Molekulargenetische und physiologische Charakterisierung von endogenen und heterologen Monocarboxylattransportern in der Hefe Saccharomyces cerevisiae

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

> vorgelegt von Judita Makuc aus Düsseldorf

> > Düsseldorf 2002

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

Referent: Prof. Dr. J. Ernst

Korreferentin: Prof. Dr. E. Knust

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 2002

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Monocarboxylattransporter in der Hefe Saccharomyces cerevisiae	8
1.2	Monocarboxylattransporter in Säugerzellen	11
1.2.1	Struktur der Monocarboxylattransporter	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Stämme und Medien	20
2.1.1	Bakterienstämme	20
2.1.2	Medien und Anzucht von <i>E. coli</i>	20
2.1.3	Hefestämme	20
2.1.4	Medien und Anzucht von Hefestämmen	22
2.2	Plasmide	23
2.3	Synthetische Oligonukleotide	25
2.4	Genbank	32
2.5	Antikörper	32
2.6	Chemikalien, Material und Enzyme	33
2.7	Transformationen	33
2.7.1	Transformation von <i>E. coli</i>	33
2.7.2	Transformation von S. cerevisiae	33
2.8	Präparation von DNA	34
2.8.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	34
2.8.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus S. cerevisiae	34
2.9	Enzymatische Modifikation von DNA	34
2.9.1	DNA-Restriktion	34
2.9.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	34
2.9.3	Ligation	35
2.10	PCR-Amplifikation von DNA	35
2.11	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	36
2.12	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	36

2.13	Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	36
2.14	Sequenzierung von DNA	36
2.15	Gendeletion in S. cerevisiae	36
2.15.1	Gendeletion mittels <i>loxP</i> /Cre-Rekombinasesystem	36
2.15.2	Konstruktion des <i>erg4∆</i> :: <i>HI</i> S3-Deletionsstammes	37
2.15.3	Gendeletion mittels Deletionsplasmid	38
2.16	Klonierung von DNA-Fragmenten durch in vivo-Rekombination	38
2.17	Konstruktion von <i>MCH4</i> -Überexpressionsplasmiden mit und ohne His <sub>6</sub> -Epitop	39
2.18	Konstruktion von genomischen HA-Fusionen	39
2.19	Konstruktion von GFP-Fusionsproteinen	40
2.20	Split-Ubiquitin-System	41
2.20.1	Konstruktion der Split-Ubiquitin Plasmide	41
2.21	Herstellung von Proteinextrakten aus S. cerevisiae	42
2.22	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacryl- amidgelen	42
2.23	Antikörperaufreinigung mittels Acetonpulver	43
2.24	Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse	43
2.25	Zellfraktionierung durch Saccharosegradientenzentrifugation	44
2.26	Bestimmung der Proteinkonzentration	44
2.27	Bestimmung der ß-Galaktosidaseaktivität	45
2.27.1	Quantitative Enzymtests	45
2.27.2	Qualitative Enzymtests (X-Gal Overlay-Assay)	45
2.28	Bestimmung der Aufnahme von Monocarboxylaten in S. cerevisiae	45
2.28.1	Messung der Aufnahme von Acetat	45
2.28.2	Messungen der Aufnahme von Pyruvat	46
2.28.3	Messungen der Aufnahme von Lactat	46
2.29	Bestimmung der Pyruvatverbrauchsrate	47
2.29.1	Bestimmung der Pyruvatkonzentration	47

2.30	Bestimmung der Sekretion von Acetat, Lactat und Pyruvat4	7
2.30.1	Bestimmung der Konzentration von Acetat4	8
2.30.2	Bestimmung der Konzentration von Lactat4	8
2.31	UV-Mutagenese	8
2.32	EMS-Mutagenese 4	8
2.33	Kreuzung von Hefestämmen, Tetradenanalyse und Bestimmung des Paarungstyps4	.9
2.34	Mikroskopische Untersuchungen 4	.9
3 Ei	rgebnisse	0
3.1	Untersuchung der putativen Monocarboxylattransporter von S. cerevisiae	0
3.1.1	Konstruktion und Untersuchung des <i>mch1-5</i> -Deletionsstammes 5	0
3.1.2	Untersuchung der Transkriptionsregulation der MCH-Gene5	2
3.1.2.1	Transkriptionsregulation der MCH-Gene durch Carbonsäuren 5	2
3.1.2.2	Transkriptionsregulation der MCH-Gene durch Aminosäuren 5	4
3.1.3	Deletion von <i>JEN1</i> im <i>mch1-5</i> -Deletionsstamm5	6
3.1.3.1	Untersuchung der Pyruvatverbrauchsrate in den Deletions- stämmen5	8
3.1.3.2	Untersuchung der Monocarboxylatsekretion in den Deletions- stämmen5	9
3.1.4	Untersuchung der Lokalisation der Mch-Proteine6	0
3.1.4.1	Genauere Untersuchung der Lokalisation von Mch46	1
3.1.4.2	Genauere Untersuchung der Lokalisation und Funktion von Mch36	2
3.2	Untersuchung von heterologen Monocarboxylattransportern in <i>S. cerevisiae</i>	4
3.2.1	Expression von MCT1 und MCT2 aus Ratte in der jen1-Mutante6	4
3.2.2	Koexpression von MCT1 und MCT2 mit CD147 in der jen1-Mutante 6	5
3.2.3	Konstruktion eines Pyruvat-auxotrophen Stammes6	7
3.2.4	Bestimmung der Aufnahme von Monocarboxylaten im MCT1- Einzelexpressionsstamm und MCT1-CD147-Koexpressionsstamm7	1

3.2.5	Untersuchung der Lokalisation von MCT1	. 73
3.2.5.1	Untersuchung der MCT1-Lokalisation durch GFP-Fusions- proteine	. 73
3.2.5.2	Untersuchung der MCT1-Lokalisation durch Saccharose- Dichtegradientenzentrifugation	. 75
3.2.6	Untersuchung der möglichen Interaktion zwischen dem Monocarboxylattransporter MCT1 und dem Glykoprotein CD147 der Ratte	. 77
3.2.6.1	Untersuchung der direkten Interaktion zwischen CD147 und MCT1 bzw. MCT2	. 79
3.2.7	Untersuchung der MCT1- und MCT2-Expression in einer <i>erg4-</i> Deletionsmutante	. 83
3.3	Suche nach dem unbekannten mitochondrialen Pyruvattransporter in <i>S. cerevisiae</i>	. 85
3.3.1	Bestimmung der Trockenmasseausbeute der <i>mch3</i> - und <i>mch1-5</i> -Mutante im aeroben Glukose-limitierten Chemostaten	. 85
3.3.2	Untersuchung der Funktion der Mch-Proteine durch Deletions- mutanten	. 87
3.3.2.1	Deletion von YOR100c im mch1-5-Deletionsstamm	. 87
3.3.2.2	Deletion von ADL7 im mch1-5-Deletionsstamm	. 88
3.3.3	Suche nach dem mitochondrialen Pyruvattransporter unter Verwendung eines synthetisch-letalen "Screens"	. 89
3.3.4	Identifizierung des mitochondrialen Pyruvattransporters durch sukzessive Deletion der MCF-Gene	. 92
3.3.4.1	Untersuchung des Wachstumsdefekts der ydl198c-Mutante	. 93
3.4	Suche nach dem Acetattransporter in der Plasmamembran von <i>S. cerevisiae</i>	. 96
3.4.1	Deletion eines mutmaßlichen Acetattransporters	. 96
3.4.2	Identifizierung des Acetattransporters der Plasmamembran	. 97
3.4.2.1	Mutagenese des yhl008c jen1 mch1-5-Deletionsstammes	. 97
3.4.2.2	Identifizierung des mutierten Gens in der Ac16b-Mutante	. 99
3.4.2.3	Deletion von SEF1 in der yhl008c jen1 mch1-5-Deletionsmutante	. 99

3.4.3	Deletion von STL1 in der jen1-Mutante 102
4 [	Diskussion
4.1	Putative und tatsächliche Monocarboxylattransporter von <i>S. cerevisiae</i>
4.1.1	Funktionsuntersuchung105
4.1.2	Regulationsuntersuchung 107
4.1.3	Lokalisationsuntersuchungen 110
4.2	Expression heterologer Monocarboxylattransporter in S. cerevisiae 111
4.2.1	Entwicklung eines Expressionssystems zur Untersuchung heterologer Monocarboxylattransporter
4.2.2	Funktion von CD147 bei der funktionellen Expression von MCT1 und MCT2112
4.2.2.	1 Beeinflussung der MCT1-Lokalisation durch die CD147- Koexpression
4.2.2.	2 Beeinflussung der Transportaktivität von MCT1 durch die CD147-Koexpression
4.2.2.3	<ul> <li>Beeinflussung der funktionellen Expression von MCT2 durch</li> <li>die CD147-Koexpression</li></ul>
4.2.2.4	4 Problematik bei der Versuchsdurchführung 116
4.2.3	Interaktion zwischen CD147 und MCT1 bzw. MCT2 117
4.2.4	Expression von MCT1 und MCT2 in <i>erg4</i> -Mutanten
4.3	Suche nach dem mitochondrialen Pyruvattransporter der Hefe 119
4.3.1	Sukzessive Deletion der MCF-Gene121
4.4	Suche nach dem Acetattransporter der Plasmamembran in <i>S. cerevisiae</i>
4.4.1	Yhl008c als mutmaßlicher Acetattransporter der Plasmamembran 123
4.4.2	Sef1 als mutmaßlicher Acetattransporter der Plasmamembran 124
4.4.3	Stl1 als mutmaßlicher Acetattransporter der Plasmamembran 124
5 2	Zusammenfassung126
6 l	Literaturverzeichnis

7	Abkürzungsverzeichnis	137
---	-----------------------	-----

# **1 EINLEITUNG**

Der Transport von Monocarboxylaten wie Lactat, Pyruvat und Acetat ist sowohl in den Zellen unterschiedlicher Gewebe als auch in einzelligen Organismen von entscheidender Bedeutung. Monocarboxylate entstehen nicht nur als Endprodukte beim Katabolismus und müssen aus den Zellen heraustransportiert werden, sondern bilden auch Ausgangssubstrate für den Anabolismus oder für die Energiegewinnung und müssen in die Zellen hereintransportiert werden. So entsteht in kontrahierenden Muskeln Lactat, welches aus den Muskelzellen heraustransportiert werden muß, um eine Übersäuerung zu verhindern. Andererseits dient Lactat den Muskelzellen als Energiequelle und wird von diesen aufgenommen. In der Leber wird Lactat auch aufgenommen, um im Rahmen des Cori-Zyklusses in Glukose umgewandelt zu werden. Auch die Hefe Saccharomyces cerevisiae ist in der Lage, Acetat, Lactat und Pyruvat als Energieund Kohlenstoffquelle zu verwenden und sie aus dem Medium aufzunehmen. Die gleichen Monocarboxylate stellen aber auch Endprodukte von verschiedenen Stoffwechselwegen in der Hefe dar und werden ins Medium ausgeschieden. Sowohl in der Hefe als auch in den Säugerzellen kann der Transport der Monocarboxylate über die Plasmamembran entweder durch Diffusion der undissoziierten Säure erfolgen oder aber von Transportproteinen vermittelt werden. In Säugern ist eine Familie von zehn Monocarboxylattransportern (MCT1-MCT9, TAT1) identifiziert worden, von denen für vier Mitglieder eine Transportaffinität für Monocarboxylate nachgewiesen werden konnte. In der Hefe ist bis heute nur ein Monocarboxylattransporter bekannt. Es gibt jedoch Hinweise auf die Existenz von mindestens einem weiteren Monocarboxylattransporter.

# 1.1 Monocarboxylattransporter in der Hefe Saccharomyces cerevisiae

In der Hefe *S. cerevisiae* beschrieben Casal *et al.* (1996) neben dem Monocarboxylattransport durch Diffusion zwei Transportsysteme, durch die die Aufnahme von verschiedenen Monocarboxylaten vermittelt wird. Ein niederaffiner Transporter ist in der Lage, Acetat, Propionat und Formiat zu transportieren, während er für Pyruvat und Lactat keine Transportaffinität aufweist. Er wird beim Wachstum auf Medien mit Acetat, Ethanol oder Lactat als Kohlenstoffquelle exprimiert. Ein hochaffiner Transporter, der auf Lactat oder Ethanol als Kohlenstoffquelle exprimiert wird, vermittelt den Transport von Pyruvat, Lactat, Propionat und Acetat, jedoch nicht von Formiat. Während Lactat, Pyruvat und Acetat eine Kohlenstoff- und Energiequelle für *S. cerevisiae* darstellen (Abb. 1), können Propionat oder Formiat als einzige Kohlenstoffquelle nicht verwertet werden. Sie können nur beim Vorhandensein einer weiteren Kohlenstoffquelle kometabolisiert werden.



**Abb. 1: Stoffwechselwege der Monocarboxylatverwertung.** Wichtige Enzyme bei der Verwertung von Acetat, Pyruvat und Lactat: Ldh: Lactatdehydrogenase, Pdc: Pyruvatdecarboxylase, Ald: Acetaldehyddehydrogenase, Acs: Acetyl-CoA-Synthetase, Pyc: Pyruvatcarboxylase, Cit: Citratsynthase, Aco: Aconitase, Icl: Isocitratlyase, MIs: Malatsynthase, Mdh: Malat-dehydrogenase und Pck: Phosphoenolpyruvatcarboxykinase.

Es konnte gezeigt werden, daß die Expression des hochaffinen Transporters auch von einem internen Induktor, einem Metabolit, abhängig ist (Casal *et al.*, 1995). Auf Medien, die Glukose, Galaktose, Maltose, Fruktose oder Saccharose als Kohlenstoffquelle enthalten, findet kein Transport von Monocarboxylaten statt. Während das Gen, welches für den niederaffinen Transporter kodiert, bis heute noch nicht identifiziert werden konnte, wurde der hochaffine Transporter von Casal *et al.* (1999) kloniert. Es zeigte sich, daß es sich dabei um das Gen *YKL217w* handelt, dessen Protein, Jen1, ein Mitglied der "major facilitator superfamily" ist und zur Sialat:H<sup>+</sup>-Familie gehört (Nelissen *et al.*, 1997; Pao *et al.*, 1998). Nach der Deletion von *JEN1* ist weder ein Wachstum auf Pyruvat noch

Lactat möglich, noch konnte ein Transport der beiden Monocarboxylate in der *jen1*-Mutante nachgewiesen werden (*Casal et al.*, 1999; Akita *et al.*, 2000). Trotz der Transportaffinität von Jen1 für Monocarboxylate wie Pyruvat und Lactat, welche auch für die Monocarboxylattransportern der Säuger aufgezeigt werden konnte, gehört Jen1 nicht zur Monocarboxylattransporter-Familie, sondern zeigt vielmehr eine Ähnlichkeit zum Prolin-Betain-Transporter und dem  $\alpha$ -Ketoglutarat-Transporter von *E. coli* (Garrel, 1997). Die Expression von *JEN1* unterliegt der Glukoserepression, an der verschiedene Faktoren beteiligt sind (Bojunga und Entian, 1999; Lodi *et al.*, 2002). Im Promotorbereich von *JEN1* konnten aber auch Sequenzen ermittelt werden, die bei der Induktion durch Lactat und Ethanol eine wichtige Rolle spielen (Andrade und Casal, 2001; persönliche Mitteilung von R.P. Andrade, Portugal).

Im Gegenteil zum hochaffinen Transporter des Monocarboxylattransportsystems konnte kein Gen identifiziert werden, welches für den niederaffinen Transporter kodiert. Nach der Sequenzierung des gesamten Hefegenoms sind jedoch fünf Gene von *S. cerevisiae* gefunden worden, deren Proteine eine Ähnlichkeit zu den Monocarboxylattransportern der Säuger (MCT) aufweisen (André, 1995; Nelissen *et al.*, 1997; http://alize.ulb.ac.be/YTPdb/) (Abb. 2).





Diese Gene, *YDL054c, YKL222w, YNL125c, YOL119c* und *YOR306c,* wurden deshalb als Monocarboxylattransporter-Homologe, *MCH1* bis *MCH5*, bezeichnet. Das Gen *YNL125c* trägt auch den Namen *ESBP6*, da es im Rahmen der

Sequenzierung des Chromosoms XIV von *S. cerevisiae* als putatives Gen auf diesem gefunden wurde (de Antoni *et al.*, 1997). Die Gene *YOL119c* und *YOR306c* wurden im Rahmen der Funktionsuntersuchung einiger unbekannter Gene von Chromosom XV deletiert. Es zeigte sich jedoch, daß auf Medien mit Acetat, Lactat oder Pyruvat als Kohlenstoffquelle kein Wachstumsunterschied zwischen dem *yoll119c yor306c*-Deletionsstamm und dem Wildtypstamm vorlag (Lafuente und Gancedo, 1999). So ist über die physiologische Funktion und die Substratspezifität dieser Proteine nichts bekannt.

Im Rahmen der Ermittlung der Funktion noch unbekannter Proteine in der Hefe *S. cerevisiae* sollten die putativen Monocarboxylattransporter Mch1 bis Mch5 hinsichtlich ihrer Substratspezifität, der Regulation und der Lokalisation untersucht werden. Da außer Jen1 kein Transporter identifiziert werden konnte, der Acetat über die Plasmamembran transportiert, sollte überprüft werden, ob eines der Mch-Proteine an diesem Transport beteiligt ist bzw. sollte unter Zuhilfenahme spezifischer Deletionsmutanten der zusätzliche Acetattransporter der Plasmamembran ermittelt werden. Monocarboxylate werden jedoch nicht nur über die Plasmamembran transportiert, sondern müssen auch intrazelluläre Membranstrukturen passieren. So ist beispielsweise der Transport von Pyruvat in die Mitochondrien beim respiratorischen Wachstum von entscheidender Bedeutung. Es ist jedoch noch kein Protein bekannt, das diesen Transport vermittelt. Aus diesem Grund sollte durch die Verwendung bestimmter Deletionsmutanten versucht werden, diesen Transporter zu identifizieren.

## 1.2 Monocarboxylattransporter in Säugerzellen

Schon bevor die Mitglieder der Monocarboxylattransporter-Familie identifiziert worden waren, wurde der Transport von Monocarboxylaten über die Plasmamembran verschiedener Zellen untersucht. Am besten untersucht war dabei der Transport von Monocarboxylaten über die Plasmamembran von Erythrozyten. Der Transport durch Diffusion beträgt hier bei einem physiologischen pH und einer physiologischen Konzentration der Monocarboxylate Pyruvat und Lactat (<10 mM) weniger als 5% des Gesamttransports (Deuticke *et al.*, 1982). Bei hohen Konzentrationen von Pyruvat und Lactat wird der Transport der Monocarboxylate durch den Anionen-Antiport-Mechanismus des Bande 3-Proteins vermittelt, indem das Monocarboxylat im Austausch gegen  $HCO_3^-$  oder Cl<sup>-</sup> aufgenommen wird (Halestrap, 1976). Unter physiologischen Bedingungen spielt der durch das Bande 3-Protein vermittelte Monocarboxylattransport jedoch nur eine untergeordnete Rolle (Deuticke *et al.,* 1982). Entscheidender ist der Monocarboxylattransport, der durch einen spezifischen H<sup>+</sup>-Monocarboxylattransporter vermittelt wird.

Der erste der zehn Monocarboxylattransporter wurde von Kim et al. (1992) durch Zufall entdeckt. Auf der Suche nach einem Mevalonattransporter isolierten sie aus einer Hamsterovariengenbank eine cDNA, die für einen Mevalonattransporter kodierte. Es zeigte sich jedoch, daß diese cDNA ein mutiertes Allel eines Wildtypgens darstellte. Das Wildtypgenprodukt gleicht dem Mevalonattransporter bis auf einen Aminosäureaustausch an Position 360 in der zehnten Transmembrandomäne: hier enthält das Wildtypprotein Phenylalanin anstelle von Cystein. Da das Wildtypprotein eine Transportaktivität für Pyruvat und Lactat besitzt und große Ähnlichkeit zum physiologisch charakterisierten aber bis dahin noch nicht identifizierten Monocarboxylattransporter der Erythrozyten zeigte, wurde es nach diesem mit MCT1 (Monocarboxylattransporter) benannt (Garcia et al., 1994). Bis heute sind neben MCT1 neun weitere Monocarboxylattransporter (MCT2 bis MCT9, TAT1) in Säugern identifiziert worden, wobei für MCT1 bis MCT4 eine Transportaktivität für Monocarboxylate nachgewiesen werden konnte (Garcia et al., 1995; Philp et al., 1995; Wilson et al., 1998; Price et al., 1998; Halestrap *et al.*, 1999).

## Monocarboxylattransporter 1 (MCT1)

Neben der bereits beschriebenen Identifizierung des Monocarboxylattransporters MCT1 aus einer Genbank von Hamsterovarien konnte MCT1 bis heute aus der Ratte, der Maus und dem Menschen kloniert werden (Jackson et al., 1995; Carpenter et al., 1996; Garcia et al., 1994). Diese zeigen eine Identität von etwa 95% zum Monocarboxylattransporter MCT1 aus dem Hamster. Für MCT1 aus der Ratte konnte gezeigt werden, daß es sich um ein 55 kDa-Protein handelt, welches eine ubiguitäre Lokalisation aufweist. In den Erythrozyten stellt es den einzigen Monocarboxylattransporter dar (Poole und Halestrap, 1993; Deuticke et al., 1982). Außerdem konnte MCT1 auch in der Lunge, der basolateralen Membran von Darmzellen des Hamsters, dem Spermienkopf, der apikalen Membran des RPE (retinal pigment epithelium) und den Herz- und Skelettmuskelzellen nachgewiesen werden (Garcia *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, daß MCT1 grundsätzlich eher in Muskelzellen mit vielen Mitochondrien zu finden ist, die ihre Energie durch oxidative Phosphorylierung gewinnen (Mc Cullagh et al., 1996). Brooks et al. (1999) konnten MCT1 auch in den Mitochondrien von Herz- und Skelettmuskelzellen der Ratte nachweisen. Neben der Lokalisation von MCT1 in den exokrinen Zellen der Pankreas der Ratte (Zhao et al., 2001) konnte die Expression von MCT1 auch in Astrogliazellen nachgewiesen werden, während nur eine geringe Expression von MCT1 in Neuronen gefunden wurde (Bröer *et al.*, 1997).

MCT1, wie auch die Monocarboxylattransporter MCT2-MCT4, transportiert Monocarboxylate als Monocarboxylatanion im Symport mit einem Proton. Dabei bindet das Proton vor dem Anion an den Transporter. Nach der Translokation des Anions und Protons über die Plasmamembran wird zuerst das Anion und dann das Proton vom Transporter entlassen. Die Rückkehr des freien Transporters in die ursprüngliche Konformation stellt beim Transport den limitierenden Schritt dar (Poole und Halestrap, 1993). Der Transport des Monocarboxylats ist umkehrbar, so daß MCT1 grundsätzlich sowohl als Importer als auch als Exporter fungieren kann. Die Richtung des Transports ist dabei abhängig von dem Konzentrationsgradienten des Substrats und des Protonengradienten, welche beide die treibende Kraft des Transports darstellen (Bröer et al., 1999; Halestrap und Price, 1999). In Astrogliazellen wird für MCT1 eine Funktion als Exporter postuliert (Bröre et al., 1997; Halestrap und Price, 1999), während MCT1 in den Skelettmuskelzellen eher eine Funktion als Importer zugesprochen wird (Mc Cullagh et al., 1996). MCT1 hat eine breite Substratspezifität und wird deshalb auch als unspezifischer Monocarboxylattransporter bezeichnet. Es kann kurzkettige Monocarboxylate transportieren wie z.B. Pyruvat, Lactat, Acetoacetat, ß-Hydroxybutyrat, Propionat, Oxoisopentanoat und Oxoisohexanoat (Bröer et al., 1998; Poole und Halestrap, 1993). Für Lactat weist es eine Stereoselektivität auf: Es transportiert L-Lactat mit einem K<sub>m</sub>, der eine Größenordnung kleiner ist als der K<sub>m</sub> für D-Lactat (Bröer *et al.*, 1998). Die Affinität des Transporters für unterschiedliche Substrate ist abhängig vom Expressionssystem, in dem die Transportaktivität untersucht wurde. Bei der Expression von MCT1 in Xenopus *laevis* Oozyten wurde beispielsweise ein K<sub>m</sub> von 3,5 mM für Lactat und ein K<sub>m</sub> von 1,0 mM für Pyruvat bestimmt (Bröer et al., 1998). Vier Gruppen von Inhibitoren sind für MCT1 bekannt: (1) aromatische Monocarboxylate wie z.B.  $\alpha$ -Cyano-4hydroxycinnemat (CHC), (2) Inhibitoren von Anionentransportern wie Stilbenedisulfonate z.B. 4,4'-Diisothiocyanato-stilbene-2,2'-disulfonat (DIDS), (3) Bioflavenoide wie Phloretin und (4) Thiolreagenzien wie z.B. p-Chloromercuribenzenesulfonat (pCMBS). Jedoch ist keiner dieser Inhibitoren spezifisch für MCT1.

Es ist gezeigt worden, daß durch Training nicht nur die Lactattransportkapazität in den Skelettmuskelzellen zunimmt, sondern daß auch die Konzentration von MCT1 erhöht wird (Bonen *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu dieser Langzeitregulation der MCT1-Expression ist keine Kurzzeitregulation durch Hormoneinwirkung bekannt. Da auch durch elektrische Stimulation des Gehirns in der Ratte eine Erhöhung der Lactattransportrate festgestellt wurde, die mRNA-Konzentration jedoch im Vergleich zu unstimulierten Tieren nicht erhöht wurde, wird eine translationale Regulation angenommen, wie sie z.B. durch eine Erhöhung der Translationsrate durch die Ribosomen möglich wäre (Juel und Halestrap, 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die Regulation der funktionellen Expression aber auch der Aktivität von MCT1 von sog. Hilfsproteinen beeinflußt wird. So konnten Kirk *et al.* (2000) zeigen, daß ein Protein der Immunglobulin-Superfamilie, CD147, bei der Expression von MCT1 und MCT4 in der Plasmamembran verantwortlich ist, wodurch der Transport von Lactat ermöglicht wird.

## Monocarboxylattransporter 2 (MCT2)

Das Fehlen der MCT1-Expression in der Leber von Hamstern, in der Lactat zu Glukose umgewandelt wird und somit in die Zellen aufgenommen werden muß, veranlaßte Garcia et al. (1995) nach einem zweiten Monocarboxylattransporter, MCT2, zu suchen. Inzwischen konnte MCT2 nicht nur aus dem Hamster kloniert werden, sondern auch aus der Ratte, der Maus und dem Menschen (Jackson et al., 1997; Koehler-Stec et al., 1998; Lin et al., 1998). Die Monocarboxylattransporter des Hamsters, MCT2 und MCT1 zeigen eine Identität von 60% (Garcia et al., 1995). Auch die Substratspezifität von MCT2 zeigt eine große Ähnlichkeit zur Substratspezifität von MCT1. MCT2 besitzt eine Transportaktivität für Pyruvat, Lactat, Acetoacetat, ß-Hydroxybutyrat, Oxoisopentanoat und Oxoisohexanoat und transportiert die Substrate im Anionen/Protonen-Symport (Bröer et al., 1999). Dabei ist die Substrataffinität von MCT2 durchweg höher als die von MCT1. MCT2 wird deshalb auch als hochaffiner Monocarboxylattransporter bezeichnet. Für MCT2 des Menschen konnte nach seiner Expression in *Xenopus laevis* Oozyten ein K<sub>m</sub> von 25 µM für Pyruvat ermittelt werden, während der von MCT1 im Vergleich 2,5 mM betrug (Lin et al., 1998). Die schon für MCT1 festgestellte Stereoselektivität für L-Lactat gegenüber D-Lactat konnte auch für MCT2 nachgewiesen werden. Obwohl der Transport von Monocarboxylaten durch MCT2 reversibel ist, wird für MCT2 die Funktion eines Importers postuliert (Bröer et al., 1999). Diese Annahme wird dadurch bestätigt, daß MCT2 in Neuronen gefunden wurde, von denen bekannt ist, daß sie Lactat als Energiequelle nutzen (Bröer et al., 1997). Bei Betrachtung des MCT1-Vorkommens in Astrogliazellen und des MCT2-Vorkommens in Neuronen läßt sich postulierten, daß MCT1 den Transport von Lactat aus den Astrogliazellen vermittelt und dadurch den Neuronen Lactat als Energiequelle liefert, welches von MCT2 aufgenommen werden kann. Damit ist eine Kommunikation zwischen diesen beiden Zelltypen gewährleistet. Außer in den Neuronen von Ratten und in der Leber von Hamstern konnte MCT2 auch in der Niere, der Haut, dem Magen, Herzmuskelzellen, Skelettmuskelzellen und dem Spermienschwanz nachgewiesen werden (Garcia et al., 1995). Der von MCT2 vermittelte Transport der Monocarboxylate läßt sich durch die gleichen Inhibitoren wie der MCT1-vermittelte Transport hemmen. So zeigt MCT2 eine Sensitivität gegenüber  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnemat (CHC), Stilbenedisulfonaten und auch Phloretin. Im Gegensatz zu MCT1, welches durch pCMBS inhibiert werden kann, ist MCT2 insensitiv gegenüber pCMBS (Bröer *et al.*, 1999). Es wurde postuliert, daß pCMBS mit extrazellulären Cysteinresten reagiert, welcher bei MCT1 zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne zu findet ist (Cys<sub>106</sub>), der jedoch bei MCT2 fehlt (Ser<sub>106</sub>) (Fox *et al.*, 2000; Dimmer *et al.*, 2000).

## Monocarboxylattransporter 3 (MCT3)

MCT3 wurde als erstes von Philp *et al.* (1995) als Protein der Retinamembran im Huhn identifiziert und mit REMP (retinal epithelium membran protein) bezeichnet. Später konnten Yoon et al. (1997) zeigen, daß MCT3 zur Familie der Monocarboxylattransporter gehört und eine Identität von 43% zu MCT1 bzw. eine Identität von 45% zu MCT2 zeigt. Inzwischen konnte MCT3 auch aus der Ratte, der Maus und dem Menschen kloniert werden (Philp et al., 1998; Philp et al., 2001; Yoon et al., 1999). MCT3 hat ein Molekulargewicht von 55 kDa und ist ausschließlich in der basolateralen Membran des RPE (retinal pigment epithelium) lokalisiert (Yoon et al., 1997; Philp et al., 1998). Eine detaillierte Charakterisierung von MCT3 wurde bis jetzt noch nicht durchgeführt. Durch Expression von MCT3 in Rattenzelllinien konnte lediglich gezeigt werden, daß MCT3 sowohl Pyruvat als auch Lactat als Protonen-Symporter transportiert. (Yoon et al., 1997). Aufgrund der Lokalisation von MCT1 in der apikalen Membran des RPE und der Lokalisation von MCT3 in der basolateralen Membran des RPE wurde für die Monocarboxylattransporter eine Funktion beim Transport des Lactats von dem subretinalen Raum durch das RPE in die Blutbahn postuliert (Philp et al., 1998). In den Müller-Stützzellen der Retina wird Glukose durch die Glykolyse zur Energiegewinnung in Lactat umgewandelt. Lactat wird aus den Müller-Stützzellen entweder in die Photorezeptorzellen transportiert, wo es durch oxidative Phosphorylierung weiter verwertet wird, oder in den subretinalen Raum. Von dort gelangt Lactat nach der Durchquerung des RPE in die Blutbahn. Eine Beteiligung von MCT1 und MCT3 an diesem Lactattransport wurde aufgrund ihrer spezifischen Lokalisation im RPE angenommen.

#### Monocarboxylattransporter 4 (MCT4)

MCT4 wurde von Wilson et al. (1998) kloniert und zuerst als MCT3 bezeichnet, später jedoch umbenannt, da zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt war, daß es sich bei dem von Philp et al. (1995) identifizierten Protein aus der Retinamembran um ein Mitglied der MCT-Familie handelt. MCT4 konnte bis heute in der Ratte und im Menschen nachgewiesen werden (Wilson et al., 1998; Price et al., 1998). Genau wie die anderen Monocarboxylattransporter weist MCT4 eine Transportaktivität für verschiedene Monocarboxylate auf wie Lactat, Pyruvat, Acetoacetat, Oxoisophexanoat und ß-Hydroxybutyrat (Dimmer et al., 2000). Dabei konnte die für die Monocarboxylattransporter schon bekannt Stereoselektivität für L-Lactat festgestellt werden. Die Affinität von MCT4 für die getesteten Substraten ist im Vergleich zu den Affinitäten von MCT1 und MCT2 geringer (Fox et al., 2000). MCT4 wird daher auch als niederaffiner Monocarboxylattransporter bezeichnet. Auffällig ist seine Affinität zu Lactat, welche größer ist als zu den anderen Monocarboxylaten. Die Expression von MCT4 konnte in Skelettmuskelzellen, der Plazenta, der Niere, der Leber, dem Hoden, dem Dünndarm und in den weißen Blutzellen des Menschen und der Ratte nachgewiesen werden (Dimmer et al., 2000; Wilson et al., 1998; Price et al., 1998). Im Menschen ist MCT4 außerdem noch in den Herzmuskelzellen nachgewiesen worden (Wilson et al., 1998). Aufgrund der hohen Expression von MCT4 in Skelettmuskelzellen, die nur wenige Mitochondrien aufweisen und die Energie hauptsächlich aus der Glykolyse gewinnen, deren Endprodukt Lactat ist, wurde eine Lactatexportfunktion für MCT4 postuliert. Bestätigt wird diese Vermutung dadurch, daß MCT4 den einzigen Monocarboxylattransporter der weißen Blutzellen darstellt, die eine hohe Glykolyserate aufweisen und einen hohen Lactatexport zeigen (Wilson et al., 1998). Als physiologische Funktion für die niedrige Lactataffinität von MCT4 wurde postuliert, daß dadurch eine Übersäuerung des Blut verhindert wird. Aufgrund der geringen Affinität von MCT4 für Lactat staut sich dieses bei einer hohen Muskelaktivität und der damit verbundenen hohen Glykolyserate in den Muskelzellen an, wodurch die Glykolyse gehemmt und eine Übersäuerung des Blutes verhindert wird. Außerdem wird durch die geringe Lactataffinität gewährleistet, daß die Menge des produzierten Lactats in den Muskeln die Menge des von der Leber umgesetzten Lactats nicht übersteigt (Fox et al., 2000). Der MCT4-vermittelte Transport kann durch  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamat (CHC), p-Chloromercuribenzenesulfonat (pCMBS) und Phloretin inhibiert werden. Anders als MCT1 und MCT2 ist eine Inhibition von MCT4 durch DIDS (4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'disulfonat) nicht möglich (Fox et al., 2000; Dimmer et al., 2000). Es wurde postuliert, daß DIDS an extrazelluläre Arginin- und Lysinreste in der Nähe der Substratbindestelle bindet und dadurch der Transport der Substrate gehemmt wird (Halestrap und Price, 1999). Potentielle Kandidaten sind der Lysinrest Lys<sub>413</sub> in MCT1 und der Lysinrest Lys<sub>404</sub> in MCT2, während bei MCT4 an vergleichbarer Stelle ein Methioninrest zu finden ist (Fox *et al.*, 2000).

## Monocarboxylattransporter 5-9 (MCT5-MCT9) und TAT1

Über die Monocarboxylattransporter MCT5 bis MCT9 ist nur wenig bekannt. Mit Ausnahme von MCT8, welches auch in der Maus gefunden wurde, konnten sie bis heute nur im Menschen nachgewiesen werden. MCT4 bis MCT7 wurden als MCT-Homologe in der dbEST (database of expression sequence tags) gefunden und sind anschließend kloniert worden. MCT8 ist von Lafreniere et al. (1994) auf dem X-Chromoson identifiziert worden. Da das Protein in seinem langen N-Terminus eine PEST-Sequenz enthält, welche ein Motif für den schnellen Proteinabbau darstellt, wurde das Protein zuerst mit XPCT (X-linked PEST containig transporter) benannt. Von MCT9 ist nicht die gesamte Seguenz bekannt, jedoch konnte es durch die dbEST-Suche auch als Mitglied der MCT-Familie identifiziert werden (Halestrap und Price, 1999). Für keines dieser MCT-Proteine ist bis heute eine Transportaktivität für Monocarboxylate nachgewiesen worden. Aufgrund ihrer Homologie zu anderen Proteinen der MCT-Familie wird jedoch eine ähnliche Funktion vermutet. In verschiedenen Geweben konnten unterschiedlichen MCT-Isoformen lokalisiert werden. So konnten MCT5 und MCT6 in der Plazenta, der Niere und dem Herzen nachgewiesen werden, wobei MCT5 zusätzlich noch im Darm nachweisbar war (Price et al., 1998). MCT7 und MCT8 sind in der Pankreas lokalisiert (Zhao et al., 2001). Für MCT7 konnte außerdem eine Lokalisation im Gehirn und für MCT8 in viele anderen Geweben wie z.B. Herz, Leber, Thymus und Darm aufgezeigt werden (Price et al., 1998). Da viele Gewebe verschiedene Monocarboxylattransporter exprimieren, wurde postuliert, daß sie entweder verschiedene Substratspezifitäten haben oder aber sich durch die Funktion als Importer oder Exporter unterscheiden.

Kürzlich ist TAT1 (<u>T</u>-type <u>a</u>mino acid <u>t</u>ransporter 1) als neues Mitglied der Monocarboxylattransporter-Familie identifiziert worden (Kim *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werde, daß TAT1 ein Na<sup>+</sup>-unabhängiger, niederaffiner Aminosäuretransporter für aromatische Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin ist, der im Dünndarm der Ratte exprimiert wird. Es wird angenommen, daß TAT1, genau wie die MCT-Proteine, seine Substrate nur in der Anionenform erkennt. Anders als die Monocarboxylattransporter transportiert es die Substrate jedoch durch erleichterte Diffusion. Aufgrund einer Identität von 31%-33% zu MCT1-MCT4 und sogar einer Identität von 49% zu MCT8 wird es zur Familie der Monocarboxylattransporter gezählt.

