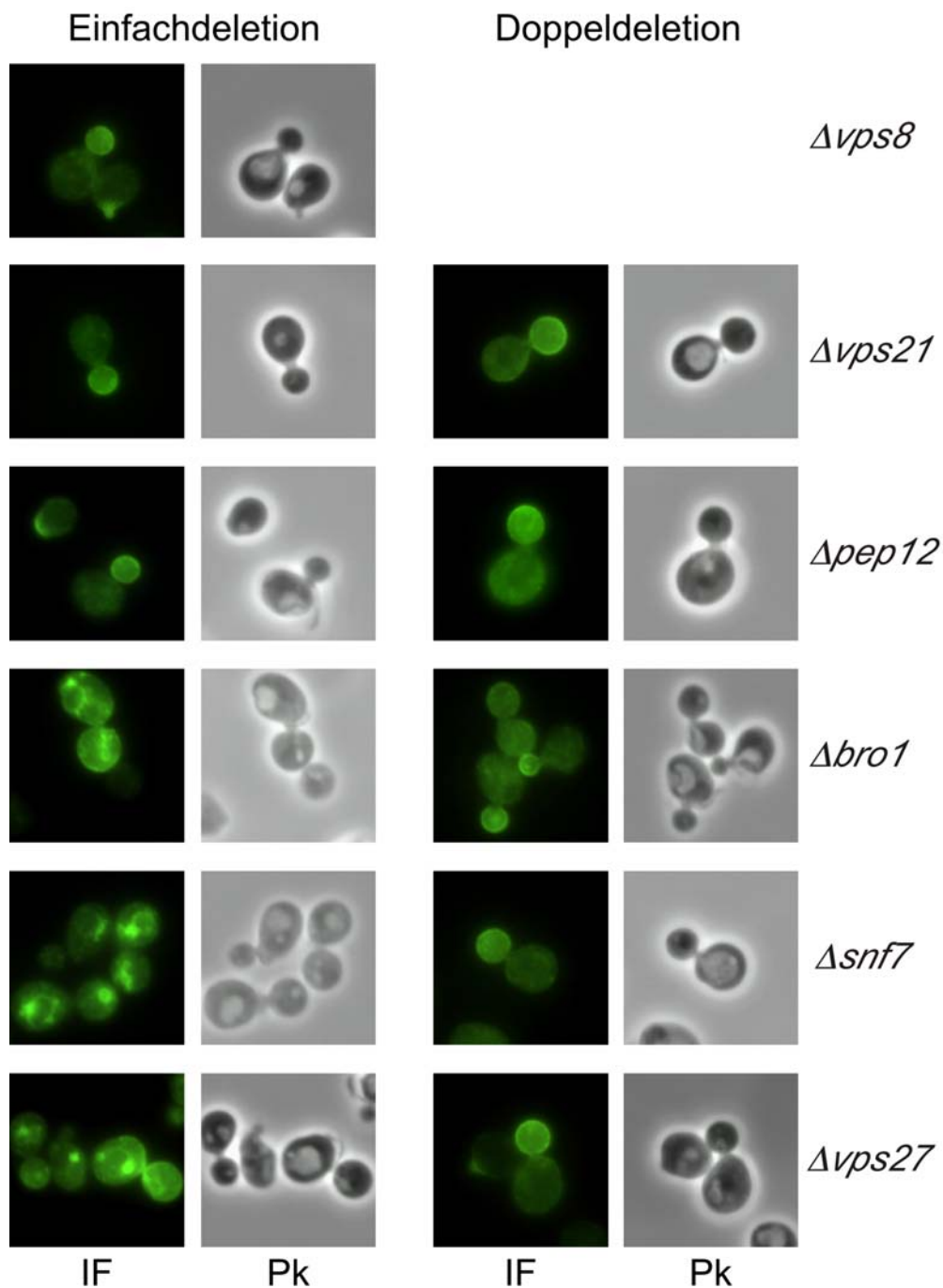
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Einordnung der Vps8-Funktion im endozytischen Weg

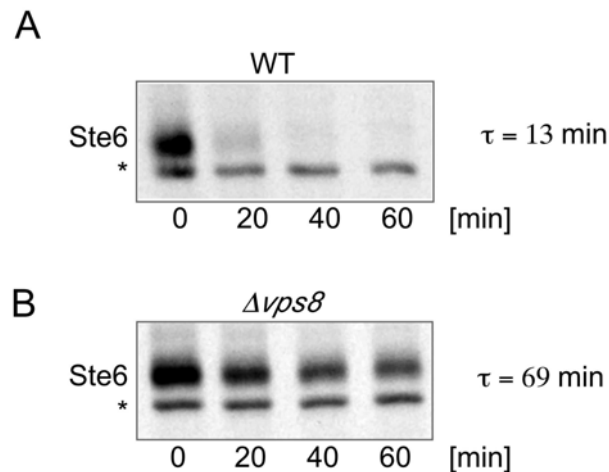
Im Zuge von Immunofluoreszenz-Untersuchungen zum Ste6-Transport in einer Reihe von *vps* Mutanten fiel eine eindrucksvolle Veränderung der Ste6-Lokalisation in  $\Delta vps8$ -Zellen auf. Im Gegensatz zum Wildtyp (WT) war Ste6 hier nicht in interne Strukturen verteilt, sondern polar in der Knospenmembran konzentriert (Abb. 4). Diese Verteilung ähnelt dem Phänotyp der Ste6- $\Delta A$ -Box-Variante in WT-Zellen (Kölling, Losko, 1997). Normalerweise wird der a-Faktor-Transporter Ste6 nach dem Transport zur Zelloberfläche schnell wieder internalisiert und in den Abbauweg zur Vakuole geleitet (Halbwertszeit  $\tau \sim 13$ min). Diese Internalisierung und rascher Abbau werden durch ein Signal in der Linker-Region von Ste6 vermittelt, welche in der Ste6- $\Delta A$ -Box-Variante deletiert ist. Diese Variante ist dementsprechend stabil. Die resultierende polare Akkumulation in der Plasmamembran wird auf kontinuierliches Recycling zurückgeführt (Krsmanović *et al.*, 2005).

In Klasse D *vps* Mutanten kommt es zur Blockierung der Fusion von Transportvesikeln mit späten Endosomen (Gerrard *et al.*, 2000). Um zu untersuchen, ob Ste6 in  $\Delta vps8$  die Vakuole möglicherweise nicht erreicht und stabilisiert wird, wurde ein Pulse-Chase Experiment durchgeführt (Abb. 5). Nach radioaktiver Markierung von Wildtyp- und  $\Delta vps8$ -Stamm mit Tran[<sup>35</sup>S]-Label wurde ein Überschuss an nichtradioaktivem Methionin/Cystein zugegeben und Proteinextrakte zu angegebenen Zeitpunkten hergestellt. Aus den Proteinextrakten wurde Ste6 immunopräzipitiert. Die Quantifizierung der Autoradiogramme ergab für den Wildtypstamm eine Ste6-Halbwertszeit  $\tau = 13$  min und  $\tau = 69$  min für die  $\Delta vps8$ -Mutante. Damit konnte gezeigt werden, dass Ste6 in  $\Delta vps8$ -Zellen stabilisiert wird.

Um festzustellen, ob die polare Ste6-Lokalisation für  $\Delta vps8$  spezifisch ist, wurde die Ste6-Verteilung in verschiedenen Klasse D Mutanten analysiert (Abb. 4). Andere Klasse D Mutanten (Einfachdeletionen  $\Delta vps21$ , endosomale Rab-GTPase,  $\Delta pep12$ , spät endosomales t-SNARE) wiesen die gleiche polare Verteilung wie  $\Delta vps8$  auf. Damit scheint das verstärkte Ste6-Recycling ein generelles Merkmal aller Klasse D *vps* Mutanten zu sein.



**Abb. 4:** Auswirkung der *vps* Klasse D-Mutanten auf den Ste6 Transport: Epistasis-Analyse. Einfachdeletions- (linke Spalte) und Doppeldeletionsmutanten (rechte Spalte) wurden mit pYKS2 (wt Ste6-myc, 2 $\mu$ ) transformiert und die Ste6-Verteilung mittels Immunofluoreszenz mit anti-myc Primärantikörpern (9E10) und FITC gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörpern untersucht. Es wurden analysiert (von oben): RKY1843 ( $\Delta vps8$ ), RKY1920 ( $\Delta vps21$ )/ RKY1926 ( $\Delta vps8\Delta vps21$ ), RKY1921 ( $\Delta pep12$ )/ RKY1930 ( $\Delta vps8\Delta pep12$ ), 1922 ( $\Delta bro1$ )/ RKY1928 ( $\Delta vps8\Delta bro1$ ), RKY1510 ( $\Delta snf7$ )/ RKY1927 ( $\Delta vps8\Delta snf7$ ), RKY1876 ( $\Delta vps27$ )/ RKY2093 ( $\Delta vps8\Delta vps27$ ), IF: FITC-Filter, Pk: Phasenkontrast.



**Abb. 5:** Ste6-Stabilität in  $\Delta vps8$ . Die Halbwertszeit von Ste6 wurde im WT-(A) und  $\Delta vps8$  (B)-Stamm mittels Pulse-Chase-Experiments bestimmt. Die Zellen wurden 15 min lang mit Tran $^{35}\text{S}$ -Label markiert, worauf ein Überschuß an Methionin/Cystein zugegeben ( $t=0$ ) und in angegebenen Zeitabständen Proben entnommen wurden. Der spezifische Nachweis von Ste6 erfolgte durch Immunopräzipitation, SDS-PAGE und Autoradiographie. Die Halbwertszeit wurde anhand der Abnahme der Ste6-Signalintensität berechnet. WT (JD52),  $\Delta vps8$  (RKY1843).

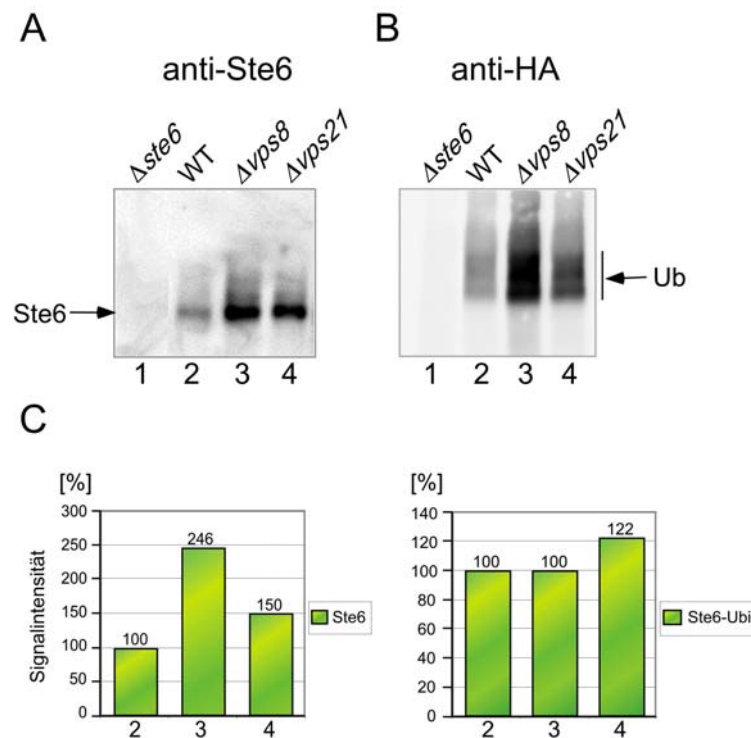
Nun sollte die Position für die Vps8-Funktion im endozytischen Weg mittels einer Epistasisanalyse genauer erfaßt werden. Doppelmutanten von  $\Delta vps8$  mit anderen Klasse D-Mutanten ( $\Delta vps21$ ,  $\Delta pep12$ ) sowie Klasse E-Mutanten ( $\Delta bro1$ ,  $\Delta snf7$ ) und  $\Delta vps27$  wurden hergestellt und die Ste6-Lokalisation durch Immunofluoreszenz untersucht (Abb. 4). Kombinationen von  $\Delta vps8$  mit  $\Delta vps21$  und  $\Delta pep12$  zeigten den gleichen Phänotyp wie die  $\Delta vps8$ -Einfachmutante. Diese Beobachtung bestätigt die Klassifizierung von Vps8 als eine Klasse D Funktion. In Klasse E-Mutanten funktioniert das Sortieren von Proteinen in der spät endosomalen MVB (Multivesicular Body) Struktur nicht, was zur Ausbildung eines vergrößerten, späten, der Vakuole anliegenden Endosoms führt. In diesem vergrößerten Endosom, welches als Klasse E-Kompartiment bezeichnet wird, akkumulieren die transportierten Proteine (Raymond *et al.*, 1992). So war auch das Ste6-Signal in großen, punktförmigen Strukturen an der Vakuole (Klasse E-Kompartiment) und der vakuolären Membran zu beobachten (Einfachdeletionen  $\Delta bro1$ ,  $\Delta snf7$ ). Die  $\Delta vps27$ -Einfachdeletion zeigte ebenfalls einen Klasse E-Ste6-Lokalisationsphänotyp. Vps27 ist an der sukzessiven Bindung von ESCRT-Komplexen beteiligt, indem es den ESCRT-1-Komplex an die frühen Endosomen rekrutiert (Bache *et al.*, 2003, Katzman *et al.*, 2003) und damit zur Ausbildung eines funktionsfähigen MVBs beiträgt. Wurden die Mutanten  $\Delta bro1$ ,  $\Delta snf7$  und  $\Delta vps27$  mit  $\Delta vps8$  kombiniert, so zeigten die Doppelmutanten die  $\Delta vps8$ -Lokalisation von Ste6. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass Vps8 seine Funktion vor Bro1, Snf7 und Vps27 ausübt.

Ein charakteristischer Phänotyp von Klasse D *vps* Mutanten ist das beeinträchtigte Wachstum bei höheren Temperaturen (37°C). So wiesen  $\Delta vps8$ - sowie  $\Delta pep12$ -Zellen bei 37°C einen starken Wachstumsdefekt auf,  $\Delta vps21$ -Zellen einen etwas schwächeren (Tab. 7). Bei Kombinationen von  $\Delta vps8$  mit in der Epistasis-Analyse verwendeten Mutanten (Tab. 7) zeigte sich der ts-Phänotyp dominant. Auch diese Analyse ordnet die Vps8-Funktion als epistatisch zu Bro1, Snf7 und Vps27 ein.

**Tab.7** Temperatursensitivität in der Epistasis-Analyse verwendeter Mutanten

Wachstum bei 37°C :	Einfachdeletion	Doppeldeletion mit $\Delta vps8$
$\Delta vps8$	-	
$\Delta vps21$	+/-	-
$\Delta pep12$	-	-
$\Delta bro1$	+	-
$\Delta snf7$	+/-	-
$\Delta vps27$	+	-

Die Sortierung von Ste6 in den vakuolären Abbauweg wird durch Ubiquitinierung reguliert (Kölling und Hollenberg, 1994). Das Ubiquitinierungssignal befindet sich in der Linker-Region und fehlt in der Ste6- $\Delta$ A-Box-Variante, welche dementsprechend nicht mehr ubiquitiniert ist (Kölling und Losko, 1997). Offensichtlich kann verstärktes Ste6-Recycling auf reduzierte Ubiquitinierung zurückgeführt werden (Krsmanović *et al.*, 2005). Daher stellt sich die Frage, ob Klasse D-Mutanten über die Ubiquitinierung Einfluß auf den Ste6-Transport ausüben. In Abb. 6 wurde die Ubiquitinierung in  $\Delta vps8$  und  $\Delta vps21$  untersucht. Ste6 und HA-markiertes Ubiquitin wurden zusammen exprimiert. Aus Zellextrakten immunopräzipitiertes Ste6 wurde im Western Blot auf die Anwesenheit von kovalent gebundenem HA-Ubiquitin hin analysiert. Aufgrund der Stabilisierung konnte in Immunopräzipitaten aus  $\Delta vps8$  und  $\Delta vps21$  deutlich mehr Ste6 nachgewiesen werden (Abb 6A,C). Die Ubiquitinierung von Ste6 erscheint als ein diffuses Signal von hohem Molekulargewicht (Abb. 6B,C). Nachdem das Ubiquitinsignal auf das Ste6-Signal normiert worden war, konnte keine Reduzierung der Ubiquitinierung in den Klasse D-Mutanten festgestellt werden. Demnach kontrollieren die Klasse D-Funktionen den Ste6 Transport auf eine vom Ubiquitinsignal unabhängige Art und Weise.

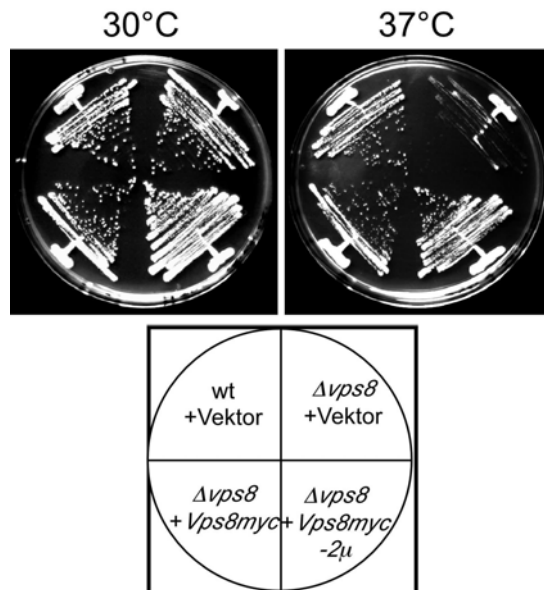


**Abb. 6:** Ste6-Ubiquitinierung in *vps* Klasse D-Mutanten. Ste6 wurde immunopräzipitiert aus Zellextrakten von Stämmen, welche ein HA-markiertes Ubiquitin exprimierendes Plasmid (YEp112) trugen (1) und YEp112 zusammen mit  $2\mu$ -*STE6* (pRK69) (2,3,4). Analysiert wurden (1)  $\Delta ste6$  (RKY959), (2) WT (JD52), (3)  $\Delta vps8$  (RKY1843), (4)  $\Delta vps21$  (RKY1920). Die präzipitierten Proteine wurden mittels Western Blots nachgewiesen, bei (A) mit anti-Ste6 Antikörpern, bei (B) mit anti HA Antikörpern. Die Expression von HA-Ubiquitin unter *CUPI*-Promotor-Kontrolle wurde mit 0,5 mM  $\text{CuSO}_4$  5 h vor der Zellextraktherstellung induziert. Die Ubiquitinbanden sind mit einem Pfeil gekennzeichnet. In (C) sind die Intensitäten der Ste6-Signale (links) und der HA-Signale (rechts) dargestellt, wobei die WT-Signalintensität auf 100% gesetzt und die HA-Werte auf die entsprechende Ste6-Menge normiert wurden.

### 3.2 Das C-terminal 13-myc markierte Vps8 Protein ist funktional

Für die folgende Charakterisierung von Vps8 wurde der *VPS8*-ORF mit seiner 600 bp langen Promotorregion in einen *CEN* (pRK827) und einen  $2\mu$ -Vektor (pRK828) kloniert und C-terminal mit 13-myc markiert. Vps8-13myc konnte in Western Blots mit anti-myc Antikörpern als ein 155 kDa großes Protein detektiert werden (Abb 10 und folgende). Die Funktionalität des *CEN*- und  $2\mu$ -plasmidkodierten Vps8-13myc wurde mit einem Wachstumstest bei 37°C geprüft (Abb. 7).  $\Delta vps8$  Zellen wachsen etwas langsamer bei 30°C als der Wildtyp und sind temperatursensitiv bei 37°C. Dieser Phänotyp ist typisch auch für andere Klasse D-Deletionsmutanten wie  $\Delta vps21$  und  $\Delta pep12$ . Während der  $\Delta vps8$ -Stamm, transformiert mit dem leeren Vektor (pRK717)

bei 37°C kaum Wachstum zeigte, wurde dieser Phänotyp durch Expression von Vps8-13myc vom *CEN* und vom 2 $\mu$ -Plasmid komplementiert (Abb. 7).



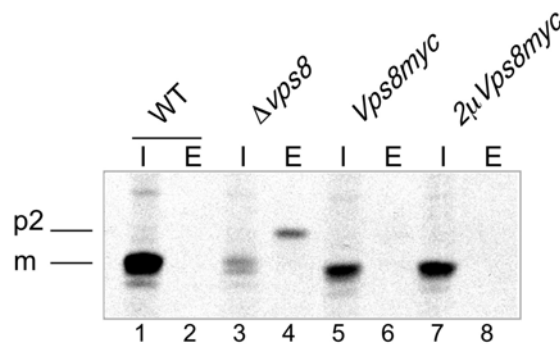
**Abb. 7:** Temperatursensitivität von  $\Delta vps8$ . Der wildtyp-Stamm (wt) JD52 (+pRK717) und der  $\Delta vps8$ -Stamm RKY1843, transformiert mit den komplementierenden Plasmiden pRK827 (*VPS8*-13myc, *CEN*), pRK828 (*VPS8*-13myc, 2 $\mu$ ) und pRK717 (Vektor) wurden auf SD/Cas-URA Platten ausgestrichen und 3 Tage bei 30°C bzw. 37°C inkubiert.

Die  $\Delta vps8$ -Mutante weist einen Defekt im Transport der löslichen, vakuolären Hydrolyase CPY auf (Chen und Stevens, 1996). CPY verläßt das ER als ein kernglykosyliertes Proenzym (p1-Form), das während seiner Passage durch den Golgi-Komplex weiter zur p2-Form modifiziert wird. Im TGN wird CPY von seinem Rezeptor (Vps10) in den vakuolären Weg geleitet. Während der Rezeptor vom späten Endosom zum Golgi-Komplex zurückgebracht wird, wandert p2-CPY in die Vakuole und wird dort zum aktiven Enzym prozessiert. Die *vps8*-Deletion scheint das Recycling des CPY-Rezeptors zu unterbinden. Als Konsequenz wird ProCPY im TGN nicht in den vakuolären Weg geleitet sondern sekretiert.

In Abb. 8 ist der CPY-Transport in einem CPY-Sorting Experiment dargestellt. Die Zellen wurden 5 min lang mit radioaktiven Methionin/Cystein inkubiert, welches dabei in neusynthetisierte Proteine eingebaut wurde. Nach einem Chase von 40 Minuten wurden die Zellen sphäroplastiert und in die interne Fraktion (intrazelluläre Proteine) und externe Fraktion (extrazelluläre Proteine) aufgetrennt. Im Wildtypstamm fand sich ausschließlich die reife CPY-Form in der internen Fraktion (I). Das bedeutet, dass CPY vollständig in die Vakuole transportiert worden ist. Der  $\Delta vps8$ -Stamm jedoch zeigte eine Fehlsortierung von CPY, mehr als die Hälfte des Proteins waren als p2-Form sekretiert worden und nun in der externen (E)-Fraktion zu finden. In  $\Delta vps8$ -Zellen, welche plasmidkodiertes Vps8-13myc trugen (*CEN* / 2 $\mu$ ), verlief die Prozessierung von CPY normal, die reife Form war intrazellulär zu finden.



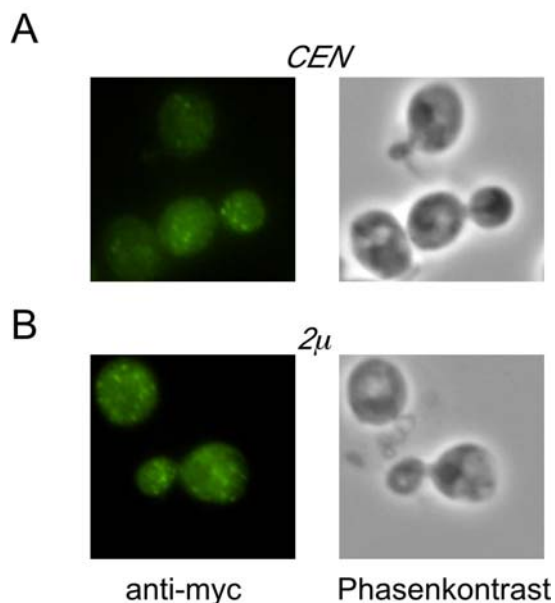
Da die 13-myc-Markierung die Funktion von Vps8 offenbar nicht beeinträchtigt, wurde sie in allen folgenden Experimenten zum Nachweis von Vps8 verwendet.



**Abb. 8:** Nachweis der Funktionalität des Vps8myc Proteins im CPY-Sorting Experiment . Zellen entsprechender Stämme wurden 5 min lang (30°C) mit Tran<sup>[35S]</sup>-Label markiert und nach 40 min Chase sphäroplastiert. Die markierten Kulturen wurden in die Pellet- (Spuren 1, 3, 5, 7) und Kulturüberstand- (Spuren 2, 4, 6, 8) Fraktionen aufgetrennt. Immunopräzipitiertes CPY wurde mit SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Analysiert wurden Spur1,2: WT (JD52), Spur3,4:  $\Delta vps8$  (RKY1843), Spur5,6:  $\Delta vps8$  mit Vps8-13myc (RKY1843+pRK827) und Spur7,8:  $\Delta vps8$  mit Vps8-13myc/2 $\mu$  (RKY1843+pRK827).

### 3.3 Lokalisation von Vps8 in der Zelle

Um die Funktion von Vps8 im vakuolären Abbauweg besser zu verstehen, wurden Immunfluoreszenzexperimente mit anti-myc Antikörpern durchgeführt und die intrazelluläre Lokalisation von Vps8 untersucht (Abb. 9).

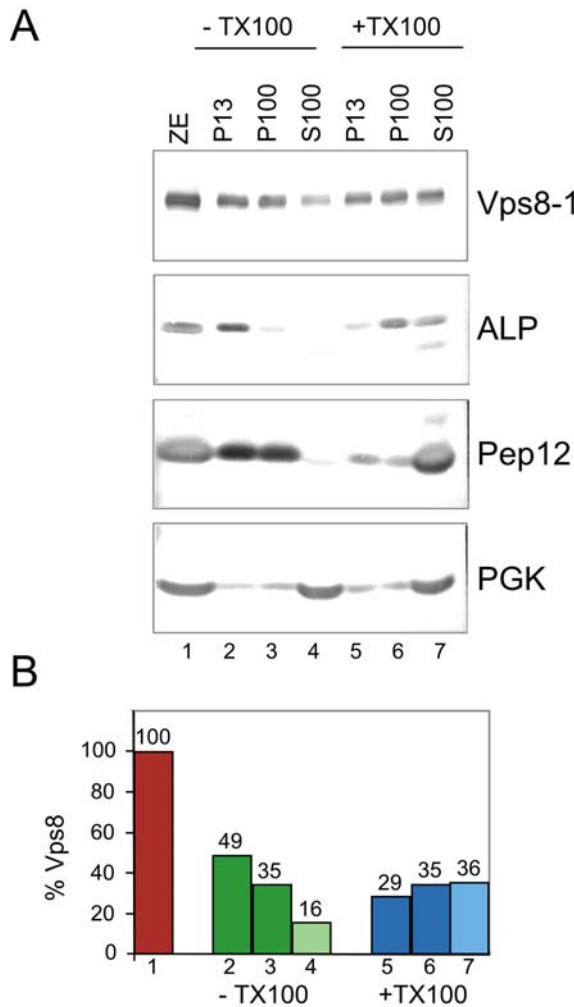


**Abb. 9:** Immunofluoreszenz zur Lokalisation von Vps8-13myc. Der  $\Delta vps8$  (RKY1843)-Stamm wurde (A) mit *VPS8*-13myc/*CEN* (pRK827) und (B) mit *VPS8*-13myc/2 $\mu$  transformiert und über Nacht exponentiell angezogen. Als Primärantikörper wurde der anti-c-myc-Antikörper (9E10) verwendet, als Sekundärantikörper dienten FITC-gekoppelte anti-Maus-Antikörper. Linke Bilder: Immunofluoreszenz. rechte Bilder: Phasenkontrast.

