

**Molekulargenetische und physiologische
Untersuchungen zur Funktion
von *FGY1* bei der heterologen Expression
von Glukosetransportern in der Hefe
*Saccharomyces cerevisiae***

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

vorgelegt durch Roman Wiczorke
aus Düsseldorf

Düsseldorf 2001

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

Referent: Prof. Dr. C. P. Hollenberg

Korreferent: Prof. Dr. H. Bünemann

Tag der mündlichen Prüfung: 9.7.2001

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	7
1.1	Die Hexosetransporter-Familie von <i>S. cerevisiae</i>	7
1.1.1	Glukoseinduktion von Hexosetransportern der Hefe	9
1.1.2	Glukoserepression und Derepression	12
1.2	Die GLUT-Glukosetransporter der Säugetiere.....	14
1.2.1	Zwei verwandte Proteine mit unterschiedlicher Funktion, Lokalisierung und Regulation: GLUT1 und GLUT4	14
1.2.2	Erkrankungen im Zusammenhang mit Glukosetransportdefekten.....	18
1.2.3	Heterologe Expression von Transportproteinen in Hefe	18
2	Material und Methoden	21
2.1	Stämme und Medien.....	21
2.1.1	Bakterienstämme.....	21
2.1.2	Medien und Anzucht von <i>E. coli</i>	21
2.1.3	Hefestämme	22
2.1.4	Medien und Anzucht von Hefestämmen.....	23
2.2	Plasmide	24
2.3	Synthetische Oligonukleotide.....	26
2.4	Genbanken	30
2.5	Mikroskopische Untersuchungen	30
2.6	Chemikalien und Enzyme	31
2.7	Antikörper	32
2.8	Transformationen.....	32
2.8.1	Transformation von <i>E. coli</i>	32
2.8.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	32
2.9	Präparation von DNA	32
2.9.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	32
2.9.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	32
2.10	Enzymatische Modifikationen von DNA	33

2.10.1	DNA-Restriktion	33
2.10.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	33
2.10.3	Ligation	33
2.11	PCR-Amplifizierung von DNA	33
2.12	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	34
2.13	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	35
2.14	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	35
2.15	Sequenzierung von DNA	35
2.16	<i>In vitro</i> -Mutagenese	35
2.17	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	35
2.18	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	36
2.19	Nachweis von Proteinen über Coomassie-Blue Anfärbung	36
2.20	Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse.....	36
2.21	Spezifischer Nachweis der Proteine Glut1, Glut4 und Pma1	37
2.22	Zellfraktionierung durch Saccharosegradientenzentrifugation	37
2.23	Bestimmung der Aufnahme von Hexosen in <i>S. cerevisiae</i>	38
2.23.1	Glukose-Aufnahme.....	38
2.23.2	Maltose-Aufnahme	39
2.24	Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität.....	39
2.24.1	Quantitative Enzymtests	39
2.24.2	Qualitative Enzymtests („X-Gal Overlay-Assay“)	39
2.25	Kreuzung von Hefestämmen, Tetradenanalyse und Bestimmung des Paarungstyps	40
2.26	Gen-Deletionen in <i>S. cerevisiae</i>	40
2.27	Klonierung von DNA-Fragmenten durch <i>in vivo</i> -Rekombination.....	41
2.28	Two-Hybrid System.....	41

3	Ergebnisse	42
3.1	Konstruktion eines Hexosetransport-negativen Hefestammes	42
3.1.1	Deletion von <i>AGT1</i> , <i>MPH2</i> und <i>MPH3</i>	42
3.1.2	Untersuchung der Expression von <i>AGT1</i>	43
3.1.3	Analyse der Funktion von <i>Agt1</i> , <i>Mph2</i> und <i>Mph3</i> bei der Aufnahme von Saccharose.....	44
3.2	Heterologe Expression von Gukosetransportern aus Säugetieren in dem Hexosetransporter-defizienten Hefestamm.....	45
3.2.1	Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 aus Ratte.....	46
3.2.2	Untersuchung der intrazellulären Lokalisierung von GLUT1 und GLUT4	46
3.2.3	Suche nach GLUT1- und GLUT4-Suppressormutationen	47
3.2.4	Analyse von GLUT1-Suppressormutanten	48
3.2.5	Isolierung genomischer Mutationen, durch die GLUT4 in einen funktionellen Glukosetransporter konvertiert wird	49
3.2.6	Expression der menschlichen GLUT1- und GLUT4- Glukosetransporter	49
3.2.7	Charakterisierung funktioneller Allele von GLUT1	51
3.2.8	Analyse der genomischen Suppressormutation <i>fgy1-1</i>	54
3.2.8.1	Kreuzungsanalyse	54
3.2.8.2	Komplementation von <i>fgy1-1</i> mit einer Genbank	55
	3.2.8.3 Isolierung und Charakterisierung von <i>YNL094w</i> als Multicopysuppressor der <i>fgy1-1</i> -Mutation	56
	3.2.8.4 Isolierung von <i>FGY1</i>	59
	3.2.8.5 Einfluß der Expressionsstärke von <i>FGY1</i> auf GLUT1 und Klonierung des Allels <i>fgy1-1</i>	60
3.2.9	Charakterisierung von <i>FGY1</i>	62
3.2.9.1	Untersuchung der Lokalisierung eines <i>Fgy1</i> -GFP Fusionsproteins	63
3.2.9.2	Deletion unterschiedlicher C-terminaler Bereiche von <i>Fgy1</i>	64
3.2.9.3	Überexpression des C-Terminus von <i>Fgy1</i>	66

3.2.9.4	Deletion von <i>FGY1</i>	69
3.2.10	Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisierung von Fgy1, GLUT1 und GLUT4 in <i>S. cerevisiae</i>	71
3.2.10.1	Sos-Recruitment-System (SRS).....	71
3.2.10.2	Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation.....	75
3.2.11	Bestimmung der kinetischen Eigenschaften von GLUT1 und GLUT4.	77
3.2.12	Untersuchungen zur Funktion von Fgy1	79
3.2.12.1	<i>in vitro</i> -Mutagenese von Fgy1	79
3.2.12.2	Bestimmung der Maltoseaufnahmeaktivität.....	81
3.2.12.3	Untersuchung der Arsenat-Resistenz von <i>fgy1</i> -Mutanten	84
3.2.12.4	Interaktionen des Fgy1-C-Terminus im Two-Hybrid-System	85
3.2.12.5	Isolierung von Multicopy-Suppressoren einer <i>fgy1</i> -Deletion	87
4	Diskussion	90
4.1	Konstruktion eines Glukosetransport-negativen Hefestammes und Untersuchung von Mitgliedern der Maltosetransporter-Familie.....	90
4.2	Entwicklung eines neuen Systems für die heterologe Expression von Glukosetransportern aus Säugetieren	91
4.3	Lokalisierung von GLUT1 und GLUT4 in <i>S. cerevisiae</i>	93
4.4	Identifizierung und Charakterisierung von Fgy1.....	96
4.4.1	Auswirkungen der Fgy1-Aktivität auf die Funktion von GLUT-Proteinen aus Säugetieren in Hefe	96
4.4.2	Untersuchungen zur physiologischen Funktion von Fgy1.....	100
5	Zusammenfassung	104
6	Literaturverzeichnis	105
7	Abkürzungsverzeichnis.....	117

1 EINLEITUNG

Der einfache Zucker Glukose ist in seinen polymeren Formen, der Zellulose und der Stärke, das vermutlich am häufigsten auftretende Biomolekül der Erde. Zusammen mit anderen Zuckern repräsentiert Glukose einen wichtigen Nährstoff für vielerlei Zelltypen, von Mikroben bis hin zu den Zellen höherer Organismen wie denen der Säugetiere. Parallel zu der weiten Verbreitung von Zuckern als Nährstoffen entwickelten sich im Laufe der Evolution eine Vielzahl von Mechanismen, um die zelluläre Aufnahme dieser hydrophilen Moleküle über den hydrophoben Kern der Plasmamembran zu katalysieren, wie z.B. Protonen-Symport-Systeme, Natrium-Glukose-Cotransporter, Bindeprotein-abhängige Systeme, Phosphotransferase-Systeme und Systeme mit erleichterter Diffusion (Saier, 2000; Walmsley *et al.*, 1998). In Eukaryonten vermitteln unterschiedliche Familien von Glukosetransportproteinen die Aufnahme des Zuckers in die Zellen, kodiert von den *GLUT*-Genen in Säugetieren und den *HXT*-Genen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Der Transport des Zuckers erfolgt passiv entlang eines Konzentrationsgradienten über den energieunabhängigen Mechanismus der erleichterten Diffusion. Die Zuckertransporter werden einer übergeordneten Familie von Transportproteinen zugerechnet, der „major facilitator superfamily“ (MFS), und zeichnen sich durch strukturelle Gemeinsamkeiten wie 12 transmembrane Helices und eine Anzahl konservierter Aminosäurereste und Motive aus (Baldwin, 1993; Boles und Hollenberg, 1997; Kruckeberg, 1996; Mueckler, 1994; Pao *et al.*, 1998; Walmsley *et al.*, 1998).

1.1 Die Hexosetransporter-Familie von *S. cerevisiae*

S. cerevisiae besitzt 34 Gene, die gemeinsam für die sog. Zuckerpermease-Familie kodieren (Abb. 1). Unter diesen Genen kodieren 18 für Hexosetransporter-verwandte Proteine, *HXT1-17* und *GAL2*. Diese Genfamilie konnte auf Basis der Charakterisierung von Hefemutanten und nach Abschluß des Hefegenom-Sequenzierprojektes durch Sequenzähnlichkeiten zu Zuckertransportern anderer Organismen identifiziert werden (Kruckeberg, 1996; Özcan und Johnston, 1999; Wieczorke *et al.*, 1999). Daneben existieren Protonen-Symporter-Systeme für die Aufnahme von Disacchariden wie Maltose (Lagunas, 1993). Ursprünglich wurden in *S. cerevisiae* zwei kinetisch unterschiedliche Glukosetransportsysteme beschrieben: Ein konstitutives, nieder-affines System mit einem K_m zwischen 25 und 45 mM, sowie ein Glukose-reprimiertes, hoch-affines System mit einem K_m von 0,7 bis 2 mM (Bisson und Fraenkel, 1983; Coons *et al.*, 1995; Reifenberger *et al.*, 1997). Mittlerweile ist klar, daß der nieder- und hoch-affine Glukosetransport eher

die Summe mehrerer Transporter als das Resultat individueller Proteine repräsentiert. Keiner der Transporter ist für das Wachstum auf Glukose essentiell, was auf eine funktionelle Redundanz hindeutet. Die Aufnahme von Glukose in die Zelle übt eine starke Kontrolle auf den glykolytischen Fluß aus und wird als geschwindigkeitslimitierender Schritt des Zucker-Metabolismus angesehen (Cortassa *et al.*, 1995; Galazzo und Bailey, 1990). Eine Adaptation der Hefe an diesen Umstand könnte sich in der Entwicklung dieser ungewöhnlichen Vielzahl von Zuckertransportern widerspiegeln, zumal die Hefe in der Lage ist, ein breites Spektrum an Glukosekonzentrationen von einigen μM bis zu 2 M effektiv metabolisieren zu können (Weusthuis *et al.*, 1994). Da in den letzten Jahren die Bedeutung der Hefe neben ihrem konventionellen Einsatz in der Bier-, Wein- und Broterzeugung auch in biotechnologischen Prozessen stark zugenommen hat, ist die Untersuchung dieser Mechanismen nicht nur von akademischem sondern auch von ökonomischem Interesse.

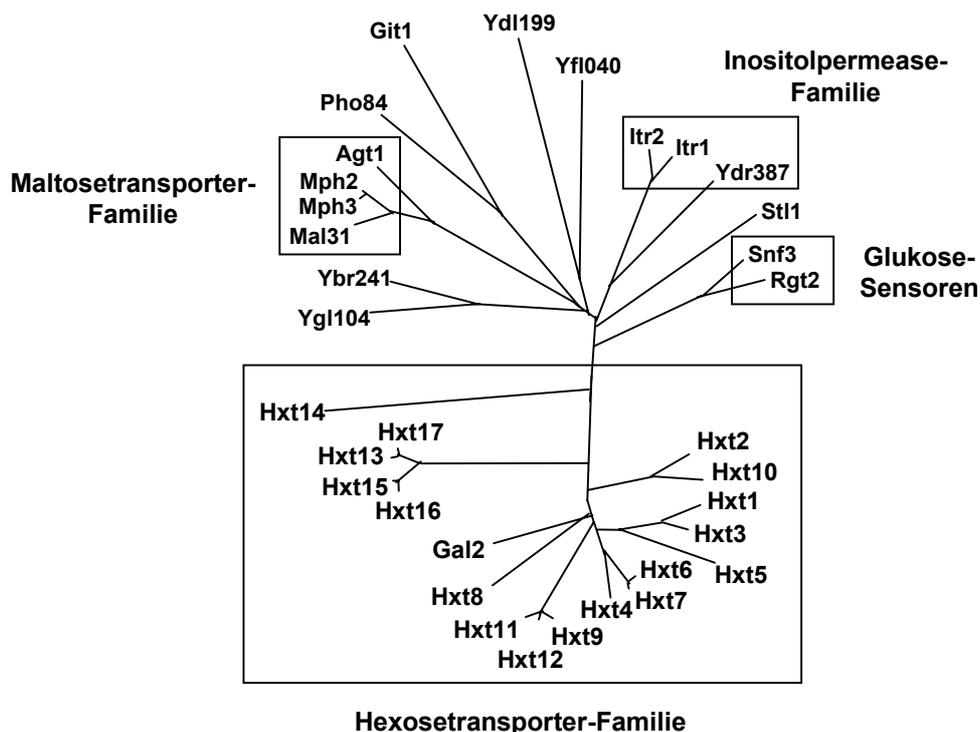


Abb. 1: Stammbaum der Zuckerpermease-Familie der Hefe, bestehend aus 34 Proteinen. 18 Proteine bilden die Unterfamilie der Hexosetransporter. Snf3 und Rgt2 wirken als Sensorproteine für niedrige bzw. hohe extrazelluläre Glukosekonzentrationen.

In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, daß Hxt1-Hxt4, Hxt6 und Hxt7 die metabolisch relevanten Hexosetransporter der Hefe darstellen und in der Lage sind, die Aufnahme von Glukose, Fruktose und Mannose zu katalysieren (Reifenberger *et al.*, 1997; Reifenberger *et al.*, 1995). Dabei ist die Transkription der korrespondierenden Gene eng an die Verfügbarkeit und Konzentration extra-

zellulärer Glukose gekoppelt und stellt den wichtigsten regulatorischen Mechanismus dar, um zu jeder Zeit die Ausstattung der Zelle mit den kinetisch am besten geeigneten Glukosetransportern zu gewährleisten (Boles und Hollenberg, 1997; Özcan und Johnston, 1999). Neben der transkriptionellen Kontrolle dienen auch posttranslationale Prozesse wie Inaktivierung von Glukosetransportern, Modulation der Affinität und unter Umständen auch Interaktionen zwischen verschiedenen Transportern der Adaptation der Zelle an die vorherrschende Konzentration der Glukose im Medium (Horak und Wolf, 1997; Krampe *et al.*, 1998; Riballo und Lagunas, 1994; Walsh *et al.*, 1994). Die Expression des nieder-affinen Glukosetransporters Hxt1 ($K_m = 100$ mM) wird nur durch hohe Glukosekonzentrationen induziert, wohingegen die Expression von Hxt3 ($K_m = 60$ mM) unabhängig von der Konzentration der Glukose erfolgt (Reifenberger *et al.*, 1997). Demgegenüber handelt es sich bei Hxt2, Hxt6 und Hxt7 um hoch-affine Transporter, die durch niedrige Glukosekonzentrationen induziert werden. Hxt6 und Hxt7 weisen einen K_m -Wert von 1-2 mM auf, während die Expression von Hxt2 in einer *hxt*-Nullmutante eine biphasische Kinetik hervorruft ($K_m = 1,5$ mM und $K_m = 60$ mM) (Reifenberger *et al.*, 1997). Unter Umständen wird die Affinität von Hxt2 in Abhängigkeit von der Konzentration der Glukose moduliert. Hxt4 besitzt eine intermediäre Affinität für Glukose ($K_m = 9$ mM) und wird ebenfalls durch geringe extrazelluläre Glukosekonzentration induziert. Im Gegensatz zu den genannten Transportproteinen ist über die Funktionen der anderen Hexosetransporter der Hefe, Hxt5 und Hxt8 bis Hxt17, bislang nur wenig bekannt (Boles und Hollenberg, 1997).

Glukose übt zwei wesentliche Effekte auf die Genexpression in *S. cerevisiae* aus: Die Expression vieler Gene, die für Proteine des respiratorischen Weges und der Glukoneogenese kodieren oder der Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen (z.B. Galaktose, Saccharose, Maltose) dienen, wird reprimiert. Dieser Mechanismus wird als Glukoserepression bezeichnet (Carlson, 1998; 1999; Gancedo, 1998; Trumbly, 1992). Auf der anderen Seite wird im Rahmen der Glukoseinduktion die Synthese von Proteinen stimuliert, die für die Metabolisierung der Glukose erforderlich sind, beispielsweise die Bildung von Hexosetransportern und glykolytischen Enzymen (Boles und Hollenberg, 1997; Özcan und Johnston, 1999).

1.1.1 Glukoseinduktion von Hexosetransportern der Hefe

Da auf hohen Glukosekonzentrationen wachsende Hefezellen den größten Anteil ihrer Energie aus der Fermentation beziehen, hierbei jedoch lediglich 2 Mol ATP pro Mol Glukose gewonnen werden, müssen die Zellen entsprechend große Mengen der Kohlenstoffquelle durch die Glykolyse schleusen. Um eine höhere glykolytische Kapazität zu erreichen, wird die Expression der meisten Glykolyseenzyme

und Hexosetransporter durch Glukose induziert (Müller *et al.*, 1995; Özcan und Johnston, 1995).

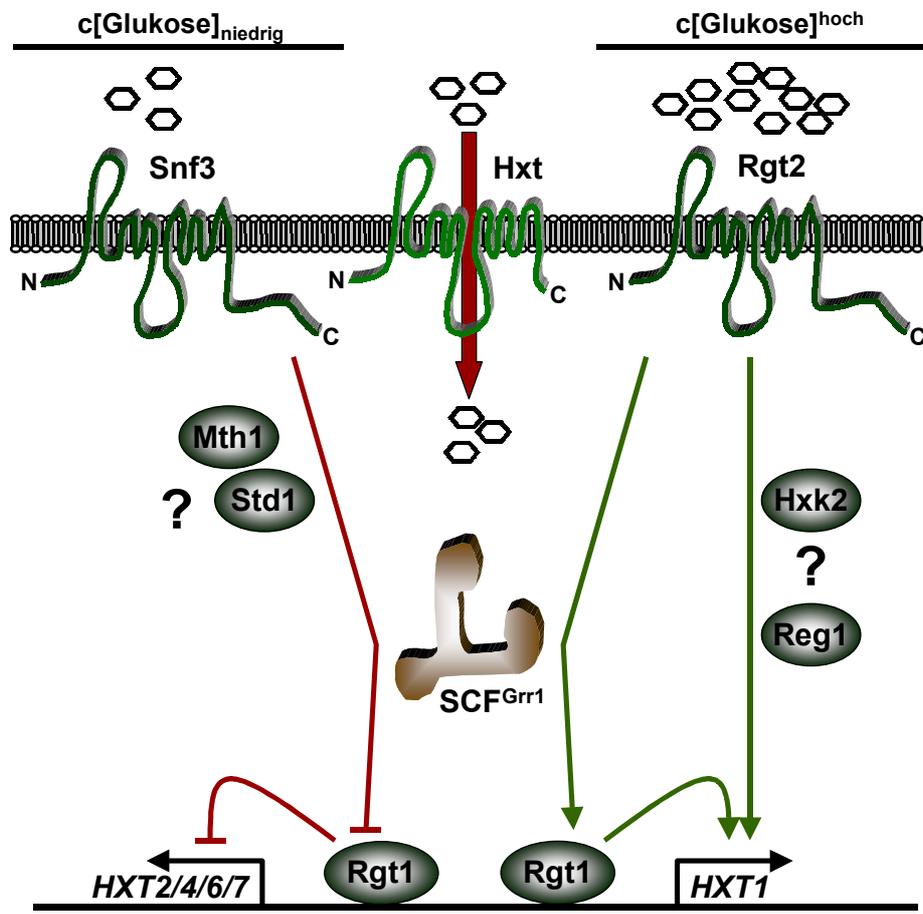


Abb. 2: Schematisches Modell der Snf3- und Rgt2-gesteuerten Glukoseinduktionssignale in Abhängigkeit von der extrazellulären Glukosekonzentration. In Abwesenheit von Glukose wird die Transkription der *HXT*-Gene durch den Repressor Rgt1 unterdrückt. Bei niedrigen Konzentrationen von Glukose wird von Snf3 ein intrazelluläres Signal erzeugt, das über den SCF^{Grr1}-Komplex transduziert wird und durch Inhibierung von Rgt1 die Expression der Gene *HXT1-4* und *HXT6-7* erlaubt. Die Proteine Mth1 und Std1 könnten hierbei eine modulierende Funktion ausüben. Bei hohen Glukosekonzentrationen steuert Rgt2 die SCF^{Grr1}-abhängige Konversion von Rgt1 in einen Transkriptionsaktivator für die Expression von *HXT1*. Die vollständige *HXT1*-Induktion erfordert zusätzlich einen bislang unbekanntem, Hxk2/Reg1-abhängigen Signalweg.

Die zentralen Bestandteile des Signaltransduktionsweges (Abb. 2) zur Induktion der *HXT*-Gene der Hefe sind (1) die Glukosesensoren Snf3 und Rgt2 in der Plasmamembran, die ein intrazelluläres Glukosesignal erzeugen, (2) der Transkriptionsrepressor Rgt1 und (3) der Multiproteinkomplex SCF^{Grr1}, der die Funktion des Repressors beeinflusst (Kruckeberg *et al.*, 1998; Özcan und Johnston, 1999). In Abwesenheit von Glukose bindet Rgt1 mit seinem C₆-Zink-Cluster Motiv (Cys₆ Zn₂) an die Promotoren der *HXT*-Gene und unterdrückt deren Expression, vermutlich durch Rekrutierung der generellen Repressoren Ssn6 und Tup1 an die

DNA (Özcan *et al.*, 1996). Wird extrazellulär wieder Glukose verfügbar, erzeugen die Glukosesensoren in Abhängigkeit von der Konzentration ein Signal, das zur Inaktivierung des Repressors Rgt1 durch den SCF^{Grr1}-Komplex führt (Özcan *et al.*, 1996). Die genaue Art des Glukosesignals sowie der Mechanismus der Signalübertragung ist bislang unklar. Obwohl Snf3 und Rgt2 hohe Ähnlichkeit zu der Hexosetransporterfamilie aufweisen, scheinen sie selbst nicht in der Lage zu sein, Glukose zu transportieren. Wahrscheinlicher ist eine Rezeptor-ähnliche Funktion. Die Bindung von Glukose an der Zelloberfläche könnte eine Konformationsänderung der beiden Proteine nach sich ziehen, die sich auf deren ungewöhnlich langen Carboxyterminus überträgt und auf diese Weise ein intrazelluläres Signal erzeugt (Marshall-Carlson *et al.*, 1990; Özcan *et al.*, 1998). Die mehr als 200 Aminosäuren umfassenden zytoplasmatischen Anhänge von Snf3 und Rgt2 sind wesentliche Merkmale, die beide Proteine von den anderen Hexosetransportern (C-Terminus bestehend aus rund 50 Aminosäuren) unterscheiden, und sind Voraussetzung für die Generierung eines Glukosesignals. Insbesondere konnte eine 26 Aminosäuren lange, nahezu identische Sequenz identifiziert werden (zweimal in Snf3, einmal in Rgt2), deren Anwesenheit für die Signalerzeugung essentiell ist. Unter Umständen könnten diese Motive den Interaktionspunkt für die nächste Komponente des Signaltransduktionsweges darstellen (Coons *et al.*, 1997; Marshall-Carlson *et al.*, 1990; Özcan *et al.*, 1998; Vagnoli *et al.*, 1998).

Die Ereignisse unterhalb der Glukose-Erkennung durch Snf3 und Rgt2 sind komplex und bislang wenig verstanden. In einem Snf3-abhängigen Weg wird bei geringen extrazellulären Glukosekonzentrationen die Repressorfunktion von Rgt1 inhibiert und führt zur transkriptionellen Derepression der Gene *HXT2* bis *HXT4*, *HXT6* und *HXT7* (Abb. 2), die für hoch- und intermediär-affine Transportproteine kodieren (Boles und Hollenberg, 1997; Özcan und Johnston, 1995). Dieser Schritt ist abhängig von der Aktivität des F-Box Proteins Grr1 als Teil des SCF^{Grr1}-Komplexes und scheint die Beteiligung von Ubiquitin oder eines Ubiquitin-verwandten Proteins zu umfassen (Kishi *et al.*, 1998; Li und Johnston, 1997). SCF-Komplexe bestehen aus den Gerüstkomponenten Skp1 und Cdc53, dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym Cdc34 sowie einem F-Box-Protein und wirken insgesamt als E3-Enzym (Ubiquitin-Ligase) im zellulären Proteindegradationssystem (Patton *et al.*, 1998). Die Gegenwart hoher Glukosekonzentrationen führt zur Stimulation von Rgt2 und des Rgt2-abhängigen Signalweges, der in der Expression des nieder-affinen Glukosetransporters Hxt1 resultiert (Abb. 2) (Özcan *et al.*, 1996). Auch dieser Weg ist abhängig von SCF^{Grr1}, jedoch wird hier der Repressor Rgt1 scheinbar in einen Transkriptionsaktivator konvertiert. Neben dem Rgt2-Rgt1-Signaltransduktionsweg existiert ein noch unbekannter weiterer, Hxk2/Reg1-

abhängiger Mechanismus, der für die volle Expression des *HXT1*-Gens erforderlich ist (Özcan *et al.*, 1996). Die Gene *MTH1* und *STD1* kodieren für zwei verwandte nukleäre Proteine, die die Expression einiger Gene als Antwort auf Glukose zu modulieren scheinen und in Two-Hybrid-Untersuchungen mit den carboxyterminalen Domänen von Snf3 und Rgt2 interagieren (Ganster *et al.*, 1993; Hubbard *et al.*, 1994; Lafuente *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 1999; Schulte *et al.*, 2000). Eine mögliche Aufgabe von Mth1 könnte in der Verknüpfung zweier Glukose-abhängiger Signalwege liegen, da das Protein einerseits einen negativen Effekt auf den Snf3-abhängigen Glukoseinduktionsweg ausübt, andererseits den Snf1-abhängigen Glukoserepressionsweg positiv beeinflusst (Schulte *et al.*, 2000). Jedoch sind die genauen Funktionen beider Proteine bislang unklar.

1.1.2 Glukoserepression und Derepression

Der Glukoserepressionsmechanismus der Genexpression setzt sich aus mehreren zentralen Komponenten zusammen, die ein komplexes regulatorisches Netzwerk bilden. Mig1, ein Zink-Finger Transkriptionsrepressor, bindet an die Promotoren vieler Glukose-reprimierter Gene und unterdrückt deren Transkription durch Rekrutierung der generellen Repressoren Ssn6 und Tup1 an die DNA (Ostling *et al.*, 1996; Treitel und Carlson, 1995). Die nukleäre Lokalisierung von Mig1 wird dabei durch die Serin-Threonin Proteinkinase Snf1 reguliert. In Gegenwart von Glukose ist diese Kinase inaktiv und unphosphoryliertes Mig1 bewegt sich in den Zellkern, wo es als Repressor wirkt. Ist Glukose limitierend, wird Mig1 durch die aktive Snf1-Kinase phosphoryliert, wieder in das Zytoplasma exportiert und infolgedessen werden die zuvor reprimierten Gene dereprimiert (De Vit *et al.*, 1997; Treitel *et al.*, 1998; Wilson *et al.*, 1996; Woods *et al.*, 1994). Die Proteinkinase Snf1 stellt die katalytische Untereinheit eines Komplexes aus mehreren Proteinen dar und ist unter anderem mit der regulatorischen Untereinheit Snf4 und drei Mitgliedern der Sip-Proteinfamilie assoziiert, die eine Gerüstfunktion ausüben (Carlson, 1999; Johnston, 1999). In Gegenwart hoher Glukosekonzentrationen wird die katalytische Domäne des Proteins durch die regulatorische Domäne gebunden und liegt in einer inaktiven, autoinhibierten Form vor. Als Reaktion auf Glukoselimitierung wird Snf1 durch eine bislang unbekannte Kinase phosphoryliert und die regulatorische Untereinheit Snf4 bindet an die regulatorische Domäne von Snf1. Hierdurch wird die katalytische Domäne freigegeben und der Komplex in eine offene, aktive Form überführt (Jiang und Carlson; 1996; Ludin *et al.*, 1998). Die Rückkehr in die geschlossene, inaktive Form wird durch Dephosphorylierung von Snf1 durch die Proteinphosphatase 1 (Glc7, PP1) gefördert, die durch ihre assoziierte regulatorische Untereinheit Reg1 an den Snf1-Komplex dirigiert wird (Sanz *et al.*, 2000; Tu und Carlson, 1995). Übereinstimmend mit einer Funktion

der PP1 bei der Überführung des Snf1-Komplexes in die inaktive Form als Reaktion auf Glukose findet sich eine verstärkte Interaktion von Reg1 mit Snf1 bei hohen Glukosekonzentrationen (Ludin *et al.*, 1998; Sanz *et al.*, 2000). Experimentelle Daten deuten darauf hin, daß die PP1 nicht nur negativ antagonistisch zu Snf1 wirkt, sondern auch für die Dephosphorylierung von phosphoryliertem Mig1 verantwortlich ist und somit den Import des Transkriptionsrepressors aus dem Zytoplasma zurück in den Zellkern ermöglicht (Treitel *et al.*, 1998).

Die Art des Glukosesignals, das die Aktivität der Snf1-Proteinkinase beeinflußt, ist bislang unbekannt. Zwar muß Glukose in die Zellen aufgenommen werden, um die Glukoserepression auszulösen, jedoch übt keiner der Haupt-Glukosetransporter eine Detektions- oder Signalfunktion aus (Reifenberger *et al.*, 1997). Andere Arbeiten deuten darauf hin, daß das Signal für die Glukoserepression während des glykolytischen Flusses im Rahmen des Metabolismus durch Änderungen im AMP:ATP-Verhältnis bei einsetzender Glukoselimitierung erzeugt wird, da dies mit der Aktivität der Snf1-Kinase korreliert (Wilson *et al.*, 1996). Dabei wird Snf1 zwar nicht wie das Säuger-Homolog, die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), direkt durch AMP stimuliert, jedoch existieren Hinweise auf die Existenz einer Snf1-Kinase-Kinase (Stapleton *et al.*, 1994; Wilson *et al.*, 1996; Woods *et al.*, 1994). Allerdings läßt sich die Korrelation von AMP:ATP-Verhältnis und Snf1-Aktivität unter glukoneogenischen Wachstumsbedingungen nicht aufrechterhalten, so daß dieser Mechanismus als alleiniger Auslöser eines Glukosesignals umstritten ist. Möglicherweise dient er eher der Adaptation an wechselnde Glukosekonzentrationen als der Signalerzeugung unter „steady-state“ Bedingungen (Gancedo, 1998). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, daß der Hexokinase 2 (Hxk2) eine wichtige Rolle in der Glukoserepression zukommt, da das Enzym sowohl Glukose im ersten Schritt der Glykolyse phosphoryliert, als auch (zum Teil über Snf1) die Glukoserepression reguliert (De Winde *et al.*, 1996; Randez-Gil *et al.*, 1998; Sanz *et al.*, 2000). Die Entdeckung von Teusink *et al.* (1998), daß Hefezellen signifikante Mengen intrazellulärer Glukose besitzen können, legt zudem die Möglichkeit nahe, daß auch die Glukose selbst als Signalmolekül fungieren könnte.

1.2 Die GLUT-Glukosetransporter der Säugetiere

Im Vergleich zu der für einen einzelligen Organismus wie *S. cerevisiae* überraschend umfangreichen Hexosetransporter-Familie zeichnen sich die Glukosetransporter der Säugetiere durch eine gewebespezifische Distribution und Regulation aus. Neben den aktiven Natrium-Glukose-Symportern der Darmepithelien SGLT1 und SGLT2 wurden bislang neun passive Glukosefaszilitatoren identifiziert, die der GLUT-Familie zugeordnet werden (Tab. 1): GLUT1 bis GLUT5 sowie GLUT7 bis GLUT10 (Baldwin, 1993; Brown, 2000; Doege *et al.*, 2000; 2000; Ibberson *et al.*, 2000; McVie-Wylie *et al.*, 2001; Mueckler, 1994; Phay *et al.*, 2000; Turk *et al.*, 1994; Waddell *et al.*, 1992; Walmsley *et al.*, 1998). Die Schlüsselfunktionen dieser Transporter umfassen die Glukoseaufnahme in verschiedene Gewebe, Speicherung in der Leber, Insulin-abhängige Aufnahme in Muskel- und Fettzellen, die Glukose-Detektion in pankreatischen β -Zellen sowie auch die Regulation des Blutzuckerspiegels (Mueckler, 1994; Thorens, 1996; Rea und James, 1997). Auf Proteinebene sind die bislang isolierten GLUT-Isoformen insgesamt zu rund 40% konserviert (Brown, 2000). Die meisten Zellen exprimieren eine Anzahl unterschiedlicher Glukosetransporter, deren Anteil in speziellen Geweben beträchtlich variiert. Eine Charakterisierung einzelner GLUT-Proteine wird dadurch stark erschwert und die kinetischen Eigenschaften einzelner Transporter konnten bislang nur durch Expression in heterologen Systemen wie z.B. *Xenopus*-Oozyten unter Verwendung nichtmetabolisierbarer Zucker-Analoga untersucht werden (Baldwin, 1993; Gould *et al.*, 1991).

1.2.1 Zwei verwandte Proteine mit unterschiedlicher Funktion, Lokalisierung und Regulation: GLUT1 und GLUT4

Die beiden prominentesten Vertreter der GLUT-Familie sind die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4. Obwohl beide Proteine in ihrer Aminosäuresequenz zu 65% identisch sind, bestehen grundlegende Unterschiede in ihrer Lokalisierung und Regulation. GLUT1 vermittelt vor allem den Glukosetransport in endo- und epitheliale Zellen, die Blut/Gewebe-Schranken bilden, sowie in Erythrozyten, wo GLUT1 mit einem Anteil von 6% das am stärksten vertretene Membranprotein darstellt (Baldwin, 1993). Da das Protein nahezu konstitutiv exprimiert wird und ubiquitär vorhanden ist, wird GLUT1 eine generelle Funktion als basalem Glukosetransporter zugeschrieben, der die Grundversorgung der Zellen mit Glukose gewährleistet. Der K_m -Wert für zero-trans Aufnahmemessungen von Glukose in menschliche Zellen durch GLUT1 bei physiologischer Temperatur (37°C) wurde mit 7 mM bestimmt und liegt damit dicht an der durchschnittlichen Blutzucker-Konzentration von 5 mM (Jacquez, 1984; Lowe und Walmsley, 1986).

Tab. 1: Übersicht der Eigenschaften und Verteilung von GLUT-Isoformen aus der Familie der Säugetier-Glukosetransporter

Transporter	Distribution	Biologische Rolle	Referenz
GLUT1	Ubiquitär, vor allem in Erythrozyten und Gehirn (Blut/Hirn-Schranke)	Genereller basaler Glukose-transport; Transport über die Blut/Hirn-Schranke	(Baldwin, 1993; Brown 2000; Muekler, 1994)
GLUT2	Leber, pankreatische β -Zellen, Niere, Dünndarm	Intestinale und renale Absorption; pankreatische und hepatische Kontrolle der Glukose-Homeostasis	(Baldwin, 1993; Brown 2000; Muekler, 1994)
GLUT3	Gehirn (Neuronen)	Aufnahme von Glukose in die Neuronen des Gehirns	(Baldwin, 1993; Brown 2000; Muekler, 1994)
GLUT4	Adipozyten, Skelettmuskelzellen, Herzmuskeln	Glukosetransport in Zellen Insulin-sensitiver Gewebe	(Baldwin, 1993; Brown 2000; Muekler, 1994)
GLUT5	Dünndarm-Schleimhaut	Fruktose-Transporter	(Baldwin, 1993; Brown 2000; Muekler, 1994)
GLUT6	Pseudogen	kein funktioneller Glukose-transporter	(Kayano <i>et al.</i> , 1990)
GLUT7	ER der Hepatozyten	Freisetzung von Zucker aus der Leber in den Blutstrom	(Baldwin, 1993; Waddell <i>et al.</i> , 1992)
GLUT8 (GLUTX1)	Hoden; geringere Anteile auch in Muskelzellen und Gehirn	Oberflächenlokalisierung in Hoden evtl. hormonell reguliert (ähnlich GLUT4)	(Doege <i>et al.</i> , 2000; Ibberson <i>et al.</i> , 2000)
GLUT9	Gehirn, Leukozyten, Niere, Leber	Funktion bislang unbekannt	(Doege <i>et al.</i> , 2000; Phay <i>et al.</i> , 2000)
GLUT10	Leber, Pankreas	Funktion bislang unbekannt	(McVie-Wylie <i>et al.</i> , 2001)

Im Gegensatz dazu findet sich der Glukosetransporter GLUT4 ausschließlich in Geweben wie Fett, Skelett- und Herzmuskeln, wo der Zuckertransport hormonell reguliert wird (Birnbbaum, 1989; James *et al.*, 1989). In diesen Insulin-sensitiven Zellen ist die Kontrolle der Verteilung von GLUT4 in intrazelluläre Kompartimente oder zur Plasmamembran der wesentliche Mechanismus für die Regulation der Glukoseaufnahme. Im basalen Zustand befinden sich 99% der GLUT4-Transporter in einem intrazellulären Pool spezifischer, tubovesikulärer Membranstrukturen. Als Reaktion auf Insulinstimulation werden diese akkumulierten GLUT4-Vesikel selektiv mobilisiert, zur Plasmamembran lokalisiert und GLUT4 kann die Aufnahme von Glukose in die Zellen katalysieren (Holman und Kasuga, 1997; Pessin *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1991; Yang und Holman, 1993). GLUT1 wird zwar ebenfalls in diesen Insulin-sensitiven Geweben exprimiert und die zelluläre Verteilung des Proteins wird durch Insulin beeinflusst, jedoch zu einem wesentlich geringeren Anteil im Vergleich zu GLUT4. Es konnte gezeigt werden, daß GLUT4 für eine schnelle ($t_{1/2} < 10$ min) und 40fache Erhöhung der Glukoseauf-

nahme in Adipozyten und Muskelzellen nach Insulinstimulation verantwortlich ist (Ferrannini *et al.*, 1985). Dies läßt sich auf eine stark erhöhte Exozytose der GLUT4-Speichervesikeln bei gleichzeitig leicht verringerter Endozytoserate zurückführen, während die Exozytose von GLUT1 lediglich gering erhöht ist (Satoh *et al.*, 1993; Yang und Holman, 1993). In „steady-state“-Zellen, basalen wie Insulin-stimulierten, findet ein konstitutives, langsames Recycling beider Transporter zwischen Plasmamembran und Endosomen bzw. dem intrazellulären GLUT4-Speicherkompartiment statt (Abb. 3) (Pessin *et al.*, 1999; Rea und James, 1997; Yang und Holman, 1993).

Die Frage nach der Natur der spezifischen GLUT4-Vesikel und den Signalen, die zu einer Abtrennung und Sortierung von GLUT4 in diese Kompartimente führen, läßt sich bislang nur teilweise beantworten. Neben dem GLUT4-Protein konnten als weitere Komponenten der Vesikel unter anderem die PI3-Kinase, v-SNAREs, die Aminopeptidase VP165 (IRAP), die Rezeptoren für ILGF-II / Mannose-6-Phosphat und Transferrin (TfR), das Protein Sortilin sowie kleine GTP-bindende Proteine der Rab- und Arf-Familie identifiziert werden (Baldwin, 1993; Kandror und Pilch, 1998). Eine mögliche Funktion der heterotrimeren G-Proteine und der PI3-Kinase könnte in der Modulierung des Insulin-stimulierten Glukosetransports liegen, indem sie den Fusionsprozeß von angedockten GLUT4-Vesikeln mit der Plasmamembran und somit den Anteil von Oberflächen-exponiertem GLUT4 regulieren (Ferrara und Cushman, 1999; Holman und Kasuga, 1997; Satoh *et al.*, 1993). Untersuchungen der Struktur von GLUT4 anhand von chimären Proteinen und Mutageneseexperimenten weisen auf Signale im N- und C-Terminus des Proteins hin, die an der Endozytose, der intrazellulären Sortierung in das spezifische Membrankompartiment sowie an der Retention von GLUT4 innerhalb dieses Kompartiments in Abwesenheit von Insulin beteiligt zu sein scheinen. Neben einem FQQI-Motiv im aminoterminalen Bereich scheint besonders dem Carboxyterminus des Proteins eine besondere Bedeutung zuzukommen. Hier konnten wichtige Signale wie z.B. ein Di-Leucin mit vorgeschalteter Glu-Gln-Glu-Sequenz sowie ein Pro-Asp-Glu-Asn-Asp-Motiv identifiziert werden, die an der Regulation der GLUT4-Verteilung durch das *trans*-Golgi-Netzwerk oder der Kontrolle des Proteinumsatzes durch den kontinuierlichen endosomalen Recycling-Weg beteiligt sind (Cope *et al.*, 2000; Corvera *et al.*, 1994; Martinez-Arca *et al.*, 2000; Melvin *et al.*, 1999; Palacios *et al.*, 2001; Piper *et al.*, 1993; Shewan *et al.*, 2000).

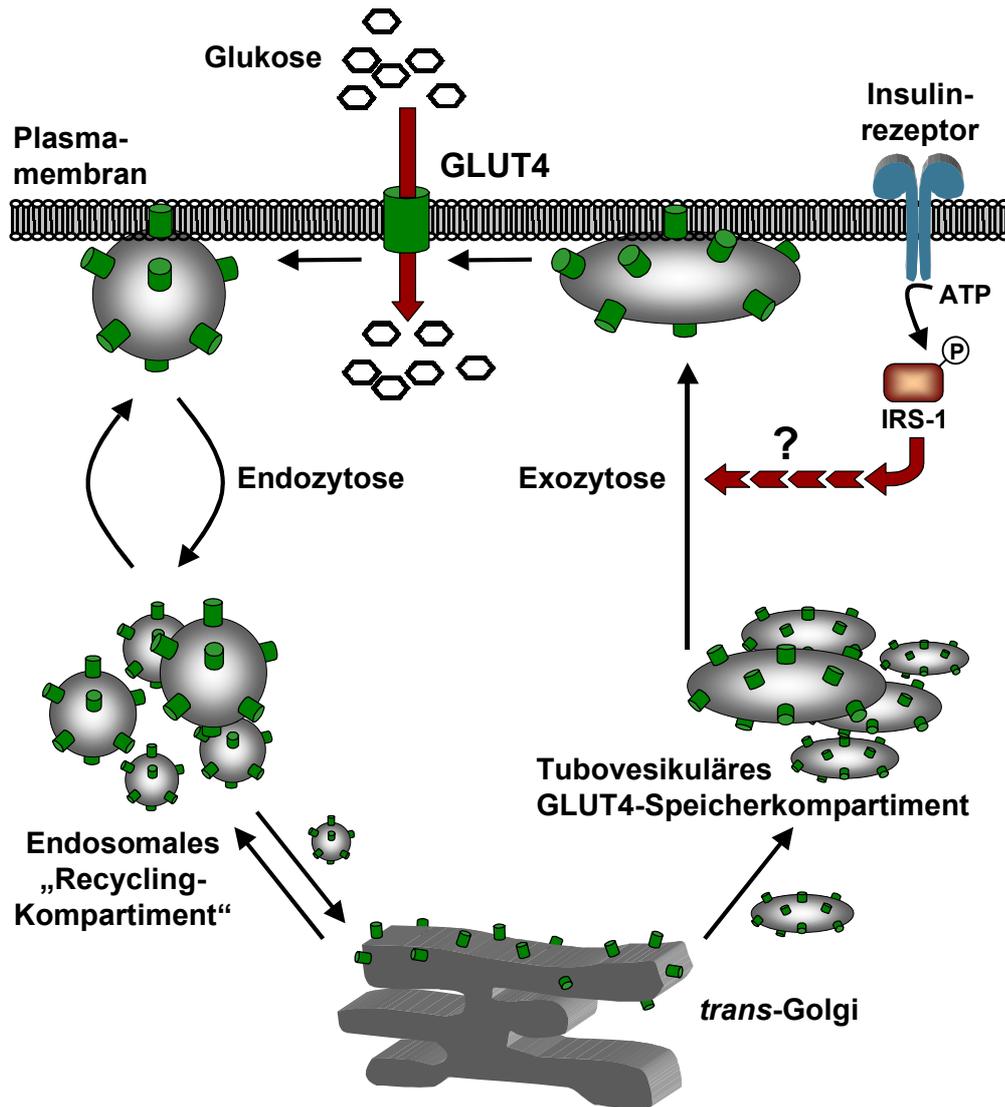


Abb. 3: Modell des Insulin-stimulierten Glukosetransports in Fett- und Muskelzellen. Proteininterne Signalmotive sind für das konstitutive Recycling von GLUT4 zwischen Plasmamembran und Endosomen erforderlich, wie auch für die gezielte Sortierung des Glukosetransporters in spezifische, Insulin-sensitive, tubovesikuläre Membranstrukturen. Infolge extrazellulärer Bindung von Insulin an den tetrameren $\alpha 2\beta 2$ -Insulinrezeptor wird über Autophosphorylierung dessen Tyrosinkinase-Aktivität stimuliert. Die Phosphorylierung intrazellulärer Proteinsubstrate wie IRS-1 durch den Rezeptor initiiert eine Proteinkinasekaskade, die in der Stimulation der Exozytose von GLUT4-Vesikeln zur Plasmamembran und einer Erhöhung der Glukosetransportrate resultiert.