# 1.2.1 Struktur der Monocarboxylattransporter

Aufgrund der Aminosäuresequenz der MCT-Proteine und von TAT1 ist für sie eine Topologie mit zwölf Transmembrandomänen vorhergesagt worden, die als  $\alpha$ -Helices die Plasmamembran durchqueren. Der N- und C-Terminus sollen dabei im Zytoplasma lokalisiert sein. Die genaueren Untersuchungen von Poole *et al.* (1996) bestätigten diese Vermutung für den Monocarboxylattransporters MCT1 der Ratte. Sie konnten außerdem zeigen, daß die sechste und siebte Transmembrandomäne durch eine große, hydrophile Region voneinander getrennt sind. Aufgrund ihrer Untersuchungen stellten sie das in Abb. 3 dargestellte Modell auf, welches auch für die übrigen MCT-Proteine angenommen wird.



Abb. 3: Topologie von MCT1 der Ratte. (Poole et al., 1996).

Obwohl MCT1 bis MCT7 eine Konsensussequenz für N-Glykosylierung aufweisen, konnte diese nicht nachgewiesen werden. Wahrscheinlich sind die extrazellulären Bereiche zu klein als daß eine N-Glykosylierung erfolgen könnte (Yoon *et al.,* 1997; Carpenter *et al.,* 1996; Halestrap und Price, 1999). Beim Vergleich der Strukturen der MCT-Proteine untereinander zeigt sich zum einen, daß MCT1 bis MCT4 eine Homologie >50% zueinander aufweisen, während MCT5 bis MCT9 eine Homologie von <30% zeigen. Zum anderen zeigt sich, daß die N-Termini stärker konserviert sind als die C-Termini (Price *et al.,* 1998). Dieses Muster ist bei

vielen Transporterfamilien beobachtet worden (Saier, 1994). Es wurde postuliert, daß die beiden Hälften der Transporter verschiedene Funktionen ausüben. Dabei wird dem C-terminalen Teil eine Funktion bei der Substratspezifität und dem Nterminalen Teil eine Funktion bei der Energiekopplung und der Insertion des Transporters in die Membran zugesprochen. Untersuchungen von Rahman et al. (1999) unterstützen diese Vermutung. Sie konnten zeigen, daß beim Austausch des Aspartatrestes Asp<sub>302</sub> in der achten Transmembrandomäne gegen Glutamat die Transportaktivität von MCT1 stark reduziert wird. Der Austausch des Argininrestes Arg<sub>306</sub> gegen Threonin, der in allen Mitgliedern der MCT-Familie bis auf MCT5 konserviert ist, führte auch zu einer Veränderung der Transportaktivität. Für Phenylalanin in der zehnten Transmembrandomäne konnte schon früh eine Beteiligung an der Substratspezifität gezeigt werden. So führte der Austausch von Phe<sub>360</sub> zu Cystein zur Umwandlung des MCT1 von einem Lactat-/Pyruvattransporter in einen Mevalonattransporter (Kim et al., 1992; Garcia et al., 1994). Es wurde postuliert, daß die achte und zehnte Transmembrandomäne die Translokationspore bilden und Arg<sub>306</sub> und Phe<sub>360</sub> dabei in engen Kontakt mit dem Substrat kommen (Rahman et al., 1999).

Da nach der Entdeckung der Monocarboxylattransporter-Familie des Menschen gezeigt werden konnte, daß einige Krankheiten durch einen Defekt in diesen Transportern verursacht werden (Merezhinskaya et al., 2000; Baker et al., 2001), hat die Charakterisierung der Monocarboxylattransporter einen großen Stellenwert erhalten. Die Untersuchung der Transporter in heterologen Expressionssystemen ist oft das Mittel der Wahl, da eine Untersuchung in den Geweben, in denen sie natürlicherweise vorkommen, häufig durch weitere endogene Isoformen der Transporter behindert wird. Die Hefe bietet sich als ein solches heterologes Expressionssystem aufgrund ihrer einfachen und kostengünstigen Handhabung an. Aber auch die Tatsache, daß die Sequenz des gesamten Genoms bekannt ist, erlaubt durch die Herstellung von transportdefekten Mutanten die Konstruktion eines Expressionssystems, in dem heterologe Transporter exprimiert werden können und ihre Funktionalität durch einfache Wachstums- und Komplememtationstests überprüft werden kann. So war es Ziel der Arbeit, einen Hefestamm zu konstruieren, in dem die heterologen Monocarboxylattransporter MCT1 und MCT2 der Ratte funktionell exprimiert werden können, so daß eine anschließende Charakterisierung möglich ist.

# **2 MATERIAL UND METHODEN**

## 2.1 Stämme und Medien

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Tab. 1: Escherichia coli (E. coli)

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
DH5αF'	F', $\Phi$ (80dlacZ $\Delta$ M15) $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 ( $r_k^- m_k^+$ ) supE44 $\Delta^-$ gyrA96 thi-1 relA1	Gibco BRL Gaithersburg, USA
DH10B	F', mcrA $\Delta$ -(mrr hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74 deoR recA1 ara $\Delta$ 139 $\Delta$ (ara, leu)7697 galU galK $\lambda$ <sup>-</sup> rpsL end A1 nupG	Gibco BRL Gaithersburg, USA
SURE	e14 <sup>-</sup> (McrA <sup>-</sup> )∆(mcrCB-hsdSMR-mrr) 171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan <sup>r</sup> ) uvrC [F' proAB lacl <sup>q</sup> Z∆M15 Tn10(Teť)]	Stratagene

## 2.1.2 Medien und Anzucht von E. coli

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

Die Anzucht erfolgte bei 37°C. Festen Nährmedien wurde 1,8% Agar hinzugesetzt. Für die Selektion auf eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 40 µg/ml Ampicillin hinzugefügt.

#### 2.1.3 Hefestämme

Tab. 2: verwendete Hefestämme (Saccharomyces cerevisiae)

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
CEN.PK2-1C (=VW1A)	MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-∆1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2	KD. Entian, Frankfurt
CEN.PK113-13D (=K26)	MAT $\alpha$ ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2	KD. Entian, Frankfurt
CEN.PK113-5D (=K1 <b>)</b>	MATa ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2	KD. Entian, Frankfurt
EBY.D153	MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 pyk1∆ mae1∷lacZ-kanMX	Boles <i>et al.,</i> 1998
EBY109A	MATa leu1	E. Boles, Düsseldorf
EBY109B	$MAT\alpha$ leu1	E. Boles, Düsseldorf
EBY139A	MATa	E. Boles, Düsseldorf
L40	MATa trp1 leu2 his3 LYS::lexA-HIS3 URA::lexAlacZ	Vojtek <i>et al.,</i> 1993

#### Tab. 3: im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Hefestämme

Stamm	Genotyp	Referenz
JMY1	MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-∆1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 mch1∆::kanMX	Makuc <i>et al</i> ., 2001
JMY2	MATα ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 mch5 $\Delta$ ::kanMX	Makuc <i>et al</i> ., 2001
JMY6	MATa/ $lpha$ ura3-52 MAL2-8° SUC2 mch1 $\Delta$ ::lacZkanMX/MCH1	diese Arbeit
JMY7	MATa/ $lpha$ ura3-52 MAL2-8 $^{\circ}$ SUC2 mch5 $\Delta$ ::lacZkanMX/MCH5	diese Arbeit
JMY8	MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-∆1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 mch1∆::lacZkanMX	Makuc <i>et al</i> ., 2001
JMY9	MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-∆1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 mch5∆::lacZkanMX	Makuc <i>et al</i> ., 2001
JMY18	MATα ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 mch1Δ::loxP mch2Δ::loxP mch3Δ::loxP mch4Δ::loxP mch5Δ::loxP	Makuc <i>et al</i> ., 2001
JMY20	MAT $lpha$ ura3-52 MAL2-8° SUC2 mch2 $\it\Delta$ ::lacZkanMX	Makuc <i>et al</i> ., 2001
JMY21	MATa/ $lpha$ ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 mch2 $\Delta$ ::lacZkanMX/MCH2	diese Arbeit
JMY22	MAT $lpha$ ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 mch3 $\Delta$ ::lacZkanMX	Makuc <i>et al</i> ., 2001
JMY23	MATa/ $lpha$ ura3-52 MAL2-8° SUC2 mch3 $\Delta$ ::lacZkanMX/MCH3	diese Arbeit
JMY24	MAT $lpha$ ura3-52 MAL2-8° SUC2 mch4 $\it\Delta$ ::lacZkanMX	Makuc <i>et al</i> ., 2001
JMY25	MATa/ $lpha$ ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 mch4 $\Delta$ ::lacZkanMX/MCH4	diese Arbeit
JMY27	MAT $lpha$ ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 MCH3-3xHA	Makuc <i>et al</i> 2001
JMY29	MAT $\alpha$ ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 jen1 $\Delta$ ::loxP	Makuc <i>et al</i> 2001
JMY30	MATα ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 jen1Δ::loxP mch1Δ::loxP mch2Δ::loxP mch3Δ::loxP mch4Δ::loxP mch5Δ::loxP	Makuc <i>et al</i> ., 2001
JMY35	МАТ $lpha$ ura3-52 MAL2-8 $^{\circ}$ SUC2 yhl008c $arDelta$ ::kanMX	Makuc <i>et al</i> ., 2001
JMY36	MAT $lpha$ ura3-52 MAL2-8° SUC2 yhl008c $\Delta$ ::kanMX jen1 $\Delta$ ::loxP	Makuc <i>et al</i> ., 2001
JMY38	MAT $lpha$ ura3-52 MAL2-8° SUC2 MCH4-3xHA	diese Arbeit
JMY44	MAT <i>α</i> ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 ald7 <i>Δ</i> ::loxP mch1 <i>Δ</i> ::loxP mch2 <i>Δ</i> ::loxP mch3 <i>Δ</i> ::loxP mch4 <i>Δ</i> ::loxP mch5 <i>Δ</i> ::loxP	diese Arbeit
JMY45	MAT $lpha$ ura3-52 MAL2-8° SUC2 crc1 $ m \Delta$ ::kanMX	diese Arbeit
JMY46	MAT <i>α</i> ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 crc1 <i>Δ</i> ::kanMX mch1 <i>Δ</i> ::loxP mch2 <i>Δ</i> ::loxP mch3 <i>Δ</i> ::loxP mch4 <i>Δ</i> ::loxP mch5 <i>Δ</i> ::loxP	diese Arbeit
JMY56	MATa ura3-52 MAL2-8 <sup>°</sup> SUC2 ydl198c∆∷kanMX	diese Arbeit
JMY57	MAT $\alpha$ ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 yor222w $\Delta$ ::kanMX	diese Arbeit
JMY58	MATa ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 yer053c∆∷URA3 ydl198c∆∷kanMX	diese Arbeit
JMY59	MATα ura3-52 MAL2-8 <sup>°</sup> SUC2 ypl134cΔ::URA3 yor222wΔ::kanMX	diese Arbeit
JMY61	MAT $lpha$ ura3-52 MAL2-8° SUC2 ald7 $\Delta$ ::loxP	diese Arbeit
JMY62	MAT <i>α</i> ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 yhl008cΔ::loxP jen1Δ::loxP mch1Δ::loxP mch2Δ::loxP mch3Δ::loxP mch4Δ::loxP mch5Δ::loxP	Makuc <i>et al.,</i> 2001
JMY63	MAT $lpha$ ura3-52 MAL2-8 $^{\circ}$ SUC2 sef1 ${\it \Delta}$ ::kanMX	diese Arbeit

JMY64	$\begin{array}{l} \textit{MAT}\alpha \textit{ ura3-52 MAL2-8}^c \textit{SUC2 sef1} \varDelta::\textit{kanMX yhl008c} \varDelta::\textit{loxP} \\ \textit{jen1} \varDelta::\textit{loxP mch1} \varDelta::\textit{loxP mch2} \varDelta::\textit{loxP mch3} \varDelta::\textit{loxP mch4} \varDelta::\textit{loxP} \\ \textit{mch5} \varDelta::\textit{loxP} \end{array}$	diese Arbeit
JMY65	MATa ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 yer053c <i>∆</i> ::loxP ydl198c <i>∆</i> ::loxP ypl134c <i>∆</i> ::loxP yor222w <i>∆</i> ::loxP	diese Arbeit
JMY71	MAT $lpha$ ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 stl $\Delta$ 1::kanMX	diese Arbeit
JMY72	MAT $\alpha$ ura3-52 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 stl1 $\Delta$ ::kanMX jen1 $\Delta$ ::loxP	diese Arbeit
JMY73	MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-∆1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 jen1∆::kanMX	diese Arbeit
JMY74	MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-∆1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 mae1∆::kanMX jen1∆::kanMX	diese Arbeit
JMY75	MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-∆1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 pyk1∆::LEU2 mae1∆::kanMX jen1∆::kanMX	diese Arbeit
JMY78	MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-∆1 MAL2-8 <sup>c</sup> SUC2 erg4∆::HIS3 pyk1∆::LEU2 mae1∆::kanMX jen1∆::kanMX	diese Arbeit

#### 2.1.4 Medien und Anzucht von Hefestämmen

Vollmedium	YEP	1% Hefeextrakt, 2% Bacto-Pepton, Kohlenstoff- quelle in der jeweils angegebenen Konzentration
Minimalmedium	YNB	0,67% YNB w/o amino acids, pH 6,3, Amino- säuren/Nukleobasen-Lösung, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegeben Konzentration
Minimalmedium ohne Ammonium	YNB <sub>-NH3</sub>	0,17% YNB w/o amino acids & ammonium sulphate, pH 6,3, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegebenen 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)

Es wurden folgende Kohlenstoffquellen verwendet: Glukose, Galaktose, Maltose, Ethanol, Glycerin, Pyruvat, Lactat, Kaliumacetat, Butyrat, Sorbat, Succinat und Ölsäure. Hierbei wurden Glukose, Galaktose, Glycerin und Kaliumacetat mit dem Medium autoklaviert, während von den anderen Kohlenstoffquellen Stammlösungen hergestellt, sterilfiltriert und dem autoklavierten Medium zugesetzt wurden. Ethanol wurde erst nach dem Autoklavieren zugegeben. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 1,8% Agar.

Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen bzw. Zellen mit genomisch integriertem *Kluyveromyces lactis URA3*-Markergen, *S. cerevisiae LEU2*-Markergen oder *Saccharomyces kluyveri HIS3*-Markergen wurde die jeweilige Aminosäure oder Base nicht hinzu gegeben. Für die Selektion auf Verlust eines Plasmids mit *URA3*-Marke wurden YNB-Agarplatten verwendet, die neben Uracil 1 mg/ml FOA enthielten (Boeke *et al.,* 1984). Die Selektion auf Geneticinresistenz erfolgte auf Vollmediumsplatten mit 200 mg/ml G418.

Die Anzucht der Hefezellen erfolgte bei 30°C.

# 2.2 Plasmide

Tab. 4	4:	verwendete	Plasmide
--------	----	------------	----------

Plasmid	Quelle/Referenz	Beschreibung
p426HXT7-6HIS	Dlugai, 1999	2μ Plasmid zur Herstellung von Fusionsproteinen mit 6xHis-Epitop; <i>URA3</i> - Selektionsmarker, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
p426MET25-GFP-ORF1	Betz, 1997	Ausgangsvektor für die Konstruktion des pMET25-GFP-Plasmids; <i>MET25</i> -Promotor, CYC1-Terminator, GFP-Sequenz
p424MET25	Mumberg <i>et al.,</i> 1994	Ausgangsvektor für die Konstruktion des p424MET25-GFP; <i>MET25</i> -Promotor, <i>CYC1</i> -Terminator; <i>TRP1</i> -Marker
p423HXT7-6HIS	J. Becker, Düsseldorf	2µ Plasmid zur Herstellung von Fusions- proteinen mit 6xHis-Epitop; <i>HIS3</i> -Selektions- marker, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pSH47	Güldener <i>et al.</i> , 1996	Cre-Rekombinase hinter dem <i>GAL1-</i> Promotor der Hefe; <i>URA3</i> -Marker
pUG6	Güldener <i>et al.</i> , 1996	DNA-Vorlage für die Amplifizierung von DNA- Fragmenten zur Deletion von Genen mit dem kanMX-Selektionsmarker
pUG6-HA	Makuc <i>et al.,</i> 2001	DNA-Vorlage für die Amplifizierung von DNA- Fragmenten zur genomischen HA-Tag- Konstruktion mit dem <i>kanMX</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>kanMX</i> -Selektionsmarker
pJJH726	Güldener <i>et al</i> ., 2002	DNA-Vorlage für die Amplifizierung von DNA- Fragmenten zur Deletion von Genen mit dem <i>URA3</i> -Selektionsmarker
pFA6a-HIS3MX	Güldener <i>et al</i> ., 2002	DNA-Vorlage für die Amplifizierung von DNA- Fragmenten zur Deletion von Genen mit dem <i>HIS3</i> -Selektionsmarker
pNub-WT-ALG5	Stagljar <i>et al.,</i> 1998	Klonierungsvektor für die Fusion von Proteinen mit der N-terminalen Sequenz des Wildtyp-Ubiquitins; <i>TRP1</i> -Marker; <i>CUP1</i> - Promotor
pNub-G-ALG5	Stagljar <i>et al.,</i> 1998	Klonierungsvektor für die Fusion von Proteinen mit der N-terminalen Sequenz des Ubiquitins <sup>113G</sup> ; <i>TRP1</i> -Marker; <i>CUP1</i> -Promotor
YCpGLUT4-Cub-PLV	S. Dlugai, Düsseldorf	Klonierungsvektor für die Fusion von Proteinen mit der C-terminalen Sequenz des Ubiquitins, ProteinA, LexA und VP16; <i>LEU2</i> - Marker; verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor
pCI-neo-CD147	Kirk <i>et al.,</i> 2000	pCIneo-Vektor mit CD147-Sequenz
pSPORTrMCT1	S. Bröer, Tübingen	Klonierungsvektor mit MCT1-Sequenz
pBSrMCT2	S. Bröer, Tübingen	Expressionsvektor mit MCT2-Sequenz
pCPLV	S. te Heesen, Zürich	Plasmid für die konstitutive Expression des Cub-PLV; <i>LEU2</i> -Marker

#### Tab. 5: im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pMET25-GFP	2µ-Expressionsvektor zur Fusion von Proteinen mit GFP; URA3- Marker, MET25-Promotor, CYC1-Terminator
p424MET25-GFP	2µ-Expressionsvektor zur Fusion von Proteinen mit GFP; <i>TRP1</i> - Marker, <i>MET25</i> -Promotor, CYC1-Terminator
pM25-MCH1-GFP	C-terminale Fusion von MCH1 mit GFP in pMET25-GFP
pM25-MCH2-GFP	C-terminale Fusion von MCH2 mit GFP in pMET25-GFP
pM25-MCH3-GFP	C-terminale Fusion von MCH3 mit GFP in pMET25-GFP
pM25-MCH4-GFP	C-terminale Fusion von MCH4 mit GFP in pMET25-GFP

pM25-MCH5-GFP	C-terminale Fusion von MCH5 mit GFP in pMET25-GFP
pHXT7-6HIS-MCH4	N-terminale Fusion von MCH4 mit HIS-Tag in p423HXT7-6HIS
pHXT7-MCH4	Klonierung von <i>MCH4</i> in p423HXT7-6HIS unter Aussparung des $\mathrm{His}_{6^{-}}$ Epitops
pHXT7-rMCT1	Klonierung von MCT1 in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des $\mathrm{His}_{\mathrm{6}}\text{-}$ Epitops
pHXT7-rMCT2	Klonierung von MCT2 in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des $\mathrm{His}_{\mathrm{6}}\text{-}$ Epitops
p423HXT7-CD147	Klonierung von CD147 in p423HXT7-6HIS unter Aussparung des ${\rm His}_{\rm 6}\text{-}$ Epitops
p424MET25-CD147-GFP	C-terminale Fusion von CD147 mit GFP in p424MET25-GFP
p426MET25-rMCT1-GFP	C-terminale Fusion von MCT1 mit GFP in pMET25-GFP
YCpCD147-Cub-PLV	C-terminale Fusion von CD147 mit C-Terminus des Ubiquitin (Cub) fusioniert an ProteinA, LexA und VP16; verkürzter <i>HXT</i> 7-Promotor
pNub- <i>WT</i> -rMCT1	N-terminale Fusion von MCT1 mit N-Terminus des Wildtyp-Ubiquitins (Nub <i>WT</i> ); <i>CUP1</i> -Promotor
pNub-G-rMCT1	N-terminale Fusion von MCT1 mit N-Terminus des Ubiquitins <sup><math>I13G</math></sup> (Nub <i>G</i> ); <i>CUP1</i> -Promotor
pNub- <i>WT</i> -rMCT2	N-terminale Fusion von MCT2 mit N-Terminus des Wildtyp-Ubiquitins (Nub <i>WT</i> ); <i>CUP1</i> -Promotor
pNub-G-rMCT2	N-terminale Fusion von MCT2 mit N-Terminus des Ubiquitins <sup><math>I13G</math></sup> (Nub <i>G</i> ); <i>CUP1</i> -Promotor
pC33-ALD7	ALD7-Gen hinter seinem endogenen Promotor in YCplac33

# 2.3 Synthetische Oligonukleotide

Oligo	Sequenz (5' $\rightarrow$ 3')	Beschreibung
METGFP1	GGAATTCGCGGCCGCTCTAGAGTAT GGATGGGGGGTAATA	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung von p426MET25-GFP-ORF1 zur Konstruktion von pMET25-GFP
METGFP2	GGAATTCGCGGCCGCTGGTGCTGG TATGAGTAAAGGAGAAGAACTTTT	Abwärtsprimer für die Amplifizierung von p426MET25-GFP-ORF1 zur Konstruktion von pMET25-GFP

 Tab. 6: im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

S1-LMCH1	AGTCCTCTATCAAAGCTGGAGCACT ACCTTTCATACCATAC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung <i>der loxP- kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>MCH1</i>	
S22-MCH1	ATAAGCTATGAATTTTAAAAAAAATA AATGTAGCAGTTTCTTTTTTGTGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zu S1-LMCH1	
a4-MCH1	GTATTGGAACGGTAAAGATCA	Abwärtsprimer zum Nachweis der MCH1- Deletion	
RGFPMCH1	AACAAGAATTGGGACAACTCCAGTG AAAAGTTCTTCTCCTTTACTCATATT CCTGAGTTTTCTACTTTTTAA	Abwärtsprimer zur Konstruktion der <i>MCH1</i> -GFP-Fusion in pMET25-GFP	
S1-LMCH2	ATGTCCGAAGAACGGCATGAACATC ATCATAGGGATGTTGAAAATAAATTC GTACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung <i>der loxP- kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>MCH2</i>	
S22-MCH2	GACTCTCCTAGGTAATTGTTTATAAC GAAAAAGACATTTACTCATATHGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zu S1-LMCH2	
a4-MCH2	GAATGACAAACGCGTAAATCCGC	Abwärtsprimer zum Nachweis der MCH2- Deletion	
RGFPMCH2	GACAACTCCAGTGAAAAGTTCTTCT CCTTTACTCATACCAGCACCAGCGA CTCTCCTAGGTAATTGTTTATAACG	Abwärtsprimer zur Konstruktion der <i>MCH2</i> -GFP-Fusion in pMET25-GFP	
S1-LMCH3	ATGTCAACGCACTCAAACGACTACT TTTCTGCTTCTTCCGGAATGGTCTTC GTACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung <i>der loxP- kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>MCH3</i>	
S12-MCH3	GGTCCGGGCATTAAAAAATACTTCC TAAGAATGGTATATCCAATGAAGGT CGCCGGTGCTGGATCCGGT	Aufwärtsprimer zur Konstruktion des genomischen <i>MCH3</i> -HA-Epitops	
S22-MCH3	GCGACGTAACTATCGCGTATATAAC ATGAATCAGGTCGTCGAAAAGAAGC ATAGGCCACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zu S1-LMCH3	
a4-MCH3	GTAATGGTAGCAAATGATTTACAG	Abwärtsprimer zum Nachweis der MCH3- Deletion	
RGFPMCH3	GACAACTCCAGTGAAAAGTTCTTCT CCTTTACTCATACCAGCACCAGCGA CCTTCATTGGATATACCATTC	Abwärtsprimer zur Konstruktion der <i>MCH3</i> - GFP-Fusion in pMET25-GFP	
S1-LMCH4	ATGTTGAACATTCCCATAATTGCTAA CTCCAAGAGGTTCCTGTTCTCATTC GTACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung <i>der loxP- kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>MCH4</i>	
S12-MCH4	TGTTATATAATATCAAGGCATATTTG CGTTGGTGCGAAGCTTTGTAAGTTT GCCGGTGCTGGATCCGGT	Aufwärtsprimer zur Konstruktion des genomischen <i>MCH4</i> -HA-Epitops	
S22-MCH4	ACGAAATACCCCCCCCCCCCTAT TGGAACGCTTCTGAACGCTGACCGC ATAGGCCACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zu S1-LMCH4	

a4-MCH4	CCACTGTAATCTCCAGCAAGA	Abwärtsprimer zum Nachweis der <i>MCH4</i> -Deletion	
RGFPMCH4	GACAACTCCAGTGAAAAGTTCTTCT CCTTTACTCATACCAGCACCAGCAA ACTTACAAAGCTTCGCACC	Abwärtsprimer zur Konstruktion der <i>MCH4-</i> GFP-Fusion in pMET25-GFP	
ph426-m4	CATCACCATCACCATCACTTGAACA TTCCCATAAT	Aufwärtsprimer zur Konstruktion des <i>MCH4-</i> His <sub>6</sub> -Epitops in p426HXT7-6HIS	
p426-m4	ТААТТТТААТСААААААТGTTGAACA ТТСССАТАА	Aufwärtsprimer zur Klonierung von <i>MCH4</i> hinter den verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His <sub>6</sub> - Epitops	
S1-LMCH5	ATGAGCTCAGACAGTTTAACGCCTA AAGACACTATAGTTCCAGAAGAATT CGTACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung <i>der loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>MCH5</i>	
S22-MCH5	ATATTATTGCATTACTTTTTTGAAGA TCTATAAAGGGCACTGTCTTACGCA TAGGCCACTGATGGATCTG	Abwärtsprimer zu S1-LMCH5	
a4-MCH5	TAAATAGTCTATCTACACATTTCC	Abwärtsprimer zum Nachweis der MCH5- Deletion	
RGFPMCH5	AACAAGAATTGGGACAACTCCAGTG AAAAGTTCTTCTTCTTTACTCATAAA TCTGACCCACTTGAAGCC	Abwärtsprimer zur Konstruktion der <i>MCH5</i> -GFP-Fusion in pMET25-GFP	
S1-LJEN1	ATGTCGTCGTCAATTACAGATGAGA AAATATCTGGTGAACAGCAACAATT CGTACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung <i>der loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>JEN1</i>	
S22-JEN1	TGAAATGCAGTTACATAGAGAAGCG AACACGCCCTAGAGAGCAATGAAGC ATAGGCCACTAGTGAATCTG	Abwärtsprimer zu S1-LJEN1	
a1-JEN1	CACGCTGAAGCGGCAGCAAGC	Aufwärtsprimer zum Nachweis der <i>JEN1-</i> Deletion	
a4-JEN1	CCAAATGGGCCGCAGCTGTGAAGC	Abwärtsprimer zum Nachweis der <i>JEN1</i> - Deletion	
S1-LACC	ATGTCTTCAGACACTTCATTATCAGA ATCTTCATTA	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung <i>der loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>CRC1</i>	
S22-ACC	CCAAAAGAAATGCCAGAAAAAAATG GGAGGCAGGTC	Abwärtsprimer zu S1-LACC	
a1-ACC	CCTTGTGGCTACACGCTTAATGTC	Aufwärtsprimer zum Nachweis der <i>CRC1</i> - Deletion	
a4-ACC	AAGTTGCCAAAGCCTGCTGGTTGG	Abwärtsprimer zum Nachweis der <i>CRC1</i> - Deletion	
S1-008c	ATGGTTGACGACTCAAACTATCTTA CACCACATGAAACTGCATTAGCGTT CGTACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung <i>der loxP- kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>YHL008c</i>	
S22-008c	TGATTTATTTTTTTTTTTGTTTTCGTTGA TATCGCGGGCATCTTAACTCTTCGC ATAGGCCACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zu S1-L008c	
a1-008c	AGCAGGGTACACCTTATTATCGAC	Aufwärtsprimer zum Nachweis der YHL008c- Deletion	

a4-008c	ACCTGATGGAATGAGAAATAGGTC	Abwärtsprimer zum Nachweis der YHL 008c- Deletion	
S1-LALD7	ATGTTCAGTAGATCTACGCTCTGCT TAAAGACGTCTGCATCCTCCATTTTC GTACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung <i>der loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>ALD7</i>	
S22-ALD7	AATTTTATGTATGTAAGCATCGATTG GACACCAGGCTTATTGATGACCGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zu S1-LALD7	
a1-ALD7	TGTAGGTAAGCAGAATGAGGAG	Aufwärtsprimer zum Nachweis der ALD7- Deletion	
a4-ALD7	GCTATGTTTGACCAAGGTGATG	Abwärtsprimer zum Nachweis der ALD7- Deletion	
RMCT1-F7	TTAATTTTAATCAAAAAATGCCACCT GCGATTGGC	Aufwärtsprimer zur Amplifikation von MCT1 von pSPORTrMCT1 und Klonierung in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His <sub>6</sub> - Epitops	
RMCT1-R	CCCCGGGAATTGCCATGTCAGACTG GGCGCTCCTC	Abwärtsprimer zu RMCT1-F7	
RMCT2-F7	TTAATTTTAATCAAAAAATGCCATCA GAGTCTTCA	Aufwärtsprimer zur Amplifikation von MCT2 von pBSrMCT2 und Klonierung in p426HXT7- 6HIS unter Aussparung der His <sub>6</sub> -Epitops	
RMCT2-R	CCCGGGAATTGCCATGTTAAATACT ACTTTCTTTG	Abwärtsprimer zu RMCT2-F7	
CD147-F7	TTAATTTTAATCAAAAAATGGCGGCG GCGCTGCTG	Aufwärtsprimer zur Amplifikation von CD147 von pCIneo-CD147 und Klonierung in p423HXT7-6HIS unter Aussparung der His <sub>6</sub> - Epitops	
CD147-R	CCCCGGGAATTGCCATGTCAGGTG GCGTTCCTCTG	Abwärtsprimer zu CD147-F7	
FgfprM1	TCAGATACATAGATACAATTCTATTA CCCCCATCCATACATGCCACCTGCG ATTGGC	Aufwärtsprimer zur Konstruktion der MCT1- GFP-Fusion in pMET25-GFP	
RgfprM1	AGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCA TACCAGCACCAGCGACTGGGCTCTC CTCCTC	Abwärtsprimer zu FgfprM1	
FgfpCD	TCAGATACATAGATACAATTCTATTA CCCCCATCCATACATGGCGGCGGC GCTGCTG	Aufwärtsprimer zur Konstruktion der CD147- GFP-Fusion in p424MET25-GFP	
RgfpCD	AGTGAAAAGTTCTTCTCCTTTACTCA TACCAGCACCAGCGGTGGCGTTCCT CTGGCG	Abwärtsprimer zu FgfprM1	
S1-dl198	ATGCCTCATACCGATAAGAAACAAT CAGGATTAGCTCGTCTTTTGTTCGT ACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung <i>der loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>YDL198c</i>	

S2-dl198

a1-dl198

a4-dl198

S1-er053

S2-er053

a1-er053

a4-er053

S1-or222

S2-or222

a1-or222

a4-or222

S1-pl134

TTTGCTCAACAGTTTATCGAATCTAG GTATCAAAGATTGAGCTAAGCATAG GCCACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zu S1-dl198
GGCGGATTCAAAGCATTGTTC	Aufwärtsprimer zum Nachweis der <i>YDL198c</i> - Deletion
ATAGTAACAGGTTCCTCTGTAG	Abwärtsprimer zum Nachweis der YDL198c- Deletion
ATGGAGTCCAATAAACAACCACGTA AAATCCAATTATATACGAAATTCGTA CGCTGCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung <i>der loxP- kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion YER053c
ACCGGTGGTTGGTAAGCCTACATAA GCCTTGAACGAATCGTAAATGCATA GGCAACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zu S1-er053
AACATCGTACCATTACCCTCTC	Aufwärtsprimer zum Nachweis der YER053c- Deletion
GCAAGTTTGGGCATGCATCGAG	Abwärtsprimer zum Nachweis der YER053c- Deletion
ATGTCATCAGACTCAAACGCAAAGC CATTGCCTTTTATATATCAGTTCGTA CGCTGCAGGTGCAC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung <i>der loxP- kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von YOR222w
GTGTCCGTACTTCAGATCCCTGAAA AAGTTCATCATACCGGTAAAGCATA GGCCACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zu S1-or222
TAACACAAGGCGATGCTAACG	Aufwärtsprimer zum Nachweis der YOR222w- Deletion
CAACTCCGGGTAATGGAGATGG	Abwärtsprimer zum Nachweis der YOR222w- Deletion
ATGACATCTATAGATAATAGACCTTT GCCGTTCATATACCAGTTCTTCGTA CGCTGCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung <i>der loxP- kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von YPL134c
TTGTTTTTTACCATACTTGACTTCTC	Abwärtsprimer zu S1-pl134

- S2-pl13431TTGTTTTTTACCATACTTGACTTCTC<br/>TGAAAAAATCCATGACGTTGCATAG<br/>GCCACTAGTGGATCTGAbwärtsprimer zu S1-pl134a1-pl134AATACGGGTCCATAGCGTTTG<br/>AATACGGGTCCATAGCGTTTGAufwärtsprimer zum Nachweis der YPL134c-<br/>Deletiona4-pl134GTTTTACCTCACCTGGTACTAC<br/>DeletionAbwärtsprimer zum Nachweis der YPL134c-<br/>Deletion
- S1-SEF1ATGGTGAAGGATAATCGAGATTCTG<br/>ACCAAGACCAAGACCAAGATTTTAGTTCTTC<br/>GTACGCTGCAGGTCGACAufwärtsprimer für die Amplifizierung der loxP-<br/>kanMX-loxP-Deletionskassette zur Deletion<br/>von SEF1S22-SEF1TCGTTGTTCTATGATATCAACTTTGG<br/>AACAACTCAGAGGTGGATATCCGCAAbwärtsprimer zu S1-SEF1

TAGGCCCATAGTGGATCTG

a1-SEF1	ACCTACCCTTCCACCGTCGGA	Aufwärtsprimer zum Nachweis der SEF1- Deletion	
a4-SEF1	GTTCCATGTTCATATCGAACC	Abwärtsprimer zum Nachweis der SEF1- Deletion	
S1-STL1	ATGAAGGATTTAAAATTAACGAATTT CAAAGGCAAATTTATAAGCAGA	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung <i>der loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>STL1</i>	
S2-STL1	ACCCTCAAAATTTGCTTTATCGTTCA CTGTATCTTCATTTTTGATGTT	Abwärtsprimer zu S1-STL1	
a12-STL1	GGACTAGTGTTCTAGCATACAAGT	Aufwärtsprimer zum Nachweis der STL1- Deletion	
a42-STL1	ATTAAGACTACGGAGTCGGGCT	Abwärtsprimer zum Nachweis der STL1- Deletion	
S1-ERG4	ATGGCAAAGGATAATAGTGAGAAGC TGCAGGTGCAGGGAGAGTTCGTAC GCTGCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung <i>der loxP- kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>ERG4</i>	
S2-ERG4	CTAGAAAACATAAGGAATAAAGACG TAAGGGCAATGTTTACAGCATAGGC CACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zu S1-ERG4	
a1-ERG4	GCAAGTGATGTTCAAATTGTC	Aufwärtsprimer zum Nachweis der <i>ERG4</i> - Deletion	
a4-ERG4	CATTTACAAAACTGACCC	Abwärtsprimer zum Nachweis der <i>ERG4</i> - Deletion	
K3-ERG4	ACCTCCAATGGATCGTACCTA	Aufwärtsprimer, der im ERG4-ORF bindet	
FNubM1	TCAAGACAAGGAAGGGATCCCTGGT GGGTCGACCATGATGCCACCTGCG ATTGGCGGGCCA	Aufwärtsprimer zur Konstruktion der MCT1- Nub <i>WT/G</i> -Fusion	
RNubM1	AATAATAATGATAATAATAACATAAA AATAATTACTTCAGACTGGGTCCTC CTCCT	Abwärtsprimer zur Konstruktion der MCT1- Nub <i>WT/G</i> -Fusion	
FNubM2	TCAAGACAAGGAAGGGATCCCTGGT GGGTCGACCATGATGCCATCAGAGT CTTCAGTAAAG	Aufwärtsprimer zur Konstruktion der MCT2- NubWT/G-Fusion	
RNubM2	ААТААТААТGАТААТААТААСАТААА ААТААТТАСТТТАААТАСТАСТТСТТ ТGTCCCT	Abwärtsprimer zur Konstruktion der MCT2- Nub <i>WT/G</i> -Fusion	
FCubCD	ACAAAAACAAAAAGTTTTTTTAATTT TAATCAAAAAATGGCGGCGGCGCGCTG CTGCT	Aufwärtsprimer zur Konstruktion der CD147- Cub-Fusion	
RCubCD	TGGAGGGATCCCCCCCGACATGGT CGACCCCTCGACGGTGGCGTTCCT CTGGCGCACATT	Abwärtsprimer zur Konstruktion der CD147- Cub-Fusion	

SEQrM131	GGCAGCCGTCCAGTAATG	Sequenzierprimer für MCT1
SEQrM261	CACGACATTTCCAGACAG	Sequenzierprimer für MCT2
pHXT7seq	CTTTTCTAAGAACAAAGA	Aufwärtssequenzierprimer für CD147, bindet im <i>HXT7</i> -Promotor
seqcyc1	GGCGTGAATGTAAGCGTGAC	Abwärtssequenzierprimer für CD147, bindet im CYC1-Terminator
seqCub1	ACTGTAACGAATTCGATATCA	Sequenzierprimer für CUP1-Promotor
seqMCT1	TGTCATGTATGCCGGAGGTCCT	Aufwärtssequenzierprimer für MCT1
rseqM1	ACCAAGCCCACAGCACTGGAGA	Abwärtssequenzierprimer für MCT1
seqMCT2	ATCCTCCATTATGCTGGCTGT	Aufwärtssequenzierprimer für MCT2
rseqM2	ACTGGGCAACACTCCACGATA	Abwärtssequenzierprimer für MCT2
rseqNub	TGGCTGCAGGAATTCGATATCA	Abwärtssequenzierprimer für Nub-Sequenz
FC33-ALD	CCATGATTACGCCAAGCTTGCATGC CTGCAGCTGGCCTCTGCCAGCAGC AATG	Aufwärtsprimer zur Amplifikation von <i>ALD7</i> aus dem Genom und Klonierung in YCplac33
RC33-ALD	CGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCG GTACCCCGGTAAGGTCTTGCCATCT TTG	Abwärtsprimer zu FC33-ALD
K2 kanMX	TTGTCGCACCTGATTGCCCG	Abwärtsprimer zum Nachweis der <i>kanMX</i> - Integration
K3-kanMX	TATGGAACTGCCTCGGTGAG	Aufwärtsprimer zum Nachweis der <i>kanMX</i> -Integration
T1-ORF	GTAATACAGGGTCGTCAGATGCATA GATACAATTCTATTACCCCCATCCAT ACGGAATTCCAGATGACCACC	Aufwärtsprimer für die Klonierung von DNA- Fragmenten hinter den <i>MET25</i> -Promotor
T2-ORF	GGGGGAGGGCGTGAATGTAAGCGT GACATAACTAATTACATGACTCGAG GATCCCCGGGAATTGCCATG	Abwärtsprimer für die Klonierung von DNA- Fragmenten vor den CYC1-Terminator
T71-ORF	АСАААGAATAAACACAAAAACAAAA AGTTTTTTTAATTTTAATCAAAAA	Aufwärtsprimer für die Klonierung von DNA- Fragmenten hinter den <i>HXT7</i> -Promotor

Außerdem wurden forward und reverse GENEPAIRS Primer verwendet, die homolog zum jeweiligen Anfang bzw. Ende der *MCH-Gen*e waren und von der Firma Research Genetics bezogen wurden.