Zu beobachten waren punktförmige, gleichmäßig in der Zelle verteilte Vps8-Signale, welche erfahrungsgemäß als endosomale Signale gedeutet werden können. Diese Färbung unterscheidet sich von fein verteilten, zytoplasmatischen Signalen. Überexpression scheint keine Auswirkung auf die Verteilung von Vps8 in der Zelle zu haben (Abb. 9B). Nachdem die Klasse D-Funktion zum Fusionsereignis am späten Endosom zugeordnet wurde (Gerrard *et al.*, 2000), erscheint es plausibel, dass Vps8 an endosomalen Strukturen lokalisiert.

Einen anderen Ansatz zur Untersuchung intrazellulärer Lokalisation von Vps8 stellt die Fraktionierung mittels differentieller Zentrifugation dar.  $\Delta vps8$ -Zellen, welche Vps8-13myc exprimierten wurden mittels Glasperlen lysiert und die von Zelltrümmern gereinigten (500 g Zentrifugation) Zellextrakte einer Zentrifugation bei 13 000 g unterzogen. Diese resultierte im P13-Pellet und dem S13-Überstand, welcher nachfolgend bei 100 000 g zentrifugiert wurde. Dies ergab ein P100-Pellet und einen S100-Überstand. Die Immunoblot-Analyse der P13, P100 und S100 Fraktionen ist in Abb. 10A, die Quantifizierung in Abb. 10B dargestellt. Die P13-Fraktion beinhaltet große zelluläre Membranen, wie Plasmamembran, ER, Vakuole, aber auch teilweise endosomale Strukturen (Marcusson *et al.*, 1994). Im P100 Pellet finden sich endosomale und Golgi-Membranen sowie Transportvesikel. Die S100-Fraktion enthält lösliche Proteine, wie beispielsweise Phosphoglyceratkinase (PGK), ein glykolytisches Enzym (Abb. 10A). Das meiste Vps8-Protein war in den Pellet-Fraktionen, P13 (49%) und P100 (35%) zu finden. Es ist ein erstaunliches Ergebnis, denn das hydrophile Vps8 wird in den Datenbanken (z.B. <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>) als zytoplasmatisch eingestuft. Auch das endosomale t-SNARE Pep12, ein Membranprotein, fraktionierte in P13 und P100. Die Alkalische Phosphatase (ALP), ein Bestandteil der Vakuolenmembran, konnte mit den großen zellulären Membranen, im P13-Pellet, abzentrifugiert werden.

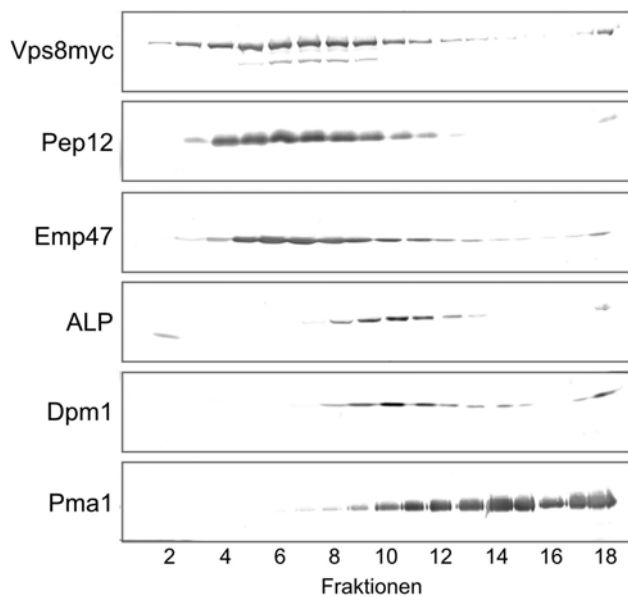
Durch Inkubation der Zellextrakte mit dem Detergenz TX-100 (1%) vor den Zentrifugationsschritten sollten die zellulären Membranen aufgelöst werden und infolgedessen membranassoziierte Proteine in Lösung gehen. Obwohl weitere 20% von Vps8 aus der P13-Fraktion auf diese Weise in Lösung gebracht werden konnten (Abb. 10B, Spur4 und 7) blieb immer noch ein beträchtlicher Vps8-Anteil pelletierbar (~ 60%).



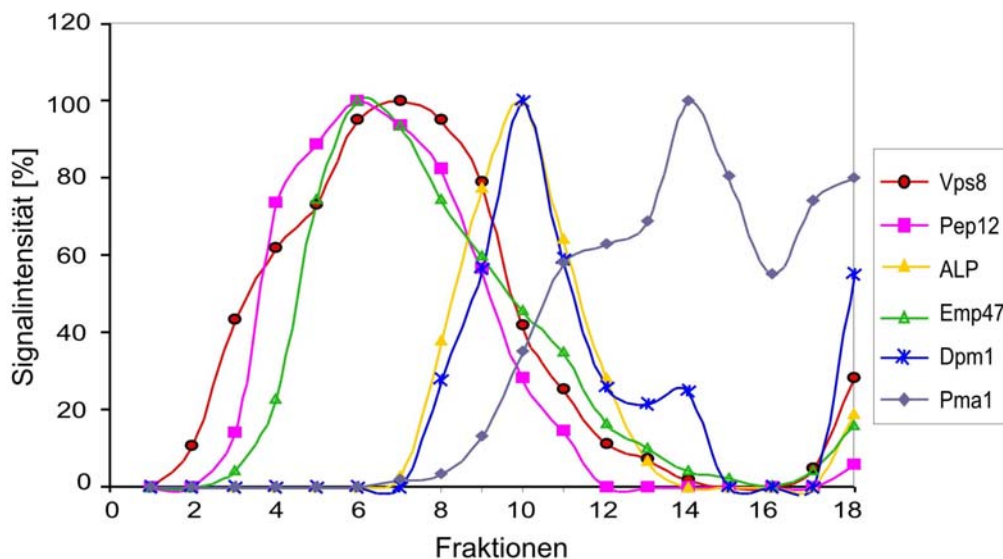
**Abb. 10:** Fraktionierung von Vps8 durch differenzielle Zentrifugation. Zur Abtrennung intakter Zellen sowie Zelltrümmer wurde ein Zellysate aus  $\Delta vps8$ +Vps8-13myc (RKY1843+pRK827) für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Anschließend folgten 10 min Zentrifugation bei 13 000 g (P13-Pellet) und 1 h bei 100 000 g (P100-Pellet, S100-Überstand). Ein Teil des Zellextraktes wurde mit 1% TX100 auf Eis behandelt. (A) Gleiche Anteile der Fraktionen wurden durch Western Blotting analysiert. Von oben: anti-c-myc (9E10) gegen Vps8myc, anti ALP (Alkaline Phosphatase), anti Pep12, anti Pgc (Phosphoglyceratkinase). (B) Quantifizierung der Signalstärken im Vps8myc Western Blot. Die Signalintensität des Gesamtextraktes wurde als 100% definiert. ZE, Gesamtzellextrakt

Zur weiteren Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von Vps8 wurden Zellextrakte aus dem  $\Delta vps8$ -Stamm, welcher Vps8-13myc exprimiert, im 20-53%igen Sucrosedichtegradienten untersucht. Während der 14-stündigen Zentrifugation bewegen sich die zellulären Komponenten in den Dichtebereich des Gradienten, der ihrer eigenen Dichte entspricht. In Abb. 11 ist das Ergebnis einer Fraktionierung im Sucrosedichtegradienten als eine Immunoblot-Analyse dargestellt. Zum Vergleich wurden neben Vps8 folgende Markerproteine detektiert: Pep12 (endosomales t-SNARE), Emp47 (Trans-Golgi-Netzwerk), ALP (Alkalische Phosphatase, Vakuolenmembran), Dpm1 (Dolicholphosphattransferase, ER) und Pma1 (Plasmamembran ATPase). Eine Quantifizierung der Signalstärken gibt das Diagramm in Abb. 12 wieder. Vps8 kolokalisiert nicht mit Pma1, ALP und Dpm1. Bemerkenswerterweise war die Vps8-Verteilung gegenüber dem Pep12-Fraktionierungsprofil verschoben. Möglicherweise hält sich Vps8 an einer endosomalen Membran ähnlicher, aber nicht derselben Zusammensetzung auf wie das Pep12-Kompartiment. Dies wäre in Anbetracht der Vielfalt endoso-

maler Strukturen denkbar. Des weiteren war eine Kolokalisation des Trans-Golgi-Markers Emp47 mit dem endosomalen Pep12 und des ER-Markers Dpm1 mit dem Vakuolenmarker ALP zu beobachten. Wenn unterschiedlich zusammengesetzte Kompartimente rein zufällig die gleiche Dichte besitzen, so können sie ebenfalls zusammen fraktionieren. Eine Kolokalisation muss demnach nicht zwangsläufig auf dasselbe Kompartiment hinweisen.



**Abb. 11:** Fraktionierung von Vps8 im Sucroedichtegradienten. Ein durch 500 g-Zentrifugation gereinigter Zellextrakt aus  $\Delta vps8 + Vps8-13myc$  (RKY1843 + pRK827) wurde in einem 20-53%igen Sucrosegradienten (geringste Dichte in Fraktion 1) fraktioniert. Markerproteine in den Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert. Eingesetzt wurden spezifische Antikörper gegen c-myc (9E10), Pep12, Emp47, ALP (Alkalische Phosphatase), Dpm1 (Dolicholphosphattransferase), Pma1 (Plasmamembran ATPase).



**Abb. 12:** Fraktionierung von Vps8 im Sucroedichtegradienten. Fraktionierungsprofile von Vps8myc sowie der Markerproteine. Die Signalstärken der Western-Blots aus Abb.11 wurden quantifiziert und das jeweils stärkste Signal als 100% definiert. Dargestellt sind Vps8 (Kreise), Pep12 (Quadrate), ALP (Dreiecke), Emp47 (offene Dreiecke), Dpm1 (Sterne), Pma1 (Rauten)

### 3.4 Ist die Assoziation von Vps8 mit zellulären Membranen durch Vps21 bedingt?

Ein wichtiger Aspekt bei der Charakterisierung des Sedimentationsverhaltens von Vps8 ist die Natur der pelletierbaren Fraktionen. Handelt es sich um Membranassoziation, große Proteinkomplexe oder vielleicht um beides? Um diese Fragestellung zu untersuchen wurden differentielle Fraktionierungen durchgeführt, wobei Zellextrakte vor den Zentrifugationsschritten mit Detergenzien oder Salzen behandelt wurden. In Abb. 13A sind die Western Blot-Analyse sowie die zugehörige Quantifizierung einer differentiellen Zentrifugation dargestellt. Von groben Zelltrümmern gereinigte Zellextrakte aus  $\Delta vps8$ -Zellen, welche Vps8-13myc exprimierten wurden 30 min lang mit 0,25% TX-100/ 2,5%  $\beta$ -D-Maltosid inkubiert, um Proteine aus Membranen zu extrahieren, oder mit 1M NaCl oder Natriumcarbonat, um Proteinwechselwirkungen zu schwächen und Proteinkomplexe aufzulösen. Durch nachfolgende Zentrifugation bei 100 000 g wurden die P100- (Pellet) und die S100- (Überstand) Fraktionen erhalten.

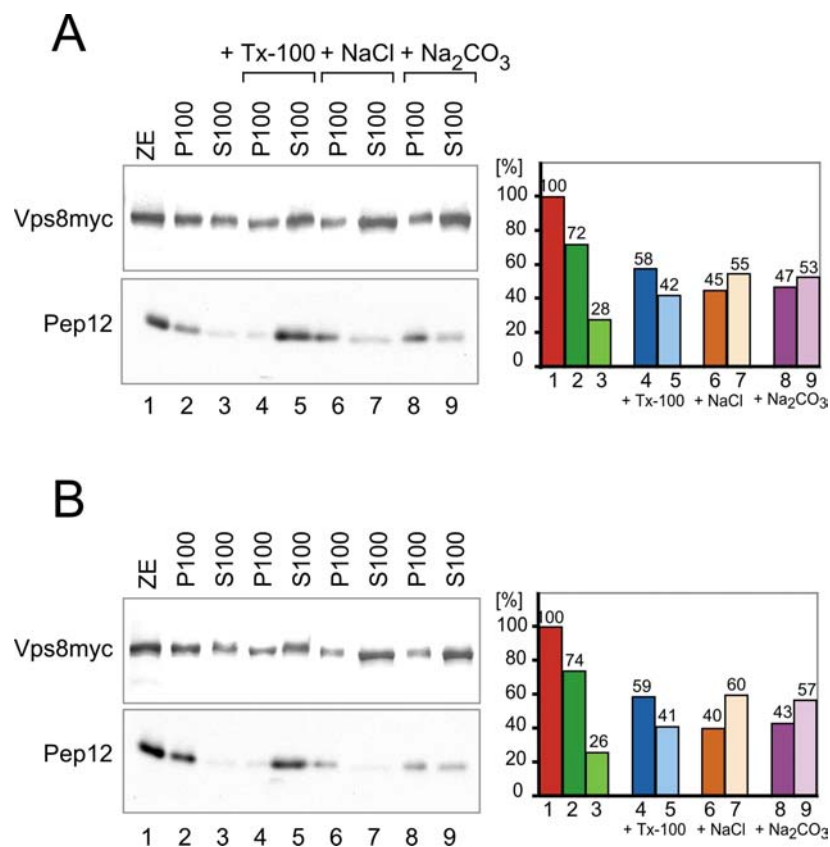
Wie zuvor beobachtet, war der Großteil von Vps8 unlöslich (Abb. 13A, Spur 2). Die Einwirkung von TX-100/Maltosid löste etwa 20% Vps8 auf (Spur 3 vgl. 5), etwa 25% wurden löslich, wenn durch NaCl oder pH-Erhöhung (Natriumcarbonat) Proteinwechselwirkungen gestört werden (~ 5% mehr als mit TX100). Diese Beobachtungen legen den Schluß nahe, dass ein Teil der Vps8-Proteinmoleküle (~ 20%) membranassoziiert vorliegt und Vps8 darüber hinaus Bestandteil eines größeren Proteinkomplexes sein könnte.

Vps8 wird möglicherweise von anderen Proteinen an die Membran rekrutiert. Als ein guter Kandidat bietet sich hier die monomere GTPase Vps21 an, ein Rab5-homologes Protein, das wie Vps8 zur Klasse D der *vps* Mutanten gehört und eine wichtige Funktion bei der Vesikelfusion am späten Endosom hat (Horazdovsky *et al.*, 1994, Gerrard *et al.*, 2000). In bereits publizierten Ergebnissen einer differentiellen Zentrifugation von Zellextrakten aus  $\Delta vps21$ -Zellen wurde Vps8 ausschließlich in der S100-Fraktion beobachtet (Horazdovsky *et al.*, 1996). Dementsprechend scheint die Membranassoziation von Vps8 von Vps21 abhängig zu sein.

Ein analoges Experiment ist in Abb. 13B gezeigt. Zellextrakte aus  $\Delta vps21$ -Zellen wurden hergestellt und wie in Abb. 13A behandelt. Das Ergebnis dieser differentiellen Zentrifugation steht im Widerspruch zu den Beobachtungen von Horazdovsky *et al.*, (1996). Wie in der WT-Situation (Abb. 13A) sind lediglich ca. 30% des Vps8-Pools löslich. Auch nach Behandlung der Zellextrakte mit TX-100/Maltosid und Salzen ent

spricht die Löslichkeit von Vps8 der WT-Löslichkeit. Ein möglicher Grund für den Widerspruch zu den publizierten Daten könnte in den unterschiedlichen experimentellen Vorgehensweisen liegen. In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen rasch mit Hilfe von Glasperlen aufgeschlossen und die Zellextrakte kurz behandelt und zentrifugiert. Die Methode von Horazdovsky *et al.*, (1996) beinhaltet eine Sphäroplastierung der Zellen gefolgt von radioaktiver Markierung (30 min) und einer ebenso langen Chase-Zeit. Erst dann findet die Lyse der Sphäroplasten und die differentielle Zentrifugation der Lysate statt.

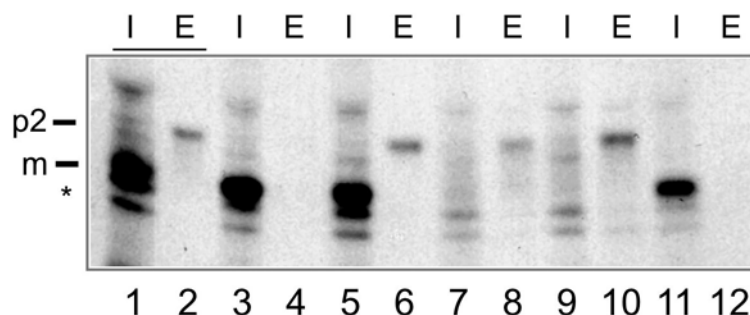
Nach dem Ergebnis der differentiellen Zentrifugation aus Abb. 13B scheint Vps21 keinen Einfluß auf die Membranassoziation von Vps8 zu haben.



**Abb. 13:** Fraktionierungsprofil von Vps8 in  $\Delta vps21$ . Zur Abtrennung intakter Zellen sowie Zelltrümmer wurden Zellysate aus (A)  $\Delta vps8+Vps8myc$  (RKY1843+pRK827) und (B)  $\Delta vps21+Vps8myc$  (RKY1926+pRK827) für 5 min bei 500 g zentrifugiert. Folgende Detergenzien oder Salze wurden beigemischt: [2,3] keine Zusätze; [4,5] 0,25% TX-100/ 2,5%  $\beta$ -D-Maltosid; [6,7] 1 M NaCl; [8,9] 0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH11. Nach 1 h Zentrifugation bei 100 000 g wurden äquivalente Anteile des Gesamtzellextraktes (ZE), der pelletierten (P100) und Überstand-(S100)-Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Dargestellt sind Signale von Vps8myc sowie Pep12. Rechts sind die quantifizierten Signalstärken gezeigt, wobei die Signalintensität des Gesamtzellextraktes als 100% definiert wurde.

### 3.5 Analyse der Lokalisation von Vps8 in *vps21*-Mutanten

Um jede Möglichkeit wahrzunehmen, die einen Hinweis darauf geben könnte, ob Vps21 die Membranassoziation von Vps8 auf irgendeine Weise beeinflusst, wurden Vps21-Mutanten generiert, welche Aminosäure-Austausche in konservierten Domänen der GTPase trugen. Mit zielgerichteter Mutagenese wurde das konservierte Serin in Position 21 im GTP-Bindemotiv I zu Asparagin umgewandelt (S21N). Diese Mutation stabilisiert die GDP-gebundene Form und verursacht einen dominant-negativen Phänotyp (Horazdovsky *et al.*, 1994). In der zweiten Mutante wurde das konservierte Glutamin an Position 66 im GTP-Bindemotiv II gegen Leucin getauscht. Die Q66L-Mutante ist in ihrer GTPase Funktion blockiert und so permanent aktiv. Im CPY-Sorting Experiment (Abb. 14) wurde die Fähigkeit, CPY korrekt zu transportieren im  $\Delta vps21$  Stamm sowie  $\Delta vps21$ -Zellen mit komplementierenden Plasmiden pRK972 (*VPS21/CEN*), pRK973 (*VPS21/2 $\mu$* ) und den Mutanten Formen pRK933 (*Vps21/S21N/CEN*), pRK935 (*Vps21/S21N/2 $\mu$* ) und pRK935 (*Vps21/Q66L/CEN*) untersucht.



**Abb. 14:** Einfluß von Vps21-Mutanten auf CPY-Transport. Zellen entsprechender Stämme wurden 5 min lang (30°C) mit Tran<sup>35</sup>S]-Label markiert und nach 40 min Chase sphäroplastiert. Die markierten Kulturen wurden in die Pellet-(I, intern) und Kulturüberstand-(E, extern) Fraktionen aufgetrennt. Immunopräzipitiertes CPY wurde mit SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. 1,2 ( $\Delta vps21$ , RKY1920), 3,4 (RKY1920-pRK972, *Vps21-CEN*), 5,6 (RKY1920-pRK973, *Vps21-2 $\mu$* ), 7,8 (RKY1920-pRK933, *Vps21 S21N/CEN*), 9,10 (RKY1920-pRK934, *Vps21-S21N/2 $\mu$* ), 11,12 (RKY1920-pRK935, *Vps21-Q66L/CEN*), p2 (Golgi-Precursor), m (mature, die reife CPY-Form), \* unspezifisches Signal.

Ein Teil von CPY wurde in der  $\Delta vps21$ -Mutante (Spur1,2) als p2-Form fehlsortiert, der Rest zur reifen Form prozessiert. Der Fehlsortierungseffekt war hier nicht so stark wie bei der  $\Delta vps8$  Mutante. Vom *CEN*-Plasmid exprimiertes *VPS21* komplementierte vollständig den Effekt der *VPS21*-Deletion (Spur3,4). Überexpression (Spur5,6) verur-

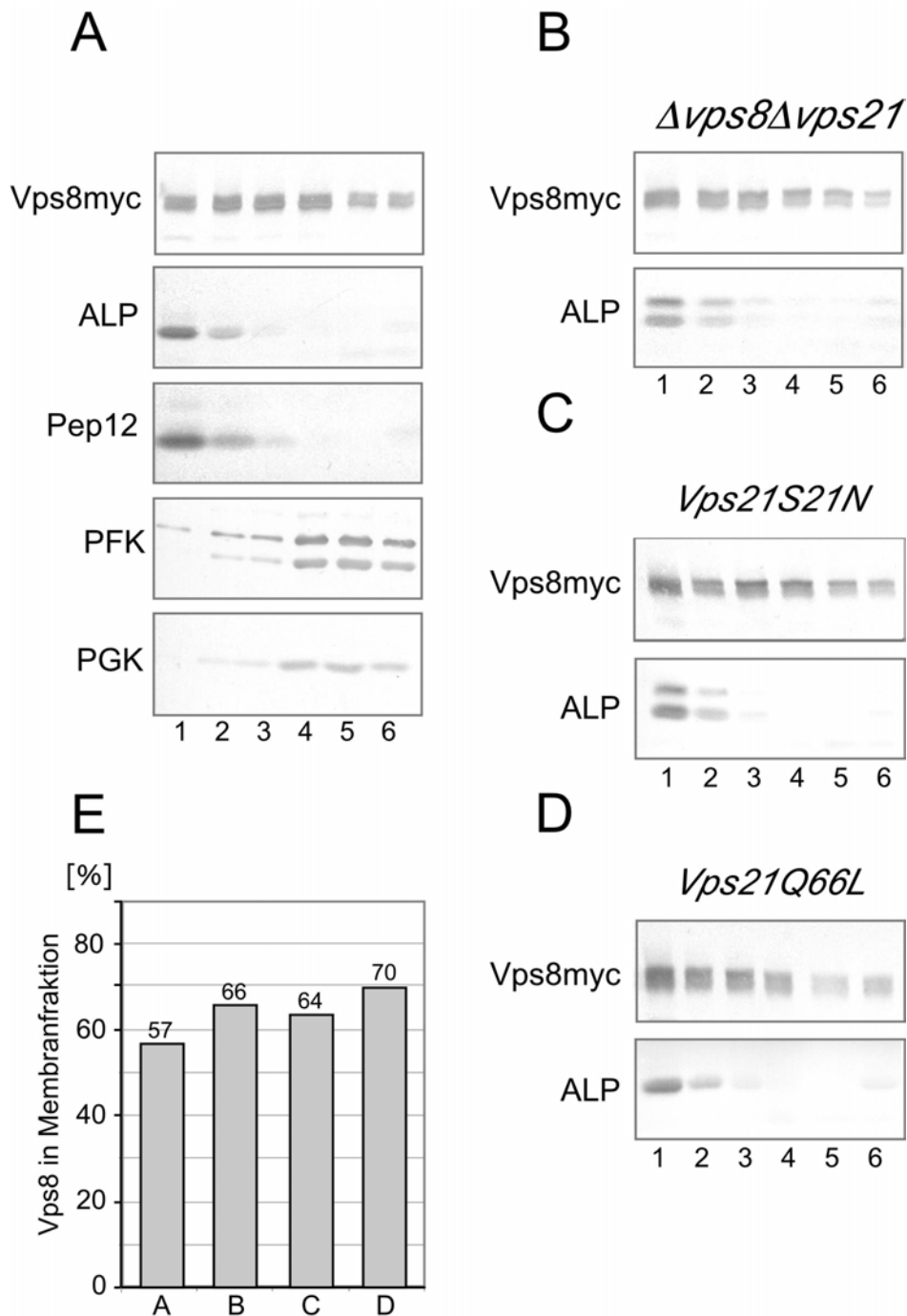


sachte einen dominant-negativen Effekt, welcher damit zusammenhängt, dass überschüssiges Vps21 keinen Geranylgeranyl-Anker für die Membranbindung besitzt. Nur die Prenylierung befähigt Vps21 zur Membranbindung, und nur membrangebunden ist es funktional für den Proteintransport (Horazdovsky *et al.*, 1994). Lag die GDP-blockierte Vps21-Variante (S21N) in der Zelle vor (Spur7,8,9,10), so kam es zur Sekretion von p2-CPY. Der Phänotyp war bemerkenswerterweise ausgeprägter als im  $\Delta vps21$ -Stamm. Wurde hyperaktives Vps21 (Q66L) exprimiert (Spur11,12), hatte dies keine negative Auswirkung auf den CPY-Transport.

Ob eine der mutierten Vps21-Formen die Membranassoziation von Vps8 beeinflusst, wurde im Flotation-Experiment untersucht (Abb. 15). Zellextrakte werden hierbei in einem Optiprep<sup>®</sup>-Gradienten durch Zentrifugation derart aufgetrennt, dass die Komponenten kleinster Dichte (Lipidmembranen) sich in den ersten Fraktionen ansammeln. Sie „schwimmen“ im oberen Teil des Gradienten. Auf diese Weise ist es möglich, den membranassoziierten Anteil eines Proteins zu erfassen. In Abb. 15A wurde ein Zellextrakt aus dem  $\Delta vps8$ -Stamm, welcher Vps8-myc exprimierte im Immunoblot analysiert. Anhand der membrangebundenen Markerproteine ALP, Pep12 sowie der löslichen PFK (Phosphofruktokinase) und PGK (Phosphoglyceratkinase) konnte der Bereich im Gradienten eingegrenzt werden, in welchem Membranproteine sich aufhalten. Fraktionen 1-3 wurden als „Membranbindung“ definiert, Fraktionen 4-6 dementsprechend als „löslich“. Das Diagramm (Abb. 15E) zeigt, dass 57% von Vps8 membranassoziiert vorliegen. In einer Reihe von Experimenten wurden für die Membranassoziation von Vps8 im Mittel 65% festgestellt. Eine Abweichung von +/- 8% erwies sich als nicht signifikant. Im Falle der  $\Delta vps21$ -Mutante (Abb. 15B) konnte daher keine Veränderung zur WT-Situation festgestellt werden.

Wie bei Horazdovsky *et al.*, (1994) beschrieben, ist die Prozessierung der membranständigen, vakuolären Phosphatase ALP in  $\Delta vps21$ -Zellen betroffen, denn die größere Precursor-Form tritt zusätzlich zur reifen Form auf, (Abb. 15B)). Dieser Phänotyp ist auch bei der GDP-blockierten, dominant-negativen Vps21-Mutante (Abb. 15C) zu beobachten. Das Flotation-Ergebnis zeigt, dass inaktives Vps21 ebenfalls keinen Einfluß auf die Membranassoziation von Vps8 hat (Abb. 15E: 64% an der Membran.). Was passiert, wenn Vps21 immer eingeschaltet ist (Abb. 15D, Q66L)? In diesem Fall scheint die Membranbindung noch gefestigter. Dennoch handelt es sich hier um keine signifikante Veränderung.