Für eine selektive Sortierung von GLUT4 in die spezialisierten Membrankompartimente und deren Lokalisierung zur Plasmamembran nach Insulinstimulation ist zudem ein intaktes mikrotubuläres Zytoskelett erforderlich, wobei jüngst das Filamentprotein Vimentin und das Mikrotubulus-Protein α -Tubulin als weitere Komponenten der GLUT4-haltigen Membranfraktionen identifiziert werden konnten (Fletcher *et al.*, 2000; Guilherme *et al.*, 2000). Die mathematische Analyse der Wanderungs-Kinetiken von photomarkiertem GLUT1 und GLUT4 in basalen Zel-

len und Zellen nach Stimulation mit Insulin sowie die Untersuchung von GLUT4-Versionen mit Mutationen in den geschilderten Signalmotiven führte zur Ableitung eines „Drei-Pool-Modell“ der intrazellulären Sortierung von GLUT4 (Abb. 3) (Araki *et al.*, 1996; Holman *et al.*, 1994; Melvin *et al.*, 1999).

1.2.2 Erkrankungen im Zusammenhang mit Glukosetransportdefekten

Primäre Defekte im Glukosetransport sind scheinbar äußerst selten. Defizienzen wurden bislang nur für SGLT1 (Glukose/Galaktose-Mangelabsorption), SGLT2 (renale Glukosurie), GLUT1 (Kleinwüchsigkeit und Entwicklungsverzögerungen) und GLUT2 (Fanconi-Bickel-Syndrom: Leber- und Nierendefekte aufgrund von Glykogenhyperakkumulation) beschrieben (Brown, 2000). Jedoch ist besonders der Insulin-regulierte Glukosetransporter GLUT4 in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Viele Untersuchungen deuten auf eine mögliche Rolle von GLUT4 bei der Entwicklung von Insulin-Resistenz hin, die sich in TypII-Diabetes, also der nicht-Insulin-abhängigen Diabetes mellitus (NIDDM), manifestieren. Unter dieser Krankheit leiden weltweit etwa 5% der Gesamtbevölkerung (rund 160 Millionen Patienten), wodurch Diabetes eines der größten Gesundheitsprobleme unserer Zeit darstellt. Nach einer Studie der Firma „SmithKline Beecham Pharma“ belaufen sich die Kosten des TypII-Diabetes allein in Deutschland jährlich auf rund 31,4 Milliarden DM. Untersuchungen an NIDDM-Patienten und Tiermodellen lieferten Hinweise auf mögliche Ursachen wie reduzierte Expression von GLUT4, eine Beeinträchtigung der Glukosetransportaktivität und Defekte bei der Translokation von GLUT4-Vesikeln an die Plasmamembran (Eriksson *et al.*, 1992; Garvey *et al.*, 1989; 1991). Jedoch zeigen diese Studien, daß sich keine einfache Korrelation zwischen GLUT4-Expression und Insulin-Resistenz herstellen läßt, sondern vielmehr unterschiedliche Faktoren zum Tragen kommen. Da bislang weder Mutationen des humanen GLUT4-Gens identifiziert werden konnten, die zu einer Fehlfunktion des GLUT4-Proteins führen, noch Beweise für einen Zusammenhang zwischen spezifischem GLUT4-Polymorphismus und NIDMM gefunden wurden, läßt sich die biologische Rolle von GLUT4 im Menschen nicht durch einfache Analyse der Konsequenzen einer GLUT4-Defizienz studieren (Bjorbaek *et al.*, 1994; Lesage *et al.*, 1997). Stattdessen ist man auf die Verwendung aufwendiger Modellsysteme wie z.B. transgener Mäuse angewiesen (Katz *et al.*, 1995; 1996).

1.2.3 Heterologe Expression von Transportproteinen in Hefe

Die Entwicklung therapeutischer Maßnahmen für die Behandlung von NIDDM-Patienten erfordert das umfassende Verständnis der generellen Mechanismen des Glukosetransports und der biologischen Eigenschaften einzelner Transporter. Die systematische Sequenzierung von Genomen komplexer Organismen (z.B.

Arabidopsis thaliana, bestimmte Parasiten, Mensch) förderte eine große Anzahl von Genen zutage, die wahrscheinlich für Membrantransporter kodieren. Allerdings werden solche Proteine oft nur aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu bekannten Transportproteinen dieser Kategorie zugerechnet. Da Membranproteine jedoch eine wichtige Rolle als Kanäle, Pumpen oder Carrier in der Physiologie der Zelle spielen, ist das Wissen um deren biochemische Eigenschaften (Substratspezifitäten, kinetische Eigenschaften für den Transport bekannter Substrate etc.) sowohl von wissenschaftlicher als auch von industrieller Bedeutung. Beispielsweise beruhen viele genetisch bedingte Krankheiten auf einer Fehlfunktion von Membrantransportsystemen. Darüberhinaus eignen sich Transportproteine aufgrund ihrer Lokalisierung an der Zelloberfläche ausgezeichnet als Angriffspunkte für die Entwicklung neuer therapeutischer Agenzien, wie das Beispiel einiger Antipsychotika und Antiepileptika illustriert, die auf Transporter von Neurotransmittern wie GABA, Noradrenalin oder Serotonin wirken (Iversen, 2000). Bei der Suche nach therapeutischen Substanzen gegen parasitische Protozoen (z.B. *Plasmodium*, *Trypanosoma*) oder Pilze (z.B. *Candida albicans*) scheinen Transporter für essentielle Metabolite (z.B. für D-Glukose, Aminosäuren, Nukleoside) in der Plasmamembran des pathogenen Organismus ein vielversprechendes Ziel zu sein (Barrett *et al.*, 1999).

Die möglichst schnelle Nutzung der neuen Informationen aus den unterschiedlichen Genomen erfordert biologische Systeme, in denen sich jedes Transportprotein individuell exprimieren lässt, sich dessen biochemische und pharmakologische Eigenschaften durch einfache Untersuchungen studieren lassen und die die Entwicklung von schnellen Tests erlauben, die der Identifizierung von spezifischen Agonisten oder Antagonisten dieser Proteine mit Molekülen aus „chemischen Büchereien“ dienen. Die Hefe *S. cerevisiae* eignet sich aus vielerlei Gründen als ein solches System: für die Hefe sprechen ihre einfache und kostengünstige Handhabung, die leichte Manipulierbarkeit des relativ kleinen, haploiden Genoms ($1,4 \times 10^7$ bp), die bekannte Sequenz des Genoms und ihre Eignung für automatisierte „high-throughput screening“ (HTS) Anwendungen. Eine große Anzahl verfügbarer Mutanten mit Defizienzen im Transport von anorganischen Ionen und Metaboliten (Zucker, Aminosäuren, Lipide etc.) bietet sich für die Expression und Charakterisierung heterologer Proteine anhand von Komplementationstests an und durch die relativ einfache Herstellung von Gendelektionen kann die Hintergrundtransportaktivität oftmals unterdrückt oder reduziert werden. Zudem lassen sich viele grundlegende Mechanismen der Wachstumskontrolle und des Metabolismus von *S. cerevisiae* auch auf Zellen höherer Eukaryonten übertragen.

Bislang konnten nur wenige menschliche Transporter und einige Transporter von Parasiten funktionell in der Hefe exprimiert werden. In der Vergangenheit stellte sich heraus, daß viele heterologe Membrantransporter wahrscheinlich aufgrund von Fehlfaltung inaktiv sind und/oder nicht an die Zelloberfläche lokalisiert werden, sondern in Kompartimenten des sekretorischen Weges (ER, Golgi, sekretorische Vesikel) zurückgehalten werden. Aus diesem Grund ist es von vorrangigem Interesse, Faktoren der Hefe zu identifizieren, die in die Mechanismen des Membran-Lokalisierungsapparates involviert sind, mit ihm interferieren oder die funktionelle Expression heterologer Transporter limitieren. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte daher mit Hinblick auf die Untersuchung heterologer Glukosetransporter anderer Organismen in *S. cerevisiae* durch Verwendung molekular-genetischer Methoden zunächst die endogene Zuckertransporterfamilie der Hefe näher analysiert werden, um diesen Ascomyceten im Anschluß daran als neues, alternatives Expressionssystem für die Charakterisierung fremder Zuckertransportproteine zu etablieren. Neben der Option, die kinetischen Eigenschaften heterologer Hexosetransporter mit vergleichsweise geringem Aufwand und (in entsprechenden Mutantenstämmen) unbeeinflusst von endogenen Transportproteinen untersuchen zu können, bietet *S. cerevisiae* eine einzigartige Möglichkeit, durch Mutageneseexperimente und Suche nach spontanen Mutanten spezielle Glukosetransporter gezielt manipulieren und exprimieren zu können. Desweiteren sollten hierdurch Faktoren identifiziert werden, die im Rahmen biotechnologischer Anwendungen von Hefe, wie z.B. in der Produktion fremder Membranproteine, unter Umständen einen generellen, negativen Einfluß auf deren Funktionalität (Faltungszustand, Retention in sekretorischen Kompartimenten, s.o.) ausüben.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Stämme und Medien

2.1.1 Bakterienstämme

Tab. 2: *Escherichia coli* (*E. coli*)

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
DH5aF'	<i>F'</i> , $\Phi 80dlacZ\Delta M15$, $\Delta(lacZYA-argF)$, U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> ($r_k^- m_k^+$), <i>supE44</i> , λ^- , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Gibco BRL, Gaithersburg/MD, USA
DH10B	<i>F'</i> , <i>mcrA</i> Δ -(<i>mrr hsdRMS-mcrBC</i>), $\Phi 80dlacZ\Delta M15$, $\Delta lacX74$, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>ara</i> Δ 139, $\Delta(ara, leu)$ 7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , λ^- , <i>rpsL</i> , <i>end A1</i> , <i>nupG</i>	Gibco BRL, Gaithersburg/MD, USA
SURE	<i>e14</i> (<i>McrA</i> ⁻), $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 171, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> , <i>recB</i> , <i>recJ</i> , <i>sbcC</i> , <i>umuC::Tn5</i> (<i>Kan</i> ^r), <i>uvrC</i> [<i>F'</i> <i>proAB lacI</i> ^q Φ 80 Δ M15 <i>Tn10</i> (<i>Tet</i> ^r)]	Stratagene

2.1.2 Medien und Anzucht von *E. coli*

Vollmedium (LB): 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, pH 7,5

Feste Nährmedien wurden durch Zusatz von 1,8% Agar hergestellt, die Anzucht erfolgte bei 37°C. Für die Selektion auf eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 40 µg/ml Ampicillin zugesetzt.

Zur Farbreaktion bei Komplementation der α -Domäne der β -Galaktosidase wurden 100 µl einer IPTG/X-Gal Stammlösung auf den Agarplatten ausplattiert (10 mg/ml X-Gal; 2,4 mg/ml IPTG in DMF).

2.1.3 Hefestämme

Tab. 3: *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
<i>cdc25-2</i>	<i>MATα cdc25-2 ura3 lys2 leu2 trp1 hisΔ200 ade2-101</i>	(Aronheim <i>et al.</i> , 1997)
CEN.PK2-1C (= VW1A)	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	K.-D. Entian
CEN.PK141	<i>MATα LEU2 URA3 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i> <i>MATα leu2-3,112 ura3-52 TRP1 HIS3 MAL2-8^C SUC2</i>	K.-D. Entian
EBY.VW202	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 his3-Δ1 trp1-289 Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δsuc2 leu2::128A2SuSy MAL2-8^C</i>	(Hermesdorf <i>et al.</i> , 2001)
EBY109A	<i>MATα leu1</i>	E. Boles, Düsseldorf
EBY109B	<i>MATα leu1</i>	E. Boles, Düsseldorf
PJ69-4A	<i>MATα trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	(James <i>et al.</i> , 1996)
W303	<i>MATα/α ura3-1/ura3-1 leu2-3,112/ leu2-3,112 trp1-1/trp1-1 his3-11/his3-11 ade2-1/ade2-1 can1-100/can1-100</i>	E. Boles, Düsseldorf

Tab. 4: Stämme von *S.cerevisiae*, die im Rahmen dieser Arbeit konstruiert wurden.

Stamm	Genotyp	Referenz
EBY.18ga	<i>MATα Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	(Wieczorke <i>et al.</i> , 1999)
EBY.F4-1	<i>MATα Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 fgy41 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	(Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
EBY.S7	<i>MATα Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	(Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
EBY.S7d	<i>MATα/α Δhxt1-17/Δhxt1-17 Δgal2/Δgal2 Δagt1/Δagt1 Δstl1/Δstl1 fgy1-1/FGY1 leu2-3,112/leu2-3,112 ura3-52/ ura3-52 trp1-289/ trp1-289 his3-Δ1/his3-Δ1 MAL2-8^C/MAL2-8^C SUC2/SUC2</i>	(Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
EBY.VW4000	<i>MATα Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	(Wieczorke <i>et al.</i> , 1999)
RWY13	<i>MATα agt1::lacZ::kanMX leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	(Plourde-Owobi <i>et al.</i> , 1999)
RWY94D	<i>MATα/α fgy1::kanMX/FGY1 leu2-3,112/LEU2 ura3-52/ URA3 trp1-289/TRP1 his3-Δ1/HIS3 MAL2-8^C/MAL2-8^C SUC2/SUC2</i>	diese Arbeit
RWY95D	<i>MATα/α fgy1::kanMX/FGY1 ura3-1/ura3-1 leu2-3,112/ leu2-3,112 trp1-1/trp1-1 his3-11/his3-11 ade2-1/ade2-1 can1-100/can1-100</i>	diese Arbeit

RWY95-1A und -1C	haploide Stämme nach Sporulation von RWY95D Genotyp: <i>fgy1::kanMX</i>	diese Arbeit
RWY95-1B und -1D	haploide Stämme nach Sporulation von RWY95D Genotyp: <i>FGY1</i>	diese Arbeit
RWY96	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1Δ659::kanMX leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	diese Arbeit

2.1.4 Medien und Anzucht von Hefestämmen

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

Synthetisches Minimalmedium (YNB): 0,67% Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, pH 6,3, Aminosäure/Nukleobase-Lösung, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegeben Konzentration.

Konzentration der Aminosäuren und Nukleobasen im Minimalmedium (nach Zimmermann, 1975):

Adenin (0,08 mM), Arginin (0,22 mM), Histidin (0,25 mM), Isoleucin (0,44 mM), Leucin (0,44 mM), Lysin (0,35 mM), Methionin (0,26 mM), Phenylalanin (0,29 mM), Tryptophan (0,19 mM), Threonin (0,48 mM), Tyrosin (0,34 mM), Uracil (0,44 mM), Valin (0,49 mM).

Als Kohlenstoffquelle wurden Glukose, Maltose, Saccharose, Fruktose und Ethanol verwendet. Saccharose- und Raffinose-Stammlösungen wurden sterilfiltriert, die anderen Kohlenstoffquellen autoklaviert. Feste Nährböden enthielten zusätzlich 1,8% Agar. Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen wurde auf die Zugabe der entsprechenden Aminosäuren bzw. Uracil verzichtet. Für die Selektion auf Verlust eines Plasmids mit *URA3*-Marker (*ura⁻*-Zellen) wurden YNB-Agarplatten benutzt, die neben 0,44 mM Uracil zusätzlich 1 mg/ml 5-FOA enthielten (Boeke *et al.*, 1984). Die Selektion auf Geneticinresistenz wurde auf Vollmediumsplatten mit 200 µg/ml G418 durchgeführt.

Die Anzucht der Hefezellen erfolgte bei 30°C. Temperatursensitive Stämme wurden zunächst bei einer permissiven Temperatur von 25°C angezogen und darauffolgend bei der restriktiven Temperatur von 37°C inkubiert.

2.2 Plasmide

Tab. 5: Verwendete Plasmide

Plasmid	Quelle/Referenz	Beschreibung
pTV3e	(Kasahara und Kasahara, 1996)	2 μ -Vektor mit <i>TRP1</i> -Selektionsmarker
GLUT1-pTV3	(Kasahara und Kasahara, 1996)	GLUT1 der Ratte hinter dem <i>GAL2</i> -Promotor und vor dem <i>GAL2</i> -Terminator der Hefe in pTV3e
GLUT4-pTV3	(Kasahara und Kasahara, 1997)	GLUT4 der Ratte hinter dem <i>GAL2</i> -Promotor und vor dem <i>GAL2</i> -Terminator der Hefe in pTV3e
p426AGT1	(Wieczorke <i>et al.</i> , 1999)	<i>AGT1</i> kloniert in p426MET25
p426HXT7-6His	(Dlugai, 1999)	2 μ -Vektor zur Herstellung von Fusionsproteinen mit 6xHis-Epitop; <i>URA3</i> -Selektionsmarker, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
p426MET25	(Mumberg <i>et al.</i> , 1994)	2 μ -Expressionsvektor mit <i>URA3</i> Selektionsmarker, <i>MET25</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
p426MET25-GFP	J. Makuc, Düsseldorf	2 μ -Expressionsvektor zur Fusion von Proteinen mit GFP; <i>URA3</i> -Selektionsmarker, <i>MET25</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
p426MPH2	(Wieczorke <i>et al.</i> , 1999)	<i>MPH2</i> kloniert in p426MET25
p426MPH3	(Wieczorke <i>et al.</i> , 1999)	<i>MPH3</i> kloniert in p426MET25
p426STL1	(Wieczorke <i>et al.</i> , 1999)	<i>STL1</i> kloniert in p426MET25
pGEM4Z-hsGLUT1	H. Al Hasani, Köln	DNA-Vorlage zur Amplifizierung von menschlichem GLUT1
pGEM4Z-hsGLUT4	H. Al Hasani, Köln	DNA-Vorlage zur Amplifizierung von menschlichem GLUT4
pSH47	(Güldener <i>et al.</i> , 1996)	Cre-Rekombinase hinter dem <i>GAL2</i> -Promotor der Hefe; <i>URA3</i> -Selektionsmarker
pUG6	(Güldener <i>et al.</i> , 1996)	DNA-Vorlage für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Deletion von Genen mit dem <i>kan^R</i> -Selektionsmarker
pUG6-lacZ	(Boles <i>et al.</i> , 1998)	DNA-Vorlage für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Deletion von Genen mit dem <i>lacZ</i> -Gen und <i>kan^R</i> -Selektionsmarker
YEplac4H7	(Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)	2 μ -Expressionsvektor; <i>URA3</i> -Selektionsmarker, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
YCplac33	(Gietz und Sugino, 1988)	CEN/ARS-Vektor mit <i>URA3</i> -Selektionsmarker
YEplac112	(Gietz und Sugino, 1988)	2 μ -Vektor mit <i>TRP1</i> -Selektionsmarker
YEplac181	(Gietz und Sugino, 1988)	2 μ -Vektor mit <i>LEU2</i> -Selektionsmarker
YEplac195	(Gietz und Sugino, 1988)	2 μ -Vektor mit <i>URA3</i> -Selektionsmarker
pYES2	Invitrogen Corp.	2 μ -Expressionsvektor; <i>URA3</i> -Selektionsmarker, <i>GAL1</i> -Promotor, <i>CYC1</i> -Terminator

pYES2-5'Sos	(Aronheim <i>et al.</i> , 1997)	3 kb DNA-Fragment von hSOS in pYES2
pGBDU-C1	(James <i>et al.</i> , 1996)	Klonierungsvektor für die Fusion von Proteinen mit der Gal4-DNA-Bindedomäne; <i>URA3</i> -Marker, <i>ADH1</i> -Promotor und Terminator
pSE1111	(Fields und Song, 1989)	<i>GAL4-AD-SNF4</i> -Fusion im Two-Hybrid Vektor pACT1
pSE1112	(Fields und Song, 1989)	<i>GAL4-BD-SNF1</i> -Fusion im Two-Hybrid Vektor pAS1
YCp50	E. Boles, Düsseldorf	Plasmid für die Expression der HO-Endonuklease der Hefe in einem <i>URA3</i> -Vektor
YCpHXT2	(Wieczorke, 1998)	<i>HXT2</i> -Gen der Hefe in YCplac33
YCpHXT7	(Wieczorke, 1998)	<i>HXT7</i> -Gen der Hefe in YCplac33

Tab. 6: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide.

Plasmid	Beschreibung/Referenz
pGBDU-FGY1c	Fusion des <i>FGY1</i> -C-Terminus mit der DNA-Bindedomäne von <i>GAL4</i> in pGBDU-C1
pRW7S-7	Im Rahmen der Komplementation von <i>fgy1-1</i> aus einer Genbank isoliertes Plasmid; <i>LEU2</i> -Selektionsmarker
pRW7S-T1-19	Im Rahmen der Komplementation von <i>fgy1-1</i> aus einer Genbank isoliertes Plasmid; <i>URA3</i> -Selektionsmarker
pRWMCS1, 4, 6, 8 und 11	Multicopy-Suppressorplasmide des Wachstumsdefekts der <i>fgy1</i> -Deletionsmutante RWY95-1A auf Maltosemedium
pTV-HXT2p-GLUT1 ^{V69M}	Mutagenisiertes GLUT1 in YEpH2-rGLUT1 (Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
pTV-HXT2p-GLUT1 ^{V69T}	Mutagenisiertes GLUT1 in YEpH2-rGLUT1 (Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
pTV-HXT2p-GLUT1 ^{V69F}	Mutagenisiertes GLUT1 in YEpH2-rGLUT1 (Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
pTV-HXT2p-GLUT1 ^{A70M}	Mutagenisiertes GLUT1 in YEpH2-rGLUT1 (Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
pTV-HXT2p-GLUT1 ^{I71M}	Mutagenisiertes GLUT1 in YEpH2-rGLUT1 (Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
YCpFGY1	<i>FGY1</i> -Gen hinter seinem endogenen Promotor in YCplac33
YCpFGY1-1	<i>fgy1-1</i> -Gen hinter seinem endogenen Promotor in YCplac33
YEp4H7-hsGLUT1	GLUT1 des Menschen in YEp4H7 (Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
YEp4H7-hsGLUT4	GLUT4 des Menschen in YEp4H7 (Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
YEpFGY1 (YEpYMR212)	<i>FGY1</i> -Gen hinter seinem endogenen Promotor in YEplac195
YEpFGY1-1	<i>fgy1-1</i> -Gen hinter seinem endogenen Promotor in YEplac195
YEpFGY1c-HIS	C-Terminus von <i>FGY1</i> ab der kodierten Aminosäure T ₆₆₀ mit 5'-terminalem 6xHis-Epitop in p426HXT7-6HIS
YEpFGY1-D329A-GFP	Mutagenisiertes Fgy1-GFP mit Austausch von Aspartat ₃₂₉ gegen Alanin
YEpFGY1-GFP	Fusion von <i>FGY1</i> mit <i>GFP</i> in p426MET25-GFP

YE _p FGY1-hSOS	Fusion von <i>FGY1</i> mit SOS durch Austausch des <i>GFP</i> -Gens aus YE _p FGY1-GFP gegen SOS
YE _p H2-rGLUT1	GLUT1 der Ratte hinter dem <i>HXT2</i> -Promotor in 2 μ -Vektor mit <i>TRP1</i> -Selektionsmarker und <i>GAL2</i> -Terminator (Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
YE _p H2-rGLUT4	GLUT4 der Ratte hinter dem <i>HXT2</i> -Promotor in 2 μ -Vektor mit <i>TRP1</i> -Selektionsmarker und <i>GAL2</i> -Terminator (Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
YE _p H2-hsGLUT4	GLUT4 des Menschen, konstruiert durch Austausch des GLUT1 aus YE _p H2-rGLUT1 gegen menschliches GLUT4 (Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
YE _p MyrFgy1c	<i>FGY1</i> -C-Terminus in p426MET25 fusioniert mit Myristoylierungssignal
YE _p GLUT1a	GLUT1 der Ratte im 2 μ -Vektor YE _p lac195 als <i>Xba</i> I-Fragment aus YE _p H2-rGLUT1 (<i>HXT2</i> -Promotor, <i>GAL2</i> -Terminator)
YE _p rGLUT1-GFP	GLUT1 der Ratte als GFP-Fusion in p426MET25-GFP (Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
YE _p rGLUT4-GFP	GLUT4 der Ratte als GFP-Fusion in p426MET25-GFP (Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
YE _p rGLUT1-hSOS	GLUT1 der Ratte, N-terminal mit dem menschlichen hSOS fusioniert (Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
YE _p YMR211	<i>YMR211</i> mit Promotor- und Terminationsbereich in YE _p lac195
YE _p YMR212/YE _p FGY1	<i>YMR212/FGY1</i> -Gen in YE _p lac195
YE _p YNL094w	<i>YNL094w</i> -Gen als <i>Eco</i> RV/ <i>Stu</i> I-Fragment in YE _p lac181
YE _p YNL094-GFP	Fusion von <i>YNL094w</i> mit <i>GFP</i> in p426MET25-GFP

2.3 Synthetische Oligonukleotide

Tab. 7: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Oligo	Sequenz (5'→3')	Beschreibung
a1- <i>agt1</i>	CAGTAATCAAGAGTGTACCCA AC	Aufwärts-Primer; Nachweis einer <i>agt1</i> -Deletion
a4- <i>agt1</i>	GCTTGATTGCTGCTTGGGC	Abwärts-Primer zu a1- <i>agt1</i>
a1-m2m3	TTCTGGAGAGGAATCAGCTCG	Aufwärts-Primer; Nachweis einer <i>mph2</i> -bzw. <i>mph3</i> -Deletion
a4- <i>mph2</i>	CACGCGCCATACTCGGATGAG	Abwärts-Primer zu a1-m2m3
c1-CtermFGY1	CAAAAAGTTAACATGCATCAC CATCACCATCACACAATGAAT GAAAAGAATATTC	Klonierung des Fgy1-C-Terminus in p426HXT7-6His über homologe Rekombination
c4-CtermFGY1	GAATGTAAGCGTGACATAACT AATTACATGACTCGAGTCAAG TGGAGGAGAATATTTTAC	Abwärts-Primer zu c1-CtermFGY1

c1-G1GFP	GATACATAGATACAATTCTATT ACCCCATCCATACTCTAGAA AATGTCTGAATTCAGCAGCAA GAAGG	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer Fusion des <i>GLUT1</i> der Ratte mit <i>GFP</i> (homologe Rekombination hinter den <i>MET25</i> -Promotor)
c4-G1GFP	GTGAAAAGTTCTTCTCCTTTAC TCATACCAGCACCAGCGGCC GCCACTTGGGAGTCAGCCCC CAG	Abwärts-Primer zu c1-G1GFP; Homologie zum Anfang des <i>GFP</i> -Gens
c1-G4GFP	GATACATAGATACAATTCTATT ACCCCATCCATACTCTAGAA AATGCCGTCGGAATTCCAGCA GATCG	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer Fusion des <i>GLUT4</i> der Ratte mit <i>GFP</i> (homologe Rekombination hinter den <i>MET25</i> -Promotor)
c4-G4GFP	GTGAAAAGTTCTTCTCCTTTAC TCATACCAGCACCAGCGGCC GCGTCATTCTCATCTGGCCCT AAGTATTC	Abwärts-Primer zu c1-G4GFP; Homologie zum Anfang des <i>GFP</i> -Gens
c11-Fgy1-SOS	CTTTAAGTTCAAGAGGTAATAAT ATTCTCCTCCACTGGTCCAGC TATGCAGGCGCAGCAGCTGC C	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer <i>FGY1</i> -SOS-Fusion über homologe Rekombination in YEprGLUT1-GFP
c11-GLUT1-SOS	GAGCTCTTCCACCCTCTGGGG GCTGACTCCCAAGTGGGTCCA GCTATGCAGGCGCAGCAGCT GCC	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer Fusion des <i>GLUT1</i> der Ratte mit <i>SOS</i> über homologe Rekombination in YEprGLUT1- GFP
c4-fusSOS	GCGTACACGCGTCTGTACAG	Abwärts-Primer zu c11-GLUT1-SOS
c1- G4BDfusFGY1c	GGTCAAAGACAGTTGACTGTA TCGCCGGAATTCCTCCGGGG ATCCGACCTTAACCATAAAACT TATTAC	Aufwärts-Primer zur Fusion des C- Terminus von <i>FGY1</i> mit der <i>GAL4</i> -DNA- Binde-domäne in pGBDU-C1 über homolo- ge Rekombination
c4- G4BDfusFGY1c	CGGGGTTTTTTCAGTATCTACG ATTCATAGATCTCTGCAGGTC GACTCAAGTGGAGGAGAATAT TTTAC	Abwärts-Primer zu c1-G4BDfusFGY1c
c1-HXT2p-hsG4	TATAAGAACAACAAATTAATTAAT ACAAAAAGACTTATAAAGCAAC ATAATGCCGTCGGGCTTCCAA CAG	Aufwärts-Primer zur Klonierung von menschlichem <i>GLUT4</i> in YEph2-rGLUT1 über homologe Rekombination
c4-hsG4-GAL2t	CGTCAGTCATGAAAAATTAAG AGAGATGATGGAGCGTCTCAC TTCAAATCGATCAGTCGTTCT CATCTGGCCC	Abwärts-Primer zu c1-HXT2p-hsG4
c1-Myr-FGY1c	CGGGATCCAAAATGGGGAGTA GCAAGAGCAAGCCTAAGGAC CCCAGCCAGCGCCGGGACCT TAACCATAAACTTATTAC	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer Fusion des <i>FGY1</i> -C-Terminus mit einem Myristoylierungssignal; <i>Bam</i> HI-Site am 5'- terminalen Ende
c4-Myr-FGY1c	CGGAATTCTCAAGTGGAGGAG AATATTTTAC	Abwärts-Primer zu c1-Myr-FGY1c, bindet an das Ende von <i>FGY1</i> ; <i>Eco</i> RI-Site am 5'- terminalen Ende

c1-YMR212-GFP	GATACATAGATACAATTCTATT ACCCCCATCCATACTCTAGAA AAATGCAGTTGTCTATGCGGA TGATG	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer <i>FGY1-GFP</i> -Fusion durch homologe Rekombination in p426MET25-GFP
c4-YMR212-GFP	GTGAAAAGTTCTTCTCCTTTAC TCATACCAGCACCAGCGGCC GCAGTGGAGGAGAAAATTTTA CCTC	Abwärts-Primer zu c1-YMR212-GFP
c1-YNL094-GFP	GATACATAGATACAATTCTATT ACCCCCATCCATACTCTAGAA AAATGAATAGTCAAGGTTACG ATG	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer <i>YNL094w-GFP</i> -Fusion durch homologe Rekombination in p426MET25-GFP
c4-YNL094-GFP	GTGAAAAGTTCTTCTCCTTTAC TCATACCAGCACCAGCGGCC GCGTTTGAATACTTCTCCCTA ATTC	Abwärts-Primer zu c4-YNL094-GFP
glutmet1	CCGACAGAGAAGATGGCCAT GGAGAGAGACCAGAGTG	Primer zur Mutagenese des GLUT1 der Ratte
glutmet2	CCCGACAGAGAAGATCATCAC GGAGAGAGACCAGAG	Primer zur Mutagenese des GLUT1 der Ratte
glutphe	CCGACAGAGAAGATGGCGAA GGAGAGAGACCAGAGTG	Primer zur Mutagenese des GLUT1 der Ratte
glutthr	CCGACAGAGAAGATGGCCGT GGAGAGAGACCAGAGTG	Primer zur Mutagenese des GLUT1 der Ratte
hsG1-F7	TTAATTTTAATCAAAAAATGGA GCCAGCAGCAAG	Aufwärts-Primer zur Amplifizierung von humanem GLUT1, enthält Bindestelle für t71-ORFs
hsG4-F7	TTAATTTTAATCAAAAAATGCC GTCGGGCTTCCAA	Aufwärts-Primer zur Amplifizierung von humanem GLUT4, enthält Bindestelle für t71-ORFs
k2-kanMX	TTGTGCGACCTGATTGCCCG	Verifizierung von Gendeletionen, Bindestelle im <i>kanMX</i> -Gen
k3-kanMX	TATGGAAGTGCCTCGGTGAG	Verifizierung von Gendeletionen, Bindestelle im <i>kanMX</i> -Gen
p4-mutFGY1	AAACCCACTATACTGACAGCT GAAACAAGTAATGAC	Mutageneseprimer zum Austausch des Aspartat ₃₂₉ gegen Alanin in Fgy1
RP	AACAGCTATGACCATG	Sequenzierprimer
RPhom	TGTGAGCGGATAACAATTTCA CACAGGAAACAGCTATGACCA TG	Aufwärts-Primer für die Klonierung von DNA-Fragmenten in die von Gietz und Sugino (1988) beschriebenen Vektoren über homologe Rekombination in Hefe
UP	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenzierprimer
UPhom	CGCCAGGGTTTTCCAGTCAC GACGTTGTAAAACGACGGCCA GT	Abwärts-Primer zu RPhom
RPhom-YMR211	GAAACAGCTATGACCATGGCT TTGCATGCTCAGGA	Aufwärts-Primer für die Amplifizierung von <i>YMR211</i> , enthält RPhom-Bindestelle

UPhom-YMR211	GTAAAACGACGGCCAGTCTGA TCGCAGTAGCATTG	Abwärts-Primer für die Amplifizierung von <i>YMR211</i> , enthält UPhom-Bindestelle
RPhom-YMR212	GAAACAGCTATGACCATGGAT CTAGAAGTTGGGCA	Aufwärts-Primer für die Amplifizierung von <i>YMR212</i> , enthält RPhom-Bindestelle
UPhom-YMR212	GTAAAACGACGGCCAGTTTGT GGTAAGGTACTTC	Abwärts-Primer für die Amplifizierung von <i>YMR212</i> , enthält UPhom-Bindestelle
s1-lag1	ATGAAAAATATCATTTTCATTGG TAAGCAAGAAGAAGGCTGCCT CAAATTTCGTACGCTGCAGGT CGAC	Aufwärts-Primer; Amplifizierung eines <i>lacZ::kanMX</i> DNA-Fragments zur Deletion von <i>AGT1</i>
s2-agt1	TAATTCTCGCTGTTTTATGCTT GAGGACTGACTGATACTCTCA TCAGCGCATAGGCCACTAGTG GATCTG	Abwärts-Primer zu s1-lag1
s1-FGY1del382	GACCTTAACCATAAACTTATT ACGCTGAACAGACCTCAGATA TGTTATGATAATTCGTACGCT GCAGGTCGAC	Amplifizierung eines <i>kanMX</i> DNA-Fragments zur Deletion des <i>FGY1</i> -C-Terminus durch Insertion von zwei Stop-Codons hinter Aminosäure 382
s1-FGY1del506	CTAGAGAACGTTTCTGAGCCT GAGTATACCTATTATTCGTACC ATTTATGATAATTCGTACGCTG CAGGTCGAC	Amplifizierung eines <i>kanMX</i> DNA-Fragments zur Deletion des <i>FGY1</i> -C-Terminus durch Insertion von zwei Stop-Codons hinter Aminosäure 506
s1-FGY1del659	TGGAAAACAATGAGAGCCACC GCACCAAAGTTAGCGATTTG AAAAATGATAATTCGTACGCT GCAGGTCGAC	Amplifizierung eines <i>kanMX</i> DNA-Fragments zur Deletion des <i>FGY1</i> -C-Terminus durch Insertion von zwei Stop-Codons hinter Aminosäure 659
s1-mph2	ATGAAAACTTATCTTTTCTCA TAAACAGAAGAAAGGAAAATA CAAGTTTCGTACGCTGCAGGT CGAC	Aufwärts-Primer für die Amplifizierung eines <i>kanMX</i> DNA-Fragments zur Deletion von <i>MPH2</i>
s2-mph2	TTCCTCTGCAATGGAAGCTTC GATATCTCCCTTGGGGTCGTT ATGGCATAGGCCACTAGTGGA TCTG	Abwärts-Primer zu s1-mph2
s1-mph3	ATGAAAACTTATCTTTTCTCA TAAACAGAAGAAAGGAAAATA CAAGTTTCGTACGCTGCAGGT CGAC	Aufwärts-Primer für die Amplifizierung eines <i>kanMX</i> DNA-Fragments zur Deletion von <i>MPH3</i>
s2-mph3	TTCCTCTGCAATGGAAGCTTC GATATCTCCCTTGGGGTCGTT ATGGCATAGGCCACTAGTGGA TCTG	Abwärts-Primer zu s1-mph3
s1-YMR212	ATGCAGTTGTCTATGCGGATG ATGTTACACCAAACATCAG AACTGTTTCGTACGCTGCAGG TCGAC	Aufwärts-Primer für die Amplifizierung eines <i>kanMX</i> DNA-Fragments zur Deletion von <i>FGY1</i>
s2-YMR212	CTCTTGCCCTTGAAAGCATCC ACAGCTGTCCGTCAAAAACCTT AATTTGCATAGGCCACTAGT GGATCTG	Abwärts-Primer zu s1-YMR212

seq1-FGY1	GCTCTATTATTCATCTTTTCG	Primer zur Sequenzierung von <i>FGY1</i>
seq2-FGY1	GCCCTTGAAAGCATCCAC	Primer zur Sequenzierung von <i>FGY1</i>
seq3-FGY1	CTGTCTGCAAAGTACACC	Primer zur Sequenzierung von <i>FGY1</i>
seq4-FGY1	GAGCCATCTCTTTTCATATTA	Primer zur Sequenzierung von <i>FGY1</i>
seq6-FGY1	GGTACGAATAATAGGTATAC	Primer zur Sequenzierung von <i>FGY1</i>
seq2gal2	AACGTCAGTCATGAAAAATTAA GA	Sequenzierprimer und Abwärts-Primer für die Mutagenese von <i>GLUT1</i>
seqGal4BD	CTAACATTGAGACAGCATA	Sequenzierprimer zur Überprüfung von Proteinfusionen mit der <i>GAL4</i> -DNA-Bindedomäne
seqhxt2	CTTTCTCAATTCCTCTTATATT AG	Sequenzierprimer und Aufwärts-Primer für die Mutagenese von <i>GLUT1</i>
t2-hsG1	ACATGACTCGAGGTCGACGGT ATCGATAAGCTTATCACACTT GGGAATCAGC	Abwärts-Primer zu hsG1-F7 bzw. t71-ORFs; Klonierung von menschlichem <i>GLUT1</i> vor den <i>CYC1</i> -Terminator über homologe Rekombination
t2-hsG4	ACATGACTCGAGGTCGACGGT ATCGATAAGCTTATCAGTCGT TCTCATCTGG	Abwärts-Primer zu hsG4-F7 bzw. t71-ORFs; Klonierung von menschlichem <i>GLUT4</i> vor den <i>CYC1</i> -Terminator über homologe Rekombination
t71-ORFs	ACAAAGAATAAACACAAAAACA AAAAGTTTTTTAATTTTAATC AAAAA	Aufwärts-Primer für die Klonierung von DNA-Fragmenten hinter den <i>HXT7</i> -Promotor über homologe Rekombination in Hefe

2.4 Genbanken

Es wurde eine *S. cerevisiae* DNA-Bank mit chromosomalen Fragmenten des Stammes EBY.VW5000 (Wieczorke *et al.*, 1999) im 2 μ -Vektor YEplac195 (Tab. 5) verwendet (T. Hamacher, Düsseldorf), sowie eine Genbank im Vektor YEplac181 (Boles *et al.*, 1996).

2.5 Mikroskopische Untersuchungen

Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden mit unfixierten Zellen und einem Zeiss Axioskop durchgeführt. Für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurde ein FITC-Filtersatz (Zeiss) verwendet. Die Bilder wurden mit einer CCD-Kamera (Sony) aufgenommen und mit dem Programm „Adobe Photoshop 5.0“ nachbearbeitet.

2.6 Chemikalien und Enzyme

Acros Organics	Fruktose, Galaktose, Lysin, Maltose, Natriumacetat
Amersham	D-[¹⁴ C(U)]-Maltose
Braun-Melsungen	Glasperlen 0,45 mm Ø
Caesar & Loretz	Glukose
Calbiochem	G418/Geneticin
Difco	Bacto Agar, Pepton, Trypton, Yeast Extract, Yeast Nitrogen Base
Fluka	Rubidiumchlorid
GibcoBRL	Agarose, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase
Janssen Chimica	Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO)
J.T. Baker	Kaliumacetat (KAc), K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , MgCl ₂ , NaCl, NaOH, PEG4000, Saccharose
Kodak	Röntgenfilme
MBI	Lambda-DNA
Merck	Adenin, DMF, EDTA, Leucin, MgSO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , NaH ₂ PO ₄ , TEMED, Uracil
Millipore	Immobilon-N PVDF-Membran
MWG Biotech	Synthetische Oligonukleotide
NEN Life Science	D-[¹⁴ C(U)]-Glukose
New England Biolabs	Restriktionsendonukleasen, BSA
PCR Inc. Florida	5-FOA
Qiagen	PCR Purification Kit, Plasmid Mini Kit, QIAEX II Gel Extraction Kit
Riedel-de Haen	Essigsäure, Ethanol, Methanol, MnCl ₂
Roche	Alkalische Phosphatase, Antimycin A, Expand High Fidelity PCR System, Protease Inhibitoren „Complete“, T4-DNA-Ligase
Roth	Dithiothreitol (DTT), Gel30 Acrylamid, Glycin, Isopropanol, KCl, PEG1000, PEG3350
Seikagaku Kogyo Co. Ltd.	Zymolyase
Serva	Ammoniumperoxodisulfat (APS), Albumin Bovine Fraction V (BSA), CaCl ₂ , Comassie Brilliant Blue G250, Glycerin, Maltose, Natriumdodecylsulfat (SDS), Raffinose, Tween20, X-Gal
Sigma	Antimycin A, Ampicillin, Cytochalasin B, Ethidiumbromid, 2-Desoxy-D-Glukose, IPTG, Lithiumacetat, MOPS-Puffer, ONPG, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), „Prestained“ Molekulargewichtsstandard, L(+)-Tartrat, Tris-Puffer
Sigma ARK	Synthetische Oligonukleotide
Whatman	3 MM Papier, GF/C Glas-Fiber-Filter

2.7 Antikörper

polyklonale Antikörper:

anti-Pma1	R. Kölling, Düsseldorf
anti-GLUT-1	Dianova
anti-GLUT-4	Calbiochem
anti-Kaninchen IgG (H+L) Peroxidase-Konjugat	Dianova

2.8 Transformationen

2.8.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* Zellen erfolgte durch die Elektroporationsmethode nach Dower *et al.* (1988) und Wirth (1989) mittels eines GENEPULSER-Gerätes der Firma BIORAD (München). Alternativ wurden die Zellen nach der Methode von Hanahan (1985) transformiert.

2.8.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* Stämmen erfolgte nach der Methode von Klebe *et al.* (1983), modifiziert nach Dohmen *et al.* (1991). Alternativ wurden die Zellen nach der Lithiumacetat-Methode von Gietz und Woods (1994) mit Plasmid-DNA bzw. DNA-Fragmenten transformiert. Zur Selektion auf Geneticinresistenz wurden die Zellen nach der Transformation zunächst für 3 h bei 30°C in flüssigem Vollmedium inkubiert und erst im Anschluß auf G418-haltigem Medium ausplattiert.

2.9 Präparation von DNA

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979), modifiziert nach Maniatis *et al.* (1982). Zur Restriktionsanalyse wurden 200 ng der isolierten Plasmid-DNA in 20 µl Gesamtvolumen enzymatisch geschnitten. Hochreine Plasmid-DNA für Sequenzierungen und Klonierungen wurde mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit nach Angaben des Herstellers präpariert.

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

Die Zellen aus einer stationären Hefekultur (5 ml) wurden durch Zentrifugation geerntet und in 400 µl Puffer P1 (Plasmid Mini Kit, Firma Qiagen) resuspendiert.

Nach Zugabe von 400 µl Qiagen Puffer P2 und 2/3 Volumen Glasperlen (\varnothing 0,45 mm) erfolgte ein Zellaufschluß durch fünfminütiges Schütteln auf einem Vibrax (Janke&Kunkel, Vibrax VXR) bei 4°C. Nach Überführung von 0,5 ml Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß wurden 0,25 ml Qiagen Puffer P3 hinzugegeben und gemischt. Einer zehnmütigen Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation für 15 min mit 10000 rpm. Der Überstand wurde erneut in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 0,75 ml Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wurde im Anschluß durch Zentrifugation für 30 min mit 13000 rpm gesammelt, das Pellet mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 20 µl Wasser resuspendiert. 2 µl dieser DNA wurden für die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

2.10 Enzymatische Modifikationen von DNA

2.10.1 DNA-Restriktion

Sequenzspezifische Spaltungen der DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Inkubationsbedingungen über 2-3 Stunden mit 2-5 U Enzym pro µg DNA durchgeführt. Es kamen Restriktionsendonukleasen und Puffer der Firmen Roche, New England Biolabs und Gibco zum Einsatz.

2.10.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung von DNA-Enden erfolgte durch Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase (CIP) zum Restriktionsansatz und 30 minütige Inkubation bei 37°C. Im Anschluß wurden die dephosphorylierten Fragmente durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel aufgereinigt.

2.10.3 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem 20 µl Ansatz aus Vektor-DNA, 2-5fachem molarem Überschuß Fragment-DNA und 1 U T4-Ligase. Der Ligationsansatz wurde für 16 h bei 16°C (überstehende Enden) oder für 2 h bei Raumtemperatur (glatte Enden) inkubiert. Die Enzyme und zugehörigen Puffer wurden von den Firmen Roche oder Gibco BRL bezogen.

2.11 PCR-Amplifizierung von DNA

Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit dem „Expand High Fidelity PCR-System“ (Roche) durchgeführt. Jeder Ansatz bestand

aus 1-10 ng DNA als Synthesevorlage, 0,2 mM dNTP-Mix, 1x Puffer 2 (1,5 mM MgCl₂), 2-3 U Polymerase und je 100 pmol der entsprechenden Oligonukleotide.