# 2.4 Genbank

Es wurde eine *S. cerevisiae* DNA-Bank mit chromosomalen Fragmenten des Stammes EBY.VW5000 (Wieczorke *et.al.*, 1999) im 2µ-Vektor YEplac195 (Tab. 4) verwendet (T. Hamacher, Düsseldorf).

# 2.5 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Quelle
anti-HA	Monoklonaler Antikörper aus Ratte gegen ein Epitop des Hämagglutinins des humanen Influenzavirus	Roche
anti-HIS <sub>6</sub>	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen sechs Histidinreste	Roche
anti-MCH4	Polyklonales Antiserum aus Kaninchen gegen die Aminosäuren 66-80 des Mch4-Proteins	Dianova
anti-MCT1	Polyklonaler Antikörper gegen 15 Aminosäuren des C-Terminus vom Ratten MCT1	Chemicon
anti-ALP1	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen die alk. Phosphatase aus Hefe	Molecular Probes
anti-DPM1	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen die cytosolische Domäne der Dolicholphosphat- Mannose-Synthase aus Hefe	Molecular Probes
anti-PEP12	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen den N- Terminus der cytosolischen Domäne von Pep12 aus Hefe	Molecular Probes
anti-PMA1	Polyklonaler Antikörper gegen die H <sup>+</sup> -ATPase	R. Kölling, Düsseldorf
anti-Kaninchen IgG (H+L) POD-Konjugat	Sekundär-Antikörper gegen Kaninchenantikörper gekoppelt an Peroxidase	Dianova
Anti-Ratte IgG POD- Konjugat	Sekundär-Antikörper gegen Rattenantikörper gekoppelt an Peroxidase	Roche
anti-Huhn	Sekundär-Antikörper gegen Huhnantikörper gekoppelt an Peroxidase	Dianova
anti-Maus	Sekundär-Antikörper gegen Mausantikörper gekoppelt an Peroxidase	Roche

# 2.6 Chemikalien, Material und Enzyme

Acros Organics	Galaktose, Harnstoff, KAc, Lysin, NaAc		
Amersham	L-[U- <sup>14</sup> C]-Lactat,		
Braun-Melsungen	Glasperlen 0,45 mm $\varnothing$		
Caesar & Loretz	Glukose		
Calbiochem	G418/Geneticin		
Difco	Bacto Agar, Hefe-Extrakt, Pepton, Trypton, YNB		
Fluka	Glycin		
GibcoBRL	Agarose, T4-Ligase		
Janssen Chimica	DMSO, Ethylenglykol		
J.T. Baker	KAc, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MgCl <sub>2</sub> , NaCl, NaOH, PEG4000, Glycerin		
Kodak	Röntgenfilme		
MBI	Lambda-DNA		
Merck Adenin, EDTA, Leucin, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> , TEMED, Ura			
Millipore	Immobilon-N PVDF-Membran		
MWG Biotech Synthetische Oligonukleotide			
NEN Life Science	[1,2 <sup>14</sup> C]-Acetat, [2 <sup>14</sup> C]-Pyruvat		
New England Biolabs Restriktionsendonukleasen, BSA			
Oxoid Agar, Bacteriological Peptone, Hefe-Extrakt			
PCR Inc. Florida	5-FOA		
Pharmacia	dNTP-Mix		
Pierce SuperSignal ULTRA chemiluminescent substrate			
Qiagen	QIAquick PCR Purification Kit, Plasmid Mini Kit, Qiaex II Gel Extraction Kit		
Riedel-deHaën	Essigsäure, Ethanol, NaN <sub>3</sub> , MeOH, Lactat		
Roche	AP, Expand High Fidelity PCR System, Lebensmittelanalytik-Kit "Acetat",		
	"Lactat", Protease Inhibitoren "Complete", Restriktionsendonukleasen, Lactat-		
	Dehydrogenase		
Roth	DTT, Gel30 Acrylamid, Isopropanol, KCI, PEG 1000 und 3350, ß-Merkapto-		
	ethanol, Ampicillin		
Seikagaku Kogyo Co.Ltd.	Zymolyase		
Serva	APS, BSA, Bicin, CaCl, Glyzerin, SDS, Tween20, X-Gal		
Sigma	Amp, EtBr, HMW, LiAc, Nal, ONPG, PMSF, PonceauS, Sorbit, TCA, Tris,		
	Pyruvat, Ethylmethansulfonat		
Sigma ARK	Synthetische Oligonukleotide		
Whatman	GF/C Glas-Fiber-Filter		
Zinnsser Analytik	Szintillationslösung "Quicksafe A"		

# 2.7 Transformationen

## 2.7.1 Transformation von E. coli

Die Transformation der *E. coli* Zellen erfolgte durch die Elektroporationsmethode nach Dower *et al.* (1988) und Wirth (1989) mittles eines GENE-PULSER-Geräts von der Firma BIORAD (München).

## 2.7.2 Transformation von S. cerevisiae

Die Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA bzw. DNA-Fragmenten erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode von Gietz und Woods (1994). Alternativ

wurden die Zellen nach der Methode von Klebe *et al.* (1983), modifiziert nach Dohmen *et al.* (1989), transformiert.

# 2.8 Präparation von DNA

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979), modifiziert nach Maniatis *et al.* (1982). Hochreine Plasmid-DNA für Sequenzierungen und Klonierungen wurde mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit nach Angaben des Herstellers isoliert.

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

Die Zellen einer stationären Hefekultur (5ml) wurden nach dem Ernten durch Zentrifugation in 400  $\mu$ l Puffer P1 (Plasmid Mini Kit, Qiagen) resuspendiert. Anschließend erfolgte nach Zugabe von 400  $\mu$ l Puffer 2 und 2/3 Volumen Glasperlen (Ø0,45 mm) der Zellaufschluß durch fünfminütiges Schütteln auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax VXR). 0,5 ml des Überstands wurden mit 0,25 ml Puffer 3 versetzt, gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 15 min bei 10000 rpm wurde durch Zugabe von 0,75 ml Isopropanol zum Überstand die Plasmid-DNA bei Raumtemperatur gefällt. Die durch Zentrifugation für 30 min bei 13000 rpm pelletierte DNA wurde mit 70% igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20  $\mu$ l Wasser resuspendiert. 2  $\mu$ l der DNA wurden für die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

# 2.9 Enzymatische Modifikation von DNA

## 2.9.1 DNA-Restriktion

Die sequenzspezifische Spaltung der DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen unter den vom Hersteller empfohlenen Inkubationsbedingungen über 2-3 Stunden mit 2-5 U Enzym pro µg DNA.

# 2.9.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung von DNA-Enden erfolgte durch Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase zum Restriktionsansatz und einer einstündigen Inkubation bei 37°C.

## 2.9.3 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte durch Zugabe von 1 U T4-Ligase zu einem Ligationsansatz, bestehend aus Vektor-DNA und 3-5-fachem Überschuß an Fragment-DNA für 16 h bei 16°C (überstehende Enden) oder für 2 h bei Raumtemperatur (glatte Enden).

# 2.10 PCR-Amplifikation von DNA

Bei der Polymerasekettenreaktion wurde als Synthesevorlage entweder 1-10 ng DNA oder ein bis zwei Hefekolonien (ca. 3µl) verwendet. Letztere wurden mit einem sterilen Zahnstocher von einer Agarplatte abgenommen und in einem Reaktionsgefäß für 1 min 30 s in der Mikrowelle erhitzt. Das Synthesevolumen betrug 50 µl und enthielt neben der Synthesevorlage noch 0,2 mM dNTP-Mix, 1x Puffer 2 (Expand High Fidelity PCR System, Roche), 2-3 U Polymerase und 100 oder 50 pmol der entsprechenden Oligonukleotide. Die PCR-Reaktion wurde im einem Thermocycler (Techne) durchgeführt und die PCR-Bedingungen nach Bedarf wie folgt gewählt:

1.		4 min, 95°C	Denaturierung der DNA
2. 1	15-35x	30 s/40 s, 95°C	Denaturierung der DNA; 30 s: Plasmid-DNA, 40 s: Hefekolonien
		30 s/ 40 s, 50-56°C	Bindung der Primer an die DNA (Annealing); Temperatur wurde an die Schmelztemperatur der Oligonukleotide angepaßt)
		1-5 min, 72°C/68°C	DNA-Synthese (Elongation); 1 min pro 1 kb zu amplifizierender DNA; Produkte < 3 kb: 72°C Produkte > 3 kb: 68°C
3.		5 min, 72°C/68°C	Verlängerung der synthetisierten DNA

Nach dem ersten Schritt wurde die Polymerase hinzugegeben ("hot start PCR"). Die Reaktionsprodukte wurden durch Agarosegelelektrophorese überprüft und bei Bedarf aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte entweder durch Isolierung aus einem Agarosegel (2.12) oder mittels Verwendung des Qiaquick PCR Purification Kit nach Angaben des Herstellers.
## 2.11 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 0,2-20 kb erfolgte in 0,6-1,2% Agarosegelen mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1x TAE Puffer (40mM Tris, 40mM Essigsäure, 2mM EDTA) verwendet (Maniatis *et al.* 1982), als Größenstandard eine mit *EcoRI*-und *Hind*III-geschnittene Lambda-Phagen-DNA. Nach der Auftrennung wurden die Nukleinsäuren durch UV-Bestrahlung (254nm) sichtbar gemacht.

# 2.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde bei langwelligem Licht (366nm) aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem "QIAEX II Gel Extraction Kit" (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isloiert.

## 2.13 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA wurde spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm (Maniatis *et al.*, 1982) bestimmt, die Reinheit der DNA durch den Quotient  $E_{260}/E_{280}$ . Liegt der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  einer gereinigten Probe bei ca. 1,8, so entspricht die Extinktion  $E_{260}$  = 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

# 2.14 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) oder von der Firma Scientific Research & Development GmbH (Oberursel) durchgeführt.

#### 2.15 Gendeletion in S. cerevisiae

#### 2.15.1 Gendeletion mittels *loxP*/Cre-Rekombinasesystem

Die Deletion von Genen wurde sowohl unter der Verwendung des *loxP::kanMX::loxP*/Cre-Rekombinase-Systems (Güldener *et al.* 1996) als auch unter der Verwendung des *loxP::KIURA3::loxP*/Cre-Rekombinase-Systems durchgeführt (Güldener *et al.*, 2002). In beiden Systeme wurde die Fähigkeit der Hefe zur homologen Rekombination ausgenutzt, wobei durch homologe Integration der jeweilgen Deletionskassette (*loxP::kanMX::loxP* bzw.

*loxP::KIURR3::loxP*) die gleichzeitige Deletion des gewünschten Gens erreicht wurde.

Zuerst wurde in einer PCR-Reaktion (2.10) die jeweilige Deletionskassette aus dem Plasmid pUG6 bzw. pJJH726 mit den Oligonukleotiden S1 und S22 amplifiziert. Die Oligonukleotide S1 enthalten an den 5'-Enden 48 Nukleotide, die identisch sind zu den ersten 48 Nukleotide des jeweiligen ORFs. An den 3'-Enden enthalten die Oligonukleotide 20-22 Nukleotide, die identisch sind zur flankierenden Sequenz am 5'-Ende der loxP::kanMX-Deletionskassette. Die Oligonukleotide S22 enthalten an den 5'-Enden 48 Nukleotide, die zur flankierenden Sequenz des 3'-Endes des ORFs homolog sind, während sie am 3'-Ende 20-22 Nukleotide enthalten, die zur flankierenden Seguenz des 3'-Endes der loxP::kanMX-Deletionskassette identisch sind. Alternativ wurden Gene mit einer *lacZ::kanMX*-Reporterkassette deletiert, wodurch gleichzeitig eine PromotorlacZ-Fusion im Locus des betreffenden Gens erzeugt wurde (Boles et al., 1998). Nach Transformation der PCR-Produkte (2.7.2) in die Hefe erfolgte die Selektion auf G418-haltigem Vollmedium nach Geneticin-resistenten Transformanten bzw. auf synthetischem Minimalmedium ohne Uracil nach Uracil-prototrophen Transformanten. Die ersten 48 bp des Gens blieben aufgrund der Wahl der Oligonukleotide erhalten, die Stopcodons wurden mit deletiert. Die Deletion wurde durch PCR-Reaktion mit ganzen Zellen (2.10) unter Verwendung der Oligonukleotide a1/a4, a1/K2kanMX oder K3kanMX/a4 verifiziert.

Das *kanMX*-Markergen wurde nach Exzision durch das Cre-Rekombinase-System wiederverwendet. Hierfür wurde das Plasmid pSH47, welches das Enzym Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des induzierbaren *Gal1*-Promotors enthält, in die Hefezellen transformiert. Nach 2-tägiger Inkubation auf galaktosehaltigem Medium wurden die Kolonien auf G418-haltiges Medium replikaplattiert und G418-sensitive Kolonien isoliert. Die Exzision des *kanMX*-Gens durch homologe Rekombination der *loxP*-Bereiche aufgrund der Expression der Cre-Rekombinase wurde durch PCR-Reaktion mit den Oligonukleotiden a1/a4 überprüft.

#### 2.15.2 Konstruktion des erg4*<sup>Δ</sup>::HIS3*-Deletionsstammes

Die Konstruktion des  $erg4\Delta$ ::HIS3-Deletionsstammes beruhte auf dem gleichen Prinzip wie die Gendeletion mittels *loxP*/Cre-Rekombinasesystem. Hierbei besteht die Deletionskassette jedoch nur aus dem Markergen *HIS3*, die das Markergen flankierenden *loxP*-Sequenzen fehlen. Die Deletionskassette wurde vom Plasmid pFA6a-HIS3MX mit den Oligonukleotiden S1-ERG4 und S2-ERG4 amplifiziert. Das Oligonukleotid S1-ERG4 enthält am 5'-Terminus 42 Nukleotide, die zum Beginn des *ERG4*-ORFs identisch sind. 3'-terminal besitzt es 20 Nukleotide, die identisch sind zum flankierenden Bereich des 5'-Endes der Deletionskassette. Das Oligonukleotid S2-ERG4 enthält 5'-terminal 42 Nukleotide, die identisch sind zum 3'-Terminus des ORFs. 3'-terminal enthält es 22 Nukleotide, die homolog sind zum 3'-flankierenden Bereich der Deletionskassette. Nach Transformation des PCR-Produkts in die Hefe erfolgte die Selektion auf synthetischem Minimalmedium ohne Histidin. Die positiven Transformanten wurden durch eine PCR unter Verwendung der Oligonukleotide a1-ERG4 und a4-ERG4 überprüft.

#### 2.15.3 Gendeletion mittels Deletionsplasmid

Die Deletion des Gens *PYK1* erfolgte durch die klassische Methode der Gendeletion von Rotstein (1993) mit Hilfe eines Deletionsplasmids. Die Exzision des *pyk1* $\Delta$ ::*LEU2*-Konstrukts aus dem Deletionsplasmid pEB55 wurde mittels Restriktion (2.9.1) mit *Bam*HI und *Hind*III durchgeführt. Hierbei wurde ein DNA-Fragment erhalten, welches das *LEU2*-Gen von *S. cerevisiae* besaß und das zusätzlich am 5'-Terminus von der 3'-Region des *PYK1*-Promotors und am 3'-Terminus von der 5'-Regoin des *PYK1*-Terminators flankiert wurde. Nach anschließender Transformation des DNA-Fragments in die Hefe erfolgte die Selektion auf synthetischem Minimalmedium ohne Leucin. Die positiven Transformatien wurden durch erneutes Ausstreichen auf synthetischem Minimalmedium überprüft.

#### 2.16 Klonierung von DNA-Fragmenten durch in vivo-Rekombination

Für eine *in vivo*-Klonierung von DNA-Fragmenten wurde zuerst das entsprechende Gen durch PCR-Reaktion (2.10) amplifiziert. Dafür wurden Oligonukleotide verwendet, die im 5'-Bereich 36-39 Nukleotide enthalten, die homolog zu den Sequenzen des Integrationsbereichs des Zielvektors sind. Im 3'-Bereich enthalten die Oligonukleotide 20-22 Nukleotide, die homolog zum 3'- bzw. 5'-Ende des zu amplifizierenden Gens sind. Das PCR-Produkt wurde zusammen mit dem durch Restriktion (2.9.1) im Integrationsbereich linearisierten und gereinigten Vektor in die Hefe transformiert. Die Zellen wurden auf Selektivmedium ausplattiert, das zur Selektion auf den Auxotrophiemarker des Vektors die entsprechende Aminosäure bzw. Base nicht enthielt. Dadurch wuchsen nur solche Transformanten, die durch homologe Rekombination des DNA-Fragments und des linearisierten Vektors ein stabiles, zirkuläres Plasmid gebildet hatten. Die Plasmide wurden isoliert (2.8.2), in *E. coli* amplifiziert (2.7.1, 2.8.1) und durch anschließende Restriktionsanalyse (2.9.1), in einigen Fällen auch durch Sequenzierung (2.14), überprüft.

# 2.17 Konstruktion von *MCH4*-Überexpressionsplasmiden mit und ohne His<sub>6</sub>-Epitop

Für die Klonierung von MCH4 auf ein Überexpressionsplasmid mit bzw. ohne His<sub>6</sub>-Epitop wurde in einer ersten PCR-Reaktion das Gen mit den Primern ph426m4 bzw. p426-m4 und dem reverse GENEPAIRS Primer für MCH4 amplifiziert. In der sich anschließenden zweiten PCR-Reaktion dienten die DNA-Fragmente der ersten als Synthesevorlage für die Amplifizierung mit den Oligonukleotide ph426m4/T2-ORF bzw. T71-ORF/T2-ORF. Das Oligonukleotid ph426-m4 besitzt 5'terminal sechs mal eine für Histidin kodierende und damit homologe Seguenz zur Histidinsequenz des Plasmids p426HXT7-6HIS. 3'-terminal enthält es identische Bereiche zum 5'-Terminus des MCH4-ORFs unter Aussparung des Startcodons. Das Oligonukleotid p426-m4 weist 3'-terminal einen homologen Bereich zum 5'-Ende des MCH4-ORFs einschließlich des Startcodons auf. 5'-terminal besitzt es homologe Bereiche zum 3'-Ende des Oligonukleotid T71-ORF. Das Oligonukleotid T71-ORF enthält 5'-terminal identische Bereiche zum HXT7-Promotor des Plasmids p426HXT7-6HIS. Der reverse GENEPAIRS Primer von MCH4 besitzt 5'terminal homologe Bereiche zum 3'-Ende des Oligonukleotids T2-ORF. 3'-terminel enthält er einen identischen Bereich zum 3'-Terminus des MCH4-ORFs. T2-ORF enthält 5'-terminal 51 Nukleotide, die identisch sind zum CYC1-Terminator des Plasmids p426HXT7-6HIS. Der amplifizierte *MCH4*-ORF mit homologem Anhang zur sechsfachen Histidin-Segeunz wurde durch in vivo-Rekombination in den linearisierten Vektor p426HXT7-6HIS<sup>Spel/HindIII</sup> kloniert. Der amplifizierte MCH4-ORF mit homologem Anhang zum HXT7-Promotor wurde in den gleichen Vektor kloniert, der jedoch durch Restriktion mit Hpal/HindIII keine sechsfache Histidinkodierende Sequenz besaß. Die erhaltenen Plasmide wurden mit pHXT7-6HIS-MCH4 und pHXT7-MCH4 bezeichnet.

# 2.18 Konstruktion von genomischen HA-Fusionen

Für die Konstruktion von genomisch HA-markierten Genen wurde ein DNA-Fragment vom Plasmid pUG6-HA mit den Oligonukleotiden S12/S22 mittels PCR amplifiziert. Das DNA-Fragment enthielt eine dreifache Ausführung eines Teil der Sequenz des Hämagglutinins (3x HA) und das von *loxP*-Sequenzen flankierte *kanMX*-Markergen. Es wurde in die Hefe transformiert. Durch die Wahl der Oligonukleotide wurde das Stopcodon des *MCH3*- und *MCH4*-ORFs durch die amplifizierte DNA-Kassette im Zuge der homologen Rekombination ersetzt, so daß sich das dreifache HA-Epitop im Leserahmen der ORFs befand. Unter Verwendung des Cre-Rekombinasesystems wurde das *kanMX*-Markergen anschließend wieder aus dem Genom entfernt.

#### 2.19 Konstruktion von GFP-Fusionsproteinen

Für die Herstellung von Fusionen zwischen Proteinen und dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) aus *Aequorea victoria* wurden zunächst zwei Plasmide hergestellt. Das Plasmid pMET25-GFP wurde durch Amplifizierung des Plasmids p426MET25-GFP-ORF1 mit den Oligonukleotiden METGFP1 und METGFP2 und Religation des 6,3 kb *Eco*RI Restriktionsfragments konstruiert. Das Plasmid p424MET25-GFP wurde durch Ligation (2.9.3) des 1,5 kb *Kpnl/Sac*I-Restriktionsfragments von pMET25-GFP und dem 5,5 kb *Kpnl/Sac*I-Restriktonsfragment von p424MET25 konstruiert.

Die ORFs, an die das GFP-Gen fusioniert werden sollte, wurden in einer ersten PCR-Reaktion mit forward GENEPAIRS Primern und den Oligonukleotiden RGFPMCH amplifiziert. Die Oligonukleotide RGFPMCH enthalten 5'-terminal 48 Nukleotide, die identisch sind zur Linkersequenz und dem 5'-Ende der GFP-Sequenz. 3'-terminal besitzen sie 20-22 Nukleotide, die zum 3'-Ende des zu amplifizierenden ORFs (ohne Stopcodon) homolog sind. Die forward GENEPAIRS Primer enthalten 5'-terminal einen Bereich, der identisch ist zum 3'-Terminus von T1-ORF. 3'-terminal besitzen sie einen Bereich, der identisch ist zum 3'-Terminus des jeweiligen ORFs. In einer zweiten PCR-Reaktion wurde das PCR-Produkt der ersten PCR-Reaktion als Synthesevorlage verwendet und mit den Oligonukleotiden RGFPMCH und T1-ORF amplifiziert. T1-ORF enthält am 5'-Ende 53 Base, die identisch sind zum MET25-Promotor des Plasmids pMET25-GFP. Am 3'-Ende enthält T1-ORF 19 Nukleotide, die identisch sind zu den forward GENEPAIRS Primern. Die PCR-Produkte der zweiten PCR bestanden aus einem homologen Bereich zum *MET*25-Promotor, dem *MCH*-Gen und einem homologen Bereich zur linker-Sequenz vor dem GFP-Gen. Sie wurden über *in vivo*-Rekombination in den linearisierten Vektor pMET25-GFP<sup>*EcoRI*</sup> kloniert. Die erhaltenen Plasmide wurden mit pM25-MCHx-GFP bezeichnet.

Bei der Konstruktion der übrigen GFP-Fusionsproteine wurde nur eine PCR-Reaktion durchgeführt. Die dabei verwendeten Oligonukleotide FgfprM1 und FgfpCD enthalten am 5'-Ende 39 Base, die identisch sind zum *MET25*-Promotor des Plasmids pMET25-GFP. Am 3'-Terminus enthalten sie 18 Base, die identisch sind zum Anfang des jeweiligen ORFs. Die Oligonukleotide RgfprM1 und RgfpCD besitzen 5'-terminal 39 Nukleotide, die zur Linkersequenz und dem 5'-Ende der GFP-Sequenz homolog sind. 3'-terminal enthalten sie 18 Nukleotide, die zum 3'-Ende des jeweiligen ORFs (ohne Stopcodon) homolog sind. Für die Konstruktion des MCT1-GFP-Fusionsplasmids wurden die PCR-Produkte über *in vivo*-Rekombination in den linearisierten Vektor pMET25-GFP<sup>EcoRI</sup> kloniert. Für die Konstruktion des CD147-GFP-Fusionsplasmids wurden die PCR-Produkte über *in vivo*-Rekombination in den linearisierten Vektor p424MET25-GFP<sup>Nott</sup> kloniert. Die entstandenen Plasmide wurden p426MET25-rMCT1-GFP bzw. p424MET25-CD147-GFP genannt.

## 2.20 Split-Ubiquitin-System

Es wurde das Split-Ubiquitin-System von Johnsson und Varshavsky (1994) in einer Modifikation nach Stagljar *et al.*, (1998) verwendet.

#### 2.20.1 Konstruktion der Split-Ubiquitin Plasmide

Um die Interaktion von CD147 mit MCT1 bzw. MCT2 zu untersuchen, sollte der Cterminale Teil des Ubiquitins (Cub) an den C-Terminus von CD147 und der Nterminale Teil des Ubiquitins (Nub) an den N-Terminus von MCT1 bzw. MCT2 fusioniert werden. Dafür wurden die Gene auf Cub- bzw. Nub-kodierende Plasmide mittels *in vivo*-Rekombination kloniert.

CD147 wurde mit den Oligonukleotiden FCubCD und RCubCD mittels PCR vom Plasmid p423HXT7-CD147 amplifiziert. Das Oligonukleotid FCubCD enthält am 5'-Terminus 36 Nukleotide, die zum Ende des verkürzten HXT7-Promotors des Plasmids YCpGLUT4-Cub-PLV homolog sind. Am 3'-Terminus enthält es 20 Nukleotide, die identisch sind zum Anfang des ORFs CD147. Das Oligonukleotid RCubCD besitzt 5'-terminal 36 Nukleotide, die zum Anfang der Cub- und der Linkersequenz des Plasmids YCpGLUT4-Cub-PLV homolog sind. 3'-terminal enthält es 24 Nukleotide, die identisch sind zum 3'-Ende des CD147-ORFs (ohne Stopcodon). Durch *in vivo*-Rekombination wurde das resultierende PCR-Fragment in den linearisierten Vektor YCpGLUT4-Cub-PLV nach Exzision von GLUT4 durch Xhol/Pstl-Restriktion kloniert. Das konstruierte Plasmid wurde YCpCD147-Cub-PLV benannt. Zur Konstruktion der MCT-Nub-Fusionsplasmide wurden MCT1 bzw. MCT2 mit den Oligonukleotiden FNubM1/RNubM1 bzw. FNubM2/RNubM2 vom Plasmid pHXT7-rMCT1 bzw. pHXT7-rMCT2 amplifiziert. Die Oligonukleotide FNubM1 und FNubM2 enthalten 5'-terminal 36 Nukleotide, die zum Ende der Nub-Sequenz und der Linkersequenz des Plasmids pNub-WT-ALG5 bzw. pNub-G-ALG5 identisch sind. 3'-terminal enthalten sie 20 Nukleotide, die identisch sind zum 5'-Terminus des jeweiligen ORFs. Die Oligonukleotide RNubM1 und RNubM2 besitzen am 5'-Terminus 36 Nukleotide, die zur Sequenz hinter dem Stopcodon des *ALG5*-Gen des Plasmids pNub-*WT*-ALG5 bzw. pNub-*G*-ALG5 homolog sind. 3'-terminal enthalten sie 20 Nukleotide, die zum 3'-Terminus des jeweiligen ORFs identisch sind. Die entstandenen PCR-Fragmente wurden durch *in vivo*-Rekombination in den linearisierten Vektor pNub-*WT*-ALG5 und pNub-*G*-ALG5 nach Exzision des *ALG5*-Gens durch *Sacl/Bg/*II-Restriktion kloniert. Die resultierenden Plasmide wurden mit pNub-*WT*-MCT1 und pNub-*G*-MCT1 bzw. pNub-*WT*-MCT2 und pNub-*G*-MCT2 bezeichnet.

## 2.21 Herstellung von Proteinextrakten aus S. cerevisiae

Zur Herstellung von Proteinextrakten für Western-Analysen wurden 25-40 OD<sub>600</sub>-Einheiten Zellen einer logarithmisch wachsenden Hefekultur bei 3000 rpm abzentrifugiert und in 10 mM NaN<sub>3</sub>/NaF-Lösung gewaschen. Nach Resuspension der Zellen in 100 µl Lysispuffer (0,3 M Sorbitol, 50 mM MOPS, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,5) mit Proteaseinhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail Tablets) und Zugabe von Glasperlen (Ø0,45 mm) wurden die Zellen 4 min mit einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen. Anschließend wurden 200 µl 2x Probenpuffer (4% SDS, 20% Glyzerin, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 mM DTT, 0,02% Bromphenolblau) zugegeben und der Überstand abgenommen. Unlösliche Zellbestandteile wurden abzentrifugiert und die Proben bei -20°C gelagert.

# 2.22 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Die Auftrennung von Proteinen unter diskontinuierlichen Bedingungen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) erfolgte nach der Methode von Laemmle (1970). Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 5%iges Sammelgel (5,9 ml H<sub>2</sub>O; 2,5 ml Upper Tris [0,4% SDS, 0,5 M Tris HCI pH 6,8]; 1,6 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid; 75  $\mu$ l 20% APS; 15  $\mu$ l TEMED) und ein 10%iges Trenngel (16,2 ml H<sub>2</sub>O; 10 ml Lower Tris [0,4% SDS, 1,5 M Tris HCI, pH 8,8]; 13,3 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid; 200  $\mu$ l APS; 25  $\mu$ l TEMED) verwendet (Maniatis, 1982). Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 0,192 M Glycin und 0,1% SDS. Die Proben wurden 5 min bei 95°C denaturiert und auf dem Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine und des Molekulargewichtsstandards Prestained High Molecular Weight Standard (HMW) von Sigma erfolgte über Nacht bei 55-60 V.

## 2.23 Antikörperaufreinigung mittels Acetonpulver

Die Aufreinigung des Antikörpers gegen Mch4 erfolgte nach der abgewandelten Methode von Harlow und Lane (1988). Für die Herstellung des Acetonpulvers des mch4-Deletionsstammes wurde eine in YEP-Glukose (YEPD) gewachsene 500 ml-Kulter des *mch4*-Deletionsstammes bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bis 1 geerntet und mit einer 10 mM NaN<sub>3</sub>/NaF-Lösung gewaschen. Nach der Resuspension der Zellen in 2 ml Lysispuffer (0,3 M Sorbitol, 50 mM MOPS, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,5) mit Proteaseinhibitor (Protease Inhibitor Cocktail Tablets) wurden die Zellen nach der Zugabe von Glasperlen ( $\emptyset$ 0,45 mm) für 8 min auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen. Nach der Zugabe von 15 ml Lysispuffer wurde der Überstand abgenommen und die Proteine mit dem 4-fachen Volumen eiskaltem Aceton (-20°C) für 30 bis 60 min bei 4°C gefällt. Durch die anschließende Zentrifugation bei 8500 rpm für 15 min wurden die Proteine pelletiert. Das Pellet wurde mit 10 ml Aceton (-20°C) gewaschen und schließlich fein zerrieben auf Filterpapier getrocknet. Die Lagerung des Acetonpulvers erfolfgte bei 4°C. 2 ml des zu reinigenden Antiserums wurden über Nacht bei 4°C mit 0,02 g des Acetonpulvers unter Schütteln inkubiert und anschließend für 10 min bei 10000 rpm abzentrifugiert. Das gereinigte Antiserum sollte überwiegend Antikörper gegen Mch4 enthalten.

# 2.24 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse

Im Anschluß an die elektrophoretische Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran (Millipore). Der Transfer wurde für 2,5 bis 3 h bei 55 V (250mA) im Blotting-Puffer (25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 20% Methanol) durchgeführt und im Anschluß durch reversible Färbung der Membran mittels PonceauS überprüft. Anschließend wurden unspezifische Bindungen durch eine einstündige Inkubation der Membran in PBSTB (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,3% Tween20, 3% BSA) verhindert. Für die Bindung des Primärantikörpers an spezifische Proteine wurde dieser in PBSTB verdünnt und die Membran in der hergestellten Verdünnung für 1-15 h bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte das Waschen der Membran 3x in PBST (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,3% Tween20) und anschließend die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, verdünnt in PBSTB, für 1-2 h bei Raumtemperatur. Danach folgte wiederum das Waschen der Membran 3x mit PBST. Der Nachweis der gebundenen, Peroxidase-gekoppelten Antikörper erfolgte durch Zugabe eines Chemilumineszenzsubstrats (SuperSignal ULTRA chemiluminescent substrate) und anschließender Detektion durch Auflegen eines Röntgenfilms.

## 2.25 Zellfraktionierung durch Saccharosegradientenzentrifugation

Die Zellen einer 100 ml Hefekultur ( $OD_{600}$ =0,5-0,8) wurden durch Zentrifugation geerntet und in STED10 (10% Saccharose; 10 mM Tris/HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA; 1 mM DTT) gewaschen. Das Zellpellet wurde schnell in 250 µl eiskaltem STED10 mit Proteaseinhibitor (0,2 mM PMSF; Protease-Inhibitor "Complete", Firma Roche) resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch Zugabe von Glasperlen (Ø0,45 mm) bis zum Meniskus der Flüssigkeit und dreiminütiges Schütteln auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR). Nach Zugabe von 1 ml STED10 und Mischen wurde der Überstand abgenommen und für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. 1 ml des Überstands wurde auf einen Saccharosegradienten aufgetragen.

Die Herstellung des Gradienten erfolgte nach Kölling und Hollenberg (1994). Hierfür wurden 4 ml STED50 (wie STED10, nur mit 53% Saccharose), 4 ml STED36 (wie STED10, nur mit 36% Saccharose) und 4 ml STED20 (wie STED10, nur mit 20% Saccharose) in einem SW40-Zentrifugationsgefäß vorsichtig übereinander geschichtet. Das Gefäß wurde mit Parafilm verschlossen, langsam in eine horizontale Lage gebracht und für 3 h bei 4°C gelagert. In dieser Zeit stellte sich durch Diffusion ein annährend kontinuierlicher Gradient ein. Der Gradient wurde vorsichtig aufgerichtet, mit dem vorbereiteten Zellextrakt überschichtet und für 15 h in einem Beckmann SW40-Rotor mit 30000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 700  $\mu$ l Aliquots vom Gradienten abgenommen und mit dem gleichen Volumen 2x Probenpuffer versetzt. 50  $\mu$ l jedes Aliquots wurde elektrophoretisch aufgetrennt (2.22). Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte durch Western-Analyse (2.24).

#### 2.26 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Zamenhoff (1957) bestimmt. Als Standard diente Rinderserumalbumin in Konzentrationen von 0-200 µg/ml. Zu 1 ml wässriger, proteinhaltiger Lösung wurden 0,5 ml Mikrobiuret-Reagenz (8 M NaOH; 0,2% Kupfersulfat) gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand zur Messung der Extinktion bei 290 nm in Quarzküvetten benutzt.

## 2.27 Bestimmung der ß-Galaktosidaseaktivität

#### 2.27.1 Quantitative Enzymtests

Die quantitative Bestimmung der ß-Galaktosidaseenzymaktivität erfolgte nach Miller (1972). Eine Hefekultur (5 ml) wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 1-2 durch Zentrifugation geerntet und zweimal mit kaltem Kaliumphosphat-Puffer (50mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0) gewaschen. Nach Zugabe von 0,2 g Glasperlen (Ø0,45 mm) erfolgte der Zellaufschluß für 5 min durch Schütteln auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) bei 4°C. Darauf wurden je nach Zelldichte 0,2-0,5 ml kalter Kaliumphosphat-Puffer zugegeben, gemischt und der Überstand abgenommen. Der noch Zelltrümmer enthaltende Überstand wurde ohne weitere Zentrifugation zur Messung der Enzymaktivität und zur Proteinbestimmung (2.26) eingesetzt.

Die Enzymreaktion wurde bei 30°C in einem Gesamtvolumen von 1 ml lacZ-Puffer (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10 mM KCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 1 mg/ml ONPG; pH 7,0) durchgeführt und durch Zugabe des Rohextrakts gestartet. Nach eintretender Gelbfärbung, spätestes aber nach 30 min Inkubation, wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml einer 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung gestoppt. Der Ansatz wurde für 5 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Extinktion der Probe gegen die Extinktion eines Blindwerts, der anstelle des Rohextrakt Wasser enthielt, bei 420 nm spektralphotometrisch gemessen. Der molare Extinktionsko-effizient des 2-Nitrophenols beträgt unter diesen Bedingungen 4,5x10<sup>3</sup> M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

#### 2.27.2 Qualitative Enzymtests (X-Gal Overlay-Assay)

Die qualitative Bestimmung der ß-Galaktosidaseaktivität wurde mit auf Agarplatten gewachsenen Zellen durchgeführt. Diese wurden durch Überschichtung mit warmem Aufschlußpuffer (0,2% SDS; 2% DMF; 0,8 mg/ml X-Gal; 0,5% Agarose; 0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0) lysiert. Nach Erstarren des Aufschlußpuffers wurden die Platten bei 37°C inkubiert. Die ß-Galaktosidase der aufgeschlossenen Zellen setzt X-Gal (5-Brom-4chlor-3-indolyl-ß-D-galaktosid) zu einem blauen Farbstoff um (5-Brom-4-chlorindigo). Die entstehende Blaufärbung wurde protokolliert und anhand ihrer Intensität die Expressionsstärke abgeleitet.