**Abb. 15:** Vergleich der Membranassoziation von Vps8 im WT und *vps21*-Mutanten. Dargestellt sind Western-Blot Ergebnisse aus Flotation Experimenten der Stämme (A) RKY1843 ( $\Delta vps8$ )/pRK827 (Vps8myc), (B) RKY1926 ( $\Delta vps8\Delta vps21$ )/pRK827 (Vps8myc), (C) RKY1926 ( $\Delta vps8\Delta vps21$ )/pRK827 (Vps8myc); pRK933 (Vps21/S21N), (D) RKY1926 ( $\Delta vps8\Delta vps21$ )/pRK827 (Vps8myc); pRK935 (Vps21/Q66L). Als Kontrollen dienen die Markerproteine ALP (Alkaline Phosphatase), Pep12, PFK (Phosphofruktokinase) und PGK (Phosphoglyceratkinase). (E) zeigt die quantifizierten Vps8myc Signalstärken der Experimente aus (A-D) im Vergleich. Als membranassoziiert wurden die Fraktionen 1-3 gerechnet, Fraktionen 4-5 als löslich. Die Summe der Signale wurde gleich 100% gesetzt.

### 3.6. Suche nach Faktoren, die für Membranassoziation von Vps8 verantwortlich sind

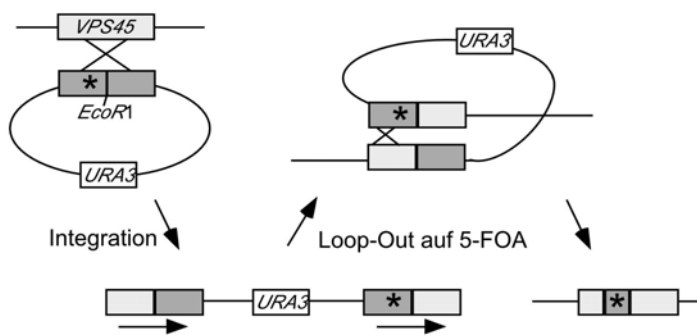
Da die kleine GTPase Vps21 keinen Einfluß auf die Membranständigkeit von Vps8 auszuüben scheint, stellte sich die Frage nach anderen möglichen Faktoren. Interessanterweise besitzt Vps21 zwei nahe Verwandte, die GTPasen Ypt52 und Ypt53. Alle drei sind strukturelle Homologe der Säuger-GTPase Rab5; die Sequenz-Ähnlichkeit zwischen Rab5 und Vps21 liegt bei 71%, zwischen Rab5 und Ypt52 bzw. Ypt53 bei 48-54% (Singer-Krüger *et al.*, 1994). Synergistische Effekte wurden mit Doppel- und Tripelmutanten der Ypts festgestellt. Es ist daher denkbar, dass Ypt52 und Ypt53 die Vps21-Funktion im endozytischen Transportweg zumindest teilweise ersetzen könnten. Flotation-Experimente mit Mutanten der drei Ypts wurden durchgeführt, jedoch konnte kein Zusammenhang zur Membranassoziation von Vps8 festgestellt werden (Ergebnisse in Tab. 8 zusammengefaßt).

Eine zentrale Rolle bei der Zusammensetzung von Hüllen, so genannten „Coats“, auf intrazellulären Membranen, die für Abschnürung von Transportvesikeln erforderlich sind, spielen die ARFs (ADP-ribosylation factors). Es handelt sich dabei um monomere GTPasen, welche an mehreren Stellen des intrazellulären Transports wichtig sind. So ist ARF1 für die Ausbildung des Coatomers (COPI-Coat) beim Retrograden Transport vom Golgi zum ER essentiell, aber auch für die Zusammensetzung des Clathrin-Coats am TGN und der Plasmamembran (Yahara *et al.*, 2001). Die Coats werden über Adapterproteine befestigt, und ARF1 rekrutiert solche Adapter an spezifische Membranbereiche. Nachdem in Flotation-Experimenten mit der *chc1*-Mutante Clathrin als alleiniger Membranassoziationsfaktor für Vps8 ausgeschlossen worden war, entstand die Überlegung, ARF1 könnte Vps8 an die Membranen bringen. In Flotation-Gradienten mit *arf*-Mutanten und unter Zugabe von Brefeldin A, einer Substanz, welche den GDP-GTP Austausch an ARF1 verhindert, wurde dieser Zusammenhang untersucht. Auch unter diesen Bedingungen blieb Vps8 jedoch membrangebunden (Tab.8).

Auch Komponenten der SNARE Maschinerie am späten Endosom, t-SNARE Pep12, SM (Sec1/ Munc18)-Protein Vps45 und NSF/Sec18 wurden als Faktoren für Membranassoziation von Vps8 analysiert. SM-Proteine verbinden die Andockungskomplexe an Transportvesikeln mit den SNARE-Komponenten.

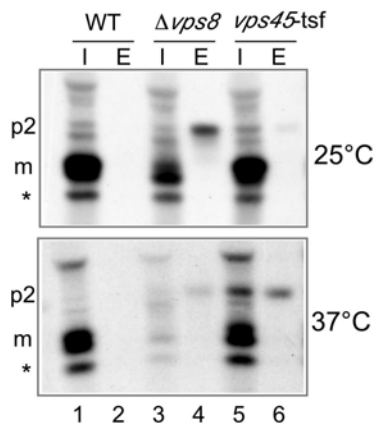
Für die Analyse wurde eine temperatursensitive Variante des Vps45-Proteins hergestellt (Abb. 16A). Die Vps45<sup>ts</sup>-Mutante wurde mit Hilfe des pRCP56-Integrationsplasmids (Piper *et al.*, 1994), auf dem sich das *VPS45-ts-3*-Allel und der *URA3*-Marker befinden konstruiert (Abb. 16A). Das Plasmid musste zuerst mit *EcoRI* linearisiert werden, bevor es transformiert und in der Hefe durch homologe Rekombination in das *VPS45*-Gen eingebaut wurde.

A



**Abb. 16:** Konstruktion einer Vps45-ts<sup>f</sup>-Mutante. (A) Integration des Vps45-ts<sup>3</sup>-Allels an die Stelle von *VPS45* durch homologe Rekombination. Die ts<sup>f</sup>-Mutation ist durch einen Stern gekennzeichnet. (B) Nachweis der Auswirkung der Mutation auf CPY-Transport. Das immunopräzipitierte CPY wurde mit SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. WT (JD52),  $\Delta vps8$  (RKY1843), *VPS45-ts<sup>f</sup>* (RKY2040), I (intern), E (extern), p2 (Golgi-Precursor), m (mature, die reife CPY-Form), \* unspezifisches Signal.

B



Die positiven Kolonien wurden danach auf 5-FOA-Platten getropft und diejenigen, welche den *URA3*-Marker durch Rück-Rekombination wieder verloren hatten, als mögliche Positive auf CPY-Fehlsortierung und ts-Phänotyp hin untersucht. Die Zellen wurden 40 min bei 25°C oder 37°C vorinkubiert, 5 min lang mit Tran<sup>[35S]</sup>-Label markiert, gefolgt von einem Chase von 40 Minuten. Nach Sphäroplastierung wurden Kulturüberstand (E, externe Fraktion) und Sphäroplasten (I, intrazelluläre Fraktion) getrennt und CPY immunopräzipitiert. Das Autoradiogramm in Abb. 16B zeigt die Sekretion und interne Anwesenheit von p2-CPY bei 37°C bei Expression des *vps45-ts<sup>f</sup>* Allels (Spur 5, 6). Ein kleinerer Effekt war bereits bei 25°C zu beobachten, das Wachstum der Zellen war bei dieser Temperatur jedoch nicht beeinträchtigt (nicht gezeigt).

Im Wildtypstamm fand die Prozessierung von CPY auch bei 37°C statt (Spur 1, 2). Der für  $\Delta vps8$ -Zellen typische CPY-Transportdefekt war bei 25°C zu beobachten (Spur 3, 4); bei 37°C war das Wachstum dieser Mutanten stark beeinträchtigt, daher das schwache CPY-Signal.

Mittels Flotation-Experimenten mit *vps45-ts1*- und *pep12*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Membranassoziation von Vps8 nicht von diesen Komponenten der SNARE-Maschinerie abhängig ist (Tab. 8).

Die Membranen selber rekrutieren über direkte Bindung an Phosphatidylinositide Effektorproteine, welche den intrazellulären Transport regulieren (Übersichtsartikel Simonsen *et al.*, 2001). Das Membranphospholipid Phosphatidylinositol (PtdIns) tritt in einfach und mehrfach phosphorylierter Form auf. So wird beispielsweise das Vps27-Protein über seine FYVE-Domäne an PtdIns-3-*P*, das in endosomalen Membranen angereichert ist, gebunden (Burd und Emr, 1998; Stahelin *et al.*, 2002). Vps34 ist die PtdIns-3-Kinase, welche den Transport zwischen Golgi und Vakuole reguliert. Denkbar wäre, dass Vps8 über PtdIns-3-*P* an der Membran befestigt ist. In Flotation-Experimenten mit dem  $\Delta vps34$ -Stamm konnte ein solcher Zusammenhang jedoch nicht beobachtet werden.

Als Weiteres wurde die Abhängigkeit der Membranassoziation von Vps8 von PtdIns-4-*P* untersucht. Dieses Phosphatidylinositid kommt in Trans-Golgi-Membranen angereichert vor. Weder in *pik1*-Mutanten (Pik1, Phosphatidylinositol-4-Kinase) noch bei Überexpression von *SAC1* (einer PtdIns-Phosphatase), das antagonistisch zu Pik1 wirkt, löste sich Vps8 von der Membran.

Es bleibt folglich ungeklärt, welche Faktoren für die Membranbindung von Vps8 verantwortlich sind (Zusammenfassung Tab. 8).

**Tab. 8** Mutationen/ Bedingungen, welche die Membranassoziation von Vps8 nicht beeinflussen

Komponente	Beschreibung	Mutante	Auswirkung
Vps21	kleine monomere GTPase, Rab5-Homolog, Rekrutierung von Effektormolekülen an die endosomale Membran	$\Delta vps21$ , Vps21/S21N, Vps21/Q66L	Blockierung des vakuolären Transports am späten Endosom

Ypt52	kleine monomere GTPase, Rab5-Homologes, redundant zu Vps21 ?	$\Delta ypt52$ , $\Delta ypt52/53$ , $\Delta vps21/ypt52/ypt53$	Blockierung des vakuolären Transports am späten Endosom, synergistischer Effekt mit <i>vps21</i> Deletion
Ypt53	Kleine monomere GTPase, Rab5-Homologes	$\Delta ypt52/53$ , $\Delta vps21/ypt52/ypt53$	Beteiligt am vakuolären Transport, synergistischer Effekt mit <i>vps21</i> Deletion
Chc1	Clathrin Heavy Chain	<i>chc1</i> tsf	kein Clathrin Coat an Plasmamembran und TGN
ARF1	Kleine monomere GTPase, reguliert die Zusammensetzung des COPI-Coats und des Clathrin-Coats am TGN durch Rekrutierung von Adaptor-Proteinen	<i>arf1-13</i> , <i>arf1-16</i> , <i>arf1-18</i>	Blockierung des Golgi → ER und PM/ Golgi → Endosom Transports
BFA	Brefeldin A, makrozyklisches Lacton	-	verhindert Zusammensetzung der Coats
Pep12	t-SNARE am späten Endosom	$\Delta pep12$ , <i>pep12</i> tsf	Blockierung des vakuolären Transports am späten Endosom
Sec18	NSF (N-Ethylmaleimid sensitives Fusionsprotein), eine ATPase, welche bei der Freisetzung des Fusionsapparates eine Rolle spielt	<i>sec18</i>	Blockierung der Vesikelfusion
Vps45	SM-Protein, verbindet die Andockungsmachinerie (Tethering-Faktoren) mit SNAREs	<i>vps45 1-3</i> tsf	Blockierung des vakuolären Transports am späten Endosom

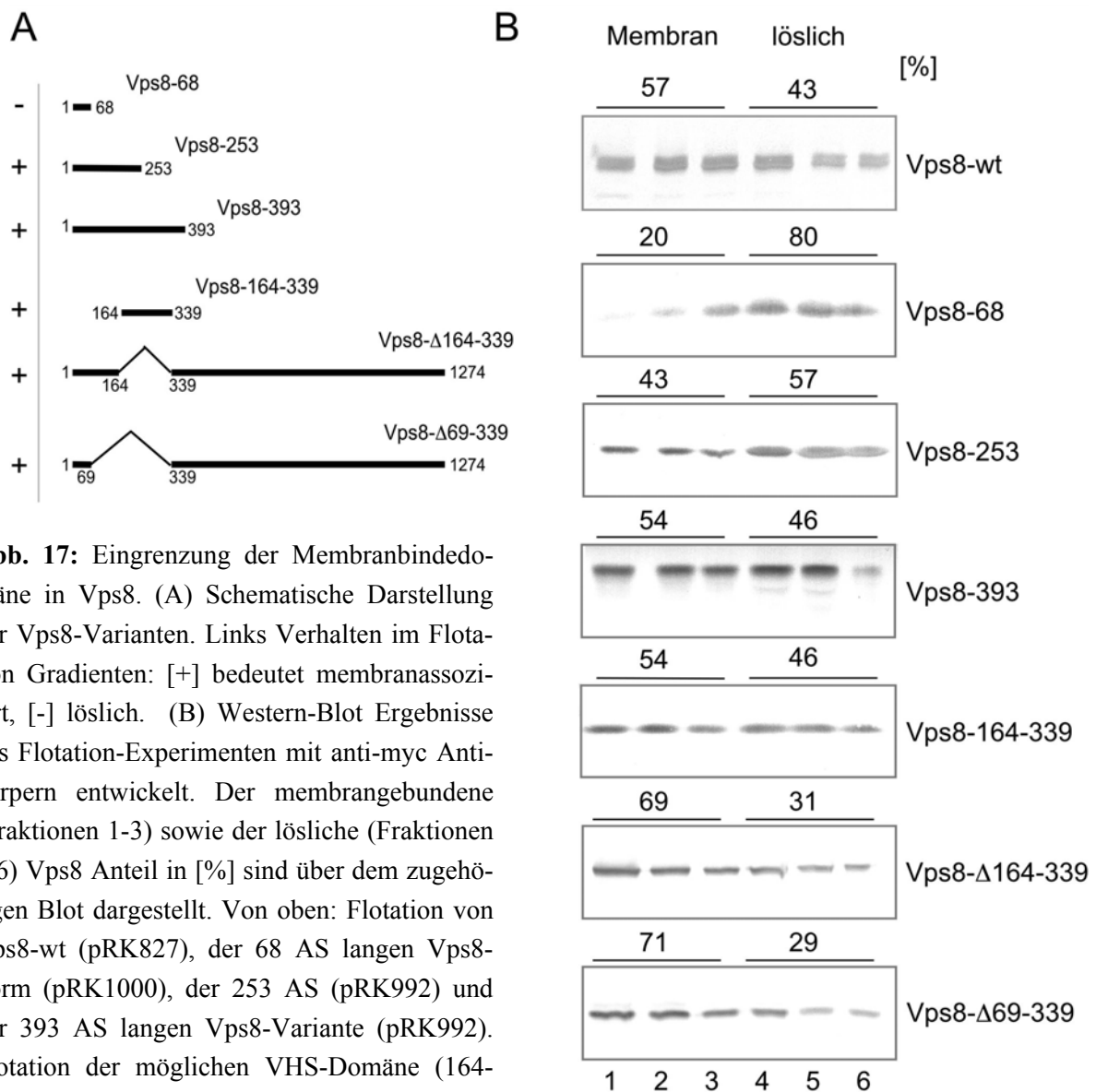
Vps34	einzigste Phosphatidylinositol-3-Kinase, Bildung von PtdIns-3- <i>P</i> in endosomalen Membranen	$\Delta vps34$	Blockierung des vakuolären Transports am späten Endosom
Pik1	Phosphatidylinositol-4-Kinase, Bildung von PtdIns-4- <i>P</i> in Golgi-Membranen	<i>pik1-63</i> , <i>pik1-83</i>	Blockierung des sekretorischen/ endozytischen Weges
Sac1	Phosphatidylinositol-Phosphatase, antagonistisch zu Pik1	<i>SAC1</i> Überexpression	Blockierung des sekretorischen/ endozytischen Weges

### 3.7 Eingrenzung der Membranbindedomäne von Vps8

Mit C-terminal verkürzten Vps8-Varianten (Abb. 17A) wurde nach dem Sequenzbereich gesucht, über den Vps8 an der Membran haftet. Die Vps8-Varianten wurden in  $\Delta vps8$ -Zellen exprimiert und die Fraktionierung des Proteins in Flotationsexperimenten analysiert (Abb. 17B). Tatsächlich konnte eine Vps8-Form, welche lediglich aus den ersten 68 Aminosäuren bestand, nicht mehr an die Membran binden (80% waren löslich), während die Membranassoziation bei einer 253 Aminosäuren-Variante noch gegeben war. Jedoch verringerte sich die Löslichkeit der letzteren bereits auf 57%, und bei der Vps8-393 AS-Variante lag wieder annähernd die WT-Situation vor (46%). Dies deutet auf eine potentielle Membranbindestelle im Bereich von 68-393 Aminosäuren hin. Eine Datenbankanalyse von Vps8 auf konservierte Motive (SMART, [www.smart.embl-heidelberg.de](http://www.smart.embl-heidelberg.de), siehe auch Abb. 20) gab für diesen Bereich mit geringer Zuverlässigkeit (siehe Tab. 9) eine VHS-Domäne an (AS 164-339). Es handelt sich dabei um eine Domäne, die nach den Initialen der Proteine benannt ist, in denen sie zuerst entdeckt worden war (Vps27/Hrs/STAM). Oft im Zusammenspiel mit anderen Funktionsbereichen in demselben Protein vermittelt die VHS-Domäne als ein Multifunktionsadapter wahrscheinlich die Membranlokalisation und/oder die Bindung an andere Proteine.

Der Vps8-Bereich von AS 164-339 wurde C-terminal mit einem 13myc-Epitop markiert (pRK1015) und das Membranassoziationsverhalten untersucht (Abb. 17B). Vps8-164-339 bindet genauso gut an die Membran wie die C-terminal verkürzte Variante Vps8-393 (46% löslich). Erstaunlicherweise verliert die Vps8- $\Delta 164-339$  Form, deren

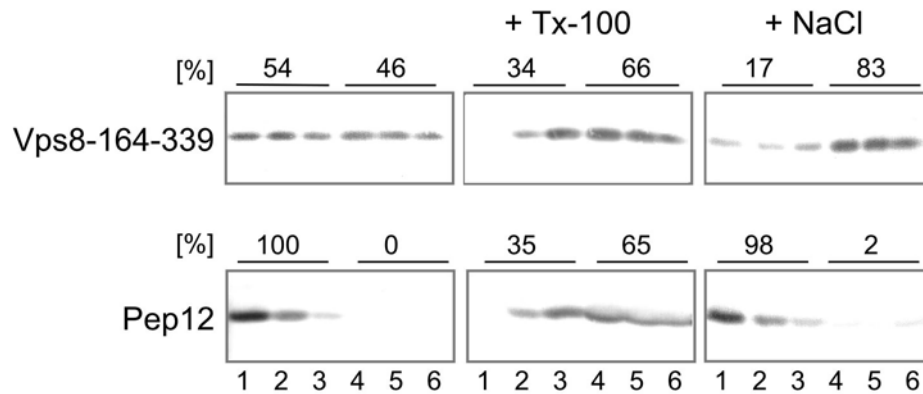
„VHS“-Domäne fehlt, die Membranhaftung jedoch nicht (31% löslich). Auch die etwas erweiterte Deletionsvariante Vps8- $\Delta$ 69-339 fraktioniert wie das Wildtypprotein.



**Abb. 17:** Eingrenzung der Membranbindedomäne in Vps8. (A) Schematische Darstellung der Vps8-Varianten. Links Verhalten im Flotation Gradienten: [+] bedeutet membranassoziiert, [-] löslich. (B) Western-Blot Ergebnisse aus Flotation-Experimenten mit anti-myc Antikörpern entwickelt. Der membrangebundene (Fraktionen 1-3) sowie der lösliche (Fraktionen 4-6) Vps8 Anteil in [%] sind über dem zugehörigen Blot dargestellt. Von oben: Flotation von Vps8-wt (pRK827), der 68 AS langen Vps8-Form (pRK1000), der 253 AS (pRK992) und der 393 AS langen Vps8-Variante (pRK992). Flotation der möglichen VHS-Domäne (164-339 AS) von Vps8 (pRK1015), der Deletionsvariante  $\Delta$ 164-339 (pRK1038) und der  $\Delta$ 69-339 AS-Vps8-Form (pRK1052).

In Abb. 18 ist die Natur der Membranbindung von Vps8-164-339 näher beleuchtet. Das Ergebnis eines Flotation-Experiments ist als Western Blot-Analyse dargestellt. Zusätzlich zu Normalbedingungen wurden die Zellextrakte vor der Zentrifugation einmal mit 1% TX-100 und einmal mit 1M NaCl vorbehandelt. Die untere Reihe demonstriert das Verhalten von Pep12 als Kontrolle für die Wirkung des Detergenz/Salzes. Unter Normalbedingungen sind 46% von Vps8-164-339 löslich. Das Protein ließ sich durch TX-100 zum großen Teil aus der Membran extrahieren. Diese Ex-

traktion ist ebensogut wie im Falle eines integralen Membranproteins (siehe Pep12). Durch die Behandlung mit NaCl löste sich Vps8-164-339 vollständig von der Membran.



**Abb. 18:** Analyse der Membranassoziation der Vps8 VHS-Domäne (164-339 AS, pRK1015) im Flotationgradienten. Western-Blot Ergebnisse aus Flotation-Experimenten mit anti-myc Antikörpern entwickelt. Der membrangebundene (Fraktionen 1-3) sowie der lösliche (Fraktionen 4-6) Vps8 Anteil in [%] sind über dem zugehörigen Blot dargestellt; darunter die Pep12-Kontrolle.

Insgesamt betrachtet legen die Ergebnisse aus Abb. 17 und 18 den Schluß nahe, dass nicht nur ein Bereich, die „VHS“-Domäne, die Membranassoziation von Vps8 vermittelt, sondern dass es mehrere Anheftungsstellen geben muss.

### 3.8 Vps8 zeigt homotypische Wechselwirkung

Die Daten aus der differentiellen Zentrifugation (3.4, Abb. 13) deuten auf Vps8 als Bestandteil eines größeren Proteinkomplexes hin. Dabei wären neben Interaktionen mit anderen Komponenten auch Wechselwirkungen der Vps8-Moleküle untereinander möglich. Um dies zu prüfen wurde das 2-Hybrid System eingesetzt.

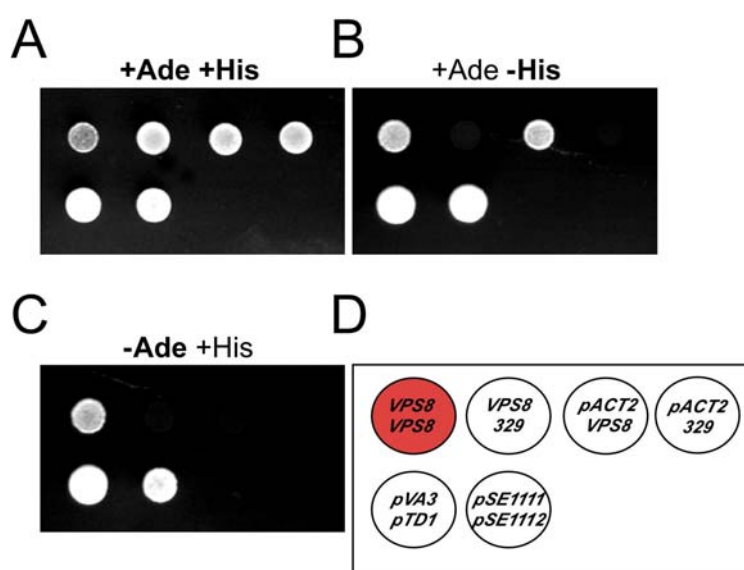
Beim 2-Hybrid System handelt es sich um ein genetisches System zur Detektion von Proteinwechselwirkungen *in vivo* (Fields und Song, 1989). Das System beruht auf dem modularen Charakter eukaryotischer Transkriptionsfaktoren, wie Gal4. Die Funktion des Vollängenproteins kann rekonstituiert werden, wenn die Gal4-DNA-Bindedomäne (BD) und die Gal4-DNA-Aktivierungsdomäne (AD) in räumliche Nähe gelangen. Dazu werden im 2-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 Binde-



domäne zusammengebracht, so dass sie als Transkriptionsfaktor fungieren können; dies geschieht nicht, wenn X und Y nicht miteinander interagieren.

Zur Expression solcher Hybridproteine wurden  $2\mu$ -Vektoren verwendet, welche die Gal4-AD (pACT2) bzw. BD (pRK329) unter Kontrolle des *ADHI*-Promotors kodieren. Ein Polylinker am 3'-Ende der *GAL4*-Domänen mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen erlaubt die Integration von Sequenzen, welche für zu untersuchende Proteine kodieren. Die Fusionskonstrukte werden in einen speziellen Stamm PJ69-4a transformiert, der unter anderem auxotroph ist für Adenin und Histidin. Im Gegenzug beinhaltet der Stamm Expressionskassetten mit den Reportergenen *HIS3*, *ADE2* und *lacZ*, welche Gal4-abhängig transkribiert werden. Die Expression des *HIS3*- oder des *ADE2*-Reportergens bewirken Wachstum auf Medium ohne die auxotrophen Marker. Die Expression der  $\beta$ -Galactosidase vom *lacZ*-Gen erlaubt eine Quantifizierung der Interaktionsstärke. In der vorliegenden Arbeit wird die letztere nicht berücksichtigt.

Transformanten wurden zunächst unter plasmidselektiven Bedingungen herangezogen und anschließend auf Medien mit und ohne Histidin bzw. Adenin getropft (Abb. 19). Die Kombination *VPS8*-AD/*VPS8*-BD (pRK979/pRK978) neben den Negativkontrollen *VPS8*AD oder *VPS8*-BD mit pRK329 oder pACT2 oder beide Ausgangsvektoren alleine wurden untersucht. Als Positivkontrollen dienten Doppeltransformanten mit den Plasmiden pSE1111 und pSE1112 (Fields und Song, 1989) bzw. pVA3 und pTD1 (Iwabuchi *et al.*, 1993).



**Abb. 19:** Homotypische Wechselwirkung von Vps8 im 2-Hybrid-Experiment. Gleiche Mengen Zellsuspension wurden auf selektive Platten getropft und drei Tage bei 30°C inkubiert. (A) SD+Ade+His (Wachstum erfordert keine Aktivierung der Reporterkassetten), (B) SD+Ade, (C) SD+His, (D) Zuordnung der getropften Doppeltransformanten von PJ69-4a: *VPS8/VPS8* (pRK979/pRK978), *VPS8/329* (pRK979/pRK329), *pACT2/VPS8* (pACT2 /pRK978), *pACT2/329* (pACT2/pRK329, Vektorkontrolle). Positivkontrollen: pVA3/pTD1 (Interaktion zwischen T-Antigen und p53) sowie pSE1111/pSE1112 (Interaktion zwischen Snf1 und Snf4).