Alle Reaktionen wurden nach der „Hot-start“-Methode in einem programmierbaren Thermoblock der Firma Techne durchgeführt. Bei dieser Methode wird den Synthesezyklen eine Denaturierungsphase von 5 min vorgeschaltet, bevor die Amplifizierung durch Zugabe der Polymerase gestartet wird. Die Bedingungen der weiteren PCR-Schritte (Denaturierung, Annealing und DNA-Synthese) wurden wie folgt gewählt:

1. Denaturierung 30 s, 95°C
2. Annealing 30 s, 50-56°C
3. Synthese 1 min pro 1 kb zu amplifizierender DNA
 Produkte < 3 kb bei 72°C
 Produkte > 3 kb bei 68°C

Bei präparativen Ansätzen wurde im Anschluß an den letzten Syntheseschritt zusätzlich eine um das Doppelte verlängerte Extensionsphase hinzugefügt. Die Reaktionsprodukte wurden in einem Agarosegel überprüft und bei Bedarf aufgereinigt. Entweder mittels Isolierung aus einem Agarosegel (2.13), oder durch Verwendung des „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers.

Für eine PCR-Reaktion mit ganzen Zellen wurden anstelle von DNA als Synthesevorlage ein bis zwei Hefekolonien (Volumen ca. 3 µl) mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte abgenommen, in das Reaktionsgefäß gegeben und durch 1 ½ min Erhitzen in der Mikrowelle aufgeschlossen. Im Anschluß wurden die übrigen Komponenten des Ansatzes zugegeben.

2.12 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit Größen zwischen 0,2 und 20 kb erfolgte in 0,6-1,2%igen Agarosegelen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid nach Maniatis *et al.* (1982). Als Gel- und Laufpuffer wurde 1x TAE Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) verwendet. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen Blaumarker (0,2% Bromphenolblau, 25% Glycerin) versetzt und die Nukleinsäuren nach der Auftrennung durch UV-Bestrahlung (254 nm) sichtbar gemacht. Als Längen- und Konzentrationsstandard diente 1 µg mit *EcoRI* und *HindIII* geschnittene DNA des Phagen λ.

2.13 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus einem TAE-Agarosegel unter langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten und die DNA mittels des „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

2.14 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm nach Maniatis *et al.* (1982) bestimmt. Der Quotient E_{260}/E_{280} einer gereinigten Probe liegt bei ca. 1,8. In diesem Fall entspricht ein Wert von $E_{260} = 1$ einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

2.15 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA oder von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

2.16 *In vitro*-Mutagenese

Die zielgerichtete Mutagenese von Genen wurden durch *in vitro*-PCR-Mutagenese nach der Methode von Boles und Miosga (1995) durchgeführt. Die Bedingungen und die Art der mutagenen Primer sind für den Einzelfall im Ergebnisteil beschrieben.

2.17 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit der Mikro-Biuret-Methode nach Zamenhoff (1957) bestimmt. Als Standard diente Rinderserumalbumin in Konzentrationen von 0 bis 200 µg/ml. 0,5 ml Mikrobiuret-Reagenz (8 M NaOH; 0,2% Kupfersulfat) wurde zu 1 ml wässriger, proteinhaltiger Lösung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurden die Proben für 5 min mit 10000 rpm zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Im Anschluß wurde in Quarzküvetten die Extinktion bei 290 nm bestimmt.

2.18 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970) in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen. Zur Auftrennung der Proteine wurden ein 5%iges Sammelgel (125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,025% APS; 0,1% TEMED; 5% Acrylamid) und ein 10%iges Trenngel (375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,025% APS; 0,1% TEMED; 10% Acrylamid) verwendet (Maniatis, 1989). Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 0,192 M Glycin und 0,1% SDS. Die Proben wurden mit 2x Probenpuffer (4% SDS; 20% Glycerin; 125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 20 mM DTT; 0,02% Bromphenolblau) versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 40-50 V über Nacht. Als Molekulargewichtsstandard diente der „Prestained High Molecular Weight Standard“ von Sigma.

2.19 Nachweis von Proteinen über Coomassie-Blue Anfärbung

Die Anfärbung der Proteine erfolgte in 0,1% Coomassie brilliant blue G250, 50% Methanol und 7,5% Eisessig, Entfärbung und Fixierung der Gele in Entfärbelösung (7,5% Eisessig, 50% Methanol).

2.20 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse

Im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung der Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte der Transfer auf eine PVDF-Membran (Millipore). Die Übertragung verlief in Blotting-Puffer (25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 20% Methanol) für 2 h bei 55 V (250 mA). Der Proteintransfer wurde durch reversible Färbung des Filters mit PonceauS überprüft.

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Membran für 1 h in PBS/Tween (10 mM Natriumphosphat, pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,1% Tween20; „PBSTB“) mit 3% BSA blockiert. Die Reaktion mit dem Primärantikörper (spezifische Verdünnung in 10 ml PBSTB) erfolgte je nach Antikörper für 2 h oder über Nacht bei Raumtemperatur. Danach wurde der Filter 3x mit PBS/Tween-Puffer gewaschen und anschließend für 2 h mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Peroxidase-Konjugat der Firma Dianova eingesetzt (1:10000 in PBSTB verdünnt) und die Membran anschließend 3x mit PBS/Tween-Puffer gewaschen.

Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch eine Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenz-Reaktion nach Zugabe eines Chemilumineszenz-Substrates (SuperSignal ULTRA Chemiluminescent Substrate, Firma Pierce) und anschließende Detektion durch Auflegen eines Röntgenfilms.

2.21 Spezifischer Nachweis der Proteine Glut1, Glut4 und Pma1

Die Antikörper gegen GLUT1 (Dianova) und GLUT4 (Calbiochem) wurden in Verdünnungen von 1:1000 (GLUT1) und 1:800 (GLUT4) eingesetzt. Sie richten sich jeweils gegen eine GLUT1- bzw. GLUT4-spezifische, zwölf Aminosäuren umfassende Sequenz im C-Terminus des jeweiligen Proteins. Der Antikörper gegen das Pma1-Protein von *S. cerevisiae* wurde freundlicherweise von R. Kölling, Düsseldorf, zur Verfügung gestellt.

2.22 Zellfraktionierung durch Saccharosegradientenzentrifugation

Die Zellen einer 150 ml Hefekultur ($OD_{600}=0,5-0,8$) wurden durch Vakuumfiltration auf einer Nitrozellulosemembran gesammelt und rasch in 250 μ l eiskaltem STED10 (10% Saccharose; 10 mM Tris/HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA; 1 mM DTT) mit Proteaseinhibitoren (0,2 mM PMSF; Protease-Inhibitor „Complete“, Firma Roche) resuspendiert. Nach Zugabe von Glasperlen (\varnothing 0,45 mm) bis zum Meniskus der Flüssigkeit wurde die Suspension für 3 min auf einem Vibrax geschüttelt. Nach Zugabe von 1 ml STED10 wurde der Ansatz gemischt und der Überstand für 5 min mit 3000 rpm zentrifugiert, um Glasperlen und Zelltrümmer zu sedimentieren. 900 μ l dieses Überstandes wurden auf einen Saccharose-Gradienten gegeben.

Die Herstellung des Gradienten erfolgte nach Kölling und Hollenberg (1994) in einem SW40-Zentrifugationsgefäß (Beckmann), indem 4 ml STED50 (wie STED10, jedoch mit 53% Saccharose), 4 ml STED36 (wie STED10, jedoch mit 36% Saccharose) und 4 ml STED20 (wie STED10, jedoch mit 20% Saccharose) sorgfältig übereinandergeschichtet wurden. Das Gefäß wurde gründlich mit Parafilm verschlossen und vorsichtig in eine horizontale Lage gebracht. Nach dreistündiger Diffusion bei 4°C wurde der nun annähernd kontinuierliche Gradient aufgerichtet und mit dem Zellextrakt überschichtet. Nach Zentrifugation für exakt 14 h in einem Beckmann SW40-Rotor mit 114000 g wurden Fraktionen zu 700 μ l vom Gradienten abgenommen. Aliquots wurden mit dem gleichen Volumen 2x Probenpuffer versetzt und hiervon jeweils 50 μ l elektrophoretisch aufgetrennt (2.18). Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte durch Western-Analyse (2.20).

2.23 Bestimmung der Aufnahme von Hexosen in *S. cerevisiae*

2.23.1 Glukose-Aufnahme

Die Glukoseaufnahmemessung erfolgte nach Bisson und Fraenkel (1983) mit Modifikationen nach Walsh *et al.* (1994). Hefezellen wurden bis zu einer Dichte von $1-2 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ angezogen und zweimal mit Phosphat-Puffer (0,1 M K_iPO_4 , pH 6,5) gewaschen. Im Anschluß wurde das Naßgewicht der Zellen bestimmt und die Zellen entsprechend einer Konzentration von 60 mg/ml in Phosphat-Puffer resuspendiert. Sofern nicht anders angegeben wurde die Aufnahme bei Glukosekonzentrationen von 0,2-100 mM bestimmt. Die eingesetzte spezifische Radioaktivität betrug dabei 0,37-111 kBq μmol^{-1} . Vor Beginn der Aufnahmemessung wurden sowohl die Zellen als auch die Glukoselösung 5 min bei 30°C vorinkubiert. Die Aufnahmereaktion wurde durch Zugabe von 100 μl Zellen zu 50 μl dreifachkonzentrierter Glukoselösung gestartet. Der Reaktionsansatz wurde gut gemischt. Nach 5 sec wurden 100 μl entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Quench-Lösung (0,1 M K_iPO_4 , pH 6,5; 500 mM Glukose; -3 bis 0°C) abgestoppt. Mittels einer speziellen Pipette wurde das 5 sec-Zeitintervall der Glukoseinkubation auf 1/100 sec genau bestimmt. Die Zellen wurden sofort durch Vakuumfiltration auf Whatman GF/C Glas-Fiber-Filtern gesammelt und viermal mit 10 ml eiskalter Quenchlösung gewaschen. Hierauf wurden die Filter in Szintillationsgefäße aus Polyethylenglycol mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A, Zinsser Analytik) gegeben und die Radioaktivität in einem Beckmann Szintillationszähler gemessen. Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität wurden 10 μl des Reaktionsansatzes in 5 ml Szintillationsflüssigkeit gemessen (cpm_0). Als Kontrolle für den Anteil der unspezifisch an den Glas-Fiber-Filter gebundenen radioaktiven Glukose wurden Glukose-Lösung und Zellen gleichzeitig zur vorgelegten Quench-Lösung gegeben. Diese Kontrolle wurden für eine bestimmte eingesetzte Gesamtradioaktivität mehrfach bestimmt und der statistische Mittelwert von den entsprechenden Meßwerten abgezogen. Die Aufnahmegeschwindigkeiten V in $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg TG}^{-1}$ wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Aufgenommene Glukose} = [(\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Kontrolle}}) / (\text{cpm}_0 \cdot 10)] \cdot \text{mM}_{\text{Glukose}}$$

Für die Untersuchung der Hemmbarkeit von in Hefe exprimierten Säugetier-Glukosetransportern durch Cytochalasin B wurden die Zellen für 15 min bei 30°C in Gegenwart von 20 μM Cytochalasin B (in Ethanol) vorinkubiert und im Anschluß die Glukoseaufnahme bestimmt.

2.23.2 Maltose-Aufnahme

Die Bestimmung der Aufnahme von Maltose erfolgte wie für die Aufnahme von Glukose beschrieben (2.23.1) und wurde nach Cheng und Michels (1991) modifiziert. Anstelle des Phosphat-Puffers wurden die Zellen mit 0,1 M Tartrat/Tris-Puffer (pH 4,2) gewaschen und für die Messung mit Tartrat/Tris-Puffer auf eine Zelldichte von 60 mg/ml eingestellt. Die Quenchlösung (0,1 M K_iPO_4 , pH 6,5) enthielt 100 mM Maltose.

2.24 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität

2.24.1 Quantitative Enzymtests

Die Bestimmung der Enzymaktivität der β -Galaktosidase erfolgte nach Miller (1972). 5 ml Hefekulturen wurden bei einer OD_{600} von 1-2 geerntet und zweimal mit kaltem Phosphat-Puffer (50 mM K_iPO_4 , pH 7,0) gewaschen. Der Zellaufschluß erfolgte durch Zugabe von 0,2 g Glasperlen (\varnothing 0,45) und 5 min kräftigem Schütteln auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) bei 4°C. Im Anschluß wurden je nach Zelldichte 0,2-0,5 ml kalter Phosphatpuffer zugegeben, gut gemischt und die Glasperlen abgetrennt. Der noch Zelltrümmer enthaltende Rohextrakt wurde ohne weitere Zentrifugation zur Proteinbestimmung (2.17) und für die Messung der Enzymaktivität eingesetzt.

Die Enzymreaktion wurde bei 30°C in einem Gesamtvolumen von 1 ml in lacZ-Puffer (60 mM Na_2HPO_4 ; 40 mM NaH_2PO_4 ; 10 mM KCl; 1 mM $MgSO_4$; 1 mg/ml ONPG; pH 7,0) durchgeführt und durch Zugabe des Rohextraktes gestartet. Nach eintretender Gelbfärbung, spätestens aber nach 2 h Inkubation, wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml einer 1 M Na_2CO_3 -Lösung gestoppt. Anschließend wurde der Ansatz für 5 min mit 10000 rpm zentrifugiert und die Extinktionsänderung des Überstandes spektralphotometrisch bei 420 nm gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient von 2-Nitrophenol beträgt unter diesen Bedingungen $4,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.24.2 Qualitative Enzymtests („X-Gal Overlay-Assay“)

Die qualitative Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität erfolgte durch Lyse von auf Agarplatten gewachsenen Zellen durch Überschichtung mit heißem Aufschlußpuffer (0,2% SDS; 2% DMF; 2 mg/ml X-Gal; 0,5% Agarose; 0,5 M Natriumphosphat-Puffer, pH 7,2). X-Gal wird von der β -Galaktosidase der aufgeschlossenen Zellen zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Nach der Überschichtung wurden die Platten bei 37°C inkubiert und die Blaufärbung dokumentiert.

2.25 Kreuzung von Hefestämmen, Tetradenanalyse und Bestimmung des Paarungstyps

Die haploiden Kreuzungspartner wurden in flüssigem Vollmedium oder auf einer Agarplatte mit Vollmedium miteinander gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 3-4 h bei 25°C wurden Zygoten mit Hilfe eines Mikromanipulators isoliert. Die diploiden Zellen wurden 1-2 Tage in 5 ml Vollmedium bis zur stationären Phase herangezogen, mit Wasser gewaschen und auf Agarplatten mit 2% Kaliumacetat aufgebracht. Nach 3-5 Tagen wurden die sporulierenden Zellen in 0,5 ml Wasser aufgenommen und die Ascuswände durch Zugabe von 20 µl Zymolyaselösung (0,2 mg/ml) für 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Sporen wurden mittels eines Mikromanipulators isoliert und zum Auskeimen auf einer YEP-Platte mit 2% Glukose oder 1% Maltose abgelegt. Für die Bestimmung des Paarungstyps wurden die zu prüfenden Stämme wie beschrieben mit den Testerstämmen EBY109A (*MAT a*) und EBY109B (*MAT α*) gekreuzt und auf Minimalmedium ausgestrichen. Zellen, die mit EBY109A gekreuzt worden waren und Wachstum auf Minimalmedium zeigten, gehörten dem Paarungstyp α an, bzw. solche nach Kreuzung mit EBY109B dem Paarungstyp *a*.

2.26 Gen-Deletionen in *S. cerevisiae*

Die Deletion von Genen wurde, soweit nicht anders beschrieben, mit dem *loxP::kanMX::loxP/Cre*-Rekombinase System durchgeführt (Güldener *et al.*, 1996; Wach *et al.*, 1994). Es beruht auf der Eigenschaft von Hefe, mit einer gewissen Frequenz homologe DNA-Bereiche miteinander zu rekombinieren. Dies wird genutzt, um über gezielte homologe Rekombination von Markergenen in die chromosomale DNA die gewünschten Gene zu deletieren.

In PCR-Reaktionen (2.11) wurden zunächst DNA-Deletionskassetten synthetisiert. Neben einem von *loxP*-Erkennungssequenzen eingefassten Geneticin-Resistenzgen wiesen diese Fragmente an ihren Enden Übereinstimmungen zu den 5'- bzw. 3'-flankierenden Sequenzen des zu deletierenden Gens oder der zu deletierenden DNA-Region auf. Diese 48 bp langen Bereiche befanden sich bereits als „Anhang“ an den Oligonukleotiden, die für die PCR-Reaktion eingesetzt wurden. Alternativ wurden Gene mit einer *lacZ::kanMX*-Reporterkassette deletiert, wodurch gleichzeitig eine Promotor-*lacZ*-Fusion im Locus des betreffenden Gens erzeugt wurde. Hierbei blieben die ersten 48 Nukleotide der kodierenden Region erhalten. Nach Transformation der PCR-Produkte in die Hefe (2.8.2) erfolgte auf Vollmedium mit 200 mg/l G418 eine Selektion auf Geneticin-resistente Klone. Die

Deletionen wurden durch PCR-Reaktionen mit ganzen Zellen (2.11) unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide verifiziert.

Um den Geneticin-Resistenzmarker zu regenerieren, wurden die Zellen mit einem Plasmid transformiert, welches das Gen für das Enzym Cre-Rekombinase hinter einem induzierbaren *GAL2*-Promotor trägt (Tab. 5). Nach Inkubation der Transformanten für 1-2 Tage auf Galaktose- oder Maltosemedium wurden die Kolonien auf G418-haltiges Medium replikaplatziert und G418-sensitive Kolonien isoliert. Die durch die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des *kanMX*-Gens wurde in einer PCR-Reaktion mit den entsprechenden Oligonukleotiden überprüft.

2.27 Klonierung von DNA-Fragmenten durch *in vivo*-Rekombination

Für die *in vivo*-Klonierung von DNA-Fragmenten in *S. cerevisiae* wurde zunächst das zu klonierende Gen in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide besaßen spezifische 5'-terminale Anhänge mit Homologie zu den 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen des Integrationsbereichs im Zielvektor. Der Vektor wurde durch Restriktion (2.10.1) im Integrationsbereich linearisiert, über ein Agarosegel gereinigt (2.13) und zusammen mit dem PCR-Produkt in die Hefe transformiert (2.8.2). Die Zellen wurden im Anschluß auf synthetischem Selektivmedium mit 2% Glukose oder 1% Maltose ausplattiert. Für die Selektion auf den Auxotrophiemarker des Vektors wurde auf den Zusatz der entsprechenden Aminosäure bzw. Base zum Medium verzichtet. Auf diese Weise wurden nur solche Transformanten erhalten, die aufgrund homologer Rekombination des DNA-Fragments in den linearisierten Vektor innerhalb der Zelle wieder ein stabiles, zirkularisiertes Plasmid besaßen. Die Plasmide wurden aus Hefe isoliert (2.9.2), in *E. coli* amplifiziert (2.8.1, 2.9.1) und durch eine darauffolgende Restriktionsanalyse überprüft (2.10.1).

2.28 Two-Hybrid System

Es wurde das Two-Hybrid System nach Fields und Song (1989) in einer Modifikation von James *et al.* (1996) verwendet. Als DNA-bindendes Fusionsprotein wurde Gal4_{BD}::Fgy1c eingesetzt (Tab. 6), eine Fusion aus Gal4-DNA-Bindedomäne und dem C-terminalen Bereich des Fgy1-Proteins. Durch Interaktionen mit zufälligen Fusionsproteinen bestehend aus Gal4-Aktivierungsdomäne mit Genfragmenten einer Genbank sollten unterschiedliche Reportersysteme des Testerstamms PJ69-4A induziert werden.

3 ERGEBNISSE

3.1 Konstruktion eines Hexosetransport-negativen Hefestammes

Wie bereits in der Einleitung dargestellt, wird die Aufnahme von Hexosen in *S. cerevisiae* durch eine Familie von 18 Transportproteinen vermittelt, die der sogenannten Hexosetransporter-Familie zugeordnet werden. Zu dieser Unterfamilie der Zuckerpermease-Familie zählen die Proteine Hxt1 bis Hxt17 sowie der Galaktosetransporter Gal2 (Abb. 1; Kruckeberg, 1996; Boles und Hollenberg, 1997; Nelissen *et al.*, 1997). Lediglich sieben dieser Hexosetransporter (Hxt1 bis Hxt4, Hxt6, Hxt7, Gal2) konnten bislang funktionell charakterisiert werden und scheinen für die Aufnahme von Glukose in die Zelle ausreichend zu sein (Reifenberger *et al.*, 1997; Özcan und Johnston, 1999). Über die genaue Funktion von Hxt5 sowie Hxt8 bis Hxt17 ist bislang hingegen nur wenig bekannt. Da der Transport von Glukose über die Plasmamembran einen wichtigen Schritt des Glukose-Metabolismus darstellt, ist die Aufklärung der Funktionen der vielfältigen Transportproteine von entscheidender Bedeutung. Zu diesem Zweck wurde in einem ersten Ansatz ein Hefestamm konstruiert, der Deletionen in den Genen *HXT1* bis *HXT17* und *GAL2* aufwies (Wieczorke *et al.*, 1999). Ziel der Arbeit war es, einen Hefestamm zu entwickeln, der durch das Fehlen endogener Hexosetransporter nicht mehr in der Lage ist, auf Medium mit Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen bzw. Hexosen aufzunehmen.

3.1.1 Deletion von *AGT1*, *MPH2* und *MPH3*

In der *hxt1-17 gal2*-Deletionsmutante ließ sich keine Glukoseaufnahmeaktivität mehr nachweisen, allerdings zeigte der Stamm nach Wachstum auf Maltosemedium noch eine beträchtliche Glukoseverbrauchsrate (Wieczorke *et al.*, 1999). Im Gegensatz zum Wildtyp verringerte sich die Glukoseverbrauchsrate des *hxt1-17 gal2*-Stammes langsam und stagnierte nach 15 h, als etwa die Hälfte der Glukose im Medium verbraucht war. Dies deutet auf die Anwesenheit weiterer Transportproteine hin, die den Glukosetransport vermitteln können, deren Expression aber durch Glukose reprimiert wird (Wieczorke *et al.*, 1999).

Um diese möglichen Transporter zu identifizieren, wurden die verbleibenden 16 Proteine der Zuckerpermease-Familie der Hefe (Abb. 1) in 2 μ -Plasmide hinter den *MET25*-Promotor kloniert und im *hxt1-17 gal2*-Deletionsstamm überexprimiert. Es zeigte sich, daß die Überexpression von drei Proteinen der Maltosepermease-Unterfamilie, *Agt1*, *Mph2* und *Mph3*, das Wachstum der Zellen auf Glukosemedium wiederherstellen konnte.

Um einen vollständigen und hinsichtlich der Bildung von Glukose-positiven Suppressormutanten stabilen Hexosetransporter-defizienten Hefestamm zu erhalten, wurden auch diese Gene in dem *hxt1-17 gal2*-Mutantenstamm nach der in Abschnitt 2.26 beschriebenen Methode deletiert. Für die PCR-Synthese der Deletionskassetten wurden die Oligonukleotidpaare s1-lagt1/s2-agt1, s1-mph2/s2-mph2 und s1-mph3/s2-mph3 bzw. für die Überprüfung der Deletionen die Oligonukleotide a1-agt1/a4-agt1 sowie a1-m2m3/a4-m2m3 eingesetzt (Tab. 7). Der daraus resultierende *hxt1-17 gal2 agt1 mph2 mph3*-Deletionsstamm (*hxt⁻ mph⁻*) wies keine restliche Glukoseverbrauchsaktivität mehr auf und zeigte auch nach mehrtägiger Inkubation bei 30°C auf Glukosemedium kaum mehr Bildung sekundärer Suppressormutationen (Wieczorke *et al.*, 1999).

3.1.2 Untersuchung der Expression von *AGT1*

Das *AGT1*-Gen der Hefe kodiert für einen generellen α -Glukosidtransporter, dessen Substratspektrum neben Trehalose und Saccharose auch Maltose umfaßt (Han *et al.*, 1995; Stambuk *et al.*, 1998; 1999; Plourde-Owobi *et al.*, 1999). Um die transkriptionelle Regulation von *AGT1* zu untersuchen, wurde der offene Leseraster des Gens durch eine *lacZ::kanMX*-Reporterkassette ersetzt (2.26), wobei nur die ersten 48 bp des ursprünglichen kodierenden Bereichs erhalten blieben und in das Leseraster des *lacZ*-Gens übergingen. Im Anschluß wurde die spezifische Aktivität der β -Galaktosidase auf unterschiedlichen Kohlenstoffquellen bestimmt (2.24.1). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Spezifische β -Galaktosidaseaktivität ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein) einer genomisch integrierten *AGT1prom-lacZ*-Fusion nach Anzucht der Zellen auf verschiedenen Kohlenstoffquellen bis in die logarithmische Wachstumsphase (Hefestamm RWY13).

C-Quelle	spez. Aktivität
2% Glukose	13,2
2% Saccharose	12,0
1% Ethanol	172,7
1% Maltose	1382,1

Es zeigte sich, daß das *AGT1*-Gen stark durch Maltose induziert wird, jedoch dem Mechanismus der Glukoserepression unterliegt. Diese Daten implizieren eine Maltose-vermittelte Induktion von Agt1 (und möglicherweise auch der anderen Maltosepermease-Homologen Mph2 und Mph3), wodurch sich die restliche Glukoseverbrauchsaktivität des *hxt1-17 gal2*-Deletionsstammes während des Wachstums in Maltosemedium erklären läßt. Die einsetzende Glukoserepression nach dem Umimpfen der Zellen von Maltose- in Glukosemedium führt zu einer

Einstellung des Glukoseverbrauchs und des Wachstums (Wieczorke *et al.*, 1999). Saccharose, die extrazellulär durch das Enzym Invertase in Fruktose und Glukose hydrolysiert wird, konnte im Versuch ebenfalls die Induktion des *AGT1*-Promotors unterdrücken. Vermutlich vermittelt Saccharose nach Aufnahme der freigesetzten Hexosen auch die Glukoserepression. Im Gegensatz dazu ist der *AGT1*-Promotor in Gegenwart einer neutralen Kohlenstoffquelle wie Ethanol dereprimiert und zeigt eine basale Aktivität.

3.1.3 Analyse der Funktion von *Agt1*, *Mph2* und *Mph3* bei der Aufnahme von Saccharose

Die Maltosepermease-Familie bildet eine Untergruppe der Hexostransporter-Familie und umfaßt neben *Mal1* die Proteine *Agt1*, *Mph2* und *Mph3*. Bislang wurde lediglich die Transportaktivität des α -Glukosidtransporters *Agt1* in Hinblick auf den Transport unterschiedlicher Disaccharide sowie die der Maltosepermease *Mal1* näher untersucht (Han *et al.*, 1995; Stambuk *et al.*, 1998; 1999; Plourde-Owobi *et al.*, 1999). Hingegen ist über die Substratspezifität der beiden anderen Mitglieder der Maltosepermease-Familie, *Mph2* und *Mph3*, noch wenig bekannt. In einem Ansatz, über funktionelle Komplementation in Hefe pflanzliche Saccharosetransporter zu identifizieren, wurde der Transkriptionsfaktor *StPCP1* isoliert (Hermesdorf *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von *StPCP1* in dem Hefestamm EBY.VW202 (*hxt⁻ Δ suc2 SuSy*) dessen Wachstumsdefekt auf Saccharose-Medium durch Induktion endogener α -Glukosidtransporter komplementieren konnte. Aufgrund einer Deletion des *SUC2*-Gens besaß dieser Stamm keine extra- und intrazelluläre Invertase-Aktivität mehr, exprimierte jedoch eine zytoplasmatische Saccharose-Synthase („SuSy“) aus Kartoffel. Die Komplementation korrelierte mit einer Induktion der Transkription der Gene *MPH2* und *MPH3*. Beide Proteine sind zu 55% identisch zu *Agt1*, das in dem Stamm EBY.VW202 deletiert worden war, und zeigen auf Nukleotidebene 99% Identität.

Um die Transportaktivität zu testen, wurden *Mph2*, *Mph3*, *Agt1* sowie das Hexosetransporter-ähnliche Protein *Stl1* in dem Hefestamm EBY.VW202 hinter dem starken *MET25*-Promotor überexprimiert und das Wachstum des Stammes auf Medium mit Saccharose als einziger Kohlenstoffquelle untersucht (Abb. 4). Übereinstimmend mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen, in denen eine Saccharose-Transportaktivität des *Agt1*-Proteins gefunden worden war (Han *et al.*, 1995; Stambuk *et al.*, 1998; 1999; Plourde-Owobi *et al.*, 1999), ermöglichte die Expression von *Agt1* das Wachstum der Transformanten auf Saccharosemedium. *Mph2*- und *Mph3*-Transformanten von EBY.VW202 zeigten ebenfalls einen positi-

ven Wachstumsphänotyp (Abb. 4). Somit kann den bislang kaum charakterisierten Proteinen Mph2 und Mph3 erstmal auch eine Funktion als Saccharosetransporter in Hefe zugeordnet werden. Im Gegensatz dazu konnte der Wachstumsdefekt durch die Überexpression von Stl1, das in EBY.VW202 ebenfalls deletiert worden war, nicht komplementiert werden. Demnach hat die heterologe Expression des pflanzlichen Transkriptionsfaktors StPCP1 in dem Hexosetransport-defizienten Hefestamm EBY.VW202 die Induktion der endogenen Saccharosetransporter Mph2 und Mph3 zur Folge, wodurch unabhängig von der Anwesenheit des Stl1-Proteins das Wachstum des Stammes auf Saccharosemedium hergestellt wird (Hermesdorf *et al.*, 2001).

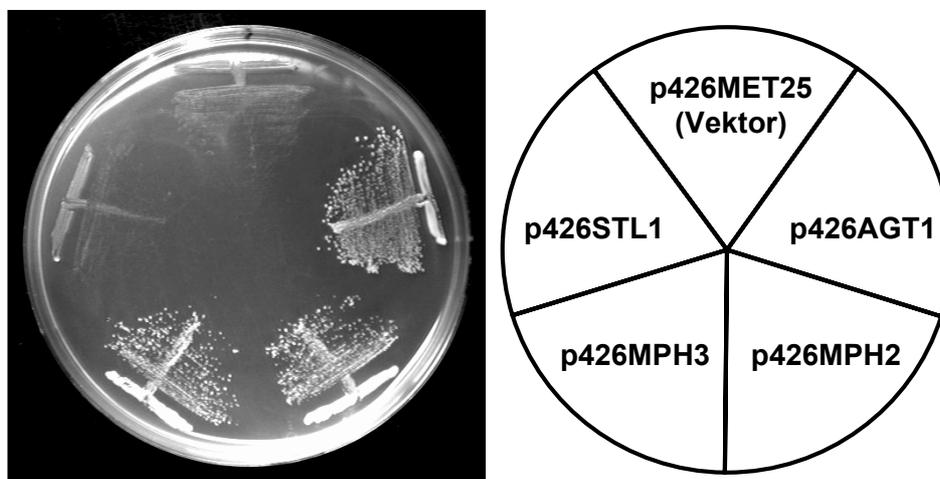


Abb. 4: Überexpression von Agt1, Mph2, Mph3 und Stl1 in EBY.VW202, sowie mit leerem Vektor p426MET25 transformierte Kontrollzellen. Die Zellen wurden für 3 Tage bei 30°C auf synthetischem Kompletmedium mit 2% Saccharose ohne Uracil, Leucin und Methionin inkubiert.

3.2 Heterologe Expression von Gukosetransportern aus Säugetieren in dem Hexosetransporter-defizienten Hefestamm

Die Charakterisierung von Glukosetransportern aus Säugetieren stellt eine wichtige Aufgabe dar, um das Verständnis von Krankheiten zu erweitern, die mit einem Defekt in der Glukose-Homeostasis einhergehen, wie z.B. Diabetes Mellitus oder das Fanconi-Bickel Syndrom (James und Piper, 1994; Manz *et al.*, 1987; Santer *et al.*, 1998). Allerdings werden die Untersuchungen bestimmter GLUT-Transporter, beispielsweise in Insulin-sensitiven Geweben, durch das Vorhandensein weiterer endogener Isoformen und den schnellen Glukosemetabolismus erschwert. Um dies zu umgehen, wurden in der Vergangenheit alternative heterologe Expressionssysteme wie *Xenopus*-Oocyten, Insektenzellen, Zellen aus

Zellkulturen und auch Hefezellen eingesetzt (Baldwin, 1993; Mueckler, 1994; Kasahara und Kasahara, 1996; 1997). Jedoch wiesen diese Systeme ebenfalls Probleme auf: unzureichende Aktivität der heterolog exprimierten Transporter, intrinsische Glukosetransporter dieser Systeme, intrazelluläre Retention einer beträchtlichen Menge der Transporter oder Produktion inaktiver Proteine (Kasahara und Kasahara, 1996). Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Hexosetransportdefizienter Hefestamm als alternatives heterologes Expressionssystem ohne endogene Glukosetransporter etabliert werden, durch den die Schwierigkeiten anderer Systeme bei der Charakterisierung von Glukosetransportern aus Säugtieren umgangen werden können.

3.2.1 Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 aus Ratte

Um die Aktivität heterolog exprimierter Glukosetransporter aus Säugetieren in Hefe zu untersuchen, wurde der Hefestamm EBY.18ga (hxt⁻) mit den Plasmiden YEpH2-rGLUT1 und YEpH2-rGLUT4 transformiert. Diese 2 μ -Plasmide tragen das GLUT1- bzw. GLUT4-Gen der Ratte unter Kontrolle des Glukose-induzierbaren *HXT2*-Promotors der Hefe (Wieczorke *et al.*, 2001). Die Transformanten wurden auf synthetischem Medium ohne Tryptophan und mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle herangezogen und auf das gleiche Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen von Glukose (5 mM, 10 mM, 50 mM und 100 mM) anstelle der Maltose replikaplattiert. Auch nach einwöchiger Inkubation bei 30°C zeigten die Transformanten kein Wachstum auf den verschiedenen Glukosemedien. Somit sind die GLUT1- und GLUT4-Glukosetransporter der Ratte offensichtlich nicht in der Lage, den Glukoseaufnahmedefekt des Hexosetransportdefizienten Stammes EBY.18ga zu komplementieren.

3.2.2 Untersuchung der intrazellulären Lokalisierung von GLUT1 und GLUT4

Frühere Immunfluoreszenz-Experimente hatten gezeigt, daß die Glukosetransporter der Ratte zwar in Hefezellen exprimiert werden können, aber offensichtlich in intrazellulären Strukturen zurückgehalten werden. Die Transporter waren daher nicht in der Lage, die Plasmamembran zu erreichen und konnten somit auch nicht zur Glukoseaufnahme beitragen (Kasahara und Kasahara, 1996; 1997). Diese Untersuchungen waren in einem Hefestamm durchgeführt worden, der lediglich partielle Deletionen in einigen endogenen Glukosetransportern aufwies.

Um zu prüfen, ob auch in EBY.18ga (hxt⁻) eine Mislokalisierung von GLUT1 und GLUT4 für das ausbleibende Wachstum der Zellen verantwortlich war, wurde die kodierende Sequenz für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) an die car-

boxyterminalen Enden des GLUT1- bzw. GLUT4-Gens fusioniert. Die Fusion wurde nach der in Abschnitt 2.27 beschriebenen Methode durch *in vivo*-Rekombination durchgeführt. Für die PCR-Amplifizierung der entsprechenden DNA-Fragmente wurden die Oligonukleotidpaare c1-G1GFP/c4-G1GFP bzw. c1-G4GFP/c4-G4GFP verwendet. Die PCR-Produkte wurden zusammen mit *EcoRI*-linearisiertem Vektor p426MET25-GFP in Hefe transformiert und die Plasmide wie beschrieben präpariert. Im Anschluß wurden die resultierenden Plasmide YEprGLUT1-GFP und YEprGLUT4-GFP in den Glukoseaufnahme-defizienten Stamm EBY.18ga transformiert und Transformanten auf synthetischem Maltosemedium ohne Uracil selektiert. Erneut zeigte sich nach Replikaplattieren der Zellen kein Wachstum auf Medien mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen. Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung ergab, daß der größte Anteil des GLUT4-GFP-Proteins in intrazellulären Strukturen zurückgehalten wurde, die dem endoplasmatischen Retikulum oder endosomenartigen Organellen ähnelten (Abb. 5). Diese Lokalisierung steht im Einklang mit früheren Beobachtungen von Kasahara und Kasahara (1997). Im Gegensatz dazu und abweichend von vorhergehenden Ergebnissen (Kasahara und Kasahara, 1996) fand sich die Mehrheit von GLUT1-GFP jedoch an der Zelloberfläche (Abb. 5).

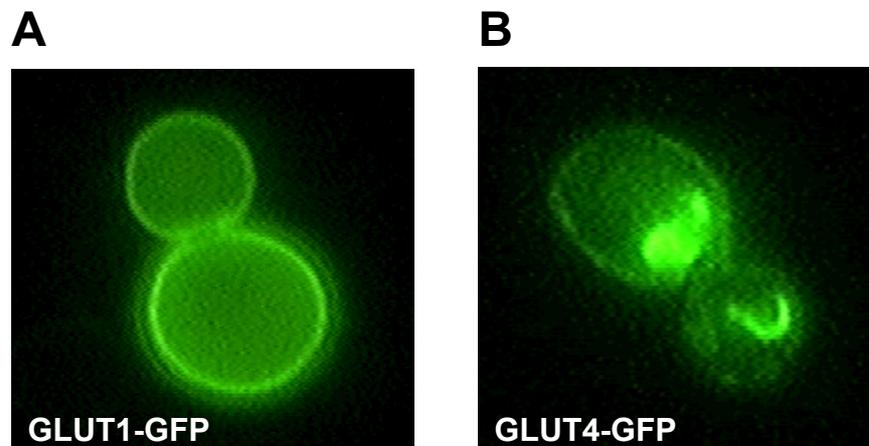


Abb. 5: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine **(A)** GLUT1-GFP und **(B)** GLUT4-GFP in dem Hefestamm EBY.18ga (*hxt⁻*). Die Zellen wurden in synthetischem Komplettmedium mit 1% Maltose ohne Uracil und Methionin bis in die logarithmische Phase herangezogen.

3.2.3 Suche nach GLUT1- und GLUT4-Suppressormutationen

Wie bereits beschrieben konnte gezeigt werden, daß weder die Expression des GLUT1- noch des GLUT4-Proteins der Ratte in dem *hxt⁻*-Hefestamm EBY.18ga dessen Wachstumsdefekt auf Glukosemedien komplementieren konnte. Um dennoch eine Möglichkeit zu finden, diese heterologen Proteine funktionell in Hefe

exprimieren zu können, wurden GLUT1- bzw. GLUT4-Transformanten (Plasmide YEpH2-rGLUT1 und YEpH2-rGLUT4) des Stammes auf Agarplatten mit synthetischem Medium ohne Tryptophan und mit 10 mM Glukose als einziger Kohlenstoffquelle ausplattiert. Nach Bestrahlung mit einer subletalen Dosis UV-Licht wurden die Zellen für 7-14 Tage bei 30°C inkubiert. Während im Fall der GLUT4-Transformanten keine Suppressorkolonien erhalten wurden, zeigten sich auf den Platten mit GLUT1-Transformanten mehrere Hefekolonien, die die Fähigkeit zurückerlangt hatten, auf Glukosemedium zu wachsen.

3.2.4 Analyse von GLUT1-Suppressormutanten

Mögliche Gründe für die Wiederherstellung des Wachstums von GLUT1-Transformanten des Stammes EBY.18ga auf Glukosemedium nach erfolgter UV-Mutagenese konnten sein: (a) eine Mutation in der GLUT1-Sequenz, die GLUT1 in einen in Hefe funktionellen Glukosetransporter konvertiert hatte, (b) eine Mutation im Genom der Hefe, die dazu führte, daß GLUT1 aktiv wird oder (c) eine Mutation im Hefegenom, durch die ein endogenes Hefeprotein in einen Glukosetransporter konvertiert oder die Expression eines unbekanntes „stillen“ Glukosetransporters induziert worden war.

Um zwischen diesen drei Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurden fünf der GLUT1-Suppressormutanten in nicht-selektivem YEP-Maltosemedium über mehr als 15 Generationen herangezogen. Alle Zellen, die ihr Plasmid verloren hatten, waren daraufhin nicht mehr in der Lage, auf Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Dies deutete darauf hin, daß das zuvor beobachtete Wachstum von der Anwesenheit des GLUT1-Proteins abhängig war. Nach Retransformation des ursprünglichen Wildtyp-Plasmids YEpH2-rGLUT1 in diese Zellen erlangte einer der fünf Hefestämme die Fähigkeit zurück, auf Glukosemedium zu wachsen. Der Effekt, der eine funktionelle GLUT1-Expression bislang verhindert hatte, war in diesem Stamm offenbar durch eine genomische Mutation aufgehoben worden. Das mutante Allel wurde als *fgy1-1* bezeichnet („functional expression of GLUT1 in yeast“) und der entsprechende Hefestamm mit EBY.S7 benannt. Die YEpH2-rGLUT1-Plasmide wurden aus den übrigen vier Stämmen reisoliert, in *E. coli* amplifiziert und in den ursprünglichen Glukosetransportdefizienten Stamm EBY.18ga (*hxt⁻*) zurücktransformiert. Alle vier Plasmide waren in der Lage, das Wachstum des Stammes auf synthetischem Medium mit 10 mM Glukose als Kohlenstoffquelle wiederherzustellen. Demzufolge mußten Mutationen in diesen Plasmiden (höchstwahrscheinlich innerhalb der GLUT1-kodierenden Sequenzen) für den beobachteten Wachstumseffekt verantwortlich sein.

3.2.5 Isolierung genomischer Mutationen, durch die GLUT4 in einen funktionellen Glukosetransporter konvertiert wird

Offensichtlich führt eine genomische Mutation im Stamme EBY.S7 dazu, daß GLUT1 in Hefe zu einem funktionellen Glukosetransporter konvertiert wird, der die Aufnahme von Glukose über die Plasmamembran in die Zelle katalysieren kann (3.2.4). Wie beschrieben konnten jedoch keine entsprechenden Mutanten isoliert werden, die GLUT4 in ähnlicher Weise in eine funktionelle Form hätten überführen können. Eine Erklärung für das fehlende Auftreten von GLUT4-Suppressormutanten könnte in der beobachteten Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine liegen. Da sich GLUT1-GFP in EBY.18ga bereits an der Zelloberfläche befindet, war offenbar eine Mutation, genomisch oder plasmidkodiert, ausreichend, eine funktionelle Expression von GLUT1 zu gewährleisten und den Glukosetransport zu vermitteln. Im Gegensatz dazu zeigte GLUT4-GFP eine intrazelluläre Akkumulation in zellinternen Strukturen, die zusätzlich zu einer „aktivierenden Mutation“ wie *fgy1-1* weitere Mutationen erforderlich machen könnte, um gleichfalls eine Lokalisierung an die Zelloberfläche zu erreichen.

Nach Transformation des Plasmids YEpH2-rGLUT4 in den Stamm EBY.S7 (*hxt⁻ fgy1-1*) zeigten die Zellen ein sehr langsames Wachstum auf Medium mit 10 mM Glukose als einziger Kohlenstoffquelle. Im Gegensatz zu Kontrollzellen mit YEpH2-rGLUT4 in EBY.18ga (*hxt⁻*) entwickelten die Transformanten des Stammes EBY.S7 zahlreiche Suppressorkolonien. Eine Analyse von neun Suppressormutanten, wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben, wies diese allesamt als genomische Mutationen aus. Die neuen mutanten Allele wurden als *fgy41* bis *fgy49* bezeichnet („functional expression of GLUT4 in yeast“), während die korrespondierenden Hefestämme mit EBY.F4-1 bis EBY.F4-9 benannt wurden. YEpH2-rGLUT4-Transformanten dieser Stämme wurden durch funktionelle Expression von GLUT4 wieder in die Lage versetzt, auf Medium mit 10 mM Glukose als Kohlenstoffquelle wachsen zu können. Mit leerem Vektor transformierte Kontrollzellen zeigten hingegen kein Wachstum.

3.2.6 Expression der menschlichen GLUT1- und GLUT4-Glukosetransporter

Die bisherigen Untersuchungen waren mit den Glukosetransportern GLUT1 und GLUT4 der Ratte durchgeführt worden. Beide Proteine sind sehr eng mit ihren entsprechenden menschlichen Homologen verwandt und zeigen auf Proteinebene 98% (GLUT1) bzw. 95% (GLUT4) Identität (Pessin und Bell, 1992). In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob bei heterologer Expression der Glukosetransporter des Menschen in Hefe Unterschiede zu den bislang getesteten Isoformen aus der Ratte erkennbar werden würden.

Die humanen Gene für GLUT1 und GLUT4 wurden in einer ersten PCR-Reaktion mit den Oligonukleotidpaaren hsG1-F7/t2-hsG1 bzw. hsG4-F7/t2-hsG4 und den Plasmiden pGEM4Z-hsGLUT1 bzw. pGEM4Z-hsGLUT4 als DNA-Vorlagen über 10 Zyklen amplifiziert. Im Anschluß wurden die PCR-Produkte für weitere 10 Zyklen mit den Primerpaaren t71-ORFs/t2-hsG1 bzw. t71-ORFs/t2-hsG4 amplifiziert. Durch kurze 5'- und 3'-terminale Sequenzübereinstimmungen dieser PCR-Produkte zu *HXT7*-Promotor und *CYC1*-Terminator des Plasmids YEp4H7 konnten die GLUT1- und GLUT4-Expressionsplasmide YEp4H7-hsGLUT1 und YEp4H7-hsGLUT4 nach *in vivo*-Rekombination in dem Hefestamm EBY.18ga und Selektion auf Maltosemedium ohne Uracil aus prototrophen Transformanten isoliert werden.

Tab. 9: Wachstum von GLUT1- und GLUT4-Transformanten unterschiedlicher Hexosetransportdefizienter Hefestämme auf synthetischem Komplettmedium mit 10 mM Glukose als Kohlenstoffquelle. (++) sehr gutes Wachstum, (+) gutes Wachstum, (+/-) mäßiges Wachstum, (-) kein Wachstum. Die Zellen wurden für zwei Tage bei 30°C inkubiert.