# 2.28 Bestimmung der Aufnahme von Monocarboxylaten in S. cerevisiae

#### 2.28.1 Messung der Aufnahme von Acetat

Die Acetataufnahmemessung erfolgte nach Casal und Leao (1995) unter Abwandlung durch die Methode zur Glukoseaufnahmemessung von Bisson und Fraenkel (1983) mit Modifikation nach Walsh *et al.* (1994). Die Aufnahme wurde bei Acetatkonzentrationen von 0,05-4 mM bestimmt. Die verwendete spezifische Radioaktivität betrug 54 kBq/µmol – 162 kBq/µmol.

Die Zellen wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 1-2 geerntet und zweimal mit kaltem Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M  $K_2$ HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6) gewaschen. Das Naßgewicht wurde bestimmt und die Zellen in einer Konzentration von 60 mg/ml in Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) resuspendiert. Vor Beginn der Messung wurden sowohl die Zellen als auch die Acetatlösung für 5 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von 100 µl Zellen zu 50 µl der dreifach konzentrierten Acetatlösung. Das Stoppen der Reaktion erfolgte nach 5 sec. Dafür wurden 100µl der Probe entnommen und in 10 ml eiskalten Stoppuffer (0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6) gegeben. Durch den Gebrauch einer speziellen Pipette konnte das Zeitinterval von 5 sec bis auf 1/100 genau eingehalten werden. Nach dem Abstoppen wurden die Zellen sofort mittels Vakuumfiltration auf einem Whatman GF/C Glas-Fiber-Filter gesammelt und viermal mit 10 ml eiskaltem Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen. Die Filter wurden in 5 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und die Radioaktivität in einem Szintillationszähler (Beckmann) gemessen (cpm<sub>Probe</sub>). Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität (cpm<sub>0</sub>) wurden 10 µl des Gesamtreaktionsansatzes in 5 ml Szintillationsflüssigkeit gemessen. Zur Bestimmung der Acetatmenge, die unspezifisch an den Filter und außen an die Zellen bindet, aber nicht aufgenommen wird, wurden 33µl der jeweiligen Acetatlösung zusammen mit 67 µl Zellen gleichzeitig in den Stoppuffer gegeben und im weiteren wie die Probe behandelt (cpm<sub>Kontrolle</sub>). Diese Kontrolle wurde 2-3x bestimmt und der Mittelwert von dem Meßwert der Probe abgezogen. Die Aufnahmegeschwindigkeiten V in nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG wurden nach folgender Formel berechnet:

aufgenommenes Acetat =  $[(cpm_{Probe} - cpm_{Kontrolle})] / (cpm_0 \cdot 10)] \cdot mM_{Acetat}$ 

#### 2.28.2 Messungen der Aufnahme von Pyruvat

Die Pyruvataufnahmemessung wurde wie für die Acetataufnahmemessung beschrieben (2.28.1) durchgeführt. Es wurden Pyruvatkonzentrationen von 0,04-4 mM eingesetzt. Die verwendete spezifische Radioaktivität betrug 10,63 kBq/µmol – 47,41 kBq/µmol. Die Inkubation der Zellen mit der Pyruvatlösung erfolgte für 10 sec.

#### 2.28.3 Messungen der Aufnahme von Lactat

Die Bestimmung der Aufnahme von Lactat wurde über einen Zeitraum von 10 min bestimmt und erfolgte nach Modifikation der unter 2.28.1 beschriebenen Aufnahme von Acetat. Die Zellen wurden in Kaliumphosphat-Puffer (0,1 M  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , pH 6) mit 2% Glukose resuspendiert. Durch die Zugabe der Glukose wurde gewährleistet, daß die Zellen weiterhin ATP herstellen können, welches von der Plasmamembran-ATPase Pma1 benötigt wird, um den pH-Gradienten über der Plasmamembran aufrecht zu erhalten. Der pH-Gradient wiederum gewährleistet den H<sup>+</sup>-Symport von Lactat über die Plasmamembran. Es wurde eine Lactatkonzentration von 1 mM verwendet. Proben wurden nach 1, 4, 10 min gezogen. Die verwendete spezifische Radioaktivität betrug 76 kBq/µmol.

## 2.29 Bestimmung der Pyruvatverbrauchsrate

Für die Bestimmung der Verbrauchsraten von Pyruvat wurden die Zellen in synthetischem Minimalmedium mit Uracil und 2% Ethanol herangezogen, mit synthetischem Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle gewaschen und anschließend mit einer  $OD_{600}$  von 1,5 in synthetisches Minimalmedium mit 0,4 % Pyruvat umgeimpft. Über einen Zeitraum von 8 h hinweg sind jede Stunde Proben entnommen und für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert worden. Die Überstände wurden zur Messung der Pyruvatkonzentration (2.29.1) eingesetzt. Die Pyruvatverbrauchsrate (V<sub>Pyr</sub>) wurde durch Anlehnung an die Glukoseverbrauchsratenbestimmung von Walsh *et al.* (1991) bestimmt. Sie berechnet sich aus der Formel:

$$V_{Pyr} = (Pyr-Konz1 - Pyr-Konz2/OD_{600} 2 - OD_{600} 1) * \mu_{max} [mM * h^{-1} * OD_{600}^{-1}]$$

 $\mu_{max}$  ist dabei die maximale Wachstumsrate pro Stunde. Pyr-Konz1 bzw. Pyr-Konz2 ist die Pyruvatkonzentration zum Zeitpunkt t=1 bzw. t=2. OD<sub>600</sub>1 bzw. OD<sub>600</sub>2 ist die optische Zelldichte bei OD<sub>600</sub> zum Zeitpunkt t=1 bzw. t=2.

#### 2.29.1 Bestimmung der Pyruvatkonzentration

Die Bestimmung der Pyruvatkonzentration wurde nach Bergmeyer (1974) durchgeführt. Sie beruht auf der Umsetzung von Pyruvat und NADH+H<sup>+</sup> zu Lactat und NAD<sup>+</sup> mittels Lactat-Dehydrogenase. NADH+H<sup>+</sup> ist Meßgröße und kann aufgrund seiner spezifischen Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm spektralphotometrisch bestimmt werden.

#### 2.30 Bestimmung der Sekretion von Acetat, Lactat und Pyruvat

Zur Bestimmung der Sekretion von Acetat, Pyruvat und Lactat wurden die Zellen in synthetischem Minimalmedium mit Uracil und 2% Glukose mit einer OD<sub>600</sub> von

0,5 angeimpft. Proben wurden zu Zeitpunkten unterschiedlicher Zelldichte gezogen und die Überstände für die Messung der Acetat- (2.30.1), Pyruvat- (2.29.1) und Lactatkonzentrationen (2.30.2) eingesetzt.

#### 2.30.1 Bestimmung der Konzentration von Acetat

Die Bestimmung der Acetatkonzentration erfolgte unter Verwendung des Lebensmittelanalytik-Kits für Acetat nach Herstellerangaben. NADH+H<sup>+</sup> ist Meßgröße und kann aufgrund seiner spezifischen Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm spektralphotometrisch bestimmt werden.

#### 2.30.2 Bestimmung der Konzentration von Lactat

Die Lactatkonzentration wurde mittels des Lebensmittelanalytik-Kits für Lactat nach Angaben des Herstellers bestimmt, wobei die Bildung von NADH+H<sup>+</sup> spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt und gemessen wurde.

## 2.31 UV-Mutagenese

Für die Entstehung von Mutationen durch die Einwirkung von ultraviolettem Licht (UV-Licht) auf die DNA eines Hefestammes wurde eine 100 ml-Kultur bei einer OD<sub>600</sub> von 3-5 geerntet. Nach dem Waschen des Zellpellets in Wasser wurde das Pellet in 20 ml Wasser resuspendiert und im Dunkeln mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm unter ständigem Rühren für 20 min bestrahlt. Proben von 1 ml wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und für 4-5 h im Dunkeln bei 30°C in 4 ml Medium inkubiert. Das dabei verwendete Medium sollte keinen Selektionsdruck auf die gesuchten Mutanten erzeugen, sondern lediglich der Regeneration der mutagenisierten Zellen dienen. Anschließend wurden unterschiedliche Verdünnungen der mutagenisierten Zellsuspension jeder Probe auf Vollmediumsplatten mit 2% Glukose (YEPD) ausplattiert. Der Rest der Proben wurde bei 4°C gelagert. Die Bestrahlung als auch die anschließende Regeneration der Zellen sollte im Dunkeln stattfinden, um das durch sichtbares Licht aktivierte DNA-Reparatursystem der Zelle, die Photolyase, zu unterdrücken.

#### 2.32 EMS-Mutagenese

Um Mutationen in der DNA eines Hefestammes durch die Einwirkung von Ethylmethansulfonat (EMS) zu erzeugen, wurden 10 ml eine Hefekultur bei einer OD<sub>600</sub> von 1-2 abgenommen und bei 3000 rpm zentrifugiert. Nach dem Waschen

in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,0) wurde des Zellpellet in 1 ml des Puffers resuspendiert. 0,7 ml der Resuspension wurden in 1 ml Kaliumphosphatpuffer mit 50 µl EMS gegeben und bei 30 °C inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben von 100 µl entnommen und zum Abstoppen der EMS-Reaktion in 4 ml 5% Natriumthiosulfat für 40 min bei 30°C inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 3000 rpm wurde das Zellpellet für 4-5 h in 4 ml YEP-Glukose (YEPD) bei 30°C inkubiert. Danach wurden unterschiedliche Verdünnugen der Zellsuspension jeder Probe auf YEPD-Platten ausplattiert. Der Rest der Proben wurde bei 4°C gelagert.

# 2.33 Kreuzung von Hefestämmen, Tetradenanalyse und Bestimmung des Paarungstyps

Die zu kreuzenden haploiden Stämme wurden über Nacht in 5 ml YEP-Glukose (YEPD) herangezogen und am nächsten Morgen auf einer Agarplatte miteinander gemischt. Nach einer Inkubation von 3 h bei 30°C wurden Zygoten mit Hilfe eines Mikromanipulators isoliert und auf einer YEPD-Platte herangezogen. Die dipoloiden Zellen wurden anschließend in 5 ml YEPD bis zur stationären Phase herangezogen, in Wasser gewaschen und für 3-5 Tage auf Agarplatten mit 2% Kaliumacetat bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die sporulierenden Zygoten in 0,5 ml Wasser aufgenommen, die Ascuswände durch Zugabe von 20 µl ß-Glucuronidase (0,2 mg/ml) für 10 min bei Raumtemperatur lysiert und die Sporen mittels Mikromanipulator getrennt.

Zur Bestimmung des Paarungstyps wurden die zu prüfenden Stämme mit den Testerstämmen EBY109A (*MATa leu1*) und EBY109B (*MATa leu1*) gekreuzt und auf Minimalmedium ausgestrichen. Zellen, die nach der Kreuzung mit dem Stamm EBY109A auf Minimalmedium Wachstum zeigten, gehörten dem Paarungstyp  $\alpha$  an. Zellen, die mit dem Stamm EBY109B gekreuzt wurden und auf Minimalmedium wuchsen, gehörten dem Paarungstyp a an.

#### 2.34 Mikroskopische Untersuchungen

Zur mikroskopischen Untersuchung wurden unfixierte Zellen und ein Zeiss Axioskop verwendet. Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem FITC-Filtersatz durchgeführt. Die Bilder wurden mit einer CCD-Kamera (Sony) aufgenommen und mit der Software "Adobe Photoshop 5.0" bearbeitet.

# **3 ERGEBNISSE**

# 3.1 Untersuchung der putativen Monocarboxylattransporter von S. cerevisiae

Nach der Sequenzierung des gesamten Hefegenoms wurden fünf Gene identifiziert, deren Proteine eine Ähnlichkeit zu den Monocarboxylattransportern der Säuger aufweisen (André, 1995; Nelisson *et al.*, 1997; Yeast Transport Protein database (YTPdb) (http://alize.ulb.ac.be/YTPdb/). Diese fünf Gene *YDL054c, YKL222w, YNL125c, YOL119c und YOR306c* wurden deshalb als <u>Monocarboxylattransporter-Homologe</u> (*MCH1-MCH5*) bezeichnet. Da über die Funktion und Substratspezifität der einzelnen Mitglieder der Mch-Familie nichts bekannt war, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Funktion, Regulation und Lokalisation der Mch-Proteine aufgeklärt werden.

#### 3.1.1 Konstruktion und Untersuchung des *mch1-5-*Deletionsstammes

Die phänotypische Charakterisierung von Deletionsmutanten gibt häufig Hinweise auf die Funktion der deletierten Gene. Aus diesem Grund wurden die *MCH-Gene* sukzessive im Stamm CEN.PK113-13D nach der in Abschnitt 2.15.1 beschriebenen Methode deletiert. Für die Amplifikation der *loxP::kanMX::loxP*-Kassette wurden die Oligonukleotide S1-LMCHx und S22-MCHx verwendet. Die nachfolgende Verifizierung der einzelnen Deletionen erfolgte mit den Oligonukleotiden a4-MCHx und den forward GENEPAIRS Primern (Tab. 6).

Um einen ersten Hinweis auf die Funktion der Mch-Proteine zu bekommen, wurde das Wachstumsverhalten der *mch*-Deletionsstämme auf unterschiedlichen Medien untersucht. Aufgrund der Ähnlichkeit der Mch-Proteine zu den Monocarboxylattransportern der Säuger wurde das Wachstumsverhalten der Deletionsstämme auf verschiedenen Kohlenstoffquellen, insbesondere auf unterschiedlichen Monocarboxylaten, beobachtet. Dafür wurden der Fünffachdeletionsstamm *mch1-5* (JMY18) und die *mch*-Einzeldeletionsstämme (Konstruktionsbeschreibung s. 3.1.2) auf Agarplatten mit synthetischem Minimalmedium mit jeweils Glukose, Ethanol, Pyruvat, Acetat oder Lactat als Kohlenstoffquelle ausgestrichen. Die verwendeten Kohlenstoffquellen wurden dem Medium in Konzentrationen von 0,1% und 2% zugegeben. Es zeigte sich, daß die Deletionsstämme auf allen verwendeten Medien wuchsen und sich ihre Wachstumsraten nicht von denen des Wildtypstammes unterschieden. Während für die Monocarboxylattransporter der Säuger MCT1-MCT4 eine Transportaktivität für Monocarboxylate festgestellt werden konnte (Juel und Halestrap, 1999; Yoon *et al.*, 1997), gaben diese Wachstumstests keinerlei Hinweis darauf, daß die Mch-Proteine der Hefe ebenfalls an der Aufnahme oder Verwertung von Monocarboxylaten beteiligt sind.

Es wurden weitere Tests durchgeführt, um die Mitwirkung der Mch-Proteine bei anderen Prozessen zu überprüfen. Eine Untersuchung der Sensitivität von Deletionsstämmen gegenüber Schwermetallionen kann einen Hinweis auf die Funktion der deletierten Gene geben. So wurde die Sensitivität des mch3-5-Deletionsstammes (zu diesem Zeitpunkt war der mch2-5- und mch1-5-Deletionsstamm noch nicht konstruiert) gegenüber Schwermetallionen durch einen sogenannten Plättchentest untersucht. Hierfür wurde ein in eine 100 mM Kobaltbzw. Kupferlösung getauchtes Plättchen in die Mitte einer Agarplatte (synthetisches Minimalmedium mit Uracil und 1% Maltose) gelegt. Der mch3-5-Deletionsstamm und der Wildtypstamm wurden vom Rand der Platte zum Plättchen hin ausgestrichen. Dadurch wurde erreicht, daß die Zellen unterschiedlichen Konzentrationen der Kobalt- und Kupferionen ausgesetzt wurden. Ein Wachstum der Zellen kann nur so nah an das getränkte Plättchen heran erfolgen wie es die Sensitivität der Stämme gegenüber der Ionenkonzentration erlaubt, da ab einer bestimmten Konzentration die Kupfer- und Kobaltionen toxisch wirken. Jedoch wuchsen der mch3-5-Deletionsstamm sowie der Wildtypstamm beide gleich nah an die getränkten Plättchen heran (nicht dargestellt). Es lag daher keine veränderte Sensitivität im *mch3-5*-Deletionsstamm gegenüber der getesteten Ionen im Vergleich zum Wildtypstamm vor.

Eine erhöhte Sensitivität eines Deletionsstammes gegenüber hohem osmotischen Druck kann einen Hinweis auf die Beteiligung der deletierten Gene an der Reaktion der Zelle auf osmotischen Streß liefern. Dafür wurde das Wachstum der Deletionsstämme *mch5, mch4/5* und *mch3-5* und des Wildtypstammes CEN.PK113-13D auf Medien mit 500 mM Natriumchloridlösung und 1,2 M Sorbitollösung getestet. Das beobachtete Wachstum der Stämme zeigte keine Unterschiede, weder untereinander noch im Vergleich zum Wildtyp. Somit ist eine Mitwirkung der Mch-Proteine Mch3, Mch4 und Mch5 bei der Antwort auf osmotischen Streß unwahrscheinlich. Außerdem wurde das Wachstum der Deletionsstämme *mch5, mch4/5* und *mch3-5* auf Medium mit einem pH von 3 bzw. 8 beobachtet. Hierbei sollte festgestellt werden, ob durch die Deletion der *MCH*-Gene das Wachstum auf sehr saurem bzw. basischem Medium beeinflußt wird. Das Wachstum der Deletionsstämme war jedoch nicht zu unterscheiden vom Wachstum des Wildtypstammes. Demzufolge haben weder Mch3, Mch4 noch Mch5 einen Einfluß auf das Wachstum bei extremen pH-Werten.

#### 3.1.2 Untersuchung der Transkriptionsregulation der MCH-Gene

Häufig wird die Expression von Genen, die in den Metabolismus spezifischer Substrate involviert sind, durch diese selbst reguliert. So wäre bei den putativen Monocarboxylattransportern der Hefe eine Expressionsregulation durch Monocarboxylate im Medium denkbar. Casal et al. (1996) beobachteten die Induktion eines bisher noch nicht identifizierten Monocarboxylattransporters durch Acetat. Dieser ist in der Lage sowohl Acetat, Propionat und Formiat zu transportiert, jedoch nicht Lactat und Pyruvat. Eine Regulation durch Lactat wurde indirekt auch für die Expression der Monocarboxylattransporter MCT1 und MCT4 im Menschen gezeigt: Die Steigerung der Muskelaktivität bewirkt zum einen die Bildung großer Mengen Lactat, die aus dem Gewebe heraustransportiert werden müssen. Zum anderen wird Lactat aber auch zur Energiegewinnung durch Oxidation im Gewebe benötigt. Eine Steigerung der Muskelaktivität hat eine Steigerung der Expression von MCT1 und MCT4 zur Folge (Juel, C., 2001). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde die Transkription der MCH-Gene in Abhängigkeit von Monocarboxylaten, zusätzlich aber auch einiger anderer Substrate, untersucht. Zu diesem Zweck wurden die Promotoren der MCH-Gene an das lacZ-Reportergen aus E. coli fusioniert. Hierfür wurde der offene Leserahmen der MCH-Gene durch eine *lacZ::kanMX*-Kassette ersetzt (2.15.1), so daß außer dem Promotor nur die ersten 48 Basenpaare des ursprünglichen kodierenden Bereiches eines jeden ORFs erhalten blieben und in den Leserahmen des lacZ-Gens übergingen. Eine gualitative Messung der ß-Galaktosidaseaktivität mittels eines X-Gal-Overlay-Assays bzw. eine quantitative Messung der ß-Galaktosidaseaktivität mittels eines Enzymtests sollten Aufschluß über die Transkriptionsregulation der MCH-Gene geben.

#### 3.1.2.1 Transkriptionsregulation der MCH-Gene durch Carbonsäuren

Für die Untersuchung der ß-Galaktosidaseaktivität mittels eines X-Gal-Overlay-Assays wurden die Einzeldeletionsmutanten auf synthetische Medien mit jeweils unterschiedlichen Monocarboxylaten wie 2% Pyruvat, 2% Lactat, 2% Acetat, 0,1% Butyrat, 0,1% Sorbat, 0,1% des Dicarboxylats Succinat und 0,1% Ölsäure, aber auch 2% Glycerin ausgestrichen. Zusätzlich zur Untersuchung der Transkriptionsregulation durch Carbonsäuren sollte eine mögliche Autoregulation untersucht werden. Dadurch sollte festgestellt werden, ob die Mch-Proteine ihre eigene Transkription regulieren. Hierfür wurden die Einzeldeletionsstämme mit dem Stamm EBY139A (*MATa*) gekreuzt. Die aus der Kreuzung hervorgehenden heterozygoten diploiden Stämme wurden auf den gleichen Medien wie die Einzeldeletionsstämme ausgestrichen. Im X-Gal-Overlay-Assay konnte keine unterschiedliche Färbung der haploiden und diploiden Stämme beobachtet werden, so daß bei der Transkriptionsregulation der *MCH*-Gene eine Autoregulation ausgeschlossen werden konnte. Bei keinem der getesteten Stämme konnte eine starke Induktion bzw. Repression der Transkription durch eine der verwendeten Kohlenstoffquellen beobachtet werden. Lediglich eine schwache Repression der Transkription von *MCH4* auf den Monocarboxylaten sowie eine schwache Repression der Transkription von *MCH3* auf Glukose konnte anhand des X-Gal-Overlay-Assays abgeleitet werden (nicht dargestellt). Weiterhin zeigte der Overlay-Assay, daß *MCH5* auf allen getesteten Kohlenstoffquellen die stärkste Transkription aufwies. *MCH1* und *MCH2* wurden dagegen am geringsten transkribiert.

Der anschließende quantitative Enzymtest bestätigte die unterschiedliche Stärke der Transkription der *MCH*-Gene, die schon im X-Gal-Overlay-Assay beobachtet wurde (Tab. 7). Da aus dem vorangegangenen Overlay-Assay hervorgegangen war, daß die *MCH*-Transkription in den haploiden und heterozygot-diploiden Stämmen vergleichbar ist, wurde der quantitative Enzymtest nur mit den haploiden Stämmen durchgeführt.

Gen::lacZ-kanMX	2% Lactat	2% Glucose	2% Ethanol
mch1	0,3	1,5	2
mch2	0,1	0,1	0,2
mch3	2,8	2,1	2,4
mch4	2,6	5,5	6,1
mch5	25	17,5	7,2

Tab. 7: Spezifische ß-Galaktosidaseaktivität (nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> Protein) der *MCH*-Promotor*lacZ*-Fusionen nach Anzucht der Stämme auf verschiedenen Kohlenstoffquellen. Die Stämme wurden in synthetischem Minimalmedium mit Uracil und der angegebenen Kohlenstoffquelle bis zu einer  $OD_{600}$  1-2 bei 30°C inkubiert und anschließend geerntet. Nach der Herstellung der Proteinrohextrakte wurde sowohl die Proteinkonzentration (mg/ml) als auch die ß-Galaktosidaseaktivität (nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> Protein) bestimmt.

Tab. 7 zeigt, daß *MCH5* im Vergleich zu den anderen *MCH*-Genen am stärksten exprimiert wurde und bestätigt damit die Beobachtung des X-Gal-Overlay-Assays. Die Expression von *MCH4*, *MCH3* und *MCH1* war im Vergleich zur Expression von *MCH5* deutlich geringer. *MCH2* wurde unter diesen Bedingungen kaum exprimiert. Die Transkription von *MCH4* und *MCH1*, unterlag einer Repression auf Lactat. Die Transkription von *MCH5* wurde durch Ethanol reprimiert.

Zusammenfassend konnte eine unterschiedliche Stärke der Transkription der *MCH*-Gene beobachtet werden und zum Teil eine geringfügige Regulation durch Kohlenstoffquellen. Auch eine Abhängigkeit der Transkription der *MCH*-Gene von Monocarboxylaten, wie es beim beschriebenen System des Monocarboxylattransporters von *S. cerevisiae* zu beobachten war (Cássio *et al.*, 1987; Casal *et al.*, 1995, 1996), konnte nicht eindeutig festgestellt werden.

#### 3.1.2.2 Transkriptionsregulation der MCH-Gene durch Aminosäuren

Kürzlich konnte ein Transporter aus dem Dünndarm der Ratte isoliert werden (Kim et al., 2001), dessen Aminosäuresequenz eine Identität von 30% zu den Monocarboxylattransportern MCT1-MCT4 aus Säugern Dieser aufweist. Transporter, TAT1, transportiert aromatische Aminosäuren wie Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin. Aufgrund der Ähnlichkeit der MCT-Proteine der Säuger zu den Mch-Proteinen von S. cerevisiae lag die Vermutung nahe, daß es sich bei den Mch-Proteinen möglicherweise um Aminosäuretransporter, inbesondere Aminosäuretransporter von aromatischen Aminosäuren, handeln könnte. Demzufolge sollte getestet werden, ob eine Regulation der Transkription der MCH-Gene in Anwesenheit bestimmter Aminosäuren im Medium erfolgt. Da bekannt ist, daß Ammonium im Medium die Expression einiger Aminosäurepermeasen reprimiert, beispielsweise von Gap1 (Jauniaux und Grenson, 1990), wurde ein X-Gal-Overlay-Assay sowohl auf synthetischem Medium mit als auch ohne Ammonium durchgeführt (2.27.2). Die Medien enthielten neben 2% Glukose jeweils eine der zwanzig Aminosäuren in der Konzentration von 10 mM. In den Medien ohne Ammonium dienten die Aminosäuren z.T. gleichzeitig als Stickstoffquelle.

Der X-Gal-Overlay-Assay sollte mit den heterozygot-diploiden *mch*-Einzeldeletionsmutanten durchgeführt werden. Diese wurden auf die zu testenden Medien ausgestrichen. Bei Betrachtung des Wachstums der getesteten Stämme auf den verwendeten Medien zeigte sich, daß alle Stämme auf Ammonium-freien Medium mit Lysin oder Cystein sehr langsam wuchsen (nicht dargestellt). Somit scheinen diese beiden Aminosäuren keine guten Stickstoffquellen darzustellen. Auch das Wachstum auf Histidin war bei allen Stämmen stark beeinträchtigt. Dies wurde jedoch auf ein generell langsameres Wachstum des Stammes CEN.PK113-13D zurückgeführt, welcher der Ausgangsstamm für die *MCH*-Deletionen gewesen war.

Die Ergebnisse des X-Gal-Overlay-Assays sind in Tab. 8 (A, B) dargestellt. Für die Bestimmung der relativen Transkriptionsstärke in Tab. 8A wurde die Expression der *MCH*-Gene auf synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose und Ammonium als Stickstoffquelle ohne jede Aminosäure als Referenz herangezogen. Für die Auswertung in Tab. 8B diente die Expression der *MCH*-Gene auf synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose und Prolin, einer sekundär verwendeten Stickstoffquelle, als Referenz.

Α						В					
SMD <sup>U</sup>	MCH1-lacZ	MCH2-lacZ	MCH3-lacZ	MCH4-lacZ	MCH5-lacZ	SMD <sup>U</sup> -NH3	MCH1-lacZ	MCH2-lacZ	MCH3-lacZ	MCH4-lacZ	MCH5-lacZ
10mM Glu						10mM Glu					- (-)
10mM Arg						10mM Arg					
10mM Pro						10mM Lys					
10mM Lys						10mM Gly				++++	
10mM Gly				+++		10mM Gln					- (-)
10mM Gln						10mM Cys					++++
10mM Cys						10mM Ser					
10mM Ser						10mM Asn					
10mM Asn						10mM Leu					
10mM Leu				+++		10mM lle					
10mM lle				+++		10mM Val					
10mM Val						10mM Thr					
10mM Thr				+++		10mM Met					- (-)
10mM Met				+++		10mM Ala					
10mM Ala						10mM His		k	ein Wachstu	m	
10mM His		k	ein Wachstu	m		10mM Asp					
10mM Asp						10mM Phe		++++			
10mM Phe			+++			10mM Tyro					
10mM Tyrc	)		++++			10mM Trp		++++	++++	+++	
10mM Trp		+++	++++			-					

**Tab. 8: Qualitativer ß-Galaktosidasetest der heterozygot diploiden** *mch-lacZ*-Einzeldeletionsstämme. Die Stämme wurden auf synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose und der angegebenen Aminosäure für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde ein X-Gal-Overlay-Assay durchgeführt. Ammonium als Stickstoffquelle (A), jeweilige Aminosäure als Stickstoffquelle (B). (+++) starke Induktion, (++++) sehr starke Induktion, (--) Repression, - (-) schwache Repression.

Bei Betrachtung der Ergebnisse des X-Gal-Overlay-Assays auf den Medien mit Ammonium ließ sich folgendes feststellen: Die Transkription von *MCH1* und *MCH5* wurde durch keine der getesteten Aminosäuren induziert oder reprimiert. *MCH4* unterlag einer deutlichen Induktion durch einige aliphatische Aminosäuren wie Leucin, Isoleucin und Glycin, aber auch durch Threonin und Methionin. *MCH3* wurde nur durch aromatische Aminosäuren induziert (Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan), während *MCH2* nur durch die aromatische Aminosäure Tryptophan induziert wurde. Auf den Ammonium-freien Medien wurde *MCH2* neben der Aminosäure Tryptophan zusätzlich durch die aromatische Aminosäure Phenylalanin induziert. Bis auf die Induktion durch diese beiden aromatischen Aminosäuren war die Expression von *MCH2* sehr gering. *MCH3* konnte hingegen nur noch durch Tryptophan induziert werden. Zusätzlich zeigte sich eine Repression des *MCH3*-Promotors durch Aspartat, Glutamin und Cystein. Auch *MCH5* wurde durch Aspartat reprimiert, aber auch Leucin und Isoleucin reprimierten die Transkription von *MCH5*. Cystein hatte hingegen eine starke Induktion von *MCH5* zur Folge. *MCH4* zeigte, wie schon auf dem Medium mit Ammonium, eine Induktion durch die Aminosäure Glycin. Des weiteren konnte nur noch durch Tryptophan eine Induktion hervorgerufen werden. Sowohl auf den Medien mit als auch auf den Medien ohne Ammonium war *MCH5* wieder das am stärksten exprimierte Gen, während *MCH1* am geringsten exprimierte wurde. Zusammenfassend ließ sich sagen, daß die Transkription der Monocarboxylattransporter-Homologen der Hefe, mit Ausnahme von *MCH1*, tatsächlich von einigen Aminosäuren reguliert wurde. Das Vorhandensein von Ammonium im Medium beeinflußte dabei zusätzlich die Regulation der *MCH*-Transkription.

#### 3.1.3 Deletion von *JEN1* im *mch1-5*-Deletionsstamm

Die vorangegangenen Ergebnisse lieferten keinen Hinweis darauf, daß einer der putativen Monocarboxylattransporter von S. cerevisiae tatsächlich in den Transport der Monocarboxylate Pyruvat, Lactat oder Acetat involviert ist. Trotzdem ließ sich nicht gänzlich ausschließen, daß zumindest eines der Mch-Proteine eine geringe Transportaktivität für Monocarboxylate aufweist, diese jedoch von einem weiteren Monocarboxylattransportsystem überlagert wird. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde als nächstes JEN1 im mch1-5-Deletionsstamm deletiert. Zu diesem Zeitpunkt war die Funktion von Jen1 noch nicht bekannt. Es lagen jedoch Hinweise vor, daß Jen1 möglicherweise den Transport von Lactat über die Plasmamembran vermittelt (persönliche Mitteilung von C. Gancedo). Spätere Untersuchungen bestätigten dies und zeigten zusätzliche eine Transportaktivität von Jen1 für Pyruvat auf (Casal et al., 1999; Akita et al., 2000). Heute ist bekannt, daß es sich bei Jen1 um den schon 1996 von Casal et al. kinetisch beschriebenen Transporter handelt, der neben Lactat und Pyruvat auch Acetat und Propionat, nicht aber Formiat transportieren kann. Obwohl er Monocarboxylate transportiert, gehört Jen1 dennoch nicht zur Familie der Monocarboxylattransporter. Bei den bisher beschriebenen Untersuchungen zur Ermittlung der Funktion der Mch-Proteine war Jen1 noch aktiv. So war es denkbar, daß ein möglicher Wachstumsdefekt auf Monocarboxylaten, verursacht durch die Deletion der MCH-Gene, durch die Aktivität von Jen1 überlagert werden konnte. Aus diesem Grund wurde JEN1 zusätzlich im mch1-5-Deletionsstamm und dem Wildtypstamm CEN-PK113-13D, wie in Abschnitt 2.15.1 beschrieben, deletiert. Für die PCR-Synthese der Deletionskassette wurden die Oligonukleotide S1-LJEN1 und S22-JEN1, für die Überprüfung der Deletion die Oligonukleotide a1-JEN1 und a4-JEN1 verwendet.

Die resultierenden Deletionsstämme *jen1 mch1-5* (JMY30) und *jen1* (JMY29) wurden auf synthetischem Minimalmedium mit jeweils Pyruvat, Acetat und Lactat, aber auch Glukose und Ethanol als Kontrolle, in den Konzentrationen 2% und 0,1% getestet. Nach einer Inkubation von bis zu acht Tagen zeigte sich, daß sowohl der *jen1-* als auch der *jen1 mch1-5-*Deletionsstamm auf den Medien mit Pyruvat und Lactat als Kohlenstoffquelle, unabhängig von der Konzentration der verwendeten Substrate, ein stark eingeschränktes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen (Abb. 4). Das Wachstum auf Acetat, Glukose und Ethanol blieb hingegen unverändert (nicht dargestellt).



Abb. 4: Wachstum der jen1-, jen1 mch1-5-Deletionsstämme und des Wildtypstammes CEN.PK.113-13D (WT) auf verschiedenen Monocarboxylaten. Inkubation der Zellen auf Agarplatten mit synthetischem Minimalmedium mit Uracil und den angegebenen Monocarboxylaten für bis zu acht Tagen bei 30°C.

Der Versuch bestätigte zum einen die Beobachtungen von Casal *et al.* (1999) und Akita *et al.* (2000), daß Jen1 in den Transport von Pyruvat und Lactat involviert ist. Zum anderen zeigte auch dieser Versuch, daß scheinbar keines der Mch-Proteine am Transport von Pyruvat oder Lactat über die Plasmamembran beteiligt ist, da kein sichtbarer Wachstumsvorteil des *jen1*-Deletionsstammes gegenüber dem *jen1 mch1-5*-Deletionsstamm zu erkennen war. Dieser hätte bei einer Beteiligung der Mch-Proteine am Lactat- und Pyruvattransport vorliegen müssen, da die Mch-Proteine im *jen1*-Deletionsstamm den Monocarboxylattransport von Pyruvat und Lactat noch vermitteln könnten. Da das Wachstum auf Acetat in keinem der getesteten Deletionsstämme im Vergleich zum Wildtyp beeinträchtigt war, konnte

geben muß. Aufgrund dieser Tatsache konnte des weiteren eine Mitwirkung der Mch-Proteine am Acetattransport nicht völlig ausgeschlossen werden, da diese durch den noch nicht identifizierten und daher im *jen1 mch1-5* Deletionsstamm noch aktiven Acetattransporter überlagert wäre. Die Frage nach dem weiteren Acetattransporter blieb bestehen und wird im Abschnitt 3.4 noch einmal diskutiert.

#### 3.1.3.1 Untersuchung der Pyruvatverbrauchsrate in den Deletionsstämmen

Durch die Bestimmung der Pyruvatverbrauchsrate sollte der Verbrauch des Pyruvats in den Deletionsstämmen *jen1, jen1 mch1-5, mch1-5* und dem Wildtypstamm CEN.PK113-13D untersucht werden. Dazu wurden die Deletionsstämme wie in Abschnitt 2.29 beschrieben kultiviert. Aus dem Überstand der zu jeder Stunde entnommenen Proben wurde die Pyruvatkonzentration bestimmt und gegen die optische Dichte der Zellen bei  $OD_{600}$  aufgetragen. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt.



Abb. 5: Pyruvatverbrauch der jen1- ( $\blacktriangle$ , grün), jen1 mch1-5- ( $\diamondsuit$ , gelb), mch1-5-Deletionsstämme ( $\blacksquare$ , rot) und des Wildtypstammes CEN.PK.113-13D ( $\diamondsuit$ , blau). Die Stämme wurden in synthetischem Minimalmedium mit Uracil und 2% Ethanol herangezogen, gewaschen und in synthetisches Minimalmedium mit Uracil und 0,4% Pyruvat mit einer OD<sub>600</sub>=1,5 umgeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30°C. Jede Stunde wurden Proben zur Bestimmung der Pyruvatkonzentration (mM) (**A**) und zur Bestimmung der OD<sub>600</sub> (**B**) entnommen.

In den Stämmen, in denen *JEN1* deletiert wurde, konnte kein Pyruvatverbrauch festgestellt werden. Der *mch1-5*-Deletionsstamm hingegen zeigte eine Pyruvatverbrauchsrate ähnlich der des Wildtyps (*mch1-5*: V<sub>Pyr</sub>=1,8894 mM·h<sup>-1</sup>·OD<sub>600</sub><sup>-1</sup>,

Wildtyp=1,452 mM·h<sup>-1</sup>·OD<sub>600</sub><sup>-1</sup>). Auch das Wachstum der *mch1-5*-Mutante entsprach dem Wachstum des Wildtyps, während die *jen1*-Mutanten auf dem Medium mit Pyruvat als Kohlenstoffquelle nicht wachsen konnten (Abb. 5). Die Pyruvatverbrauchsratenbestimmung bestätigte somit, daß die Mch-Proteine am Transport von Pyruvat nicht beteiligt sind, wie sich schon aus den Wachstumstests auf Platten schlußfolgern ließ. Weiterhin bestätigten die Messungen, daß Jen1 für den Transport von Pyruvat über die Plasmamembran erforderlich ist.

# 3.1.3.2 Untersuchung der Monocarboxylatsekretion in den Deletionsstämmen

Neben dem Verbrauch von Monocarboxylaten werden Lactat, Pyruvat und Acetat während des Wachstums auf Glukose auch synthetisiert und ins Medium ausgeschieden. Deshalb wurde als nächstes die Beteiligung der Mch-Proteine an der Sekretion von Monocarboxylaten untersucht. Die Deletionsstämme *jen1* und *jen1 mch1-5* sowie der Wildtypstamm wurden in synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose angeimpft. Proben wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen und aus den Überständen die Konzentration von Pyruvat, Lactat und Acetat wie in Abschnitt 2.30 beschrieben bestimmt.