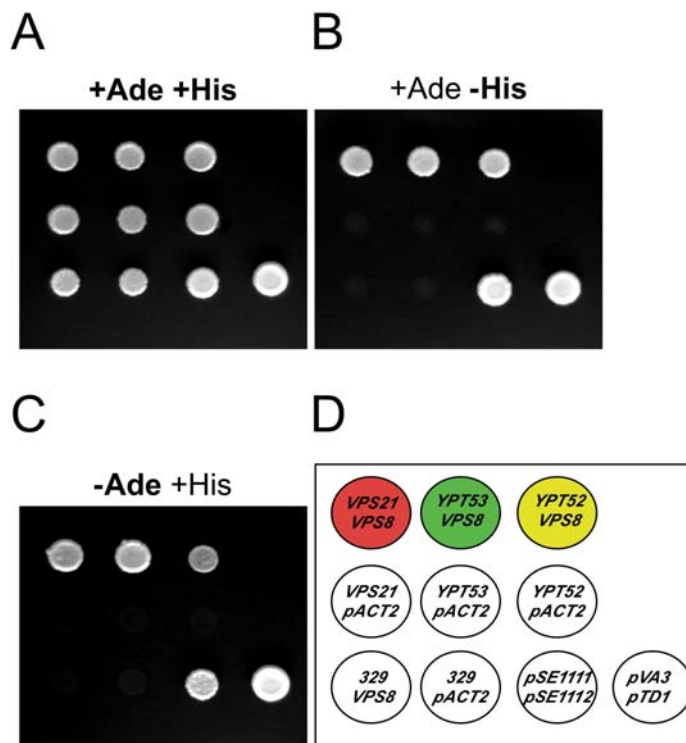
Eine Interaktion von Vps8-AD mit Vps8-BD aktivierte sowohl die Expression des *HIS3*-Gens als auch des *ADE2*-Gens (Abb. 19, B, C). Auf Medium ohne Histidin wuchs auch die Kombination pACT2/*VPS8*-BD. Anscheinend ist Vps8 alleine bereits in der Lage, die *HIS3*-Expression zu aktivieren. Das gilt jedoch nicht für die Transkription des *ADE2*-Gens; auch kann Vps8-BD nicht selbständig an die DNA binden. Demnach scheint es sich um eine verlässliche 2-Hybrid-Wechselwirkung zu handeln.

### 3.9 Vps8 interagiert mit Vps21 *in vivo*

Die vorhergehenden Experimente haben gezeigt, dass die kleine GTPase Vps21 keinen signifikanten Einfluß auf die Membranassoziation von Vps8 besitzt. Aufgrund ihrer phänotypischen Zuordnung zur Klasse D *vps* Gruppe wäre eine direkte oder indirekte Wechselwirkung beider Proteine trotzdem sehr gut möglich.

Die Verbindung von Vps8 zu Vps21 sowie zu den anderen Rab5 Homologen, Ypt52 und Ypt53 wurde im 2-Hybrid System analysiert (Abb. 20). Doppeltransformanten wurden zunächst unter plasmidselektiven Bedingungen herangezogen und anschließend auf Medien mit und ohne Histidin bzw. Adenin getropft. Verwendet wurde das Vps8-Gal4AD-Fusionsprotein (pRK979) jeweils in Kombination mit Vps21-BD (pRK1002), Ypt53-BD (pRK1003) oder Ypt52-BD (pRK1024). Als Negativkontrollen dienten Kombinationen mit den entsprechenden Ausgangsplasmiden, pACT2 bei Vps21, Ypt52, Ypt53 und pRK329 bei Vps8 sowie die Kombination beider Ausgangskontrollen. Transformanten mit pSE1111/pSE1112 und pVA3/pTD1 stellten die Positivkontrollen dar.

Alle drei GTPasen zeigten Interaktion mit Vps8, sowohl auf histidin- als auch auf adeninfreiem Medium. Keine Wechselwirkung hingegen war unter den als Negativkontrollen verwendeten Kombinationen zu beobachten.



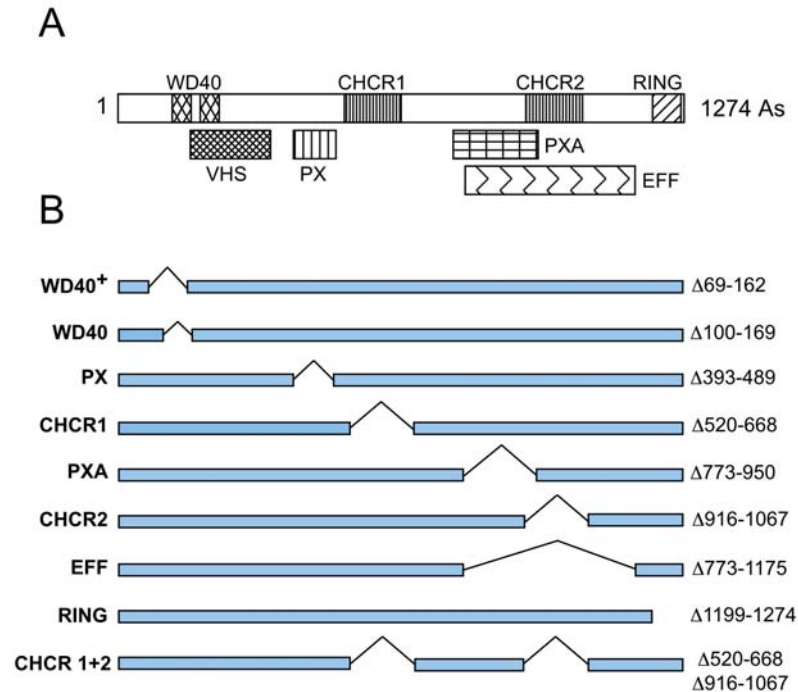
**Abb. 20:** Interaktion zwischen Vps8 und Vps21, Ypt52 sowie Ypt53 im 2-Hybrid Experiment. Gleiche Mengen Zellsuspension wurden auf selektive Platten getropft und drei Tage bei 30°C inkubiert. (A) SD+Ade+His (Wachstum erfordert keine Aktivierung der Reporter-kassetten), (B) SD+Ade, (C) SD+His; (D) Zuordnung der getropften Doppeltransformanten von PJ69-4a: *VPS21/VPS8* (pRK1002/ RK979), *YPT53/VPS8* (pRK1003/pRK979), *YPT52/VPS8* (1024/pRK979), *VPS21/pACT2* (pRK1002/pACT2), *YPT53/pACT2* (pRK1003/pACT2), *YPT52/pACT2* (pRK1024/pACT2), *329/VPS8* (pRK329/pRK979), *pRK329/pACT2* (Vektorkontrolle). Positivkontrollen: pSE1111/ pSE1112 und pVA3/pTD1.

### 3.10 Deletionsanalyse von Vps8

Im folgenden sollten Bereiche im Vps8-Protein spezifiziert werden, welche Träger der Vps8-Funktionen, wie CPY und Ste6 Sortierung, Vps21-Bindung oder Membranassoziation sind. Eine Deletionsanalyse wurde durchgeführt, die sich an Abschnitten im Vps8-Protein orientierte, denen mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit konservierte funktionale Domänen zugeordnet werden konnten. Die Abb. 21A stellt schematisch die gefundenen Proteinmotive dar, in Tab.9 sind diese erläutert und mit einem Wahrscheinlichkeitswert (e-value) beurteilt. Vps8 wurde mit der SMART und der EMBL-EBI-Proteindatenbank verglichen. Je besser die Vps8-Sequenz zu den konservierten Motiven paßt, desto weniger zufällige Datenbanksequenzen werden sich finden, die eine ebenso hohe Motivähnlichkeit besitzen und desto kleiner ist der e-value. Die Datenbanken benutzen unterschiedliche Algorithmen für die Berechnung, daher treten verschiedene Zahlenwerte auf (vgl. Tab. 9 Bsp. WD40).

Mit höchster Zuverlässigkeit ist ein RING-H2-Motiv am C-Terminus zu finden. Es handelt sich hierbei um eine cysteinreiche Region, welche sich zu einer RING-Finger  $Zn^{2+}$ -Bindedomäne faltet. In der RING-H2-Variante sind das Cys<sub>4</sub> und Cys<sub>5</sub> durch Histidin-Reste ersetzt. Die RING-Domäne ist möglicherweise an Protein-Protein Wech-

selwirkungen beteiligt und tritt charakteristisch in E3-Ubiquitin-Ligasen auf, wo sie deren Bindung an Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2, Ubc's) vermittelt. Für die Deletionsanalyse wurde der Bereich von AS 1199-1274 (Abb. 21B) entfernt.



**Abb. 21:** Deletionsanalyse von Vps8. **(A)** Vps8-Protein mit möglichen konservierten Domänen aus der SMART-Datenbank ([www.smart.embl-heidelberg.de](http://www.smart.embl-heidelberg.de)): RING-H2-Variante [AS 1198-1265], WD40-repeat-1 [122-161], WD40-repeat-2 [181-224]; Effektor: schließt ähnliche überlappende Domänen ein, FH2 [786-1166], RasGEFN [1046-1172], RhoGEF [854-1067], RhoGAP [1027-1176], ARF-GAP [883-968], Sec7 [948-1138]; PXA [759-949], PX [395-488] und VHS [164-339]. EMBL-EBI-Datenbank ([www.ebi.ac.uk/cgi-bin/iprscan](http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/iprscan)): Clathrin Heavy Chain Repeat (CHCR)-1 [507-638] und CHCR-2 [915-1037], vgl. Tab. 9 **(B)** C-terminal 13myc markierte Deletionsvarianten von Vps8, von oben: WD40<sup>+</sup> [pRK999], WD40 [pRK902]; PX [pRK1006], CHCR-1 [pRK868], PXA [pRK1007], CHCR-2 [pRK863], EFF [pRK1008], RING [pRK858], CHCR1+2 [pRK864].

Ferner wurden 2 so genannte WD40-Repeats gefunden. Sie bestehen aus 40 AS, welche oft mit einem Trp-Asp (W-D)-Dipeptid enden. Mehrere WD40-Repeats setzen sich zu einer  $\beta$ -Propeller Struktur zusammen, einem Gerüst für Proteinwechselwirkungen. Entsprechende Proteine tragen zwischen 4-16 Repeats. Zwei Vps8-Deletionen betreffen das erste WD40-Repeat: WD40 und WD40<sup>+</sup>, die letztere umfasst noch einen Teil des N-Terminus.

Im C-terminalen Abschnitt von Vps8 liegen überlappende GTPase-Effektor-Motive (FH2, RasGEFN, RhoGEF, RhoGAP, ARF-GAP, Sec7). Diese sind in der großen Effektor Deletion nicht mehr vorhanden (AS 773-1175).

In der Mitte des Proteins befinden sich die so genannten Vps9-, PX- und die PXA-Motive. Das Vps9-Motiv entstammt einem konservierten Bereich in Vps9, dem Guannukleotide Exchange Factor von Vps21. Die PX (Phox Homology) bzw. die PXA Domänen spielen eine Rolle bei der Bindung an Phosphoinositide. In der PX-Deletionsvariante (AS 393-489) fehlt das PX-Motiv vollständig sowie ein großer Teil des Vps9-Motivs. Die PXA-Deletion umfasst AS 773-950.

Die EMBL-EBI-Datenbank gibt zwei mögliche Clathrin Heavy Chain Homologie Domänen für Vps8 an. Die Deletionsvariante CHCR1 deckt den Bereich von AS 520-668 ab; das zweite Motiv ist in der CHCR2-Variante (AS 916-1067) deletiert. In der CHCR1+2 Vps8-Variante fehlen beide Motive. In Clathrin sind je sieben CHCR-Domänen essentiell für die Zusammensetzung der schweren Ketten zur Triskelion Struktur. CHCR-Motive könnten zur Oligomerisierung diverser Proteine beitragen. So könnte Vps8, das an sich selbst bindet (s.o.) über diese Repeats multimerisieren oder mit anderen Proteinen wechselwirken.

Alle Deletionsvarianten wurden C-terminal mit einem 13-myc Epitop markiert und vom *CEN*-Plasmid aus exprimiert.

**Tab. 9** Proteinmotive in Vps8<sup>1</sup>.

Motiv aus SMART-Datenbank	Beschreibung	e-value
RING-H2-Variante [1198-1265 AS]	E3 Ubiquitin-Protein Ligase Aktivität	1,57 e-02
WD40-Repeat1 [122-161 AS]	mehrere Repeats fungieren als beta-Propeller Struktur, Plattform für Proteininteraktionen	2,31 e-01
WD40-Repeat2 [181-224 AS]		8,52 e+01
Vps9 [356-466]	Effektor-Motiv im Vps9 Protein	1,78 e+2
EFF : [786-1176]	Interaktion mit GTPasen	
FH2 [786-1166]		3,4 e+02
RasGEFN [1046-1172]		4,04 e+02
RhoGEF [854-1067]		4,36 e+02
RhoGAP [1027-1176]		5,71 e+02
ARF-GAP [883-968]		6,46 e+02
Sec7 [948-1138]		7,15 e+02

PXA [759-949]	kommt in Assoziation mit PX-Motiven vor	8,74 e+02
PX [395-488]	Phosphoinositid-bindendes Modul, Membranassoziation	1,01 e+03
VHS [164-339]	Vielzweck-Adapter, der Proteine an Membranen lokalisiert	2,84 e+03

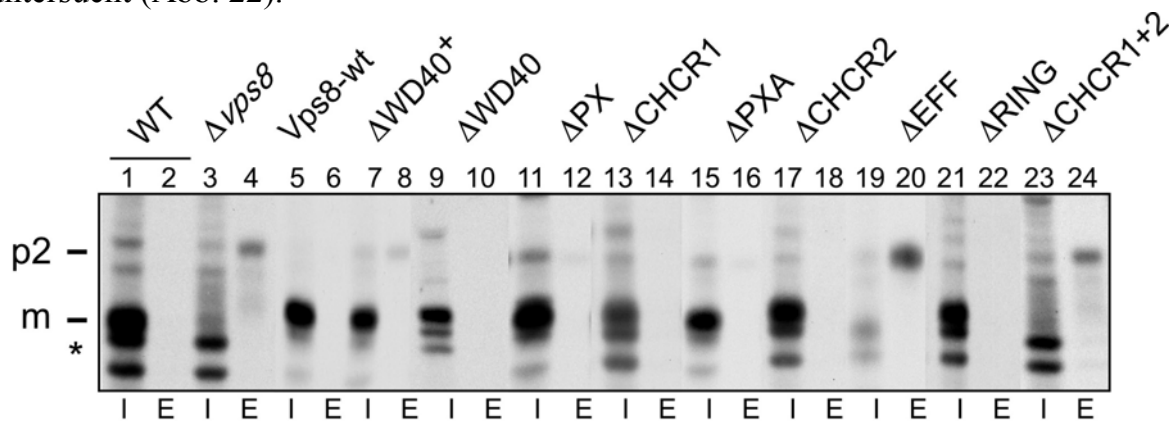
#### Motive aus EMBL-EBI-Datenbank

CHCR 1+2	Clathrin Heavy Chain Repeat, Zusammensetzung der Triskelion Struktur	14,763
Zum Vergleich: WD40		11,350

<sup>1</sup> In Vps8 gefundene mögliche Motive, die Position im Protein (AS) sowie deren Beurteilung (e-values). Je kleiner der e-value, desto sicherer das Motiv. Für die EMBL-EBI-Datenbank gilt ein anderer Algorithmus, daher nicht direkt mit SMART vergleichbar.

### 3.11 CPY Transport in Vps8-Deletionsmutanten

Der Transport der vakuolären Hydrolase CPY in den Vps8 Deletionsmutanten wurde untersucht (Abb. 22).



**Abb. 22:** CPY-Transport in *vps8*-Deletionsmutanten. Immunopräzipitiertes CPY Protein wurde mit SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Untersucht wurden von links: (1,2) WT (JD52), (3,4)  $\Delta vps8$  (RKY1843) sowie (5,6)  $\Delta vps8$  (RKY1843) mit: Vps8-13myc (pRK827), (7,8) Vps8 $\Delta$ 69-162 (pRK999), (9,10) Vps8 $\Delta$ 100-169 (pRK902), (11,12) Vps8 $\Delta$ 393-489 (pRK1006), (13,14) Vps8 $\Delta$ 520-668 (pRK868), (15,16) Vps8 $\Delta$ 773-950 (pRK1007), (17,18) Vps8 $\Delta$ 916-1067 (pRK863), (19,20) Vps8 $\Delta$ 773-1175 (pRK1008), (21,22) Vps8 $\Delta$ 1199-1274 (pRK858), (23,24) Vps8 $\Delta$ 520-686 $\Delta$ 916-1067 (pRK864). p2 (Golgi-Precursor), m (mature, die reife CPY-Form), \* unspezifisches Signal.

WT- und  $\Delta vps8$ -, sowie mit den Vps8-Varianten transformierte  $\Delta vps8$ -Zellen wurden 5 Minuten lang mit Tran[<sup>35</sup>S]-Label markiert und nach 40 Minuten Chase sphäropla-

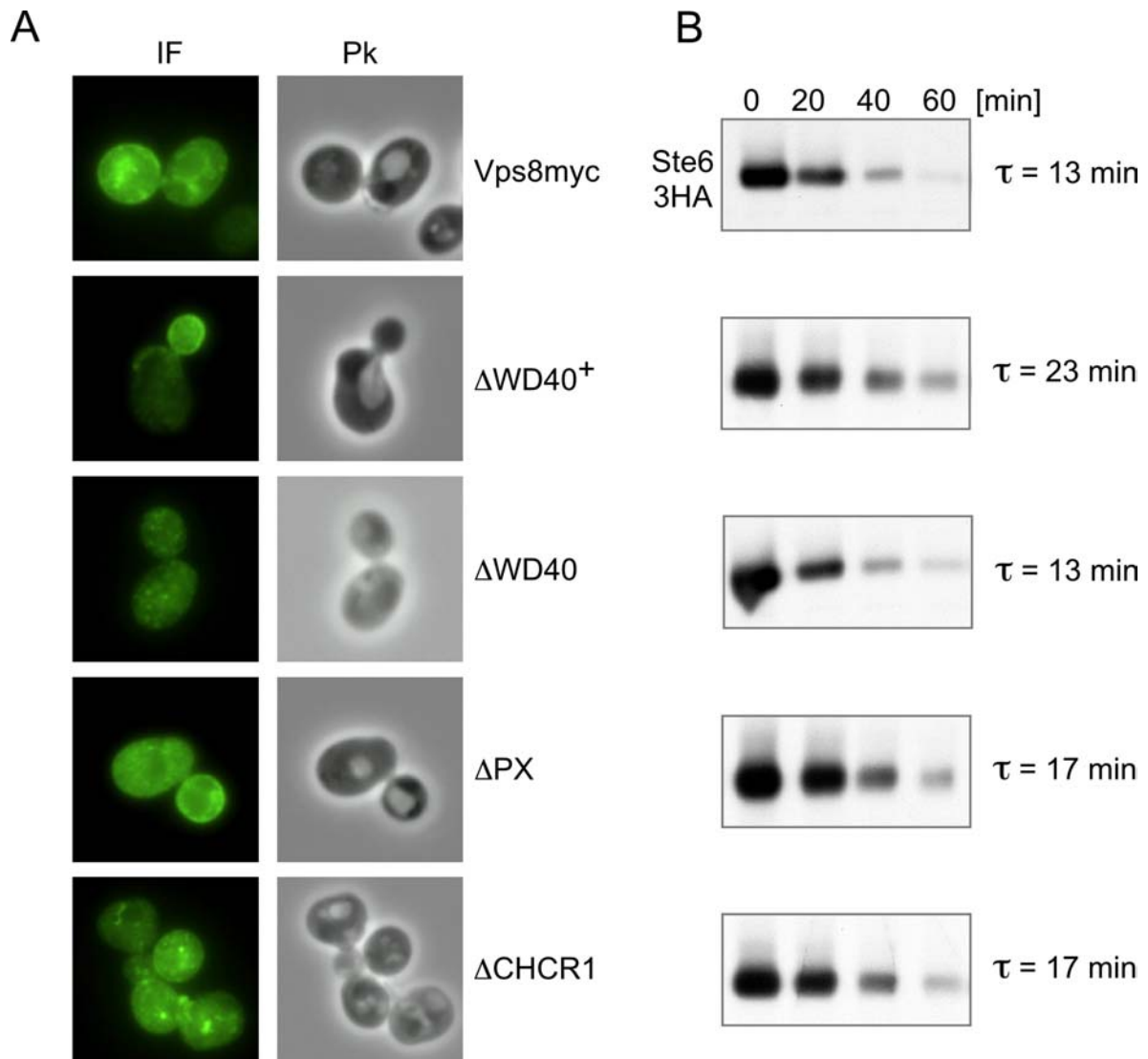
stiert. CPY-Proteine wurden aus den getrennten extrazellulären (E) und intrazellulären (I) Fraktionen immunopräzipitiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Während in  $\Delta vps8$ -Zellen der Großteil von CPY als p2-Proenzym sekretiert worden war, konnte im WT- und  $\Delta vps8$ -Stamm, mit komplementierendem *VPS8*<sup>wt</sup> Plasmid CPY zur Vakuole gelangen und dort zur reifen (m) Form prozessiert werden. Von den untersuchten Transformanten zeigten *Vps8*- $\Delta$ EFF ( $\Delta$ 773-1175) und *Vps8*- $\Delta$ CHCR1+2 ( $\Delta$ 520-668/  $\Delta$ 916-1067) eine starke, dem  $\Delta vps8$  Phänotyp vergleichbare CPY-Fehlsortierung. Im  $WD40^+$ -( $\Delta$ 69-162) und PX-( $\Delta$ 393-489) Deletionstämmen war ein sehr kleiner Fehlsortierungseffekt zu beobachten.

### 3.12 Lokalisation von Ste6 in *Vps8* Deletionsmutanten

Ste6 akkumuliert polar in der Knospenmembran von  $\Delta vps8$  Zellen, wohingegen es im Wildtyp in interne Strukturen verteilt beobachtet wird (Abschn. 3.1). Auch verursachte die Deletion von *VPS8* eine Stabilisierung des Proteins. Die Auswirkung der *Vps8*-Deletionsmutanten auf den Transport von Ste6 sollte nun mittels Immunfluoreszenz und Pulse-Chase-Experimenten analysiert werden. Diesmal wurde als Epitopmarkierung für Ste6 das Influenzavirus Hämagglutinin (HA) gewählt. Die Ste6-Verteilung in  $\Delta vps8$ -Doppeltransformanten, welche  $2\mu$  Ste6-HA neben der jeweiligen *Vps8*-Variante exprimierten, zeigt die Abb. 23A und C. Zur Messung des Ste6-Abbaus wurden die Zellen 15 Minuten lang mit Tran<sup>[35S]</sup>-Label markiert (Pulse) und dann durch Zugabe eines Überschusses an unmarkiertem Methionin/Cystein der Chase eingeleitet. Die Probennahme erfolgte alle 20 Minuten; das immunopräzipitierte Ste6 wurde mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (Abb. 23B, D).

Eine eindrucksvolle Stabilisierung von Ste6, verbunden mit der polaren Knospenlokalisation, konnte in der EFF ( $\Delta$ 773-1175) sowie der CHCR1+2 ( $\Delta$ 520-668 $\Delta$ 916-1067) Deletionsmutante festgestellt werden. Die Ste6-Halbwertszeit  $\tau$  betrug hier 96 bzw. 69 Minuten. Eine polare Ste6-Verteilung wurde ebenfalls als Auswirkung der  $WD40^+$  ( $\Delta$ 69-162) und PXA ( $\Delta$ 773-950)-Variante beobachtet; in diesen Mutanten war Ste6 etwa um das doppelte stabiler,  $\tau = 23$  min. In der PX ( $\Delta$ 393-489)-Mutante wurde der Abbau von Ste6 etwas verzögert ( $\tau = 17$  min) und Ste6 ebenfalls in der Knospe beobachtet. Doch korrelierte dieser Einfluß auf Ste6 Stabilität nicht immer unbedingt mit einer polaren Verteilung in der Zelle (CHCR1:  $\Delta$ 520-668,  $\tau = 17$  min). Hierbei scheint es sich um Grenzsituationen zu handeln. Im Falle der CHCR2 ( $\Delta$ 916-1067)-

Deletionsmutante zeigte Ste6 eine Tendenz zur polaren Lokalisation ohne dass eine Stabilisierung vorlag.



**Abb. 23:** Auswirkung der *vps8*-Deletionsmutanten auf den Ste6-Transport. (A, C)  $\Delta$ *vps8*-Stämme mit entsprechenden Vps8-Deletionsvarianten wurden mit pRK906 ( $2\mu$  wt Ste6-HA) transformiert und die Ste6-Verteilung mittels Immunofluoreszenz mit anti-HA Primärantikörpern und FITC gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörpern untersucht. Es wurden analysiert (A, von oben): Vps8 (wt), Vps8 $\Delta$ 69-162 (pRK999), Vps8 $\Delta$ 100-169 (pRK902), Vps8 $\Delta$ 393-489 (pRK1006), Vps8 $\Delta$ 520-668 (pRK868); C: Vps8 $\Delta$ 773-950 (pRK1007), Vps8 $\Delta$ 916-1067 (pRK863), Vps8 $\Delta$ 773-1175 (pRK1008), Vps8 $\Delta$ 1199-1274 (pRK858), Vps8 $\Delta$ 520-686 $\Delta$ 916-1067 (pRK864). IF: FITC-Filter, Pk: Phasenkontrast. (B, D) Stabilität von Ste6-HA in *vps8*-Mutanten, Stämme in gleicher Reihenfolge wie (A, C). Die Zellen wurden 15 min lang mit Tran[<sup>35</sup>S]-Label markiert, worauf ein Überschuss an Methionin/Cystein zugegeben (t=0) und in angegebenen Zeitabständen Proben entnommen wurden. Der spezifische Nachweis von Ste6 erfolgte durch Immunopräzipitation mit anti HA-Antikörpern, SDS-PAGE und Autoradiographie. Die Halbwertszeit ( $\tau$ ) wurde anhand der Abnahme der Ste6-Signalintensität berechnet.