Stamm	Genotyp	Plasmid	Wachstum
EBY.18ga	<i>hxt⁻</i>	YEp4H7-hsGLUT1	-
		YEp4H7-hsGLUT4	-
EBY.VW4000	<i>hxt⁻ mph⁻</i>	YEp4H7-hsGLUT1	-
		YEp4H7-hsGLUT4	-
EBY.S7	<i>hxt⁻ fgy1-1</i>	YEp4H7-hsGLUT1	++
		YEp4H7-hsGLUT4	+
		YEpH2-hsGLUT4	+/-
EBY.F4-1	<i>hxt⁻ fgy1-1 fgy41</i>	YEp4H7-hsGLUT1	++
		YEp4H7-hsGLUT4	++
		YEpH2-hsGLUT4	+

Die Plasmide wurden in die Stämme EBY.18ga (*hxt⁻*), EBY.VW4000 (*hxt⁻ mph⁻*), EBY.S7 (*hxt⁻ fgy1-1*) und EBY.F4-1 (*hxt⁻ fgy1-1 fgy41*) transformiert. Während beide Plasmide weder das Wachstum von EBY.18ga noch von EBY.VW4000 auf Glukosemedium wiederherstellen konnten, wurde der Wachstumsdefekt der Stämme EBY.S7 und EBY.F4-1 komplementiert (Tab. 9). Somit war das menschliche GLUT4-Protein im Gegensatz zum GLUT4 der Ratte bereits in einem Hefestamm funktionell, der lediglich die Mutation *fgy1-1* trug. Um zu testen, ob dieser Effekt auf die sehr starke Überexpression von GLUT4 hinter dem *HXT7*-Promotorfragment zurückzuführen war, wurde das menschliche GLUT4-Gen auch

unter Kontrolle des im Vergleich schwächeren *HXT2*-Promotors exprimiert (wie ursprünglich auch das GLUT4 der Ratte). Menschliches GLUT4 wurde zunächst in einer PCR-Reaktion (18 Zyklen) mittels der Primer c1-HXT2p-hsG4 und c4-hsG4-GAL2t synthetisiert und darauffolgend durch homologe Rekombination in Hefe gegen das GLUT1 der Ratte in dem Plasmid YEpH2-rGLUT1 (geschnitten mit *EcoRI* und *ClaI*) ausgetauscht. Nach Transformation dieses Plasmids YEpH2-hsGLUT4 in die Stämme EBY.S7 und EBY.F4-1 war nur noch ein sehr langsames Wachstum der EBY.S7-Transformanten zu beobachten, wohingegen die Transformanten von EBY.F4-1 gutes Wachstum auf 10 mM Glukosemedium zeigten (Tab. 9), vergleichbar dem Wachstum mit dem GLUT4 der Ratte. Diese Ergebnisse zeigen, daß lediglich geringe Unterschiede zwischen der heterologen Expression der GLUT-Proteine des Menschen und denen der Ratte bestehen. Sehr starke Überproduktion von GLUT4 führt dabei offenbar bereits in der *fgy1-1*-Mutante dazu, daß genügend Protein zur Plasmamembran gelangen kann, um Glukoseaufnahme und Wachstum des Stammes auf Glukosemedium zu vermitteln.

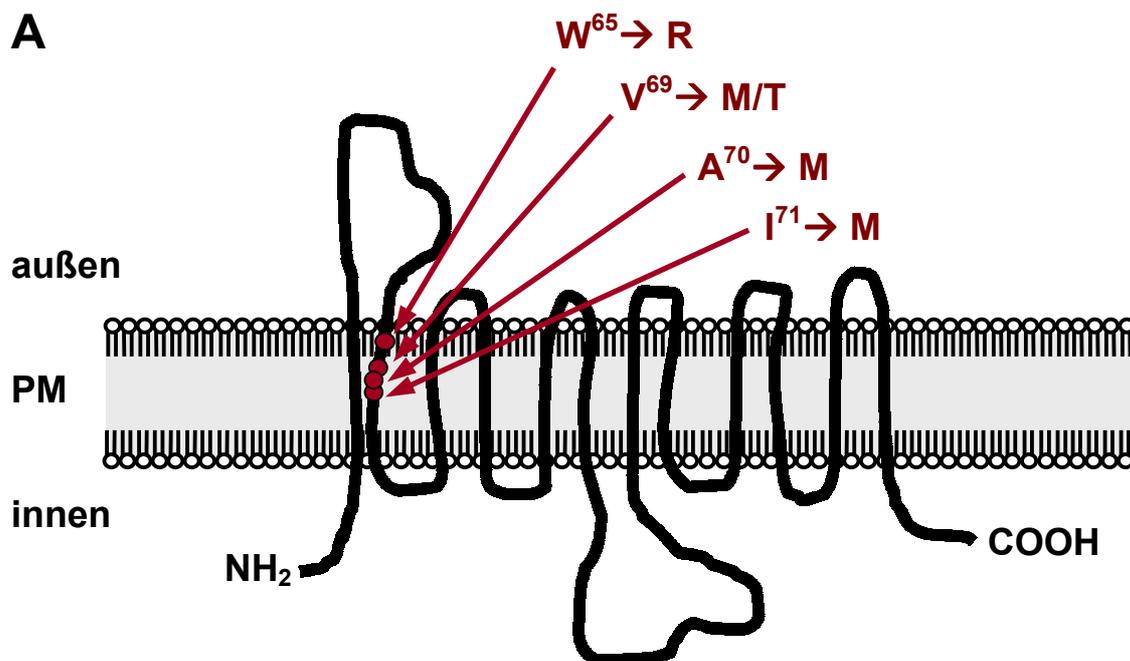
3.2.7 Charakterisierung funktioneller Allele von GLUT1

Im Rahmen des in Abschnitt 3.2.4 beschriebenen Screens konnten neben der genomischen Suppressormutation *fgy1-1* auch GLUT1-Plasmide isoliert werden, die in der Lage waren, infolge einer plasmidkodierten Mutation das Wachstum von Hexosetransport-defizienten Hefemutanten auf Medium mit Glukose wiederherzustellen. Die kompletten GLUT1-kodierenden Sequenzen der vier isolierten Suppressorplasmide wurde sequenziert. Dabei stellte sich heraus, daß in allen Fällen die GLUT1-Sequenzen im Vergleich zu der Wildtyp-Sequenz spezifische Austausche einzelner Basenpaare aufwiesen. Dies führte zur Veränderung spezifischer Aminosäuren in den korrespondierenden Proteinsequenzen. Alle Aminosäure-Austausche waren in der ersten Hälfte der zweiten vorhergesagten Transmembrandomäne lokalisiert (Abb. 6, S. 52). Ein Plasmid beinhaltete einen Austausch der Base Thymin₁₉₃ der GLUT1-kodierenden Region gegen Adenin, wodurch Tryptophan₆₅ durch Arginin ersetzt worden war. In zwei Plasmiden war Guanin₂₀₅ durch Adenin ersetzt worden, was zu einem Austausch von Valin₆₉ gegen Methionin führte. Das vierte Plasmid wies infolge einer Mutation von Cytosin₂₁₃ zu Guanin einen Austausch von Isoleucin₇₁ gegen Methionin auf.

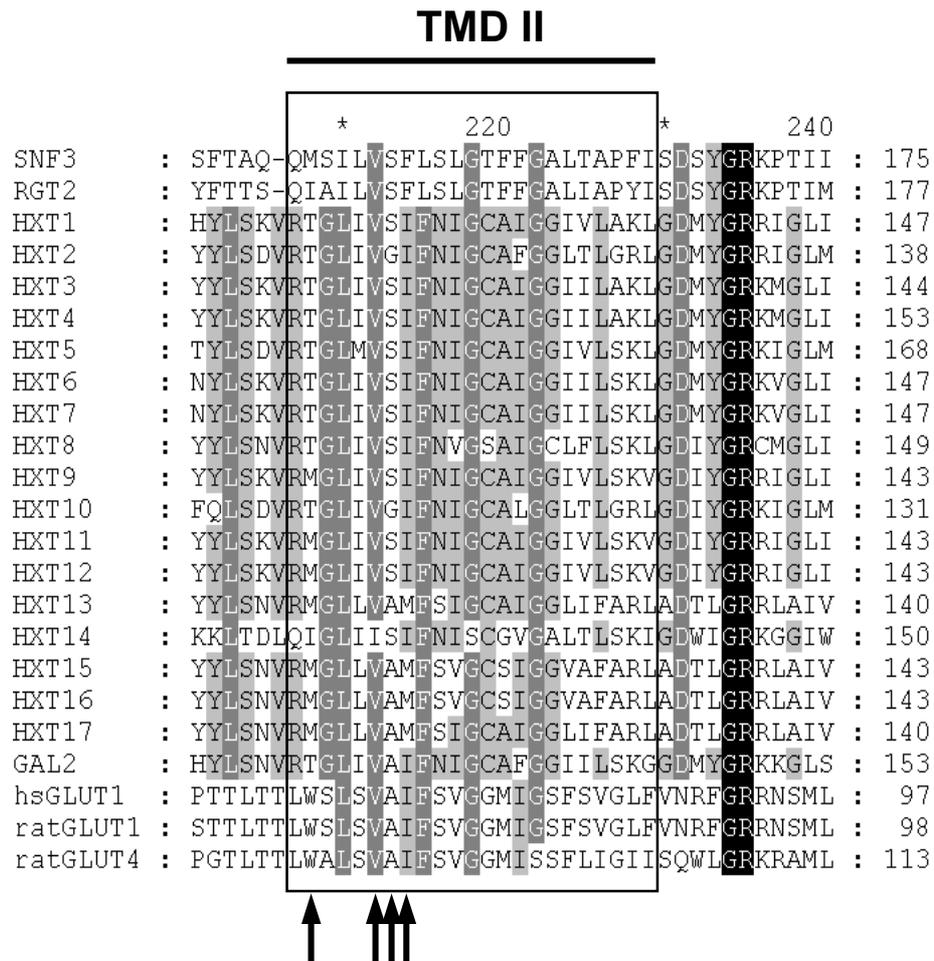
Um diese Region von GLUT1 näher zu studieren, wurden durch *in vitro*-Mutagenese weitere Austausche vorgenommen. Als mutagene Primer für die in Abschnitt 2.16 beschriebene Methode kamen die Oligonukleotide *glutthr*, *glutphe*, *glutmet1* bzw. *glutmet2* in Kombination mit den Primern *seqhxt2* und *seq2gal2*

zum Einsatz. Die mutagenisierten PCR-Produkte wurden benutzt, um das GLUT1-Wildtypgen der Ratte in Plasmid YEpH2-rGLUT1 über homologe Rekombination in dem Hefestamm EBY.S7 zu ersetzen (Wieczorke *et al.*, 2001). Im Anschluß wurden die erfolgreichen Austausche durch Sequenzierung der Plasmidinserts verifiziert. Auf diese Weise wurde Alanin₇₀ gegen Methionin ausgetauscht und Valin₆₉ durch Threonin, Phenylalanin, sowie als interne Kontrolle (wie bei der spontan erhaltenen Mutation) durch Methionin ersetzt. Die mutagenisierten Plasmide, ein Plasmid mit Wildtyp-GLUT1 sowie der leere Kontrollvektor pTV3e wurden in den *hxt⁻*-Stamm EBY.18ga transformiert, die Zellen auf synthetischem Medium mit Maltose ohne Tryptophan ausplattiert und die Transformanten auf das gleiche Medium mit 10 mM Glukose anstelle der Maltose als einziger Kohlenstoffquelle replikaplattiert. Während GLUT1^{V69M} und GLUT1^{A70M} das Wachstum der Transformanten auf Glukosemedium und somit Glukoseaufnahme-Aktivität vermitteln konnten, war dies für Wildtyp-GLUT1, GLUT1^{V69T} oder den leeren Kontrollvektor nicht der Fall (Tab. 10). Zellen, die GLUT1^{V69F} enthielten, zeigten ein mäßiges Wachstum.

Abb. 6: (A) Positionen einzelner Austausche in der Aminosäuresequenz des GLUT1-Proteins der Ratte, die zu einer funktionellen Expression dieses Glukosetransporters in Hefe führen. Die Mutationen bilden ein Cluster in der ersten Hälfte der vorhergesagten zweiten transmembranen Helix (Mueckler *et al.*, 1985). (B) Vergleich der Aminosäuresequenzen der Region um Transmembrandomäne II zwischen Glukosetransportern aus Hefe- und Säugetierzellen. Die Positionen der Austausche innerhalb der GLUT1-Sequenz sind durch Pfeile angegeben.



B



Tab. 10: Wachstum des Glukoseaufnahme-defizienten Stammes EBY.18ga (*hxt⁻*) nach Transformation mit mutagenisierten GLUT1-Plasmiden, Wildtyp-GLUT1 sowie leerem Kontrollvektor. Die Zellen wurden für zwei Tage bei 30°C auf synthetischem Komplettmedium mit 10 mM Glukose ohne Tryptophan inkubiert. (+) gutes Wachstum, (+/-) mäßiges Wachstum, (-) kein Wachstum.

Plasmid	Aminosäureaustausch	Wachstum
pTV3e	leerer Kontrollvektor	-
YEph2-rGLUT1	Wildtyp-GLUT1	-
pTV-HXT2p-GLUT1 ^{V69M}	Valin ₆₉ → Methionin	+
pTV-HXT2p-GLUT1 ^{V69F}	Valin ₆₉ → Phenylalanin	+/-
pTV-HXT2p-GLUT1 ^{V69T}	Valin ₆₉ → Threonin	-
pTV-HXT2p-GLUT1 ^{A70M}	Alanin ₇₀ → Methionin	+

Verschiedene Austausche in der Aminosäuresequenz der zweiten Transmembrandomäne von GLUT1 gegen Aminosäuren mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften führen somit zu einem funktionellen Protein in Hefe, das die Glu-

koseaufnahme eines hxt^- -Mutantenstammes wiederherstellen kann. Interessanterweise waren im Gegensatz zu einem vielleicht erwarteten Austausch einer nicht-konservierten gegen eine in den Hefe-Glukosetransportern konservierte Aminosäure vor allem solche Reste von den „aktivierenden“ Mutationen betroffen, die sowohl in den Glukosetransportern der Hefe als auch in dem GLUT1-Protein der Ratte hochkonserviert sind (vergl. Abb. 6B). Da offensichtlich weder die Art der ausgetauschten Aminosäure (chemische und sterische Eigenschaften) noch die genaue Position hochspezifisch zu sein scheint, liegt die Schlußfolgerung nahe, daß eher die Gesamtstruktur dieser Region von GLUT1 für die korrekte Insertion des Proteins in die Plasmamembran oder dessen Aktivität in Hefe ausschlaggebend ist.

3.2.8 Analyse der genomischen Suppressormutation *fgy1-1*

Ziel der folgenden Untersuchungen war die Identifizierung der in dem Stamm EBY.S7 vorliegenden Mutation. Dieser Hefestamm konnte bei der Suche nach GLUT1-Suppressormutationen isoliert werden (3.2.4), worauf das mutante Allel die Bezeichnung *fgy1-1* für „functional expression of GLUT1 in yeast“ erhielt.

3.2.8.1 Kreuzungsanalyse

Um zu bestimmen, ob es sich bei der genomischen *fgy1*-Mutation um eine dominante oder rezessive Mutation handelte, wurde der Mutantenstamm mit dem korrespondierenden parental Hefestamm gekreuzt (2.25) und der resultierende Phänotyp analysiert. Zunächst wurde der Stamm EBY.18ga (hxt^-) mit einem Plasmid transformiert, welches das Gen für die HO-Endonuklease der Hefe trug. Die Aktivität dieses Enzyms führte in einigen Zellen zu einer Änderung des Paarungstyps und darauffolgend zur Paarung dieser Zellen mit Zellen des entgegengesetzten Paarungstyps. Einer der hervorgegangenen homozygot-diploiden Stämme wurde sporuliert und durch die anschließende Tetradenanalyse konnten EBY.18ga-Mutanten des Paarungstyps α isoliert werden. Dieser Stamm EBY18ga ($MAT\alpha hxt^-$) wurde nun mit dem Stamm EBY.S7 ($MATa hxt^- fgy1-1$) gekreuzt, wodurch der heterozygot-diploide Stamm EBY.S7d ($MATa/\alpha hxt^- fgy1-1/FGY1$) erhalten wurde. Nach Transformation von EBY.S7d mit dem Plasmid YEpH2-rGLUT1 waren die Transformanten weder in der Lage, auf Medium mit 0,2% Glukose zu wachsen, noch zeigten sie auf 1% Maltosemedium mit 5 mM 2-DOG eine Sensitivität gegenüber diesem toxischen Glukose-Analog. Nach der Aufnahme in die Zelle wird 2-DOG zwar noch zu 2-Desoxy-Glukose-6-Phosphat phosphoryliert und kann die Glukoserepression vermitteln, jedoch nicht weiter vergoren werden. Die letztendliche Toxizität wird auf eine Hemmung der Zellwandbildung zurückgeführt (Bieleley *et al.*, 1972; Heredia *et al.*, 1968). Demzufolge handelte es sich bei

fgy1-1 um eine rezessive Mutation, da die GLUT1-vermittelte Glukoseaufnahme in den heterozygot-diploiden Zellen durch das dominante *FGY1*-Wildtypallel unterdrückt wurde.

3.2.8.2 Komplementation von *fgy1-1* mit einer Genbank

Um das in dem Stamm EBY.S7 von einer rezessiven Mutation betroffene Gen zu identifizieren, wurden GLUT1-Transformanten von EBY.S7 zusätzlich mit je einer von zwei Genbanken transformiert (siehe Abschnitt 2.4). Die Transformanten wurden zunächst auf synthetischem Medium ohne Tryptophan und Uracil bzw. ohne Tryptophan und Leucin mit 1% Maltose als Kohlenstoffquelle herangezogen und danach auf das gleiche Basismedium replikaplattiert, das nun aber zusätzlich 5 mM 2-DOG enthielt. Das Prinzip des Tests ist schematisch in Abb. 7 dargestellt. Zellen, die neben dem GLUT1-Expressionsplasmid YEpH2-rGLUT1 ein beliebiges Plasmid der Genbank aufgenommen hatten, sollten nicht in der Lage sein, auf 2-DOG-haltigem Medium zu wachsen. Durch die genomische *fgy1-1*-Mutation ist GLUT1 in diesen Zellen aktiv und vermittelt die Aufnahme von toxischer 2-DOG. Im Gegensatz dazu sollten Zellen auf Maltosemedium mit 2-DOG wachsen können, wenn sie durch das Plasmid der Genbank das zu *fgy1-1* korrespondierende Wildtyp-Allel erhalten hatten. In diesem Fall würde die von rezessivem *fgy1-1* vermittelte GLUT1-Aktivität durch das dominante Wildtyp-Allel unterdrückt werden. Da in die Zellen keine Glukose mehr aufgenommen werden kann, dient die im Medium enthaltene Maltose als Kohlenstoffquelle und die Zellen sollten eine Resistenz gegen 2-DOG zeigen. Als Gegenkontrolle wurde das Wachstum der Transformanten ebenfalls auf Medium mit 0,2% Glukose untersucht. Hier sollten 2-DOG-resistente „positive“ Klone im Gegensatz zu 2-DOG-sensitiven „negativen“ Klonen nicht wachsen können.

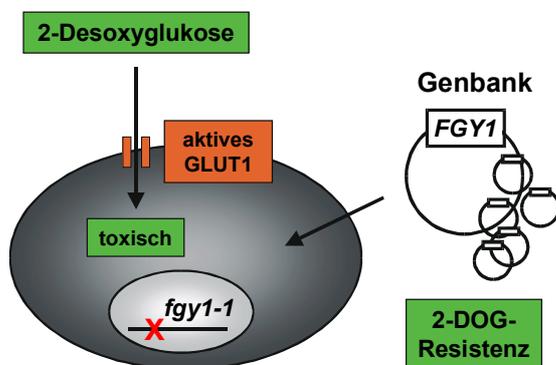


Abb. 7: Schematische Darstellung des Tests zur Klonierung von *FGY1* durch Komplementation des rezessiven Allels *fgy1-1* mit einer Genbank aus dem Stamm EBY.VW4000. Für eine positive Selektion wurde das Wachstum der Zellen auf YNB-Medium mit 1% Maltose und 5 mM 2-DOG getestet. Die Aufnahme von 2-DOG in *fgy1-1*-Zellen mit aktivem GLUT1 ist letal. Das dominante *FGY1*-Wildtypallel eines Genbankplasmids führt zu einer Inhibierung der GLUT1-vermittelten Glukoseaufnahme und bewirkt eine 2-DOG-Resistenz.

3.2.8.3 Isolierung und Charakterisierung von *YNL094w* als Multicopy-suppressor der *fgy1-1*-Mutation

Über diesen Versuchsansatz konnte ein Plasmid einer der Genbanken aus Hefe reisoliert werden, das als pRW7S-7 bezeichnet wurde. Durch Ansequenzierung beider Seiten des inserierten DNA-Fragments wurde ein ca. 7,8 kb großer Bereich genomischer DNA aus Chromosom XIV identifiziert. Nach Durchführung einer Restriktionsanalyse und Herstellung unterschiedlicher Subklone von pRW7S-7 stellte sich der DNA-Bereich des bislang kaum charakterisierten Gens *YNL094w* als für die Komplementation verantwortlich heraus. Das korrespondierende Plasmid enthielt den vollständigen *YNL094w*-Leserahmen mit Promotor- und Terminatorbereich als *EcoRV/StuI*-Fragment aus pRW7S-7 ligiert in den mit *SmaI*-linearisierten Vektor YEplac181 und wurde mit YEpYNL094w bezeichnet.

GLUT1-Transformanten von EBY.S7 mit YEpYNL094w zeigten im Gegensatz zu Kontrollzellen mit leerem Vektor Resistenz gegenüber 2-DOG auf 1% Maltosemedium, während das Wachstum auf Medium mit 0,2% Glukose als einziger Kohlenstoffquelle stark reduziert, obgleich nicht vollständig unterbunden wurde (Tab. 11). Es stellte sich jedoch heraus, daß *YNL094w* in der Lage war, in dem mit dem aktiven GLUT1-Allel GLUT1^{V69M} transformierten Hefestamm EBY.VW4000 (hxt⁻ mph⁻ *FGY1*) denselben Phänotyp hervorzurufen, wie in GLUT1-Transformanten von EBY.S7 (hxt⁻ *fgy1-1*) (Tab. 11). Somit handelte es sich bei *YNL094w* nicht um das gesuchte *FGY1*-Gen, sondern um einen sogenannten „Multicopy-Suppressor“. Die reine Überexpression eines solchen Gens könnte zwar den gewünschten Phänotyp hervorrufen, jedoch auf völlig andere Ursachen zurückzuführen sein, als der Effekt des ursprünglichen *FGY1*-Gens (z.B. durch Induktion sekundärer Faktoren, Abbau regulatorischer Proteine, Abbau von GLUT1 selbst, etc.). Würde es sich bei *YNL094w* tatsächlich um *FGY1* handeln, sollte dessen Expression im Stamm EBY.VW4000, der das Wildtyp-*FGY1*-Gen trägt, keinen Einfluß auf die Funktion von GLUT1^{V69M} ausüben. Für die Annahme, daß es sich bei *YNL094w* um einen „Multicopy-Suppressor“ handelt, spricht auch die Beobachtung, daß sich die Glukoseaufnahme bzw. das Wachstum auf Glukosemedium durch Überexpression von *YNL094w* nur partiell und nicht vollständig unterdrücken läßt. Dennoch scheint sich der Effekt von *YNL094w* spezifisch auf die Funktion von GLUT1 auszuwirken. Es ließ sich keine Beeinträchtigung des Wachstums von EBY.VW4000-Zellen auf Medium mit 0,2% Glukose bzw. keine 2-DOG-Resistenz beobachten, die zuvor mit Plasmiden transformiert worden waren, die die Gene für die Hefe-Glukosetransporter Hxt2 bzw. Hxt7 trugen (Tab. 11).

Tab. 11: Wachstum von Transformanten der Stämme EBY.S7 und EBY.VW4000 auf synthetischem Komplettmedium ohne Uracil und Tryptophan mit den angegebenen Kohlenstoffquellen bzw. in Anwesenheit von 5 mM 2-DOG. Die Zellen wurden für zwei Tage bei 30°C inkubiert. (+) gutes Wachstum, (+/-) mäßiges Wachstum, (-) kein Wachstum.

Stamm	Genotyp	Plasmid 1	Plasmid 2	Wachstum	
				0,2% Glc	1% Mal 2-DOG
EBY.S7	<i>hxt⁻ fgy1-1</i>	YEplac181	YEplac181	+	-
		YEplac181	YEplac181	+/-	+
		YEplac181	YEplac181	+/-	+
EBY.VW4000	<i>hxt⁻ mph⁻ FGY1</i>	pTV-HXT2p-GLUT1 ^{V69M}	YEplac181	+	-
		pTV-HXT2p-GLUT1 ^{V69M}	YEplac181	+/-	+
		YCplac33	pRW7S-7	-	+
		YCpHXT2	YEplac181	+	-
		YCpHXT7	YEplac181	+	-
		YCpHXT2	pRW7S-7	+	-
		YCpHXT7	pRW7S-7	+	-

Um Informationen über die intrazelluläre Verteilung von Ynl094w zu erhalten, wurde Ynl094w mit dem GFP-Protein fusioniert und die Lokalisierung des Fusionsproteins anhand von Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Der Leserahmen des *YNL094w*-Gens wurde zunächst in einer PCR-Reaktion mit den Primern c1- bzw. c4-YNL094-GFP und dem Plasmid YEplac181 als Vorlage amplifiziert. Nach Transformation des PCR-Produkts zusammen mit dem *EcoRI*-linearisierten Vektor p426MET25-GFP in den Stamm EBY.18ga und homologer Rekombination konnte das Plasmid YEplac181-GFP aus der Hefe isoliert werden, das die kodierende Sequenz von *YNL094w* mit der im gleichen Leserahmen angeschlossenen Sequenz des *GFP*-Gens trug. Die Funktionalität von Ynl094w in dem Fusionsprotein wurde nach Transformation des Stammes EBY.S7 mit YEplac181-GFP zusammen mit YEplac181 getestet. Bei der Untersuchung des Wachstums der Transformanten auf YNB-Medium mit 0,2% Glukose bzw. 1% Maltose mit 2-DOG waren keine Unterschiede zwischen den mit YEplac181-GFP transformierten Zellen gegenüber Vergleichszellen mit YEplac181 erkennbar (Tab. 11). Somit kann davon ausgegangen werden, daß die Funktion von Ynl094w durch die Fusion mit GFP nicht beeinträchtigt wurde.

YEplac181-GFP wurde zusammen mit dem leerem Vektor YEplac181 in den Stamm EBY.18ga transformiert und die Lokalisierung des Fusionsproteins fluo-

reszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 8A). Es wird erkennbar, daß Ynl094-GFP in intrazellulären, vesikelähnlichen Membranstrukturen akkumuliert.

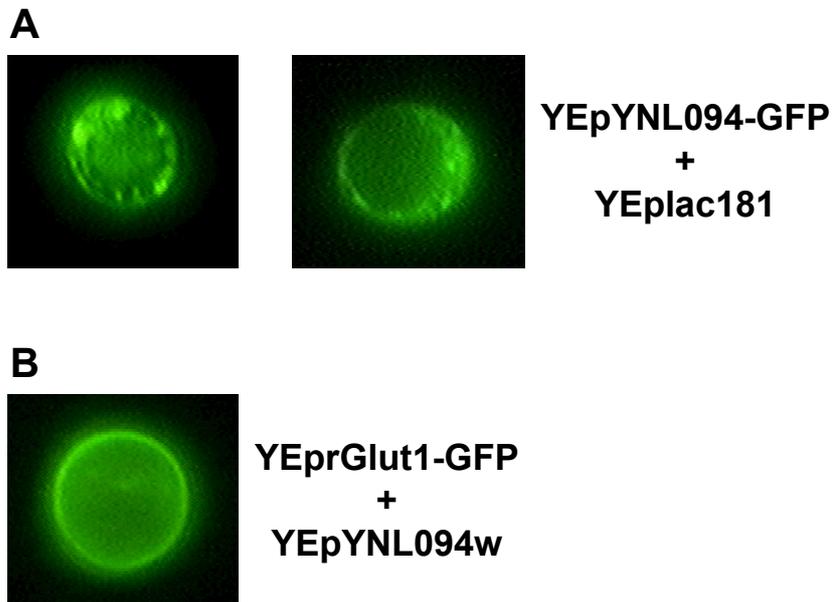


Abb. 8: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine **(A)** Ynl094w-GFP im Vergleich zu **(B)** GLUT1-GFP bei paralleler Überexpression von Ynl094w in dem Hefestamm EBY.18ga (*hxt⁻*). Die Zellen wurden auf synthetischem Komplettmedium ohne Uracil, Leucin und Methionin mit 1% Maltose als Kohlenstoffquelle bis in die logarithmische Wachstumsphase angezogen.

Kürzlich konnte im Rahmen einer Two-Hybrid Analyse eine Interaktion von Ynl094w mit den Proteinen Rvs161 und Rvs167 nachgewiesen werden (Bon *et al.*, 2000). Sowohl Rvs161 als auch Rvs167 sind in Prozesse der Endozytose, der Zellfusion, der Organisation des Actin-Zytoskeletts und der Vesikelbewegung involviert (Munn *et al.*, 1995; Sivadon *et al.*, 1997). Aufgrund der beobachteten intrazellulären Lokalisierung des Ynl094w-GFP-Fusionsproteins kann man spekulieren, daß Ynl094w möglicherweise als Regulator der Rvs-Proteine bei der Steuerung des Vesikeltransports fungiert. Die Überexpression des *YNL094w*-Gens könnte zu einer erhöhten GLUT1-Endozytoserate von der Plasmamembran oder aber zu einer verringerten Exozytose von GLUT1-haltigen Vesikeln führen, wodurch der von GLUT1 vermittelte Glukosetransport in *hxt⁻*-Zellen so weit verringert wird, daß die Zellen eine Resistenz gegenüber 2-DOG entwickeln können bzw. nicht ausreichend membranlokalisiertes GLUT1 zur Verfügung steht, um auf Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle zu wachsen. Um dieser Hypothese nachzugehen und zu prüfen, ob die Überexpression von Ynl094w zu einer verstärkten Internalisierung des GLUT1-Proteins führt, wurde der Stamm EBY.18ga mit den beiden Plasmiden YEprGLUT1-GFP und YEpYnl094w transformiert. Die Fluoreszenz des GLUT1-GFP-Fusionsproteins bei gleichzeitiger Expression von

Ynl094w weist jedoch auf eine unverändert membranständige Lokalisierung von GLUT1 hin (Abb. 8B; vergl. Abb. 5A). Somit bleibt unklar, welcher Art der Effekt ist, den Ynl094w auf GLUT1 in Hefe ausübt. Die hier dargestellten Ergebnisse lassen eine Reduzierung des Anteils von oberflächenlokalisiertem GLUT1 als Ursache für die beobachteten Auswirkungen auf die GLUT1-vermittelten Glukoseaufnahme als wenig wahrscheinlich erscheinen. Auch die Frage nach der scheinbaren Spezifität des Effekts von Ynl094w auf GLUT1 im Vergleich zu den endogenen Hefe-Glukosetransportern Hxt2 und Hxt7 kann bislang nicht sicher beantwortet werden. Unter Umständen führen Säugetierzellen-spezifische Motive in der Aminosäuresequenz von GLUT1 und möglicherweise auch in der anderer heterologer Glukosetransporter zu einer Erkennung durch endogene Hefefaktoren wie Ynl094w, wobei deren Überexpression die Aktivität der Fremdproteine inhibieren könnte.

3.2.8.4 Isolierung von *FGY1*

Im Rahmen des in Abschnitt 3.2.8.2 beschriebenen Versuchsansatzes konnte ein weiteres Plasmid einer der Genbanken aus der Hefe reisoliert werden, das als pRW7S-T1-19 bezeichnet wurde. Durch beidseitige Ansequenzierung des inserierten DNA-Fragments wurde ein ca. 6,3 kb großer Abschnitt genomischer DNA aus Chromosom XII identifiziert. Neben den vollständigen Leserahmen der bislang nicht oder nur wenig charakterisierten Gene *YMR211w* und *YMR212c* (*EFR3*) beinhaltete das inserierte DNA-Fragment auch den 5'-terminalen Bereich des *CEF1*-Gens. Die Gene *YMR211w* und *YMR212c* wurden in einer PCR-Reaktion mit den Primerpaaren RPhom-YMR211/UPhom-YMR211 bzw. RPhom-YMR212/UPhom-YMR212 und dem Plasmid pRW7S-T1-19 als DNA-Vorlage für 15 Zyklen amplifiziert und die Produkte in einer weiteren PCR-Reaktion mit den Primern RPhom/UPhom über 5 Zyklen vervielfältigt. Als Endprodukte wurden so DNA-Fragmente der beiden Gene erhalten, die neben ca. 500 bp des jeweiligen Promotor- und 300 bp des Terminationsbereichs zusätzlich 5'- und 3'-terminal überlappende Sequenzen zu der multiplen Klonierungsstelle des 2 μ -Vektors YEplac195 besaßen. Durch Transformation der einzelnen Fragmente in den Stamm EBY.18ga zusammen mit *EcoRI*-linearisiertem YEplac195 konnten nach homologer Rekombination in Hefe die Plasmide YEpYMR211 und YEpYMR212 isoliert werden. Um zu testen, ob sich durch eines der beiden Gene der mit dem Genbank-Plasmid pRW7S-T1-19 beobachtete Phänotyp reproduzieren ließ, wurden diese Plasmide sowie der leere Vektor zusammen mit dem GLUT1-Plasmid YEpH2-rGLUT1 in den *fgy1-1*-Mutantenstamm EBY.S7 transformiert. Die Zellen wurden auf synthetischem Medium mit 1% Maltose ohne Tryptophan und Uracil herangezogen, darauffolgend auf das gleiche Basismedium, jedoch mit 0,2%

Glukose bzw. 1% Maltose mit 5 mM 2-DOG, replikaplattiert und das Wachstum der Transformanten beobachtet (Tab. 12). Während YEpYMR212 mit YEpH2-rGLUT1 in EBY.S7 denselben Phänotyp zeigte, wie das Plasmid pRW7S-T1-19, war dies mit dem Plasmid YEpYMR211 nicht der Fall. Folglich konnte es sich bei *YMR212c* tatsächlich um das gesuchte Wildtypallel von *fgy1-1* in EBY.S7 handeln, das die Aktivität von GLUT1 unterdrücken und somit Resistenz gegen 2-DOG vermitteln konnte. Das Plasmid YEpYMR212 wurde daher mit YEpFGY1 bezeichnet.

Tab. 12: Untersuchung des Wachstums von Transformanten des Stammes EBY.S7 auf synthetischem Komplettmedium ohne Uracil und Tryptophan mit den angegebenen Kohlenstoffquellen bzw. in Anwesenheit von 5 mM 2-DOG. Die Zellen wurden für zwei Tage bei 30°C inkubiert. (+) gutes Wachstum, (-) kein Wachstum.

Stamm	Genotyp	Plasmid 1	Plasmid 2	Wachstum	
				0,2% Glc	1% Mal 2-DOG
EBY.S7	<i>hxt⁻ fgy1-1</i>	YEpH2-rGLUT1	YEplac195	+	-
		YEpH2-rGLUT1	YEpYMR211	+	-
		YEpH2-rGLUT1	YEpYMR212	-	+
		YEpH2-rGLUT1	pRW7S-T1-19	-	+

3.2.8.5 Einfluß der Expressionsstärke von *FGY1* auf *GLUT1* und Klonierung des Allels *fgy1-1*

Bislang konnte noch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, daß es sich bei dem klonierten Gen *YMR212c* anstelle des Wildtyp-Gens *FGY1* nicht ebenfalls um einen „Multicopy-Suppressor“ wie *YNL094w* handelte (vergl. Abschnitt 3.2.8.3). Aus diesem Grund wurde das mutmaßliche *FGY1*-Gen durch eine PCR-Reaktion und *in vivo*-Rekombination in den CEN/ARS-Vektor YCplac33 kloniert (wie in Abschnitt 3.2.8.2 beschrieben). Während es sich bei YEplac195 um einen episomalen Vektor handelt, der in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund des verwendeten Hefestamms in ca. 30 bis 40 Kopien pro Zelle vorliegen kann, sollten auf YCplac33 basierende Plasmide lediglich in ein bis wenigen Kopien pro Zelle auftreten. In gleicher Weise, jedoch durch eine PCR-Reaktion mit ganzen Hefezellen (2.11), wurde das mutante Gen *fgy1-1* aus dem Stamm EBY.S7 amplifiziert und ebenfalls über homologe Rekombination in die Vektoren YEplac195 und YCplac33 kloniert. Die neugewonnenen Plasmide YCpFGY1, YCpFGY1-1, YEpFGY1 sowie YEpFGY1-1 und ein leerer Kontrollvektor wurden zusammen mit

dem GLUT1-Plasmid YEpH2-rGLUT1 in den Stamm EBY.S7 transformiert und das Wachstum der Transformanten erneut untersucht (Tab. 13). Zusätzlich wurden die Plasmide YEpFGY1, YEpFGY1-1 und ein leerer Kontrollvektor zusammen mit pTV-HXT2p-GLUT1^{V69M} in den Stamm EBY.18ga transformiert und ebenfalls das Wachstum getestet. Wie in Abschnitt 3.2.7 beschrieben, trägt das Plasmid pTV-HXT2p-GLUT1^{V69M} eine in Hefe funktionelle Version des GLUT1-Gens.

Tab. 13: Wachstumstest von Transformanten der Hefestämme EBY.S7 und EBY.18ga auf synthetischem Kompletmedium ohne Uracil und Tryptophan mit den angegebenen Kohlenstoffquellen bzw. in Anwesenheit von 5 mM 2-DOG. Die Zellen wurden für zwei Tage bei 30°C inkubiert. (+) gutes Wachstum, (-) kein Wachstum.

Stamm	Genotyp	Plasmid 1	Plasmid 2	Wachstum	
				0,2% Glc	1% Mal 2-DOG
EBY.S7	<i>hxt⁻ fgy1-1</i>	YEpH2-rGLUT1	YEplac195	+	-
		YEpH2-rGLUT1	YCpFGY1	-	+
		YEpH2-rGLUT1	YCpFGY1-1	+	-
		YEpH2-rGLUT1	YEpFGY1	-	+
		YEpH2-rGLUT1	YEpFGY1-1	+	-
EBY.18ga	<i>hxt⁻ FGY1</i>	pTV-HXT2p-GLUT1 ^{V69M}	YEplac195	+	-
		pTV-HXT2p-GLUT1 ^{V69M}	YEpFGY1	+	-
		pTV-HXT2p-GLUT1 ^{V69M}	YEpFGY1-1	+	-

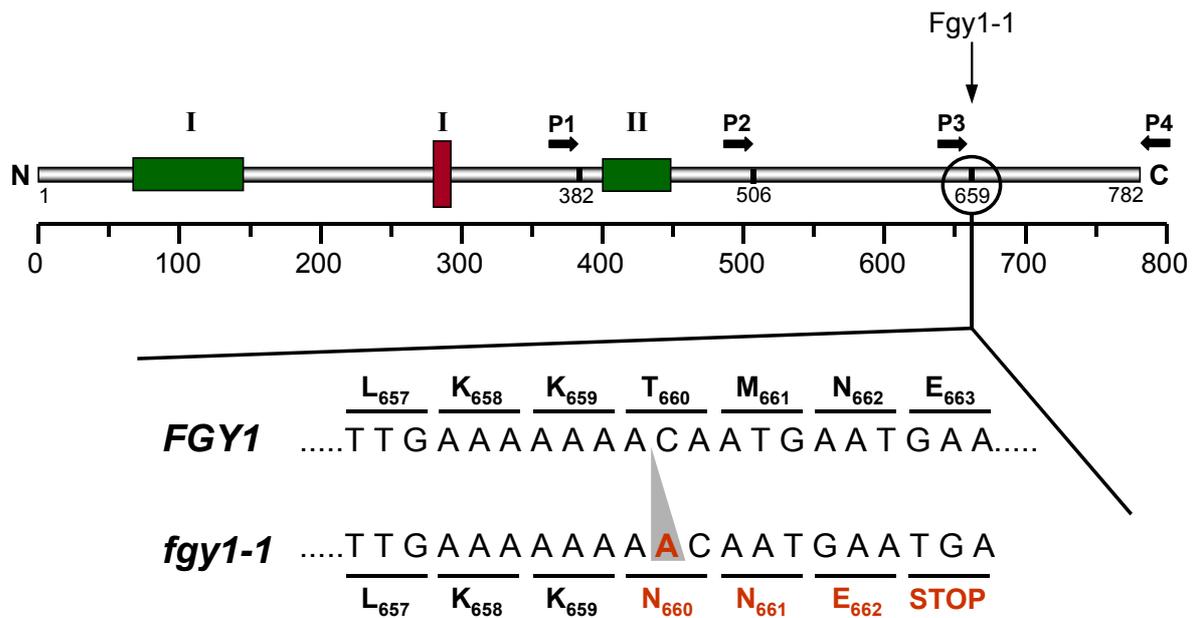
Es stellte sich heraus, daß in GLUT1-Transformanten von EBY.S7 mit YEpFGY1 die kopienzahl-bedingt höhere Expression von *FGY1* keinen Effekt auf den beobachteten Phänotyp zeigte. Das Wachstumsverhalten der Zellen war identisch zu dem der korrespondierenden Transformanten mit dem Plasmid YCpFGY1. Beide Plasmide vermittelten gleichermaßen eine Resistenz gegen 2-DOG auf Maltosemedium bzw. unterbanden die GLUT1-katalysierte Aufnahme von Glukose (Tab. 13). Erwartungsgemäß zeigte sich sowohl in einfacher als auch in hoher Kopienzahl ein Verlust der Fähigkeit des mutanten *fgy1-1*-Gens, die funktionelle Expression von GLUT1 in Hefe zu inhibieren. Die jeweils mit YCpFGY1-1 oder YEpFGY1-1 transformierten EBY.S7-Zellen konnten, vergleichbar den Kontrollzellen mit leerem Vektor, weiterhin auf Medium mit 0,2% Glukose wachsen und wiesen eine Sensitivität gegenüber 2-DOG auf (Tab. 13). Desweiteren übte die Überexpression von *FGY1* keinen Einfluß auf aktives GLUT1^{V69M} in dem *hxt⁻*-Stamm EBY.18ga aus. Das Wachstum dieser Transformanten war nicht von dem

Wachstum der entsprechenden Kontrollzellen mit leerem Vektor zu unterscheiden (Tab. 13). Zusammengenommen unterstützen diese Resultate die Annahme, daß es sich bei dem Gen *YMR212c* tatsächlich um das *FGY1*-Wildtyp-Allel handelt.

3.2.9 Charakterisierung von *FGY1*

Das als *FGY1* bezeichnete Gen *YMR212c/EFR3* wurde erst kürzlich im Rahmen eines synthetisch-letalen Screens bei der Suche nach Mutanten isoliert, die für ihre Lebensfähigkeit die Cyclin-abhängige Kinase (CDK) Pho85 benötigen (Lenburg und O'Shea, 2001) und kodiert für ein 782 Aminosäuren langes Protein mit einer Größe von 90 kDa. Ein schematischer Überblick über die Domänenstruktur ist in Abb. 9 dargestellt. Demnach lassen sich für Fgy1 mindestens eine transmembrane Helix sowie zwei weitere, partiell hydrophobe Regionen vorhersagen. Ein Vergleich der Fgy1-Aminosäuresequenz mit Proteindatenbanken der Hefe (SGD, YPD) lieferte keine Erkenntnisse über ein möglicherweise homologes Protein in *S. cerevisiae*. Die erweiterte Suche mit Datenbanken anderer Organismen (NCBI Blast search) ergab lediglich schwache Ähnlichkeiten zu einem unbekanntem Protein aus der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* (SPCC794.08), einem weiteren unbekanntem Membranprotein aus *Drosophila melanogaster*, cmp44E, sowie zu der schweren Kette des Myosins einiger anderer Organismen.

Um die genaue Art der Mutation in *fgy1-1* festzustellen, die eine funktionelle Expression des GLUT1-Glukosetransporters in Hefe und eine Wiederherstellung des Wachstums des Stammes EBY.S7 auf Glukosemedium ermöglicht, wurde die komplette *fgy1-1*-kodierende Region in dem Plasmid YEpFGY1-1 sequenziert (Sequenzierprimer seq1-FGY1 bis seq6-FGY1). Ein Vergleich mit der Sequenz des *FGY1*-Wildtyp-Allels in dem Plasmid YEpFGY1 ergab eine einzelne Insertion von Adenosin zwischen die Adenosin-Nukleotide im Bereich bis Position 1978 und Cytosin an Position 1979 des offenen Leserahmens (Abb. 9). Die durch diese Rasterschubmutation hervorgerufene Verschiebung des ursprünglichen Leserahmens hat eine Veränderung der Aminosäuresequenz und einen vorzeitigen Abbruch der Translation zur Folge, bedingt durch ein kurz hinter der Adenosin-Insertion auftretendes Stop-Codon. Somit liegt bei dem mutanten Fgy1-1-Protein gegenüber dem 782 Aminosäuren langen Wildtyp-Protein eine carboxyterminale Verkürzung um 120 auf 662 Aminosäuren vor.

**Zeichenerklärung:**

 = hydrophiler Bereich
  = Transmembrandomäne
  = partiell hydrophober Bereich

Abb. 9: Schematische Darstellung der Struktur des Fgy1-Proteins. Das Auftreten einer möglichen Transmembrandomäne (hydrophober Bereich) sowie peripherer Membrandomänen (partiell hydrophobe Bereiche) wurde in einem Hydrophatietest durch die Software PROSIS sowie über das Programm PSORTII ermittelt. P1 bis P4 bezeichnen die homologen Abschnitte von Oligonukleotiden zu den entsprechenden Regionen des *FGY1*-Gens, die für die Konstruktion unterschiedlicher C-terminaler Deletionen des Fgy1-Proteins eingesetzt wurden (3.2.9.2). Die hierbei eingefügten Stop-Codons sind durch schwarze Balken erkennbar. Der hervorgehobene Bereich zeigt die genaue Position der Mutation im Gen *fgy1-1*, die zu einem Verlust des C-terminalen Bereichs des Fgy1-Proteins führt.