**Abb. 6: Sekretion von Acetat und Pyruvat des Wildtypstammes CEN.PK113-13D, des jen1und jen1 mch1-5-Deletionsstammes.** CEN.PK113-13D (blau), der *mch1-5*-Deletionsstamm (rot) und der *jen1 mch1-5*-Deletionsstamm (gelb) wurden mit einer Anfangs-OD<sub>600</sub> von 0,5 in synthetischem Minimalmedium mit Uracil und 2% Glukose bei 30°C inkubiert. Proben wurden zu Zeitpunkten verschiedener optischer Zelldichten entnommen und zur Bestimmung der Acetat- und Pyruvatkonzentration (mM) eingesetzt.

Eine Lactatsekretion konnte in keinem der getesteten Stämme nachgewiesen werden. Hingegen konnte eine Zunahme der Konzentration von Pyruvat und

Acetat gemessen werden. Abb. 6 zeigt, daß sowohl die *mch1-5*-Mutante als auch die *jen1 mch1-5*-Mutante Acetat und Pyruvat in Mengen ähnlich denen des Wildtyps ausschieden. Die Sekretion von Acetat und Pyruvat schien daher weder durch die Deletion der *MCH*-Gene noch durch die zusätzliche Deletion von *JEN1* beeinträchtigt zu sein. Die Beteiligung der untersuchten putativen Monocarboxylattransporter der Hefe an der Pyruvat- und Acetatsekretion konnte aufgrund dieser Ergebnisse ausgeschlossen werden.

#### 3.1.4 Untersuchung der Lokalisation der Mch-Proteine

Wie bereits in der Einleitung erwähnt erinnert die aufgrund der Aminosäuresequenz vorhergesagte Struktur der Mch-Proteine an die Struktur von Transportproteinen. Transportproteine können nicht nur in der Plasmamembran, sondern auch in anderen intrazellulären Membranen lokalisiert sein. Sie vermitteln den Stoffaustausch zwischen dem Zytoplasma und der Umwelt bzw. den Organellen.

Um die Lokalisation der Mch-Proteine zu bestimmen, wurde die Sequenz des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) aus *Aequorea victoria* an die C-terminalen Enden jedes *MCH*-ORFs fusioniert. Die Fusion wurde nach der in Abschnitt 2.19 beschriebenen Methode durchgeführt. Die resultierenden Plasmide pM25-MCHx-GFP wurden in den Stamm CEN.PK113-13D transformiert und die Transformanten fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

Abb. 7 zeigt, daß alle Mch-GFP-Proteine eine intrazelluläre Lokalisation aufweisen. Für Mch1, Mch2 und Mch5 konnte die Lokalisation mittels GFP-Fusion nicht genauer bestimmt werden, da sich nicht eindeutig ein Kompartiment der Lokalisation der Protein-GFP-Fusion zuweisen ließ. Mch4-GFP hingegen ließ aufgrund der zirkulären Anordnung des Proteins eine Lokalisation in der Membran der Vakuole vermuten, da die erhaltene Struktur der einer Vakuole in der späten Wachstumsphase glich. Das Mch3-GFP-Fusionsprotein schien in der Membran der Mitochondrien lokalisiert zu sein, wie anhand der Grünfluoreszenz der Protein-GFP-Fusion im Vergleich zur DAPI-Färbung deutlich wurde.



**Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation der Mch-Proteine.** Der Hefestamm CEN.PK113-13D mit den Plasmiden pM25-MCH1-GFP bis pM25-MCH5-GFP wurde für drei Stunden in synthetischem Komplettmedium mit 2% Glucose ohne Uracil und Methionin bei 30°C inkubiert (A). Für die DAPI-Färbung wurde zu den Zellen 30 min vor dem Ernten eine 1µg/ml DAPI-Lösung zugegeben (**B**).

#### 3.1.4.1 Genauere Untersuchung der Lokalisation von Mch4

Die mittels der Mch4-GFP-Fusion beobachtete Lokalisation von Mch4 in der Vakuolenmembran sollte mittels einer weiteren Nachweismethode bestätigt werden. Zu diesem Zweck sollte die Vakuolenmembran isoliert und anschließend Mch4 immunologisch nachgewiesen werden. Für den immunologischen Nachweis von Mch4 sollte zunächst ein spezifisches Antiserum hergestellt werden. Dafür wurde ein 15 Aminosäure umfassendes Epitop (Aminosäuren 66-80) des Mch4-Proteins für die Herstellung eines charakteristischen Peptids ausgewählt. Die Immunisierung von Kaninchen und die Gewinnung des polyklonalen Antiserums wurde von der Firma Dianova in Hamburg durchgeführt. Die Spezifität des Antiserums wurde in einer Western-Analyse getestet. Dafür wurde der mch4-Deletionsstamm und der Wildtypstamm in synthetischem Komplettmedium mit 2% Glukose bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 herangezogen. Anschließend wurden Gesamtproteinrohextrakte hergestellt. Durch die folgende Western-Analyse unter Verwendung des hergestellten Antiserums gegen Mch4 sollte eine Mch4spezifische Bande im durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteinextrakt des Wildtypstammes detektiert werden, die im mch4-Deletionsstamm fehlen sollte. Jedoch konnte Mch4 nicht nachgewiesen werden, da das Antiserum offensichtlich sehr unspezifisch mit vielen Hefeproteinen reagierte (nicht dargestellt). Auch nach der sich anschließenden Antikörper-Aufreinigung (2.23) konnten die unspezifischen Bindungen nicht soweit limitiert werden, daß eine Mch4-spezifische Bande detektierbar wurde.

Um auszuschließen, daß Mch4 aufgrund seiner geringen Expression nicht nachweisbar gewesen war, wurde es überexprimiert. Dafür wurde *MCH4* auf ein 2µ-Plasmid hinter den konstitutiven, verkürzten *HXT7*-Promotor kloniert, der eine starke Expression der durch ihn regulierten Gene bewirkt (2.17). Jedoch konnte auch nach dieser starken Überexpression keine Bande in der nachfolgenden Western-Analyse Mch4 zugeordnet werden.

Da eine Detektion des Mch4-Proteins durch Verwendung des Antiserums nicht möglich war, sollte Mch4 mit einem HA- bzw. His<sub>6</sub>-Epitop markiert werden, das einen späteren Nachweis mit spezifischen monoklonalen Antikörpern erlaubt. Für die genomische HA-Markierung des Mch4-Proteins wurde die dreifache Ausführung eines Teils des Hämagglutinins (3x HA) wie unter 2.18 beschrieben gegen das Stopcodon von *MCH4* ausgetauscht. Die plasmidkodierte Fusion des *MCH4*-ORFs an ein His<sub>6</sub>-Epitop erfolgte wie in Abschnitt 2.17 beschrieben. Jedoch war auch ein Nachweis des HA- bzw. His<sub>6</sub>-Epitop-markierten Mch4-Proteins nicht möglich, obwohl der anti-HA- bzw. anti-His<sub>6</sub>-Antikörper bei einem HA- bzw. His<sub>6</sub>-fusionierten Kontrollprotein ein Signal zeigte. Die mögliche Lokalisation von Mch4 in der Vakuolenmembran konnte somit durch einen immunologischen Nachweis von Mch4 nicht näher untersucht werden.

#### 3.1.4.2 Genauere Untersuchung der Lokalisation und Funktion von Mch3

Auch die mitochondriale Lokalisation von Mch3 sollte durch weitere Versuche bestätigt werden. Dafür wurde eine genomische, C-terminale *MCH3*-HA-Fusion wie in Abschnitt 2.18 beschrieben hergestellt. Hierbei wurde das dreifache HA-Epitop durch homologe Rekombination gegen das Stopcodon von *MCH3* so ausgetauscht, daß es sich im Leserahmen der *MCH3*-Sequenz befand. Durch die Zellfraktionierung der *MCH3*-HA exprimierenden Zellen (nach Gawaz *et al.,* 1990) und die anschließende Western-Blot-Analyse mit HA-Antikörpern konnte Mch3-HA in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 8, Versuch und persönliche Mitteilung von M. Schauen; Makuc *et al.,* 2000).



Abb. 8: Nachweis der Lokalisation von Mch3-HA in den Mitochondrien (von M. Schauen aus Makuc et al., 2001). Mch3-HAexprimierenden Zellen wurden einer subzelluläre Fraktionierung und anschließend einer Western-Blot-Analyse mittels HA-Antikörper unterzogen. Jede aufgetragene Fraktion enthielt 10 µg Protein. 1: Protoplasten; 2: Pellet der Niedriggeschwindigkeitszentrifugation, enthält lysierte und unlysierte Protoplasten; 3: Überstand der Niedriggeschwindigkeitszentrifugation, enthält den Überstand der Protoplasten; 4: Überstand der ersten Hochgeschwindigkeitszentrifugation, enthält das Cytoplasma; 5: Pellet der ersten Hochgeschwindigkeitszentrifugation, enthält die Mitochondrienfraktion; 6: Pellet der Hochgeschwindigkeitszentrifugation, zweiten enthält gewaschene Mitochondrien.

Aufgrund der mitochondrialen Lokalisation von Mch3 und der Induktion der *MCH3*-Transkription durch aromatische Aminosäuren war es denkbar, daß *MCH3* einen Aminosäuretransporter der Mitochondrien kodiert, der aromatische Aminosäuren transportiert. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die Aufnahme von Tryptophan in isolierten Mitochondrien gemessen. Da auch für andere *MCH*-Gene eine Induktion durch aromatische Aminosäuren und eine intrazelluläre Lokalisation nachgewiesen werden konnte (s. 3.1.2.2, 3.1.4), wurde die Tryptophanaufnahme in isolierten Mitochondrien des *mch1-5*-Deletionsstammes im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt. Die Tryptophanaufnahmemessungen zeigten jedoch keinen Unterschied zwischen dem Wildtyp CEN.PK113-13D und der *mch1-5*-Mutante (durchgeführt von M. Schauen). Somit kann davon ausgegangen werden, daß weder Mch3 noch ein anderes Mch-Protein ein mitochondrialer Tryptophantransporter ist.

# 3.2 Untersuchung von heterologen Monocarboxylattransportern in *S. cerevisiae*

Die Untersuchung und Charakterisierung der Monocarboxylattransporter aus Säugern gewinnt immer mehr an Bedeutung. Ihre Erforschung soll die Aufklärung und Behandlung einiger Krankheiten ermöglichen, die ihre Ursache in der Disfunktion der Monocarboxylattransporter zu haben scheinen. So ist der gestörte Lactattransport in den Erythrozyten und eine dadurch verursachte Schädigung der Muskulatur in einer Mutation des Monocarboxylattransporter MCT1 begründet (Merezhinskaya et al., 2000). Der verminderte Rückgang der Lactatkonzentration in den Muskeln nach einer Muskelbeanspruchung wurde ebenfalls auf einen Defekt in einem der Monocarboxylattransporter zurückgeführt (Fishbein, 1986). Die genauere Untersuchung von Monocarboxylattransportern ist daher von entscheidender Bedeutung. Die Untersuchung der Transporter in Geweben, in denen sie natürlicherweise auftreten, ist häufig mit Schwierigkeiten verbunden, wie z.B. durch Interferenzen mit endogenen Isoformen. Um solche Probleme zu umgehen, werden heterologe Expressionssysteme verstärkt eingesetzt. Neben dem Einsatz von Zellkulturen, Xenopusoocyten und der Rekonstitution von Transportern in Liposomen gewinnt die Hefe als heterologes Expressionssystem mehr und mehr an Bedeutung. Jedoch treten auch in diesem System einige Schwierigkeiten auf wie z.B. die Expression inaktiver Proteine oder die Retention der Transporter in intrazellulären Strukturen. Ziel der Arbeit war es deshalb, ein heterologes Expressionssystem zu schaffen, in dem Monocarboxylattransporter funktionell in der Plasmamembran exprimiert werden, so daß eine anschließende Charakterisierung derselben erfolgen kann.

#### 3.2.1 Expression von MCT1 und MCT2 aus Ratte in der jen1-Mutante

Der im Rahmen dieser Arbeit konstruierte *jen1*-Deletionsstamm stellte ein hilfreiches System für die Charakterisierung von heterologen Monocarboxylattransportern dar, da die *jen1*-Mutante einen deutlichen Defekt beim Wachstum auf Pyruvat und Lactat zeigte (Abb. 4). Für diese beiden Monocarboxylate konnte bei den Monocarboxylattransportern MCT1-MCT4 der Säuger eine Transportaktivität nachgewiesen werden (Juel und Halestrap, 1999; Yoon *et al.*, 1997). Gelingt eine funktionelle Expression der Monocarboxylattransporter der Säuger im *jen1*-Deletionsstamm, kann dies durch die Komplementation des Wachstumsdefekts der *jen1*-Mutante auf Pyruvat und Lactat festgestellt werden. Der *jen1*-Deletionsstamm sollte deshalb für die Charakterisierung der Monocarboxylattransporter MCT1 und MCT2 der Ratte genutzt werden. Die MCT-Gene wurden vom Plasmid pSPORTrMCT1 bzw. pBSrMCT2 mit den Oligonukleotiden RMCT1-F7/RMCT1-R bzw. RMCT2-F7/RMCT2-R amplifiziert. Durch *in vivo*-Rekombination wurden sie jeweils hinter den verkürzten *HXT7*-Promotor des Plasmids p426HXT7-6HIS unter Aussparung der sechsfachen Histidinsequenz kloniert. Dazu wurden die PCR-Produkte zusammen mit dem *Hpal/Hind*IIIgeschnittenen Vektor p426HXT7-6HIS in Hefe transformiert. Die erhaltenen Plasmide pHXT7-rMCT1 und pHXT7-rMCT2 wurden wie in 2.8.2 beschrieben präpariert und durch Sequenzierung unter Verwendung der Oligonukleotide SEQrM131 für pHXT7-rMCT1 und SEQrM261 für pHXT7-rMCT2 überprüft. Anschließend wurden die Plasmide einzeln in den *jen1*-Deletionsstamm transformiert. Die Transformanten wurden auf synthetischem Minimalmedium mit Uracil und 2% Pyruvat oder Lactat ausgestrichen. Nach einer achttägigen Inkubation bei 30°C zeigte sich, daß weder die Expression von MCT1 noch von MCT2 den Wachstumsdefekt der *jen1*-Mutante auf einer der beiden Kohlenstoffquellen komplementieren konnte (nicht dargestellt).

#### 3.2.2 Koexpression von MCT1 und MCT2 mit CD147 in der jen1-Mutante

Wie sich später herausstellte, ist die funktionelle Expression von einigen Monocarboxylattransportern in Säugerzellinien abhängig von der Koexpression des CD147-Proteins, einem Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie (Kirk *et al.,* 2000). Es konnte gezeigt werden, daß CD147 mit MCT1 und MCT4 kolokalisiert. Außerdem führte die Koexpression von CD147 und MCT1 oder MCT4 zur 3-4-fachen Steigerung des Lactattransports in den transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Lokalisation und Transportaktivität von MCT2 schien dagegen durch die gleichzeitige Expression von CD147 nicht beeinflußt zu sein.

Aufgrund dieser Untersuchungen wurde auch im *jen1*-Deletionsstamm versucht, die funktionellen Expression von MCT1 durch Koexpression von CD147 zu erreichen. Dafür wurde CD147 durch *in vivo*-Rekombination hinter den verkürzten *HXT7*-Promotor des Plasmids p423HXT7-6HIS unter Aussparung der Histidinsequenz kloniert. Die Oligonukleotide CD147-F7 und CD147-R wurden zur Amplifikation des CD147-Gens vom Plasmid pCI-neo-CD147 verwendet. Zusammen mit dem *Hpal/Hind*III-geschnittenen Vektor wurde das erhaltene PCR-Produkt in die Hefe transformiert und das nach homologer Rekombination resultierende Plasmid wie in 2.8.2 beschrieben isoliert. Das erhaltene Plasmid p423HXT7-CD147 wurde durch Sequenzierung unter Verwendung der Oligonukleotide hxt7-seq und seqcyc1 überprüft. Nach der Deletion von *JEN1* im Stamm CEN.PK113-2C wurden die Plasmide p423HXT7-CD147 und pHXT7-rMCT1 zusammen in die neu konstruierte *jen1*-Mutante (JMY73) transformiert.

Nach einer einwöchigen Inkubation der Transformanten auf synthetischem Minimalmedium mit Tryptophan, Leucin und 0,5% Lactat bei 30°C zeigte sich, daß durch die Koexpression von MCT1 und CD147 ein verbessertes Wachstum der *jen1*-Mutante auf Lactat erreicht wurde (nicht dargestellt). Wachstumstests in flüssigem synthetischen Minimalmedium bestätigten dieses Ergebnis.



Abb. 9: Wachstum des *jen1*-Deletionsstammes mit Koexpression von MCT1 und CD147 in synthetischem Minimalmedium mit 0,5% Pyruvat. Der *jen1*-Deletionsstamm mit den Plasmiden pHXT7-rMCT1 und p423HXZ7-CD147 ( $\blacklozenge$ , blau), den Plasmiden p423HXT7-CD147 und p426HXT7-6HIS ( $\blacksquare$ , rot), den Plasmiden pHXT7-rMCT1 und p423HXT7-6HIS ( $\blacktriangle$ , gelb) und den Plasmiden p426HXT7-6HIS und p423HXT7-6HIS ( $\blacklozenge$ , grün) wurde über Nacht in synthetischem Komplettmedium ohne Uracil und Histidin mit 0,2% Glukose herangezogen. Nach dem Waschen mit synthetischem Medium ohne Kohlenstoffquelle wurden sie in synthetisches Minimalmedium mit Tryptophan, Leucin und 0,5% Pyruvat mit einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,2 umgeimpft. Jeden Tag wurden 1-2 Proben zur Bestimmung der OD<sub>600</sub> entnommen.

Wie Abb. 9 zu entnehmen ist zeigte schon die *jen1*-Mutante, die nur MCT1 exprimierte, in flüssigem synthetischen Minimalmedium mit 0,5% Pyruvat einen Wachstumsvorteil gegenüber dem *jen1*-Deletionsstamm, der keinen zusätzlichen Monocarboxylattransporter exprimierte. Durch die Koexpression von CD147 zu MCT1 im *jen1*-Deletionsstamm wurde jedoch eine deutliche Wachstumssteigerung im Vergleich zur MCT1-Einzelexpression im *jen1*-Deletionsstamm auf Pyruvat erreicht.

Der in Abb. 9 dargestellte Wachstumstest konnte nur mit Pyruvat als Kohlenstoffquelle durchgeführt werden, da keiner der getesteten Stämme auf gleichem Medium mit Lactat als Kohlenstoffquelle wuchs. Die Diskrepanz des Wachstums in flüssigem Medium und des fehlenden Wachstums auf Agarplatten wurde jedoch schon häufiger beobachtet (s. 4.2.2.4). Weitere Schwierigkeiten zeigte sich darin, daß zum einen der *jen1*-Deletionsstamm schon ohne Expression eines funktionellen Monocarboxylattransporters ein sehr langsames Wachstum zeigte, zum anderen das Wachstum auf Pyruvat als Kohlenstoffquelle langsam war, was beides die Feststellung von Wachstumsunterschieden erschwerte.

#### 3.2.3 Konstruktion eines Pyruvat-auxotrophen Stammes

Die Nutzung der von Hefe schlecht verwertbaren Kohlenstoff- und Energiequelle Pyruvat hatte ein langsames Wachstum der Stämme zur Folge, die Pyruvat als Kohlenstoffquelle nutzen. Auch die Verwendung hoher Pyruvatkonzentrationen erschwert die Wachstumsversuche, da der *jen1*-Deletionsstamm auf solchen Medien langsam wachsen konnte. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, daß das verwendete Pyruvat nicht rein war, sondern geringe Mengen einer anderen Kohlenstoffquelle enthielt. Zum anderen ist es denkbar, daß einige der im Medium enthaltenen Aminosäuren als Kohlenstoffquelle verwendet werden konnten. Die Beurteilung, ob eine Komplementation des Wachstumsdefekts der *jen1*-Mutante auf Pyruvat durch Expression heterologer Monocarboxylattransporter erreicht wurde, war daher schwierig. Aus diesem Grund wurde im folgenden eine Pyruvat-auxotrophe Mutante konstruiert, die Pyruvat nur als Supplement für die Synthese von Alanin, Valin, Leucin und Isoleucin und damit nur in geringen Konzentrationen benötigt. Für die Konstruktion einer Pyruvat-auxotrophen Mutante mußten die Gene *PYK1* und *MAE1* deletiert werden.

Wie Abb. 10 zeigt, sind bei Wachstum auf Ethanol die von Pyk1 und Mae1 katalysierten Reaktionen die einzigen, in denen Pyruvat als Endprodukt gebildet wird (Burke *et al.*, 1983; Boles *et al.*, 1998). Pyk2, das Isoenzym von Pyk1, kann die Funktion des Enzyms Pyk1 nicht ersetzen und spielt nur eine untergeordnete, noch nicht vollständig aufgeklärte Rolle bei der Herstellung des Pyruvats (Boles *et al.*, 1993, 1997; Ciriacy *et al.*, 1979). Da Pyruvat die Vorstufe der Aminosäuren Alanin, Valin, Isoleucin und Leucin ist, ist das Wachstum einer *pyk1 mae1*-Mutante auf Ethanol-haltigem Medien ohne Pyruvat nicht möglich. Die Mutante ist Pyruvat-auxotroph. Erst durch die Zugabe von Pyruvat oder Alanin kann ein Wachstum ermöglicht werden. Wird in der *pyk1 mae1*-Mutante zusätzlich der Pyruvattransporter *JEN1* deletiert, sollte auch nach Zugabe von Pyruvat kein wachstum mehr stattfinden. Der *pyk1 mae1 jen1*-Deletionsstamm sollte sich somit hervorragend für die Überprüfung der funktionellen Expression von heterologen Lactat- und Pyruvattransportern eignen. Durch die Verwendung von Ethanol als Kohlenstoffquelle und einem Bedürfnis nur geringer Pyruvat-

konzentrationen sollte zum einen ein schnelleres Wachstum als auf Pyruvat als Kohlenstoffquelle erfolgen. Zum anderen sollte ein deutlicher Wachstumsunterschied zwischen der Komplementation und der nicht erfolgten Komplementation des Wachstumsdefekts der *pyk1 mae1 jen1*-Mutante durch die Expression von heterologen Monocarboxylattransportern erkennbar sein.



Abb. 10: Schematische Darstellung der Pyruvatbildung durch das Malatenzym (Mae1) und die Pyruvatkinase (Pyk1). Pyruvat entsteht aus der Umwandlung des Phosphoenolpyruvats durch die Pyruvatkinasen (Pyk1, Pyk2). Phosphoenolpyruvat ist zum einen ein Zwischenprodukt der Glykolyse, zum anderen entsteht es durch die Decarboxylierung des Oxalacetats durch die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (Pck). Das Malatenzym (Mae1) decarboxyliert Malat zu Pyruvat.

Aufgrund dieser Überlegungen wurde im *jen1*-Deletionsstamm (JMY73) zuerst das *MAE1*-Gen durch die in Abschnitt 2.15.1 beschriebene Gendeletionsmethode mittels *loxP*/Cre-Rekombinasesystem deletiert. Anschließend wurde unter Verwendung eines Deletionsplasmids das *PYK1*-Gen deletiert (2.15.3). In den resultierenden *jen1 pyk1 mae1*-Deletionsstamm wurden die Plasmide p423HXT7-CD147 und pHXT7-rMCT1 bzw. pHXT7-rMCT2 kotransformiert. Das Wachstum der Transformanten wurde anschließend auf Medium mit Ethanol als Kohlenstoff-quelle und unterschiedlichen Pyruvatkonzentrationen untersucht (Abb. 11).



Abb. 11: Wachstum des *pyk1 mae1 jen1*-Deletionsstammes mit exprimiertem CD147 und MCT1 bzw. MCT2. Der *pyk1 mae1 jen1*-Deletionsstamm mit den Plasmiden p423HXT7-CD147 und pHXT7-rMCT1, p423HXT7-CD147 und pHXT7-rMCT2, p423HXT7-6HIS und pHXT7-rMCT1 oder p423HXT7-6HIS und pHXT7-rMCT2 und der *pyk1 mae1*-Deletionsstamm wurden auf Agarplatten mit synthetischem Minimalmedium mit Tryptophan, 2% Ethanol und den angegebenen Pyruvatkonzentrationen ausgestrichen. Dargestellt ist das Wachstum der Stämme nach einer Inkubation von vier Tagen bei 30°C.

Die *pyk1 mae1 jen1*-Mutante, die keine Monocarboxylattransporter exprimierte, konnte auf den verwendeten Medien nicht wachsen. Es zeigte sich jedoch, daß durch die Koexpression von MCT1 und CD147 in der *pyk1 mae1 jen1*-Mutante die Pyruvat-Auxotrophie komplementiert werden konnte. Das Wachstum dieser Transformante war vergleichbar mit dem Wachstum der *pyk1 mae1*-Mutante, die als positive Wachstumskontrolle zusätzlich ausgestrichen worden war. Da sie den Pyruvattransporter Jen1 exprimiert, konnte sie auf allen verwendeten Medien wachsen. Die alleinige Expression von MCT1 ermöglichte auch eine Komplementation des Wachstumsdefekts, jedoch war das Wachstum im Vergleich zur Koexpression mit CD147 langsamer. Das Wachstum der *pyk1 mae1 jen1*-Mutante, die MCT2 und CD147 koexprimierte, war sehr langsam. Die *pyk1 mae1* 

*jen1*-Mutante, die nur MCT2 exprimierte, konnte hingegen auf allen getesteten Medien nicht wachsen. Bezüglich der unterschiedlichen verwendeten Pyruvatkonzentrationen war das Wachstum mit steigender Pyruvatkonzentration schneller.



Abb. 12: Wachstum des *pyk1 mae1 jen1*-Deletionsstammes mit Koexpression von MCT1 und CD147. Der *pyk1 mae1 jen1*-Deletionsstamm mit den Plasmiden p423HXT7-CD147 und pHXT7-rMCT1 ( $\blacklozenge$ , blau) bzw. mit den Plasmiden p423HXT7-6HIS und pHXT7-rMCT1 ( $\bigstar$ , gelb) bzw. mit den Plasmiden p423HXT7-6HIS und p426HXT7-6HIS ( $\blacklozenge$ , grün), sowie der *pyk1 mae1*-Deletionsstamm ( $\blacksquare$ , rot) wurden in synthetischem Minimalmedium mit Tryptophan, 2% Ethanol und 10 mM Alanin herangezogen. Nach dem Waschen in synthetischem Minimalmedium ohne Zusätze wurden sie in synthetischem Minimalmedium mit Tryptophan, 2% Ethanol und 10 mM Pyruvat (**B**) mit einer OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft. Proben wurden jeden Tag zur Bestimmung der OD<sub>600</sub> gezogen.

Das Wachstumsverhalten der Mutanten konnte in flüssigem Medium bestätigt werden (Abb. 12). Auch hier zeigte sich, daß die alleinige Expression von MCT1 eine ausreichende Pyruvataufnahme für die Komplementation der Pyruvat-Auxotrophie der *pyk1 mae1 jen1*-Mutante ermöglichte. Eine scheinbare Steigerung des Pyruvattransports und ein damit verbundenes besseres Wachstum erfolgte durch die zusätzliche Expression von CD147. Die Versuche mit der *pyk1 mae1 jen1*-Mutante bestärkten die Annahme, daß CD147 eine Art Hilfsprotein darstellt, das in die funktionelle Expression von Monocarboxylattransportern involviert ist. Da die *pyk1 mae1 jen1*-Mutante ohne Expression eines Monocarboxylattransporters nicht in der Lage war, auf den verwendeten Medien zu wachsen, stellt sie ein ideales System zur Untersuchung der funktionellen Expression von heterologen Lactat- und Pyruvattransportern dar.

## 3.2.4 Bestimmung der Aufnahme von Monocarboxylaten im MCT1-Einzelexpressionsstamm und MCT1-CD147-Koexpressionsstamm

Im folgenden sollte der Transport von Monocarboxylaten über die Plasmamembran der *jen1*-Mutante untersucht werden. Dabei sollte ermittelt werden, ob und inwieweit der Transport von Pyruvat und Lactat durch die zusätzliche Expression des Monocarboxylattransporters MCT1 und durch die Koepression von CD147 und MCT1 verändert wird.

Zuerst wurde der Transport von unterschiedlichen Konzentrationen radioaktivmarkiertem [2<sup>14</sup>C]-Pyruvat im *jen1*-Deletionsstamm gemessen, der keinen Monocarboxylattransporter exprimierte. Um die Auswirkung der Expression eines heterologen Monocarboxylattransporters auf den Transport von Pyruvat im *jen1*-Deletionsstamm zu ermitteln, wurde der Pyruvattransport in der *jen1*-Mutante bestimmt, die nur MCT1 exprimierte als auch in der *jen1*-Mutante, die MCT1 und CD147 exprimierte. Alle Stämme wurden in synthetischem Komplettmedium ohne Uracil und Histidin mit 0,2% Glukose herangezogen.



<i>jen1</i> -Mutante mit den Plasmiden:	V <sub>max</sub> [nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> TG]	K <sub>m</sub> [mM]
p423HXT7-CD147+ pHXT7-rMCT1	0,85	0,38
p423HXT7-6HIS+ pHXT7-rMCT1	0,22	0,12

Abb. 13: Eadie-Hofstee Plot der Pyruvataufnahme des *jen1*-Deletionsstammes mit MCT1-Einzelexpression und MCT1-CD147-Koexpression. Die *jen1*-Mutante mit den Plasmiden p423HXT7-CD147 und pHXT7-rMCT1 ( $\blacklozenge$ , blau), den Plasmiden p423HXT7-6HIS und pHXT7rMCT1 ( $\blacktriangle$ , gelb) und den Plasmiden p423HXT7-6HIS und p426HXT7-6HIS ( $\blacklozenge$ , grün) wurden über Nacht in synthetischem Komplettmedium mit 0,2% Glukose ohne Uracil und Histidin bei 30°C bis zu einer Zelldichte von OD<sub>600</sub>=1 herangezogen. Der Pyruvattransport wurde durch 10 s Influx-Messungen mit radioaktivmarkiertem Pyruvat bestimmt.

Wie aus Abb. 13 ersichtlich ist, scheint in der *jen1*-Mutante kein Pyruvattransport vorgelegen zu haben, da die Meßwerte ungefähr der Diffusion des undissoziierten Pyruvats entsprechen. Der *jen1*-Deletionsstamm, der nur MCT1 exprimierte,
zeigte eine geringe Pyruvattransportaktivität. Der ermittelte  $V_{max}$  betrug 0,22 nmol min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>TG. Für die *jen1*-Mutante, die MCT1 und CD147 koexprimierte, wurde hingegen ein  $V_{max}$  von 0,85 nmol/min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> TG ermittelt. Somit konnte geziegt werden, daß durch die Koexpression von MCT1 und CD147 in der *jen1*-Mutante der Pyruvattransport deutlich gesteigert werden konnte.

Anschließend sollte der Lactattransport in der *jen1*-Mutante, die keinen Monocarboxylattransporter exprimierte, und in der *jen1*-Mutante, die MCT1 allein bzw. mit CD147 exprimiert, untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen in synthetischem Komplettmedium ohne Uracil und Histidin mit 2% Glukose herangezogen. Anschließend wurde die Lactataufnahme über einen Zeitraum von 10 min unter Verwendung radioaktivmarkiertem Lactat verfolgt (2.30.2).



Abb. 14: Lactataufnahme des *jen1*-Deletionsstammes mit MCT1-Einzelexpression und MCT1-CD147-Koexpression über einen Zeitraum von 10 min. Die *jen1*-Mutante mit den Plasmiden p423HXT7-CD147 und pHXT7-rMCT1 ( $\blacklozenge$ , blau), den Plasmiden p423HXT7-6HIS und pHXT7-rMCT1 ( $\blacklozenge$ , gelb) und den Plasmiden p423HXT7-6HIS und p426HXT7-6HIS ( $\blacklozenge$ , grün) wurden über Nacht in synthetischem Komplettmedium mit 2% Glukose ohne Uracil und Histidin bei 30°C bis zu einer Zelldichte von OD<sub>600</sub>=1 inkubiert. Proben wurden in unterschiedlichen Abständen entnommen und die intrazelluläre Konzentration des radioaktiven Lactat wurde bestimmt.

Im *jen1*-Deletionsstamm, der keinen Monocarboxylattransporter exprimierte, lag nur eine sehr geringe Lactataufnahme vor (Abb. 14), die entweder aufgrund von Diffusion erfolgte oder von einem unbekannten Transporter mit einer Transportaktivität für Lactat vermittelt wurde. Im *jen1*-Deletionsstamm mit MCT1-Einzelexpression konnte hingegen eine höhere Transportrate des Lactats ermittelt werden, was sich in der Steigung der Geraden widerspiegelt. Durch Koexpression von MCT1 und CD147 konnte eine zusätzliche Steigerung des Lactattransports im Vergleich zum MCT1-Einzelexpressionsstamm erreicht werden. Dies wird bei Betrachtung der Zunahme der internen Lactatkonzentration bis zum Zeitpunkt von 4 min deutlich. Anschließend war die Zunahme der Lactatkonzentration im Inneren der Zelle, und damit der Transport von Lactat, vergleichbar mit der Zunahme in der *jen1*-Mutante, in der nur MCT1 exprimiert wurde. Die zusätzliche Expression von CD147 zu MCT1 bewirkt demnach in der *jen1*-Mutante nicht nur einen gesteigerten Pyruvattransport (s. Abb. 13), sondern auch einen gesteigerten Lactattransport.

#### 3.2.5 Untersuchung der Lokalisation von MCT1

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, daß durch die zusätzliche Expression des Glykoproteins CD147 zum Monocarboxylattransporter MCT1 der Transport von Pyruvat und Lactat deutlich gesteigert werden konnte. Dabei blieb jedoch ungeklärt, ob CD147 die Translokation oder Funktionalität des Monocarboxylattransporters beeinflußte. Bei der Verwendung von Säugerzellinien zur Untersuchung der MCT1-Lokalisation beobachtete Kirk et al. (2000) bei alleiniger Expression von MCT1 eine Retention des Proteins in perinukleären Strukturen, wie dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi-Apparat. Hingegen zeigte die Koexpression von MCT1 und CD147 eine Lokalisation des MCT1-Proteins in der Plasmamembran. Diese Beobachtung deutet demnach auf eine Funktion von CD147 bei der MCT1-Translokation von den intrazellulären Strukturen des Sekretionsapparates zur Plasmamembran hin. Auch bei der heterologen Expression des Monocarboxylattransporters in der Hefe wäre eine ähnliche Funktion von CD147 denkbar. Dies sollte durch die Untersuchung der MCT1-Lokalisation bei zusätzlicher Expression von CD147 bzw. bei alleiniger Expression von MCT1 aufgeklärt werden.

#### 3.2.5.1 Untersuchung der MCT1-Lokalisation durch GFP-Fusionsproteine

Um die Lokalisation von MCT1 und CD147 zu untersuchen, wurde die kodierende Sequenz des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) an die C-terminalen Enden des MCT1- bzw. CD147-Proteins fusioniert. Die Fusion wurde nach der in Abschnitt 2.16 beschriebenen Methode durchgeführt. Beide Gene wurden mittels PCR und den Oligonukleotiden FgfprM1/RgfprM1 bzw. FgfpCD/RgfpCD amplifiziert. Das PCR-Produkt von MCT1 wurde zusammen mit dem *Eco*RI-linearisierten Vektor pMET25-GFP in die Hefe transformiert. Das PCR-Produkt von CD147 wurde mit dem *Not*I-linearisierten Vektor p424MET25-GFP in die Hefe transformiert. Die erhaltenen Plasmide p426MET25-rMCT1-GFP und p424MET25-

Restriktionsanalyse CD147-GFP wurden isoliert und durch überprüft. Anschließend wurden sie sowohl zusammen als auch einzeln in den jen1-Deletionsstamm (JMY73) transformiert. Die Expression der Fusionsplasmide, die der Kontrolle des MET25-Promotors unterlagen, wurde durch Inkubation der Transformaten in synthetischem Medium ohne Methionin induziert. Durch Fluoreszenzmikroskopie wurde die Lokalisation der Fusionsproteine untersucht. Eine CD147-Lokalisation war nicht auszumachen, da die Zellen, die das CD147-GFP-Fusionsprotein exprimierten, keine Fluoreszenz erkennen ließen. Die CD147-GFP-Fusion schien daher instabil zu sein, was wahrscheinlich einen schnellen Abbau des Proteins bewirkte. Die Lokalisation von MCT1 war unbeeinflußt von der CD147-Expression. MCT1 war sowohl bei alleiniger Expression als auch bei Koexpression von CD147 hauptsächlich in intrazellulären Strukturen lokalisiert, die dem endoplasmatischen Retikulum oder der Vakuole ähnelten. Ein sehr geringer Anteil des MCT1-Proteins war in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 15).



Abb. 15: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisation von MCT1. Die *jen1*-Deletionsstämme mit den Plasmiden p426MET25-rMCT1-GFP und p424MET25 (A) und den Plasmiden p426MET25-rMCT1-GFP und p424MET25-CD147-GFP (B) wurden für 4 h in synthetischem Komplettmedium mit 2% Glukose ohne Uracil, Tryptophan und Methionin inkubiert.

Die ermittelte MCT1-Lokalisation spiegelte somit annähernd die zuvor erhaltenen Ergebnisse der Wachstumstests und Aufnahmemessungen wider. So konnte gezeigt werden, daß die MCT1-Proteine sowohl mit als auch ohne CD147-Koexpression zu einem geringen Anteil in der Plasmamembran lokalisiert waren, wodurch der in den vorangegangenen Abschnitten (3.2.4) ermittelte Transport von Pyruvat und Lactat vermittelt werden konnte.

## 3.2.5.2 Untersuchung der MCT1-Lokalisation durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Da die Fusion des grün-fluoreszierenden Proteins an MCT1 und CD147 keine hinreichenden Aufschlüsse über die Lokalisation von MCT1 in Abhängigkeit der CD147-Expression ergab, wurde im folgenden die intrazelluläre Verteilung des MCT1-Proteins unter Zuhilfenahme der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation untersucht. Die jen1-Deletionsstämmen, in die die Plasmide pHXT7rMCT1 und p423HXT7-6HIS bzw. pHXT7-rMCT1 und p423HXT7-CD147 transformiert worden waren, wurden in synthetischem Komplettmedium ohne Uracil und Histidin mit 2% Glukose bis zur exponentiellen Phase herangezogen. Von den geernteten Zellen wurden Zellextrakte hergestellt. Die Zellen wurden unter Verwendung eines Saccharosegradienten einer subzellulären Fraktionierung unterzogen. Mittels Western-Analyse wurde das Verteilungsmuster von MCT1 untersucht. Als Markerproteine wurden Pma1 (Plasmamembran-ATPase), Alp1 (alkalische Phosphatase in der Valuolenmembran), Dpm1 (Dolichol-Phosphat-Mannose-Synthase in der Membran des endoplasmatischen Retikulum) und Pep12 (endosomales Protein der t-SNARE-Familie) verwendet. Ihre Verteilung wurde ebenfalls bestimmt.