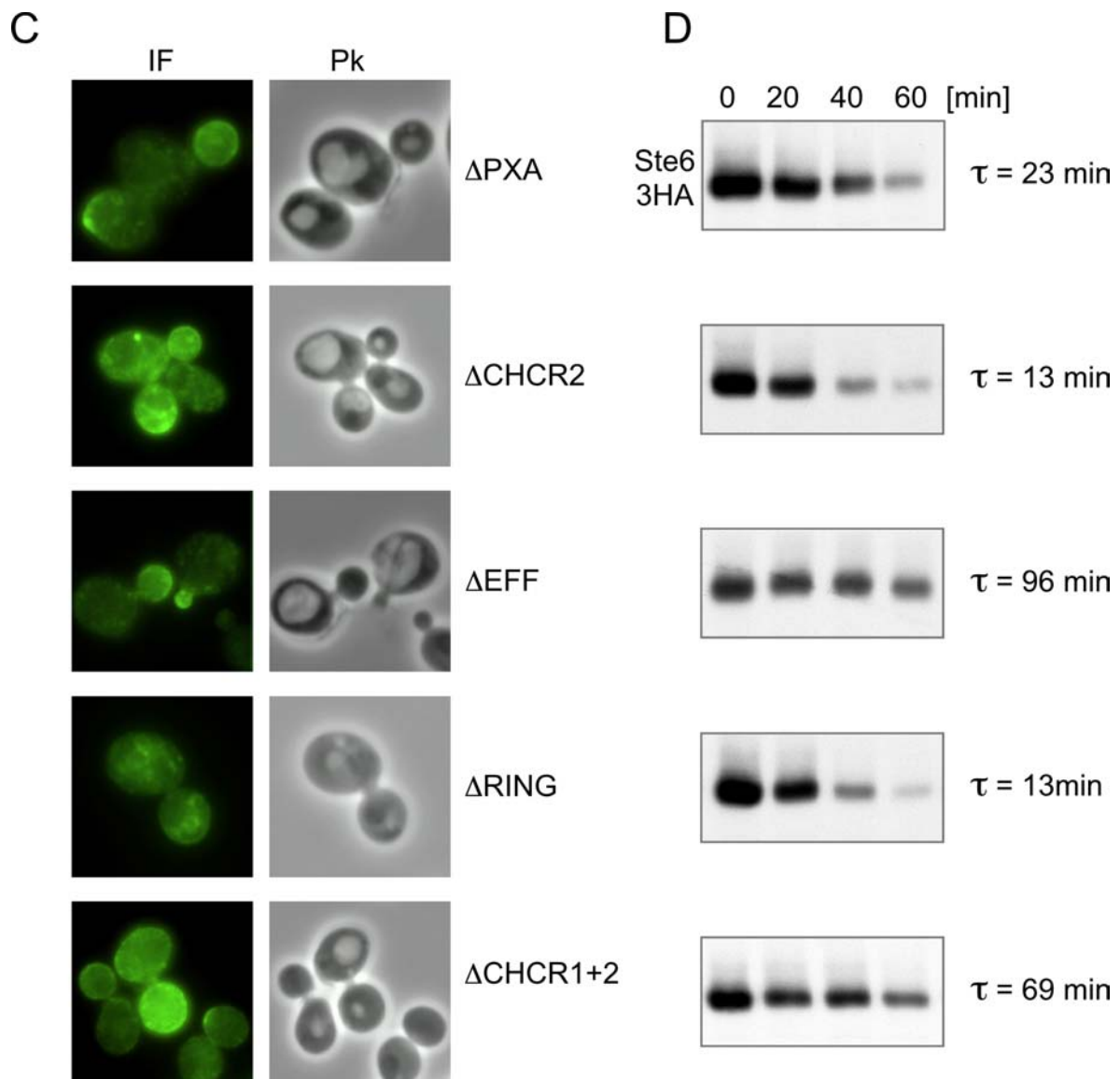


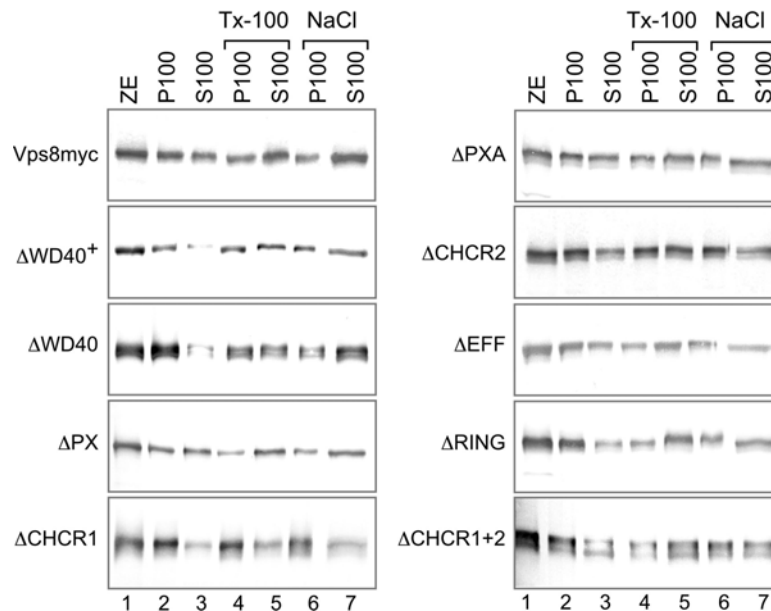
Abb. 23: Fortsetzung

### 3.13 Das Sedimentationsverhalten von Vps8 ist von bestimmten Bereichen abhängig

Im Abschnitt 3.4 (Abb. 13) wurde die ungewöhnlich starke Sedimentationsneigung von Vps8 analysiert. Die folgenden Experimente greifen diese Fragestellung noch einmal auf; hier sollte die Ursache für das Sedimentationsverhalten im Protein untersucht werden.

Differentielle Fraktionierungen wurden durchgeführt, wobei Zellextrakte aus  $\Delta$ vps8-Hefen, welche die jeweilige Vps8-Deletionsvariante exprimieren, vor den Zentrifugationsschritten mit Detergenzien oder Salz behandelt wurden. Von groben Zelltrüm-

mern gereinigte Zellextrakte wurden 30 min lang mit 0,25% TX-100/ 2,5%  $\beta$ -D-Maltosid inkubiert, um Proteine aus Membranen zu extrahieren oder mit 1M NaCl, um Proteinwechselwirkungen zu schwächen. Durch nachfolgende Zentrifugation bei 100 000 g wurden die P100 (Pellet) und die S100 (Überstand) erhalten.



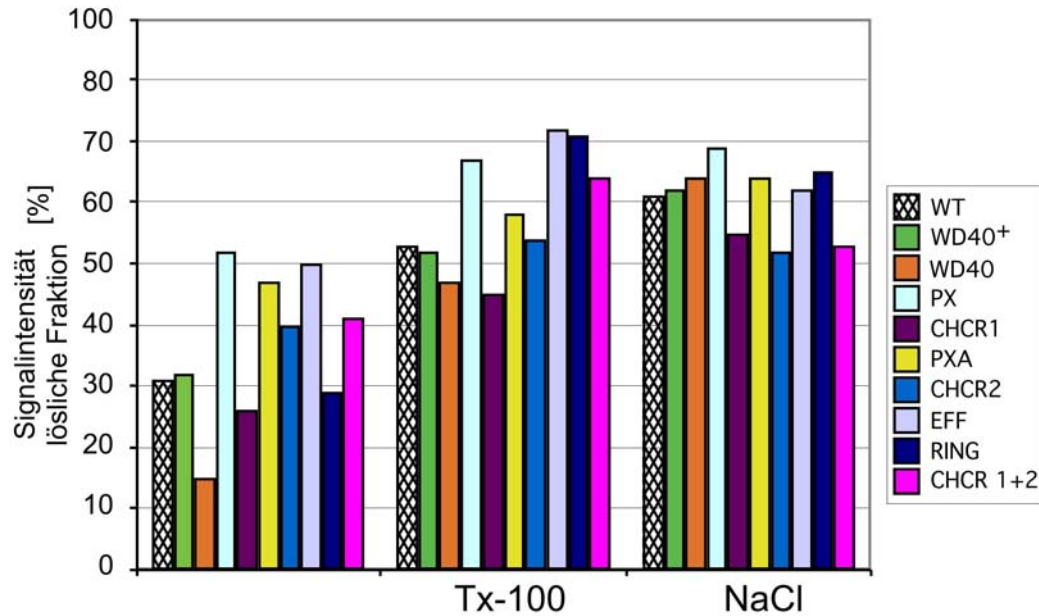
**Abb. 24:** Untersuchung der Löslichkeit von Vps8-Deletionsvarianten. Äquivalente Anteile des Gesamtzellextrakts (ZE), der pelletierten (P100) und Überstand-Fractionen (S100) wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Spur 1: Zellextrakt; Spur 2,3: Normalbedingungen; Spur 4,5: 0,25% TX-100/ 2,5%  $\beta$ -D-Maltosid; Spur 6,7: 1 M NaCl. Dargestellt sind von oben: Vps8myc-WT (pRK827), Vps8 $\Delta$ 69-162 (pRK999), Vps8 $\Delta$ 100-169 (pRK902), Vps8 $\Delta$ 393-489 (pRK1006), Vps8 $\Delta$ 520-668 (pRK868), Vps8 $\Delta$ 773-950 (pRK1007), Vps8 $\Delta$ 916-1067 (pRK863), Vps8 $\Delta$ 773-1175 (pRK1008), Vps8 $\Delta$ 1199-1274 (pRK858), Vps8 $\Delta$ 520-686 $\Delta$ 916-1067 (pRK864).

In Abb. 24 ist die Western Blot-Analyse einer differentiellen Zentrifugation beispielhaft dargestellt, in Abb. 25 die zugehörige Quantifizierung von jeweils 3 Experimenten pro Stamm. Es sind die Mittelwerte der löslichen S100 Fractionen als Prozentanteil des Gesamtextraktes aufgetragen. Die Werte des WD40<sup>+</sup> und PXA-Stammes sind das Ergebnis von einem Experiment. Erfahrungsgemäß sind nur Veränderungen über 10% als signifikant anzusehen.

Wie in vorhergehenden Experimenten bereits beobachtet, lagen 30% wt-Vps8 von vornherein gelöst vor; der sedimentierbare Anteil (70%) enthielt 20% detergentzlösliches, wahrscheinlich peripher membrangebundenes Protein und 30% NaCl lösliche Aggregate. Offensichtlich befinden sich demzufolge ca. 10% von Vps8 in NaCl-löslichen Proteinkomplexen, die nicht detergent-solubilisierbar sind. 40% von Vps8

ließen sich auch durch die Einwirkung von 1M NaCl nicht in Lösung bringen und stellen möglicherweise unphysiologische Aggregate dar.

**A**



**B**

	Signalintensität der löslichen Fraktion [%]				
		Tx-100	NaCl	ΔTx-100	ΔNaCl
WT	31	53	61	22	30
WD40 <sup>+</sup> (Δ69-162)	32	52	62	20	30
WD40 (Δ100-169)	15	47	64	32	49
PX (Δ393-489)	52	67	69	15	17
CHCR1 (Δ520-668)	26	45	55	19	29
PXA (Δ773-950)	47	58	64	11	17
CHCR2 (Δ916-1067)	40	54	52	14	12
EFF (Δ773-1175)	50	72	62	22	12
RING (Δ1199-1274)	29	71	65	42	36
CHCR1+2 (Δ520-668 Δ916-1067)	41	64	53	23	12

**Abb. 25:** Analyse der Löslichkeit von Vps8-Deletionsvarianten. **(A)** Dargestellt sind quantifizierte Signale der Überstandsfraktion mit WT Vps8myc, WD40<sup>+</sup> Vps8Δ69-162, WD40 Vps8Δ100-169, PX Vps8Δ393-489, CHCR1 Vps8Δ520-668, PXA Vps8Δ773-950, CHCR2 Vps8Δ916-1067, EFF Vps8Δ773-1175, RING Vps8Δ1199-1274, CHCR 1+2 Vps8Δ520-686Δ916-1067. **(B)** Tabelle mit relativen Werten des Vps8 Anteils in der löslichen Fraktion, die Signalstärke des Gesamtzellextraktes wurde gleich 100% gesetzt.

Mit einem Blick auf die Ergebnisse unter Normalbedingungen (kein TX-100/Maltosid, kein NaCl) in Abb. 25 fallen drei Deletionsvarianten auf, welche von vornherein um

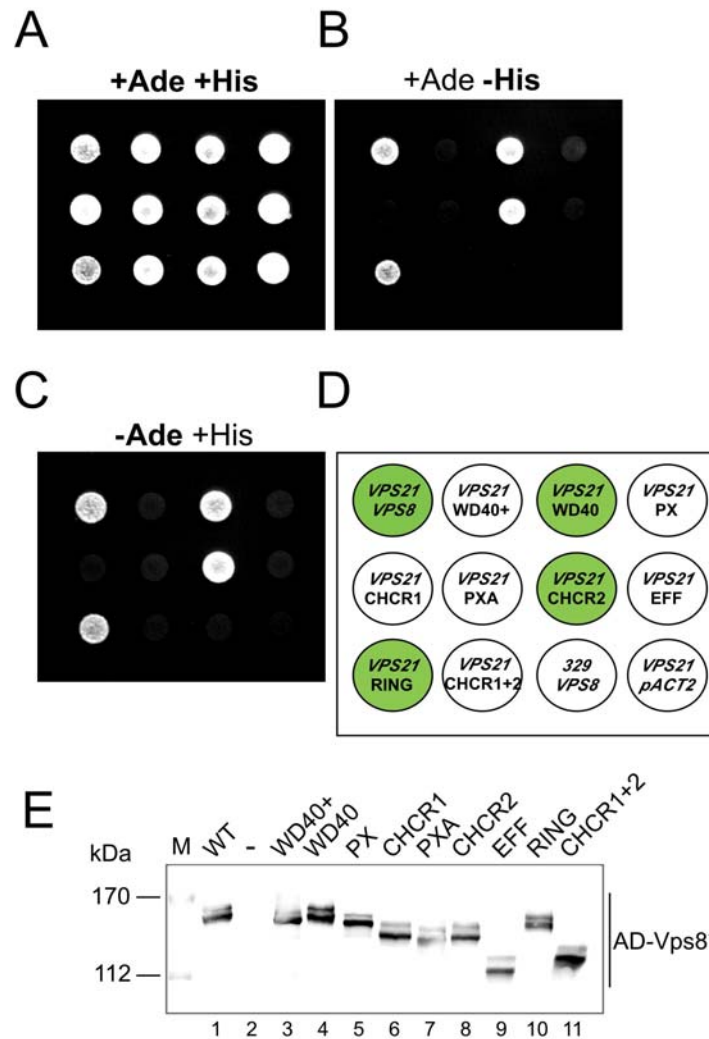
20% löslicher waren als das wt-Vps8-Protein: PX ( $\Delta 393-489$ ), PXA ( $\Delta 773-950$ ) und EFF ( $\Delta 773-1175$ ). Anscheinend tragen diese Bereiche maßgeblich zur Fähigkeit des Proteins bei, sich mit anderen Proteinen zu einem Komplex zusammenzulagern. Unter Einwirkung von Detergenzien gingen zusätzlich 10-20% der drei Deletionsvarianten (der membrangebundene Pool) in Lösung. Die Zugabe von NaCl hob die Unterschiede zwischen wt-Vps8 und den Deletionsmutanten auf. Bei wt-Vps8 wurden hier Proteinaggregate aufgelöst, die bei den Deletionsvarianten offenbar gar nicht erst entstanden waren.

Ähnliche, jedoch nicht so stark ausgeprägte Unterschiede lagen bei den Vps8-Deletionen CHCR2 ( $\Delta 916-1067$ ) sowie CHCR 1+2 ( $\Delta 520-686\Delta 916-1067$ ) vor. Der lösliche Anteil betrug hier unter Normalbedingungen 40%, 10-20% bildeten den Membranpool. Beide Deletionen befinden sich innerhalb der EFF-Domäne, betreffen also, weniger stark vielleicht, dieselbe Funktion.

Auffällig war das Sedimentationsverhalten der RING ( $\Delta 1199-1274$ )-Deletionsvariante. Unter Normalbedingungen waren 30% des Proteins in Lösung, wie bei wt-Vps8. Wurde TX-100/Maltosid zugegeben, lösten sich plötzlich statt 20%, wie bei allen anderen Varianten, sogar 40% des Proteins von der Membran. Salzbehandlung bewirkte keine größere Löslichkeit. Diese Beobachtung kann möglicherweise folgendermaßen erklärt werden: Vps8 liegt tatsächlich immer zu mindestens 40% membrangebunden vor. Jedoch bleiben nach Ablösung von der Membran durch Behandlung mit Detergenzien etwa 20% Vps8 in Form von NaCl-löslichen Aggregaten pelletierbar. Fehlt die RING-Domäne, so sinkt die Neigung des Proteins zur Aggregation, und der komplette Membrananteil geht direkt in Lösung. Dies stünde im Einklang mit Flotation-Ergebnissen, wo etwa 60% von Vps8 membranassoziiert waren.

### 3.14 Eingrenzung der Vps21-Bindestelle im Vps8-Protein

Das 2-Hybrid-Experiment im Abschnitt 3.9 ergab eine *in vivo* Interaktion von Vps8 mit Vps21. Durch ein gleichartiges Experiment sollte nun die Position der Vps21-Bindestelle im Vps8-Protein bestimmt werden. PJ69-4a Doppeltransformanten wurden zunächst unter plasmidselektiven Bedingungen herangezogen und anschließend auf Medien mit und ohne Histidin bzw. Adenin getropft. Verwendet wurde das Vps21-Gal4BD-Fusionsprotein (pRK1002) in Kombination mit wt-Vps8-Gal4AD (pRK979) oder den entsprechenden Deletionsklonen.

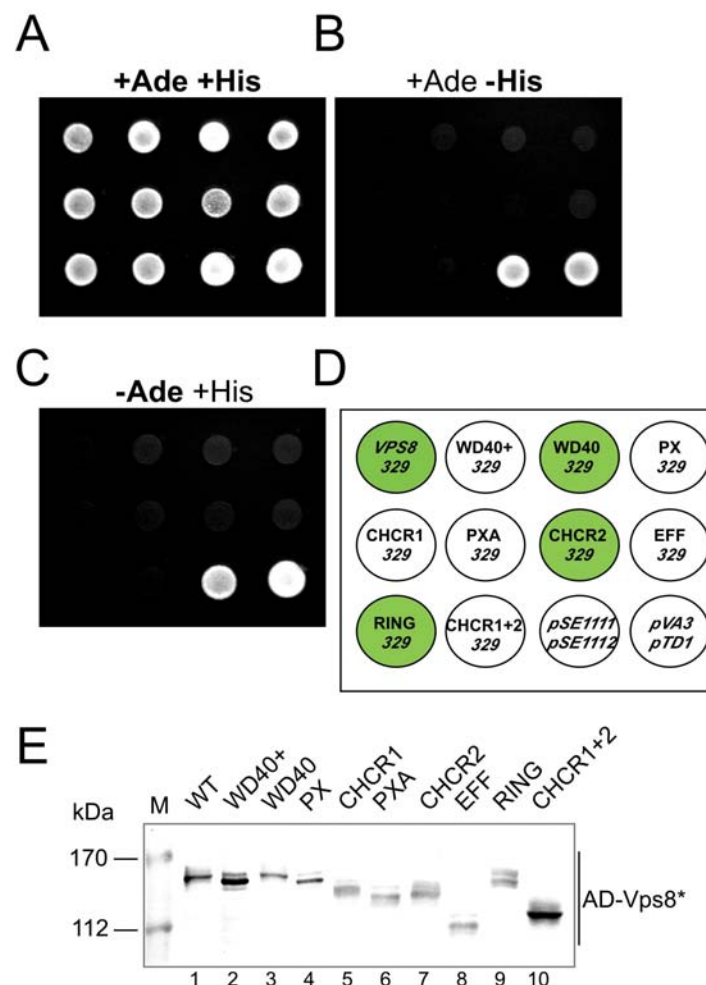


**Abb. 26:** 2-Hybrid Interaktionen zwischen Vps21 und Vps8-Deletionsvarianten. Gleiche Mengen Zellsuspension wurden auf selektive Platten getropft und drei Tage bei 30°C inkubiert. **(A)** SD+Ade+His, **(B)** SD+Ade, **(C)** SD+His; **(D)** Zuordnung der getropften Doppeltransformanten von PJ69-4a: *VPS21/VPS8* (pRK1002/pRK979); *VPS21* mit Gal4AD-Vps8WD40<sup>+</sup> (pRK1047); Gal4AD-Vps8WD40 (pRK1031); Gal4AD-Vps8PX (pRK1033); Gal4AD-Vps8CHCR1 (pRK1051); Gal4AD-Vps8PXA (pRK1034); Gal4AD-Vps8CHCR2 (pRK1045); Gal4AD-Vps8EFF (pRK1035); Gal4AD-Vps8RING (pRK1030); Gal4AD-Vps8CHCR1+2 (pRK1032); 329/*VPS8* (pRK329/pRK979), *VPS21/pACT2* (pRK1002/pACT2). **(E)** Gal4AD-Vps8 Detektion im Western-Blot mit anti-Gal4-AD Antikörpern. Zellextrakte aus entsprechenden Transformanten: (1) WT (pRK979), (2) - (pACT2), (3-11) vgl. oben. Gal4AD-Vps8\*: Vps8-Fusionsvarianten, M: Größenstandard.

Wie in Abb. 26 dargestellt, interagierten neben wt-Vps8 auch die WD40, CHCR2 und die RING-Deletionsvariante mit Vps21. Die Wechselwirkung aktivierte sowohl die Expression des *HIS3*-Gens als auch des *ADE2*-Gens (B, C). Bei allen anderen Deletionsmutanten von Vps8 war die Bindung an Vps21 betroffen. Die Kombinationen von wt-Vps8AD mit dem BD-Ausgangsvektor (pRK329) sowie Vps21 mit AD-Ausgangsvektor (pACT2) wuchsen weder auf histidin- noch auf adeninfreiem Medi-

um. In (E) belegt ein anti-Gal4AD Western Blot, dass die verwendeten Transformanten die jeweilige Vps8-Variante auch wirklich exprimierten.

Um etwaige unspezifische Wechselwirkungen auszuschließen, wurde ein 2-Hybrid-Experiment mit dem BD-Ausgangsvektor (pRK329) in Kombination mit der jeweiligen Vps8-Deletionsvariante durchgeführt (Abb. 27). Als Positivkontrollen fungierten Transformanten von pSE1111/pSE1112 und pVA3/pTD1. Außer den Positivkontrollen wuchs keine der getropften Transformanten auf histidin- oder adeninfreiem Medium. Der in (E) dargestellte anti-Gal4AD-Immunoblot bekräftigt die Korrektheit der Transformanten.



**Abb. 27:** Negativkontrollen zum 2-Hybrid Experiment von Vps8-Deletionsvarianten mit Vps21, (A-C) analog zur Abb.26. (D) Zuordnung der getropften Doppeltransformanten von PJ69-4a: *VPS8/329* (pRK979/pRK329), pRK329 mit Gal4AD-Vps8WD40<sup>+</sup> (pRK1047); Gal4AD-Vps8WD40 (pRK1031); Gal4AD-Vps8PX (pRK1033); Gal4AD-Vps8CHCR1 (pRK1051); Gal4AD-Vps8PXA (pRK1034); Gal4AD-Vps8CHCR2 (pRK1045); Gal4AD-Vps8EFF (pRK1035); Gal4AD-Vps8RING (pRK1030); Gal4AD-Vps8CHCR1+2 (pRK1032); 329/*VPS8* (pRK329/pRK979), *VPS21/pACT2* (pRK1002/pACT2). (E) Gal4AD-Vps8 Detektion im Western-Blot. Zellextrakte aus entsprechenden Transformanten: (1) WT (pRK979), (2-10) vgl. mit oben. Gal4AD-Vps8\*: Vps8-Fusionsvarianten, M: Größenstandard.

### 3.15 Charakterisierung der Bindung von Vps8 an Pep5

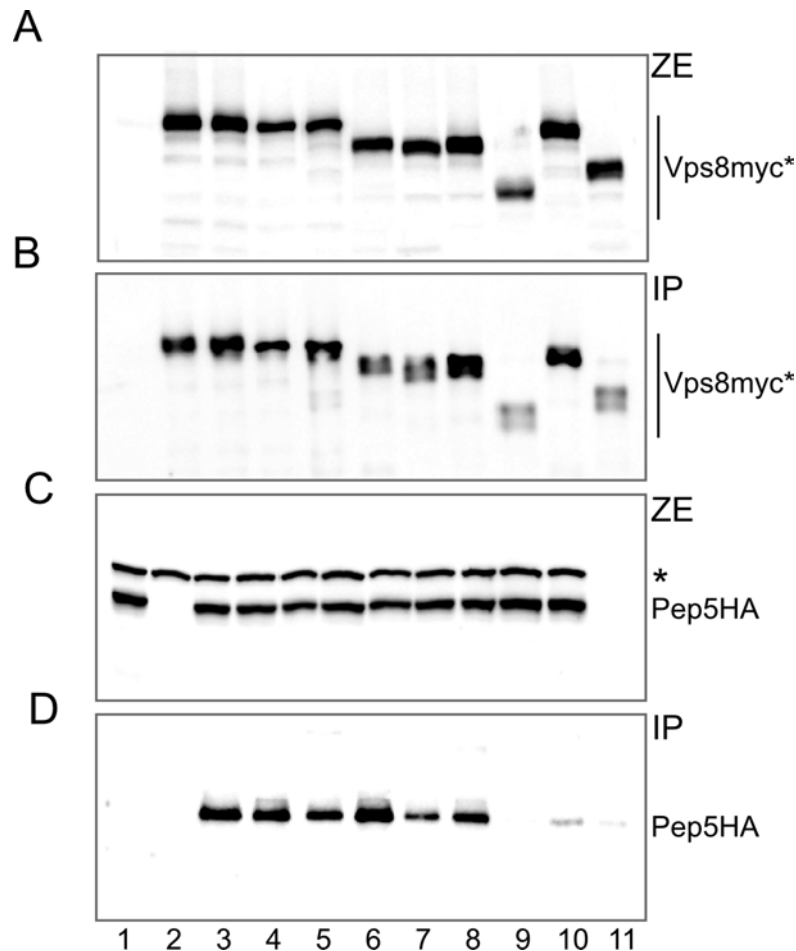
Subramanian *et al.* (2004) konnten mittels Koimmunopräzipitation und Massenspektrometrie zeigen, dass Vps8 in einem Proteinkomplex zusammen mit Pep3, Pep5, Vps16 und Vps33 vorliegt. Es handelt sich hierbei um Komponenten des so genannten HOPS-Komplexes, welcher die Andockung und Fusion von Transportvesikeln mit Vakuolen und von Vakuolen untereinander vermittelt (HOPS = **h**omotypic **v**acuole **f**usion and **v**acuole **p**rotein **s**orting, Seals *et al.*, 2000).

Nun sollte die Bindung von Vps8 an Pep5 näher charakterisiert werden. Hierzu wurden Koimmunopräzipitationsexperimente unter Verwendung der plasmidkodierte Vps8-Deletionsvarianten durchgeführt. Eingesetzt wurde der Hefestamm RKY2046, eine  $\Delta vps8$  Mutante, welche das genomisch C-terminal 3HA-markierte Pep5 exprimiert. Als Negativkontrollen dienten zum einen der Stamm RKY2046 mit leerem Vektor zum anderen RKY1843 ( $\Delta vps8$ ) mit pRK827 (wt-Vps8-13myc).

Unter nicht denaturierenden Bedingungen wurden Vps8-13myc Varianten mit anti-myc Antikörpern immunopräzipitiert. Das Ergebnis zeigt die Immunoblotanalyse in Abb. 28. Die Blots in (A) und (B) sind mit anti-myc-Antikörpern entwickelt, diejenigen in (C) und (D) mit anti-HA Antikörpern. Unter den gegebenen experimentellen Bedingungen war es möglich, 20% des Vps8-Proteins im Zellextrakt zu präzipitieren, 5% von Pep5HA wurde dabei ko-immunopräzipitiert.

Lag kein Vps8-13myc in der Zelle vor, so konnte Pep5HA nicht präzipitiert werden, (Abb28D, Spur1). Vps8-myc alleine konnte kein Signal im Pep5HA Blot produzieren (D, Spur2), daher sind alle Pep5HA Signale als spezifisch anzusehen.

Infolge der Deletionen in den Vps8-Varianten EFF ( $\Delta 773-1175$ ) und CHCR 1+2 ( $\Delta 520-686\Delta 916-1067$ ) war die Bindung an Pep5 nicht mehr gegeben (D, Spuren 9 und 11). Bei Abwesenheit der RING-Domäne ( $\Delta 1199-1274$ ) konnten beide Proteine zwar noch zusammen präzipitiert werden, jedoch war diese Assoziation geschwächt.