3.2.9.1 Untersuchung der Lokalisierung eines Fgy1-GFP Fusionsproteins

Die in der Struktur von Fgy1 auftretende Transmembrandomäne weist möglicherweise auf eine Membranlokalisierung des Proteins hin (Plasmamembran, interne zelluläre Membranen). Um genauere Informationen über den Aufenthaltsort von Fgy1 innerhalb der Zelle zu erhalten, wurde Fgy1 mit dem GFP-Protein fusioniert und die Lokalisierung des Fusionsproteins fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zunächst wurde *FGY1* in einer PCR-Reaktion mit den Primern c1- bzw. c4-YMR212-GFP und dem Plasmid YEpFGY1 als DNA-Vorlage amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde zusammen mit *EcoRI*-linearisiertem Vektor p426MET25-GFP in den Stamm EBY.S7 transformiert. Nach homologer Rekombination des DNA-Fragments hinter den *MET25*-Promotor bzw. vor das *GFP*-Gen in p426MET25-

GFP konnte das Fusionskonstrukt YEpFGY1-GFP aus der Hefe isoliert werden. Die Funktionalität von Fgy1 in der Fusion wurde nach Transformation des Stammes EBY.S7 mit YEpFGY1-GFP zusammen mit YEpH2-rGLUT1 getestet. GLUT1-Transformanten mit YEpFGY1-GFP waren ebenso wie mit YEpFGY1 transformierte Kontrollzellen nicht mehr in der Lage, auf synthetischem Selektivmedium mit 10 mM Glukose als Kohlenstoffquelle zu wachsen und wiesen eine 2-DOG-Resistenz auf. Demzufolge war Fgy1 auch in Fusion mit GFP nachwievor funktionell und wie das Fgy1-Wildtypprotein in der Lage, die Aktivität von GLUT1 in einem *fgy1-1*-Mutantenstamm zu unterdrücken. Die Fusion hatte somit offenbar weder eine Mißlokalisierung noch eine Beeinträchtigung der nativen Funktion von Fgy1 zur Folge.

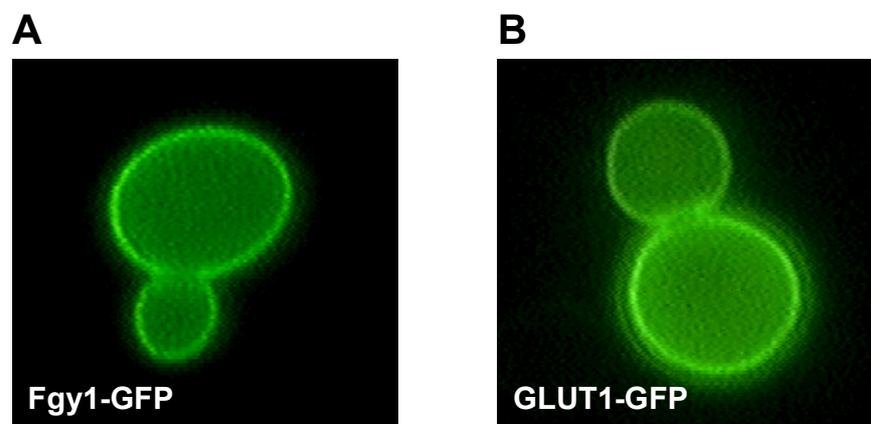


Abb. 10: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisierung der GFP-Fusionsproteine **(A)** Fgy1-GFP im Vergleich mit **(B)** GLUT1-GFP in dem Hefestamm EBY.18ga (*hxt⁻*). Die Zellen wurden auf synthetischem Maltosemedium ohne Uracil und Methionin bis in die logarithmische Wachstumsphase angezogen.

YEpFGY1-GFP wurde in den Stamm EBY.18ga transformiert und die Lokalisierung des Fusionsproteins durch Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abb. 10). Anhand des Vergleichs mit der Fluoreszenz von GLUT1-GFP wird eine Lokalisierung von Fgy1-GFP an der Zelloberfläche klar erkennbar. Somit ist eine Kolo-kalisierung von Fgy1 mit GLUT1 in der Plasmamembran wahrscheinlich.

3.2.9.2 Deletion unterschiedlicher C-terminaler Bereiche von Fgy1

Die bislang gewonnenen Erkenntnisse deuten auf eine inhibitorische Funktion des C-Terminus von Fgy1 auf das GLUT1-Protein in Hefe hin. Während GLUT1 in EBY18.ga (*hxt⁻ FGY1*) nicht funktionell war und den Wachstumsdefekt des Stammes auf Glukosemedium nicht komplementieren konnte, schien dieser hemmende Effekt in dem Stamm EBY.S7 (*hxt⁻ fgy1-1*) mit einem C-terminal verkürzten Fgy1-Protein aufgehoben zu sein (siehe Abschnitt 3.2.9). Interessanter-

weise ließ die Expression des GLUT1-GFP Fusionsproteins in EBY18ga im Vergleich zu EBY.S7 keine Unterschiede in der Lokalisierung erkennbar werden (Daten nicht gezeigt), obwohl EBY.S7 im Gegensatz zu EBY.18ga scheinbar in der Lage ist, über GLUT1-GFP Glukose aufzunehmen (vergl. Abb. 15B). In den folgenden Untersuchungen sollte daher durch schrittweise Deletion unterschiedlich langer Bereiche des Fgy1-C-Terminus die für den inhibitorischen Effekt auf GLUT1 verantwortliche Proteinregion näher eingegrenzt werden.

Die Deletionen wurden nach der in Abschnitt 2.26 beschriebenen Methode durchgeführt. Durch PCR-Reaktionen mit den Primern s1-FGY1del382 (P1), s1-FGY1del506 (P2) und s1-FGY1del659 (P3) in Kombination mit s2-YMR212 (P4) wurden *kanMX*-Fragmente synthetisiert, die im 5'-Bereich Übereinstimmung zu dem gewünschten Insertionsort im *FGY1*-Gen gefolgt von zwei Stop-Codons besaßen. 3'-terminal wiesen die Produkte überlappende Sequenzen zur Terminationsregion direkt hinter dem ursprünglichen Stop-Codon von *FGY1* auf (P1 bis P4, siehe Abb. 9). Nach chromosomaler Integration der Deletionskassetten sollten so mutante Hefestämme erhalten werden, die durch Insertion zweier Stop-Codons unterschiedliche Verkürzungen der Aminosäuresequenz von Fgy1 aufwiesen: Fgy1₁₋₃₈₂, Fgy1₁₋₅₀₆ sowie Fgy1₁₋₆₅₉. Die relative Lage der eingefügten Stop-Codons bezogen auf die Gesamtstruktur des Fgy1-Proteins ist aus Abb. 9 ersichtlich. Durch die Deletion Fgy1₁₋₃₈₂ sollte das Protein etwa um die Hälfte verkürzt werden, einschließlich der zweiten partiell hydrophoben Region, während bei Fgy1₁₋₅₀₆ lediglich ein verglichen mit Fgy1-1 größeres Fragment des C-Terminus entfernt werden würde. Infolge der Rasterschubmutation wies das Protein Fgy1-1 des Stammes EBY.S7 an seinem C-terminalen Ende die drei „neuen“ Aminosäuren Asparagin, Asparagin und Glutamat auf (vergl. Abb. 9). Um einen Einfluß dieser Aminosäuren auf den beobachteten GLUT1-Phänotyp ausschließen zu können, sollten diese durch die Deletion Fgy1₁₋₆₅₉ ebenfalls entfernt werden.

Bei der Herstellung der mutanten Hefestämme konnte lediglich die Verkürzung Fgy1₁₋₆₅₉ realisiert werden. Die Deletion wurde durch eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden seq1-FGY1 und k2-kanMX verifiziert und der erhaltene Mutantenstamm mit RWY96 bezeichnet. Nach Transformation von RWY96 mit dem Plasmid YEpH2-rGLUT1 und Anzucht der Zellen auf synthetischem Maltosemedium ohne Tryptophan wurden die Transformanten auf das gleiche Basismedium mit 10 mM Glukose als Kohlenstoffquelle anstelle der Maltose replikaplattiert. Nach zweitägiger Inkubation bei 30°C zeigte sich ein deutliches, GLUT1-vermitteltes Wachstum der *fgy1*Δ659-Zellen auf Glukosemedium, vergleichbar dem Wachstum des ebenfalls mit YEpH2-rGLUT1 transformierten Stammes EBY.S7 (*hxt*⁻ *fgy1-1*). Mit leerem Vektor pTV3e transformierte Kontrollzellen beider

Stämme waren hingegen nicht in der Lage zu wachsen. Im Fall der Deletionen Fgy1₁₋₃₈₂ und Fgy1₁₋₅₀₆ konnten keine G418-resistenten Transformanten erhalten werden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß eine weitere Verkürzung des C-Terminus von Fgy1 in der Hefe möglicherweise einen letalen Phänotyp zur Folge hat (siehe Abschnitt 3.2.9.4). Somit scheint das Fgy1-Protein neben seiner inhibitorischen Wirkung auf die GLUT1-Expression in Hefe eine für die Lebensfähigkeit der Zellen essentielle Funktion auszuüben.

3.2.9.3 Überexpression des C-Terminus von Fgy1

Die Analyse des *fgy1-1*-Allels sowie C-terminale Deletionen von Fgy1 lassen auf eine besondere Rolle dieser Proteinregion bei der funktionellen Expression des GLUT1-Glukosetransporters in Hefe schließen. In Mutantenstämmen mit carboxyterminal verkürzten Fgy1-Versionen konnte eine GLUT1-vermittelte Wiederherstellung der Glukoseaufnahme und des Wachstums beobachtet werden. Daher sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob die Überexpression des fehlenden Teils von Fgy1 in einer Mutante mit dem verkürzten Protein ausreichend ist, den inhibitorischen Einfluß des ursprünglichen Vollängenproteins auf GLUT1 wiederherzustellen.

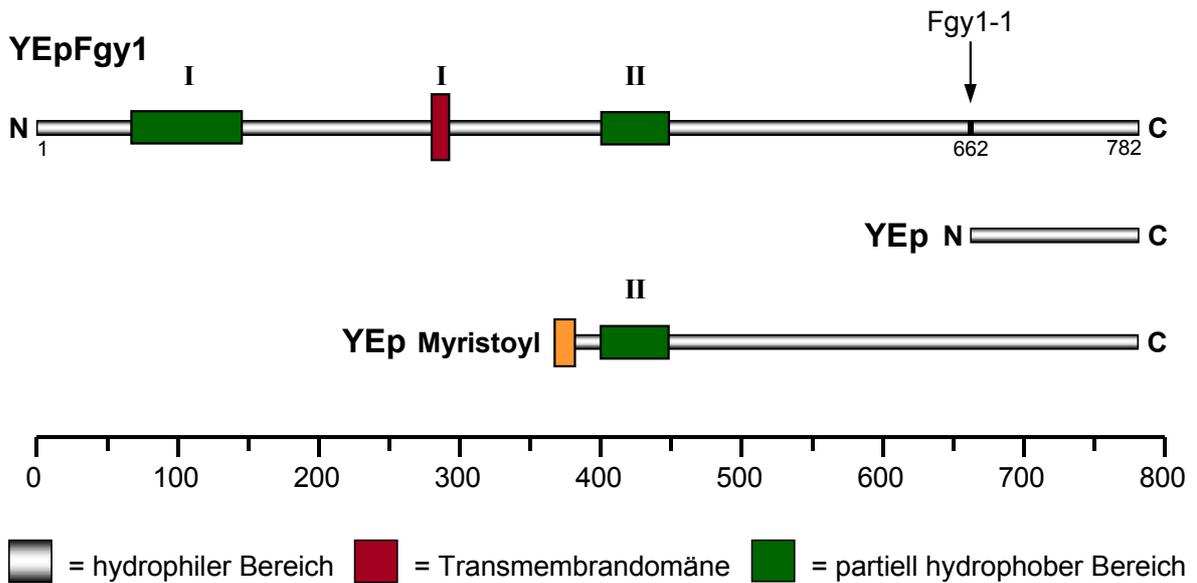
Die für den gesamten Fgy1-C-Terminus ab der Aminosäure Tyrosin₆₆₀ (Abb. 11A) kodierende DNA-Region wurde durch eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden c1-CtermFGY1 und c4-CtermFGY1 sowie dem Plasmid YEpFGY1 als Vorlage synthetisiert. Das DNA-Fragment wies an den 5'- und 3'-Enden überlappende Sequenzen zu dem *HXT7-6xHis*-Promotorbereich bzw. *CYC1*-Terminator des 2 μ -Expressionsplasmids p426HXT7-6HIS auf und wurde über homologe Rekombination in dem Stamm EBY.S7 in den mit *EcoRI/BamHI* linearisierten Vektor kloniert. Das neue Konstrukt wurde mit YEpFGY1c-HIS bezeichnet und zusammen mit dem GLUT1-Plasmid YEpH2-rGLUT1 in den Stamm EBY.S7 transformiert. Die Zellen wurden auf Selektivmedium ohne Uracil und Tryptophan mit 1% Maltose als Kohlenstoffquelle ausplattiert und für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Im Anschluß wurden die Transformanten auf synthetisches Medium mit 0,2% Glukose bzw. 1% Maltose mit 5 mM 2-DOG replikaplattiert und das Wachstum beobachtet. Es zeigte sich, daß der *fgy1-1*-Stamm EBY.S7 mit GLUT1 und dem Fgy1-C-Terminus gutes Wachstum auf Glukosemedium zeigte und Sensitivität gegenüber 2-DOG aufwies. Das Wachstum war nicht von EBY.S7-Kontrollzellen zu unterscheiden, die mit YEpH2-rGLUT1 und dem leerem Vektor p426HXT7-6HIS transformiert worden waren. Demzufolge war GLUT1 in den *fgy1-1*-Zellen nachwievor aktiv und die alleinige Überexpression des C-Terminus von Fgy1 nicht

ausreichend, den dominanten Phänotyp des *FGY1*-Wildtyp-Allels wiederherzustellen.

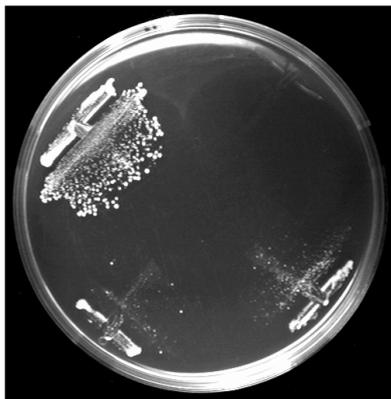
Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung eines Fgy1-GFP-Fusionsproteins hatte dessen Lokalisierung der Zelloberfläche gezeigt (3.2.9.1). Es war daher denkbar, daß der rein hydrophile Fgy1-C-Terminus des ersten Konstruktes (YEpFGY1c-HIS, vergl. Abb. 11A) für die Ausübung seiner inhibitorischen Funktion auf GLUT1 eine Lokalisierung in der Nähe der Plasmamembran benötigte. In einem weiteren Versuch wurde daher der C-Terminus von Fgy1 ab der Aminosäure Aspartat₃₆₇ mit einer Myristoylierungssignalsequenz fusioniert. Durch die posttranslationale Modifikation von Proteinen in Form kovalenter Anheftung von Myristoylresten entsteht ein starkes Signal, das diese Proteine zur Plasmamembran dirigiert (Resh, 1999). Allerdings ist in vielen Fällen die Myristoylierung nur in Verbindung mit einer kurz darauffolgenden, partiell hydrophoben Proteindomäne für eine Plasmamembranlokalisierung ausreichend (Resh, 1999). Aus diesem Grund wurde der Beginn des Fgy1-C-Terminus für die aminoterminalen Fusion mit dem Myristoylierungssignal so gewählt, daß er unmittelbar nach der Fusionsstelle eine solche hydrophobe Region aufwies (Abb. 11A).

Durch eine PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden c1- und c4-Myr-FGY1c wurde der carboxyterminale Teil des *FGY1*-Gens amplifiziert. Das Produkt enthielt eine 5'-terminale *Bam*HI-Schnittstelle gefolgt von einer kurzen Linkersequenz (A₃) und dem Myristoylierungssignal (enthalten in c1-Myr-FGY1c), sowie eine *Eco*RI-Schnittstelle am 3'-Ende (in c4-Myr-FGY1c). Nach Restriktion mit *Bam*HI und *Eco*RI wurde das DNA-Fragment in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen 2 μ -Vektor p426MET25 ligiert und das isolierte Plasmid mit YEpMyr-Fgy1c benannt. Nach Transformation von YEpMyr-Fgy1c, YEpFGY1 und leerem Vektor YEplac195 in GLUT1-exprimierende Zellen des Stammes EBY.S7 (*hxt⁻ fgy1-1*) wurde erneut das Wachstum auf Maltosemedium in Gegenwart von 2-DOG untersucht (Abb. 11B). Nach dreitägiger Inkubation bei 30°C zeigten die Kontrollzellen mit GLUT1 und Wildtyp-Fgy1 bzw. leerem Vektor die erwarteten Wachstumsphänotypen. Die Überexpression des myristoylierten Fgy1-Carboxyterminus in EBY.S7 konnte dessen Wachstum teilweise beeinflussen. Da die Zellen eine geringe Resistenz gegenüber 2-DOG aufwiesen, deutet dies auf eine partielle Hemmung des GLUT1-vermittelten Glukosetransports in Hefe hin. Verglichen mit dem Wachstum der entsprechenden Kontrollzellen bildeten die Transformanten somit einen intermediären Phänotyp aus. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, daß dem C-terminalen Teil des Fgy1-Proteins eine besondere Bedeutung bei der Regulation des in Hefe heterolog exprimierten GLUT1-Glukosetransporters zukommt.

A



B



YNB 1% Maltose
+ 5 mM 2-DOG

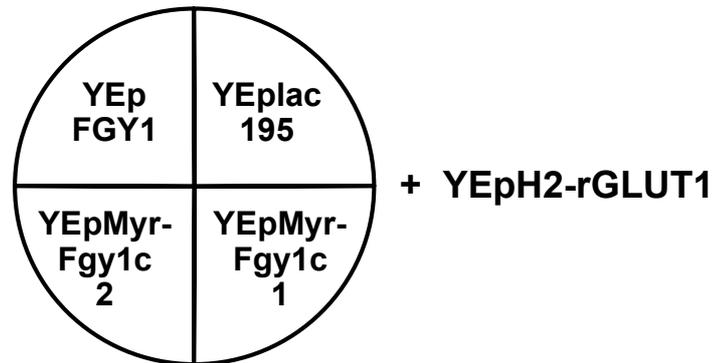


Abb. 11: (A) Unterschiedliche Konstrukte zur Überexpression des C-Terminus von Fgy1 im Vergleich zum Gesamtlängenprotein. Die Lage der *fgy1-1*-Mutation ist durch einen Pfeil angedeutet. (B) Wachstum von Transformanten des Stammes EBY.S7 (*hxt⁻ fgy1-1*) mit dem GLUT1-Plasmid YEpH2-rGLUT1 sowie leerem Vektor YEp lac195, YEpFGY1 oder YEpMyr-Fgy1c (Plasmide mit Fragmenten aus zwei unabhängigen PCR-Reaktionen) auf synthetischem Komplettmedium ohne Uracil und Tryptophan nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C. Das Medium enthielt als Kohlenstoffquelle 1% Maltose mit Zusatz von 5 mM 2-DOG. Der myristoylierte Carboxyterminus von Fgy1 kann die *fgy1-1*-Mutation partiell komplementieren.

3.2.9.4 Deletion von *FGY1*

Die Mutagenese von Genen unbekannter Funktion und die daraus unter Umständen resultierenden Phänotypen der Mutanten lassen in vielen Fällen Rückschlüsse auf die native Funktion der kodierten Proteine zu. Daher sollten mögliche Auswirkungen einer Deletion von *FGY1* in den Hefezellen näher untersucht werden. Ein entsprechendes DNA-Fragment, um den *FGY1*-Leserahmen über homologe Rekombination gegen das *kanMX*-Gen auszutauschen, wurde durch eine PCR-Reaktion mit den Primern s1-YMR212/s2-YMR212 und dem Plasmid pUG6 als Vorlage synthetisiert. Nach Transformation dieser Deletionskassette in den Stamm EBY.VW4000 konnten jedoch keine G418-resistente Klone erhalten werden. Dies deutete darauf hin, daß eine Deletion von Fgy1 für die Zellen letal sein könnte, was bereits in ähnlicher Weise bei den C-terminalen Verkürzungen von Fgy1 beobachtet worden war (3.2.9.2). Aus diesem Grund wurde die Deletion analog in dem diploiden Wildtypstamm CEN.PK141 durchgeführt. Ein heterozygot-diploider *fgy1*-Deletionsstamm konnte nach Selektion resistenter Transformanten auf G418-haltigem Medium isoliert werden und wurde durch PCR-Reaktionen verifiziert (Primerpaare: seq1-FGY1/k2-kanMX bzw. seq1-FGY1/seq6-FGY1). Der diploide Stamm wurde mit RWY94D bezeichnet und sporuliert. Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden Tetraden isoliert, die Sporen auf unterschiedlichen Medien abgelegt und das Wachstum beobachtet (Abb. 12). In allen Fällen zeigte sich eine 2:2-Aufspaltung der Phänotypen zwischen Wildtyp- und $\Delta fgy1$ -Sporen. Während die Deletion von *FGY1* auf Medium mit Glukose oder Maltose als Kohlenstoffquelle eine sehr starke Beeinträchtigung des Wachstums zur Folge hatte, war der Effekt auf Medium mit Ethanol für die Zellen offensichtlich sogar letal.

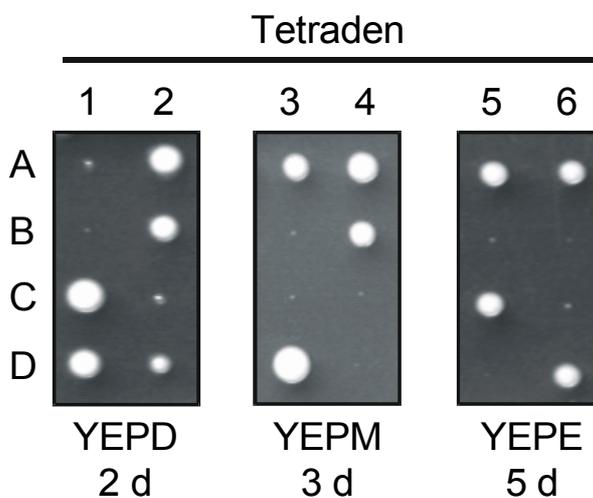
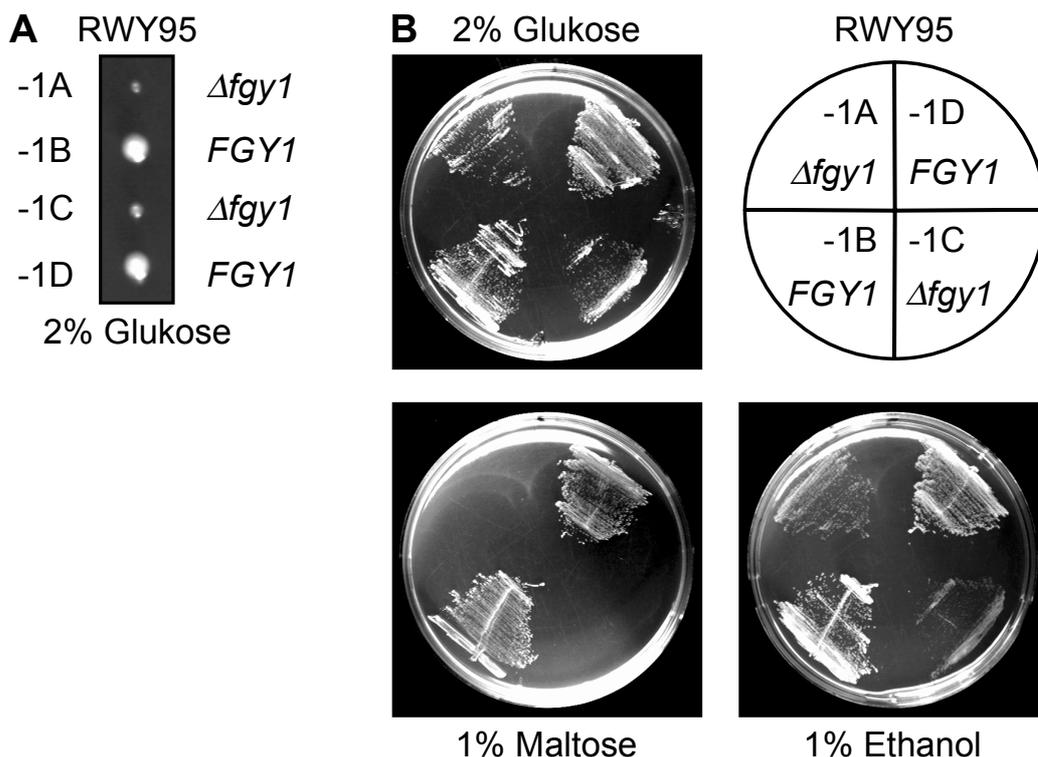


Abb. 12: Wachstum haploider Sporen aus Tetraden des Stammes RWY94D (*fgy1::kanMX/FGY1*) auf YEP-Medium mit 2% Glukose (D), 1% Maltose (M) oder 1% Ethanol (E) als Kohlenstoffquellen. Die Zellen wurden für zwei, drei oder fünf Tage (d) bei 30°C inkubiert.

Um den Einfluß der *FGY1*-Deletion auch in einem anderen Stammhintergrund studieren zu können, wurde der Austausch des *FGY1*-Gens gegen eine *kanMX*-Kassette wie im Fall des Stammes CEN.PK141 auch in dem diploiden Wildtypstamm W303D durchgeführt. Der für *FGY1* heterozygot-diploide Deletionsstamm wurde mit RWY95D (*fgy1::kanMX/FGY1*) benannt. Im Gegensatz zu den $\Delta fgy1$ -Sporen des CEN.PK-Stammes zeigten die Sporen mit einer *fgy1*-Deletion im W303-Stammhintergrund jedoch noch geringes Wachstum nach dem Ablegen einer Tetrade auf YEP-Medium mit Glukose als Kohlenstoffquelle (Abb. 13A). Die Sporen dieser Tetrade wurden isoliert und erneut auf YEP-Medium mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen ausgestrichen (Abb. 13B). Nach Inkubation der Zellen für drei Tage bei 30°C war ein im Vergleich zu den Wildtyp-Sporen klar verringertes, aber dennoch deutliches Wachstum der $\Delta fgy1$ -Sporen auf Medium mit Glukose oder Ethanol zu beobachten. Im Gegensatz dazu hatte die Deletion von *FGY1* auf Medium mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle einen letalen Phänotyp zur Folge, der durch Transformation der Zellen mit dem Plasmid YEpFGY1 wieder komplementiert werden konnte (nicht gezeigt). In Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle und dem genetischen Hintergrund des verwendeten Hefestammes lassen sich somit verschiedene Wachstumsphänotypen der *fgy1*-Deletionsmutanten zusammenfassen (Tab. 14).

Abb. 13: (A) Wachstum haploider *fgy1::kanMX*- bzw. *FGY1*-Sporen einer Tetrade des Stammes RWY95D auf YEPD-Medium und (B) auf YEP-Medium mit 2% Glukose, 1% Maltose oder 1% Ethanol als Kohlenstoffquellen. Die Zellen wurden für drei Tage bei 30°C inkubiert.



Tab. 14: Phänotypische Unterschiede im Wachstumsverhalten von *Δfgy1*-Stämmen mit anderem genetischen Hintergrund. Die Zellen wurden für drei Tage bei 30°C auf YEP-Medium mit den angegebenen Kohlenstoffquellen inkubiert. (++) gutes Wachstum, (+) eingeschränkt gutes Wachstum, (+/-) schwaches Wachstum, (-) kein Wachstum.

Stammhintergrund	Genotyp	2% Glukose	1% Maltose	1% Ethanol
CEN.PK	<i>FGY1</i>	++	++	++
	<i>Δfgy1</i>	+/-	+/-	-
W303	<i>FGY1</i>	++	++	++
	<i>Δfgy1</i>	+	-	+

3.2.10 Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisierung von Fgy1, GLUT1 und GLUT4 in *S. cerevisiae*

Die bislang anhand von GFP-Fusionsproteinen gewonnenen Daten deuteten auf eine Lokalisierung sowohl von Fgy1 als auch des heterolog in Hefe exprimierten Säugetier-Glukosetransporters GLUT1 an der Zelloberfläche hin, wahrscheinlich in der Plasmamembran (3.2.9.1 bzw. 3.2.2). Zudem war GLUT1 wie auch das GLUT1-GFP Fusionsprotein in der Lage, die Aufnahme von Glukose zu vermitteln und so den Wachstumsdefekt des Glukosetransport-defizienten *fgy1-1*-Mutantenstammes EB.Y.S7 zu komplementieren. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Beobachtungen von Kasahara und Kasahara (1996), die in Immunfluoreszenz-Experimenten GLUT1 in intrazellulären Strukturen lokalisieren konnten. Allerdings fällt es anhand von GFP-Fluoreszenz schwer, zwischen einer Lokalisierung „in“ oder „an“ der Plasmamembran zu differenzieren, wobei auch Artefakte durch die Fusion mit dem GFP-Protein nicht ausgeschlossen werden können. Daher wurde die zelluläre Lokalisierung der Proteine Fgy1, GLUT1 und GLUT4 in Hefe zusätzlich durch das sogenannte „SOS-Recruitment-System“ (SRS) sowie in einem zweiten Ansatz über Dichtegradientenzentrifugation näher charakterisiert.

3.2.10.1 Sos-Recruitment-System (SRS)

Das von Aronheim *et al.* (1997) entwickelte SRS-System erlaubt im Gegensatz zum klassischen „Two-Hybrid“-System (Fields und Song, 1989) die *in vivo*-Untersuchung der Wechselwirkungen löslicher Proteine an deren nativem Wirkungsort, ohne sie in den Zellkern lokalisieren zu müssen, um dort ein transkriptionelles Reportersystem zu induzieren. Durch entsprechende Modifikationen des SRS-Systems lassen sich ebenfalls Interaktionen zwischen löslichen und membranständigen Proteinen studieren, die aufgrund ihrer Hydrophobizität nicht in den

Zellkern dirigiert werden können (Wieczorke, 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine weitere Variante des SRS-Systems entwickelt, die eine Untersuchung der Membranlokalisierung von Proteinen erlaubt, sowie Rückschlüsse auf die zytoplasmatische oder extrazelluläre Ausrichtung der carboxy- bzw. aminoterminalen Enden von Membranproteinen zulässt.

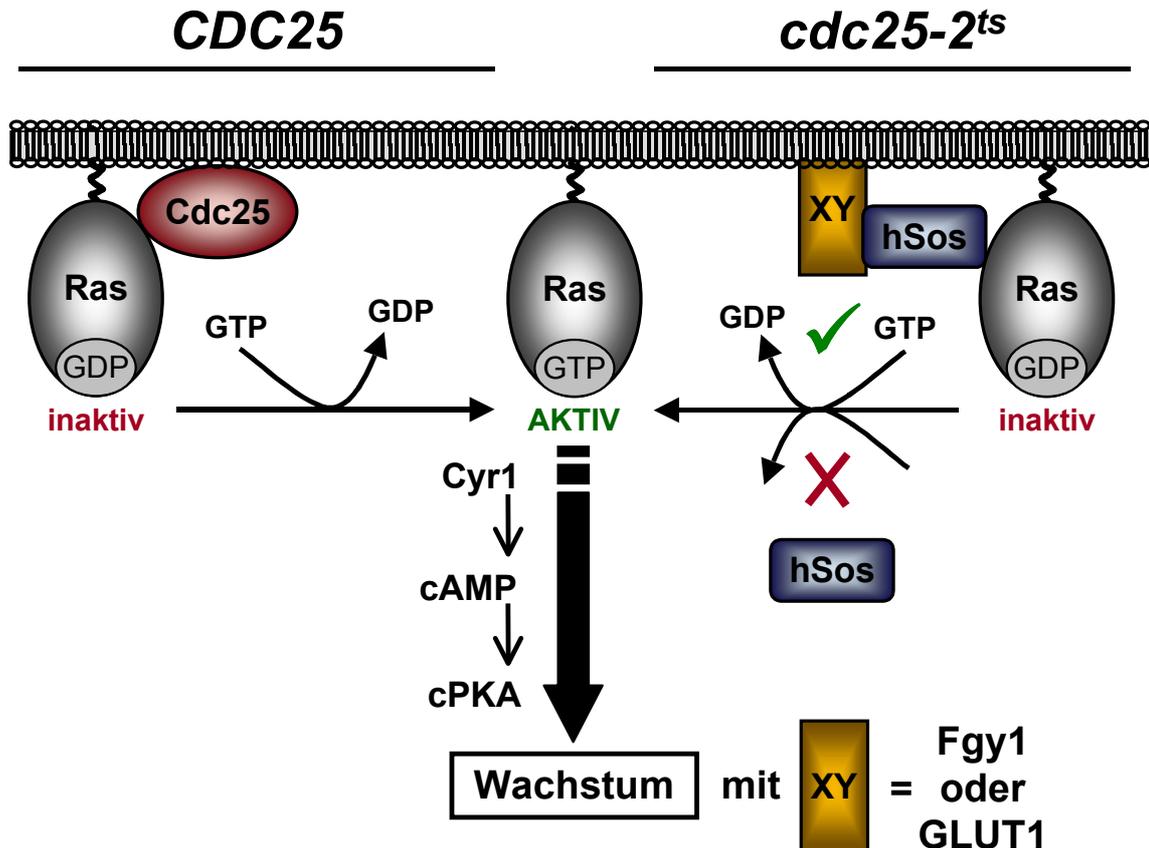


Abb. 14: Schematische Darstellung des „SOS-Recruitment-Systems“. In Wildtypzellen wird das GTP-bindende Protein Ras durch Cdc25 aktiviert, das seinerseits die Adenylatzyklase Cyr1 zur Produktion von cAMP stimuliert. Durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (cPKA) werden vielfältige Prozesse des Wachstums und Metabolismus in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Nährstoffen reguliert. Das menschliche hSos-Protein kann die Funktion des essentiellen Cdc25 in einem *cdc25-2^{ts}*-Mutantenstamm ersetzen, sofern es sich an der Zellmembran und in räumlicher Nähe zu Ras befindet. Eine Lokalisierung von hSos an die Plasmamembran kann durch Interaktion von hSos oder eines hSos-Fusionsproteins mit einem Membranprotein (XY) erfolgen, jedoch auch durch die direkte Fusion von hSos mit einem Membranprotein.

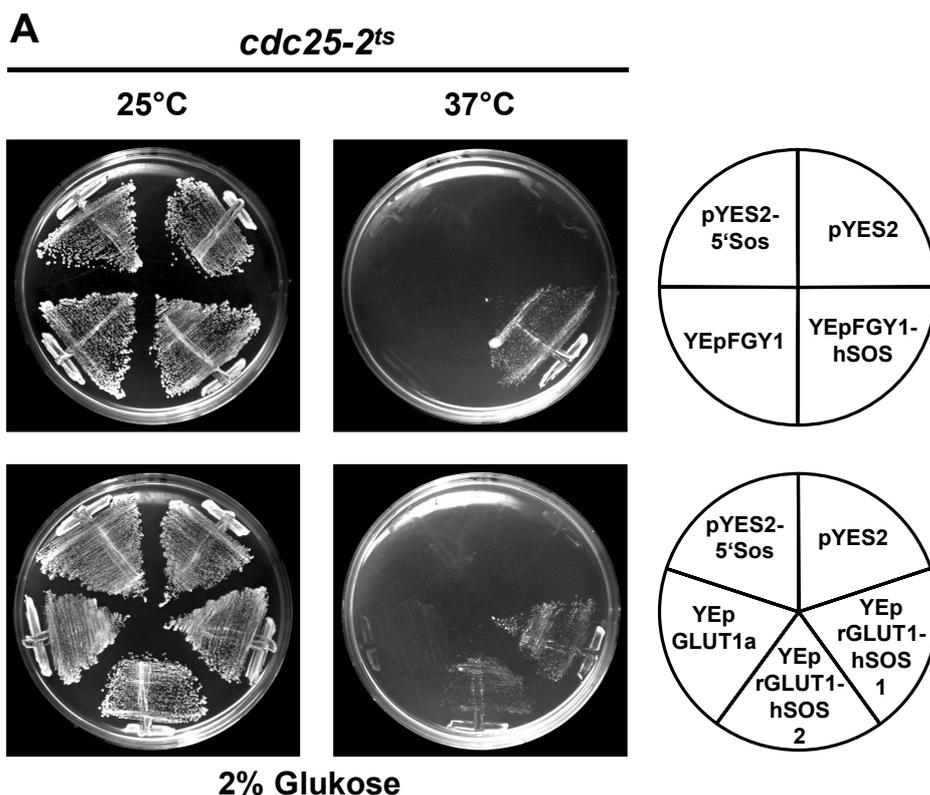
Das SRS-System basiert auf einem temperatursensitiven *cdc25-2^{ts}*-Mutantenstamm von *S. cerevisiae*. Cdc25 spielt eine essentielle Rolle als GEF („guanyl nucleotide exchange factor“) im Ras/cAMP-Weg der Hefe. Es aktiviert das GTP-bindende Protein Ras durch Stimulation des Austausches von gebundenem GDP gegen freies GTP (Thevelein und De Winde, 1999). Aktiviertes Ras

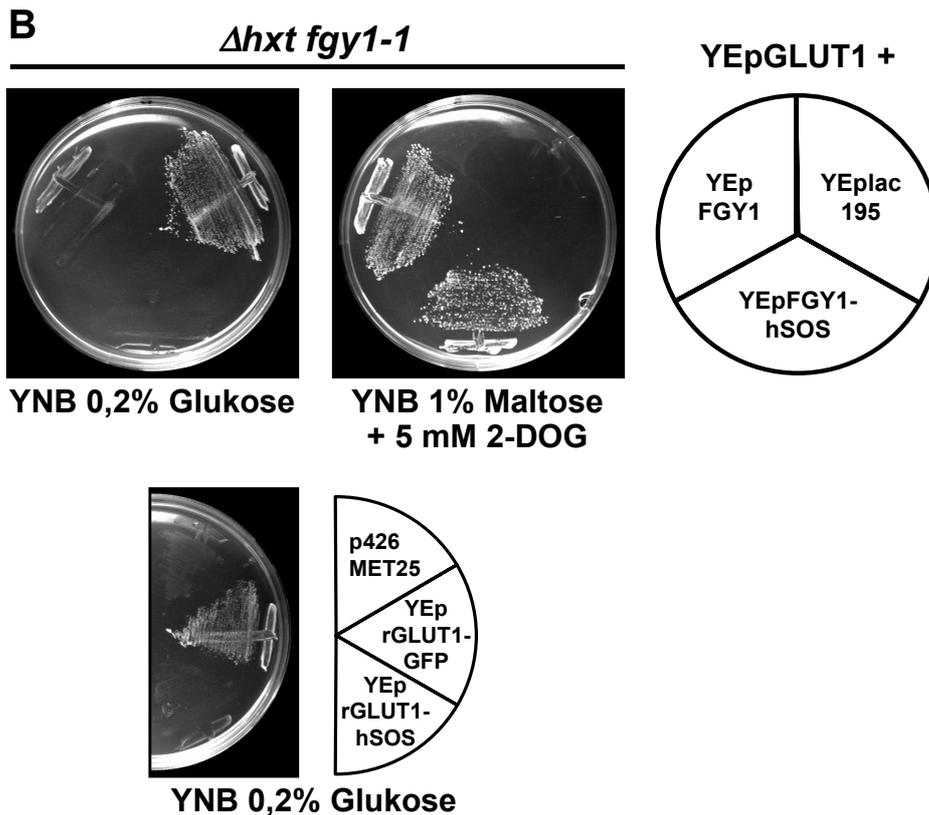
stimuliert die Adenylatzyklase (Cyr1) zur Produktion von cAMP, das wiederum zu einer Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (cPKA) führt (Abb. 14). Über diese Signaltransduktionskette werden zahlreiche zelluläre Prozesse wie Kohlenstoff-Metabolismus, Wachstum und Zellzyklus gesteuert (Boles *et al.*, 1997). Daher ist die Produktion von cAMP für den normalen Zellzyklus essentiell und läßt ein Wachstum des *cdc25-2^{ts}*-Stammes lediglich bei einer permissiven Temperatur von 25°C zu. Beim SRS-System macht man sich die Entdeckung zunutze, daß in *S. cerevisiae* die Lokalisierung des menschlichen GEF-Austauschfaktors (hSos) zur Plasmamembran und in die Nähe von Ras ausreichend ist, den Ras-Signalweg zu aktivieren (Aronheim *et al.*, 1994). Jedoch kann nur Plasmamembran-lokalisiertes hSos die Funktion des essentiellen Hefeproteins Cdc25 ersetzen und das Wachstum der *cdc25-2^{ts}*-Mutanten bei der restriktiven Temperatur ermöglichen. Eine solche Lokalisierung kann dabei das Resultat der Interaktion von hSos oder eines hSos-Fusionsproteins mit einem Protein in oder an der Plasmamembran sein (Abb. 14).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Modifikation dieses Systems eingesetzt. Um die zelluläre Lokalisierung von Fgy1 und GLUT1 in Hefe detaillierter zu untersuchen, wurden diese Proteine carboxyterminal mit hSos fusioniert. Im Fall einer Lokalisierung von Fgy1 und GLUT1 an die Plasmamembran sollte durch die Fusion auch hSos an die Zelloberfläche gelangen und daher in der Lage sein, das Wachstum des *cdc25-2^{ts}*-Reporterstammes bei der restriktiven Temperatur von 37°C zu ermöglichen. Für die Konstruktion der Fgy1-Sos und Glut1-Sos Fusionen wurde eine verkürzte, stark aktive Version des SOS-Gens (Aronheim *et al.*, 1994) in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotidpaaren c11-Glut1-SOS/c4-fusSOS bzw. c11-Fgy1-SOS/c4-fusSOS und dem Plasmid pYES2-5'Sos als Vorlage amplifiziert. Die „c11-Primer“ binden an den Anfang des SOS-Gens ab dem ATG-Startkodon und besitzen homologe Sequenzen zu den Enden von *FGY1* und *GLUT1* unter Auslassung des Stop-Kodons und Beibehaltung des offenen Leserahmens, während c4-fusSOS im *CYC1*-Terminator von pYES2-5'Sos bindet. Als Endprodukte wurden so SOS-DNA-Fragmente mit 5'-terminalen Überlappungen zu den Enden der für *FGY1* bzw. *GLUT1* kodierenden Gene sowie 3'-terminaler Übereinstimmung zum *CYC1*-Terminator erhalten. Die Plasmide YEpFGY1-GFP und YEprGLUT1-GFP wurden mit *NotI* linearisiert (Schnittstelle zwischen *FGY1* bzw. *GLUT1* und *GFP*) und zusammen mit den PCR-Produkten in den Hefestamm EBY.S7 transformiert. Nach homologer Rekombination in dem *cdc25-2^{ts}*-Hefestamm konnten die neuen Plasmide YEpFGY1-hSOS und YEprGLUT1-hSOS isoliert werden, bei denen das *GFP*-Gen durch SOS substituiert worden war.

Transformanten des *cdc25-2^{ts}*-Stammes, die lediglich einen leeren Kontrollvektor oder ein Plasmid für die alleinige Expression von hSos oder GLUT1 enthielten, waren nicht in der Lage, bei einer restriktiven Temperatur zu wachsen. Im Gegensatz dazu wurde der Wachstumsdefekt der Mutanten durch die Plasmide YEpFGY1-hSOS und YEpGLUT1-hSOS komplementiert (Abb. 15A). Diese Ergebnisse deuten auf eine Lokalisierung von Fgy1 und GLUT1 an der Plasmamembran in die Nähe des Ras-Proteins hin. Für GLUT1 war bereits zuvor eine zytoplasmatische Orientierung des Carboxyterminus vorhergesagt worden (Muekler *et al.*, 1984). Die dargestellten Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß sich der C-Terminus des Fgy1-Proteins ebenfalls im Zytoplasma befinden muß, da nur so der hSos-Anteil des Fusionsproteins in der Lage ist, den Ras-Signalweg zu aktivieren und das Wachstum der *cdc25-2^{ts}*-Mutanten bei restriktiver Temperatur zu ermöglichen.

Abb. 15: (A) Wachstum von Transformanten des *cdc25-2^{ts}*-Reporterstammes des SRS-Systems auf YNB-Medium mit 2% Glukose ohne Uracil nach dreitägiger Inkubation bei 25°C bzw. 37°C. Fgy1- bzw. GLUT1-hSos-Fusionsproteine können das Wachstum des Stammes bei 37°C nur bei einer Lokalisierung an der Plasmamembran wiederherstellen. (B) Wachstum von Transformanten des Stammes EBY.S7 (hxt⁻ *fgy1-1*) auf synthetischem Komplettmedium ohne Uracil nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C. Die Medien enthielten als Kohlenstoffquellen 0,2% Glukose oder 1% Maltose mit Zusatz von 5 mM 2-DOG. Während die Aktivität von Fgy1 in Fusion mit hSos unverändert ist, geht die Glukosetransport-Funktion von GLUT1 durch die Fusion mit hSos verloren, nicht jedoch bei einer Fusion mit dem GFP-Protein.