Wie Abb. 16 A zeigt, kolokalisiert ein Teil der MCT1-Proteine sowohl bei der Koexpression von CD147 als auch ohne CD147-Expression mit Pma1, dem Markerprotein der Plasmamembran (Serrano *et al.*, 1986). Die densitometrische Analyse des Verteilungsprofils (Abb. 16 B) von MCT1 mit und ohne Koexpression von CD147 ergab, daß bei der Betrachtung der letzten beiden Fraktionen die Menge des MCT1-Proteins im Falle der CD147-Koexpression 2,4 % des Gesamtproteins von MCT1 betrug, während bei der MCT1-Einzelexpression nur 1,5 % des Gesamtproteins von MCT1 in den gleichen Fraktionen vorlagen. Das Ergebnis deutet somit darauf hin, daß die Lokalisation von MCT1 in der Plasmamembran durch die Koexpression von CD147 gefördert, aber nicht erst durch diese ermöglicht wird.

20

0

0

5

---- Pma1

20

Α



Abb. 16: Fraktionierung (A) und Fraktionierungsprofil (B) von MCT1 und verschiedener Markerproteine durch Dichtegradientenzentrifugation. Zellextrakte des *jen1*-Deletionsstammes mit den Plasmiden pHXT7-rMCT1 und p423HXT7-6HIS sowie den Plasmiden pHXT7-rMCT1 und p423HXT7-CD147 wurden mittels Saccharosegradienten fraktioniert (20-50% Saccharose, geringste Dichte in Fraktion 1). Durch SDS-PAGE und Western-Analyse wurde die Verteilung des MCT1-Proteins und der Markerproteine Pma1, Alp1, Dpm1 und Pep12 in den Fraktionen untersucht. Es wurden polyklonale Antiseren gegen MCT1 und Pma1 und monoklonale Antikörper gegen Alp1, Dpm1 und Pep12 verwendet (A). Die Western-Blots (A) wurden eingescannt und die Signalstärke mit dem Programm "NIH Image" quantifiziert. Das jeweils stärkste Signal wurde als 100% definiert (B).

10

Fraktionen

15

Der restliche Anteil der MCT1-Proteine war sowohl mit als auch ohne CD147-Expression in Fraktionen geringerer Dichte lokalisiert (Abb. 16), was auf eine Akkumulation in intrazellulären Membranstrukturen hindeutete (Kölling und Hollenberg, 1994). Hierbei zeigte das Fraktionierungsprofil von MCT1 im CD147-Koexpressionsstamm die größte Ansammlung des MCT1-Proteins in Fraktion 9 (Abb. 16 B). Im *jen1*-Deletionsstamm mit alleiniger Expression von MCT1 lag die größte Ansammlung des Transporters in Fraktion 10 vor. Demnach entsprach das Fraktionierungsprofil von MCT1 keinem Profil der verwendeten Markerproteine. Deren Verteilung war im Vergleich zur Verteilung von MCT1 in die Fraktionen höherer Dichte verschoben. Eine intrazelluläre Lokalisation von MCT1 in der Vakuolen- oder Endosomenmembran als auch in der Membran des endoplasmatischen Retikulums konnte für den Großteil der MCT1-Proteine demnach ausgeschlossen werden.

# 3.2.6 Untersuchung der möglichen Interaktion zwischen dem Monocarboxylattransporter MCT1 bzw. MCT2 und dem Glykoprotein CD147 der Ratte

Die bislang gewonnenen Daten der Wachstumstests, Aufnahmemessungen und Dichtegradientenzentrifugation deuten auf eine Interaktion zwischen den Monocarboxylattransportern der Ratte MCT1 und MCT2 und dem Ratten-Glykoprotein CD147 in der Hefe hin. In Rattenzellinien, die mit CD147 und den Monocarboxylattransportern MCT1, MCT2 bzw. MCT4 kotransfiziert wurden, konnten durch Immunopräzipitation von CD147 die Transporter MCT1 und MCT4 koimmunopräzipitiert werden, nicht aber MCT2 (Kirk *et al.*, 2000). Es sollte deshalb untersucht werden, ob auch in der Hefe eine direkte Interaktion zwischen CD147 und MCT1 bzw. MCT2 stattfindet. Dabei wurde das Split-Ubiquitin-System zur Hilfe genommen.

Das von Johnsson und Varshavsky (1994) entwickelte Split-Ubiquitin-System ermöglicht die *in vivo*-Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Anders als beim Two-Hybrid-System (Fields und Song, 1989), bei dem nur die Interaktion zwischen löslichen Proteinen untersucht werden kann, erlaubt es die Untersuchung der Interaktion zwischen Membranproteinen. Das Prinzip des Split-Ubiquitin-Systems beruht auf der Rekonstitution zweier Hälften des Ubiquitins aufgrund der Interaktion von zwei Proteinen, an die jeweils eine Hälfte des Ubiquitins fusioniert ist. Ubiquitin ist ein stark konserviertes Protein, das aus 76 Aminosäuren besteht und normalerweise an Proteine angehängt wird, um deren Degradation zu signalisieren. Es kann in zwei Teilen exprimiert werden: Einem N-terminalen Bereich (Nub), der die Aminosäuren 1 bis 37 beinhaltet, und einem C-terminalen Bereich (Cub), der die Aminosäuren 35 bis 76 enthält. An den C-terminalen Bereich ist ein Reporterprotein fusioniert. Nach der Rekonstitution des Ubiquitins wird Ubiquitin von einer Ubiquitin-spezifischen-Protease (UBP) erkannt, die sofort hinter der letzten Aminosäure des Ubiquitins, an der Ubiquitin-Polypeptid-Verbindung, schneidet, so daß das Reporterprotein frei wird. Nub und Cub werden an Proteine fusioniert, von denen die Interaktion untersucht werden soll. Da Cub und die Wildtypform des Nubs (Nub*WT*) eine hohe Affinität zueinander haben, wurde in dieser Arbeit das mutiertes Nub (Nub*G*) verwendet, welches an Position 13 anstelle des Isoleucins Glycin enthält (Johnsson und Varshavsky, 1994). Durch den Aminosäureaustausch ist die Affinität von Cub und Nub*G* verringert. Die Reassoziation von Cub und Nub*G* ist nun abhängig von der Interaktion der Proteine, an die sie fusioniert werden. Eine Interaktion kann durch den Nachweis des durch UBP abgespaltenen Reporterproteins festgestellt werden. Eine wichtige Voraussetzung für die Anwendung des Split-Ubiquitin-Systems auf Membranproteine ist die Fusionierung von Cub und Nub an das Ende der Membranproteine, das dem Cytoplasma zugewandt ist, da nur dort die benötigten UBPs vorhanden sind (Stagljar *et al.*, 1998; Stagljar und te Hessen, 2000).

Neben einem HA-Epitop (Johnsson und Varshavsky, 1994) und dem Ura3-Protein (Wittke *et al.*, 1999) wird auch der Transkriptionsfaktor Protein A-LexA-VP16 (PLV) als Reporterprotein eingesetzt (Stagljar *et al.*, 1998). Dabei erlaubt die Protein A-Sequenz von *Staphylococcus aureus*, welche zwei IgG-Bindedomänen enthält, den Nachweis des Fusionsproteins als auch des abgespaltenen Produkts durch Western-Analyse. Die LexA-VP16-Kassette enthält das gesamte DNA-Bindeprotein LexA gefolgt von der Transkriptionsaktivierungsdomäne des VP16 (Pellet *et al.*, 1985). Diese Kassette ermöglicht die Aktivierung von Reporter-proteinen, die eine LexA-Bindedomäne in der Promotorregion besitzen. Durch die Verwendung des Hefereporterstammes L40 (Stagljar *et al.*, 1998) kommt es nach der Abspaltung des Reporterproteins PLV zur Induktion der Transkription eines *lacZ*-Gens (Abb. 17). Durch einen X-Gal-Overlay-Assay oder die quantitative Bestimmung der ß-Galaktosidaseaktivität kann anschließend die Interaktion zweier Proteine ermittelt werden.



**Abb. 17: Das Prinzip des Split-Ubiquitin-Systems zur in vivo-Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen.** Bei Expression der unveränderten N-terminalen Hälfte (Nub*WT*) des Ubiquitins zusammen mit der C-terminalen Hälfte (Cub), fusioniert an das Reporterprotein (PLV), reassoziieren die Hälften zum vollständigen Ubiquitin. Das Reporterprotein wird durch die Ubiquitin-spezifischen-Proteasen abgetrennt (A). Wird die mutierte N-terminale Hälfte des Ubiquitins exprimiert, die an Position 13 anstelle des Isoleucins Glycin enthält (Nub*G*), findet keine Reassoziation statt. Das Reporterprotein wird nicht abgetrennt (B). Bei Fusion von Nub*G* an ein Protein P1 und der Fusion von Cub-PLV an ein Protein P2 reassoziieren die beiden Hälften des Ubiquitins bei der Interaktion zwischen P1 und P2. Das Reporterprotein wird abgetrennt (C). Das abgespaltene Reporterprotein gelangt durch Diffusion in den Zellkern und bindet an die lexA-Bindestellen im Promoter. Dies führt zur Aktivierung der Transkription des *lacZ*-Reportergens (D).

# 3.2.6.1 Untersuchung der direkten Interaktion zwischen CD147 und MCT1 bzw. MCT2

Für die Untersuchung der Interaktion zwischen CD147 und MCT1 bzw. MCT2 wurde der C-terminale Bereich des Ubiquitins (Cub) an den C-Terminus von CD147 und der N-terminale Bereich des Wildtyp-Ubiquitins (Nub*WT*) sowie des mutierten Ubiquitins (Nub*G*) an die N-Termini von MCT1 und MCT2 fusioniert. Die Fusion erfolgte nach der in Abschnitt 2.20.1 beschriebenen Methode durch *in vivo*-Rekombination. Die Gene MCT1, MCT2 und CD147 wurden mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide FnubM1/RNubM1, FnubM2/RNubM2 und

FcubCD/RcubCD amplifiziert. Die entstandenen PCR-Produkte von MCT1 und MCT2 wurden zum einen zusammen mit dem Sacl/Bg/II-linearisierten Vektor pNub-WT-ALG5 zum anderen mit dem Sacl/Bg/II-linearisierten Vektor pNub-G-ALG5 in die Hefe transformiert. Das PCR-Produkt von CD147 wurde mit dem *Xhol/Pst*l-linearisierten Vektor YCpGLUT4-Cub-PLV in die Hefe transformiert. Die resultierenden Plasmide pNub-WT-MCT1/2, pNub-G-MCT1/2 und YCpCD147-Cub-PLV wurden isoliert und mittels Restriktionsanalyse überprüft. Von den Plasmiden pNub-G-MCT1 und pNub-G-MCT2 wurden zwei Konstrukte isoliert. Diese unterschieden sich insoweit, daß das klonierte Gen aus zwei unabhängigen PCR-Reaktionen stammte. Diese Plasmide wurden sowohl einem Funktionalitätstest unterzogen als auch sequenziert. Für die Überprüfung der Funktionalität wurden die zwei Konstrukte des Plasmids pNub-G-MCT1 bzw. pNub-G-MCT2 jeweils mit dem Plasmid p423HXT7-CD147 in den pyk1 mae1 jen1-Deletionsstamm transformiert. Es sollte beobachtet werden, ob die Fusionsproteine bei gleichzeitiger Expression von CD147 den Wachstumsdefekt des Deletionsstammes auf synthetischem Minimalmedium mit 2% Ethanol und einer Pyruvatkonzentration von 5 mM gleichermaßen komplementieren können wie es bei MCT1 bzw. MCT2 ohne Fusion an NubG der Fall gewesen war (s. 3.2.3). Dabei stellt sich heraus, daß jeweils ein Konstrukt sowohl von pNub-G-MCT1 als auch von pNub-G-MCT2 nicht funktionell war, da es den Wachstumsdefekt nicht komplementieren konnte. Dies wurde durch das Ergebnis der Sequenzierung bestätigt. Hierbei zeigte sich, daß MCT1 eine Mutation in den letzten Basen des ORFs aufwies, was zum Wegfall des Stopcodons geführt hatte. Im Fall des fehlerhaften Konstrukts von pNub-G-MCT2 war eine zusätzliche Base im Bereich der NubG-kodierenden Sequenz eingebaut worden, was zur Verschiebung des Leserahmens geführt hatte.

Anschließend sollte die Interaktion der Monocarboxylattransporter MCT1 bzw. MCT2 mit CD147 durch X-Gal-Overlay-Assays untersucht werden. Dazu wurde das Plasmid YCpCD147-Cub-PLV mit dem funktionellen Plasmid pNub-G-MCT1 bzw. dem funktionellen Plasmid pNub-G-MCT2 in den Reproterstamm L40 kotransformiert. Als Referenz für eine Interaktion wurde das CD147-Cub-PLV-kodierende Plasmid zusammen mit dem MCT1-Nub*WT*- bzw. MCT2-Nub*WT*-kodierenden Plasmid in den gleichen Stamm transformiert. Als Kontrolle für die Funktionalität des Reportersystems diente das Plasmid pCPLV, bei dem sich Cub-PLV hinter dem *ADH1*-Promotor befindet und konstitutiv exprimiert wird. pCPLV wurde zu diesem Zweck auch in den Reporterstamm L40 transformiert. Die Basalexpression der ß-Galaktosidase und das durch den Abbau des Fusionsproteins CD147-Cub-PLV frei werdende Reporterprotein, welches auch die ß-

Galaktosidaseexpression induzieren kann, wurden zusätzlich bestimmt. Dafür wurde das Plasmid YCpCD147-Cub-PLV ohne Nub-kodierende Plasmide in den Reporterstamm transformiert. Die Transformanten wurden auf synthetischem Komplettmedium mit 2% Glucose ohne Leucin und Tryptophan ausgestrichen und nach einer Inkubation von 2 Tagen bei 30°C mit dem X-Gal-enthaltenden Aufschlußpuffer überschichtet.



Abb. 18: Bestimmung der Interaktion von CD147 und MCT1 (A) bzw. MCT2 (B) mittels X-Gal-Overlay-Assay. In den L40-Stamm wurden die angegebenen Plasmide kotransformiert. Die Transformanten wurden auf synthetischem Komplettmedium mit 2% Glukose ohne Leucin und Tryptophan für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde der X-Gal-Overlay-Assay durchgeführt.

Wie erwartet wurden die Transformanten, die Cub-PLV konstitutiv exprimierten, schon nach 2 min Inkubation bei 37°C blau (Abb. 18). Die schwache Blaufärbung der Transformanten, die nur das Plasmid YCpCD147-Cub-PLV besaßen, setzte erst nach 1 h 20 min ein. Die auf Proteininteraktion zwischen CD147 und MCT1

bzw. MCT2 zu untersuchenden Transformanten wurden kurze Zeit nach den Transformanten, die das CD147-Cub-PLV-exprimierende Plasmid zusammen mit den Nub*WT*-exprimierenden Plasmiden enthielten, blau. Bei letzteren wurde Ubiquitin aufgrund der hohen Affinität zwischen Cub und Nub*WT* auch ohne Interaktion der an sie fusionierten Proteine rekonstituiert. Die Rekonstitution von Cub und Nub*G* war dagegen abhängig von der Proteininteraktion der zu untersuchenden Proteine CD147 und MCT1 bzw. MCT2. Demzufolge konnte sowohl bei MCT1 als auch bei MCT2 eine Interaktion mit CD147 durch den X-Gal-Overlay-Assay festgestellt werden.

Ein genaueres Maß für die Interaktion zweier Proteine ist durch die quantitative Bestimmung der ß-Galaktosidaseaktivität gegeben, die im Anschluß von einigen Transformanten untersucht wurde (s. Abb. 19).



Abb. 19: Spezifische ß-Galaktosidaseaktivität (nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> Protein) der auf Interaktion zu untersuchenden Transformanten des Split-Ubiquitin-Systems. Der L40-Stamm mit den Plasmide YCp-CD147-CubPLV und pNub-G-MCT1 (rot), YCp-CD147-CubPLV und pNub-WT-MCT1 (blau), YCp-CD147-CubPLV und pNub-G-MCT2 (gelb), YCp-CD147-CubPLV und pNub-WT-MCT2 (grün) oder YCp-CD147-CubPLV und p424MET25 (schwarz) wurde in synthetischem Komplettmedium mit 2% Glukose ohne Leucin und Tryptophan bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1-2 bei 30°C inkubiert und anschließend geerntet. Nach der Herstellung der Proteinrohextrakte wurde sowohl die Proteinkonzentration (mg/ml) als auch die  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität (nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> Protein) bestimmt.

Es zeigte sich, daß die ß-Galaktosidaseaktivität des L40-Stammes, der nur das Plasmid YCpCD147-Cub-PLV besaß, sehr gering war. Das bedeutete, daß nur eine geringe Basalexpression der ß-Galaktosidase vorlag und auch die Konzentration des durch Abbau frei werdenden Reporterproteins PLV niedrig war. Die hohe Affinität von Cub und Nub*WT,* unabhängig von der Interaktion der an sie fusionierten Proteine, spiegelte sich in der hohen ß-Galaktosidaseaktivität wider. Die im Vergleich dazu etwas geringeren Aktivitäten der ß-Galaktosidase der Transformanten, die die Plasmide YCpCD147-Cub-PLV und pNub-*G*-MCT1 bzw. pNub-*G*-MCT2 besaßen, zeigten deutlich, daß sowohl MCT1 als auch MCT2 mit CD147 interagiert. Aufgrund dieses Ergebnisses scheint die Interaktion von MCT2 und CD147 sogar stärker zu sein als von MCT1 und CD147.

## 3.2.7 Untersuchung der MCT1- und MCT2-Expression in einer *erg4*-Deletionsmutante

Als nächstes sollte untersucht werden, ob eine veränderte Plasmamembranzusammensetzung in der Hefe die funktionelle heterologe Expression der Monocarboxylattransporter MCT1 und MCT2 begünstigt. MCT1 und MCT2 sind in der Plasmamembran verschiedener Zelltypen der Säuger lokalisiert (Halestrap und Price, 1999), in denen Cholesterol neben verschiedenen Phospholipiden einen wichtigen Bestandteil der Membran darstellt. In der Plasmamembran der Hefe liegt Ergosterol vor, ein funktionell und strukturell verwandtes Sterol, welches 90% des Sterolanteils der Plasmamembran ausmacht (Zweytick et al., 2000). Der Anteil von Cholesterol bzw. Ergosterol beeinflußt in der jeweiligen Membran deren Fluidität und Permeabilität. In der Hefe konnte außerdem gezeigt werden, daß die Membranzusammensetzung die Aktivität einiger Transporter beeinflußt. So verursacht eine Mutation im ERG4-Gen, welches die C-24(28)-Reduktase, das letzte Enzym der Ergosterolbiosynthese, kodiert, eine erhöhte Sensitivität gegenüber einigen Arzneimitteln (Zweytick et al., 2000). Dies wurde begründet durch die geringere Effektivität des Effluxes solcher Substanzen, der durch die membrangebundenen Pumpen der Multidrug-Resistance-Familie vermittelt wird. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß bei der Expression des CDR1 von C. albicans (Candida drug resistance) in verschiedenen erg-Mutanten von S. cerevisiae die Aktivität des Proteins erhöht wurde (Krishnamurthy und Prasad, 1999). Aufgrund dieser Hinweise war es denkbar, daß eine veränderte Membranzusammensetzung die funktionelle Expression von MCT1 und MCT2 fördert.

Deshalb wurde im Deletionsstamm *pyk1 mae1 jen1* das Gen *ERG4* deletiert. Die *pyk1 mae1 jen1*-Mutante ist Pyruvat-auxotroph und zusätzlich deletiert im Pyruvattransporter *JEN1* (s.3.2.3). Sie kann nur dann auf Ethanol-haltigem Medium mit Pyruvat wachsen, wenn in der Mutante ein funktioneller Pyruvattransporter exprimiert wird. Durch die zusätzliche Deletion von *ERG4* sollte die Synthese von Ergosterol verhindert werden. Die Deletion erfolgte nach der in

2.15.2 beschriebenen Methode. Die Deletionskassette wurde vom Plasmid pFA6a-HIS3MX mit den Oligonukleotiden S1-ERG4 und S2-ERG4 amplifiziert. Zur Überprüfung der Deletion wurden die Oligonukleotide a1-ERG4 und a4-ERG4 verwendet. In die positiven Transformanten wurden anschließend jeweils die Plasmide pHXT7-rMCT1, pHXT7-rMCT2 sowie p426HXT7-6HIS transformiert. Als Referenz für das Wachstum dieser Transformanten wurden die gleichen Plasmide und zusätzlich das leere Plasmid p423HXT7-6HIS in den Ausgangsdeletionsstamm *pyk1 mae1 jen1* transformiert. Anschließend wurden alle Transformanten auf synthetischem Minimalmedium mit 2% Ethanol und Tryptophan ausgestrichen, das zusätzlich noch Pyruvat in den Konzentrationen 5 mM bzw. 50 mM enthielt. Als Kontrolle wurde die *pyk1 mae1*-Mutante ausgestrichen, die aufgrund der Expression des Jen1-Pyruvattransporters auf dem verwendeten Medium wachsen kann.

Genotyp	Plasmid 1	Plasmid 2	Wachstum auf SME + 5 mM Pyruvat
erg4 pyk1 mae1 jen1	pHXT7-MCT1	-	+
erg4 pyk1 mae1 jen1	pHXT7-MCT2	-	-
erg4 pyk1 mae1 jen1	p426HXT7-6HIS	-	-
pyk1 mae1 jen1	pHXT7-MCT1	p423HXT7-6HIS	+ +
pyk1 mae1 jen1	pHXT7-MCT2	p423HXT7-6HIS	-
pyk1 mae1 jen1	p426HXT7-6HIS	p423HXT7-6HIS	-
pyk1 mae1	-	-	+ + +

**Tab. 9: Wachstumstest der erg4 pyk1 mae1 jen1-Mutante mit Expression von MCT1 bzw. MCT2.** Die aufgeführten Deletionsstämme, welche die angegebenen Plasmide enthielten, wurden für vier Tage auf Agarplatten mit synthetischem Minimalmedium mit Tryptophan, 2% Ethanol und 5 mM Pyruvat bei 30°C inkubiert. (+++) sehr gutes Wachstum, (++) gutes Wachstum, (+) schlechteres Wachstum, (-) kein Wachstum.

Nach einer Inkubation von vier Tagen bei 30°C zeigte sich, daß der *erg4 pyk1 mae1 jen1*-Deletionsstamm, der MCT2 exprimierte, nicht wuchs wie es auch beim gleichen Stamm ohne *ERG4*-Deletion der Fall war (Tab. 9). Der *erg4 pyk1 mae1 jen1*-Deletionsstamm hingegen, der MCT1 exprimierte, konnte den Wachstumsdefekt komplementieren, jedoch war das Wachstum schlechter als bei der gleichen Mutante ohne zusätzliche *ERG4*-Deletion. Letzerer zeigte die schon bekannte Komplementation des Wachstumsdefekts der *pyk1 mae1 jen1*-Mutante (vgl. Abb. 11), wuchs jedoch immer noch deutlich schlechter als die *pyk1 mae1*-Mutante. Bezüglich der beiden verwendeten Pyruvatkonzentrationen war das Wachstum auf dem Medium mit 50 mM Pyruvat ausgeprägter als beim Medium

mit 5 mM Pyruvat. Die veränderte Plasmamembranzusammensetzung, hervorgerufen durch die *ERG4*-Deletion, hatte demnach keinen positiven Einfluß auf die heterologe Expression von MCT1 und MCT2. Vielmehr schien die *ERG4*-Deletion sogar einen negativen Effekt auf die funktionelle Expression von MCT1 auszuüben.

## 3.3 Suche nach dem unbekannten mitochondrialen Pyruvattransporter in *S. cerevisiae*

Pyruvat ist ein wichtiger Knotenpunkt im Zuckermetabolismus. Während des fermentativen Wachstums wird es durch Decarboxylierung und anschließende Reduzierung zu Ethanol umgewandelt. Im Zuge des respiratorischen Wachstums kann es durch oxidative Decarboxylierung zu Acetyl-CoA umgesetzt werden. Dafür ist der Transport des Pyruvats in die Mitochondrien erforderlich. Ein mitochondrialer Pyruvattransporter konnte jedoch noch nicht identifiziert werden.

## 3.3.1 Bestimmung der Trockenmasseausbeute der *mch3*- und *mch1-5*-Mutante im aeroben Glukose-limitierten Chemostaten

Für die Mch-Proteine Mch1-5 konnte eine intrazelluläre Lokalisation aufgezeigt werden, die jedoch für die meisten dieser Proteine nicht genauer bestimmt werden konnte (3.1.4). Die Lokalisation von Mch3 konnte hingegen in den Mitochondrien nachgewiesen werden (3.1.4.2). Aufgrund der intrazellulären Lokalisation der Mch-Proteine, insbesondere Mch3, sollte untersucht werden, ob eines der Proteine am mitochondrialen Pyruvattransport beteiligt ist. Erste Hinweise gaben die Untersuchungen von M. Schauen (Makuc et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, daß die Trockenmasseausbeute des mch3-Deletionsstammes nach Anzucht im aeroben, Glukose-limitierten Chemostaten geringer war (0,47+/-0,02 g/g Glukose) als die des zu vergleichenden Wildtyps (0,51+/-0,03 g/g Glukose). Die Trockenmasseausbeute des *mch1-5*-Deletionsstammes lag mit 0,37+/-0,02 g/g Glukose sogar noch unter der des *mch3*-Deletionsstammes. Eine ähnlich geringe Trockenmasseausbeute wurde bei einer *pda1*-Mutante unter den gleichen Wachstumsbedingungen beobachtet (Pronk et al., 1994). Bei dieser pda1-Mutante betrug die Trockenmasseausbeute 0,44+/-0,01 g/g Glukose. Dies wurde auf eine geringere ATP-Ausbeute zurückgeführt.



Abb. 20: Schematische Darstellung der Pyruvatverwertung in einer *pda1*-Mutante. Das aus Glukose als Endprodukt der Glykolyse entstehende Pyruvat kann auf drei verschiedenen Wegen weiterverwertet werden: 1. die Pyruvatcarboxylase (Pyc) carboxyliert Pyruvat zu Oxalacetat, 2. die Pyruvatdehydrodenase (Pdh) wandelt Pyruvat in den Mitochondrien zu Acetyl-CoA um, 3. durch die Reaktion der Pyruvatdecarboxylase (Pdc) entsteht aus Pyruvat Acetaldehyd. Acetaldehyd wird durch die Acetaldehyddehydrogenase (Aadh) zu Acetat umgewandelt, welches durch die Acetyl-CoA-Synthetase (Acs) zu Acetyl-CoA umgesetzt wird. Acetyl-CoA gelangt in die Mitochondrien und fließt in den Tricarbonsäurezyklus (TCA) ein. Bei Deletion der *PDA1* liegt keine Pdh-Aktivität vor. Die Verwertung des Pyruvats kann nur noch über den sog. Pyruvatdehydrogenase-bypass (Pdh-bypass) erfolgen, der die Enzyme Pdc, Aadh und Acs einschließt und zu einer geringeren ATP-Ausbeute führt.

In der *pda1*-Mutante war keine Pyruvatdehydrogenase-Aktivität mehr vorhanden, da die E1α Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase (Pdh) deletiert worden war (Abb. 20). Demzufolge konnte Pyruvat nur über den ATP-verbrauchenden, sogenannten Pyruvatdehydrogenase-bypass (Pdh-bypass) abgebaut werden, was eine reduzierte ATP-Ausbeute im Vergleich zum Pyruvatabbau durch die Pdh zur Folge hatte. Es wurde postuliert, daß die geringere ATP-Ausbeute zu einer erniedrigten Biomasseproduktion führte. Eine Mutante, die im mitochondrialen Pyruvattransporter deletiert ist, Pyruvat also nur über den Pdh-bypass verwerten kann, sollte den gleichen Phänotyp zeigen wie die *pda1*-Mutante. Da der *mch3*- und der *mch1-5*-Deletionsstamm genau diesen Phänotypen zeigten, sollte untersucht werden, ob eines oder mehrere Mch-Proteine am mitochondrialen Pyruvattransport beteiligt sind.

## 3.3.2 Untersuchung der Funktion der Mch-Proteine durch Deletionsmutanten

Um eine mögliche Beteiligung der Mch-Proteine am mitochondrialen Pyruvattransport zu untersuchen, sollten Gene, die in die Zulieferung von Substraten des Tricarbonsäurezykluses involviert sind in Kombination mit den *MCH*-Genen deletiert werden, um anschließend das Wachstum der resultierenden Stämme zu untersuchen.

## 3.3.2.1 Deletion von YOR100c im mch1-5-Deletionsstamm

Zuerst wurde das Gen YOR100c im mch1-5-Deletionsstamm deletiert. Das Genprodukt von YOR100c (CRC1) gehört zu den 35 Mitgliedern der "mitochondrial carrier family" (MCF). Crc1 zeigt eine Identität von 35,4% zum mitochondrialen Carnitin-Transporter der Ratte, der Acyl-Carnitin im Austauch von Carnitin in die Mitochondrien transportiert (Nelson *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, daß *CRC1* tatsächlich für einen Acyl-Carnitin-Transporter der Hefe kodiert (Palmieri *et al.*, 1999). Durch die Deletion von *CRC1* in einem Stamm, in dem der mitochondriale Pyruvattransporter deletiert ist, sollte das Wachstum der resultierenden Mutante auf Pyruvat beeinträchtigt sein, da kein Acetyl-CoA dem Tricarbonsäurezyklus in den Mitochondrien zur Verfügung gestellt würde (Abb. 21).



Abb. 21: Schematische Darstellung der Pyruvatverwertung in einer *crc1*-Mutante, die im mitochondrialen Pyruvattransporter deletiert ist. Bei der Deletion des mitochondrialen Pyruvattransporters und des mitochondrialen Acyl-Carnitin-Transporters kann kein Acetyl-CoA in den Tricarbonsäurezyklus einfließen, da beide Wege der Acetyl-CoA-Bereitstellung in den Mitochondrien, durch die Pyruvtdehydrogenase (Pdh) und durch den Pyruvatdehydrogenase-bypass (Pdh-bypass; blaue Pfeile), blockiert sind.

Die Deletion von *CRC1*, dem Acyl-Carnitin-Carrier (*ACC*) der Hefe, erfolgte in der *mch1-5*-Mutante und im Wildtyp CEN.PK113-13D nach der in Abschnitt 2.15.1 beschriebenen Methode. Für die PCR-Synthese der Deletionskassette wurden die Oligonukleotide S1-LACC und S22-ACC bzw. für die Überprüfung der Deletion die Oligonukleotide a1-ACC und a4-ACC verwendet. Die daraus resultierenden Deletionsstämme *crc1 mch1-5* und *crc1* wurden auf Agarplatten mit synthetischem Minimalmedium mit Uracil, Tryptophan, Histidin, Leucin und 2% Pyruvat, 2% Ethanol oder 2% Acetat ausgestrichen. Nach einer Inkubation von bis zu vier Tagen bei 30°C zeigte sich, daß sich das Wachstum der Deletionsstämme *crc1 mch1-5* auf keinem der getesteten Medien vom Wachstum des Wildtypstammes und des *mch1-5*-Deletionsstämme unterschied (nicht dargestellt). So deutet der Wachstumstest der *crc1*-Deletionsstämme darauf hin, daß entweder Crc1 nicht der einzige Acyl-Carnitin-Transporter oder, daß keines der Mch-Proteine am mitochondrialen Pyruvattransport beteiligt ist.

#### 3.3.2.2 Deletion von ADL7 im mch1-5-Deletionsstamm

Neben der Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch die Pyruvatdehydrogenase (Pdh) oder durch den Pyruvatdehydrogenase-bypass (Pdhbypass) wurde von Boubekeur *et al.* (1999) ein weiterer Abbauweg des Pyruvats beschrieben (Abb. 22).



Abb. 22: Schematische Darstellung des mitochondrialen Pyruvatdehydrogenase-bypasses in Hefe. Pyruvat wird im Zytosol durch die Pyruvatdecarboxylase (Pdc) zu Acetaldehyd umgewandelt. Die mitochondriale Acetaldehyddehydrogenase (Ald7) oxidiert Acetaldehyd zu Acetat (mitochondrialer Pdh-bypass). Acetaldehyd kann auch durch die zytosolische Acetaldehydehydrogenase (Ald6) zu Acetat umgesetzt werden (zytosolischer Pdh-bypass). Die direkte Umwandlung des Pyruvats zu Acetyl-CoA wird durch die Pyruvatdehydrogenase (Pdh) katalysiert. Hierbei wird Acetaldehyd nach der Decarboxylierung des Pyruvats in die Mitochondrien transportiert und dort von der mitochondrialen Acetaldehyddehydrogenase (Ald7) zu Acetat oxidiert. Die Umwandlung des Acetats zu Acetyl-CoA erfolgt anschließend im Zytosol durch die Acetyl-CoA-Synthetase (Acs). Dieser Abbauweg wurde als mitochondrialer Pdh-bypass bezeichnet. Er kann durch den zytosolischen Pdh-bypass nicht ersetzt werden, wobei die Gründe dafür bis heute nicht aufgeklärt werden konnten. Unter der Voraussetzung, daß eines der Mch-Proteine der mitochondriale Pyruvattransporter ist, sollte die Deletion von *ALD7* zusätzlich zur Deletion der *MCH*-Gene zu einem Wachstumsdefekt der *ald7 mch1-5*-Mutante auf Pyruvat führen, da in dieser Mutante kein Acetyl-CoA in den Tricarbonsäurezyklus einfließen kann (Abb. 22).

Um diese Hypothese zu überprüfen, erfolgte die Deletion von *ALD7* im *mch1-5*-Deletionsstamm und im Wildtyp CEN.PK113-13D nach der in Abschnitt 2.15.1 beschriebenen Methode unter Verwendung der Oligonukleotide S1-ALD7 und S22-ALD7. Zur Verifizierung der Deletion wurden die Oligonukleotide a1-ALD7 und a4-ALD7 verwendet. Die Wachstumstests der Deletionsmutanten *ald7* und *ald7 mch1-5* auf Agarplatten mit synthetischem Minimalmedium und Uracil, Histidin, Tryptophan, Leucin und jeweils 2% Pyruvat, Ethanol, oder Acetat zeigten jedoch keinen Unterschied zum Wachstum des Wildtypstammes CEN.PK113-13D und der *mch1-5*-Mutante (nicht dargestellt). Somit konnte kein Hinweis erbracht werden, daß eines der Mch-Proteine der mitochondriale Pyruvattransporter ist.

## 3.3.3 Suche nach dem mitochondrialen Pyruvattransporter unter Verwendung eines synthetisch-letalen "Screens"

Durch die in Abschnitt 3.3.2 konstruierten Deletionsmutanten konnte nicht bestätigt werden, daß es sich bei einem der Mch-Proteine um einen mitochondrialen Pyruvattransporter handelt. Auch die anschließend von M. Schauen durchgeführten Pyruvattransportmessungen und Pyruvat-abhängigen O<sub>2</sub>-Verbrauchsmessungen an isolierten Mitochodrien des *mch3*- und *mch1-5*-Deletionsstammes im Vergleich zum Wildtyp ließen nicht auf eine Beteiligung der Mch-Proteine am mitochondrialen Pyruvattransport schließen (Makuc *et al.,* 2000). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte den Mch-Proteinen somit höchstens eine untergeordnete Funktion beim mitochondrialen Pyruvattransport zugesprochen werden, die von einem weiteren Pyruvattransporter überlagert wird.

Mit Hilfe eines synthetisch-letalen "Screens" sollte dieser unbekannte Pyruvattransporter identifiziert werden. Hierfür sollte der *ald7 mch1-5*-Deletionsstamm einer UV-Mutagenese durch Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (UV-Licht) unterzogen werden. Durch die Einwirkung von UV-Strahlen auf DNA-Moleküle kommt es zur Ausbildung von Thymindimeren, was zu Fehlern bei der Replikation führen kann. Käme es in Folge der Mutagenese zu einer zusätzlichen Mutation im unbekannten mitochondrialen Pyruvattransporter (X) in der *ald7 mch1-5*-Mutante, wäre ein Wachstum auf Pyruvat-haltigem Medium nicht möglich, da die Bereitstellung des mitochondrialen Acetyl-CoAs sowohl durch die Deletion von *ALD7* als auch durch das Fehlen eines mitochondrialen Pyruvattransporters nicht erfolgen könnte (Abb. 23). Der zytosolische Pdh-bypass kann dabei den mitochondrialen Pdh-bypass nicht ersetzen und somit den Wachstumsdefekt nicht komplementieren.



Abb. 23: Schematische Darstellung der Stoffwechselabläufe in einer ald7 mch1-5-Mutante mit zusätzlicher Mutation im unbekannten mitochondrialen Pyruvattransporter. Durch die Deletion der mitochondrialen Acetaldehyddehydrogenase (Ald7), der MCH-Gene und des unbekannten mitochondrialen Pyruvattransporters (X) bleibt die Herstellung des Acetyl-CoAs beim Wachstum auf Pyruvat aus.