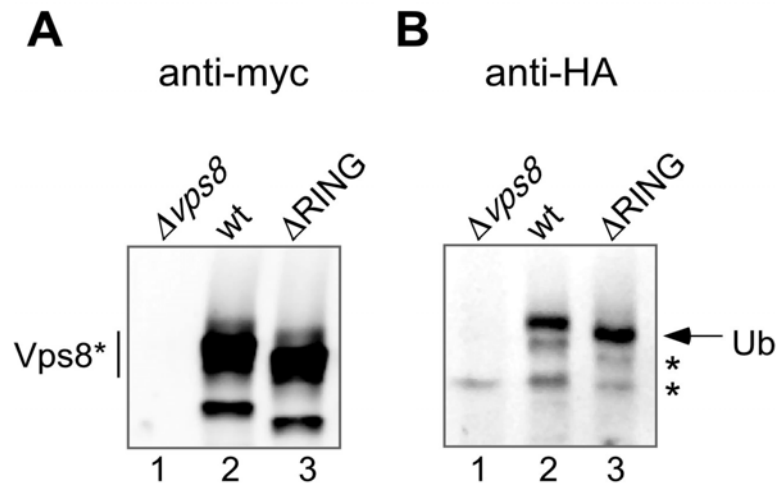
**Abb. 28:** Interaktion von Vps8-Deletionsvarianten mit Pep5. Vps8myc wurde unter nicht denaturierenden Bedingungen mit anti-myc Antikörpern aus Zellextrakten immunopräzipitiert. Verwendet wurde der Stamm RKY2046 ( $\Delta vps8PEP5$ -3HA) mit der jeweiligen plasmidkodierten Vps8-Deletionsvariante. Das Präzipitat wurde mit SDS-PAGE und Western-Analyse auf das Vorhandensein von Pep5-HA hin untersucht. ZE (Gesamtzellextrakt), IP (Immunopräzipitation), \* (unspezifisches Signal). (A,B) Vps8myc Detektion. (C,D) Pep5-HA Detektion. **1)** Negativkontrolle (RKY2046+YCplac33/Vektor), **2)**  $\Delta vps8$  Stamm ohne Pep5-HA (RKY1843+pRK827), **3)** RKY2046 ( $\Delta vps8PEP5$ -3HA) transformiert mit Vps8-wt (pRK827), **4)** Vps8WD40 (pRK999), **5)** Vps8PX (pRK1006), **6)** Vps8CHCR1 (pRK868), **7)** Vps8PXA (pRK1007), **8)** Vps8CHCR2 (pRK863), **9)** Vps8EFF (pRK1008), **10)** Vps8RING (pRK858), **11)** Vps8CHCR1+2 (pRK864).

### 3.16 Reguliert die RING-Domäne die Funktionen von Vps8 durch Ubiquitinierung?

Da Ubiquitinierung an der Steuerung vieler Prozesse beteiligt ist, stellte sich die Frage, ob die Funktionen von Vps8 nicht durch ebensolche Modifizierung reguliert sein könnten. In Abb. 29 wurde die Ubiquitinierung von Vps8 untersucht. Plasmidkodiertes (*CEN*) Vps8-13myc und HA-markiertes Ubiquitin wurden zusammen exprimiert. Aus



Zellextrakten immunpräzipitiertes Vps8 wurde im Western Blot auf die Anwesenheit von kovalent gebundenem HA-Ubiquitin hin analysiert. Ein distinktes HA-Signal war über der Vps8-Bande feststellbar, das nicht vorkam, wenn der  $\Delta vps8$ -Stamm Vps8-13myc nicht exprimierte (Abb. 29A, B, Spur 1,2). Demnach scheint Vps8 monoubiquitiniert zu sein.



**Abb. 29:** Ubiquitinierung von Vps8. Der  $\Delta vps8$ -Stamm (RKY1843), welcher HA-Ubiquitin exprimierte (YEpl12) (1), wurde zusätzlich mit pRK827 (Vps8-13myc) (2) und pRK858 (Vps8 $\Delta$ RING-13myc) (3) transformiert. Die präzipitierten Vps8-Varianten wurden mittels Western Blots analysiert, bei (A) mit anti-myc Antikörpern, bei (B) mit anti HA Antikörpern. Die Expression von HA-Ubiquitin unter *CUPI*-Promotor-Kontrolle wurde mit 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> 5 h vor der Zellextraktherstellung induziert. Die Ubiquitinbanden sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Vps8\*: Vps8-Varianten, Ub: Ubiquitin, \*: unspezifisches Signal.

Drei Enzyme sind an der Konjugation von Ubiquitin (Ub) mit Proteinen beteiligt. Die ATP-vermittelte Aktivierung von Ubiquitin wird durch das E1-Enzym katalysiert. Von diesem wird Ubiquitin an Ub-konjugierende Enzyme (E2) weitergereicht. Schließlich vermitteln Ubiquitin-Proteinligasen (E3) die spezifische Übertragung von Ubiquitin auf Substrate oder auf Ubiquitin, das bereits mit Substraten verknüpft ist (Polyubiquitinierung). Neben den HECT-Domänen Ub-Ligasen stellen RING-Finger Ub-Ligasen die zweite große Gruppe der E3s dar. Eine interessante Vorstellung wäre, wenn die Modifikation von Vps8 auf eine E3-Ligase-Aktivität der eigenen RING-Domäne zurückgeführt werden könnte. Aus Abb. 29, Spur 3 folgt, dass die Ubiquitinierung nicht reduziert ist, wenn das RING-Motiv fehlt. Die Ubiquitinierung von Vps8 scheint demnach nicht durch die RING-Domäne vermittelt zu werden.

### 3.17 Zusammenfassung der Deletionsanalyse

In Tabelle 11 sind alle beobachteten Phänotypen der Vps8-Deletionsvarianten aufgelistet. Betrachtet wurden die Aspekte: Wachstum auf 37°C, CPY-Transport, Ste6-HA Lokalisation und Stabilität, Interaktion mit Pep5 (HOPS) und Vps21.

Es scheint eine Überlappung der funktionellen Bereiche im Vps8-Protein zu geben. So sind die Bereiche WD40<sup>+</sup>, PX und EFF für den Transport von CPY und Ste6 verantwortlich. Eine Fehllokalisierung beider Proteine korreliert mit Wachstumsschwierigkeiten bei 37°C. Die Bindestelle(n) für Vps21 liegen N-terminal (WD40<sup>+</sup> Bereich vor WD40-Deletion) und mittig (PX, CHCR1, PXA). Eindeutiger konnte hingegen der Bindungsbereich für Pep5 festgelegt werden (EFF). Aus den Koimmunopräzipitationsexperimenten folgt, dass die RING-Domäne die Pep5-Assoziation positiv beeinflusst.

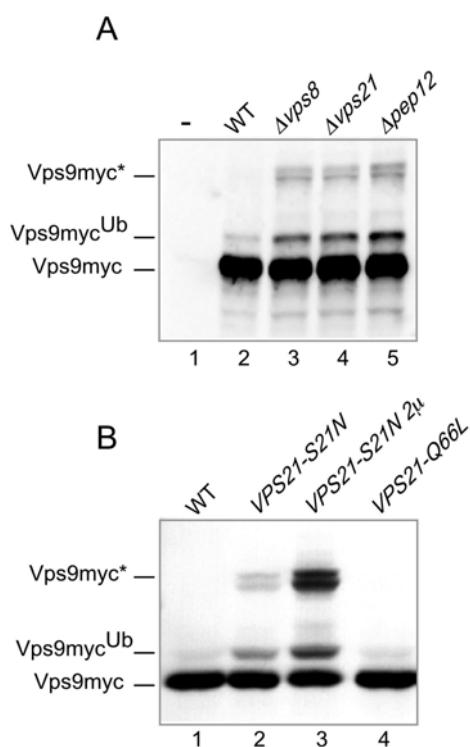
**Tab. 11** Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Deletionsanalyse

Bezeichnung	Deletion	Wachstum auf 37°C	CPY Transport	Ste6-HA Lokalisation	Ste6-HA Stabilität in min	Interaktion mit Pep5	Interaktion mit Vps21
WT	-	+	+	intern	13	+	+
-	$\Delta vps8$	-	-	Knospe	69	n.b.	n.b.
WD40 <sup>+</sup>	69-162	-	+/-	Knospe	23	+	-
WD40	100-169	+	+	intern	13	+	+
PX	393-489	+	+/-	Knospe/ intern	17	+	-
CHCR1	520-668	+	+	intern	17	+	-
PXA	773-950	+	+	Knospe	23	+	-
CHCR2	916-1067	+	+	Knospe/ intern	13	+	+
EFF	773-1175	-	-	Knospe	96	-	-
RING	1199- 1274	+	+	intern	13	+	+
CHCR 1+2	520-668 916-1067	-	-	Knospe	69	-	-

### 3.18 In Klasse D Mutanten ist die Modifizierung von Vps9 verstärkt

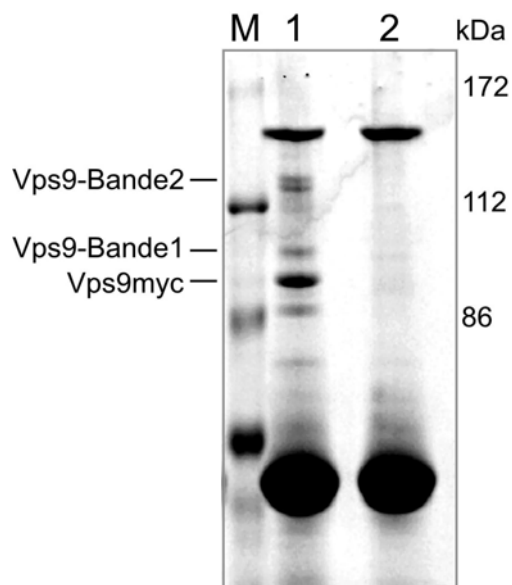
Vps9 ist ein Guaninnukleotidaustausch-Faktor, welcher die Aktivität der Vps21-GTPase reguliert (Hama *et al.*, 1999a). Es wird sowohl für den endozytischen als auch den biosynthetischen Proteintransport zur Vakuole benötigt. Es konnte gezeigt werden, dass Vps9 über die interne CUE-Domäne monoubiquitiniert wird und dass diese Modifikation von der E3-Ubiquitinligase Rsp5 abhängig ist (Shih *et al.*, 2003, Davies *et al.*, 2003). Die Rolle dieser Ubiquitinierung für die Funktion von Vps9 ist jedoch noch nicht geklärt.

Verschiedene *vps* Mutanten wurden auf eine Veränderung der Vps9 Modifizierung hin untersucht. Bemerkenswerterweise trat diese in den Klasse D *vps* Mutanten  $\Delta vps8$ ,  $\Delta vps21$ ,  $\Delta pep12$  verstärkt auf (Abb. 30A, Spur 3-5). Gezeigt ist die Western Blot-Analyse von Zellextrakten aus Stämmen, welche neben der entsprechenden Klasse D-Mutation genomisch 13-myc Epitop-markiertes Vps9 exprimierten. Neben der Hauptbande von Vps9-13myc konnte eine um 8 kDa langsamere laufende Bande detektiert werden, vermutlich die ubiquitinierte Form. Zusätzlich zu dieser Bande war eine etwa bei 130 kDa laufende Doppelbande detektierbar, welche nicht in WT-Zellen auftrat. In Abb. 30B ist dargestellt, dass die verstärkte Modifizierung besonders hervortrat, wenn die GDP-blockierte, inaktive Vps21 Variante überexprimiert wurde (*VPS21-S21N-2 $\mu$* , Spur 3). In Anwesenheit des hyperaktiven, GTPase blockierten Vps21 verschwand diese Modifikation (Spur 4).



**Abb. 30:** Verstärkte Modifikation von Vps9 in Klasse-D *vps* Mutanten. (A) Zellextrakte wurden aus folgenden Stämmen hergestellt: (1) WT (JD52), (2) *VPS9-13myc* (RKY1962), (3)  $\Delta vps8$  *VPS9-13myc* (RKY1963), (4)  $\Delta vps21$  *VPS9-13myc* (RKY2051), (5)  $\Delta pep12$  *VPS9-13myc* (RKY2050). Gleiche Proteinmengen wurden aufgetragen und Vps9myc mit anti-myc Antikörpern nachgewiesen. Vps9myc\*: unbekannte Modifikation; Vps9myc<sup>Ub</sup>: ubiquitinierte Form. (B) (1) WT-*VPS9-13myc* (RKY1962),  $\Delta vps21$  *VPS9-13myc* (RKY2051) mit (2) Vps21-S21N (pRK933), (3) Vps21-S21N-2 $\mu$  (pRK934), (4) Vps21-Q66L (pRK935).

Zur Aufklärung der Beschaffenheit dieser unbekannt modifizierten Vps9 Form wurde Vps9-13myc aus 500 OD<sub>600</sub> Hefekultur mittels anti-myc Antikörpern immunopräzipitiert. Die Zellen exprimierten einen Überschuss an inaktivem Vps21, um die Vps9-Modifikation besonders deutlich hervortreten zu lassen. Das gesamte Eluat wurde im SDS-PAGE aufgetrennt und Proteinbanden mit Coomassie Brilliant Blue detektiert (Abb. 31). In Spur 1 befand sich die eigentliche Probe, in Spur 2 die Negativkontrolle, bestehend aus dem Präzipitat aus zu 1) äquivalenten Zellen, in welchen Vps9 jedoch nicht Epitop-markiert war. Die Hauptbande von Vps9 (~ 90 kDa) sowie die modifizierten Formen (Bande1 und Bande2) waren deutlich zu erkennen. Bande 1 und 2 wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht (BMFZ). Das Resultat der Messungen ist in Tabelle 12 zusammengefaßt.



**Abb. 31:** Identifizierung der Vps9 Modifikation. Immunopräzipitation von Vps9-13myc aus, mit dem Vps21-S21N-2 $\mu$  Plasmid (pRK934) transformierten, logarithmischen Kulturen von 1)  $\Delta vps21VPS9$ -13myc (RKY2051) und 2)  $\Delta vps21$  (RKY1920), Negativkontrolle. Coomassie-Blau-Färbung des SDS-Gels. M: Proteinstandard.

Beide Banden enthielten nur 4 Proteinspezies: das *S.c.* Vps9-Protein mitsamt dem 13-myc-Epitop, Ubiquitin sowie Immunglobulin aus der Maus (anti-myc Antikörper). Damit ist geklärt, dass es sich bei beiden Vps9-Modifikationen um Ubiquitinierung handelt. Die langsamer laufende Doppelbande stellt dabei möglicherweise eine mehrfach Modifizierung dar (z.B. 3-4 Ubiquitin-Moleküle).

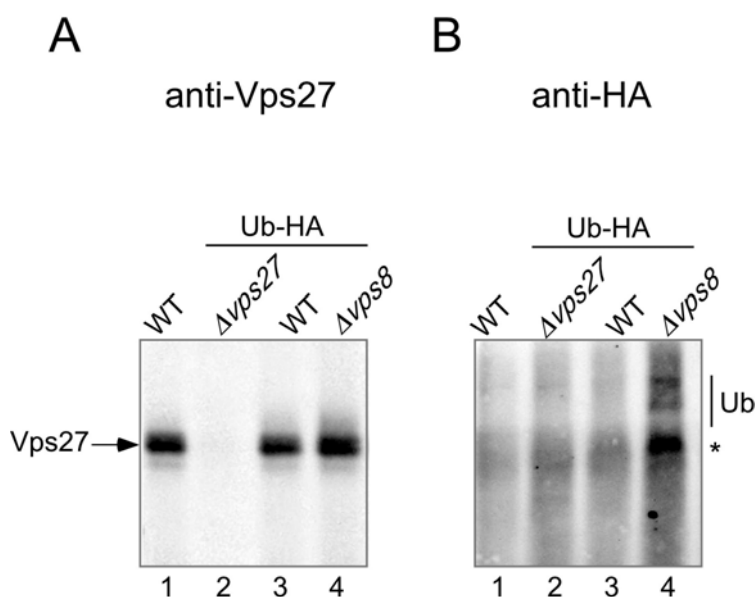
**Tab. 12** Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchung von Vps9-Bande1 und Bande2

Masse	Ladung	Molekulargewicht [M+H <sup>+</sup> ]	Sequenz	Protein
<b><i>Bande 1</i></b>				
685,44	2+	1369,88	YLVSINVNYIER	Vps9
966,08	2+	1931,16	FISPIMLDIPDTMPNAR	Vps9.
882,54	2+	1764,08	TITLEVESSDTIDNVK	Ubiquitin
622,36	2+	1243,72	VNSAAFPAPIEK	Immunglobulin (Maus)
837,5	2+	1674,0	LISEE <sub>Me</sub> DLNGLDGEQK	C-terminales 13- myc Tag
694,89	2+	1388,78	LISEE <sub>Me</sub> DLNGEQK	13myc
687,9	2+	1374,8	LISEEDLNGEQK	13myc
<b><i>Bande 2</i></b>				
609,41	2+	1217,12	LLWTVSEEIK	Vps9
633,88	2+	1266,76	QLQTPGADPLVK	Vps9
638,84	2+	1276,68	DLTNDDTLLEK	Vps9
656,65	3+	1967,95	SLTIDDHEDFEEAYQR	Vps9
685,39	2+	1369,78	YLVSINVNYIER	Vps9
661,33	3+	1981,99	SLTIEDHEDFEEAYQR	Vps9
966,02	2+	1931,04	FISPIMLDIPDTMPNAR	Vps9
644,36	3+	1931,08	FISPIMLDIPDTMPNAR	Vps9
541,3	2+	1081,60	TLSDYNIQK	Ubiquitin
882,47	2+	1763,94	TITLEVESSDTIDNVK	Ubiquitin.
550,80	2+	1100,60	DVLTITLTPK	Immunglobulin (Maus)
622,36	2+	1243,72	VNSAAFPAPIEK	Immunglobulin (Maus).
837,49	2+	1673,98	LISEE <sub>Me</sub> DLNGLDGEQK	C-terminales 13- myc Tag
830,47	2+	1659,94	LISEEDLNGLDGEQK	13myc
694,93	2+	1388,86	LISEE <sub>Me</sub> DLNGEQK	13myc
687,89	2+	1374,78	LISEEDLNGEQK	13myc

### 3.19 Vps27 ist ubiquitiniert in $\Delta vps8$ -Zellen

Vps27 und seinem Säuger Homologen Hrs wird eine entscheidende Rolle beim endosomalen Proteintransport zugeschrieben (Bilodeau *et al.*, 2002, Katzmann *et al.*, 2003). Vps27 ist an der sukzessiven Rekrutierung von ESCRT-Komplexen beteiligt, indem es den ESCRT-1 Komplex an die frühen Endosomen heranbringt. Über die interne FYVE-Domäne haftet es an Phosphatidylinositol-3-Phosphat in endosomalen Membranen. Es bindet ubiquitinierte Frachtproteine über die UIM-Domäne (ubiquitin interacting motif), was zur Umleitung dieser Proteine in den vakuolären Abbauweg führt. Für Hrs konnte gezeigt werden, dass es über ein Clathrin-Bindemotiv mit dem Clathrin Coat auf Endosomen assoziiert (Raiborg *et al.*, 2002).

Der Einfluß der Vps8-Funktion auf Vps27 wurde untersucht. Eine direkte Assoziation beider Proteine konnte mit Koimmunopräzipitationsexperimenten nicht nachgewiesen werden. Auch spricht das Ergebnis der Epistasis-Analyse (3.1) eher dafür, dass Vps27 seine Funktion nach Vps8 ausübt. Dennoch: im Ubiquitinierungsexperiment konnte eine Modifizierung von Vps27 in der  $\Delta vps8$ -Mutante beobachtet werden (Abb. 32B, Spur4). Endogenes Vps27 wurde hier aus Zellextrakten von Stämmen immunopräzipitiert, welche HA-markiertes Ubiquitin vom  $2\mu$ -Plasmid exprimieren (Spuren 2-4). In Spur 1 befindet sich die WT-Negativkontrolle, in Spur 2 das Immunopräzipitat aus dem  $\Delta vps27$ -Stamm. Das Ubiquitinierungssignal für Vps27 konnte im WT-Stamm nicht beobachtet werden (Abb. 32B, Spur 3).

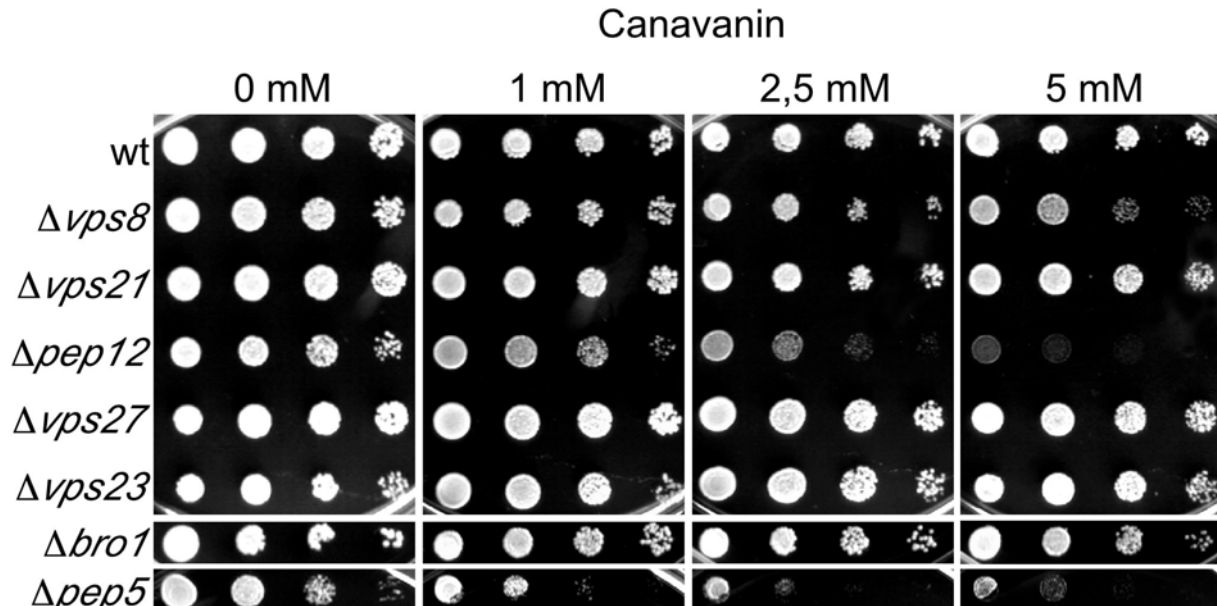


**Abb. 32:** Vps27 Ubiquitinierung. Vps27 wurde immunopräzipitiert aus Zellextrakten von Stämmen, welche ein HA-markiertes Ubiquitin exprimierendes Plasmid (YEp112) trugen (2-4) sowie aus dem Kontrollstamm (1). Analysiert wurden (1) WT (JD52), (2)  $\Delta vps27$  (RKY1876), (3) WT (JD52), (4)  $\Delta vps8$  (RKY1843). Die präzipitierten Proteine wurden mittels Western Blots nachgewiesen, bei (A) mit anti-Vps27 Antikörpern, bei (B) mit anti HA Antikörpern. Die Expression von HA-Ubiquitin unter *CUPI*-Promotor-Kontrolle wurde mit 0,5 mM  $\text{CuSO}_4$  3 h vor der Zellextrakttherstellung induziert. Die Ubiquitinbanden sind mit „Ub“ gekennzeichnet, \* unspezifisches Signal.

### 3.20 Funktion von Klasse D Komponenten bei Entfernung von Proteinaggregaten?

Ein Grund für die Wachstumsschwierigkeiten der Klasse D *vps* Mutanten könnte darin liegen, dass in diesen Zellen die Beseitigung durch den Hitzeschock entstandener Proteinaggregate nicht gut funktioniert. Mit Hilfe des Arginin-Homologen Canavanin sollte nun die Proteinaggregation induziert werden. Zellen nehmen Canavanin aus dem Nährmedium auf und bauen es in neusynthetisierte Proteine ein, was zur Deformation ihrer Struktur führt. In Abb. 33 wurde das Wachstum diverser *vps* Mutanten auf Canavanin-haltigem Medium untersucht. Gleiche Zellmengen wurden in 10fachen Verdünnungsschritten auf entsprechende Platten getropft und 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Die größte Wirkung hatte das Reagenz auf den Klasse D  $\Delta pep5$ -Stamm, gefolgt von  $\Delta pep12$ ; bei  $\Delta vps8$ -Zellen war erst bei einer höheren Canavaninkonzentration (5mM) ein Wachstumsdefekt sichtbar. Überraschenderweise waren die  $\Delta vps21$ -Zellen durch Canavanin in ihrem Wachstum nicht betroffen, obwohl die Mutante phänotypisch zur Klasse D zugeordnet wird. Unbeeinflusst durch das Reagenz blieben der WT-Stamm sowie die Klasse E Mutanten  $\Delta vps27$ ,  $\Delta vps23$  und  $\Delta bro1$ .



**Abb. 33:** Wachstum von *vps* Mutanten auf Canavanin-Platten. Serielle 10fach Verdünnungen wurden auf YPD-Platten mit unterschiedlicher Canavanin-Konzentration (0 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM) getropft und die Platten 3 d bei 30°C inkubiert. Analysiert wurden: WT (JD52),  $\Delta vps8$  (RKY1843),  $\Delta vps21$  (RKY1920),  $\Delta pep12$  (RKY1921),  $\Delta vps27$  (RKY1876),  $\Delta vps23$  (RKY1990),  $\Delta bro1$  (RKY1922),  $\Delta pep5$  (RKY1792).

## 4. Diskussion

Die vakuolären Transportwege in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eignen sich hervorragend für die Untersuchung von Sortiermechanismen. Um ein besseres Verständnis der Zusammensetzung von Transportfaktoren für Fusionsprozesse mit späten Endosomen zu erlangen, wurde eine funktionelle Charakterisierung von Vps8, eines Klasse D *vps* Proteins, unternommen.

### 4.1 Transportdefekte in der $\Delta vps8$ -Mutante

In *vps8*-Deletionmutanten findet eine Fehlsortierung von CPY statt: die Hydrolase wird nicht in die Vakuole transportiert, sondern als Proenzym sekretiert. Dieser Phänotyp wird auf ineffizientes Recycling des CPY-Rezeptors Vps10 zurückgeführt, was auf einen Defekt im endozytischen Transport hindeutet.

Bemerkenswerterweise konnte zudem eine Stabilisierung des  $\alpha$ -Pheromon Transporters Ste6 festgestellt werden. Wenn die Hefezellen nicht  $\alpha$ -Pheromon ausgesetzt sind, verbleibt Ste6 normalerweise nur kurz an der Membran und erfährt eine rasche Internalisierung und den Abbau in der Vakuole (Halbwertszeit  $\sim 13$  min). In  $\Delta vps8$ -Zellen kann es nicht dem Abbau zugeführt werden, es akkumuliert statt dessen in der Plasmamembran der Knospe und zeigt somit eine polare Lokalisation. Dieser Phänotyp wurde ebenfalls in  $\Delta vps21$  und  $\Delta pep12$  Zellen beobachtet und erwies sich demnach als Klasse D-spezifisch. Mittels einer Epistisisanalyse mit Ste6 als Markerprotein für Defekte im endozytischen System konnte der Funktionsort von Vps8 im endosomalen Weg näher bestimmt werden. Wurden Deletionsmutanten von *vps8* mit Klasse E Funktionen wie ESCRT-Komponenten *snf7* und *bro1* sowie *vps27*, welche die Entwicklung der Endosomen zum MVB betreffen, kombiniert, so erwies sich der *vps8*-Phänotyp als dominant. Ebenso verhielt es sich mit der Temperatursensitivität der Doppelmutanten. Das bedeutet, dass Vps8 vor Klasse E-Funktionen gebraucht wird und gemeinsam mit den Klasse D-Funktionen Vps21 und Pep12 agiert.

Ste6 wird in  $\Delta vps8$  Zellen (und den anderen untersuchten Klasse D-Mutanten) offensichtlich kurz nach der Endozytose wieder zur Zelloberfläche umgeleitet. Ähnliche Ergebnisse wurden für andere Hefe-Zelloberflächenproteine beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass der  $\alpha$ -Pheromon Rezeptor Ste3 im *vps8*-Deletionsstamm stabilisiert wird, was ebenfalls mit einer Plasmamembranlokalisation einherging. Es ist je-



doch unklar, ob die Lokalisation von Ste3 wie bei Ste6 polarisiert ist. Außerdem wurde für eine mutierte Form der Plasmamembran ATPase (Pma1) eine Akkumulation an der Zelloberfläche beobachtet, obwohl diese Pma1-Mutante normalerweise in der Vakuole abgebaut wird (Luo und Chang, 2000). Diese Proteine häufen sich nach der Aufnahme von der Zelloberfläche im frühen Endosom an und werden schließlich zur Zelloberfläche zurücktransportiert.