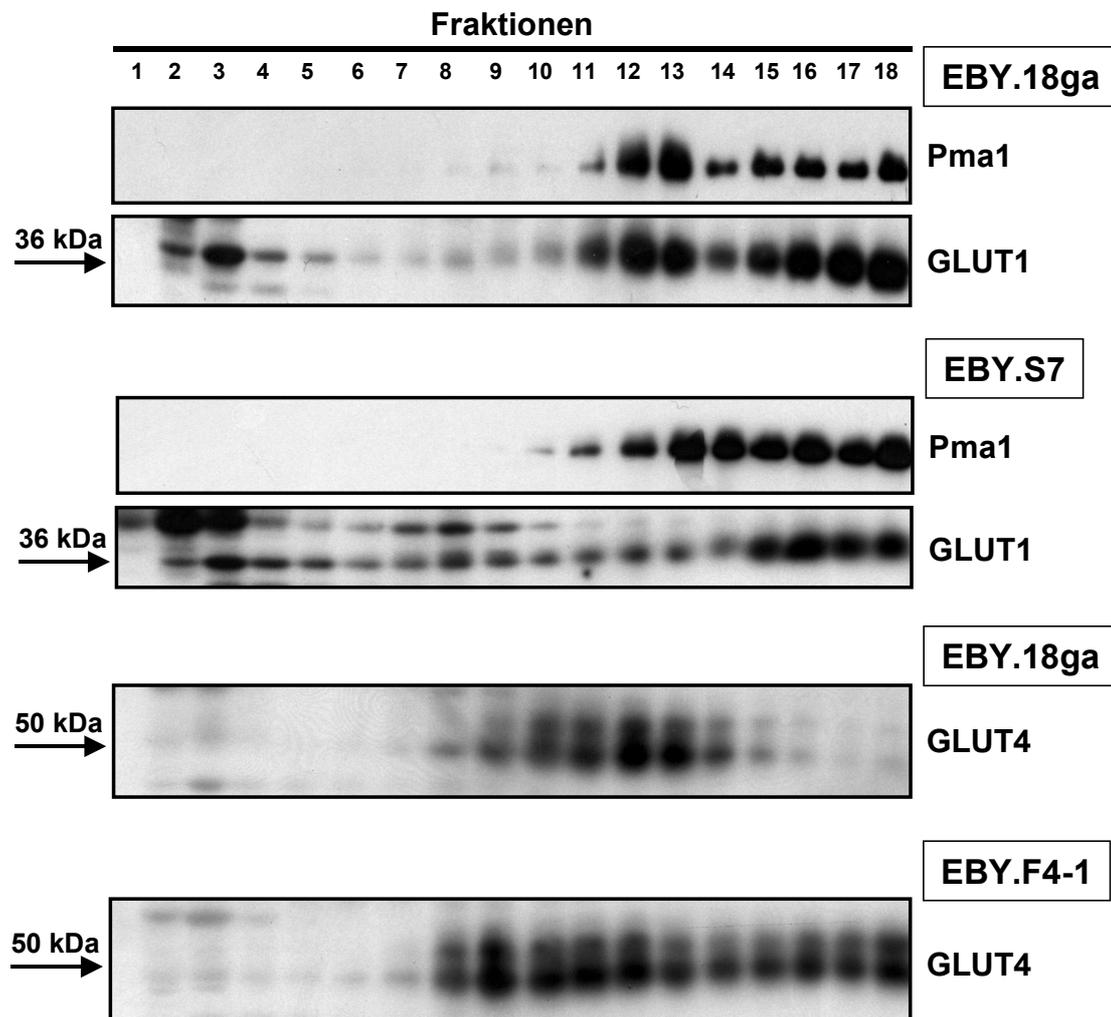
Durch die Fusion mit anderen Proteinen kann unter Umständen die ursprüngliche Aktivität eines Proteins verlorengehen. Aus Abb. 15B wird ersichtlich, daß die Funktion von Fgy1 in dem Fgy1-hSos-Fusionsprotein erhalten geblieben war. GLUT1-Transformanten von EBY.S7 (*hxt⁻ fgy1-1*) mit YEpFGY1-hSOS wie auch mit YEpFGY1 wuchsen nicht auf Medium mit 0,2% Glukose, hingegen aber auf 1% Maltose mit 5 mM 2-DOG. Im Gegensatz dazu schien die Fähigkeit von GLUT1, die Aufnahme von Glukose zu katalysieren und ein Wachstum des Stammes EBY.S7 auf Glukosemedium zu vermitteln, infolge der Fusion mit hSos verlorengegangen zu sein. Eine Fusion von GLUT1 mit dem GFP-Protein hatte hingegen keine inaktivierende Wirkung (Abb. 15B).

3.2.10.2 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Zur weiteren Untersuchung der intrazellulären Verteilung der GLUT-Proteine in Hefe wurden Fraktionierungsexperimente durchgeführt. Zellextrakte von in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Kulturen wurden mit Saccharosegradienten fraktioniert und das Verteilungsmuster von GLUT1, GLUT4 sowie des Reporterproteins Pma1 (Plasmamembran-ATPase der Hefe) durch Western-Blotting analysiert. Es wurden Zellextrakte des Stammes EBY.18ga mit dem Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 oder YEp4H7-hsGLUT4, des Stammes EBY.S7 mit YEp4H7-hsGLUT1 sowie des Stammes EBY.F4-1 mit YEp4H7-hsGLUT4 untersucht. Aus Abb. 16 wird deutlich, daß sich die Verteilung von GLUT1 im Stamm

EBY.18ga sowie auch in EBY.S7 weitgehend mit der des Plasmamembranproteins Pma1 deckt. Die *fgy1-1*-Mutation scheint somit keinen erkennbaren Einfluß auf die Lokalisierung von GLUT1 in Hefe auszuüben. Demgegenüber ist GLUT4 klar in den Fraktionen geringerer Dichte lokalisiert, was auf eine Akkumulation in intrazellulären Membranstrukturen hindeutet (Kölling und Hollenberg, 1994). In dem Mutantenstamm EBY.F4-1 (*fgy1-1 fgy41*) ist das Fraktionierungsprofil von GLUT4 deutlich zu den Fraktionen höherer Dichte verschoben und erreicht offensichtlich die Plasmamembran-Fraktionen. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, daß in Wildtypstämmen von *S. cerevisiae* eine funktionelle Expression von GLUT4 unter anderem aufgrund der Mißlokalisierung des Proteins verhindert wird.

Abb. 16: Fraktionierung von GLUT1 und GLUT4 durch Dichtegradientenzentrifugation. Zellextrakte der GLUT1- oder GLUT4-exprimierenden Hefestämme EBY.18ga, EBY.S7 und EBY.F4-1 wurden mit einem Saccharosegradienten (20-50% Saccharose, geringste Dichte in Fraktion 1) fraktioniert. Mittels SDS-PAGE und Western-Analyse wurden die Fraktionen auf die Anwesenheit dieser beiden Proteine sowie des Markerproteins Pma1 hin untersucht. Es wurden spezifische polyklonale Antisera gegen GLUT1, GLUT4 sowie Pma1 eingesetzt.



Das molekulare Gewicht von GLUT1 in tierischen Zellen variiert zwischen 44 und 55 kDa in Abhängigkeit von Gewebe- und Zelltyp (Kasahara *et al.*, 1985). Das hier festgestellte Gewicht von rund 40 kDa deckt sich mit früheren Ergebnissen von Kasahara und Kasahara (1996) und deutet auf eine zumindest wenig N-glykosylierte Form des Proteins hin. In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, daß das Molekulargewicht des menschlichen Erythrozyten-GLUT1 nach Behandlung mit N-Glykosidase F von 50 auf 40 kDa reduziert wurde und der des in Hefe exprimierten GLUT1 entsprach. Zusammengenommen mit den hier dargestellten Daten deutet dies darauf hin, daß der Glykosylierungszustand von GLUT1 offensichtlich für dessen korrekte Funktion als Glukosetransporter in Hefe nicht zwingend erforderlich ist. Im Fall von GLUT4 wurde ein Molekulargewicht von rund 50 kDa ermittelt, das sich annähernd mit dem zuvor beobachteten Gewicht von 43 kDa deckt (Kasahara und Kasahara, 1997). Ungeklärt bleibt das Auftreten einer höhermolekularen GLUT4-Form, die in der Westernanalyse als zusätzliches Signal auftritt. Da diese Doppelbande jedoch sowohl im Stamm EBY.18ga als auch in EBY.F4-1 zu beobachten ist, scheinen die Entstehungsursachen in keinem Zusammenhang mit der Glukosetransportaktivität von GLUT4 oder der *fgy41*-Mutation zu stehen.

3.2.11 Bestimmung der kinetischen Eigenschaften von GLUT1 und GLUT4

Die kinetischen Eigenschaften der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 wurden in der Vergangenheit in verschiedenen heterologen Expressionssystemen untersucht. Je nach Art des Systems (*Xenopus*-Oocyten, Zellkulturen, rekonstituierte Liposomen aus Hefe), der Meßmethode („zero-trans influx“ oder „equilibrium exchange“) und verwendetem Substrat (Glukose, 2-Desoxyglukose, 3-O-Methylglukose) ergaben sich unterschiedliche K_m -Werte für GLUT1 zwischen 1,6 mM und 44 mM bzw. 9 mM bis 22 mM für GLUT4 (Burant und Bell, 1992; Colville *et al.*, 1993; Dauterive *et al.*, 1996; Kasahara und Kasahara, 1996; 1997; Keller *et al.*, 1989; Nishimura *et al.*, 1993). Um die kinetischen Parameter der Glukoseaufnahme von Hefe-exprimiertem GLUT1 und GLUT4 zu bestimmen, wurde der Transport unterschiedlicher Konzentrationen radioaktiver D-[U-¹⁴C]-Glukose in Zellen des Stammes EBY.S7 (*hxt⁻ fgy1-1*) mit dem Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 sowie im Stamm EBY.F4-1 (*hxt⁻ fgy1-1 fgy41*) mit dem Plasmid YEp4H7-hsGLUT4 gemessen (Abb. 17). Es konnte für menschliches GLUT1 ein K_m -Wert von $3,2 \pm 0,2$ mM, für GLUT4 ein K_m -Wert von $12,6 \pm 0,5$ mM ermittelt werden. Die V_{max} -Werte betragen $16,7 \pm 1,5$ für GLUT1 und $25,4 \pm 2,0$ nmol min⁻¹ mg TG⁻¹ für GLUT4. In Kontrollzellen von EBY.S7 und EBY.F4-1 mit leerem Vektor YEp4H7 lag die Glukoseaufnahmeaktivität mit 2 nmol min⁻¹ mg TG⁻¹ unterhalb der Nachweisgrenze (Wieczorke *et al.*, 2001). Desweiteren konnte in Zellen des

Stammes EBY.18ga (*hxt⁻*) mit dem Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 oder YEp4H7-hsGLUT4 auch nach Messung über einen Zeitraum von einer Minute keine signifikante Glukoseaufnahme detektiert werden.

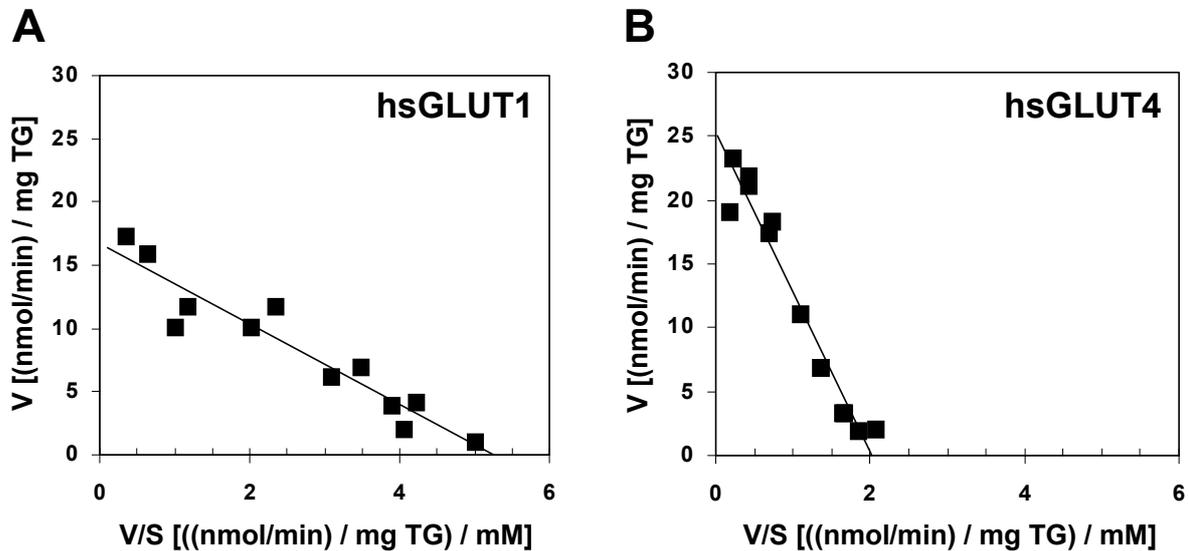


Abb. 17: Eadie-Hofstee Plots der Glukoseaufnahmekinetiken von GLUT1- und GLUT4-exprimierenden Hexosetransport-defizienten Hefezellen. **(A)** Der Stamm EBY.S7 (*hxt⁻ fgy1-1*) mit dem Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 sowie **(B)** der Stamm EBY.F4-1 (*hxt⁻ fgy1-1 fgy41*) mit dem Plasmid YEp4H7-hsGLUT4 wurden über Nacht in YNB-Medium mit 0,2% Glukose ohne Uracil bei 30°C bis zu einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen ml^{-1} herangezogen und der Glukosetransport durch 5 s zero-trans Influx-Messung radioaktiver Glukose gemessen.

Im Gegensatz zu den Hexosetransportern der Hefe wird die Aktivität von Säuger-Glukosetransportern spezifisch durch Cytochalasin B gehemmt (Baldwin, 1993; Kasahara und Kasahara, 1996). Dieser natürliche Metabolit des Pilzstoffwechsels bindet kompetitiv zu Glukose an das Transportsystem an der intrazellulären Oberfläche der Membran (Devés und Krupka, 1978; Shanahan 1982; 1983). Erwartungsgemäß führte die Zugabe von 20 μM Cytochalasin B zum Reaktionsansatz zu einer kompletten Hemmung der Glukosetransportaktivität in GLUT1- und GLUT4-Transformanten der Stämme EBY.S7 und EBY.F4-1.

Diese Ergebnisse zeigen klar, daß der in Hexosetransport-defizienten Hefestämmen beobachtete Glukosetransport auf die Aktivität der heterolog exprimierten Säuger-Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 zurückzuführen ist. Die für diese Proteine in Hefe bestimmten kinetischen Parameter weisen eine gute Übereinstimmung mit früheren Daten für GLUT1 und GLUT4 auf, die durch Expression in humanen Erythrozyten und mittels rekonstituierter Liposomen aus Membranfraktionen der Hefe gewonnen wurden (Baldwin, 1993; Kasahara und Kasahara,

1996; 1997; Lowe und Walmsley, 1985; 1986). Somit steht als Alternative zu herkömmlichen Systemen ein neues heterologes Expressionssystem für die Charakterisierung von Glukosetransportern aus Säugetieren und anderen Organismen zur Verfügung.

3.2.12 Untersuchungen zur Funktion von Fgy1

Bislang liegen keine Erkenntnisse über eine mögliche Funktion von Fgy1 in Hefe vor. Hinweise liefert lediglich die Entdeckung, daß die Deletion von *FGY1* in Verbindung mit einer Deletion der Cyclin-abhängigen Proteinkinase Pho85 einen letalen Phänotyp in der Hefe hervorruft (Lenburg und O'Shea, 2001). Als Zielsubstrat dieser CDK konnte unter anderem das Protein Rvs167 identifiziert werden (Lee *et al.*, 1998), das zusammen mit Rvs161 eine Rolle in der Regulation des Aktin-Zytoskeletts spielt, wobei Fgy1 selbst schwache Ähnlichkeiten zu Myosinen aufweist. Interessanterweise wurde kürzlich eine Two-Hybrid-Interaktion des Proteins Ynl094w mit Rvs161 und Rvs167 nachgewiesen (Bon *et al.*, 2000), dessen kodierende Sequenz, wie in Abschnitt 3.2.8.3 beschrieben, als Multicopy-Suppressor im Rahmen der Experimente zur Klonierung des *FGY1*-Gens isoliert werden konnte. In weiteren Untersuchungen wurde daher die Funktion von Fgy1 in Hefe sowie der Einfluß des Proteins auf endogene wie auch heterologe Hexosetransporter näher analysiert.

3.2.12.1 *in vitro*-Mutagenese von Fgy1

Kürzlich konnte in Säugetierzellen für das Oberflächen-Glykoprotein CD147 (OX-47) gezeigt werden, daß es spezifisch mit den Monocarboxylat-Transportern MCT1 und MCT4 an der Plasmamembran assoziiert ist und vermutlich eine Funktion bei der Translokation und/oder korrekten Lokalisierung dieser Proteine zur Zelloberfläche ausübt, wobei zusätzlich auch eine direkte regulatorische Funktion denkbar wäre (Kirk *et al.*, 2000). Obwohl CD147 Ähnlichkeit zu Immunglobulinen zeigt, teilt das Protein auch gemeinsame Strukturmerkmale mit Fgy1, wie z.B. eine einzelne Transmembrandomäne und einen zytoplasmatischen C-Terminus. Zieht man die bislang erhaltenen Daten bezüglich der Wirkung von Fgy1 auf die heterolog exprimierten GLUT-Proteinen in Hefe hinzu, wäre es denkbar, daß neben strukturellen Gemeinsamkeiten auch die Wirkungsweise von Fgy1 verwandt derjenigen von CD147 sein könnte. Es konnte bereits gezeigt werden, daß dem zytoplasmatischen C-Terminus von Fgy1 eine besondere Bedeutung zukommt (siehe Abschnitte 3.2.9.2 und 3.2.9.3), was auch im Fall von CD147 gefunden wurde (Kirk *et al.*, 2000). Ein charakteristisches Merkmal der Mitglieder der CD147-Proteinfamilie ist ein für einspännige Transmembranproteine ungewöhnlicher, zentral positionierter Glutamat-Rest (Fossum *et al.*, 1991; Green, 1991;

Saier, 1994). Dieser hat in Verbindung mit einem konservierten Arginin in der achten Transmembrandomäne der MCT-Proteine (Halestrap und Price, 1999) möglicherweise eine Funktion bei der Regulation dieser Transportproteine. In Fgy1 befindet sich anstelle eines Glutamats ein Aspartat-Rest im Zentrum der Transmembrandomäne (Abb. 18).

Fgy1

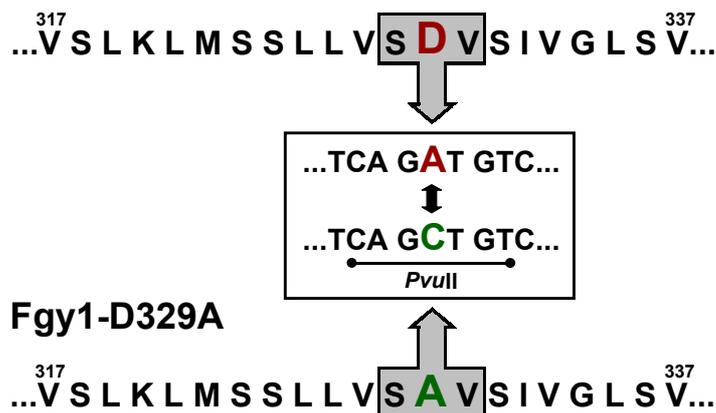


Abb. 18: Aminosäuresequenz der Transmembrandomäne von Fgy1. Hervorgehoben ist der Basenaustausch, der zu einem Ersatz des Aspartats an Position 329 durch Alanin führte. Infolgedessen wurde eine neue *PvuII*-Schnittstelle generiert.

Durch PCR-vermittelte *in vitro*-Mutagenese von Fgy1 wurde Aspartat₃₆₉ gegen Alanin ausgetauscht. Die erfolgreiche Mutagenese konnte anhand einer neu eingeführten *PvuII*-Erkennungsstelle durch Restriktionsanalyse verifiziert werden (Abb. 18). In einer ersten PCR-Reaktion wurde ein DNA-Fragment mittels der Primer seqmet25 und p4-mutFGY1 sowie dem Plasmid YEpFGY1-GFP als Vorlage synthetisiert. Das PCR-Produkt diente in einer zweiten Reaktion nach der Methode von Boles und Miosga (1995) als sog. „Megaprimer“. Zusammen mit den Oligonukleotiden seqmet25 und c4-YMR212-GFP sowie dem Plasmid YEpFGY1 als DNA-Vorlage wurde ein mutagenes *FGY1*-Fragment amplifiziert und über homologe Rekombination in dem Hefestamm EBY.18ga in den mit *EcoRI*-linearisierten Vektor p426MET25-GFP kloniert. Das neue Expressionsplasmid wurde mit YEpFGY1-D329A-GFP bezeichnet. Die Entscheidung, die Mutagenese in einem Fgy1-GFP Fusionsprotein durchzuführen, erfolgte aufgrund der für die Konstruktion zum Teil bereits vorliegenden Komponenten (Oligonukleotide, DNA-Vorlage) sowie des in Abschnitt 3.2.9.1 geschilderten Nachweises der Funktionalität von Fgy1 in einer Fusion mit dem GFP-Protein.

Um mögliche Auswirkungen der Mutation zu untersuchen, wurden GLUT1-Transformanten des Stammes EBY.S7 zusätzlich mit leerem Vektor, YEpFGY1-GFP oder dem mutagenisierten YEpFGY1-D329A-GFP transformiert und das Wachstum der Zellen auf Medium mit 0,2% Glukose sowie 1% Maltose mit 5 mM

2-DOG beobachtet (Tab. 15). Dabei zeigten sich keine Wachstumsunterschiede zwischen Zellen mit Wildtyp-Fgy1 und Zellen, die das mutagenisierte Fgy1^{D329A} in Fusion mit GFP exprimierten. In beiden Fällen wurde die genomische *fgy1-1*-Mutation des Stammes EBY.S7 komplementiert und die GLUT1-vermittelte Glukoseaufnahme inhibiert. Gleichmaßen wie Wildtyp-Fgy1 konnte das mutante Fgy1^{D329A} den Wachstumsdefekt des Δ *fgy1*-Stammes RWY95-1A (siehe Abschnitt 3.2.9.4) auf Maltosemedium komplementieren, während mit leerem Vektor transformierte Kontrollzellen kein Wachstum zeigten (Daten nicht gezeigt).

Tab. 15: Untersuchung des Wachstums von Transformanten des Stammes EBY.S7 auf synthetischem Medium ohne Uracil und Tryptophan mit den angegebenen Kohlenstoffquellen bzw. in Anwesenheit von 5 mM 2-DOG. Die Zellen wurden für drei Tage bei 30°C inkubiert. (+) gutes Wachstum, (-) kein Wachstum.

Stamm	Genotyp	Plasmid 1	Plasmid 2	Wachstum	
				0,2% Glc	1% Mal 2-DOG
EBY.S7	<i>hxt⁻ fgy1-1</i>	YEPh2-rGLUT1	YCplac33	+	-
		YEPh2-rGLUT1	YEFGY1-GFP	-	+
		YEPh2-rGLUT1	YEFGY1-D329A-GFP	-	+

3.2.12.2 Bestimmung der Maltoseaufnahmeaktivität

Eine Deletion von *FGY1* zeigt je nach genetischem Hintergrund des verwendeten Hefestammes (CEN.PK oder W303) unterschiedliche Phänotypen (vergl. Tab. 14). Der Δ *fgy1*-Stamm RWY95-1A wies dabei einen Wachstumsdefekt auf Medium mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle auf. Für den Maltosetransport in Hefe ist eine Zusammensetzung aus zwei Komponenten beschrieben: Einer hochaffinen, induzierbaren Komponente mit einem K_m -Wert von 4 mM, und einer konstitutiven, niederaffinen Komponente mit einem K_m -Wert von 70-80 mM (Cheng und Michels, 1991). Aufgrund abnormalen Verhaltens ohne Ähnlichkeiten zu anderen Transportmechanismen ist die Existenz des niederaffinen Systems jedoch umstritten (Benito und Lagunas, 1992). Sicher ist hingegen, daß die aktive, energieabhängige Aufnahme dieses Disaccharids in *S. cerevisiae* in erster Linie durch die Maltose-Permease Mal1 vermittelt wird, die durch den Transkriptionsaktivator Mal3 induziert wird und als Protonen-Symporter wirkt (Lagunas, 1993; van der Rest *et al.*, 1995). Während die Induktion abhängig von der Anwesenheit von Maltose ist, wird die Expression der strukturellen *MAL*-Gene durch Glukose reprimiert. Neben der Maltose-Permease Mal1 und dem Aktivator Mal3 ist für die Ver-

wertung von Maltose auch die Aktivität der Maltase Mal2 notwendig, wobei die Gene für diese drei Proteine in einem Locus als Cluster vorliegen (Lagunas, 1993). Bislang sind fünf hoch homologe *MAL*-Loci bekannt: *MAL1-MAL4* und *MAL6*. Jeder Locus trägt zumindest eine Kopie der drei separaten und für die Maltoseverwertung nötigen Gene *MALx1*, *MALx2* und *MALx3* (x steht dabei für einen der fünf Loci). Neben Mal1 wird die Maltoseaufnahme auch durch den generellen α -Glukosidtransporter Agt1 katalysiert, der als Allel von *MAL11* identifiziert wurde und auf Proteinebene 57% Identität zu Mal1 aufweist (Han *et al.*, 1995; Stambuk *et al.*, 1998; 1999; Plourde-Owobi *et al.*, 1999). Die für die Maltoseaufnahme beschriebenen K_m -Werte von 2-4 mM für Mal61 (Cheng und Michels, 1991) und 5-10 mM für Agt1 (Han *et al.*, 1995) weisen beide Proteine als hoch-affine Transporter aus. Durch Bestimmung der Maltoseaufnahmekapazität in einem *fgy1*-Deletionsstamm wurde untersucht, ob der Wachstumsdefekt dieser Zellen möglicherweise durch eine direkte negative Beeinflussung des Transportschrittes hervorgerufen wird.

Transformanten der Stämme RWY95-1A ($\Delta fgy1$), RWY95-1D (*FGY1*) mit *MAL1*- oder *AGT1*-Überexpressionsplasmiden bzw. leerem Vektor wurden auf Medium mit 1% Ethanol herangezogen und die Maltoseaufnahmeaktivität gemessen (Tab. 16). Beide Maltosetransporter befanden sich unter Kontrolle des *MET25*-Promotors und waren daher nicht von einer Induktion durch Maltose abhängig. Durch die Verwendung von Ethanol als „neutraler“ Kohlenstoffquelle anstelle von Glukose bei der Anzucht der Zellen wurde zudem die Glukose-induzierte Inaktivierung der Maltosepermeasen (Katabolit-Inaktivierung) ausgeschlossen (Medintz *et al.*, 1996). Als Positivkontrolle dienten die Wildtyp-Hefestämme CEN.PK2-1C und RWY95-1D, die nach Transformation mit leerem Vektor unter induzierenden Bedingungen auf Medium mit 1% Maltose herangezogen wurden.

Die Ergebnisse zeigen bei einem Vergleich des Wildtyp-Stammes RWY95-1D mit leerem Vektor und den entsprechenden $\Delta fgy1$ -Zellen, daß die Maltoseaufnahme in den Mutanten deutlich um rund 63% reduziert ist (Tab. 16B). Durch Überexpression von Agt1 und Mal1 lassen sich die Transportraten von 1 mM Maltose zwar klar erkennbar steigern, jedoch im $\Delta fgy1$ -Stamm im Verhältnis wesentlich weniger stark als in Wildtypzellen. Um mögliche Auswirkungen der *fgy1*-Deletion auf die Kinetik des Maltosetransports abschätzen zu können, wurde im Fall der Transformanten mit leerem Vektor zusätzlich die Maltosetransportrate bei einer Konzentration von 50 mM Maltose bestimmt. Aus den Daten wird erkennbar, daß in den Mutantenzellen im Vergleich zum Wildtyp lediglich der V_{max} -Wert beeinträchtigt ist, der K_m -Wert hingegen nahezu unverändert bleibt. Somit scheint sich

der Verlust der Funktion von Fgy1 vornehmlich auf die Aktivität des Maltosetransports auszuwirken, jedoch nicht auf dessen Kinetik.

Tab. 16: Aufnahme radioaktiv markierter D-[U-¹⁴C]-Maltose in Transformanten der Stämme RWY95-1A, RWY95-1D und CEN.PK2-1C mit einem Agt1- oder Mal1-Expressionsplasmid bzw. leerem Vektor p426MET25. Die Zellen wurden über Nacht bei 30°C in 50 ml 0,2% Glukose YNB-Medium ohne Uracil und Methionin herangezogen, durch Zentrifugation geerntet, mit Wasser gewaschen und erneut in YNB-Medium ohne Uracil und Methionin mit **(A)** 1% Maltose oder **(B)** 1% Ethanol als Kohlenstoffquellen angeimpft. Nach Erreichen einer Zelldichte von 1×10^7 Zellen ml^{-1} wurde der Maltosetransport durch 5 s zero-trans Influx-Messung radioaktiver Maltose bestimmt. Die Maltosekonzentration im Test betrug 1 mM oder 50 mM.

(A) Medium: 1% Maltose YNB $\text{ura}^- \text{met}^-$

Stamm	Genotyp	Plasmid	C (Maltose) [mM]	Transportrate V [$\text{nmol min}^{-1} \text{mg TG}^{-1}$]
RWY95-1D	<i>FGY1</i>	p426MET25	1	3,23
			50	36,21
CEN.PK2-1C	<i>FGY1</i>	p426MET25	1	26,47
			50	122,18

(B) Medium: 1% Ethanol YNB $\text{ura}^- \text{met}^-$

Stamm	Genotyp	Plasmid	C (Maltose) [mM]	Transportrate V [$\text{nmol min}^{-1} \text{mg TG}^{-1}$]
RWY95-1D	<i>FGY1</i>	p426MET25	1	1,93
			50	44,58
		p426AGT1	1	7,94
		p426MAL1	1	4,91
RWY95-1A	$\Delta fgy1$	p426MET25	1	0,71
			50	16,60
		p426AGT1	1	1,85
		p426MAL1	1	1,63

Wie die Messung der Transportraten nach Anzucht von Wildtyp-Stämmen in Maltosemedium unter induzierenden Bedingungen (Tab. 16A) zeigt, weist der aus dem Wildtypstamm W303 hervorgegangenen Stamm RWY95-1D eine generell

deutlich geringere Maltosetransportrate verglichen mit dem Stamm CEN.PK2-1C auf, was sich auf Unterschiede im genetischen Hintergrund beider Zelllinien zurückführen lassen könnte. Überraschenderweise ist die Transportaktivität in RWY95-1D unter induzierenden Bedingungen gegenüber dem Transport nach Anzucht in flüssigem Medium mit der bezüglich der Induktion des *MAL*-Systems neutralen Kohlenstoffquelle Ethanol unverändert niedrig, obwohl das Wachstum des Stammes auf Agarplatten mit 1% Maltose nur geringfügig langsamer als das des CEN.PK-Stammes ausfiel. Dies deutet darauf hin, daß in dem genetischen Hintergrund des Stammes W303 keine Maltose-abhängige Induktion des Systems für die Maltoseaufnahme und -verwertung erfolgen könnte, sondern möglicherweise eine konstitutiv niedrige Expression für das Wachstum der Zellen ausreichend ist.

3.2.12.3 Untersuchung der Arsenat-Resistenz von *fgy1*-Mutanten

Die synthetische Letalität einer *Δfgy1 Δpho85* Mutante sowie die Beobachtung, daß die Überexpression des Cyclins Pho80 in der Lage ist, diesen Phänotyp zu supprimieren (Lenburg und O'Shea, 2001), deutet auf eine mögliche Störung in der Aufnahme von Phosphat hin, da das *PHO85*-Gen ursprünglich durch Komplementation einer Phosphatstoffwechselmutante isoliert wurde (Uesono *et al.*, 1987).

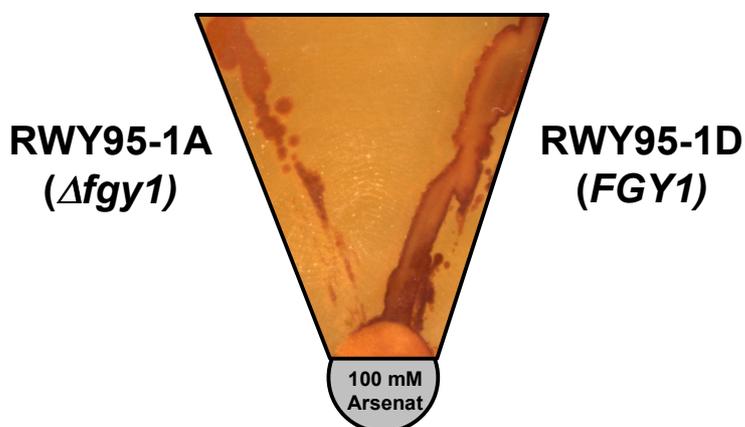


Abb. 19: Plättchentest zur Untersuchung der Arsenat-Sensitivität eines *Δfgy1*-Mutantenstammes im Vergleich zu Wildtypzellen. Das Wachstum der Zellen wurde nach fünftägiger Inkubation bei 30°C auf YEPD-Medium dokumentiert.

Phosphat wird unter anderem über den hoch-affinen Phosphattransporter Pho84 in die Zellen aufgenommen (Bun-ya *et al.*, 1991; Persson *et al.*, 1999). Neben Phosphat ist Pho84 auch in der Lage, die Aufnahme von Arsenat zu katalysieren, das in vielen zellulären Reaktionen als Analog zu Phosphat wirken kann und dadurch den Metabolismus und das Zellwachstum inhibiert. Offenbar wird Arsenat im Rahmen der Glykolyse anstelle von Phosphat auf 1,3-Diphosphoglycerat übertragen, wodurch in der Energiebilanz ein Mol ATP pro Mol Glukose weniger gewonnen werden kann (Bun-ya *et al.*, 1996; Johnson 1971). Durch einen sogenannten „Plättchentest“ wurde untersucht, ob sich Unterschiede in der Sensitivität

gegenüber Arsenat zwischen einer *fgy1*-Mutante und dem Wildtypstamm erkennen lassen (Abb. 19). Ein mit einer 100 mM Arsenatlösung getränktes Filterpapierplättchen wurde in der Mitte einer YEPD-Agarplatte plaziert und die Hefestämme RWY95-1A (Δ *fgy1*) und RWY95-1D (*FGY1*) vom Rand der Platte zur Mitte hin ausgestrichen. Nach fünftägiger Inkubation bei 30°C zeigte sich ein Wachstum der *FGY1*-Zellen bis an den Rand des Plättchens, so daß die Arsenatkonzentration für eine komplette Hemmung der Wildtypzellen offenbar nicht ausreichend war. Im Gegensatz dazu wurde das Wachstum des Δ *fgy1*-Mutantenstammes bereits ca. 1 cm entfernt vom Plättchenrand gehemmt. Demzufolge weisen Δ *fgy1*-Zellen den Phänotyp einer leicht erhöhten Sensitivität gegenüber Arsenat auf.

3.2.12.4 Interaktionen des Fgy1-C-Terminus im Two-Hybrid-System

Wie bereits dargestellt wurde, scheint der carboxyterminale Bereich des Fgy1-Proteins eine besondere Rolle bei der Hemmung des GLUT1-vermittelten Glukotransports in Hefe zu spielen. Denkbar wäre neben einer direkten Beeinflussung der Aktivität von GLUT1 auch eine Wechselwirkung des C-Terminus mit Proteinen der Hefe, die eine sekundär-regulatorische Funktion ausüben, beispielsweise bei der Fusion sekretorischer Transportvesikeln mit der Plasmamembran. Um möglicherweise Rückschlüsse auf die Funktion von Fgy1 in Hefe und die Art der Beeinflussung der GLUT1-Aktivität ziehen zu können, wurde das Two-Hybrid-System für die Suche nach Interaktionspartnern von Fgy1 eingesetzt.

Bei dem Two-Hybrid-System handelt es sich um ein genetisches System zur Detektion von Proteinwechselwirkungen *in vivo* (Fields und Song, 1989). Das Prinzip beruht auf dem modularen Charakter eukaryontischer Transkriptionsfaktoren wie z.B. Gal4. Die Funktion des Vollängenproteins kann rekonstituiert werden, wenn die Gal4-DNA-Bindedomäne (BD) und die Gal4-DNA-Aktivierungsdomäne (AD) in räumliche Nähe gelangen. Hierzu wird im Two-Hybrid-System ein Protein X an die AD und ein Protein Y an die BD fusioniert. Bei physikalischer Interaktion von X mit Y werden Aktivierungs- und DNA-Bindedomäne zusammengebracht und die Funktion als Transkriptionsaktivator wiederhergestellt. Dieser ist in der Lage, verschiedene Reportergene zu induzieren, die zuvor in unterschiedliche Gal4-abhängige *GAL*-Loci des Hefestammes PJ69-4A integriert worden waren (James *et al.*, 1996). Die Expression des *HIS3*- und des *ADE2*-Reportergens bewirkt Wachstum der Zellen auf entsprechendem Medium ohne Histidin bzw. Adenin, die Expression der β -Galaktosidase des *lacZ*-Gens erlaubt eine Quantifizierung der Interaktionsstärke.

Zur Suche nach Fgy1-Interaktionspartnern wurden die letzten 417 Aminosäuren des Proteins (entsprechend dem Konstrukt für das SRS-System, Abschnitt 3.2.10.1) N-terminal mit der Gal4-BD fusioniert. Das mit pGBDU-FGY1c bezeichnete Expressionsplasmid wurde durch *in vivo*-Rekombination eines *FGY1*-DNA-Fragments in den mit *Bam*HI/*Sa*II linearisierten Vektor pGBDU-C1 erhalten, das zuvor in einer PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden c1-G4BDfusFGY1c und c4-G4BDfusFGY1c sowie dem Plasmid YEpFGY1 als Vorlage synthetisiert worden war. Die Fusion wurde durch Sequenzierung mit dem Primer seqGal4BD überprüft. Für die Durchführung eines Genbankscreens wurde der Two-Hybrid-Testerstamm PJ69-4A mit dem Plasmid pGBDU-FGY1c (*URA3*) und drei verschiedenen Genbanken transformiert (*LEU2*), bei denen Fragmente genomischer Hefe-DNA als Fusionen mit der Gal4-Aktivierungsdomäne in unterschiedlichen Leserahmen vorlagen (James *et al.*, 1996). Die darauffolgenden Selektionsschritte wurden nach James *et al.* (1996) durchgeführt. Durch Wachstumstests auf entsprechenden synthetischen Medien wurde die Induktion der *HIS3*- und *ADE2*-Reporter-kassetten sowie durch Überschichtungstests die Aktivität der β -Galaktosidase in den Transformanten analysiert. Sogenannte „falsch-positive“-Klone wurden durch 5-FOA-Selektion (Verlust des Plasmids pGBDU-FGY1c; die Zellen trugen lediglich noch das *LEU2*-Genbankplasmid) und darauffolgende Untersuchung des Wachstums auf Selektivmedium ohne Leucin und Histidin bzw. Adenin eliminiert. Wachstum auf diesen Medien deutete auf einen von dem Genbankplasmid kodierten Transkriptionsaktivator hin und war nicht das Resultat einer Interaktion von Fgy1 mit einem weiteren Protein.

Insgesamt wurden ca. 10^6 Transformanten jeder Genbank analysiert und zunächst 63 Histidin-prototrophe Klone isoliert, die auch β -Galaktosidaseaktivität aufwiesen. Es zeigte sich, daß in keinem der Fälle das als sehr stringent beschriebene *ADE2*-Reporterkonstrukt (James *et al.*, 1996) ausreichend stark induziert werden konnte, um ein Wachstum der Zellen auf Medium ohne Adenin zu ermöglichen. Kontrollzellen des Stammes PJ69-4A, die mit den Plasmiden pSE1111 und pSE1112 (Fields und Song, 1989) transformiert worden waren, zeigten hingegen gutes Wachstum auf Adenin- und Histidin-Mangelmedium sowie eine hohe *lacZ*-Aktivität. Jedoch stellten sich alle erhaltenen 63 Klone im weiteren Verlauf der Untersuchung als „falsch-positiv“ heraus. Retransformation einiger dieser aus Hefe isolierten Genbankplasmide in PJ69-4A konnte bereits ein Wachstum des Stammes auf synthetischem Medium mit 2% Glukose ohne Histidin vermitteln. Eine Interaktion des C-Terminus von Fgy1 mit anderen Proteinen im Two-Hybrid System konnte somit bislang nicht nachgewiesen werden.

3.2.12.5 Isolierung von Multicopy-Suppressoren einer *fgy1*-Deletion

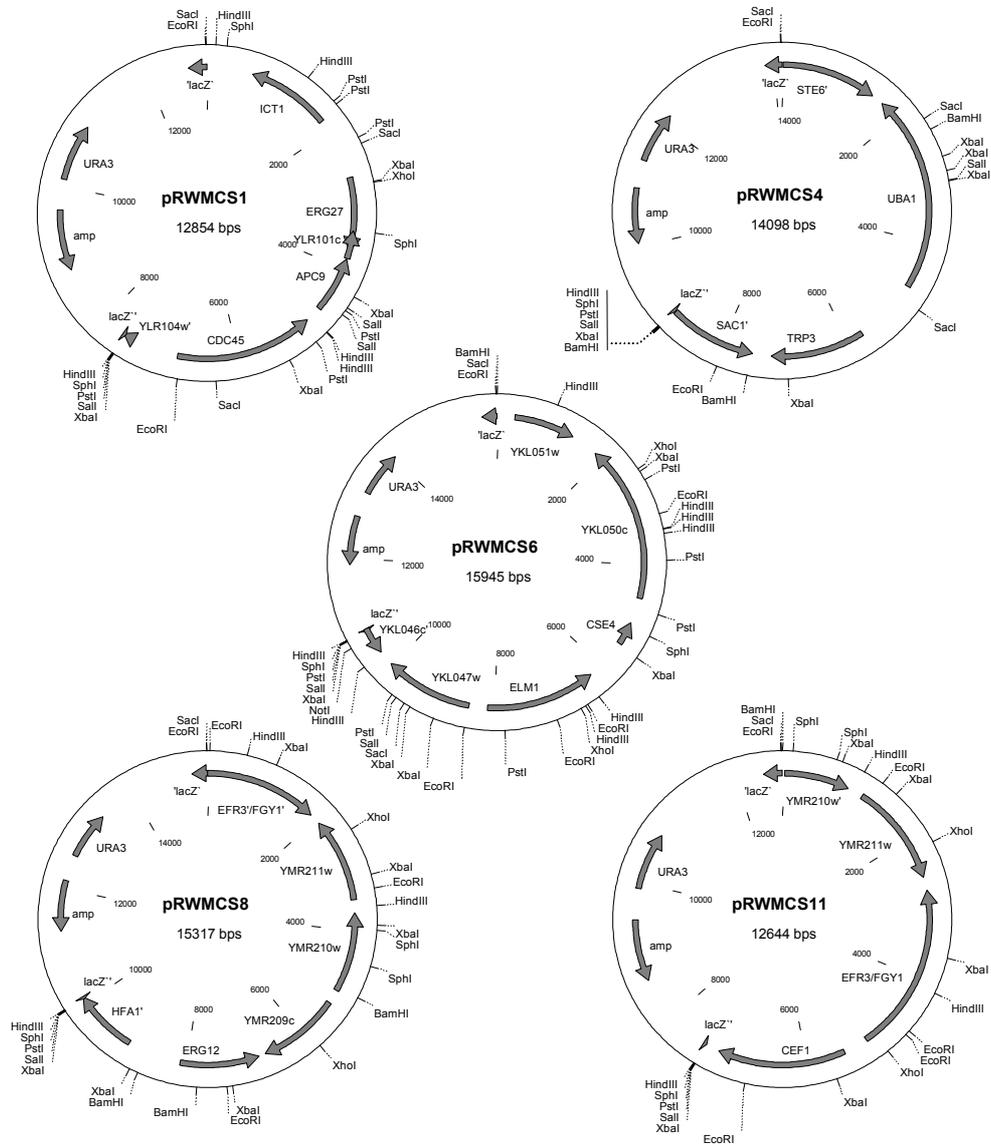
In einem weiteren Experiment wurde über Komplementation mit einer Genbank nach Plasmiden gesucht, die in hoher Kopienzahl den Wachstumsdefekt von $\Delta fgy1$ -Mutanten auf Maltosemedium komplementieren konnten. Die Analyse der hierfür verantwortlichen Gene ließ möglicherweise Rückschlüsse auf die Funktion von Fgy1 in Hefe zu. Eine DNA-Bank mit chromosomalen Fragmenten des Stammes EB.YW5000 (Wieczorke *et al.*, 1999) im 2 μ -Vektor YEplac195 wurde in den $\Delta fgy1$ -Mutantenstamm RWY95-1A transformiert und die Zellen auf YNB-Medium ohne Uracil und mit 1% Maltose als Kohlenstoffquelle ausplattiert. Nach drei- bis fünftägiger Inkubation bei 30°C konnten 16 Suppressormutanten isoliert werden, die die Fähigkeit zurückerlangt hatten, auf Maltosemedium zu wachsen. Die Plasmide wurden aus diesen Transformanten isoliert und durch Restriktionsanalyse charakterisiert, wobei sich fünf unterschiedliche Restriktionsmuster zeigten. Stellvertretend wurde je eines dieser Plasmide erneut in RWY95-1A transformiert und die Zellen auf synthetischem Maltosemedium ausplattiert. Alle Plasmide konnten den Wachstumsdefekt des Deletionsstammes supprimieren. Die komplette Sequenz der inserierten DNA-Fragmente wurde nach Sequenzierung der 5'- und 3'-terminalen Enden mit den „Universal“- und „Reverse“-Primern UP bzw. RP durch eine Datenbanksuche (NCBI Blast search) ermittelt. In Abb. 20 sind die Strukturen der isolierten Genbankplasmide schematisch dargestellt.

Tab. 17: Identifizierung offener Leserahmen bzw. Genfragmente der Suppressorplasmide pRWMCS, die für die Wiederherstellung des Wachstums des $\Delta fgy1$ -Stammes RWY95-1A auf Maltosemedium verantwortlich sind.