Bei ungerichteten Mutagenesen können jedoch nicht nur Mutanten mit der gesuchten Mutation entstehen, sondern auch Mutanten, die den gewünschten Phänotyp zeigen, aber nicht die gesuchte Mutation aufweisen. So ist es denkbar, daß durch die Mutagenese des *ald7 mch1-5*-Deletionsstammes Gene mutiert werden, die für mitochondriale Funktionen, beispielsweise Enzyme der Atmungskette, kodieren. Solche Mutanten wären ebenfalls nicht in der Lage, auf Pyruvathaltigem Medium zu wachsen. Um diese Mutanten von den gewünschten Mutanten (Defekt im mitochondrialen Pyruvattransporter) unterscheiden zu können, enthielt die *ald7 mch1-5*-Mutante bei der Mutagenese das Plasmid pC33-ALD7,

welches ein URA3-Markergen und das ALD7-Gen kodiert. Für die Konstruktion des Plasmids durch in vivo-Rekombination wurde das ALD7-Gen (523 Nukleotide vor dem ATG bis 376 Nukleotide hinter dem Stopcodon) aus ganzen Hefezellen unter Verwendung der Oligonukleotide FC33-ALD und RC33-ALD amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde zusammen mit dem BamHI-linearisierten Vektor YCplac33 in die Hefe transformiert. Das erhaltene Plasmid pC33-ALD7 wurde aus der Hefe isoliert und mittels Restriktionsanalyse überprüft. Nach der UV-Mutagenese (2.31) und dem anschließenden Wachstum der mutagenisierten Zellen für 2 Tage bei 30°C auf Agarplatten mit Vollmedium und 2% Glukose (YEPD) wurde die Überlebensrate der Zellen bestimmt, die abhängig von der Dauer der UV-Bestrahlung war. Zellen mit einer Überlebensrate von 30%, die relativ wenige Mutationen pro Zelle aufweisen, bzw. Zellen mit einer Überebensrate von 5%, die relativ viele Mutationen pro Zelle aufweisen, wurden erneut für zwei Tage bei 30°C auf YEPD-Platten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sowohl auf synthetisches Minimalmedium mit Uracil, 2% Pyruvat und Fluoroorotsäure (FOA) der Konzentration 1 mg/ml (SMPyr<sup>U</sup> FOA) replikaplattiert als auch auf synthetisches Minimalmedium mit 2% Pyruvat (SMPyr). FOA, ein Analogon eines Zwischenproduktes der Uracilsynthese, wird vom URA3-Genprodukt zu einem für die Zelle toxischen Produkt gespalten, so daß URA3kodierende Zellen auf FOA-haltigem Medium nicht wachsen können. Nach einer Inkubation der Zellen von vier Tagen sollten die Mutanten isoliert werden, die auf SMPyr<sup>U</sup> FOA nicht wuchsen, aber auf SMPyr wachsen konnten. Bei solchen Mutanten war eine Mutation im mitochondrialen Pyruvattransporter wahrscheinlich. Sie können auf SMPyr<sup>U</sup> FOA nicht wachsen, da sie das Plasmid mit dem ALD7-Gen zum Wachstum benötigen, um Acetyl-CoA herzustellen, aber aufgrund des URA3-Gens auf dem Plasmid nicht wachsen können. Bei einer zusätzlichen Mutation im mitochondrialen Pyruvattransporter bleibt auch die Bereitstellung des Acetyl-CoAs über die Pyruvatdehydrogenase aus (Abb. 23). Das Wachstum auf SMPyr hingegen wird durch das Plasmid-kodierte ALD7 ermöglicht. Mutanten, die in Folge der Mutagenese in anderen mitochondrialen Funktionen gestört wären, sollten auf keinem der beiden Medien wachsen können. Leider konnten unter den 60000 überprüften Zellen keine Mutanten isoliert werden, auf die beide oben genannten Kriterien zutrafen. Die replikaplattierten Zellen wuchsen entweder auf beiden Medien oder aber zeigten auf beiden Medien kein Wachstum. Der mitochondriale Pyruvattransporter konnte somit auf diesem Weg nicht identifiziert werden.

# 3.3.4 Identifizierung des mitochondrialen Pyruvattransporters durch sukzessive Deletion der MCF-Gene

Ein weiterer Ansatz zur Identifizierung des mitochondrialen Pyruvattransporters sollte durch sukzessive Deletion der MCF-Mitglieder (<u>mitochondrial carrier family</u>) zum Ziel führen. Zur Familie der MCF gehören 35 Transporter, die alle eine dreiteilige Struktur von ungefähr 100 Aminosäuren Länge aufweisen. Jeder Teil enthält zwei Transmembrandomänen, die, bis auf eine, eine Konsensussequenz aufweisen (Kuan und Saier, 1993). Für 12 der 35 Transporter der MCF konnte bereits eine Transportfunktion nachgewiesen werden.

Die ersten vier Gene, YDL198c, YER053c, YPL134c und YOR222w wurden aufgrund folgender Kriterien für die sukzessive Deletion unter den 23 verbleibenden unbekannten Transportern der MCF ausgesucht: (1) sie zeigten unter den noch unbekannten MCF den höchsten CAI (<u>codon a</u>daption <u>index</u>) (Nelson *et al.*, 1998), (2) ihre Genexpression wird unter Glukose-limitierten Bedingungen induziert was auch für den mitochondrialen Pyruvattransporter angenommen wird (<u>http://cmgm.stanford.edu/pbrown/explore/;</u> Belenkiy *et al.*, 2000), (3) sie zeigen eine hohe Homologie zu einem anderen Protein der MCF, so daß sie möglicherweise die gleiche Funktion ausüben (Nelson *et al.*, 1998). Da angenommen wurde, daß es für das wichtige mitochondriale Substrat Pyruvat mehrere Transporter geben könnte, wurde dieses Kriterium mit berücksichtigt.

Zuerst wurden das Gen YDL198c im CEN.PK113-5D und das Gen YOR222w im CEN.PK113-13D unter Verwendung der Oligonukleotide S1-dl198/S2-dl198 bzw. S1-or222/S2-or222 und des in Abschnitt 2.15.1 beschriebenen *loxP::kanMX::loxP/* Cre-Rekombinase-Systems (Güldener *et al.* 1996) deletiert. Die Überprüfung der Deletionen erfolgte unter Verwendung der Oligonukleotide a1-dl198/a4-dl198 bzw. a1-or222/a4-or222. Anschließend wurde im ydl198c-Deletionsstamm YER053c und im yor222w-Deletionsstamm YPL134c nach dem in Abschnitt 2.15.1 beschriebenen loxP::KIURA3::loxP/Cre-Rekombinase-System (Güldener et al., 2002) deletiert. Für die Amplifikation der Deletionskassette wurden die Oligonukleotide S1-er053/S2-er053 bzw. S1-pl134/S2-pl134 verwendet, für die Überprüfung der Deletionen die Oligonukleotide a1-er053/a4-er053 bzw. a1-pl134/a4pl134. Die resultierenden Deletionsstämme ydl198c yer053c (JMY58) und *yor222w ypl134c* (JMY59) wurden wie in Abschnitt 2.33 beschrieben miteinander gekreuzt. Die aus der Kreuzung hervorgegangenen Zygoten wurden sporuliert. Die isolierten und auf YEPD-Medium angewachsenen Sporen wurden anschließend sowohl auf Agarplatten mit synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose als auch auf Geneticin-haltiges YEPD-Medium replikaplattiert und für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Die Vierfach-Mutante *ydl198c yer053c yor222w ypl134c* sollte bei der Tetradenanalyse in einer auf beiden Medien zu findenden Aufspaltung von 2:2 zu finden sein, wobei die gewachsenen Zellen auf dem einen Medium als auch auf dem anderen Medium wachsen sollten. Die Zellen, die bei dieser Aufspaltung auf beiden Medien Wachstum zeigten, sollten in den Genen *YDL198c, YER053c, YPL134c* und *YOR222w* deletiert sein. Die Deletionen wurden anschließend mittels PCR-Reaktion und den Oligonukleotiden a1-dl198/a4-dl198, a1-or222/a4-or222, a1-er053/a4-er053 und a1-pl134/a4-pl134 überprüft und der Vierfach-Deletionsstamm mit JMY65 benannt.

Um zu ermitteln, ob es sich bei einem der deletierten Gene der MCF um den gesuchten mitochondrialen Pyruvattransporter handelte, wurden Pyruvattransportmessungen an isolierten Mitochondrien der Zweifach-Mutanten *ydl198c yer053c* und *yor222w ypl134c* und der Vierfach-Mutante von M. Schauen durchgeführt. Es konnte jedoch kein Unterschied zwischen dem Pyruvattransport der Zweifach- bzw. Vierfach-Mutante und dem Wildtyp festgestellt werden. Der gesuchte mitochondriale Pyruvattransporter wird damit nicht von einem der Gene *YDL198c, YER053c, YPL134c* oder *YOR222w* kodiert und bleibt damit weiterhin unbekannt.

#### 3.3.4.1 Untersuchung des Wachstumsdefekts der ydl198c-Mutante

Im Zuge der Konstruktion der Vierfach-Mutante wurde ein Wachstumsdefekt der ydl198c-Mutante auf synthetischem Minimalmedium mit 2% Glukose (SMD) und auf synthetischem Minimalmedium mit 2% Ethanol (SME) festgestellt. Im Vergleich zum Wildtyp CEN.PK113-5D wuchs sie auf beiden Medien deutlich langsamer (Abb. 24). Durch die Zugabe der Aminosäure Arginin (10 mM) konnte der Wachstumsdefekt auf SMD, nicht aber auf SME, komplementiert werden (Tab. 10). Ein möglicher Grund für den Unterschied bezüglich der Arginin-Komplementation des Wachstumsdefekts könnte der Transport von Arginin über die Plasmamembran sein. Möglicherweise wird die Expression des Arginintransporters auf Ethanol reprimiert. In diesem Fall konnte der Arginintransport auch nicht von Gap1, der generellen Aminosäurepermease, übernommen werden, da diese nur auf Ammonium-freiem Medium aktiv ist (Jauniaux und Grenson, 1990). Um diese Annahme zu überprüfen, wurde das Wachstum der *ydl198c*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp auf synthetischem Minimalmedium ohne Ammonium mit 2% Ethanol und 10 mM Arginin untersucht. Als Stickstoffquelle wurde 0,1% Prolin hinzugegeben. Nach einer Inkubation von drei Tagen bei 30°C zeigte sich jedoch, daß auch auf Ammonium-freiem Ethanolmedium der Wachstumsdefekt der *ydl198c*-Mutante durch Arginin nicht komplementiert werden konnte (Tab. 10). Der Unterschied bezüglich der Arginin-Komplementation des Wachstumsdefekts der *ydl198c*-Mutante auf SMD und SME konnte somit nicht aufgeklärt werden.



**Abb. 24: Wachstumsdefekt der** *ydl198c***-Mutante auf Ethanol und Glukose.** Die *ydl198c*-Mutante und der Wildtypstamm CEN.PK113-5D (WT) wurden auf Agarplatten mit synthetischem Minimalmedium mit Uracil und 2% Ethanol bzw. 2% Glukose ausgestrichen und für bis zu drei Tagen bei 30°C inkubiert.

C-Quelle	N-Quelle	Zusatz	ydl198c-Mutante	Wildtyp
Glukose	Ammonium	Arginin	+	+
Ethanol	Ammonium	Arginin	-	+
Ethanol	Prolin	Arginin	-	+
Glukose	Ammonium	Ornithin	-/(+)	+
Glukose	Ammonium	Glutamat	-	+
Glukose	Prolin	Ornithin	+/-	+
Glukose	Prolin	Glutamat	-	+

**Tab. 10: Wachstumsphänotyp der** *ydl198c-***Mutante.** Die *ydl198c-*Mutante und der Wildtyp CEN.PK113-5D wurden auf synthetischem Minimalmedien mit Uracil und den angegebenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen ausgestrichen. Den Medien wurden Arginin, Ornithin oder Glutamat in einer Konzentration von 10 mM zugesetzt. Die Stämme wurden für bis zu drei Tagen bei 30°C inkubiert und deren Wachstum protokolliert. (+) Wachstum, (-) kaum Wachstum, (+/-) langsames Wachstum, (-/(+)) sehr langsames Wachstum.

Es bleibt die Frage zu klären, welcher mitochondriale Transporter durch die Deletion des Gens YDL198c der MCF nicht mehr exprimiert werden konnte. Da der Wachstumsdefekt der *ydl198c*-Mutante durch Argininzugabe aufgehoben werden konnte, lag die Vermutung nahe, daß es sich um einen Transporter der Mitochondrien handelte, der Arginin transportiert oder eine Vorstufe der Argininsynthese. Für die Argininsynthese wird zuerst das im Zytoplasma synthetisierte Glutamat in die Mitochondrien transportiert. Hier wird es zu Ornithin umgewandelt, welches zur endgültigen Argininherstellung zurück ins Zytoplasma transportiert wird (Jauniaux, et al., 1978). Da Ornithin und Glutamat die Vorstufen der Argininsynthese sind, sollte getestet werden, ob die Zugabe einer dieser beiden Substanzen den Wachstumsdefekt der vdl198c-Mutante auf SMD auch komplementieren kann. Da bis heute nur die generelle Aminosäurepermease Gap1 als Transportprotein für Ornithin über die Plasmamembran bekannt ist, diese jedoch auf Ammonium-haltigem Medium nicht aktiv ist (Jauniaux und Grenson, 1990) wurde das Wachstum der ydl198c-Mutante sowohl auf Agarplatten mit synthetischem Minimalmedium mit Ammonium als Stickstoffquelle oder Prolin als Stickstoffguelle getestet. Dem Medium wurden 2% Glukose und Ornithin bzw. Glutamat in den Konzentrationen von 10 mM zugegeben.

Tab. 10 stellt das Wachstum der Mutante im Vergleich zum Wildtyp dar. Während die Zugabe von Ornithin den Wachstumsdefekt der Mutante aufheben konnte, konnte durch die Zugabe von Glutamat der Wachstumsdefekt nicht komplementiert werden. Die Ornithinzugabe steigerte das Wachstum der *ydl198c*-Mutante auf Prolin-haltigem Medium stärker als auf Ammonium-haltigem Medium, jedoch nicht in dem Maße wie es durch Argininzugabe verbessert worden war. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß neben der Vermutung, daß YDL198c für einen Arginintransporter der Mitochondrien kodiert auch für einen mitochondrialen Ornithintransporter kodiert könnte. Ein Ornithintransporter der Mitochondrien, Arg11, wurde schon identifiziert (Crabeel et al., 1996; Palmieri et al., 1997). Ornithinaufnahmemessungen an isolierten Mitochondrien einer arg11-Mutante zeigten einen reduzierten aber dennoch vorhandenen Ornithintransport, was für einen weiteren Ornithintransporter in den Mitochondrien spricht (Soetens et al., 1998). Ferner konnten Soetens *et al.* (1998) zeigen, daß die Ornithinakkumulation in den Mitochondrien der arg11-Mutante reduziert war im Vergleich zum Wildtyp. Wenn YDL198c für den weiteren mitochondrialen Ornithintransporter kodiert, sollten Ornithinaufnahmemessungen an isolierten Mitochondrien der ydl198c-Mutante und die Bestimmung der Ornithinakkumulation in diesen Mitochondrien ähnliche Ergebnisse erbringen wie sie bei der arg11-Mutante festgestellt worden waren. Um diese These zu überprüfen, wurden sowohl Ornithinaufnahmemessungen als auch die Bestimmung der Ornithinakkumulation an isolierten Mitochondrien der *ydl198c*-Mutante von M. Schauen durchgeführt. Da auch Arginin den Wachstumsdefekt komplementieren konnte, sind auch Argininaufnahmemessungen und die Bestimmung der Argininakkumulation durchgeführt worden. Die Ornithinakkumulation in den Mitochondrien der *ydl198c*-Mutante war auf 60%-90% der Ornithinakkumulation des Wildtyps reduziert, die Argininakkumulation auf 75%-90%. Sowohl die Ornithinaufnahme als auch die Argininaufnahme in den isolierten Mitochondrien der Mutante zeigte hingegen keinen Unterschied im Vergleich zu den Ornithin- und Argininaufnahmen in den Mitochondrien des Wildtyps. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte nicht bestätigt werden, daß *YDL198c* für einen weiteren Ornithintransporter oder einen Arginintransporter der Mitochondrien kodiert. Seine Funktion bleibt unbekannt und auch die Komplementation des Wachstumsdefekts der *ydl198c*-Mutante durch Arginin und Ornithin konnte bis zum heutigen Zeitpunkt nicht aufgeklärt werden.

# 3.4 Suche nach dem Acetattransporter in der Plasmamembran von S. cerevisiae

Acetat kann von *S. cerevsiae* als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden. Der erste Schritt der Acetatverwertung ist der Transport von Acetat über die Plasmamembran. Casal *et al.* beschrieben schon 1996 zwei Transportsysteme, die sich durch ihre Regulation und Spezifität unterscheiden, die jedoch beide eine Transportaffinität für Acetat besitzen. Ein Acetat-, Propionat- und Formiattransporter wird beim Wachstum von *S. cerevisiae* auf Acetat, Lactat oder Ethanol exprimiert, während ein Lactat-, Acetat-, Propionat- und Pyruvattransporter beim Wachstum auf Lactat exprimiert wird. Es konnte gezeigt werden, daß letzterer von *JEN1* kodiert wird (Casal *et al.,* 1999), während der erste bis heute noch nicht identifiziert werden konnte.

#### 3.4.1 Deletion eines mutmaßlichen Acetattransporters

Nach der Sequenzierung des Genoms von *S. cerevisiae* sind 270 Gene identifiziert worden, die für bekannte und mutmaßliche Transportproteine kodieren (van Belle und André, 2001). Für das Gen *YHL008c* wurde postuliert, daß es einen Acetat/H<sup>+</sup>-Symporter kodiert, da das Protein eine Ähnlichkeit zu bakteriellen Formiat-Nitrattransportern zeigt (Paulsen *et al.*, 1998) und auch der unbekannte Acetattransporter Formiat transportieren kann. Um diese mögliche Funktion von Yhl008c zu überprüfen, sollte das Gen deletiert und anschließend das Wachstum der Deletionsmutante auf Acetat untersucht werden. Da von dem Transporter Jen1 bekannt ist, daß er neben Lactat und Pyruvat auch eine Transportaktivität für

Acetat besitzt (Casal et al., 1996, 1999), sollte der putative Acetattransporter in der *jen1*-Mutante deletiert werden. Wie in Abschnitt 3.1.3 bereits erwähnt, konnte für die Mch-Proteine eine Beteiligung am Acetattransport nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurde YHL008c auch in der jen1 mch1-5-Mutante nach der in 2.15.1 beschriebenen Methode deletiert. Zusätzlich erfolgte die Deletion im Wildtyp CEN.PK113-13D. Für die Amplifikation der Deletionskassette wurden die Oligonukleotide S1-008c und S22-008c verwendet, für die Überprüfung der Deletion die Oligonukleotide a1-008c und a4-008c. Das Wachstum der resultierenden Deletionsstämme yhl008c (JMY35), yhl008c jen1 (JMY36), *yhl008c jen1 mch1-5* (JMY62) und dem Wildtypstamm wurde auf Agarplatten mit synthetischem Minimalmedium mit 2% oder 0,1% Acetat und synthetischem Minimalmedium mit 2% Ethanol bei einer Inkubation von 30 °C beobachtet. Es zeigte sich jedoch kein Wachstumsunterschied zwischen den Deletionsstämmen und dem Wildtyp (nicht dargestellt), so daß eine Funktion des putativen Transportproteins Yhl008c als Acetattransporter nicht bestätigt werden konnte.

## 3.4.2 Identifizierung des Acetattransporters der Plasmamembran

#### 3.4.2.1 Mutagenese des yhl008c jen1 mch1-5-Deletionsstammes

Die Umwandlung von Acetat zu Acetyl-CoA erfolgt nach dem Transport des Monocarboxylats in die Zelle durch das Enzym Acetyl-CoA-Synthetase. Ethanol wird nach dem Eintritt in die Zelle und zwei Oxidationsreaktionen schließlich auch von der Acetyl-CoA-Synthetase zu Acetyl-CoA umgesetzt. Der Metabolismus des Acetats ist somit direkt nach dem Transport des Acetats in die Zelle mit dem Metabolismus des Ethanols verknüpft. Durch EMS- und UV-Mutagenese sollten Mutanten isoliert werden, die einen Defekt im Acetattransport besitzen. Diese sollten also einen Defekt beim Wachstum auf Acetat-haltigem Medium zeigen, aber in der Lage sein, auf Ethanol-haltigem Medium zu wachsen. Zu diesem Zweck wurde der yhl008c jen1 mch1-5-Deletionsstamm sowohl der in Abschnitt 2.31 beschriebenen UV- als auch der in Abschnitt 2.32 beschriebenen EMS-Nach der jeweiligen Mutagenese unterzogen. Mutagenese und dem anschließenden Wachstum der mutagenisierten Zellen auf Vollmediumsplatten mit 2% Glukose (YEPD) wurde die Überlebensrate bestimmt. Die Proben mit einer Überlebensrate von 30% bzw. 5% wurden erneut für zwei Tage auf YEPD-Platten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden sie auf synthetisches Minimalmedium mit 2% Acetat oder 2% Ethanol replikaplattiert. Auf diese Weise konnte eine Mutante (Ac16b) isoliert werden, die zwar auf Ethanol, nicht aber auf Acetat wachsen konnte (nicht dargestellt). Der Wachstumstest wurde auch in flüssigem YEP-Ethanol und synthetischem Minimalmedium mit 2% Acetat durchgeführt (Abb. 25). Auch hier zeigte die Ac16b-Mutante einen deutlichen Wachstumsdefekt auf Acetat-haltigem Medium. Das Wachstum auf Ethanol-haltigem Medium entsprach dagegen weitgehend dem des Wildtyps.



Abb. 25: Wachstumsphänotyp der Ac16b-Mutante. Die Ac16b-Mutante (■, rot), der *yhl008c jen1 mch1-5*-Deletionsstamm (▲, blau) und der Wildytpstamm CEN.PK113-13D (●, grün) wurden in synthetischem Minimalmedium mit Uracil und 2% Glukose bzw. in YEP-Ethanol herangezogen und in YNB- bzw. YEP-Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in synthetisches Minimalmedium mit Uracil und 2% Acetat (A) bzw. YEP mit 2% Ethanol (B) angeimpft. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben für die Bestimmung der OD<sub>600</sub> entnommen.

Anschließend sollte ermittelt werden, ob der Wachstumsdefekt auf Acetathaltigem Medium auf einen beeinträchtigten Acetattransport oder einen beeinträchtigten Acetatmetabolismus zurückzuführen ist. Durch Acetataufnahmemessungen konnte gezeigt werden, daß sowohl die intrazelluläre Acetatkonzentration als auch die Acetataufnahmeaktivität in der Ac16b-Mutante im Vergleich zum *yhl008c jen1 mch1-5*-Deletionsstamm deutlich reduziert waren (Abb. 26). Der Wachstumsdefekt der Ac16b-Mutante wurde daher auf einen Defekt im Acetattransport und nicht auf einen Defekt in der Acetatverwertung zurückgeführt. Somit schien mit der Isolierung der Ac16b-Mutante eine Mutante mit einem Defekt im Acetattransporter gefunden worden zu sein.



Abb. 26: Acetataufnahme und intrazelluläre Acetatkonzentration in der Ac16b-Mutante und dem *yhl008c jen1 mch1-5*-Deletionsstamm. Die Ac16b-Mutante (rot) und der *yhl008c jen1 mch1-5*-Deletionsstamm (blau) wurden bei 30°C in YEP-Ethanol-Medium bis zu einer Zelldichte von 1 bei OD<sub>600</sub> herangezogen. Der Acetattransport wurde durch 5 s Influx-Messungen mit radioaktivmarkiertem Acetat der Konzentration von 1 mM und 2 mM gemessen (nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG) (**A**) als auch die intrazelluläre Acetatkonzentration bestimmt (nM) (**B**).

#### 3.4.2.2 Identifizierung des mutierten Gens in der Ac16b-Mutante

Zur Identifizierung des mutierten Gens, welches in der Ac16b-Mutante zum Wachstumsdefekt auf Acetat-haltigem Medium führt, wurde eine Genbank in diese Mutante transformiert (2.4). Nach der Replikaplattierung der Transformanten auf synthetisches Minimalmedium mit 2% Acetat wurde aus den Transformanten, die den Wachstumsdefekt der Ac16b-Mutante komplementieren konnten, die Plasmide isoliert. Durch Ansequenzierung der in dem Vektor der Genbankplasmide enthaltenen DNA-Fragmente konnte das Gen *YBL066c* identifiziert werden, dessen vollständiger Leserahmen mit Promotor- und Terminationsbereich auf jedem der zwölf isolierten und sequenzierten Plasmid kodiert wurde. Bei diesem Gen, das auf Chromosom II kodiert und als *SEF1* bezeichnet wird, handelte es sich um einen putativen Transkriptionsfaktor, der bisher nicht genauer charakterisiert ist (http://genome-www4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/).

#### 3.4.2.3 Deletion von SEF1 in der yhl008c jen1 mch1-5-Deletionsmutante

Einen Hinweis dafür, daß der Wachstumsdefekt der Ac16b-Mutante tatsächlich durch eine Mutation im Gen *SEF1* verursacht wurde, kann durch die Deletion von *SEF1* im *yhl008c jen1 mch1-5*-Deletionsstamm, dem Ausgangsstamm der Mutagenese, und anschließende Wachstumstests in dem Fall erhalten werden, wenn die *sef1 yhl008c jen1 mch1-5*-Mutante den gleichen Phänotyp zeigt wie die

Ac16b-Mutante. Zusätzlich zur *SEF1*-Deletion im *yhl008c jen1 mch1-5*-Deletionsstamm wurde *SEF1* auch im Wildtyp CEN.PK113-13D deletiert. Die Deletion erfolgte nach der in 2.15.1 beschriebenen Methode, bei der zur Amplifizierung der Deletionskassette die Oligonukleotide S1-SEF1 und S22-SEF1 verwendet wurden. Die Deletionen wurden mittels PCR-Reaktion unter Verwendung der Oligonukleotide a1-SEF1 und a4-SEF1 überprüft. Das Wachstum der resultierenden Deletionsmutanten *sef1 yhl008c jen1 mch1-5* und *sef1* wurde auf Agarplatten mit synthetischem Minimalmedium mit 2% Acetat, 2% Ethanol oder 2% Pyruvat getestet.



**Abb. 27: Wachstumsphänotyp der sef1 yhl008c jen1 mch1-5-Mutante.** Die Deletionsstämme sef1, sef1 yhl008c jen1 mch1-5, die Ac16b-Mutante, der yhl008c jen1 mch1-5-Deletionsstamm und der Wildtypstamm CEN.PK113-13D (WT) wurden auf Agarplatten mit synthetischem Minimalmedium mit Uracil und den angegebenen Kohlenstoffquellen ausgestrichen. Dargestellt ist das Wachstum nach einer Inkubation von bis zu vier Tagen bei 30°C.

Nach einer Inkubation von bis zu vier Tagen bei 30°C stellte sich heraus, daß die *sef1 yhl008c jen1 mch1-5-*Mutante als auch die *sef1-*Mutante einen starken Wachstumsdefekt auf Acetat-haltigem Medium zeigte, vergleichbar mit dem der

Ac16b-Mutante. Zusätzlich konnte bei den Mutanten, in denen *SEF1* deletiert worden war, ein eingeschränktes Wachstum auf Pyruvat und Ethanol beobachtet werden (Abb. 27). Das beeinträchtigte Wachstum auf Pyruvat-haltigem Medium wurde auch für die Ac16b-Mutante festgestellt. Der Wachstumsdefekt der *sef1*-Mutanten auf Ethanol-haltigem Medium deckte sich nicht mit der Beobachtung des Wachstumsverhaltens der Ac16b-Mutante in flüssigem Ethanol-haltigem Medium, in dem kein Wachstumsdefekt festgestellt werden konnte (s. Abb. 25). Dies läßt sich aber möglicherweise durch die schon häufiger beobachteten Unterschiede des Wachstums bestimmter Mutanten auf festen Nährboden und in flüssigem Medium erklären (s. 4.2.2.4).

Durch die Deletion von SEF1 scheint somit nicht nur ein Wachstumsdefekt auf Acetat, sondern auch auf Pyruvat und Ethanol verursacht worden zu sein. Dies kann durch einen reduzierten Transport der Monocarboxylate und durch einen beeinträchtigten Metabolismus der angebotenen Kohlenstoffguellen begründet sein. Um zu überprüfen, ob durch die Deletion von SEF1 der Transport beeinträchtigt wird, wurden Pyruvat- und Acetataufnahmemessungen in der sef1-Mutante und im Wildtyp durchgeführt. Für die Pyruvataufnahmemessungen wurden die Zellen in Vollmedium mit 2% Pyruvat herangezogen. Für die Acetataufnahmemessungen wurden die Zellen in Vollmedium mit 2% Ethanol herangezogen, da die Ergebnisse von Casal et al. (1996) eine Induktion des unbekannten Acetattransporters durch Ethanol gezeigt hatten. Abb. 28 zeigt, daß der Acetattransport in der sef1-Mutante gegenüber dem Acetattransport im Wildtyp deutlich reduziert ist. So konnte ein V<sub>max</sub> von 1,85 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG für die *sef1*-Mutante ermittelt werden, während der V<sub>max</sub> des Wildtyps 3,03 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG betrug. Dies entspricht einer Reduktion des Acetattransportaktivität in der sef1-Mutante auf 61% der Acetattransportaktivität des Wildtyps. Eine noch größere Reduktion wurde bei der Pyruvattransportaktivität der sef1-Mutante beobachtet. Hier wurde für die *sef1*-Mutante ein V<sub>max</sub> von 7,73 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG ermittelt, während der V<sub>max</sub> des Wildtyps 18,69 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG betrug. Die Deletion von SEF1 hatte somit nicht nur eine Beeinträchtigung des Acetattransports, sondern auch des Pyruvattransports zur Folge. Die Funktion von Sef1 scheint demnach nicht auf den Transport von Acetat beschränkt zu sein. Auch eine Mitwirkung beim Pyruvattransport erscheint aufgrund der Ergebnisse wahrscheinlich. Bei Betrachtung des äußerst geringen Wachstums der sef1-Mutante auf Acetat und des im Vergleich dazu nur um 40 % reduzierten Acetattransports ist sogar eine Beteiligung von Sef1 am Metabolismus des Monocarboxylats möglich. Somit scheint es wahrscheinlich, daß Sef1 nicht der gesuchte Acetattransporter der Plasmamembran ist, sondern möglicherweise eine übergeordnete regulatorische Funktion auf den Transport und Metabolismus von Acetat und Pyruvat und den Metabolismus von Ethanol ausübt.



Abb. 28: Eadie-Hofstee-Plot der Acetat- (A) und Pyruvataufnahme (B) des sef1-Deletionsstammes. Die sef1-Mutante ( $\blacktriangle$ , rot) und der Wildtyp CEN.PK113-13D ( $\blacklozenge$ , blau) wurden über Nacht in Vollmedium mit 2% Ethanol (A) bzw. 2% Pyruvat (B) bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 herangezogen. Der Acetat- und Pyruvattransport wurden durch 10 s Influx-Messungen bestimmt.

#### 3.4.3 Deletion von STL1 in der jen1-Mutante

In Aspergillus niger wurden kürzlich drei Gene identifiziert, deren Expression bei einem pH von 8 ausschließlich durch Acetat und Pyruvat induziert wird (persönliche Mitteilung von G. Ruijter, Niederlande). Diese drei Gene zeigen eine deutliche Ähnlichkeit zum Gen STL1 der Zuckerpermeasefamilie von S. cerevisiae. STL1 (sugar transporter like) wurde bei der Untersuchung der Proteine der Hexosetransporter-Familie entdeckt. Es zeigte sich, daß STL1 durch den hochaffinen Glukosesensor Snf3 reprimiert wird (Wieczorke et al., 1999). Aufgrund der Ähnlichkeit von Stl1 zu den drei durch Acetat induzierten Genen von Aspergillus niger, sollte untersucht werden, ob Stl1 eine Transportaktivität für Acetat besitzt und damit der gesuchte Acetattransporter der Plasmamembran von S. cerevisiae ist. Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben, konnte bereits für die MCH-Gene, SEF1 und YHL008c ausgeschlossen worden, daß sie für einen Acetattransporter kodieren. Deshalb sollte STL1 im jen1-Deletionsstamm deletiert werden, da für Jen1 eine Transportaktivität für Acetat nachgewiesen worden war (Casal et al., 1996; 1999). Zusätzlich zur Deletion von STL1 in der *jen1*-Mutante wurde das Gen auch im Wildtypstamm CEN.PK113-13D nach der in 2.15.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Für die Amplifikation der Deletionskassette wurden die Oligonukleotide S1-STL1 und S2-STL1 verwendet, für die Überprüfung der Deletion die Oligonukleotide a12-STL1 und a42-STL1. Die resultierenden Deletionsmutanten stl1 und stl1 jen1 wurden auf Agarplatten mit synthetischem Minimalmedium mit Uracil und 2% Acetat ausgestrichen und für zwei Tage bei 30°C inkubiert. Das Wachstum beider Mutanten unterschied sich jedoch nicht vom Wachstum des Wildtyps (nicht dargestellt). Trotzdem wäre es möglich, daß die Deletion von STL1 eine Reduktion des Acetattransports bewirkt hatte, die jedoch von solch geringem Umfang war, daß ein Wachstum auf Acetat immer noch möglich gewesen war. Um zu testen, ob ein reduzierter Transport von Acetat in der stl1 jen1-Mutane vorlag, wurde der Acetattransport in dieser Mutante und in der jen1-Mutante gemessen. Die Zellen wurden in Vollmedium mit 2% Acetat bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 herangezogen und dann für die in Abschnitt 2.28.1 beschriebenen Transportmessungen eingesetzt.



	V <sub>max</sub>	K <sub>m</sub>
	[nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> TG]	[mM]
stl1 jen1	5,44	2,34
jen1	4,21	2,11

Abb. 29: Eadie-Hofstee-Plot der Acetataufnahme des *stl1 jen1-* und *jen1-*Deletionsstammes. Die *stl1 jen1-*Mutante ( $\blacktriangle$ , rot) und die *jen1-*Mutante ( $\blacksquare$ , blau) wurden bei 30°C über Nacht in Vollmedium mit 2% Acetat bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 herangezogen. Der Acetattransport wurde durch 5 s Influx-Messungen bestimmt.

Die Aufnahmemessungen ergaben, daß der Transport von Acetat in der *stl1 jen1*-Mutante gegenüber dem Acetattransport in der *jen1*-Mutante nicht reduziert war (Abb. 29). Die Acetattransportaktivität in der *stl1 jen1*-Mutante war sogar geringfügig höher als in der *jen1*-Mutante. Aufgrund dieses Ergebnisses konnte ausgeschlossen werden, daß STL1 für einen Acetattransporter in S. cerevisiae kodiert.

# 4 DISKUSSION

## 4.1 Putative und tatsächliche Monocarboxylattransporter von S. cerevisiae

#### 4.1.1 Funktionsuntersuchung

Die Hefe S. cerevisiae ist in der Lage, Monocarboxylate wie Acetat, Lactat und Pyruvat zu verwerten, wenn sie als einzige Kohlenstoffquelle im Medium angeboten werden. Dabei stellt der Transport der Monocrboxlyate den ersten Schritt dar. Von Casal et al. (1996) wurden zwei Monocarboxylataufnahmesysteme beschrieben, die verschiedene Spezifitäten besitzen und unterschiedlich reguliert werden. Der durch Lactat induzierte Transporter ist in der Lage, Lactat, Pyruvat, Acetat und Propionat zu transportieren und wird vom *JEN1*-Gen kodiert (Casal et al., 1999). Der durch Lactat, Acetat und Ethanol induzierte Transporter weist eine Transportaktivität für Acetat, Propionat und Formiat auf. Das Gen, welches diesen Transporter kodiert, ist nicht bekannt. Nach der Sequenzierung des gesamten Hefegenoms wurden jedoch fünf Gene identifiziert, die eine Ähnlichkeit zu den Monocarboxylattransportern der Säuger zeigen (André, 1995; Nelisson et al., 1997). Sie werden von den Genen YDL054c, YKL222w, YNL125c, YOL119c und YOR306c kodiert und als Monocarboxylattransporter-Homologe (MCH1-MCH5) bezeichnet. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob diese putativen Monocarboxylattransporter tatsächlich den Transport von Monocarboxylaten vermitteln.

Sowohl die Wachstumstests auf verschiedenen Monocarboxylat-enthaltenden Medien der Einzeldeletionsmutanten aller *MCH*-Gene als auch die Wachstumstests des *mch1-5*-Fünffachdeletionsstammes (3.1.1) zeigten keinen Wachstumsdefekt im Vergleich zum Wildtyp. Damit sind die *MCH*-Gene nicht essentiell für die Hefe. Erst die zusätzliche Deletion des Lactat- und Pyruvattransporters *JEN1* im *mch1-5*-Deletionsstamm führte zu einer starken Beeinträchtigung des Wachstums in Gegenwart der Kohlenstoffquellen Pyruvat oder Lactat. Die Messungen der Pyruvatverbrauchsrate dieser Stämme bestätigte diese Beobachtung. Der Pyruvatverbrauch im *mch1-5*-Deletionsstamm war nicht beeinträchtigt durch die Deletionen der *MCH*-Gene und vergleichbar mit dem des Wildtypstammes. Der *mch1-5*-Deletionsstamm konnte auf Pyruvat-haltigem Medium wachsen. Bei dem *jen1*- und *jen1 mch1-5*-Deletionsstamm war hingegen kein Pyruvatverbrauch rachweisbar, wodurch sich der Wachstumsdefekt dieser Mutanten auf Pyruvat erklären läßt (s. Abb. 4, Abb. 5). Der *jen1*-Deletionsstamm zeigte sowohl auf Lactat- als auch auf Pyruvat-haltigen Medien keinen Wachstumsvorteil gegenüber

dem *jen1 mch1-5*-Deletionsstamm. Da im *jen1*-Deletionsstamm die Expression der *MCH*-Gene aber nicht beeinflußt ist, vermitteln die Mch-Proteine offensichtlich keine signifikante Pyruvat- und Lactataufnahme über die Plasmamembran. Auch bei Lactattransportmessungen konnte kein Unterschied zwischen dem Lactattransport des *mch1-5*-Deletionsstammes und des Wildtypstammes aufgezeigt werden. Der *jen1*-Deletionsstamm wies dagegen keine Transportaktivität für Lactat auf (Makuc *et al.*, 2000). Eine Beteiligung der Mch-Proteine am Monocarboxylattransport über die Plasmamemran bleibt daher fraglich. Bis zum heutigen Zeitpunkt ist demnach nur ein Monocarboxylattransporter, bekannt Jen1, der nachweislich in den Import von Pyruvat und Lactat über die Plasmamembran involviert ist (Casal *et al.*, 1999; Akita *et al.*, 2000).