Die Vermutung, dass der Rücktransport zur Zelloberfläche über frühe Endosomen stattfindet, wird durch Experimente zur Aufnahme des membranbindenden Farbstoffes FM4-64 gestützt (Wiederkehr *et al.*, 2000). Dort konnte ein Rückfluss endozytierter Membranen hauptsächlich durch das frühe Endosom demonstriert werden.

Ste6-Mutanten, welche nicht oder nur schwach ubiquitiniert sind, folgen ebenfalls diesem Recycling-Weg über das frühe Endosom zur Knospenmembran (Krsmanović *et al.*, 2005). Basierend auf einem Modell des Sortierungsmechanismus an frühen Endosomen aus Säugerzellen (Maxfield und McGraw, 2004) wurde für Ste6 eine Regulation des Rücktransports durch Erkennung von Ubiquitinsignalen postuliert. Demnach wird ubiquitiniertes Ste6 von Sortierungskomponenten erkannt und zum Abbau in die Vakuole geleitet. Die unzureichend ubiquitinierten Ste6-Mutanten hingegen gelangen zurück zur Oberfläche.

WT-Ste6, welches in Klasse D-Mutanten in der Knospenmembran akkumulierte, wies jedoch keine Reduzierung der Ubiquitinierung auf. Recycling von Ste6 fand also statt, obwohl ein Abbausignal vorhanden war. Dies deutet auf einen unselektiven Rücktransport hin. Es wäre möglich, dass Vps8 und andere Klasse D-Komponenten an der Sortierung von ubiquitinierten Proteinen am frühen Endosom beteiligt sind. Fehlten diese Komponenten, dann würde Ste6, unabhängig vom Ubiquitinierungszustand, automatisch zurück zur Zelloberfläche wandern. Es wäre möglich, dass Vps8 und die anderen Klasse D-Funktionen sowohl an Sortierungs- als auch an Fusionsmechanismen beteiligt sind.

Der Ste6-Transportweg vom frühen Endosom zur Plasmamembran führt wahrscheinlich über das Trans-Golgi-Kompartiment. Von dort aus wird Ste6 über den polar gerichteten, sekretorischen Weg zur Knospenmembran gebracht. Dieses Modell erklärt die polarisierte Akkumulation von Ste6 in der Knospenmembran.

## 4.2 Lokalisierung von Vps8

In Immunofluoreszenzexperimenten lokalisierte Vps8 an punktförmigen, gleichmäßig in der Zelle verteilten Strukturen, welche als Endosomen gedeutet werden können. Dieses Verteilungsmuster ähnelt stark dem für Vps21 beobachteten Muster (Gerrard *et al.*, 2000). Dort konnte eine Kolo-kalisation von Vps21 mit dem spät endosomalen Marker Pep12 gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit war es nun möglich, über das 2-Hybrid-System eine direkte Interaktion von Vps8 mit Vps21 nachzuweisen. Zudem zeigte Vps8 ebenfalls Wechselwirkungen mit Ypt52 und Ypt53, zwei mit Vps21 verwandten Rab-GTPasen, deren Funktionen teilweise mit der Funktion von Vps21 redundant sind. Es ist daher naheliegend zu vermuten, dass Vps8 und Vps21 am gleichen Ort wirken.

Über die Lokalisation von Vps21 gibt es kontroverse Meinungen. Einerseits wurde es in Pep12-markierten späten endosomalen Strukturen beobachtet. Auf der anderen Seite zeigten Experimente in Säugerzellen, in denen Vps21 heterolog exprimiert wurde, dass es an frühe Endosomen binden und darüber hinaus sogar die Funktionen des homologen früh endosomalen Markers Rab5 übernehmen kann (Singer-Krüger *et al.*, 1995). Während Vps21 also möglicherweise an frühen und späten Endosomen lokalisiert ist, fraktionierte Vps8 im Sucro-sedimentationsgradienten in einem Kompartiment etwas anderer Dichte als Pep12. Es wäre daher möglich, dass Vps8 sich ausschließlich an früh endosomalen Strukturen aufhält. Die Vps8-Fraktion war dabei klar getrennt von ER- (Marker Dpm1), Vakuolen (ALP) und Plasmamembran (Pma1)-Kompartimenten.

Vps8 ist ein großes (~140 kDa) hydrophiles Protein, welches eine erstaunliche Membranaffinität aufweist, obwohl es keine hydrophoben Bereiche besitzt, die Transmembrandomänen ausbilden könnten. So lagen in Flotation Experimenten 60-70% von Vps8 membrangebunden vor. Nach differentieller Zentrifugation fraktionierte ungefähr ein gleicher Anteil von Vps8 mit großen (P13-Pellet) und mit kleinen subzellulären Strukturen (P100-Pellet). Dies könnte auf die Lokalisation von Vps8 an großen endosomalen Strukturen wie auch an kleinen wie Transportvesikeln hindeuten.

Mittels Detergenzien, wie TX-100 oder Maltosid können Membranen und die darin enthaltenen Proteine mitsamt ihrer Bindungspartner aufgelöst werden. Eine Ausnahme bilden als „rafts“ bezeichnete Membranbereiche, welche TX-100 resistent sind. Durch Behandlung von Zellextrakten mit Detergenzien und Salzen vor der differentiellen Fraktionierung konnte die Natur des sedimentierbaren Vps8 Anteils ansatzweise aufgeklärt werden. Von den 70% des sedimentierbaren Vps8 konnten 20% unter Einwir-

kung von Detergenzien und 30% unter Einwirkung von Salzen wie NaCl oder Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in Lösung gebracht werden. Die letzteren stören Proteinwechselwirkungen und ermöglichen die Abtrennung von Vps8 von potentiellen Bindungspartnern, über welche Vps8 an die Membran gebracht werden könnte. Insofern kann Vps8 auf diese Weise nicht nur von der Membran, sondern auch aus möglichen größeren Proteinkomplexen herausgelöst werden. Die restlichen 40% von Vps8, welche in Übereinstimmung mit Flotation Experimenten auch membranassoziiert sein müssten, verblieben in der Pelletfraktion. Dies kann durch eine Assoziation von Vps8 mit detergenten-resistenten Membranbereichen bedingt sein. Denkbar wäre auch, dass Vps8 nach Extraktion von der Membran biochemisch unlösliche Proteinaggregate bildet. Bei diesen Aggregaten könnte es sich um unphysiologische Strukturen handeln. Möglich ist jedoch auch, dass die Aggregation eine physiologische, Vps8-inhärente Tendenz zur Selbstaggregation widerspiegelt. Dies stünde im Einklang mit einer Funktion von Vps8 als Gerüstprotein.

### 4.3 Die periphere Membranbindung von Vps8

Bei der Rekrutierung peripherer Proteine an Membranen spielen Rab-GTPasen, wie Vps21, eine herausragende Rolle. Aktivierte GTP-Rabs werden über ihren Geranylgeranylrest in Membranen verankert. Die Interaktion von Vps8 mit Vps21 impliziert, dass Vps8 als ein Effektor der GTPase fungieren und dass seine Membranassoziation von Vps21 abhängen könnte. Die Fraktionierungsexperimente zeigten jedoch, dass die Membranassoziation von Vps8 im  $\Delta vps21$ -Stamm erhalten bleibt. Folglich ist die Membranbindung von Vps8 nicht von Vps21 abhängig. Die Membranbindung von Vps8 blieb bei Expression von konstitutiv inaktivem Vps21 (S21N-Mutation) ebenfalls unverändert. Auch im GTP-gebundenem Zustand blockiertes Vps21 (Q66L-Mutation) führte nicht zu einer Veränderung des membranassoziierten Anteils von Vps8. Die Behandlung des Zellextraktes mit Salzen vor der differentiellen Zentrifugation führte nicht zu einer größeren Löslichkeit von Vps8, wodurch die Beteiligung von Vps21 bei der Aggregation von Vps8 zu größeren Proteinkomplexen unwahrscheinlich wird.

Diese Befunde stehen im Widerspruch zu publizierten Daten, wonach Vps21 für die Membranassoziation von Vps8 verantwortlich sein soll (Horazdovsky *et al.*, 1996). Diese Diskrepanz läßt sich möglicherweise auf experimentelle Unterschiede zurückführen. In der publizierten Arbeit wurde die Membranassoziation von radioaktiv mar-

kiertem Vps8 nach einer längeren Chase-Periode untersucht, während in der vorliegenden Arbeit die Analyse der Membranassoziation unmittelbar nach einer raschen Zellyse stattfand. Es ist denkbar, dass die Membranassoziation die langwierigere Prozedur nicht übersteht.

Des Weiteren muss die Membranassoziation von Vps8 nicht allein von Vps21 abhängig sein. Die Tatsache, dass neben Vps21 zwei nah verwandte Rab-GTPasen mit teilweise überlappender Funktion im endozytischen Weg existieren (Singer-Krüger *et al.*, 1994), legt nahe, dass möglicherweise alle drei homologen Ypts für die Membranbindung von Vps8 von Bedeutung sein könnten. Ein funktioneller Zusammenhang mit Vps8 ist vor allem aus der 2-Hybrid-Wechselwirkung mit allen drei Ypts gegeben. Flotation Experimente mit Einfach,- Doppel sowie der Tripel-Deletionsmutante für die drei GTPasen ergaben jedoch, dass diese Proteine nicht für die Rekrutierung von Vps8 an die Membran verantwortlich sind.

Welche Funktion(en) wäre(n) für Vps8 im Zusammenhang mit Vps21 und/oder Ypt52/Ypt53 denkbar? Weil die Vps8-Membranbindung nicht von Vps21 abhängt, könnte Vps8 vor Vps21 an die Membran lokalisieren und als Targeting-Faktor seinerseits Vps21 an die Membran rekrutieren. Die Lokalisation solcher Targeting-Faktoren bestimmt, an welcher Membran Vps21 aktiviert wird. Wie die Rekrutierung von RabGTPasen genau vonstatten geht ist zur Zeit noch nicht gut verstanden. Es gibt Hinweise, dass GDFs (GDI-displacement factor) inaktive Rabs erkennen und sie von den GDIs befreien, um sie an die Zielmembran und zu den spezifischen Guanin-nukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) heranzuholen (Svejstrup *et al.*, 1997). Jedenfalls ist die Lokalisation einer Rab-GTPase von der Lokalisation seines GEFs abhängig. Vielleicht kann Vps8 eine doppelte Funktion ausüben, das heißt als Rekrutierungsfaktor von Vps21 zum Vps21-GEF Vps9 und damit zur Membran sowie als Effektorprotein. Beispielsweise bindet das Vps21-Homologe der Säugerzellen Rab5 an den Rabex5-Rabaptin5-Komplex, worin Rabex5 das GEF für Rab5 ist und Rabaptin5 die Effektor-Komponente (Lippe *et al.*, 2001). Ein anderes Beispiel wäre die vakuoläre GTPase Ypt7, welche zunächst von Komponenten des HOPS-Komplexes zur Membran rekrutiert wird; dann übt der HOPS-Komplex ebenfalls Effektor-Funktionen aus (Wurmser *et al.*, 2000).

Vps8 besitzt zwei potentielle Clathrin-Heavy-Chain-Repeats, welche in den schweren Clathrin-Ketten in siebenfacher Ausführung vorkommen und die Clathrin-Ketten zur Ausbildung der Triskelion-Struktur, der Grundeinheit für Clathrin-Netzwerke, befähigen.

gen. Aufgrund seiner starken Aggregationsneigung könnte Vps8 als Gerüstprotein an membranbedeckenden Hüllenkomplexen beteiligt sein. Die Membranbindung war jedoch nicht durch die *chc1*-Mutation beeinflusst und Flotation Experimente mit *arf1* Mutanten sowie nach Behandlung mit Brefeldin A zeigten, dass die kleine GTPase ARF1, welche für die Rekrutierung von Adapterproteinen AP1, AP3 und GGAs benötigt wird, für Vps8 diese Funktion nicht erfüllt. Wenn Vps8 Bestandteil von Hüllenkomplexen sein sollte, dann von solchen, für deren Zusammensetzung ARF nicht essentiell ist.

Periphere Membranproteine können auch über die Erkennung von bestimmten Lipidspezies, wie unterschiedlich phosphorylierten Phosphatidylinositiden zu ihren Zielorten hingeleitet werden. An den Kompartimenten des sekretorischen und endosomalen Weges treten bestimmte PtdIns-*P* Varianten verstärkt auf. So ist beispielsweise PtdIns-3-*P* auf die Endosomen beschränkt. Für dessen Generierung ist die Lipidkinase Vps34 zuständig, welche in Assoziation mit einer regulatorischen Untereinheit, Vps15, und zwei weiteren Komponenten agiert. Vermutlich kann die PtdIns-3-Kinase einmal im CPY-Weg und einmal im Autophagozytoseweg wirken, je nachdem mit welchen Faktoren sie assoziiert ist (Kihara *et al.*, 2001). Die Flotation-Experimente haben jedoch gezeigt, dass die Vps8-Membranassoziation im  $\Delta vps34$ -Stamm unbeeinflusst ist. Dies würde zunächst darauf hinweisen, dass Vps8 nicht über PtdIns-3-*P* an Membranen bindet. Andererseits deutet die Sequenz von Vps8 auf das Vorhandensein einer PX (Phox-homology) und PXA-Domäne hin, denen die Fähigkeit, an PtdIns-3-*P* zu binden, zugesprochen wird (Ellson *et al.*, 2002). Ein weiteres PtdIns-3-*P* Bindemodul ist die FYVE-Domäne, welche zur Zielsteuerung von Vps27 an Endosomen beiträgt (Burd und Emr, 1998; Stahelin *et al.*, 2002). Differentielle Zentrifugationen ergaben für Vps8 $\Delta$ PX sowie Vps8 $\Delta$ PXA-Varianten eine um 20% größere Löslichkeit als für das WT-Vps8 Protein. Denkbar wäre, dass Vps8 an zwei verschiedene PtdIns-*P*-Spezies binden kann und daher die Membranbindung nicht vollständig verliert, wenn eine Lipidkomponente fehlt. Die Möglichkeit einer Membranrekrutierung von Vps8 über das PtdIns-4-*P* wurde ebenfalls mit Flotation-Experimenten in *pik1*-Mutanten und bei Überexpression der PtdIns-4-*P* Phosphatase Sac1 untersucht. Das Expressionsniveau dieses Phosphatidylinositides, welches für das Targeting an Golgi-Membranen benötigt wird, ist in Mutanten der Kinase Pik1 stark herabgesetzt (Hama *et al.*, 1999b). Die Überexpression von Sac1-Phosphatase verringert ebenfalls den PtdIns-4-*P* Pool, wobei gleichzeitig auch der Bestand anderer Phosphoinositide beeinträchtigt wird

(Hughes *et al.*, 2000). Wie in  $\Delta vps34$ -Zellen blieb die Membranassoziation auch in den *pik*-Mutanten und bei Überexpression von Sac1 bestehen. Dies bedeutet wiederum, dass Vps8 entweder nicht an PtdIns-4-*P* rekrutiert wird oder dass es relativ unselektiv an unterschiedliche PtdIns bindet. Schließlich könnte auch ein sehr niedriger Restspiegel an PtdIns-4-*P* noch für die Membranbindung von Vps8 ausreichend sein.

Ein weiterer Hinweis auf eine Membranbindungsdomäne von Vps8 lieferte die Beobachtung, dass C-terminal auf 68 Aminosäuren verkürztes Vps8 nicht mehr membranassoziiert ist. Durch weitere, etwas längere Vps8-Varianten konnte ein potentieller Bindungsbereich von AS 69 bis 393 eingegrenzt werden. Interessanterweise fand sich innerhalb dieses Bereiches eine potentielle Membranbindestelle, das VHS-Motiv (vorkommend in Vps27/Hrs/STAM), die sich von AS 164 bis 339 erstreckt. Es wird vermutet, dass die VHS-Domäne mit geringer Effizienz an die Membran bindet und dass die Membranbindung erst durch die Anwesenheit eines zweiten Bindemotivs stabilisiert wird (Misra *et al.*, 2000). Außer einer direkten Wechselwirkung der VHS-Domäne mit Membranen wäre zudem eine indirekte Assoziation über andere Proteine vorstellbar. Die Tatsache, dass Vps8 homo-oligomerisieren kann, eröffnet die Möglichkeit, dass die Bindungseffizienz durch Aneinanderlagerung von mehreren Domänen des Vps8-Proteins gesteigert wird. So wird beispielsweise die Oligomerisierung von PH (Pleckstrin homology)-Motiven der monomeren GTPase Dynamin (Säugerzellen) für eine Membranbindung benötigt (Klein *et al.*, 1998).

Flotation Experimente der isolierten mutmaßlichen VHS-Domäne von Vps8 zeigten, dass der Bereich alleine zu über 50% an Membranen haftet (WT-Vps8: 60-70%). Durch Behandlung mit Detergens oder Salzen konnte das Vps8-Fragment vollständig von Membranen losgelöst werden, zeigte also kein Aggregationsverhalten wie von Vps8 her gewohnt. Vermutlich liegt die Affinität zur Aggregation im mittleren bis C-terminalen Teil von Vps8, denn Deletionsvarianten für diesen Bereich wie  $\Delta PX$ ,  $\Delta PXA$  und  $\Delta EFF$  stachen bei differentiellen Fraktionierungen durch eine erhöhte Löslichkeit im Vergleich zum WT-Vps8 hervor. Warum bindet dann die Vps8-Form, welche das mutmaßliche VHS-Motiv nicht mehr enthält, trotzdem an Membranen? Es ist denkbar, dass Vps8 mehrere verschiedene Membranbindungsmotive besitzt.

#### 4.4 Vps8: ein multifunktionelles Adapterprotein?

Der für den Transport der löslichen vakuolären Hydrolase CPY und des  $\alpha$ -Pheromonrezeptors Ste6 wichtige Teil von Vps8 liegt hauptsächlich im Bereich der EFF-Deletion (AS 773-1175). Einer der fehlenden Abschnitte in der  $\Delta$ CHCR1+2-Vps8-Variante, CHCR2 (AS 916-1067) befindet sich innerhalb der EFF-Region. Diese beiden Vps8-Deletionsvarianten wiesen einen starken CPY-Fehlsortierungsdefekt und eine prominente Ste6-Knospenlokalisation auf. Die damit einhergehende Ste6-Stabilisierung war mit der Situation im  $\Delta$ vps8-Stamm gleichzusetzen. Ein geringer Effekt auf CPY-Transport war zudem in den Vps8-Deletionsmutanten  $\Delta$ WD40<sup>+</sup> sowie  $\Delta$ PX zu beobachten. In der ersteren fand der Abbau von Ste6 etwas verzögert statt ( $\tau = 23$  min statt 13 min), so dass es an der Knospenmembran akkumulieren konnte, im Falle der  $\Delta$ PX-Vps8 Variante trat eine Grenzsituation auf ( $\tau = 17$  min), die nicht zu einem eindeutigen Ste6-Fehlsortierungsphänotyp führte.

Für die Bindung an Vps21 scheint der Großteil des Vps8-Proteins essentiell zu sein. Deletionen fast aller analysierten Bereiche in Vps8 eliminierten die Wechselwirkung beider Proteine. Lediglich die Abschnitte WD40 (AS 100-169), CHCR2 (AS 916-1067) sowie die RING-Domänenregion (AS 1199-1274) waren nicht wichtig für die Interaktion. Es gibt also eine Überlappung der, für den endosomalen Transport von CPY und Ste6 wichtigen, Bereiche mit den Vps21-Bindungsstellen. Der etwas mosaikhafte Charakter der Interaktionsbereiche weist möglicherweise darauf hin, dass erst durch die Faltung des Proteins verschiedene Bindemodule zu einer Interaktionsplattform zusammengeführt werden. Darüber hinaus können durch die Multimerisierung von Vps8 Bindemotive aneinandergesetzt werden.

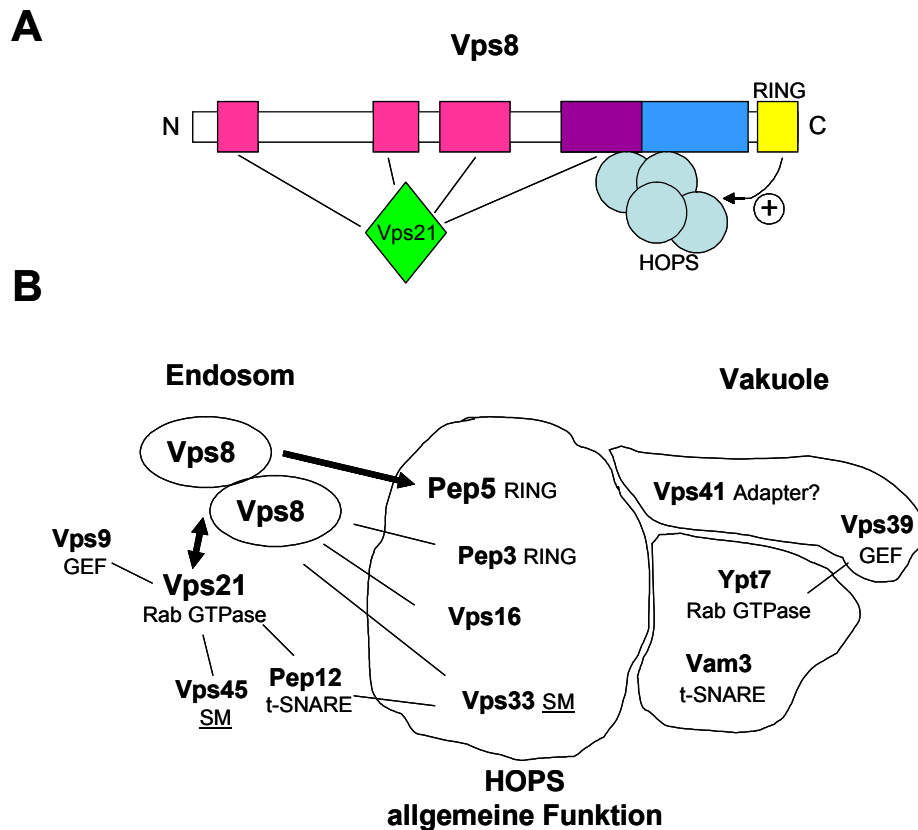
Vps8 interagiert mit Komponenten des HOPS-Komplexes, dem eine doppelte Funktion zukommt, d.h. im Golgi zu Endosom Transport als auch bei den späteren Fusionsereignissen mit der Vakuole (Peterson und Emr, 2001; Subramanian *et al.*, 2004). Nun konnte die Bindungsstelle für Pep5, eine der Komponenten von HOPS, im Vps8-Protein spezifiziert werden. Aufgrund der Koimmunopräzipitationsergebnisse ist sie der EFF-Region zuzuordnen. Interessanterweise war die Bindung von Vps8 an Pep5 geschwächt, wenn eine Vps8-Variante ohne die RING-Domäne eingesetzt wurde. Diese Auflockerung der Bindung zum HOPS-Komplex hatte jedoch keine Auswirkung auf den CPY- oder Ste6-Transport. Vermutlich erscheint die Vps8 $\Delta$ RING-Pep5 Interaktion so schwach, weil sich die Reaktionsbedingungen bei der Koimmunopräzipitation destabilisierend auf die Wechselwirkungen der Proteine auswir-

ken. Damit wird der tatsächlich vorhandene Einfluß der RING-Domäne verstärkt. Die RING-Funktion könnte eine positiv modulierende Wirkung auf die Assoziation von Vps8 mit Pep5 (HOPS) ausüben. Bemerkenswerterweise trägt das Pep5-Protein, wie auch eine weitere HOPS-Untereinheit Pep3 analog zu Vps8 eine C-terminale RING-Domäne. Zudem besitzen Pep5 und Pep3 ebenfalls ein CHCR-Motiv. Es ist vorstellbar, dass über diese Module Interaktionen der drei Proteine untereinander stattfinden, die zur Ausbildung eines größeren Netzwerkes unter Beteiligung der anderen HOPS-Komponenten führen. Die Tatsache, dass Vps8 in Sedimentationsexperimenten löslicher wurde, wenn der Bereich um das zweite CHCR entfernt worden war ( $\Delta$ EFF- und  $\Delta$ CHCR1+2), unterstützt diese Annahme. Das Sedimentationsverhalten war auch von der Bindung an Vps21 beeinflusst (größere Löslichkeit der  $\Delta$ PX und  $\Delta$ PXA-Vps8-Varianten). In Abb. 34 A sind die für Wechselwirkungen mit Vps21 und HOPS relevanten Bereiche in Vps8 dargestellt.

Der HOPS-Komplex ist einer von mehreren großen Anheftungs-faktoren in der Hefe, welche das Andocken und das Fusionieren von Transportvesikeln mit Akzeptor-Kompartimenten erleichtern. Beispielsweise erfüllt der so genannte TRAPP-Komplex ebenso wie HOPS zwei Funktionen im anterograden Transport, als TRAPP I im ER zum Golgi und als TRAPP II im intra-Golgi-Weg (Sacher *et al.*, 2001). An Stellen polarisierter Exozytose wird der Exocyst-Anheftungs-faktor gebraucht (Guo *et al.*, 1999). Charakteristisch für Anheftungskomplexe ist die Zusammensetzung aus vielen Proteinkomponenten, welche in der Regel im Zusammenspiel mit Rab-GTPasen funktionieren. An den aktiven Zonen der neuronalen Synapse der Säuger, wo Neurotransmitter via Exozytose freigesetzt werden, agiert ein großer Proteinkomplex, welcher biochemisch unlöslich ist, eine Parallele zum Vps8-enthaltenden Proteinkomplex (Schoch *et al.*, 2002). Eine zentrale Rolle bei der Zusammensetzung des FusionsApparats der aktiven Zonen nimmt das multifunktionelle RIM1 ein, ein Effektor der dort fungierenden GTPase Rab3. Vps8 wäre im HOPS-Komplex möglicherweise die Verbindungseinheit für die vier Komponenten: Pep5, Pep3, Vps16 und Vps33 mit der Vps21-GTPase, denn alle vier konnten gemeinsam mit Vps8 isoliert werden (Subramanian *et al.*, 2004). Als ein multifunktionaler Adapter würde Vps8 an der Rekrutierung und/oder Aktivierung des HOPS-Komplexes speziell für Fusionsereignisse am frühen/späten Endosom agieren. Im Gegensatz dazu könnten die Kernkomponenten des HOPS-Komplexes über vakuolenspezifische Adapter mit den Vps41/Vps39-Faktoren sowie



dem vakuolären Rab-Protein Ypt7 wechselwirken und so für vakuoläre Fusionsergebnisse rekrutiert werden (s. Abb. 34 B).



**Abb. 34** Modell der Interaktionen von Vps8 mit Vps21 und Pep5 (HOPS) (A) und spezifische Funktion des HOPS-Komplexes am Endosom durch Wechselwirkung mit Vps8 (B).

#### 4.4 Ubiquitinierung von Faktoren der Proteinsortierungsmaschinerie

Die Substraterkennung bei Ubiquitinierungsprozessen wird durch E3-Ubiquitin/Protein-Ligasen vermittelt. Es gibt zwei große Gruppen von E3-Ligasen: Die eine zeichnet sich durch die so genannte HECT-Domäne aus; während des Ubiquitinierungsprozesses bilden HECT-E3s Thiol-Ester-Zwischenstufen mit Ubiquitin aus, bevor sie es direkt auf das Substrat übertragen. Zur zweiten Gruppe gehören die RING-Finger Ubiquitinligasen, welche im Zusammenspiel mit Ubiquitin-konjugierenden Komplexen (E2) den Transfer von Ubiquitin auf das Substrat koordinieren (Übersicht Pickart, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Vps8 ubiquitiniert ist. Nun könnte Vps8 aufgrund seiner RING-Finger-Domäne eine E3-Funktion aus-

üben, die seinen eigenen Ubiquitinierungsstatus reguliert. Eine solche Autoubiquitinierung findet an der c-Cbl-Ubiquitinligase in Säugerzellen statt, die am Abbau aktivierter Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie des EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) beteiligt ist (Levkowitz *et al.*, 1998). Ein anderes RING-Finger Protein mit dieser Eigenschaft ist die V(D)J Rekombinase RAG1, deren Funktion es ist, die Gensegmente in Ig und T-Zell-Rezeptor kodierenden Regionen neu zu arrangieren, eine essentieller Prozess für die Entwicklung von B- und T-Lymphozyten (Jones und Gellert, 2003). Vps8 wird jedoch nicht über die eigene RING-Domäne ubiquitiniert, denn die Modifizierung blieb in der  $\Delta$ RING-Variante unverändert.