Genbank-plasmid	ORF	Gesamtlänge	Beschreibung
pRWMCS1	<i>YLR099c/ICT1</i>	394 AS	Funktion unbekannt, Nullmutanten zeigen erhöhte Kupfertoleranz
pRWMCS4	<i>YKL210w/UBA1</i>	1024 AS	Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1)
pRWMCS6	<i>YKL051w</i>	353 AS	Funktion unbekannt, weist sechs Transmembrandomänen auf
pRWMCS8	<i>YMR212c/FGY1</i>	616 AS	Kodiert für ein N-terminal verkürztes Fgy1-Protein (AS 167 bis 782)
pRWMCS11	<i>YMR212c/FGY1</i>	782 AS	Vollständiges <i>FGY1</i> -Wildtyp-Gen, komplementiert die <i>fgy1</i> -Deletion

Durch die Subklonierung partieller Fragmente der DNA-Inserts der Plasmide pRWMCS1, 4, 6, 8 und 11 konnten die für die Supprimierung verantwortlichen Leserahmen bzw. DNA-Abschnitte identifiziert werden (Dörthe Voss, persönliche Mitteilung). Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tab. 17 zusammengefaßt. *ICT1* kodiert für ein bislang noch nicht näher charakterisiertes Protein. Im Rahmen einer genomischen Gendelektionsstudie wurde bei *ICT1*-Nullmutanten eine erhöhte Kupfertoleranz gefunden (Entian *et al.*, 1999). Das essentielle *UBA1*-Gen kodiert für ein Protein des Ubiquitin-Proteindegradationssystems. Für Uba1 konnte eine Funktion als „Ubiquitin-aktivierendes Enzym“ (E1) bei der posttranslationalen Bildung von Ubiquitin-Protein-Konjugaten nachgewiesen werden (McGrath *et al.*, 1991). Ubiquitin wird durch das E1-Enzym in einer ATP-abhängigen Reaktion C-terminal adenyliert und darauffolgend über eine Thioester-Bindung an einen Cystein-Rest des Proteins gebunden (McGrath *et al.*, 1991). „Aktiviertes“ Ubiquitin wird über das E2-Enzym Cdc34 und den „SCF-Komplex“ (E3-Enzym; Skp1/Cdc53/F-Box-Protein) auf Substratproteine übertragen, die infolgedessen für den Abbau durch das 26S Proteasom markiert sind (Willems *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu ist über die Funktion des Gens *YKL051w* bislang nichts bekannt. Interessanterweise weist dessen Proteinstruktur sechs hydrophobe Domänen auf, was möglicherweise auf eine Rolle als integrales Membran- oder sogar Transportprotein hindeutet. Bei einem weiteren Genbankplasmid konnte der supprimierende Effekt auf das Wachstum des *fgy1*-Deletionsstammes auf ein 5'-terminal verkürztes *FGY1*-Gen zurückgeführt werden (pRWMCS8). Die ersten 453 Basen des Leserahmens fehlen. Durch ein ATG-Startkodon an Position 499 der Nuklotidsequenz könnte jedoch ein 616 Aminosäuren langes Fgy1-Protein exprimiert werden, das verglichen mit dem Vollängenprotein N-terminal um 166 Aminosäuren verkürzt ist. Demnach ist dieser fehlende Proteinabschnitt offenbar nicht für die Funktion von Fgy1 essentiell. Im Gegensatz zu pRWMCS8 enthält das Plasmid pRWMCS11 den vollständigen Leserahmen des *FGY1*-Gens.

Abb. 20: Isolierte 2 μ -Plasmide einer Genbank, die den Wachstumsdefekt des $\Delta fgy1$ -Stammes RWY95-1A auf Medium mit 1% Maltose als Kohlenstoffquelle supprimieren.



4 DISKUSSION

4.1 Konstruktion eines Glukosetransport-negativen Hefestammes und Untersuchung von Mitgliedern der Maltosetransporter-Familie

Die Hexosetransporter von *S. cerevisiae* bieten ein eindrucksvolles Beispiel für eine Familie von Proteinen mit stark überlappenden, aber dennoch distinkten Funktionen. Keiner der Hexosetransporter ist für die Lebensfähigkeit der Zellen essentiell, stattdessen spielt jeder Transporter eine mehr oder weniger hoch spezialisierte Rolle (Boles und Hollenberg, 1997; Wieczorke *et al.*, 1999). Dies versetzt die Hefe in die Lage, Zucker über einen weiten Konzentrationsbereich und mit hohen Flußraten verarbeiten zu können. Die Transportrate einer schnell fermentierenden Zelle liegt bei über 10^7 Glukosemolekülen und übt eine starke Kontrolle auf den glykolytischen Fluß aus (Gancedo und Serano, 1989; Kruckeberg, 1996). Aus diesem Grund ist das Verständnis der grundlegenden Prinzipien des Glukosetransports über die Plasmamembran von großer Bedeutung.

Neben den Hexostransportern Hxt1 bis Hxt17 und Gal2 sind auch drei Mitglieder der Maltosepermease-Familie, Agt1, Mph2 und Mph3, in der Lage, die Aufnahme von Glukose zu vermitteln. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch zusätzliche Deletion der Gene *AGT1*, *MPH2* und *MPH3* in einem *hxt1-17 gal2* Mutantenstamm von *S. cerevisiae* ein Glukosetransport-defizienter Stamm konstruiert werden, der sich auszeichnet als Werkzeug für die Expression und individuelle Untersuchung einzelner Glukosetransporter in Hefe eignet (Wieczorke *et al.*, 1999). In einer ersten Anwendung dieses Stammes bei der Analyse von Mitgliedern der Maltosetransporterfamilie konnte erstmals eine Funktion für die bislang uncharakterisierten Proteine Mph2 und Mph3 als Saccharosetransporter nachgewiesen werden. Die Expression von Mph2, Mph3 oder Agt1 in einer *hxt*-Nullmutante ohne endogene Invertase, jedoch mit einer zytoplasmatischen Saccharose-Synthase aus Kartoffel, konnte das Wachstum der Zellen auf Saccharosemedium wiederherstellen. Somit wurde auch die für den α -Glukosidtransporter Agt1 beschriebene Saccharosetransportaktivität bestätigt (Stambuk *et al.*, 1998; 1999). Jedoch zeigte sich anhand einer Promotor-*lacZ*-Fusion, daß die Expression des *AGT1*-Gens nur durch Maltose um das ca. 100fache induziert wird, der Promotor in Gegenwart von Saccharose und Glukose aber reprimiert ist. Daher ist fraglich, ob die physiologisch relevante Funktion von Agt1 tatsächlich den Transport von Saccharose einschließt, oder ob die beobachtete katalytische Aktivität nicht nur einen Nebeneffekt dieses recht unspezifischen Transporters mit breitem Substratspektrum darstellt.

4.2 Entwicklung eines neuen Systems für die heterologe Expression von Glukosetransportern aus Säugetieren

Die Ergebnisse von Untersuchungen anderer Gruppen wiesen darauf hin, daß Glukosetransporter aus Säugetieren bei heterologer Expression in *S. cerevisiae* aufgrund intrazellulärer Retention normalerweise nicht zum Transport des Zuckers über die Plasmamembran der Hefe beitragen können (Kasahara und Kasahara, 1996; 1997). GFP-Fusionen mit dem Erythrozyten-Glukosetransporter GLUT1 sowie dem Insulin-regulierten Glukosetransporter GLUT4 zeigten jedoch, daß zumindest GLUT1 in dem hier verwendeten Hefestamm bereits an der Zelloberfläche lokalisiert ist, scheinbar jedoch in einer inaktiven Form vorliegt. Experimente in menschlichen Leukämiezellen ergaben eine wichtige Rolle der *N*-Glykosylierung für die Aktivität von GLUT1 (Ahmed und Berridge, 1999). Demgegenüber scheint die in Hefe fehlende Glykosylierung von GLUT1 und GLUT4 keinen Einfluß auf die Funktionalität auszuüben, da beide Proteine in rekonstituierten Liposomen aus Membranfraktionen von GLUT1- bzw. GLUT4-exprimierenden Hefezellen Glukosetransportaktivität aufwiesen (Kasahara und Kasahara, 1996; 1997). Dies ist beispielsweise auch der Fall für den erst kürzlich in Hefe exprimierten Na⁺-Glukose-Symporter SGLT1, der trotz fehlender Glykosylierung den Glukosetransport vermitteln kann (Firnges *et al.*, 2001). Unter Umständen wird die Aktivität von GLUT1 und GLUT4 in der Plasmamembran aber auch durch endogene Faktoren der Hefe negativ beeinflusst. Demgegenüber führt in dem hier eingesetzten Hefestamm offenbar ebenfalls eine Störung der Sekretion von GLUT4 dazu, daß der Transporter in intrazellulären Membranstrukturen zurückgehalten wird und die Plasmamembran nicht erreichen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in einem Screen durch die Verwendung eines Hexosetransporter-defizienten Hefestammes mit Deletionen in den endogenen Glukosetransportern spontane Suppressormutationen isoliert werden, die eine funktionelle Expression von GLUT1 in Hefe ermöglichen. Der Wachstumsdefekt eines *hxt⁻*-Stammes auf Glukosemedium läßt sich dabei durch Expression von mutanten GLUT1-Versionen mit einzelnen Aminosäureaustauschen oder durch Expression von Wildtyp-GLUT1 in einem Stamm mit einer zusätzlichen, als *fgy1-1* („functional expression of GLUT1 in yeast“) bezeichneten Mutation komplementieren. Die nähere Analyse der GLUT1-Region, in der die spontanen Mutationen auftraten, weist auf eine Veränderung in der Proteinstruktur der zweiten Transmembrandomäne hin, die zur Überführung von GLUT1 in einen „aktiven“ Status zu führen scheint. Weitere, durch zielgerichtete Mutagenese vorgenommene Austausche benachbarter Aminosäuren sowie Überführung der von spontanen Mutationen betroffenen Aminosäuren in solche mit anderen chemischen und

sterischen Eigenschaften, resultierten in nahezu allen Fällen in einem aktiven GLUT1-Glukosetransporter.

In Arbeiten anderer Gruppen konnte durch Messung von rekonstituierter Glukose-transportaktivität, intrazellulärer Bindung von Cytochalasin B und extrazellulärer Photomarkierung mit ATB-BMPA bislang eine Reihe von wichtigen Aminosäureresten mit unterschiedlichen Funktionen in GLUT1 identifiziert werden. Während Mutationen in Tyr293, Trp412 oder Asn415 das Protein in einer nach außen orientierten Konformation arretieren, wird durch Mutagenese von beispielsweise Pro385 eine nach innen gerichtete Konformation fixiert, wodurch die Existenz zweier unabhängiger Bindestellen für Glukose gezeigt werden konnte (Garcia *et al.*, 1992; Katagiri *et al.*, 1991; Mori *et al.*, 1994). Andere Reste scheinen in die extrazelluläre (Glu161) und intrazelluläre (Trp388) Ligandenbindung oder den Glukosetransportschritt an sich (Arg333/334) involviert zu sein (Kasahara und Kasahara, 1998; Mueckler *et al.*, 1994; Schürmann *et al.*, 1997). Jedoch ist keine dieser Aminosäuren in den hier erhaltenen „aktiven“ GLUT1-Allelen von einer Mutation betroffen, sondern überraschenderweise solche Aminosäuren, die in Glukosetransportern der Säugetiere wie in denen der Hefe zum Teil hochkonserviert vorliegen. Dies legt die Vermutung nahe, daß für die funktionelle Expression von GLUT1 in Hefe bereits relativ unspezifische Veränderungen der Aminosäuresequenz in der ersten Hälfte der zweiten Transmembrandomäne ausreichend sind. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte sein, daß das Protein durch eine strukturelle Veränderung in eine „aktive“ Konformation überführt wird, bei der unter Umständen auch Interaktionsstellen für positive oder negative Regulatoren zugänglich bzw. maskiert werden könnten.

Während für die funktionelle Expression von Wildtyp-GLUT1 bereits eine einzelne genomische Mutation im *FGY1*-Gen ausreichend ist, wird für GLUT4 eine weitere Mutation benötigt, die die intrazelluläre Retention des Transporters aufhebt. Durch die Suche nach spontanen Suppressoren des Glukosetransportdefekts von GLUT4-exprimierenden *hxt⁻ fgy1-1*-Zellen konnten Mutationen isoliert werden, die mit *fgy4X* („functional expression of GLUT4 in yeast“; X bezeichnet unterschiedliche *FGY4*-Allele oder unterschiedliche betroffene Gene von 1 bis 9) benannt wurden und in Kombination mit der „aktivierenden“ *fgy1-1*-Mutation auch die funktionelle Expression von GLUT4 in Hefe erlauben. Somit steht ein neues heterologes Expressionssystem für die Charakterisierung von GLUT1 und GLUT4 zur Verfügung, das durch zero-trans Influx-Messung radioaktiv markierter Glukose die Bestimmung der kinetischen Parameter dieser Transporter erlaubte. Die kinetischen Eigenschaften von Hefe-exprimiertem, menschlichem GLUT1 zeigen eine gute Übereinstimmung mit den früheren Untersuchungen von menschlichem

Erythrozyten-GLUT1 (Baldwin, 1993; Lowe und Walmsley, 1985; 1986). GLUT4 wurde bislang lediglich in heterologen Systemen wie *Xenopus*-Oozyten oder rekonstituierten Liposomen aus Membranfraktionen von Hefezellen charakterisiert, da kein natives Gewebe existiert, in dem GLUT4 alleine exprimiert wird. Zudem wurden in einigen dieser Studien nicht-metabolisierbare Glukose-Analoga wie 3-O-Methyl-D-Glukose oder 2-Desoxy-Glukose verwendet (Dauterive *et al.*, 1996; Walmsley *et al.*, 1998). In dem neuen System wurde der K_m -Wert von GLUT4 unter zero-trans Bedingungen mit 12,6 mM bestimmt und liegt um das vierfache über dem Wert von GLUT1. Hiermit bestätigen sich frühere Resultate aus Untersuchungen des GLUT4-Proteins der Ratte in aus Hefemembranen rekonstituierten Liposomen (Kasahara und Kasahara, 1997). Darüberhinaus konnte anhand von Wachstumstests gezeigt werden, daß sich die sehr nah verwandten GLUT-Proteine von Mensch und Ratte bei deren Expression in Hefe kaum voneinander unterscheiden und daß sich die intrazelluläre Retention von GLUT4 durch eine starke Überproduktion des Proteins partiell überlagern läßt.

Diese Ergebnisse demonstrieren, daß sich das neue Hefe-Expressionssystem als zuverlässiges Werkzeug für die Klonierung und Analyse von Glukosetransportern verschiedensten Ursprungs anbietet. Gegenüber herkömmlichen Systemen weist es eine Reihe von Vorteilen auf. Anhand einfacher Wachstumstests des Hexose-transport-defizienten Hefestammes auf Medien mit unterschiedlichen Zuckern als Kohlenstoffquelle lassen sich die Substratspezifitäten einzelner heterologer Transporter charakterisieren und Hexosetransporter aus cDNA-Banken klonieren. Die kinetischen Eigenschaften können unproblematisch durch zero-trans Influx-Messungen mit radioaktiv markierten Hexosen bestimmt werden. Zudem ermöglicht das Arbeiten mit ganzen Hefezellen die Etablierung von Screening-Systemen, die die Analyse von Struktur-Funktions-Beziehungen von Glukosetransportern oder aber auch die Suche nach neuen Pharmazeutika im Rahmen automatisierter „high-throughput screening“ (HTS) Anwendungen erlauben.

4.3 Lokalisierung von GLUT1 und GLUT4 in *S. cerevisiae*

Im Gegensatz zu der bisherigen Annahme, daß das GLUT1-Protein bei Expression in Hefe in intrazellulären Membranstrukturen festgehalten wird (Kasahara und Kasahara, 1996), zeigen die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Resultate mit GFP- und hSOS-fusioniertem GLUT1 sowie Dichtegradientenzentrifugationen klar, daß sich die Mehrheit des GLUT1-Proteins an der Plasmamembran befindet. Dennoch findet kein Transport von Glukose über die Membran statt. Diese Unterschiede könnten darauf zurückzuführen sein, daß hier ein Hefestamm mit ande-

rem genetischen Hintergrund eingesetzt wurde, der zudem Deletionen in allen endogenen Hexosetransportern aufwies. Die funktionelle Expression von GLUT1 wird durch die zusätzliche *fgy1-1*-Mutation im Hefegenom ermöglicht. Bei der Untersuchung eines GLUT1-GFP Fusionsproteins ließen sich keine Unterschiede in der Lokalisierung zwischen einem *hxt⁻*- und einem *hxt⁻ fgy1-1*-Mutantenstamm erkennen, obwohl letzterer in der Lage ist, Glukose aufzunehmen. Die Fähigkeit des menschlichen hSos Proteins, in Fusion mit GLUT1 den Wachstumsdefekt einer *cdc25-2^{ts}*-Mutante komplementieren zu können, deutet ebenfalls stark auf eine Plasmamembranlokalisierung von GLUT1 hin. hSos erfüllt in Säuger-Zellen normalerweise eine Funktion als GEF-Austauschfaktor im Ras-Signalweg. Jedoch ist es in der Lage, die Rolle des essentiellen Hefe-Homologs Cdc25 zu übernehmen, sofern hSos an die Plasmamembran lokalisiert wird. Nach Fraktionierung von Zellextrakten der Hefe in Saccharose-Gradienten zeigte sich zudem eine Kolo-kalisierung von GLUT1 mit Pma1, einem Markerprotein für die Plasmamembran. Da das Fraktionierungsmuster von *hxt⁻* und *hxt⁻ fgy1-1* Zellen keine wesentlichen Unterschiede in der GLUT1-Verteilung erkennen läßt, scheint der Effekt der *fgy1*-Mutation direkt die Aktivität von GLUT1 zu betreffen. Man kann spekulieren, daß Fgy1 einen inhibitorischen Einfluß auf GLUT1 ausüben könnte oder aber andere Faktoren reguliert, die die Funktion von GLUT1 negativ beeinflussen. In Zusammenhang mit den mutanten GLUT1-Allelen könnte eine Veränderung der GLUT1-Struktur die Erkennung durch Fgy1 oder durch Fgy1-regulierte Komponenten unterbinden und auf diese Weise die katalytische Aktivität des Glukose-transporters freigeben. Eine alternative Erklärung liegt in der Möglichkeit einer unvollständigen Einbettung von GLUT1 in die Plasmamembran. GLUT1 in Wildtyp-Zellen könnte in Vesikeln knapp unterhalb der Plasmamembran lokalisiert sein, die sich anhand der hier eingesetzten Nachweismethoden nicht von der Plasmamembran differenzieren lassen. Das Fgy1-Protein ist möglicherweise in die Regulation der Verschmelzung der Transportvesikel mit der Plasmamembran involviert und übt mangels charakteristischer Hefe-endogener Sequenzmotife auf Fremdproteine einen inhibitorischen Einfluß aus, der aber durch Mutationen in *FGY1* oder *GLUT1* aufgehoben werden kann (s.u.).

Im Gegensatz zu GLUT1 und übereinstimmend mit früheren Beobachtungen (Kasahara und Kasahara, 1997) akkumuliert GLUT4 in normalen Hefezellen klar in intrazellulären Membrankompartimenten, die dem ER oder Endosomen-artigen Strukturen ähneln. Dieser Zustand kann nur durch Einführung zweier genomischer Mutationen umgangen werden. Zusätzlich zu der *fgy1-1*-Mutation ist eine Mutation in einer anderen Gengruppe, *fgy4X*, notwendig, um funktionelles und Plasmamembran-dirigiertes GLUT4 in Hefe zu erzeugen. Dies spiegelt sich bei der Un-

tersuchung der GLUT4-Verteilung in Saccharose-Dichtegradienten in einer Verschiebung der GLUT4-Signale von den Fraktionen mittlerer Dichte (intrazelluläre Membranen) zu den Fraktionen höherer Dichte (Plasmamembran) wider. Interessanterweise wird die relative Effektivität des Glukosetransports von GLUT1 und GLUT4 auch in deren natürlichen Säugetier-Zelltypen nicht nur durch die unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften bestimmt, sondern vor allem durch das Ausmaß, in dem jeder Transporter zur Zelloberfläche dirigiert wird (Cushman und Wardzala, 1980; Holman und Cushman, 1994). Besonders nicht-konservierte Bereiche wie der N- und C-Terminus der ansonsten zu 65% identischen Transporter scheinen für die grundlegenden Unterschiede in der Regulation von GLUT1 und GLUT4 in Säugerzellen verantwortlich zu sein. Im Gegensatz zu GLUT1 enthält GLUT4 N-terminale Internalisierungssignale, die die Effizienz der GLUT4-Invagination von der Plasmamembran gegenüber GLUT1 steigern, wie auch C-terminale Sequenzen, die für eine Abtrennung und Retention des Transporters in spezifische intrazelluläre Membrankompartimente in Abwesenheit von Insulin sowie die Mobilisierung dieser Vesikel zur Zelloberfläche als Antwort auf Insulinausschüttung verantwortlich sind (Araki *et al.*, 1996; Cope *et al.*, 2000; Corvera *et al.*, 1994; Haney *et al.*, 1995; Martinez-Arca *et al.*, 2000; Melvin *et al.*, 1999; Palacios *et al.*, 2001; Piper *et al.*, 1993; Shewan *et al.*, 2000; Verhey und Birnbaum, 1994; Verhey *et al.*, 1995).

Man kann spekulieren, daß die Charakterisierung der *fgy4*-Mutationen und die Klonierung der korrespondierenden Gene unter Umständen auch Ähnlichkeiten zwischen Hefe- und Säugetierzellen bezüglich der Faktoren offenbaren könnte, die o.g. Translokationsmechanismus regulieren, in dem sich GLUT1 und GLUT4 voneinander unterscheiden. Diese Annahme wird unterstützt durch Untersuchungen von Müller *et al.* (1998; 2000), deren Daten interessante Anhaltspunkte dafür liefern, daß *S. cerevisiae* und Säugetierzellen möglicherweise Gemeinsamkeiten in Teilen der Signalkaskaden besitzen, die für die Regulation des oxidativen und nicht-oxidativen Glukosemetabolismus in Antwort auf Glukose bzw. Insulin verantwortlich sind. So reagiert Hefe, ähnlich Insulin-sensitiven Säugetierzellen, auf Insulinstimulation mit einer erhöhten Glykogenakkumulation. Offenbar führt die Anwesenheit von Insulin auch in Hefe zu einer Beeinflussung der Aktivität von Schlüsselenzymen des Glykogenmetabolismus. Es konnte gezeigt werden, daß durch Insulin beispielsweise die Aktivität der Proteinphosphatase 2 (PP2A) erhöht wird, die durch Dephosphorylierung die Glykogen-Synthase 2 (Gsy2) aktiviert bzw. die Glykogen-Phosphorylase (Gph1) inaktiviert. Gleichzeitig wird die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) der Hefe verringert, die antagonistisch zu PP2A wirkt. Darüberhinaus konnte ein 53 kDa Protein der Hefe identifiziert

werden, das spezifisch Insulin zu binden scheint und an mehreren Serin-Resten phosphoryliert vorliegt. Da es mit einem 70 kDa Phosphotyrosin-Protein interagiert und die Phosphorylierung beider Proteine durch Insulin gesteigert wird, könnte dies einen möglichen Signalkomplex in der Plasmamembran der Hefe darstellen. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Hefe als Modellsystem für das Studium der zellulären Abläufe, die den Insulin-gesteuerten Prozessen in Säugetierzellen zugrunde liegen.

4.4 Identifizierung und Charakterisierung von Fgy1

4.4.1 Auswirkungen der Fgy1-Aktivität auf die Funktion von GLUT-Proteinen aus Säugetieren in Hefe

Das *FGY1*-Gen (*YMR212c*) konnte aus einer Genbank durch die Komplementation des rezessiven *fgy1-1*-Alles isoliert werden, indem der GLUT1-vermittelte Glukosetransport unterdrückt wurde. Es stellte sich heraus, daß eine Frameshift-Mutation in *fgy1-1* zu einem Verlust des carboxyterminalen Bereichs des Proteins geführt hatte, wodurch eine funktionelle Expression von GLUT1 in Hefe ermöglicht wird. Zusammen mit der Entdeckung, daß die Überexpression des C-Terminus alleine die Phänotypen des *fgy1-1*-Stammes bezogen auf die GLUT1-Expression partiell supprimieren kann, spricht dies für die Annahme, daß dieser Bereich des Proteins für die Unterdrückung der Aktivität von GLUT1 (und vermutlich auch von GLUT4) in Hefe verantwortlich ist. Welcher Art dieser Effekt von Fgy1 auf GLUT1 und GLUT4 ist, bleibt bislang unklar. Die Analyse der Aminosäuresequenz von Fgy1 deutet auf das Vorhandensein einer Transmembrandomäne hin. Anhand einer Fusion mit den Proteinen GFP und hSOS konnte nachgewiesen werden, daß Fgy1 an der Zelloberfläche lokalisiert ist und sich der Carboxyterminus im Zytoplasma befindet. Man kann spekulieren, daß Fgy1 über den zytoplasmatischen C-Terminus direkt mit GLUT1 interagieren könnte, und dessen Glukosetransportaktivität infolge dieser Wechselwirkung blockiert wird. Neben einer direkten Beeinflussung der Aktivität könnte Fgy1 auch über sekundäre Faktoren die Funktion von GLUT1 in Hefe regulieren, die durch Fgy1 an die Plasmamembran und in räumliche Nähe zu GLUT1 rekrutiert werden und eine Hemmung der katalytischen Aktivität von GLUT1 vermitteln, oder aber zwar die funktionelle GLUT1-Expression fördern, jedoch durch Fgy1 inhibiert werden (Abb. 21A). Im Rahmen einer Two-Hybrid Analyse mit dem Carboxyterminus von Fgy1 konnten bislang jedoch keine möglichen Interaktionspartner dieser Proteinregion identifiziert werden. Dies kann auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sein. Denkbar wäre beispielsweise, daß es sich bei den Interaktionspartnern um Plasmamembran-

proteine handelt, die aufgrund ihrer Hydrophobizität nicht in den Zellkern dirigiert werden können, um die Reportergene des Testerstammes zu induzieren. Unter Umständen wird auch das Fusionskonstrukt aus Fgy1-C-Terminus und Gal4-Bindedomäne nicht in den Zellkern lokalisiert oder aber dieser Bereich von Fgy1 ist trotz der beobachteten Effekte auf GLUT1 nicht die für eine vermutete Interaktion verantwortliche Region. Sollte eine Wechselwirkung von der Tertiärstruktur eines Proteins oder gar beider Interaktionspartner abhängen, wird sich aufgrund der Verwendung von Genfragmenten in den Fusionskonstrukten ebenfalls keine Interaktion nachweisen lassen. Die dargestellten Ergebnisse zu mutanten GLUT1-Versionen, die wahrscheinlich aufgrund von Strukturänderungen in eine „aktive“ Form konvertiert werden, unterstützen diese Annahme. Eine alternative Herangehensweise anstelle des Two-Hybrid-Systems bietet das sogenannte „Split-Ubiquitin-System“, das die Suche und den Nachweis von Interaktionen zwischen Plasmamembranproteinen *in vivo* ermöglicht (Johnsson und Varshavsky, 1994; Stagljar *et al.*, 1998). Dabei können die Interaktionspartner in voller Länge eingesetzt werden, ohne auf Proteinfragmente zurückgreifen zu müssen.

Frühere Untersuchungen zu Struktur und Funktion des menschlichen GLUT1-Proteins aus Erythrozyten ergaben, daß die Glukosetransportaktivität des Proteins von dessen Oligomerisierung abhängig ist. Demnach liegt gereinigtes GLUT1 als reversibles Gemisch aus Homodimeren und Homotetrameren vor, natives GLUT1 in Erythrozyten vorzugsweise als Tetramer. Während der N-Terminus von GLUT1 für die Dimerisierung verantwortlich zu sein scheint, entsteht die tetramere Form durch nicht-kovalente Interaktionen und wird durch eine extrazelluläre, intramolekulare Disulfidbrücke in der zweiten Proteinhälfte jeder Untereinheit stabilisiert (Hebert und Carruthers, 1991; 1992; Pessino *et al.*, 1991; Zottola *et al.*, 1995). Man kann spekulieren, daß die für die Aktivität von GLUT1 notwendige Oligomerisierung und Disulfid-Brückenbildung in Hefe durch die Wirkung von Fgy1 möglicherweise unterbunden wird (Abb. 21B). So ließe sich auch erklären, daß ein GLUT1-GFP-Fusionsprotein zwar sowohl in einem hxt^- -Stamm als auch in einer $hxt^- fgy1-1$ -Mutante an der Zelloberfläche lokalisiert ist, aber nur in letzterem Stamm den Glukosetransport vermittelt. Da stöchiometrisch jede GLUT1-Untereinheit mit einem GFP-Protein assoziiert ist, läßt sich anhand des Fluoreszenzsignals nicht zwischen monomeren, homodimeren oder homotetrameren Formen differenzieren. Die isolierten Mutationen in der zweiten Transmembrandomäne von GLUT1 könnten zu einer strukturellen Veränderung führen, die auch in Gegenwart von Fgy1 eine Oligomerisierung erlaubt und so die Glukosetransportaktivität ermöglicht.

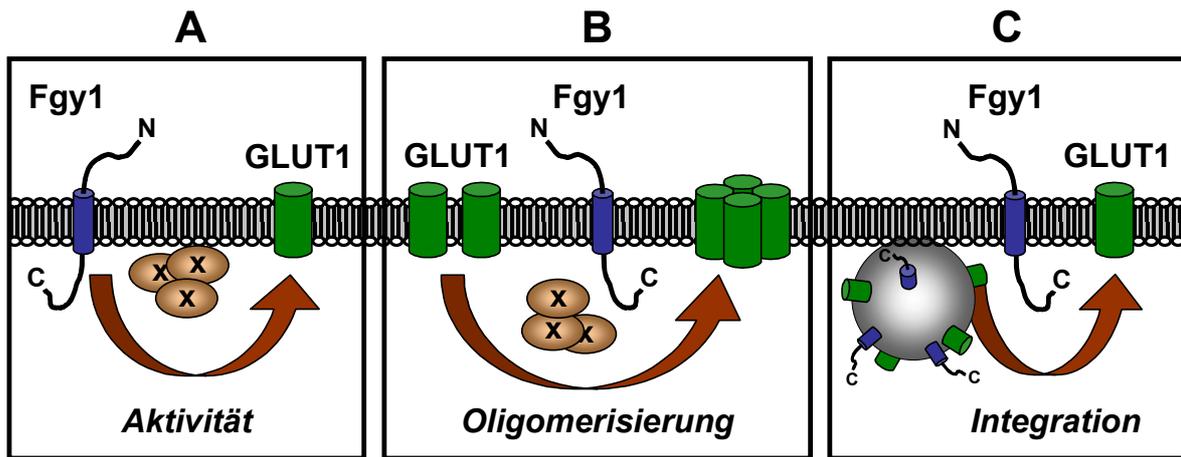


Abb. 21: Modell möglicher Wirkungsweisen von Fgy1 auf die Glukosetransportfunktion von GLUT1 in *S. cerevisiae*. Neben (A) einer direkten Beeinflussung der Aktivität von GLUT1 durch Fgy1 oder Fgy1-assoziierte Faktoren (X) könnte das Protein (B) in die Regulation des Oligomerisierungszustandes von GLUT1 in der Hefe involviert sein oder (C) eine Aufgabe bei der Verschmelzung sekretorischer Transportvesikel mit der Plasmamembran erfüllen (siehe Text).

Für Proteine aus Säugetieren wurden in jüngster Zeit Beispiele von Interaktionen zwischen einspännigen (CD147, CD98, CD36, Gycophorin) und mehrspännigen Membranproteinen (Monocarboxylattransporter, Aminosäuretransporter, Transporter für langkettige Fettsäuren, Anionenaustauscher) beschrieben. Hierbei wird für die einspännigen Membranproteine eine Chaperon-ähnliche Rolle oder Ankerfunktion bei der Lokalisierung der Membrantransporter an die Zelloberfläche sowie möglicherweise auch eine Regulation der Aktivität der Transportproteine angenommen (Abumrad *et al.*, 1999; Bruce *et al.*, 1994; Kanai *et al.*, 1998; Kirk *et al.*, 2000; Mastroberardino *et al.*, 1998). Kürzlich konnten in *S. cerevisiae* Proteine identifiziert werden, die eine wichtige Aufgabe bei der Sekretion von Membranproteinen erfüllen. So ist beispielsweise das Protein Gsf2 für den Export des niederaffinen Glukosetransporters Hxt1 aus dem endoplasmatischen Retikulum erforderlich (Sherwood und Carlson, 1999). Eine ähnliche Funktion konnte für Shr3 bei der Bildung spezifischer ER-Vesikel nachgewiesen werden, die im Rahmen der Sekretion von Mitgliedern der Aminosäurepermease-Familie wie z.B. Gap1 zur Plasmamembran auftreten (Gilstring *et al.*, 1999). Dies deutet darauf hin, daß manche Membranproteine in Hefe selektiv in spezifische Vesikel sortiert und zur Plasmamembran sekretiert werden, wie es in Säugetierzellen auch für das GLUT4-Protein der Fall ist. Im Gegensatz zu den ER-ständigen Proteinen Gsf2 und Shr3 ist Fgy1 zwar an der Zelloberfläche lokalisiert, könnte aber im Rahmen der erwähnten Chaperon- oder „Anker“-Funktion die Fusion von unter Umständen gebildeten GLUT1-haltigen Vesikeln mit der Plasmamembran regulieren und somit auf die vollständige Integration von GLUT1 in die Membran wirken.

Möglicherweise ist Fgy1 für die Ausübung dieser Funktion auch selbst in den peripher an der Plasmamembran angelagerten Vesikeln lokalisiert (Abb. 21C).

Die entfernte Sequenzverwandtschaft von Fgy1 mit Myosinen und die Klonierung von Ynl094w als Multicopy-Suppressor der *fgy1-1*-Mutation könnte auf eine Beteiligung des Zytoskeletts und des Vesikeltransports bei der funktionellen GLUT1-Expression hindeuten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß Ynl094w in intrazellulären Vesikeln lokalisiert ist und Experimente von Bon *et al.* (2000) deuten auf eine Interaktion mit den Proteinen Rvs167 und Rvs161 im Two-Hybrid System hin, die eine Rolle in der Endozytose, dem Vesikeltransport, der Organisation des Actin-Zytoskeletts und der Zellfusion spielen (Munn *et al.*, 1995; Sivadon *et al.*, 1997). Als Teil eines größeren Proteinkomplexes bilden Rvs167 und Rvs161 ein strukturelles und funktionelles Heterodimer (Navarro *et al.*, 1997). Allerdings zeigte die Expression eines Fusionsproteins aus GLUT1 und GFP in einem *hxt⁻*-Stamm bei gleichzeitiger Überexpression von Ynl094w keine Veränderung in der Plasmamembranlokalisierung, so daß eine Hemmung des GLUT1-vermittelten Glukosetransports aufgrund einer erhöhten Endozytoserate eher unwahrscheinlich ist. Die Wirkung von Ynl094w erstreckt sich dabei sowohl auf GLUT1 in einem *hxt⁻ fgy1-1*-Stamm, als auch auf aktive, mutante GLUT1-Versionen in einer reinen *hxt⁻*-Mutante, interessanterweise hingegen nicht auf die Funktion der Hefe-Glukosetransporter Hxt2 und Hxt7. Denkbar wäre, daß spezifische Motive in der Aminosäuresequenz von GLUT1 und möglicherweise auch in der anderer heterologer Glukosetransporter zu einer Erkennung durch endogene Hefefaktoren wie Ynl094w führen, wobei die Überexpression dieser Faktoren die Aktivität der Fremdproteine inhibieren könnte.

Ziel der vorliegenden Dissertation war unter anderem, Faktoren zu identifizieren, die einen generellen Einfluß auf heterolog in Hefe exprimierte Glukosetransportproteine ausüben. Dies ist durch die Identifizierung von Fgy1 nur teilweise gelungen. Während die *fgy1-1*-Mutation den Glukosetransport durch GLUT1, GLUT3 (E. Boles, persönliche Mitteilung) und, zusammen mit einer weiteren Mutation *fgy4X*, auch durch GLUT4 in Hefe erlaubt, wiesen weitere Glukosetransporter, beispielsweise aus Zebrafisch oder der menschliche Natrium-Glukose-Symporter SGLT1, keine katalytische Aktivität im *fgy1-1*-Stamm EBY.S7 auf (nicht gezeigt). Dennoch bietet das etablierte System vielversprechende Möglichkeiten, über weitere Mutageneseexperimente und Suche nach genomischen oder intragenischen Suppressormutationen auch die funktionelle Expression weiterer Glukosetransporter aus anderen Organismen zu ermöglichen.

4.4.2 Untersuchungen zur physiologischen Funktion von Fgy1

Über die physiologische Funktion von Fgy1 in Hefe ist bislang äußerst wenig bekannt. Im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß eine *fgy1*-Deletion eine deutliche Reduzierung des Maltosetransports nach sich zieht. Während der V_{\max} -Wert der Maltoseaufnahme klar verringert ist, bleibt der K_m -Wert unbeeinflusst. Dabei wirkt sich der Verlust der Fgy1-Aktivität auch auf die Maltose-Permeasen Mal1 und Agt1 aus, wenn diese Proteine unter der Kontrolle eines unabhängigen Promotors überproduziert werden. Diese Daten lassen sich so interpretieren, daß Fgy1 eine stimulierende Wirkung auf den Transport von Maltose ausübt (Abb. 22). Der Wegfall dieser Stimulation in einem *fgy1*-Deletionsstamm könnte infolge einer beeinträchtigten Maltoseaufnahme zu dem beschriebenen Wachstumsdefekt auf Maltosemedium führen. Da sich dieser Defekt jedoch nicht durch Erhöhung der Maltosetransportaktivität komplementieren läßt, deutet dies eher auf einen pleiotrophen Effekt der *fgy1*-Deletion in Bezug auf die Lebensfähigkeit der Zellen auf Medium mit Maltose als Kohlenstoffquelle hin. Zwar äußert sich der Verlust der Fgy1-Funktion in einem reduzierten Maltosetransport, offenbar existieren jedoch weitere Auswirkungen der Deletion, die ein Wachstum der Zellen auf Maltosemedium trotz Überexpression der Maltosetransportproteine nicht zulassen.

Darüberhinaus konnte eine erhöhte Sensitivität der *fgy1*-Mutanten gegenüber Arsenat nachgewiesen werden. Da Arsenat als toxisches Phosphat-Analog wirkt und beispielsweise über den Phosphat-Translokator Pho84 in die Zellen aufgenommen wird, weist dieser Phänotyp auf eine mögliche Beeinflussung des Phosphataufnahmesystems durch Fgy1 hin. Als mögliche Funktion von Fgy1 könnte man nun annehmen, daß der Translokator Pho84 unter Umständen durch Fgy1 inhibiert wird, wobei beide Proteine an der Plasmamembran lokalisiert sind (Abb. 22). Der Wegfall des hemmenden Effektes auf Pho84 oder weitere Phosphattransporter in der *fgy1*-Mutante führt möglicherweise zu einem erhöhten Einstrom von Phosphat und somit auch von Arsenat in die Zellen. Auch Untersuchungen von Lenburg und O'Shea (2001) deuten in Richtung einer Beteiligung von Fgy1 an der Phosphataufnahme bzw. deren Regulation. In einem Screen mit dem Ziel, die Funktion der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) Pho85 näher zu untersuchen, konnten die Autoren das *FGY1*-Gen aufgrund der synthetischen Letalität einer *fgy1*-Mutante mit *pho85* isolieren und bezeichneten es mit *EFR3* (*PHO* Eighty-Five Requiring) bezeichnet. *PHO85* kodiert für eine nicht-essentielle Proteinkinase, die in die Regulation einer Vielfalt zellulärer Prozesse involviert ist und deren Substratspezifität in Abhängigkeit von Interaktionen mit einer Reihe von Cyclinen (wie Pho80, Pcl8 und Pcl10, Pcl1 und Pcl2) definiert wird. Je nach Cyclin wird

durch den Pho85-Cyclin-Komplex beispielsweise die Expression von Genen gehemmt, die durch Phosphatmangel induziert werden, durch Phosphorylierung von Gsy2 (Glykogen-Synthase) die Glykogen-Akkumulation während der Fermentation gehemmt, oder aber auch der Zellzyklus reguliert (G1-Progression) (Huang *et al.*, 1996; Lenburg und O'Shea, 1996; Measday *et al.*, 1997). Durch den Komplex aus Pho85 und dem Cyclin Pho80 wird in Gegenwart von extrazellulärem Phosphat der Transkriptionsfaktor Pho4 phosphoryliert, der infolgedessen aus dem Zellkern exportiert wird. Als Reaktion auf Phosphat-Limitierung wird die Aktivität von Pho85-Pho80 durch Pho81, einer weiteren Komponente des Komplexes, inhibiert. Pho4 liegt unphosphoryliert vor, wird in den Zellkern lokalisiert und induziert dort zusammen mit einem weiteren Transkriptionsfaktor (Pho2) die Expression der Gene *PHO5* (kodiert für eine sekretorische saure Phosphatase) und *PHO84* (Phosphat-Protonen-Symporter) sowie im Rahmen einer Feedback-Regulation auch die Expression von *PHO81* (Abb. 22) (Lenburg und O'Shea, 1996).

Eine Deletion von *PHO85* führt zu dauerhafter Kernlokalisierung des Transkriptionsaktivators Pho4 und zieht dadurch die konstitutive Expression der Gene für die Phosphat-Bereitstellung und Aufnahme (*PHO5*, *PHO84*) auch unter reprimierenden Bedingungen, also in Gegenwart von Phosphat, nach sich (Kaffman *et al.*, 1994; Timblin *et al.*, 1996). Dies sollte zu einer stark erhöhten Phosphataufnahme führen, die jedoch in einer *pho85*-Mutante noch keine letalen Auswirkungen für die Zellen zu haben scheint. Nimmt man als Funktion von Fgy1 eine Inhibierung von Pho84 an, könnte bei einem gleichzeitigen Wegfall dieser Hemmung infolge einer zusätzlichen *fgy1*-Deletion in einer *pho85*-Mutante die Aufnahme von Phosphat ein kritisches Maß überschreiten oder aber die zusammen mit Phosphat einströmenden Protonen zu einer letalen Störung der Energiebilanz in der *pho85 fgy1*-Doppelmutante führen (Abb. 22). Außer der Entdeckung von Lenburg und O'Shea (2001), daß eine Deletion von *FGY1* zusammen mit *PHO85* letal ist, konnten die Autoren zeigen, daß dieser Phänotyp durch Überexpression des Cyclins Pho80 supprimiert werden kann. Man kann spekulieren, daß infolge der Überproduktion andere Cyclin-abhängige Kinasen unspezifisch aktiviert werden und einen gewissen Anteil von Pho4 als Substrat phosphorylieren können. Dies hätte wiederum eine Verringerung der Pho84-Bildung und somit der Phosphataufnahme zur Folge, wodurch der P_i/H^+ -Einstrom auf ein subletales Niveau reduziert und die *pho85 fgy1*-Doppelmutation supprimiert werden könnte.

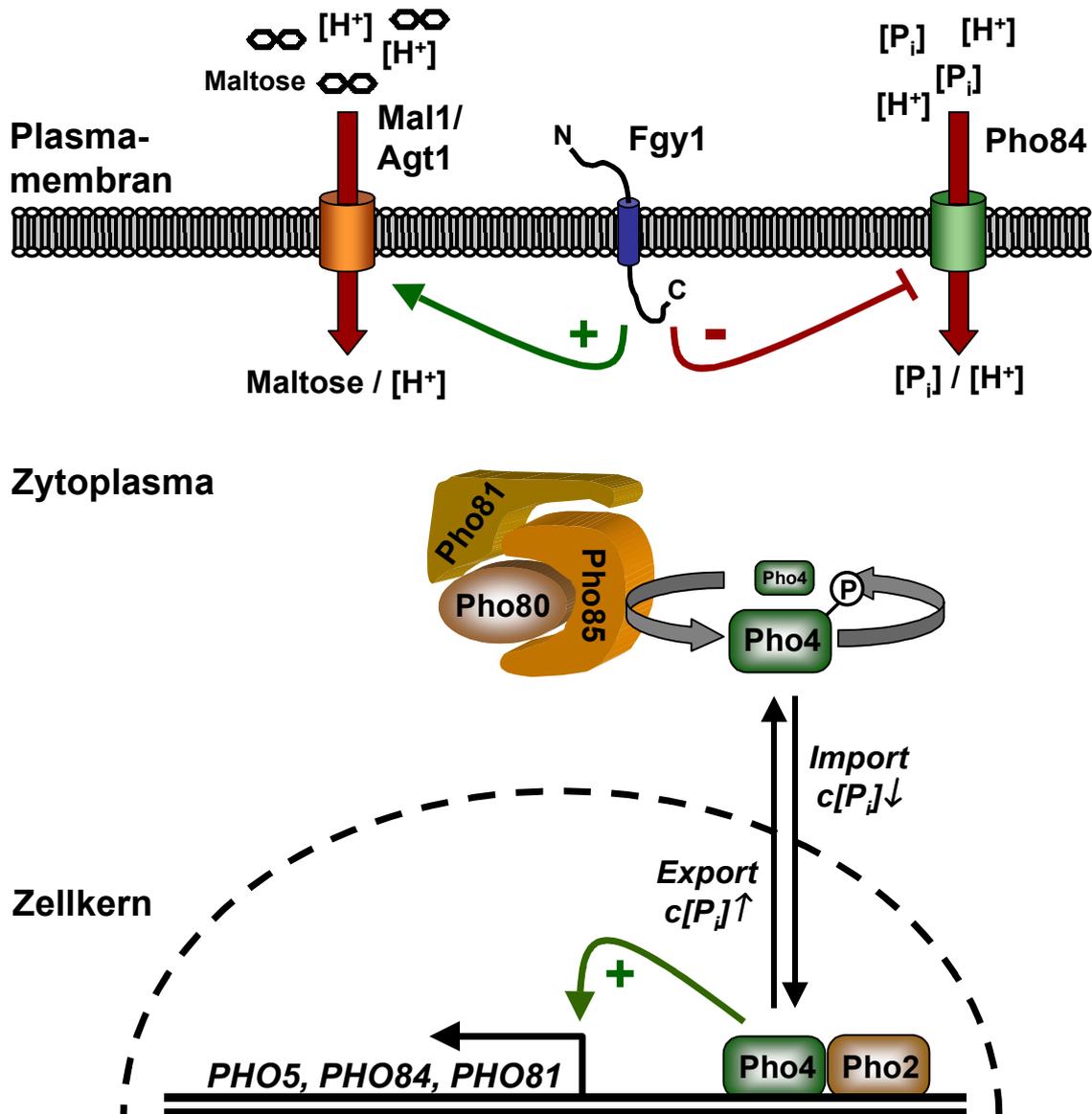


Abb. 22: Schematische Darstellung der zellulären Antwort auf Phosphatmangel und möglicher Wirkungsweisen von Fgy1. In Abhängigkeit von der Verfügbarkeit von Phosphat wird die intrazelluläre Lokalisierung des Transkriptionsaktivators Pho4 über dessen Phosphorylierungszustand u.a. durch die Kinase Pho85 mit ihrem assoziierten Cyclin Pho80 reguliert (siehe Text). Als Antwort auf Phosphatmangel wird hierdurch die Expression der sekretorischen sauren Phosphatase Pho5 sowie des Phosphattranslokators Pho84 induziert. Fgy1 übt möglicherweise einen hemmenden Einfluß auf die Funktion von Pho84 aus, wohingegen die Aktivität von Maltosetransportern wie Mal1 oder Agt1 positiv beeinflusst wird.