Vps9, das GEF für Vps21, war besonders stark ubiquitiniert in Klasse D Mutanten  $\Delta$ vps8,  $\Delta$ vps21 und  $\Delta$ pep12. Außer der sonst üblichen Monoubiquitinbande trat zudem eine Vps9-Spezies auf, welche 3-4 Ubiquitinmoleküle tragen könnte. Diese Modifikation zeigte sich spezifisch bei Expression der GDP-blockierten, inaktiven Vps21-S21N Form, nicht jedoch wenn Vps21 permanent aktiv vorlag (Vps21-Q66L). Demnach sieht es so aus, als würde Vps9 dann stark ubiquitiniert, wenn die Fusionsmaschinerie sich nicht zusammensetzen kann und der Fusionsprozess mit dem späten Endosom beeinträchtigt ist. Dies deutet auf eine negative Regulation der Vps9-Aktivität durch Ubiquitinierung hin. Vps9 besitzt ein Ubiquitin-Bindemotiv, die CUE-Domäne und kann mittels dieses Motivs mit Ubiquitinresten anderer Proteine sowie mit dem eigenen assoziieren (Shih *et al.*, 2003; Davies *et al.*, 2003). Auch ist die CUE-Domäne notwendig, damit die Ubiquitinierung von Vps9 durch die Rsp5-Ubiquitinligase vonstatten gehen kann. Wenn nun die eigene Modifizierung von Vps9 die CUE-Domäne beansprucht, wird verhindert, dass Vps9 vorzeitig, d.h. bevor es seine Zielmembran erreicht, mit anderen ubiquitinierten Proteinen wechselwirkt. Durch die Abspaltung von Ubiquitin am Zielort wäre die CUE-Domäne exponiert und die Bindung an monoubiquitinierte Faktoren möglich. In den Klasse D Mutanten  $\Delta$ vps8,  $\Delta$ vps21 und  $\Delta$ pep12 kann Vps9 möglicherweise nicht mit Zielortkomponenten interagieren und aktiviert werden und bleibt modifiziert bzw. wird sogar mehrfach modifiziert.

Die Vps8-Funktion hat ebenfalls einen Einfluss auf den Ubiquitinierungsstatus von Vps27, denn in  $\Delta$ vps8-Zellen war Vps27 ubiquitiniert, möglicherweise sogar mehrfach. Von seinem Säuger Homologen Hrs ist schon länger bekannt, dass es ubiquitiniert wird, nur sind die Art dieser Modifizierung (Poly- oder Monoubiquitinierung) und die Bedingungen, unter denen sie auftritt (konstitutiv oder regulativ), noch nicht ganz verstanden (Polo *et al.*, 2002; Katz *et al.*, 2002). Bei Vps27 treten mindestens zwei Banden auf, es könnte sich also um Polyubiquitinierung handeln. In Analogie zu

Vps9 ist Vps27 auch mit einem Ubiquitin-Interaktionsmotiv, dem UIM ausgestattet, und könnte damit beispielsweise an ubiquitinierte Frachtmoleküle binden, aber auch regulatorische Faktoren zum Zielort rekrutieren.

Insgesamt könnte die Ubiquitinierung von Komponenten der Proteinsortierungsmaschinerie, von denen einige Ubiquitin-Bindemodule besitzen, zur Ausbildung eines dynamischen Proteinnetzwerkes beitragen.

#### 4.5 Klasse D-Funktionen und Proteinaggregate

Klasse D *vps* Mutanten zeichnen sich durch Wachstumsdefekte bei 37°C aus. Wenn die Zellen Temperaturerhöhung erfahren, führt dies zur Falschfaltung vieler Proteine, die nachfolgend mit Hilfe der Heat-Shock Komponenten wieder zurechtgefaltet und/oder auf degradativem Wege beseitigt werden. Da erhöhte Temperaturen für Klasse D-Mutanten schädlich sind, stellte sich die Frage, ob für die Beseitigung von akkumulierten, abnormalen Proteinen nicht ebenfalls Klasse D-Funktionen gebraucht werden.

Durch die Behandlung der Zellen mit dem Arginin-Homolog Canavanin wird die Deformation von Proteinstrukturen induziert, welche mit Proteinaggregation einhergeht. Es wird angenommen, dass Proteinaggregate die Zelle unter anderem durch eine Blockierung des Proteinabbaues über das Proteasom schädigen, indem Komponenten des Ubiquitin-vermittelten Abbaues in die Aggregate einbezogen und so von ihrem Wirkort ferngehalten werden (Bence *et al.*, 2001; Hellmuth, 2001).

Bei sublethalen Konzentrationen von Canavanin war das Wachstum von  $\Delta pep5$ -,  $\Delta pep12$ - und  $\Delta vps8$ -Zellen beeinträchtigt. Möglicherweise hängt der starke Wachstumsdefekt der ersten beiden Stämme auch mit dem ohnehin langsamen Wachstum dieser Mutanten zusammen. Trotzdem könnte der Einfluß von Canavanin einen Hinweis auf die Beteiligung von Pep5, Pep12 und Vps8 bei der Reaktion der Zelle auf Proteinaggregation bedeuten. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, dass in Experimenten mit Polyglutamin-Domänen, welche starke Aggregationsneigung aufweisen und Zellschäden verursachen, Mutationen von Komponenten des endozytischen Weges die Defekte in der Zelle noch verstärkten (Meriin *et al.*, 2003). So führte in jener Studie die Expression von ausgedehnten Polyglutamin-Domänen in *pep5* Mutanten zu synthetischer Lethalität. Die Neigung von Vps8 zu Aggregation impliziert, dass Vps8 vielleicht bevorzugt an Proteinaggregate binden könnte. Da  $\Delta vps21$ -Zellen durch Canavanin unbeeinflusst blieben, ist Vps21 für die Beseitigung von Proteinaggregaten wahrscheinlich nicht limitierend. Eine Erklärung hierfür könnte

sein, daß die verwandten GTPasen Ypt52 und/oder Ypt53 in diesem Zusammenhang von Bedeutung sind.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle von Vps8, eines Klasse D *vps* Proteins, bei Transportprozessen im endosomalen Weg der Knospenhefe *Saccharomyces cerevisiae* charakterisiert. Mittels einer Epistasis-Analyse mit dem  $\alpha$ -Pheromon-Transporter Ste6 als Markerprotein für Defekte im endozytischen System konnte der Funktionsort von Vps8 näher bestimmt werden. Demnach wird die Vps8-Funktion im Zusammenspiel mit anderen Klasse D *vps* Komponenten, der GTPase Vps21 und dem t-SNARE Pep12, für Fusionsprozesse mit späten Endosomen benötigt. Die 2-Hybrid-Interaktion von Vps8 mit Vps21 sowie den anderen nah verwandten RabGTPasen Ypt52 und Ypt53 und Immunofluoreszenz-Experimente bekräftigen diesen Befund und weisen auf die Funktion von Vps8 als Vps21-Effektor hin. Da Vps8 im Sucrose-Dichtegradienten neben Pep12 fraktioniert, ist es vermutlich an frühen Endosomen lokalisiert. Ste6 akkumuliert polar in der Knospenmembran von Klasse D-Mutanten und dieser Phänotyp ist nicht durch eine Reduzierung der Ubiquitinierung von Ste6 bedingt. Dies deutet auf einen von Ubiquitinsignalen unabhängigen Rücktransport von Ste6 zur Knospenmembran hin und impliziert für Vps8 und andere Klasse D-Komponenten neben ihrer Funktion in Fusionsprozessen eine mögliche Rolle im Sortierungsmechanismus am frühen Endosom. In Klasse D-Mutanten wurde zudem verstärkte Ubiquitinierung von Vps27 und Vps9 beobachtet; anscheinend reguliert Ubiquitin die Funktionen dieser Proteine. Vps8, ein großes hydrophiles Protein ohne Transmembranbereiche, zeichnet sich durch eine erstaunliche Membranaffinität aus. Diese periphere Membranbindung ist nicht abhängig von Vps21, Ypt52, Ypt53 oder anderen Klasse D-Komponenten. Es konnte gezeigt werden, dass Vps8 eine N-terminale Membranbindungsstelle besitzt. Eine Deletion dieser Domäne reicht jedoch für die Veränderung der Vps8-Membranassoziation nicht aus, was ein starkes Indiz für das Vorhandensein mehrerer Membranbindemotive im Vps8 Protein ist. In Flotation und differentiellen Fraktionierungsexperimenten zeigten sich 70% von Vps8 membrangebunden und nur 30% davon waren biochemisch mit Detergens oder Salzen auflösbar. Die Vps8 inhärente Tendenz zu Homooligomerisierung und Aggregation mit Vps21 und den Komponenten des HOPS-Komplexes impliziert eine Rolle von Vps8 als Gerüstprotein. Mittels einer Deletionsanalyse von Vps8 konnten funktionelle Bereiche für CPY- und Ste6-Transport sowie die Bindestellen für Vps21 und die HOPS-Untereinheit Pep5 eingegrenzt werden. Vps8 könnte als spezifischer Adapter zusammen mit Vps21 den HOPS-Komplex zu den Endosomen rekrutieren.

## 6. Literaturverzeichnis

- Babst, M., Sato, T.K., Banta, L.M. und Emr, S.D. (1998) Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *EMBO J*, **16**: 1820-31.
- Bache, K.G., Brech, A., Mehlum, A. und Stenmark, H. (2003) Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J. Cell Biol.* **162**: 435-442.
- Berkower, C., Loayza, D., und Michaelis, S. (1994) Metabolic instability and constitutive endocytosis of *STE6*, the a-factor transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **5**: 1185-1198.
- Black, M.W. und Pelham, H.R.B. (2000) A selective transport route from golgi to late endosomes that requires the yeast GGA proteins. *J. Cell Biol.* **151**: 587-600.
- Bilodeau, P.S., Urbanowski, J.L., Winistorfer, S.C., und Piper, R.C. (2002) The Vps27p-Hse1p complex binds ubiquitin and mediates endosomal protein sorting. *Nature Cell Biol.* **4**: 534-539.
- Boman, A.L., Zhang, C., Zhu, X., und Kahn, R.A. (2000) A family of ADP-ribosylation factor effectors that can alter membrane transport through the trans-Golgi. *Mol. Biol. Cell* **11**: 1241-1255.
- Burd, C.G., Emr, S.D. (1998) Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains *Mol. Cell.* **2**: 157-162.
- Chen und Stevens. (1996) The *VPS8* gene is required for localization and trafficking of the CPY sorting receptor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Cell Biol.* **70**: 289-297.
- 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**: 109-118.
- 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**: 2769-2782.
- Darsow, T., Katzman, D.J., Cowles, C.R., und Emr, S.D. (2001) Vps41p function in the alkaline phosphatase pathway requires homo-oligomerization and interaction with AP-3 through two distinct domains. *Mol. Biol. Cell* **12**: 37-51.
- Davies, N.G., Horecka, J.L., Sprague, G.F. (1993) *Cis*- and *trans*-acting functions required for endocytosis of the yeast pheromone receptors. *J. Cell Biol.* **122**: 53-65.
- Davies, B.A., Topp, J.D., Sfeir, A.J., Katzmann, D.J., Carney, D.S., Tall, G.G., Friedberg, A.S., Deng, L., Chen, Z., Horazdovsky, B.F. (2003) Vps9p CUE domain ubiquitin binding is required for efficient endocytic protein traffic. *J. Biol. Chem.* **278**: 19826-19833.
- Dell'Angelica, E.C., Puertollano, R., Mullins, C., Aguilar, R.C., Vargas, J.D., Hartnell, L.M., und Bonifacio, J.S. (2000) GGAs: A family of ADP-ribosylation factor binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J. Cell Biol.* **149**: 81-94.
- Deloche, O., Yeung, B.G., Payne, G.S., und Shekman, R. (2001) Vps10p transport from the trans-golgi-network to the endosome is mediated by clathrin coated vesicles. *Mol. Biol. Cell* **12**: 475-485.

- Ellson, C.D., Andrews, S., Stephens, L.R., und Hawkins, P.T. (2002) The PX-domain: a new phosphoinositide binding module. *J. Cell Sci.* **115**: 1099-1105.
- Fields, S., und Song, O.K. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246.
- Gerrard, S.R., Bryant, N.J., and Stevens, T.H. (2000). *VPS21* controls entry of endocytosed and biosynthetic proteins into the yeast prevacuolar compartment. *Mol. Biol. Cell* **11**: 613-626.
- Gietz, R.D., Sugino, A. (1988) New yeast-Escherichia coli shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527-34.
- Gruenberg, J. (2001) The endocytic pathway: a mosaik of domains. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 721-730.
- Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C., und Novick, P. (1999) The Exocyst is an effector of Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J.* **18**: 1071-1080.
- Hama, H., Tall, G.G., und Horazdovsky, B. (1999a) Vps9p is a guanine nukleotide exchange factor involved in vesicle-mediated vacuolar protein transport. *J. Biol. Chem.* **274**: 15284-15291.
- Hama, H., Schnieders, E.A., Thorner, J., Takemoto, J.Y., und DeWald, D.B. (1999b) Direct involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate in secretion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **274**: 34294-34300.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In Glover, P.M. (ed.) *DNA Cloning Col. I*. IRL Press Oxford.
- 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., Pypaert, M., Rohrer, J., und Riezman, H. (1997) Transport through the yeast endocytic pathway occurs through morphologically distinct compartments and requires an active secretory pathway and Sec18p/N-ethylmaleimid-sensitive fusion protein. *Mol. Biol. Cell* **8**: 13-31.
- Hirst, J., Lui, W.W., Bright, N.A., Totty, N., Seaman, M.N., und Robinson, M.S. (2000) A family of proteins with gamma-adaptin an VHS domains that facilitate trafficking between the trans-Golgi network and the vacuole/lysosome. *J. Cell Biol.* **149**: 67-80.
- Hochstrasser, M., Ellison, M.J., Chau V., Varshavsky, A. (1991) The short-lived MAT alpha 2 transcriptional regulator is ubiquitinated in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88**: 4606-10.
- Horazdovsky, B.F., Busch, G.R., 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**: 1297-1309.
- Horazdovsky, B.F., Cowles, C.R., Mustol, P., Holmes, M. und Emr., S. (1996) A novel RING finger protein, Vps8p, functionally interacts with the small GTPase, Vps21p, to facilitate soluble vacuolar protein localization. *J. Biol. Chem.* **271**: 33607-33615.
- Hughes, W.E., Woscholski, R., Cooke, F.T., Patrick, R.S., Dove, S.K., McDonald, N.Q., und Parker, P.J. (2000) *SAC1* encodes a regulated lipid phosphoinositide phosphatase, defects in which can

- be suppressed by the homologous Inp52p and Inp53p phosphatases. *J. Biol. Chem.* **275**: 801-808.
- 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**: 1693-1696.
- Jahn, R., Lang, T., und Südhof, T.C. (2003) Membrane fusion. *Cell* **112**: 519-533.
- Jones, J.M., und Gellert, M. (2003) Autoubiquitylation of the V(D)J recombinase protein RAG1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 15446-15451.
- Katz, M., Shtiegman, K., Tal-Or, P., Yakir, L., Mosseson, Y., Harari, D., Machluf, Y., Asao, H., Jovin, T., Sugamura, T., und Yarden, Y. (2002) Ligand-independent degradation of epidermal growth factor receptor involves receptor ubiquitylation and Hgs, an adaptor whose ubiquitin-interacting motif targets ubiquitylation by Nedd4. *Traffic* **3**: 740-751.
- Katzman, D.J., Stefan, C.J., Babst, M., and Emr, S.D. (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *J. Cell Biol.* **162**: 413-423.
- Kihara, A., Noda, T., Ishihara, N., und Ohsumi, Y. (2001) Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **152**: 519-530.
- Klein, D.E., Lee, A., Frank, D.W., Marks, M.S. und Lemmon, M.A. (1998) The Pleckstrin Homology Domains of dynamin isoforms require oligomerization for high affinity phosphoinositide binding. *J. Biol. Chem.* **273**: 27725-27733.
- Klionsky, D.J., Emr, S.D. (1990) A new class of lysosomal/vacuolar protein sorting signals. *J. Biol. Chem.* **265**: 5349-5352.
- Klionsky, D.J., Cueva, R., Yaver, D.S. (1992) Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J. Cell Biol.* **119**: 287-299.
- 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**: 3261-3271.
- 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**: 2251-2261.
- Krsmanović, T., Pawelec, A., Sydor, T., Kölling, R. (2005) Control of Ste6 recycling by ubiquitination in the early endocytic pathway in yeast. *MBC* (im Druck)
- 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.
- Kuchler, K., Dohlman, H.G., Thorner, J. (1993) The a-factor transporter (STE6 gene product) and cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* **120**: 1203-15.
- Levkowitz, G., Waterman, H., Zamir, E., Kam, Z., Oved, S., Langdon, W.Y., Beguinot, L., Geiger, B., und Yarden, Y. (1998) c-Cbl/Sli1 regulates endocytic sorting and ubiquitination of the epidermal growth factor receptor. *Genes Dev.* **12**: 3663-3674.
- Lippe, R., Miaczynska, M., Rybin, V., Runge, A. und Zerial, M. (2001) Functional synergy between



- Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. *Mol. Biol. Cell.* **12**: 2219-2228.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachet, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *YEAST* **14**: 953-961.
- Losko, S., Kopp, F., Kranz, A., Kölling, R. (2001) Uptake of the ATP-binding cassette (ABC) transporter Ste6 into the yeast vacuole is blocked in the *doa4* Mutant. *Mol Biol Cell.* **12**:1047-59.
- Luo, W., Chang, A. (2000) An endosome-to-plasma membrane pathway involved in trafficking of a mutant plasma membrane ATPase in yeast. *Mol. Biol. Cell* **11**: 579-592.
- Marcusson, E.G., Horazdovsky, B.F., Cereghino, J.L., Gharakhanian, E., and Emr, S.D. (1994) The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the *VPS10* gene. *Cell* **77**: 579-586.
- Maxfield, F.R., und McGraw, T.E. (2004) Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 121-132.
- McGarth, J.P., und Varshavsky, A.. (1989) The yeast *STE6* gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature* **340**: 400-404.
- Misra, S., Beach, B.M., und Hurley, J.H. (2000) Structure of the VHS domain of human Tom1 (target of Myb1): Insights into interactions with proteins and membranes. *Biochemistry* **39**: 11282-11290.
- Neuhoff, V., Stamm, R., Eibl, H. (1985) Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* **6**: 427-448.
- Nie, Z. *et al.* (2003) ARF and its many interactors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**: 396-404.
- Pelham, H.R.B. (2001) SNAREs and the specificity of membrane fusion. *Trends Cell Biol.* **11**: 99-101.
- Peterson, M.R., Emr, S.D. (2001) The Class C Vps complex functions at multiple stages of the vacuolar transport pathway. *Traffic* **2**: 476-486.
- Pfeffer, S. (2003) Membrane domains in the secretory and endocytic pathways. *Cell* **112**: 507-517.
- Pickart, C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* **2**: 169-178.
- 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 vesicles. *Europ. J. Cell Biol.* **65**: 305-318.
- 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**: 531-545.
- Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M.R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P., und Di Fiore, P.P. (2002) A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* **416**: 451-455.
- Poussu, A., Lohi, O., und Lehto, V.P. (2000) Vear, a novel Golgi-associated protein with VHS and gamma-adaptin "ear" domains. *J. Biol. Chem.* **275**: 7176-7183.

- Prescianotto-Baschong, C., und Riezman, H. (2002) Ordering the compartments in the yeast endocytic pathway. *Traffic* **3**: 37-49.
- Pringle, J.R., Preston, R.A., Adams, A.E., Stearns, E., Drubin, D.G., Haarer, B.K., Jones, E.W. (1989) Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol.* **31**: 357-435.
- Raiborg, C., Bache, K.G., Gillooly, D.J., Madshus, I.H., Stang, E., und Stenmark, H. (2002) Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nature Cell Biol.* **4**: 394-398.
- Raymond, C.K., Howald-Stevenson, I., Vater, C.A. und Stevens, T.H. (1992) Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E *vps* mutants. *Mol. Biol. Cell* **3**: 1389-1402.
- Rayner, J.C., Pelham, H.R.B. (1997) transmembrane domain-dependent sorting of proteins to the ER and plasma membrane in yeast. *EMBO J.* **16**: 1832-1841.
- Rieder, S.E., und Emr, S.D. (1997) A novel RING finger protein complex essential for a late step in protein transport to the yeast vacuole. *Mol. Biol. Cell* **8**: 2307-2327.
- Rothman, J.E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* **372**: 55-63.
- Sacher, M., Barrowman, J., Wang, W., Horecka, J., Zhang, Y., Pypaert, M., und Ferro-Novick, S. (2001) TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport. *Mol. Cell.* **7**: 433-442.
- Sato, T.K., Rehling, P., Peterson, M.R., und Emr, S.D. (2000) Class C Vps protein complex regulates vacuolar SNARE pairing and is required for vesicle docking/ fusion. *Mol. Cell* **6**: 661-671.
- Schoch, S., Castillo, P.E., Jo., T., Mukherjee, K., Geppert, M., Wang, Y., Schmitz, F., Malenka, R.C., und Südhof, T.C. (2002) RIM1 $\alpha$  forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature* **415**: 321-326.
- Scott, S.V., Baba, M., Ohsumi, Y., und Klionsky, D.J. (1995) Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism. *J. Cell Biol.* **138**: 37-44.
- Seals, D.F., Eitzen, G., Margolis, N., Wickner, W.T. und Price, A. (2000) A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *PNAS* **97**: 9402-9407.
- Shih, S.C., Prag, G., Francis, S.A., Sutano, M.A., Hurley, J.H., und Hicke L. (2003) A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain. **22**: 1273-1281.
- Singer-Krüger, B., Stenmark, H., Düsterhöft, A., Philippsen, P., Yoo, Jin-San, 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**: 283-298.
- Singer, B., und Riezman, H. (1990) Detection of an intermediate compartment involved in transport of  $\alpha$ -factor from the plasma membrane to the vacuole in yeast. *J. Cell. Biol.* **110**: 1911-1922.
- Simonsen, A., Wurmser, A.E., Emr., S.D., und Stenmark, H. (2001) The role of phosphoinositides in membrane transport *Curr. Opin. In Cell Biol.* **13**: 485-492.

- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., und Rothman, J.E. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**: 318-324.
- Srivastava, A., Woolford, C.A., und Jones, E.W. (2000) Pep3/Pep5 complex: a putative docking factor at multiple steps of vesicular transport to the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **156**: 105-122.
- Stack, J.H., DeWald, D.B., Takegawa, K., und Emr, S.D. (1995) Vesicle-mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34 PtdIns 3-Kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. *J. Cell Biol.* **129**: 321-334.
- Stahelin, R.V., Long, F., Diraviyam, K., Bruzik, K.S., Murray, D., Cho, W. (2002) Phosphatidylinositol-3-phosphate induces the membrane penetration of the FYVE domains of Vos27p und Hrs. *J. Biol. Chem.* **277**: 26379-26388.
- Subramanian, S., Woolford, C.A., und Jones, E.W. (2004) The Sec1/Munc18 protein, Vps33p, functions at the endosome and the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **15**: 2593-2605.
- Svejstrup-Dirac, A.B., Sumizawa, T. und Pfeffer, S.R. (1997) Identification of a GDI displacement factor that releases endosomal Rab GTPases from Rab-GDI. *EMBO J.* **16**: 465-472.
- Takatsu, H., Yoshino, K., und Nakayama, K. (2000) Adaptor gamma ear homology domain conserved in gamma-adaptin und GGA proteins that interact with gamma-synergin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**: 719-725.
- Vida, T.A., Emr, S.D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell Biol.* **128**: 779-792.
- Vowels, J.J., und Payne, G.S. (1998) A dileucine-like sorting signal directs transport into an AP-3-dependent, clathrin-independent pathway to the yeast vacuole. *EMBO J.* **17**: 2482-2493.
- Wiederkehr, A., Avaro, S., Prescianotto-Baschong, C., Haguenaer-Tsapis, R., und Riezman, H. (2000) The F-box protein Rcy1 is involved in endocytic membrane traffic and recycling out of an early endosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **149**: 397-410.
- Wilcox, C.A., Redding, K., Wright, R., und Fuller, R.S. (1992) Mutation of a tyrosine localization signal in the cytosolic tail of yeast Kex2 protease disrupts golgi retention and results in default transport to the vacuole. *Mol. Biol. Cell* **3**: 1353-1371.
- Wurmser, A.E., Sato, T.K., und Emr, S.D. (2000) A new component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J. Cell Biol.* **151**: 551-562.
- Yahara, N., Ueda, T., Sato, K., und Nakano, A. (2001) Multiple roles of Arf1 GTPase in the yeast exocytic and endocytic pathways. *Mol. Biol. Cell* **12**: 221-238.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Ade	Adenin
ALP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
Ci	Curie
CPY	Carboxypeptidase Y
CVT	„cytoplasm-to-vacuole targeting“
Cys	Cystein
d.h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
ER	Endoplasmatisches Retikulum
5-FOA	5-Fluoro-Orotic-Acid
GDF	„GDI-displacement factor“
GDI	„GDP-dissociation inhibitor“
GEF	„guanine nucleotide exchange factor“
HA	Hämagglutinin
His	Histidin
HOPS	„homotypic vacuole fusion and vacuolar sorting“
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
Leu	Leucin
Lys	Lysin
MDR	„multi drug resistance“
Met	Methionin
MVB	Multivesikular Body
n.b.	nicht bestimmt
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“
PEG	Polyethylenglykol

---

PFK	Phosphofruktokinase
PGK	Phosphoglyceratkinase
PM	Plasmamembran
PMA1	Plasmamembran-ATPase
rpm	„Rotations per minute“
s.	siehe
<i>S. c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	„Sodium Dodecyl Sulfat“
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TGN	Trans Golgi Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
ts	temperatursensitiv
Ub	Ubiquitin
Ura	Uracil
vgl.	vergleiche
vps	„Vacuolar protein sorting“
WT	Wildtyp
YNB	„yeast nitrogen base“
z.B.	zum Beispiel

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralf Kölling für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Rüther danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Bei allen Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie möchte ich mich für eine kollegiale Zusammenarbeit und die ständige Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein herzliches Dankeschön an Carolin Schmitz, Christina Frick, Anja Saran und Pia Damnitz, die mir während der Höhen und Tiefen der Laborarbeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Ihre Ratschläge, Ermunterungen, die anregenden Gespräche und die gemeinsamen Mittagessen haben mir die Arbeit stets erleichtert und mich motiviert. Karin Krapka danke ich für ihre Unterstützung bei manchen Klonierungen, die „Sokoladenversorgung“ und die gute Zusammenarbeit. Bei Carolin Schmitz und Christina Frick möchte ich mich zudem für die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts sowie für ihre Hilfe bei der Formatierung und Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Eltern, die mich in jeder Hinsicht unterstützt und mir immer den nötigen Rückhalt gegeben haben.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst verfasst wurde und dass ich keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf,

(Agnes Pawelec)