Die Tatsache, daß die *FGY1*-Expression selbst offenbar nicht durch Phosphat reguliert wird (Ogawa *et al.*, 2000), sowie die im Rahmen dieser Arbeit festgestellten Befunde zur Aufnahme von Maltose und möglicherweise auch Phosphat deuten darauf hin, daß Fgy1 unter Umständen eine generellere Rolle bei der Steuerung der Funktion von Membrantransportproteinen in Hefe spielen könnte. Interessanterweise gehört Pho84 ebenfalls der Zuckerpermease-Familie an und

ist nah mit den Mitgliedern der Maltosepermease-Familie und den beiden Proteinen Ybr241 und Ygl104 verwandt (vergl. Abb. 1), die ihrerseits wiederum in einigen Bereichen partielle Ähnlichkeit zu den GLUT-Proteinen der Säugetiere aufweisen (E. Boles, persönliche Mitteilung). Dies ist ein starker Hinweis darauf, daß gemeinsame Sequenzelemente dieser Proteine eine Rolle bei der Regulation der Transportfunktion durch Fgy1 spielen könnten.

Eine *FGY1*-Deletion scheint in dem von Lenburg und O'Shea (2001) verwendeten Hefestamm nicht letal zu sein. In Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund und der eingesetzten Kohlenstoffquelle zeigten sich auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen abweichende Phänotypen der verwendeten Stämme. Während die Deletion von *FGY1* im Stamm CEN.PK zu einer äußerst starken Beeinträchtigung des Wachstums auf Medium mit Maltose oder Glukose führte und auf Medium mit Ethanol letale Auswirkungen hatte, wurde das Wachstum von *fgy1*-Mutanten im Stamm W303 auf Glukose- und Ethanolmedium lediglich leicht eingeschränkt, wohingegen kein Wachstum auf Medium mit Maltose als Kohlenstoffquelle möglich war. Die Gründe für die beobachteten Wachstumsunterschiede sind bislang unbekannt. Um weitere Informationen über eine mögliche Funktion von Fgy1 zu erhalten, wurde mit Hilfe einer Genbank nach Multicopy-Suppressoren gesucht, die den klaren Wachstumsdefekt einer *fgy1*-Deletion im W303-Stammhintergrund auf Maltosemedium wiederherstellen können. Neben einer vollständigen und einer N-terminal verkürzten Version von *FGY1* konnten über diesen Ansatz drei weitere Gene isoliert werden, die bei einer Überexpression das Wachstum der Δ *fgy1*-Zellen auf Maltosemedium ermöglichen: *ICT1*, *YKL051w* und *UBA1*. Über das Gen *ICT1* liegen bislang außer einer erhöhten Kupfertoleranz von *ict1*-Nullmutanten keine näheren Befunde vor (Entian *et al.*, 1999). Das Genprodukt weist weder strukturelle Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen noch Transmembrandomänen auf und liefert somit keinerlei Anhaltspunkte, die Rückschlüsse auf die Wirkung von Fgy1 zulassen würden. Interessanterweise besitzt das ebenfalls bislang uncharakterisierte Protein Ykl051w in seiner Struktur mit hoher Wahrscheinlichkeit sechs Transmembrandomänen, was auf eine Rolle als Transportprotein hinweisen könnte. Auch das gleichfalls als Multicopy-Suppressor isolierte *UBA1*-Gen läßt nicht unmittelbare Rückschlüsse auf die Funktion von Fgy1 zu. Als Komponente des Ubiquitin-Systems der Hefe (Ubiquitin-aktivierendes Enzym, E1; McGrath *et al.*, 1991) liegt die Vermutung nahe, daß die Überproduktion von Uba1 die Degradation unbekannter Proteine initiiert, infolge deren Abbaus ein Wachstum der Zellen auf Maltosemedium wieder ermöglicht wird.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Hefe *S. cerevisiae* als neues heterologes System für die Expression und Charakterisierung von Hexosetransportern aus anderen Organismen etabliert. Grundlage hierfür war die Konstruktion eines Hexosetransport-defizienten Hefestammes ($hxt^- mph^-$), in dem neben allen Proteinen der Hexosetransporterfamilie auch die Glukose- und Saccharose-transportierenden Agt1-, Mph2- und Mph3-Proteine durch Gendeletionen zerstört wurden.

Um die heterologen Säugetier-Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 in einer funktionell aktiven Form an der Plasmamembran zu exprimieren, mußten mit Hilfe eines genetischen „Screening“-Verfahrens zusätzliche Mutationen in den $hxt^- mph^-$ Stamm eingeführt werden. Obwohl GLUT1 bereits im parentalen Stamm an der Zelloberfläche lokalisiert werden konnte, vermittelte das Protein die Glukoseaufnahme nur nach einer Mutation in einem als *FGY1* („functional expression of GLUT1 in yeast“) bezeichneten Locus. Darüberhinaus konnten Mutationen innerhalb der zweiten Transmembrandomäne von GLUT1 isoliert werden, die das Protein in eine „aktive“ Form konvertieren. GLUT4 wurde in intrazellulären Strukturen zurückgehalten, konnte aber durch Mutationen in verschiedenen, als *FGY4X* bezeichneten Loci an die Zelloberfläche lokalisiert werden. Für die Glukosetransportaktivität war jedoch weiterhin eine zusätzliche Mutation in *FGY1* erforderlich.

Die menschlichen Glukosetransporter konnten mittels zero-trans Glukoseaufnahmemessungen mit intakten Hefezellen kinetisch charakterisiert werden. Für menschliches GLUT1 wurde ein K_m von 3,2 mM und für GLUT4 von 12,6 mM bestimmt. Diese Transportaktivitäten wurden durch Cytochalasin B inhibiert.

Das *FGY1*-Gen konnte als das bislang nicht näher charakterisierte Gen *YMR212c* identifiziert werden. Eine Zerstörung des carboxyterminalen Bereichs des in der Plasmamembran lokalisierten Proteins ermöglichte die funktionelle Expression von GLUT1 und GLUT4. Dem zytoplasmatisch-lokalisierten C-Terminus konnte eine Funktion bei der Inhibierung der GLUT1-Aktivität in Hefe zugeordnet werden. Eine vollständige Deletion von *FGY1* resultierte in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund des verwendeten Stammes und der Kohlenstoffquelle in einem letalen Phänotyp bzw. einer deutlichen Beeinträchtigung des Wachstums. Es wurde eine stark reduzierte Aktivität der Maltosetransporter Mal1 und Agt1 sowie eine erhöhte Arsenatsensitivität einer $\Delta fgy1$ -Mutante festgestellt. Die Daten deuten darauf hin, daß die physiologische Funktion von Fgy1 die Regulation der Aktivität von spezifischen Membrantransportproteinen der Hefe ist.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abumrad, N., Coburn, C. und Ibrahimi, A.** (1999) Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim. Biophys. Acta* **1441**: 4-13.
- Ahmed, N. und Berridge, M.V.** (1999) N-glycosylation of glucose transporter-1 (Glut-1) is associated with increased transporter affinity for glucose in human leukemic cells. *Leuk. Res.* **23**: 395-401.
- Araki, S., Yang, J., Hashiramoto, M., Tamori, Y., Kasuga, M. und Holman, G.D.** (1996) Subcellular trafficking kinetics of GLUT4 mutated at the N- and C-terminal. *Biochem. J.* **315**: 153-159.
- Aronheim, A., Engelberg, D., Li, N., ai-Alawi, N., Schlessinger, J. und Karin, M.** (1994) Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signalling pathway. *Cell* **78**: 949-961.
- Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S.J. und Karin, M.** (1997) Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 3094-3102.
- Baldwin, S.A.** (1993) Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1154**: 17-49.
- Barrett, M.P., Mottram, J.C. und Coombs, G.H.** (1999) Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. *Trends Microbiol.* **7**: 82-88.
- Benito, B. und Lagunas, R.** (1992) The low-affinity component of *Saccharomyces cerevisiae* maltose transport is an artifact. *J. Bacteriol.* **174**: 3065-3069.
- Biely, P., Kratky, Z. und Bauer, S.** (1972) Metabolism of 2-deoxy-D-glucose by baker's yeast. Incorporation of 2-deoxy-D-glucose into the cell wall mannan. *Biochim. Biophys. Acta* **255**: 631-639.
- Birnbaum, M.J.** (1989) Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell* **57**: 305-315.
- Birnboim, H.C. und Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Bisson, L.F. und Fraenkel, D.G.** (1983) Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **80**: 1730-1734.
- Bjorbaek, C., Echwald, S.M., Hubricht, P., Vestergaard, H., Hansen, T., Zierath, J. und Pedersen, O.** (1994) Genetic variants in promoters and coding regions of the muscle glycogen synthase and the insulin-responsive GLUT4 genes in NIDDM. *Diabetes* **43**: 976-983.
- Boeke, J.D., Lacroute, F. und Fink, G.R.** (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphat decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 345-346.
- Boles, E., de Jong-Gubbels, P. und Pronk, J.T.** (1998) Identification and characterization of MAE1, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme. *J. Bacteriol.* **180**: 2875-2882.
- Boles, E., Gohlmann, H.W. und Zimmermann, F.K.** (1996) Cloning of a second gene encoding 5-phosphofructo-2-kinase in yeast, and characterization of mutant strains without fructose-2,6-bisphosphate. *Mol. Microbiol.* **20**: 65-76.
- Boles, E. und Hollenberg, C.P.** (1997) The molecular genetics of hexose transport in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 85-111.
- Boles, E. und Miosga, T.** (1995) A rapid and highly efficient method for PCR-based site-directed mutagenesis using only one new primer. *Curr. Genet.* **28**: 197-198.

- Boles, E., Zimmermann, F.K. und Thevelein, J.M.** (1997) Metabolic signals. In: *Yeast Sugar Metabolism: Biochemistry, genetics, biotechnology, and applications* (Zimmermann, F.K. und Entian, K.-D., eds.), Technomic Publishing Company, Lancaster PA, 45-65.
- Bon, E., Recordon-Navarro, P., Durrens, P., Iwase, M., Toh-E, A. und Aigle, M.** (2000) A network of proteins around Rvs167p and Rvs161p, two proteins related to the yeast actin cytoskeleton. *Yeast* **16**: 1229-1241.
- Bruce, L.J., Groves, J.D., Okubo, Y., Thilaganathan, B. und Tanner, M.J.** (1994) Altered band 3 structure and function in glycophorin A- and B-deficient (MkMk) red blood cells. *Blood* **84**: 916-922.
- Brown, G.K.** (2000) Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **23**: 237-246.
- Bun-ya, M., Nishimura, M., Harashima, S. und Oshima, Y.** (1991) Two new genes, *PHO86* and *PHO87*, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **29**: 344-351.
- Bun-ya, M., Shikata, K., Nakade, S., Yompakdee, C., Harashima, S. und Oshima, Y.** (1996) The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3229-3238.
- Burant, C.F. und Bell, G.I.** (1992) Mammalian facilitative glucose transporters: evidence for similar substrate recognition sites in functionally monomeric proteins. *Biochemistry* **31**: 10414-10420.
- Carlson, M.** (1998) Regulation of glucose utilization in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**: 560-564.
- Carlson, M.** (1999) Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 202-207.
- Cheng, Q. und Michels, C.A.** (1991) *MAL11* and *MAL61* encode the inducible high-affinity maltose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **173**: 1817-1820.
- Colville, C.A., Seatter, M.J. und Goud, G.W.** (1993) Analysis of the structural requirements of sugar binding to the liver, brain and insulin-responsive glucose transporters expressed in oocytes. *Biochem J.* **294**: 753-760.
- Coons, D.M., Boulton, R.B. und Bisson, L.F.** (1995) Computer-assisted nonlinear regression analysis of the multicomponent glucose uptake kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**: 3252-3258.
- Coons D.M., Vagnoli P. und Bisson L.F.** (1997) The C-terminal domain of Snf3p is sufficient to complement the growth defect of *snf3* null mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: *SNF3* functions in glucose recognition. *Yeast* **13**: 9-20.
- Cope, D.L., Lee, S., Melvin, D.R. und Gould, G.W.** (2000) Identification of further important residues within the Glut4 carboxy-terminal tail which regulate subcellular trafficking. *FEBS Lett.* **481**: 261-265.
- Cortassa, S., Aon, J.C. und Aon, M.A.** (1995) Fluxes of carbon, phosphorylation, and redox intermediates during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on different carbon sources. *Biotechnol. Bioeng.* **47**: 193-208.
- Corvera, S., Chawla, A., Chakrabarti, R., Joly, M., Buxton, J. und Czech, M.P.** (1994) A double leucine within the GLUT4 glucose transporter COOH-terminal domain functions as an endocytosis signal. *J. Cell Biol.* **126**: 979-989.
- Cushman, S.W. und Wardzala, L.J.** (1980) Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **255**: 4758-4762.
- Dauterive, R., Laroux, S., Bunn, R.C., Chaisson, A., Sanson, T. und Reed, B.C.** (1996) C-terminal mutations that alter the turnover number for 3-O-methylglucose transport by GLUT1 and GLUT4. *J. Biol. Chem.* **271**: 11414-11421.

- De Vit, M.J., Waddle, J.A. und Johnston, M.** (1997) Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol. Biol. Cell* **8**:1603-1618.
- De Winde, J.H., Crauwels, M., Hohmann, S., Thevelein, J.M. und Winderickx, J.** (1996) Differential requirement of the yeast sugar kinases for sugar sensing in establishing the catabolite-repressed state. *Eur. J. Biochem.* **241**: 633-643.
- Devés, R. und Krupka, R.M.** (1978) Cytochalasin B and the kinetics of inhibition of biological transport: a case of asymmetric binding to the glucose carrier. *Biochim. Biophys. Acta* **510**: 339-348.
- Dlugai, S.** (1999) Molekulargenetische und proteinchemische Untersuchungen zur Funktion eines Glukosesensors (Snf3) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Doerge, H., Bocianski, A., Joost, H.G. und Schurmann, A.** (2000) Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem. J.* **350**: 771-6.
- Doerge, H., Schurmann, A., Bahrenberg, G., Brauers, A. und Joost, H.G.** (2000) GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J. Biol. Chem.* **275**: 16275-16278.
- Dohmen, R.J., Strasser, A.W.M., Höner, C.B. und Hollenberg, C.P.** (1991) An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells various yeast genera. *Yeast* **7**: 691-692.
- Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W.** (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**: 6127-6145.
- Entian, K.D., Schuster, T., Hegemann, J.H., Becher, D., Feldmann, H., Güldener, U., Gotz, R., Hansen, M., Hollenberg, C.P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kötter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R.K., Ramezani Rad, M., Rohmer, A., Romer, A., Hinnen, A., et al.** (1999) Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol. Gen. Genet.* **262**: 683-702.
- Eriksson, J., Koranyi, L., Bourey, R., Schalin-Jantti, C., Widén, E., Mueckler, M., Permutt, A.M. und Groop, L.C.** (1992) Insulin resistance in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients and their relatives is not associated with a defect in the expression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT-4) gene in human skeletal muscle. *Diabetologia* **35**: 143-147.
- Ferrara, C.M. und Cushman, S.W.** (1999) GLUT4 trafficking in insulin-stimulated rat adipose cells: evidence that heterotrimeric GTP-binding proteins regulate the fusion of docked GLUT4-containing vesicles. *Biochem. J.* **343**: 571-577.
- Fields, S. und Song, O.** (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246.
- Firnges, M.A., Lin, J.T. und Kinne, R.K.** (2001) Functional asymmetry of the sodium-D-glucose cotransporter expressed in yeast secretory vesicles. *J. Membr. Biol.* **179**: 143-153.
- Fletcher, L.M., Welsh, G.I., Oatey, P.B. und Tavare, J.M.** (2000) Role for the microtubule cytoskeleton in GLUT4 vesicle trafficking and in the regulation of insulin-stimulated glucose uptake. *Biochem. J.* **352**: 267-276.
- Fossum, S., Mallett, S. und Barclay, A.N.** (1991) The MRC OX-47 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. *Eur. J. Immunol.* **21**: 671-679.
- Galazzo, J.L. und Bailey, J.E.** (1990) Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* **12**: 162-172.
- Gancedo, J.M.** (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 334-361.

- Gancedo, C. und Serrano, R.** (1989) Energy-yielding metabolism. In: The yeasts. Metabolism and physiology of yeasts (Rose, A.H. und Harrison, J.S., eds.) Vol. 3, 2nd ed., 205-259, Academic Press, New York.
- Ganster, R.W., Shen, W. und Schmidt, M.C.** (1993) Isolation of *STD1*, a high-copy-number suppressor of a dominant negative mutation in the yeast TATA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 3650-3659.
- Garcia, J.C., Strube, M., Leingang, K., Keller, K. und Mueckler, M.M.** (1992) Amino acid substitutions at tryptophan 388 and tryptophan 412 of the HepG2 (Glut1) glucose transporter inhibit transport activity and targeting to the plasma membrane in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **267**: 7770-7776.
- Garvey, W.T., Huecksteadt, T.P. und Birnbaum, M.J.** (1989) Pretranslational suppression of an insulin-responsive glucose transporter in rats with diabetes mellitus. *Science* **245**: 60-63.
- Garvey, W.T., Maianu, L., Huecksteadt, T.P., Birnbaum, M.J., Molina, J.M. und Ciaraldi, T.P.** (1991) Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J. Clin. Invest.* **87**: 1072-1081.
- Gietz, R.D. und Sugino, A.** (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527-534.
- Gietz, R.D. und Woods, R.A.** (1994) High Efficiency transformation in Yeast. (Invited Book Chapter) In: Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches, ed. J.A. Johnston, Oxford University Press pp. 121-134.
- Gilstring, C.F., Melin-Larsson, M. und Ljungdahl, P.O.** (1999) Shr3p mediates specific COPII coat-cargo interactions required for the packaging of amino acid permeases into ER-derived transport vesicles. *Mol. Biol. Cell* **10**: 3549-3565.
- Gould, G.W., Thomas, H.M., Jess, T.J. und Bell, G.I.** (1991) Expression of human glucose transporters in *Xenopus* oocytes: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry* **30**: 5139-5145.
- Green, N.M.** (1991) Biological membranes. The semiotics of charge. *Nature* **351**: 349-350.
- Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinbauer, J. und Hegemann, J.H.** (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucl. Acids Res.* **24**: 2519-2524.
- Guilherme, A., Emoto, M., Buxton, J.M., Bose, S., Sabini, R., Theurkauf, W.E., Leszyk, J. und Czech, M.P.** (2000) Perinuclear localization and insulin responsiveness of GLUT4 requires cytoskeletal integrity in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **275**: 38151-38159.
- Halestrap, A.P. und Price, N.T.** (1999) The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem. J.* **343**: 281-299.
- Han, E.K., Cotty, F., Sottas, C., Jiang, H. und Michels, C.A.** (1995) Characterization of *AGT1* encoding a general alpha-glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.* **17**: 1093-1107.
- Hanahan, D.** (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: DNA-Cloning I, edited by Glover, D.M., Oxford, IRL Press, p. 109-135.
- Haney, P.M., Levy, M.A., Strube, M.S. und Mueckler, M.** (1995) Insulin-sensitive targeting of the GLUT4 glucose transporter in L6 myoblasts is conferred by its COOH-terminal cytoplasmic tail. *J. Cell Biol.* **129**: 641-658.
- Hebert, D.N. und Carruthers, A.** (1991) Cholate-solubilized erythrocyte glucose transporters exist as a mixture of homodimers and homotetramers. *Biochemistry* **30**: 4654-4658.
- Hebert, D.N. und Carruthers A.** (1992) Glucose transporter oligomeric structure determines transporter function. Reversible redox-dependent interconversions of tetrameric and dimeric GLUT1. *J. Biol. Chem.* **267**: 23829-23838.

- Heredia, C.F., Sols, A. und Dela Fuente, G.** (1968) Specificity of the constitutive hexose transport in yeast. *Eur. J. Biochem.* **5**: 321-329.
- Hermesdorf, A., Kühn, C., Wieczorke, R., Boles, E., Grof, C., Frommer, W.B. und Ward, J.M.** (2001) The plant transcription factors *AtSTR1* and *StPCP1* induce sucrose transport activity in yeast via different mechanisms. Submitted.
- Holman, G.D., Lo Leggio, L. und Cushman, S.W.** (1994) Insulin-stimulated GLUT4 glucose transporter recycling. A problem in membrane protein subcellular trafficking through multiple pools. *J. Biol. Chem.* **269**: 17516-17524.
- Holman, G.D. und Cushman, S.W.** (1994) Subcellular localization and trafficking of the GLUT4 glucose transporter isoform in insulin-responsive cells. *Bioessays* **16**: 753-759.
- Holman, G.D. und Kasuga, M.** (1997) From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia* **40**: 991-1003.
- Horak, J. und Wolf, D.H.** (1997) Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endovytosis, and degradation in the vacuole. *J. Bacteriol.* **179**: 1541-1549.
- Huang, D., Farkas, I. und Roach, P.J.** (1996) Pho85p, a cyclin-dependent protein kinase, and the Snf1p protein kinase act antagonistically to control glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 4357-4365.
- Hubbard, E.J.A., Jiang, R. und Carlson, M.** (1994) Dosage-dependent modulation of glucose repression by *MSN3 (STD1)* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 1972-1978.
- Ibberson, M., Uldry, M. und Thorens, B.** (2000) GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J. Biol. Chem.* **275**: 4607-4612.
- Iversen, L.** (2000) Neurotransmitter transporters: fruitful targets for CNS drug discovery. *Mol. Psychiatry.* **5**: 357-362.
- Jacquez, J.A.** (1984) Red blood cell as glucose carrier: significance for placental and cerebral glucose transfer. *Am. J. Physiol.* **246**: 289-298.
- James, D.E., Strube, M. und Mueckler, M.** (1989) Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* **338**: 83-87.
- James, D.E. und Piper, R.C.** (1994) Insulin resistance, diabetes, and the insulin-regulated trafficking of GLUT-4. *J. Cell Biol.* **126**: 1123-1126.
- James, P., Halladay, J. und Craig, E.A.** (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**: 1425-1436.
- Jiang, R. und Carlson, M.** (1996) Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev.* **10**: 3105-3115.
- Johnson, D.L.** (1971) Simultaneous determination of arsenate and phosphate in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* **5**: 411-414.
- Johnston, M.** (1999) Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet.* **15**: 29-33.
- Johnsson, N. und Varshavsky, A.** (1994) Split ubiquitin as a sensor of protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10340-10344.
- Kaffman, A., Herskowitz, I., Tjian, R. und O'Shea, E.K.** (1994) Phosphorylation of the transcription factor PHO4 by a cyclin-CDK complex, PHO80-PHO85. *Science* **263**: 1153-1156.

- Kanai, Y., Segawa, H., Miyamoto, K., Uchino, H., Takeda, E. und Endou, H. (1998) Expression cloning and characterization of a transporter for large neutral amino acids activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.* **273**: 23629-23632.
- Kandror, K.V. und Pilch, P.F. (1998) Multiple endosomal recycling pathways in rat adipose cells. *Biochem. J.* **331**: 829-835.
- Kasahara, M., Inui, K., Takano, M. und Hori, R. (1985) Distinction of three types of D-glucose transport systems in animal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**: 490-496.
- Kasahara, T. und Kasahara, M. (1996) Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **315**: 177-182.
- Kasahara, T. und Kasahara, M. (1997) Characterization of rat Glut4 glucose transporter expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Glut1 glucose transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1324**: 111-119.
- Kasahara, T. und Kasahara, M. (1998) Tryptophan 388 in putative transmembrane segment 10 of the rat glucose transporter Glut1 is essential for glucose transport. *J. Biol. Chem.* **273**: 29113-29117.
- Katagiri, H., Asano, T., Shibasaki, Y., Lin, J.L., Tsukuda, K., Ishihara, H., Akanuma, Y., Takaku, F. und Oka, Y. (1991) Substitution of leucine for tryptophan 412 does not abolish cytochalasin B labeling but markedly decreases the intrinsic activity of GLUT1 glucose transporter. *J. Biol. Chem.* **266**: 7769-7773.
- Katz, E.B., Stenbit, A.E., Hatton, K., DePinho, R. und Charron, M.J. (1995) Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* **377**: 151-155.
- Katz, E.B., Burcelin, R., Tsao, T.S., Stenbit, A.E. und Charron, M.J. (1996) The metabolic consequences of altered glucose transporter expression in transgenic mice. *J. Mol. Med.* **74**: 639-652.
- Kayano, T., Burant, C.F., Fukumoto, H., Gould, G.W., Fan, Y.S., Eddy, R.L., Byers, M.G., Shows, T.B., Seino, S. und Bell, G.I. (1990) Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J. Biol. Chem.* **265**: 13276-13282.
- Keller, K., Strube, M. und Mueckler, M. (1989) Functional expression of the human HepG2 and rat adipocyte glucose transporters in *Xenopus* oocytes. Comparison of kinetic parameters. *J. Biol. Chem.* **264**: 18884-18889.
- Kirk, P., Wilson, M.C., Heddle, C., Brown, M.H., Barclay, A.N. und Halestrap, A.P. (2000) CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J.* **19**: 3896-3904.
- Kishi, T., Seno, T. und Yamao, F. (1998) Grr1 functions in the ubiquitin pathway in *Saccharomyces cerevisiae* through association with Skp1. *Mol. Gen. Genet.* **257**: 143-148.
- Klebe, R.J., Harries, J.V., Sharp, Z.D. und Douglas, M.G. (1983): A general method for polyethylen-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* **25**: 333-341.
- 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.
- Krampe, S., Stamm, O., Hollenberg, C.P. und Boles, E. (1998) Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS Lett.* **441**: 343-347.
- Kruckeberg, A.L. (1996) The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **166**: 283-292.

- Kruckeberg, A.L., Walsh, M.C. und van Dam, K. (1996) How do yeast cells sense glucose? *Bioessays* **20**: 972-976.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lafuente, M.J., Gancedo, C., Jauniaux, J.C. und Gancedo, J.M. (2000) Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **35**: 161-172.
- Lagunas, R. (1993) Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**: 229-242.
- Lee, J., Colwill, K., Aneliunas, V., Tennyson, C., Moore, L., Ho, Y. und Andrews, B. (1998) Interaction of yeast Rvs167 and Pho85 cyclin-dependent kinase complexes may link the cell cycle to the actin cytoskeleton. *Curr. Biol.* **8**: 1310-1321.
- Lenburg, M.E. und O'Shea, E.K. (1996) Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 383-387.
- Lenburg, M.E. und O'Shea, E.K. (2001) Genetic evidence for a morphogenetic function of the *Saccharomyces cerevisiae* Pho85 cyclin-dependent kinase. *Genetics* **157**: 39-51.
- Lesage, S., Zouali, H., Vionnet, N., Philippi, A., Velho, G., Serradas, P., Passa, P., Demenais, F. und Froguel, P. (1997) Genetic analyses of glucose transporter genes in French non-insulin-dependent diabetic families. *Diabetes Metab.* **23**: 137-142.
- Li, F.N. und Johnston, M. (1997) Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *EMBO J.* **16**: 5629-5638.
- Lowe, A.G. und Walmsley, A.R. (1985) A quenched-flow technique for the measurement of glucose influx into human red blood cells. *Anal. Biochem.* **144**: 385-389.
- Lowe, A.G. und Walmsley, A.R. (1986) The kinetics of glucose transport in human red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta* **857**: 146-154.
- Ludin, K., Jiang, R. und Carlson, M. (1998) Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6245-6250.
- Nishimura, H., Pallardo, F.V., Seidner, G.A., Vannucci, S., Simpsons, I.A. und Birnbaum, M.J. (1993) Kinetics of GLUT1 and GLUT4 glucose transporters expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **268**: 8514-8520.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Manz, F., Bickel, H., Brodehl, J., Feist, D., Gellissen, K., Gescholl-Bauer, B., Gilli, G., Harms, E., Helwig, H., Nutzenadel, W., et al (1987) Fanconi-Bickel syndrome. *Pediatr. Nephrol.* **1**: 509-518.
- Marshall-Carlson, L., Celenza, J.L., Laurent, B.C. und Carlson, M. (1990) Mutational analysis of the SNF3 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 1105-1115.
- Martinez-Arca, S., Lalioti, V.S. und Sandoval, I.V. (2000) Intracellular targeting and retention of the glucose transporter GLUT4 by the perinuclear storage compartment involves distinct carboxyl-tail motifs. *J. Cell. Sci.* **113**: 1705-1715.
- Mastroberardino, L., Spindler, B., Pfeiffer, R., Skelly, P.J., Loffing, J., Shoemaker, C.B. und Verrey, F. (1998) Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature* **395**: 288-291.
- McGrath, J.P., Jentsch, S. und Varshavsky, A. (1991) UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *EMBO J.* **10**: 227-236.

- McVie-Wylie, A.J., Lamson, D.R. und Chen, Y.T.** (2001) Molecular cloning of a novel member of the glut family of transporters, *slc2a10* (*glut10*), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for *niddm* susceptibility. *Genomics* **72**: 113-117.
- Measday, V., Moore, L., Retnakaran, R., Lee, J., Donoviel, M., Neiman, A.M. und Andrews, B.** (1997) A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 1212-1223.
- Medintz, I., Jiang, H., Han, E.K., Cui, W. und Michels, C.A.** (1996) Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **178**: 2245-2254.
- Melvin, D.R., Marsh, B.J., Walmsley, A.R., James, D.E. und Gould, G.W.** (1999) Analysis of amino and carboxy terminal GLUT-4 targeting motifs in 3T3-L1 adipocytes using an endosomal ablation technique. *Biochemistry* **38**: 1456-1462.
- Miller, J.H.** (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, Ed.3rd.
- Mori, H., Hashiramoto, M., Clark, A.E., Yang, J., Muraoka, A., Tamori, Y., Kasuga, M. und Holman, G.D.** (1994) Substitution of tyrosine 293 of GLUT1 locks the transporter into an outward facing conformation. *J. Biol. Chem.* **269**: 11578-11583.
- Mueckler, M.** (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* **219**: 713-725.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E. und Lodish, H.F.** (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* **229**: 941-945.
- Mueckler, M., Weng, W. und Kruse, M.** (1994) Glutamine 161 of Glut1 glucose transporter is critical for transport activity and exofacial ligand binding. *J. Biol. Chem.* **269**: 20533-20538.
- Müller, G., Grey, S., Jung, C. und Bandlow W.** (2000) Insulin-like signaling in yeast: modulation of protein phosphatase 2A, protein kinase A, cAMP-specific phosphodiesterase, and glycosyl-phosphatidylinositol-specific phospholipase C activities. *Biochemistry* **39**: 1475-1488.
- Müller, G., Rouveyre, N., Crecelius, A. und Bandlow W.** (1998) Insulin signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 1. Stimulation of glucose metabolism and Snf1 kinase by human insulin. *Biochemistry* **37**: 8683-8695.
- Müller, G., Rouveyre, N., Upshon, C., Grobeta, E. und Bandlow W.** (1998) Insulin signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 2. Interaction of human insulin with a putative binding protein. *Biochemistry* **37**: 8696-8704.
- Müller, G., Rouveyre, N., Upshon, C. und Bandlow W.** (1998) Insulin signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Induction of protein phosphorylation by human insulin. *Biochemistry* **37**: 8705-8713.
- Müller, S., Boles, E., May, M. und Zimmermann, F.K.** (1995) Different internal metabolites trigger the induction of glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**: 4517-9.
- Mumberg, D., Müller, R. und Funk, M.** (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res.* **22**: 5767-5768.
- Munn, A.L., Stevenson, B.J., Geli, M.I. und Riezman, H.** (1995) *end5*, *end6*, and *end7*: mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **6**: 1721-1742.
- Navarro, P., Durrens, P. und Aigle, M.** (1997) Protein-protein interaction between the RVS161 and RVS167 gene products of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1343**: 187-192.

- Nelissen, B., De Wachter, R. und Goffeau, A.** (1997) Classification of all putative permeases and other membrane plurispansers of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 113-134.
- Ogawa N, DeRisi J, Brown PO** (2000) New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol. Biol. Cell* **11**: 4309-4321.
- Ostling, J., Carlberg, M. und Ronne, H.** (1996) Functional domains in the Mig1 repressor. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 753-761.
- Özcan, S. und Johnston, M.** (1995) Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 1564-1572.
- Özcan, S., Dover, J., Rosenwald, A.G., Woelfl, S. und Johnston, M.** (1996) Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 12428-12432.
- Özcan, S., Leong, T. und Johnston, M.** (1996) Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 6419-6426.
- Özcan, S., Dover, J. und Johnston, M.** (1998) Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**: 2566-73.
- Özcan, S. und Johnston, M.** (1999) Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 554-569.
- Palacios, S., Lalioti, V.V., Martinez-Arca, S., Chattopadhyay, S. und Sandoval, I.V.** (2001) Recycling of the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4: Access of surface internalized GLUT4 molecules to the perinuclear storage compartment is mediated by the Phe5GlnGlnIle8 motif. *J. Biol. Chem.* **276**: 3371-3383.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T. und Saier, M.H., Jr** (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1-34.
- Patton, E.E., Willems, A.R. und Tyers, M.** (1998) Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet.* **14**: 236-243.
- Persson, B.L., Petersson, J., Fristedt, U., Weinander, R., Berhe, A. und Pattison, J.** (1999) Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1422**: 255-272.
- Pessin, J.E. und Bell, G.I.** (1992) Mammalian facilitative glucose transporter family: structure and molecular regulation. *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 911-930.
- Pessin, J.E., Thurmond, D.C., Elmendorf, J.S., Coker, K.J. und Okada, S.** (1999) Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J. Biol. Chem.* **274**: 2593-2596.
- Pessino A, Hebert DN, Woon CW, Harrison SA, Clancy BM, Buxton JM, Carruthers A, Czech M.P.** (1991) Evidence that functional erythrocyte-type glucose transporters are oligomers. *J. Biol. Chem.* **266**: 20213-20217.
- Phay, J.E., Hussain, H.B. und Moley, J.F.** (2000) Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* **66**: 217-220.
- Piper, R.C., Tai, C., Kulesza, P., Pang, S., Warnock, D., Baenziger, J., Slot, J.W., Geuze, H.J., Puri, C. und James, D.E.** (1993) GLUT-4 NH2 terminus contains a phenylalanine-based targeting motif that regulates intracellular sequestration. *J. Cell Biol.* **121**: 1221-1232.

- Plourde-Owobi, L., Durner, S., Parrou, J.L., Wieczorke, R., Goma, G. und Francois, J. (1999) AGT1, encoding an α -glucoside transporter involved in uptake and intracellular accumulation of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**: 3830-3832.
- Randez-Gil, F., Sanz, P., Entian, K.D. und Prieto, J.A. (1998) Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 2940-2948.
- Rea, S. und James, D.E. (1997) Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* **46**: 1667-1677.
- Reifenberger, E., Boles, E. und Ciriacy, M. (1997) Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* **245**: 324-333.
- Reifenberger, E., Freidel, K. und Ciriacy, M. (1995) Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol. Microbiol.* **16**: 157-167.
- Resh, M.D. (1999) Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1451**: 1-16.
- Riballo, E. und Lagunas, R. (1994) Involvement of endocytosis in catabolite inactivation of the K⁺ and glucose transport systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**: 77-80.
- Saier, M.H., Jr (1994) Computer-aided analysis of transport protein sequences: gleaned evidence concerning function, structure, biogenesis and evolution. *Microbiol. Rev.* **58**: 71-93.
- Saier, M.H., Jr (2000) Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol. Microbiol.* **35**: 699-710.
- Santer, R., Schneppenheim, R., Dombrowski, A., Gotze, H., Steinmann, B. und Schaub, J. (1998) Mutations in GLUT2, the gene for the liver-type glucose transporter, in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Nat. Genet.* **17**: 324-326.
- Sanz, P., Alms, G.R., Haystead, T.A. und Carlson, M. (2000) Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 1321-1328.
- Satoh, S., Nishimura, H., Clark, A.E., Kozka, I.J., Vannucci, S.J., Simpson, I.A., Quon, M.J., Cushman, S.W. und Holman, G.D. (1993) Use of bismannose photolabel to elucidate insulin-regulated GLUT4 subcellular trafficking kinetics in rat adipose cells. Evidence that exocytosis is a critical site of hormone action. *J. Biol. Chem.* **268**: 17820-17829.
- Schmidt, M.C., McCartney, R.R., Zhang, X., Tillman, T.S., Solimeo, H., Wöflf, S., Almonte, C. und Watkins, S.C. (1999) Std1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 4561-4571.
- Schürmann, A., Doege, H., Ohnimus, H., Monser, V., Buchs, A. und Joost, H.G. (1997) Role of conserved arginine and glutamate residues on the cytosolic surface of glucose transporters for transporter function. *Biochemistry* **36**: 12897-12902.
- Schulte, F., Wieczorke, R., Hollenberg, C.P. und Boles, E. (2000) The *HTR1* gene is a dominant negative mutant allele of *MTH1* and blocks Snf3- and Rgt2-dependent glucose signaling in yeast. *J. Bacteriol.* **182**: 540-542.
- Shanahan, M.F. (1983) Characterization of cytochalasin B photoincorporation into human erythrocyte D-glucose transporter and F-actin. *Biochemistry* **22**: 2750-2756.
- Shanahan, M.F. (1982) Cytochalasin B. A natural photoaffinity ligand for labeling the human erythrocyte glucose transporter. *J. Biol. Chem.* **257**: 7290-7293.
- Sherwood, P.W. und Carlson, M. (1999) Efficient export of the glucose transporter Hxt1p from the endoplasmic reticulum requires Gsf2p. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 7415-7420.

- Shewan, A.M., Marsh, B.J., Melvin, D.R., Martin, S., Gould, G.W. und James, D.E.** (2000) The cytosolic C-terminus of the glucose transporter GLUT4 contains an acidic cluster endosomal targeting motif distal to the dileucine signal. *Biochem. J.* **350**: 99-107.
- Sivadon, P., Crouzet, M. und Aigle, M.** (1997) Functional assessment of the yeast Rvs161 and Rvs167 protein domains. *FEBS Lett.* **417**: 21-27.
- Smith, R.M., Charron, M.J., Shah, N., Lodish, H.F. und Jarett, L.** (1991) Immunoelectron microscopic demonstration of insulin-stimulated translocation of glucose transporters to the plasma membrane of isolated rat adipocytes and masking of the carboxyl-terminal epitope of intracellular GLUT4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6893-6897.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. und te Heesen, S.** (1998) A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5187-5192.
- Stambuk, B.U., Panek, A.D., Crowe, J.H., Crowe, L.M. und de Araujo, P.S.** (1998) Expression of high-affinity trehalose-H⁺ symport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1379**: 118-128.
- Stambuk, B.U., da Silva, M.A., Panek, A.D. und de Araujo, P.S.** (1999) Active alpha-glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 105-110.
- Stapleton, D., Gao, G., Michell, B.J., Widmer, J., Mitchelhill, K., Teh, T., House, C.M., Witters, L.A. und Kemp, B.E.** (1994) Mammalian 5'-AMP-activated protein kinase non-catalytic subunits are homologs of proteins that interact with yeast Snf1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* **269**: 29343-29346.
- Teusink, B., Diderich, J.A., Westerhoff, H.V., van Dam, K. und Walsh, M.C.** (1998) Intracellular glucose concentration in derepressed yeast cells consuming glucose is high enough to reduce the glucose transport rate by 50%. *J. Bacteriol.* **180**: 556-562.
- Thevelein, J.M. und De Winde, J.H.** (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **33**: 904-918.
- Thorens, B.** (1996) Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. *Am. J. Physiol.* **270**: 541-553.
- Timblin, B.K., Tatchell, K. und Bergman, L.W.** (1996) Deletion of the gene encoding the cyclin-dependent protein kinase Pho85 alters glycogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **143**: 57-66.
- Treitel, M.A. und Carlson, M.** (1995) Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3132-3136.
- Treitel, M.A., Kuchin, S. und Carlson, M.** (1998) Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 6273-6280.
- Trumbly, R.J.** (1992) Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **6**: 15-21.
- Tu, J. und Carlson, M.** (1995) REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**: 5939-5946.
- Turk, E., Martin, M.G. und Wright, E.M.** (1994) Structure of the human Na⁺/glucose cotransporter gene SGLT1. *J. Biol. Chem.* **269**: 15204-15209.
- Uesono, Y., Tanaka, K. und Toh-e, A.** (1987) Negative regulators of the PHO system in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation and structural characterization of PHO85. *Nucleic. Acids. Res.* **15**: 10299-10309.
- Vagnoli, P., Coons, D.M. und Bisson, L.F.** (1998) The C-terminal domain of Snf3p mediates glucose-responsive signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **160**: 31-36.
- van der Rest, M.E., de Vries, Y., Poolman, B. und Konings, W.N.** (1995) Overexpression of Mal61p in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of maltose transport in artificial membranes. *J. Bacteriol.* **177**: 5440-5446.

- Verhey, K.J. und Birnbaum, M.J.** (1994) A Leu-Leu sequence is essential for COOH-terminal targeting signal of GLUT4 glucose transporter in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **269**: 2353-2356.
- Verhey, K.J., Yeh, J.I. und Birnbaum, M.J.** (1995) Distinct signals in the GLUT4 glucose transporter for internalization and for targeting to an insulin-responsive compartment. *J. Cell Biol.* **130**: 1071-1079.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. und Philippsen, P.** (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-1808.
- Walmsley, A.R., Barrett, M.P., Bringaud, F. und Gould, G.W.** (1998) Sugar transporters from bacteria, parasites and mammals: structure-activity relationships. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 476-81.
- Walsh M.C., Smits H.P., Scholte M. und van Dam, K.** (1994) Affinity of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated during growth on glucose. *J. Bacteriol.* **176**: 953-958.
- Waddell, I.D., Zomerschoe, A.G., Voice, M.W. und Burchell, A.** (1992) Cloning and expression of a hepatic microsomal glucose transport protein. Comparison with liver plasma-membrane glucose-transport protein GLUT 2. *Biochem. J.* **286**: 173-177.
- Weusthuis, R.A., Pronk, J.T., van den Broek, P.J.A. und van Dijken, J.P.** (1994) Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeast. *Microbiol. Rev.* **58**: 616-630.
- Wieczorke, R.** (1998) Molekulargenetische Untersuchungen zur Regulation der Expression von Hexosetransportern in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Wieczorke, R., Krampe, S. Weierstall, T. Freidel, K., Hollenberg, C.P. und Boles, E.** (1999) Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexose in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* **464**: 123-128.
- Wieczorke, R., Dlugai, S., Krampe, S. und Boles, E.** (2001) Restoration of glucose uptake and growth in hexose transport-deficient yeast mutants by rat and human GLUT1 and GLUT4 glucose transporters. Submitted.
- Willems, A.R., Goh, T., Taylor, L., Chernushevich, I., Shevchenko, A. und Tyers, M.** (1999) SCF ubiquitin protein ligases and phosphorylation-dependent proteolysis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **354**: 1533-1550.
- Wilson, W.A., Hawley, S.A. und Hardie, D.G.** (1996) Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr. Biol.* **6**: 1426-1434.
- Wirth, R.** (1989) Elektroporation: Eine alternative Methode zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA. *Forum Mikrobiol.* **11**: 507-515.
- Woods, A., Munday, M.R., Scott, J., Yang, X., Carlson, M. und Carling, D.** (1994) Yeast SNF1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase in vivo. *J. Biol. Chem.* **269**: 19509-19515.
- Yang, J. und Holman, G.D.** (1993) Comparison of GLUT4 and GLUT1 subcellular trafficking in basal and insulin-stimulated 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 4600-4603.
- Zamenhoff, S.** (1957) Preparation and assay of desoxyribonucleic acids from animals tissue. *Methods Enzymol.* **3**: 696-704.
- Zimmermann, F.K.** (1975) Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* **31**: 71-81.
- Zottola, R.J., Cloherty, E.K., Coderre, P.E., Hansen, A., Hebert, D.N. und Carruthers, A.** (1995) Glucose transporter function is controlled by transporter oligomeric structure. A single, intramolecular disulfide promotes GLUT1 tetramerization. *Biochemistry* **34**: 9734-9747.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ade	Adenin
AK	Antikörper
Ala	Alanin
Amp	Ampicillin
Arg	Arginin
ARS	Autonom replizierende Sequenz
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
Asn	Asparagin
ATB-BMPA	2-N4-(1-Azi-2,2,2-Trifluoroethyl)Benzoyl-1,3-bis(D-Mannosyloxy)-2-Propylamin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
CEN	Centromersequenz
Ci	Curie
cpm	Zerfälle pro Minute
2-DOG	2-Desoxyglukose
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
h	Stunde
His	Histidin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat

Lys	Lysin
min	Minuten
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pro	Prolin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
<i>S. c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
ts	temperatursensitiv
U	Einheit der Enzymaktivität
Ura	Uracil
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid
z. B.	zum Beispiel

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Dr. Eckhard Boles für die Bereitstellung des Themas, die aufmerksame Betreuung dieser Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und seine zahlreichen wertvollen Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. Hollenberg danke ich für die Überlassung der Arbeitsstelle und die freundliche Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dr. H. Bünemann danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Ich möchte mich ebenfalls bei den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, viele hilfreiche Diskussionen und eine überaus angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

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

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für deren unermüdliche Unterstützung während meiner Promotion.

Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, den 11.05.2001