Ein weiteres mögliches Substrat der Mch-Proteine ist Acetat. Deshalb wurde sowohl das Wachstum als auch die Acetataufnahme im *mch1-5*-Deletionsstamm und den Einzeldeletionsstämmen untersucht. Jedoch konnte in keiner Mutante ein Wachstumsdefekt auf Acetat-haltigem Medium festgestellt werden. Die Acetataufnahmemessungen, die im *mch1-5*-Deletionsstamm im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt worden sind, bestätigen diese Annahme (Makuc *et al.*, 2000). Da ein Acetattransporter der Plasmamembran in der Hefe jedoch bis zum heutigen Tage noch nicht identifiziert werden konnte und dieser somit im *mch1-5*-Deletionsstamm noch aktiv ist, ist es denkbar, daß dessen Acetattransportaktivität eine mögliche Acetatransportaktivität eines der Mch-Proteine überlagert. Ein endgültiger Nachweis dafür, daß die putativen Mch-Proteine keine Funktion beim Transport von Acetat über die Plasmamembran ausüben, könnte beispielsweise durch die Rekonstitution der Mch-Proteine in Liposomen und anschließende Aufnahmemessungen erbracht werden.

Da für die Mch-Proteine keine Importfunktion für die untersuchten Monocarboxylate nachgewiesen werden konnte, wurde anschließend die Möglichkeit untersucht, daß es sich um Exporter handeln könnte. Monocarboxylate werden aus der Umwelt aufgenommen oder im Rahmen des Metabolismusses synthetisiert. Sie müssen, soweit sie nicht sofort weiterverwendet werden, ins Extrazelluläre transportiert werden, um eine Übersäuerung des Zytoplasmas zu verhindern. Der durch Sorbat induzierte ABC-Transporter Pdr12 exportiert beispielsweise Carboxylatanionen über die Plasmamembran, was einen Ausstrom von H<sup>+</sup> nach sich zieht (Piper *et al.*, 1998; Holyoak *et al.*, 1999). Eine ähnliche Funktion wäre auch bei den Mch-Proteinen vorstellbar. Daher wurde die Sekretion von einigen Monocarboxylaten im *mch1-5*-Deletionsstamm untersucht. Die Sekretion von Acetat und Pyruvat im *mch1-5*-Deletionsstamm war jedoch vergleichbar mit der des Wildtypstammes (s. Abb. 6). Auch die Acetat- und Pyruvatsekretion des *jen1 mch1-5*-Deletionsstammes zeigte keine signifikante Abweichung von der des Wildytpstammes. Daher ist eine Beteiligung sowohl der Mch-Proteine als auch des Pyruvat- und Lactattransporters Jen1 an der Ausscheidung von Acetat und Pyruvat unwahrscheinlich. Insgesamt konnten somit einige der aufgrund der Ähnlichkeit zu den Monocarboxylattransportern der Säuger postulierten Vermutungen für eine mögliche Funktion der Mch-Proteine ausgeschlossen werden: Die Mch-Proteine sind weder signifikant in den Import von Lactat, Pyruvat noch Acetat involviert. Ferner kann auch eine Beteiligung sowohl der Mch-Proteine als auch von Jen1 an der Sekretion dieser Monocarboxylattransporter-Homologen ungeklärt.

#### 4.1.2 Regulationsuntersuchung

Die Expression vieler Transportproteine unterliegt häufig einer Regulation in Abhängigkeit der angebotenen Kohlenstoffquelle. Für das von Casal et al. (1996) beschriebene Monocarboxylattransportsystem konnte gezeigt werden, daß es durch verschiedene Monocarboxylate induziert wird und des weiteren einer Glukoserepression unterliegt. Auch für den Lactat- und Pyruvattransporter Jen1 wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Anhand von JEN1-Promotoranalysen konnten drei sog. UAS/CSRE (upstream activating sequence/carbon sourceresponsive elements) identifiziert werden. Für zwei von ihnen wurde nachgewiesen, daß sie für die Derepression von *JEN1* auf Acetat- bzw. Ethanol-haltigem Medium benötigt werden, an der u.a. der Transkriptionsaktivator Cat8 beteiligt ist (Bojunga und Entian, 1999). Lodi et al. (2002) identifizierten später eine CCAAT-Box im *JEN1*-Promotor, an die Hap2 des Transkriptionsaktivatorkomplexes Hap2/3/4/5 bindet und damit neben Cat8 die Derepression von JEN1 bewirkt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Glukose-vermittelte Repression von JEN1 von den Repressoren Mig1 und Mig2 abhängig ist (Bojunga und Entian, 1999). Ferner konnte für die Proteinkinase Snf1, die bei der Derepression einiger Glukose-reprimierter Gene eine wichtige Rolle spielt (Celenza und Carlson, 1986), eine Beteiligung an der Kontrolle der JEN1-Transkription nachgewiesen werden (Lodi et al., 2002). Die JEN1-Expression unterliegt somit einer komplizierten Regulation in Abhängigkeit der angebotenen Kohlenstoffquellen.

Da oftmals die Expression von Transportern durch die Substrate reguliert wird, die sie transportieren, wurde für die *MCH*-Gene eine Regulation der Expression durch verschiedene Kohlenstoffquellen, insbesondere durch Monocarboxylate, untersucht. Es konnte jedoch weder eine deutliche Regulation durch die getesteten Monocarboxylate noch eine eindeutige Glukoserepression festgestellt werden
(s. Tab. 7). Lediglich eine unterschiedliche Expressionsstärke konnte aufgezeigt werden, bei der *MCH5* die bei weitem stärkste Expression und *MCH1* und *MCH2* die schwächste Expression zeigten (s. Tab. 7). Die erhaltenen Ergebnisse decken sich insoweit mit den vorangegangenen Wachstumstests, als daß sie auch eher gegen eine Beteiligung der Mch-Proteine am Monocarboxylattransport sprechen. Die *MCH*-Gene weisen weder eine Regulation durch ihre putativen Substrate auf, noch zeigen sie ein ähnliches Regulationsmuster wie Jen1 bzw. wie das noch nicht identifizierte Monocarboxylattransportsystem, welches von Casal *et al.* (1996) beschrieben wurde. Demnach ist es wahrscheinlich, daß die Mch-Proteine, trotz der Ähnlichkeit zu den Monocarboxylattransportern der Säuger, nicht für die ihnen vorhergesagten Substrate spezifisch sind, sondern vielmehr am Transport von anderen Substraten mitwirken oder eine gänzlich andere Funktionen ausüben.

Auffällig war jedoch die Regulation einiger MCH-Gene durch aromatische Aminosäuren. Diese wurde aufgrund einer Ähnlichkeit der Mch-Proteine von 30%-40% zum Aminosäuretransporter TAT1 aus dem Rattendarm untersucht. Für TAT1 konnte von Kim et al. (2001) in Xenopus laevis Oozyten gezeigt werden, daß dieses Protein Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin transportiert. Pyruvat und Lactat, die Substrate der Monocarboxylattransporter der Säuger, können durch TAT1 nicht transportiert werden. Bei der Regulationsuntersuchung der *MCH*-Gene durch verschiedene Aminosäuren zeigte sich, daß *MCH*<sup>2</sup> sehr stark durch die aromatischen Aminosäuren Tryptophan und Phenylalanin induziert wird. MCH3 wurde sogar von allen drei aromatischen Aminosäuren induziert (Tab. 8). Interessanterweise enthalten die Promotorregionen dieser beiden MCH-Gene bestimmte Elemente der UAS von ARO9, einem Gen, welches für das Enzym des ersten Schrittes des Katabolismuses von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin kodiert. Die UAS von ARO9 besteht aus vier aufeinanderfolgenden CCG-Wiederholungen, die jeweils durch sieben Basenpaare unterbrochen sind [CCG(7X)CCG(7X)CCG(7X)CCG] (Iraqui et al., 1999). In der Promotorregion von MCH2 konnten zwei CCG-Wiederholungen identifiziert werden, in der Promotorregion von MCH3 sogar drei. Da für Mch3 eine Lokalisation in den Mitochondrien nachgewiesen wurde (Abb. 8), sind Tryptophanaufnahmemessungen an isolierten Mitochondrien des *mch1-5*-Deletionsstammes durchgeführt worden. Diese zeigten jedoch keine Reduktion der Tryptophanaufnahme gegenüber der Tryptophanaufnahme der Wildtyp-Mitochondrien (3.1.4.2). Deshalb kann sowohl für Mch3 als auch für die anderen Mch-Proteine eine Mitwirkung an der mitochondrialen Tryptophanaufnahme ausgeschlossen werden. Dennoch kann aufgrund der Ähnlichkeit der Promotorregion von MCH3 zur Promotorregion von ARO9

darüber spekuliert werden, daß Mch3 am Transport einer der beiden anderen aromatischen Aminosäuren in die Mitochondrien beteiligt ist. Dies könnte anhand von Tyrosin- bzw. Phenylalanintransportmessungen in isolierten Mitochondrien des *mch3*-Deletionsstammes im Vergleich zum Wildtyp ermittelt werden. Da für Mch2 ebenfalls eine intrazelluläre Lokalisation festgestellt wurde (s. Abb. 7), läßt sich unter Hinzunahme der gefundenen CCG-Wiederholung in der Promotorsequenz von *MCH2* eine Mitwirkung am Transport von aromatischen Aminosäuren in anderen Organellen als den Mitochondrien postulieren, z.B. der Vakuole. In diesem Organell sind schon einige Aminosäuretransporter bekannt. So konnte für Avt1 nachgewiesen werden, daß es an der Aufnahme von neutralen Aminosäuren in die Vakuole involviert ist, während Avt3, Avt4 und Avt6 am Efflux von Aminosäuren aus der Vakuole beteiligt sind (Russnak *et al.,* 2001).

Auch für Mch4 wurde eine intrazelluläre Lokalisation festgestellt. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen des Mch4-GFP-Fusionsproteins deuteten auf eine Lokalisation in der Vakuole hin (3.1.4), da nur dieses Organell einen solch großen Bereich in der späten Wachstumsphase in der Zelle ausfüllt (Wiemken *et al.*, 1970). Durch die Regulationsuntersuchung von *MCH4* konnte eine Regulation der *MCH4*-Expression vor allem durch aliphatische Aminosäuren (Glycin, Leucin, Isoleucin) aber auch andere Aminosäuren (Methionin, Threonin) nachgewiesen werden. Aufgrund der ermittelten Lokalisation und der Regulation durch verschiedene Aminosäuren kann auch bei Mch4 über eine mögliche Funktion beim Aminosäuretransport über die Vakuolenmembran spekuliert werden. Jedoch weist die Promotorsequenz von MCH4 keine typischen CCG-Wiederholungen auf wie sie beim Promotor von *ARO9* gefunden wurden (Iraqui *et al.*, 1999). Durch die Isolierung von Vakuolen und anschließende Transportmessungen wäre die Überprüfung der postulierten Funktion von Mch4 möglich.

Neben der Regulation durch Aminosäuren konnte auch eine Regulation der *MCH*-Expression durch Ammonium beobachtet werden, die besonders bei *MCH5* auffällig war (s. Tab. 8). Eine von der Stickstoffquelle abhängige Regulation ist schon für andere Aminosäuretransporter nachgewiesen worden. So ist beispielsweise die generelle Aminosäurepermease Gap1 auf Ammonium-haltigem Medium nicht aktiv (Jauniaux und Grenson, 1990). Auch diese Ähnlichkeit deutet auf eine mögliche Beteiligung der Mch-Proteine am Aminosäuretransport hin. Die Untersuchung der Expressionsregulation der *MCH*-Gene durch Aminosäuren hat somit einige interessante Hinweise auf mögliche Funktionen der Mch-Proteine erbracht, die in weiteren Tests, wie z.B. der erwähnten Vakuolenisolierung zum Zwecke der Transportmessung, genauer untersucht werden müßten.

#### 4.1.3 Lokalisationsuntersuchungen

Bezüglich der untersuchten Lokalisation der Mch-Proteine konnte für Mch3 die Lokalisation in einem intrazellulären Kompartiment, den Mitochondrien, mittels subzellulärer Fraktionierung von MCH3-HA-exprimierenden Zellen und anschließender Western-Analyse bestätigt werden (s. Abb. 8). Interessanterweise konnte für MCT1, den Monocarboxylattransporter der Ratte, kürzlich ebenfalls eine Lokalisation in den Mitochondrien der Herz- und Skelettmuskeln nachgeiesen werden (Brooks et al., 1999). Somit sind MCT1 der Ratte und Mch3 der Hefe die ersten Proteine der MFS (major facilitator superfamily), für die eine Lokalisation in den Mitochondrien gezeigt werden konnte. Für die Mch-Proteine Mch1, Mch 2, Mch 4 und Mch 5 konnten lediglich Hinweise auf eine intrazelluläre Lokalisation mittels MCH-GFP-Fusionen erhalten werden (s. Abb. 7). Bei der Verwendung dieser Methode muß berücksichtigt werden, daß es zu Mißlokalisationen des zu untersuchenden Proteins durch das Anhängen des GFP-Proteins kommen kann. Die Tatsache, daß für kein Mch-Protein eine Plasmamembranlokalisation nachgewiesen werden konnte, spricht somit auch gegen eine Beteiligung der Mch-Proteine am Monocarboxylattransport über die Plasmamembran.

Eine Bestätigung der postulierten Lokalisation von Mch4 in der Vakuolenmembran durch weitere Nachweismethoden schlug fehl. Für einen Nachweis mittels Western-Analyse reagierte das gegen ein spezifisches Peptid von Mch4 hergestellte Antiserum zu unspezifisch. Eine mögliche Erklärung für die Produktion unspezifisch reagierender Antiseren kann die Verwendung von Hefeextrakte in der Nahrung der immunisierten Kaninchen sein. Bei Verletzungen der Tiere bilden diese Antikörper gegen die in der Nahrung enthaltenen Hefeproteine, die dann in der Western-Blot-Analyse neben dem spezifischen Antikörper gegen Mch4 mit den anderen Hefeproteinen reagieren. Daß Mch4 auch durch Markierung mittels des HA- bzw. His<sub>6</sub>-Epitops nicht nachgewiesen werden konnte, liegt möglicherwiese an der niedrigen Expression von Mch4, begründet durch das verwendete Medium. Eine Anzucht der Zellen in einem Medium, das zusätzlich eine der aliphatischen Aminosäuren enthält, durch die eine starke *MCH4*-Expression nachgewiesen werden konnte (s. Tab. 8), könnte möglicherweise zur erfolgreichen Detektion von Mch4 in der Western-Analyse führen.

# 4.2 Expression heterologer Monocarboxylattransporter in *S. cerevisiae*

### 4.2.1 Entwicklung eines Expressionssystems zur Untersuchung heterologer Monocarboxylattransporter

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zuerst ein *jen1*-Deletionsstamm für die Expression und Untersuchung heterologer Monocarboxylattransporter konstruiert, in dem das Gen, welches für den Pyruvat- und Lactattransporter kodiert, deletiert worden war. Jedoch wies der *jen1*-Deletionsstamm einige Schwierigkeiten bezüglich der Untersuchung der funktionellen Expression von Monocarboxylattransportern aus der Ratte auf. Obwohl Jen1 offensichtlich der einzige Lactat- und Pyruvattransporter in der Plasmamembran der Hefe ist (Casal *et al.,* 1999; Akita *et al.,* 2000), stellte sich heraus, daß der *jen1*-Deletionsstamm auf Lactat- und Pyruvat-haltigem Medium ein zwar langsames, aber dennoch deutlich sichtbares Wachstum aufwies. Dies erschwerte die Untersuchungen der heterologen Monocarboxylattransporter erheblich.

Aufgrund des beobachteten Wachstums der jen1-Mutante auf Pyruvat- und Lactat-haltigem Medium, aber auch aufgrund der Tatsache, daß diese Monocarboxylate für die Hefe schlecht verwertbare Kohlenstoff- und Energiequellen darstellen, wurde die *pyk1 mae1 jen1*-Mutante konstruiert. Durch die Deletion von PYK1 und MAE1 ist diese Mutante nicht mehr in der Lage, Pyruvat zu synthetisieren (s. Abb. 10). Sie ist Pyruvat-auxotroph. Die Pyruvataufnahme aus dem Medium ist durch die Deletion des Pyruvattransporters Jen1 verhindert. Erst nach der funktionellen Expression eines heterologen Pyruvattransporters kann eine Pyruvataufnahme erfolgen, welche zur Komplementation der Pyruvat-Auxotrophie führt. Der Pyruvattransport ist somit für diese Mutante essentiell, was die Untersuchung der funktionellen Expression von heterologen Monocarboxylattransportern ermöglicht. Ein weiterer Vorteil der pyk1 mae1 jen1-Mutante ist, daß sie nach der Expression eines heterologen Monocarboxylattransporters zum einen nur geringe Pyruvatkonzentrationen benötigt, da sie Pyruvat nur als Supplement für die Synthese der Aminosäuren Alanin, Leucin, Isoleucin und Valin verwendet. Dies ermöglicht zum anderen die Verwendung von Ethanol als Kohlenstoffguelle, was ein schnelleres Wachstum als auf Pyruvat erlaubt und somit die Inkubationsdauer verkürzt. Es zeigte sich, daß die *pyk1 mae1 jen1*-Mutante auch bei längerer Inkubation auf Ethanol-haltigem Medium mit geringen Pyruvatkonzentrationen ohne die Expression eines funktionellen Monocarboxylattransporters nicht wachsen konnte (s. Abb. 12). Eine Diffusion des Pyruvats findet somit entweder nicht statt oder aber reicht nicht aus, um die Pyruvat-Auxotrophie zu komplememtieren. Somit ist durch die Konstruktion des *pyk1 mae1 jen1*-Deletionsstammes ein ideales Expressionssystem für die Untersuchung der funktionellen Expression von heterologen Monocarboxylattransportern und ihre anschließende Charakterisierung gelungen.

Da in der *pyk1 mae1 jen1*-Mutante entweder keine oder nur eine sehr geringe Diffussion des Pyruvats stattgefunden hat, die für die Komplememtation der Pyruvat-Auxotrophie nicht ausreichte, kann das langsame Wachstum der *jen1*-Mutante auf Pyruvat-haltigem Medium nicht durch die Diffusion des Pyruvats begründet werden. Eine mögliche Erklärung für das langsame Wachstum der *jen1*-Mutante auf Pyruvat- oder Lactat-haltigem Medium könnte die Verwendung eines analytisch nicht reinen, noch andere Kohlenstoffquellen enthältenden Pyruvats oder Lactats sein. Am wahrscheinlichsten erscheint jedoch, daß einige dem Medium zugesetzten Aminosäuren als Kohlenstoffquelle verwendet werden konnten.

## 4.2.2 Funktion von CD147 bei der funktionellen Expression von MCT1 und MCT2

Es konnte gezeigt werden, daß das Wachstum der pyk1 mae1 jen1-Mutante auf Ethanol-haltigem Medium mit geringen Pyruvatkonzentrationen durch die zusätzliche Expression von CD147 zum Monocarboxylattransporter MCT1 deutlich bzw. durch die zusätzliche Expression von CD147 zu MCT2 geringfügig verbessert werden konnte (Abb. 11, Abb. 12). Dies wurde durch die Lactat- und Pyruvattransportmessungen bestätigt, bei denen eine Steigerung des Transports beider Monocarboxylate nach der Koexpression von MCT1 und CD147 nachgewiesen werden konnte (Abb. 13). Weiterhin wurde beobachtet, daß die Konzentration von MCT1 in der Plasmamembran durch die Koexpression von CD147 erhöht wurde. Dies konnte anhand der Lokalisationsuntersuchung von MCT1 durch die subzelluläre Fraktionierung mittels Saccharosegradienten festgestellt werden (Abb. 16). Dabei konnte gezeigt werden, daß der Anteil der MCT1-Proteine durch die Koexpression von CD147 von 1,5% auf 2,4% gesteigert wurde. Demnach scheint CD147 bei der Translokation von MCT1 von intrazellulären Kompartimenten durch den Sekretionsapparat zur Plasmamembran mitzuwirken. Da MCT1 auch ohne die Koexpression von CD147 in der Plasmamembran detektiert werden konnte, scheint CD147 die Translokation von MCT1 nur zu erleichtern und nicht grundsätzlich für die Translokation des Proteins notwendig zu sein. Die gesteigerte Transportaktivität kann jedoch nicht nur durch die erhöhte Konzentration von MCT1 in der Plasmamembran erklärt werden, da diese durch die Koexpression um lediglich das Doppelte zunimmt. Die Transportaktivität wird

hingegen bei zusätzlicher Expression von CD147 um das dreifache gesteigert. Somit scheint CD147 ein Hilfsprotein zu sein, das neben der Beteiligung an der Translokation noch eine Funktion bei der Regulation der Aktivität von MCT1 ausübt.

Die Beteiligung von sog. Hilfsproteinen mit einer Transmembrandomäne (CD36, CD98, Gylkophorin) an der funktionellen Expression von Plasmamembrantransportern mit mehreren Transmembrandomänen (Transporter für langkettige Fettsäuren, Aminosäuretransporter, Anionen-Antiporter) wurde schon häufiger beobachtet (Abumrad et al., 1999, Kanai et al., 1998, Mastroberardino et al., 1998, Bruce *et al.*, 1994). Beispielsweise wurde zwischen dem Anionen-Antiporter (AE1) der menschlichen, roten Blutzellen und dem Glykophorin A (GPA) ein ähnliches Zusammenspiel wie bei CD147 und MCT1 beobachtet. GPA ist ein Sialoglykoprotein und weist wie CD147 eine Transmembrandomäne auf, wobei auch hier der C-Terminus zytoplasmatisch und der N-Terminus extrazellulär lokalisiert ist (Furthmayr, 1978; Siebert und Fukuda 1986; Fossum et al., 1991). Bruce et al. (1994) stellten eine von GPA abhängige Aktivität des Anionen-Antiporters fest. So betrug die Transportaktivität von AE1 in Glykophorin Adefizienten menschlichen Erythrozyten nur 60% der Transportaktivität von Kontrollzellen, in denen Glykophorin A exprimiert wurde. Neben der Regulation der Aktivität konnte gezeigt werden, daß die zusätzliche Expression von GPA zum Anionen-Antiporter AE1 in Xenopus Oozyten zu einer höheren Konzentration von AE1 an der Zelloberfläche der Oozyten führt (Groves und Tanner, 1992; Young et al. 2000). Die Zunahme der GPA-Konzentration in der Plasmamembran nahm dabei linear mit der Konzentration von AE1 in der Plasmamembran zu.

## 4.2.2.1 Beeinflussung der MCT1-Lokalisation durch die CD147-Koexpression

Kirk *et al.* (2000) beobachteten in Säugerzelllinien, daß CD147 bei Koexpression mit MCT1 oder MCT4 in der Plasmamembran zu finden ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lokalisation von CD147 in der Hefe mittels GFP-Fusion untersucht. Es konnten jedoch keine Aussage über die Lokalisation von CD147 gemacht werden. Dies ist möglicherweise auf ein instabiles CD147-GFP-Protein zurückzuführen, was beispielsweise durch eine Mißfaltung des CD147 aufgrund der GFP-Fusion verursacht sein könnte. Parallel wurde auch die Lokalisation von MCT1 mittels GFP-Fusion untersucht. MCT1 konnte sowohl ohne als auch bei gleichzeitiger Expression von CD147 in intrazellulären Strukturen ausgemacht werden, bei denen es sich wahrscheinlich um das endoplasmatische Retikulum oder die Vakuole handelt (s. Abb. 15). Somit war die Lokalisation von MCT1 nicht

sichtbar von der CD147-Expression beeinflußt. Es ist allerdings denkbar, daß der Anteil an MCT1 in der Plasmamembran auch bei zusätzlicher CD147-Expression so gering ist, daß er fluoreszenzmikroskopisch nicht sichtbar wird. Dies deckt sich mit dem Ergebnis der subzellulären Fraktionierung, bei der nur 1,5% des Gesamtanteil des MCT1-Proteins bei einer MCT1-Einzelexpression in der Plasmamembran zu finden war, während der restliche Anteil des Proteins intrazellulär lokalisiert war. Auch bei der Koexpression von MCT1 und CD147 war nur ein Anteil von 2,4% in der Plasmamembran lokalisiert (s. Abb. 16). Die Erhöhung der MCT1-Konzentration in der Plasmamembran durch die CD147-Koexpression zeigt aber deutlich, daß CD147 an der Translokation von MCT1 beteiligt ist, jedoch nicht zwingend für eine Plasmamembranlokalisation von MCT1 notwendig ist.

## 4.2.2.2 Beeinflussung der Transportaktivität von MCT1 durch die CD147-Koexpression

Neben der Beteiligung von CD147 an der Translokation von MCT1 scheint CD147 jedoch auch eine Funktion bei der Regulation der Aktivität von MCT1 auszuüben. Bei Betrachtung der Struktur der Transporter der MCT-Familie zeigt sich, daß die N-terminale Hälfte stärker konserviert ist als die C-terminale Hälfte (Saier, 1994). Daher wurde postuliert, daß der N-terminale Teil für die Energiekopplung und Insertion in die Membran wichtig ist, während der C-terminale Teil eine Funktion bei der Substratspezifität und Substraterkennung übernimmt (Saier, 1994). Da der Aminosäure Arginin an Position 306 in der achten Transmembrandomäne von MCT1 eine wichtige Funktion bei dem Transport von Lactat zugesprochen wurde (Rahman et al., 1999), ist es denkbar, daß CD147 beispielsweise eine Konformationsänderung von MCT1 in der Plasmamembran bewirkt, welche zu einer bezüglich des Transports geeigneteren Ausrichtung des Argininrestes führt. Nach Juel und Halestrap (1999) stellt die Wiederherstellung der ursprünglichen Ausrichtung des unbeladenen Transportproteins nach dem Transport des Substrats den limitierenden Schritt dar. Demnach wäre eine Beschleunigung der Rückkehr des Transporters in die Ausgangsposition durch eine dafür geeignete Konformation denkbar. Möglicherweise beeinflußt CD147 die Ausrichtung des zentralen Argininrests 306 in einer Weise, daß die Rückkehr des Transporters und damit der Transport beschleunigt wird. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die Steigerung der Pyruvat- und Lactataufnahme nach der Koexpression von MCT1 und CD147. Somit scheint CD147 nicht nur an der Translokation von MCT1 durch den Sekretionsapparat zur Plasmamembran beteiligt zu sein, sondern auch die Aktivität von MCT1 zu beeinflussen (Abb. 30).



**Abb. 30: Postulierte Funktion von CD147.** CD147 ist an der Translokation von MCT1 durch den Sekretionsapparat beteiligt (1). CD147 beeinflußt außerdem die Aktivität von MCT1 (2).

Es muß jedoch betont werden, daß durch die Koexpression von CD147 und MCT1 der Transport der Monocarboxylate nicht erst ermöglicht wird, sondern auch ohne die zusätzliche Expression von CD147 stattfindet. Die Koexpression führt lediglich zur Steigerung des Transports. Daß in der Hefe bereits die alleinige Expression von MCT1 einen Pyruvat- und Lactattransport vermittelt, kann zwei Gründe haben: Entweder benötigt MCT1 für seine Expression in der Hefe kein Hilfsprotein oder aber ein endogenes Protein kann die Funktion eines Hilfsproteins übernehmen. In Untersuchungen von Bröer *et al.* (1998, 1999) und Halestrap und Price (1999) konnte gezeigt werde, daß eine funktionelle Expression von MCT1 und MCT4 in *Xenopus* Oozyten erfolgte, nicht jedoch von MCT2. Kirk *et al.* (2000) postulierten deshalb, daß *Xenopus* Oozyten ein CD147-verwandtes Protein enthalten, das bei der Expression der beiden Monocarboxylat-transporter behilflich ist.

## 4.2.2.3 Beeinflussung der funktionellen Expression von MCT2 durch die CD147-Koexpression

CD147 scheint auch die funktionelle Expression von MCT2 in der Hefe zu unterstützen. Die alleinige Expression von MCT2 konnte zwar den Wachstumsdefekt der *pyk1 mae1 jen1*-Mutante auf Ethanol-haltigem Medium mit geringen Pyruvatkonzentrationen nicht aufheben, wie es bei der alleinigen Expression von MCT1 der Fall gewesen war. Jedoch ermöglichte die zusätzliche Expression von CD147 zu MCT2 ein sehr langsames Wachstum der Mutante (Abb. 11). Somit scheint CD147 für eine, wenn auch nur geringe, Aktivität von MCT2 in der Hefe essentiell zu sein. Die Expression von CD147 wirkt sich somit auf die funktionelle Expression beider Monocarboxylattransporter aus und stellt damit genau wie GPA in Bezug auf die funktionelle Expression des Anionen-Antiporters eine Art Hilfsprotein dar (Young *et al.*, 2000; Groves *et al.*, 1992). Ferner ist die Beein-flussung der funktionellen Expression von MCT2, aber auch von MCT1, durch die CD147-Koexpression die erste Beschreibung einer Modulation der Aktivität eines Säugerproteins in der Hefe durch die Expression eines weiteren Säugerproteins. Eine Veränderung der Aktivität durch die Wechselwirkung zwischen einem Hefeeigenen Protein und einem heterolog-exprimierten Säugerprotein in der Hefe konnte bereits beobachtet werden. So beschrieb Wiezcorke (2001), daß erst die Expression einer modifizierten Form des Hefe-eigenen Proteins Fgy1, das eine vergleichbare Struktur zu CD147 aufweist, eine funktionelle Expression des Glukosetransporters GLUT1 des Menschen in der Hefe ermöglicht.

#### 4.2.2.4 Problematik bei der Versuchsdurchführung

Bei den durchgeführten Tests zur Untersuchung des Wachstums und der Transportaktivität der jen1-Mutante bei Expression von MCT1 mit und ohne Koexpression von CD147 tauchten einige Schwierigkeiten auf. So konnten die Wachstumstests nur in flüssigem Pyruvat-haltigen Medium durchgeführt werden, da keine der Mutanten in flüssigem Lactat-haltigen Medium wachsen konnte. Auf Agarplatten mit Lactat als Kohlenstoffguelle hingegen konnten die Mutanten wachsen. Diese Diskrepanz des Wachstums auf Agarplatten und in flüssigem Medium wurde schon häufiger beobachtet. So zeigt beispielsweise eine tps1-Mutante in flüssigem Medium mit Glukose als Kohlenstoffguelle kein Wachstum, während sie auf Agarplatten mit der gleichen Kohlenstoffquelle wachsen kann (persönliche Mitteilung von E. Boles, Düsseldorf). Eine weitere Schwierigkeit zeigt sich bei der Betrachtung des Lactattransports, der über einen Zeitraum von 10 min beobachtet wurde. Hierbei konnte nur in den ersten vier Minuten eine Steigerung des Lactattransports durch die zusätzliche Expression von CD147 zu MCT1 festgestellt und zur Bestätigung der höheren Transportaktivität durch die Koexpression herangezogen werden (s. Abb. 14). Danach war die Lactattransportaktivität im MCT1-Einzelexpressionsstamm und Koexpressionsstamm gleich. Dies könnte in der unter den gewählten Wachstumsbedingungen nicht vorhandenen Lactatdehydrogenaseaktivität begründet sein, da die Zellen auf Glukosehaltigem Medium herangezogen wurden, in dem die Lactatdehydrogenase nicht aktiv ist (Guiard, 1985). Dadurch staut sich das transportierte Lactat in der Zelle an und wirkt dem Transport weiterer Lactatmoleküle entgegen.

#### 4.2.3 Interaktion zwischen CD147 und MCT1 bzw. MCT2

Die Beteiligung von CD147 sowohl an der Translokation als auch an der Regulierung der Transportaktivität der Monocarboxylattransporter in der Hefe deutet auf eine direkte Interaktion zwischen CD147 und MCT1 bzw. MCT2 hin. Mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems wurde die Wechselwirkung der Proteine untersucht. Es zeigte sich, daß beide Monocarboxylattransporter mit CD147 interagieren (Abb. 18, Abb. 19). Für MCT2 konnte sogar eine stärkere Wechselwirkung mit CD147 festgestellt werden als für MCT1 mit CD147. Kirk *et al.* (2000) stellten mittels Ko-Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen CD147 ebenfals eine Interaktion zwischen MCT1 und CD147 in Säugerzelllinien fest, konnten jedoch keine Interaktion zwischen MCT2 und CD147 nachweisen. Die Interaktion zwischen MCT1 und CD147 konnte auch durch eine Reaktion der Proteine in Anwesenheit von DIDS (4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'disulfonat), welches eng benachbarte Lysinreste chemisch verbindet, nachgewiesen werden. Für die Interaktion reichen die Transmembrandomäne und der zytoplasmatische Teil von CD147 aus (Kirk *et al.*, 2000).

CD147 ist ein Protein der Immunglobulin-Superfamilie und besitzt neben der Transmembrandomäne und dem zytoplasmatischen Schwanz einen langen extrazellulären Teil, der zwei Immunglobulin-ähnliche Domänen aufweist (Fossum et al., 1991). Bei Betrachtung der Struktur von CD147 zeigt sich, daß die Transmembranregion hoch konserviert ist verglichen mit strukturverwandten Proteine in anderen Organismen wie z.B. dem menschlichen Glykoprotein der Leukozyten M6 Ag, dem Glykoprotein Basigin der Maus oder dem HT7-Antigen des Huhns (Kasinrerk et al., 1992). Diese Proteine gehören zur Immunglobulin-Superfamilie und besitzen, genau wie CD147, in der Transmembranregion die geladene Aminosäure Glutamat (Kasinrerk et al., 1992; Fossuom et al., 1991), was für Proteine mit einer einzigen Transmembrandomäne sehr ungewöhnlich ist (Green, 1991). Die Bedeutung dieser sauren Aminosäure in der Transmembrandomäne von CD147 zeigten Wilson et al. (2001) auf. Sie tauschten den Glutamatrest gegen einen Argininrest aus, was dazu führte, daß weder CD147 noch MCT1 bei einer Koexpression die Plasmamembran erreichten. Die Transmembranregion von CD147, und insbesondere die saure Aminosäure Glutamat, scheint damit eine wichtige Funktion bei der Interaktion mit anderen Transmembranproteinen zu übernehmen. Da für den konservierten Argininrest in der achten Transmembrandomäne von MCT1 gezeigt werden konnte, daß er entscheidend für die Transportaktivität von MCT1 ist (Rahman et al., 1999), wurde postuliert, daß CD147 und MCT1 über ihre Transmembranregionen miteinander interagieren (Wilson et al., 2001). Untersuchungen mittels FRET (fluorescence resonance energy transfer) bestätigen die enge Nachbarschaft zwischen MCT1 und CD147, die eine Interaktion ermöglicht (Wilson *et al.*, 2001). Dabei wurden an MCT1 und CD147 eine blaue (CFP) bzw. eine gelbe (YFP) Varianten des grün fluoreszierenden Proteins fusioniert. Nach Expression der Fusionsproteine in COS-Zellen und der Anregung des einen fluoreszierenden Proteins konnte ein Energietransfer auf das andere fluoreszierende Protein beobachtet werden. Diese ist nur bei einem Abstand der Proteine von weniger als 100 Angström möglich.

Während die beobachtete Interaktion zwischen CD147 und MCT1 mittels Split-Ubiquitin-System auch in der Hefe nachgewiesen werden konnte, wurde in der Hefe zusätzlich eine Interaktion zwischen CD147 und MCT2 beobachtet (Abb. 18, Abb. 19). In Säugerzellinien dagegen konnte eine solche Interaktion weder durch Ko-Immunopräzipitation noch durch die Verwendung von DIDS zwischen MCT2 und CD147 nachgewiesen werden (Kirk *et al.*, 2000). Bergersen *et al.* (2000) postulierten eine Interaktion zwischen MCT2 und einem Protein in Neuronen. Es ist daher denkbar, daß MCT2 auch in den Säugerzelllinien mit einem anderen Protein interagiert und dadurch die Wechselwirkung zwischen MCT2 und CD147 verhindert wird. In der Hefe fehlt dagegen ein Protein, welches mit MCT2 wechselwirkt, so daß eine Interaktion zwischen MCT2 und CD147 stattfinden kann. Eine andere Möglichkeit ist, daß posttranslationale Modifikationen von MCT2 in Säugerzelllinien die Interaktion von MCT2 mit CD147 unterbinden. Allerdings konnte weder ein Phosphorylierung noch Glykosylierung für MCT2 nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung von A. Halestrap, England).

#### 4.2.4 Expression von MCT1 und MCT2 in *erg4*-Mutanten

Sterole sind wesentliche Bestandteile der Plasmamembran von eukaryontischen Zellen. Sie beeinflussen die Fluidität und Permeabilität der Membran (Lees *et al.*, 1979; Bard *et al.*, 1978). Während in Säugerzellen Cholesterol vorliegt, ist in der Plasmamembran der Hefe Ergosterol zu finden. Beide Sterole bilden einen großen Teil des Gesamtsterolanteils. So ist Ergosterol mit fast 90% das am häufigsten vorkommende Sterol in der Hefeplasmamembran (Zweytick *et al.*, 2000). Bei der heterologen Expression von Säugertransportproteine in der Hefe kann es daher aufgrund der unterschiedlichen Membranenzusammensetzung zu Schwierigkeiten bei der Expression kommen. Aus diesem Grund wurde die Expression der Säuger-Monocarboxylattransporter MCT1 und MCT2 in einer Hefe untersucht, die eine veränderte Membranzusammensetzung aufgrund der *ERG4*-Deletion aufweist. Durch die Deletion des *ERG4*-Gens, welches das letzte Enzym der Ergosterols, Ergosta-5,7,22,24(28)-tetraen-3ß-ol, wird statt des Ergosterols in

die Plasmamembran eingebaut. Es wurde beobachtet, daß die Aktivität einiger Transporter durch die veränderte Membranzusammensetzung beeinflußt werden kann. So zeigten Kaur und Bachhawat (1999), daß trotz der Überproduktion des <u>multidrug resistance-Proteins Pdr5</u> durch die Deletion von *ERG4* die Resistenz gegenüber Arzneimittel erniedrigt wird. Dies wurde auf eine verringerte Aktivität des Transporters in der *erg4*-Mutante zurückgeführt.

Eine Hefestamm, der in den Genen PYK1, MAE1 und JEN1 deletiert ist, kann nur bei der funktionellen Expression eines Monocarboxylattransporters auf Ethanolhaltigem Medium mit geringen Pyruvatkonzentrationen wachsen. Während diese Mutante durch die Expression von MCT1 langsam wachsen konnte, führte die Expression von MCT2 nicht zur Komplementation des Wachstumsdefekts (Abb. 11). Durch die zusätzliche Deletion von ERG4 in der pyk1 mae1 jen1-Mutante konnte die Expression von MCT1 und MCT2 offensichtlich nicht positiv beeinflussen werden (Tab. 9). Die ERG4-Deletion scheint sogar die funktionelle Expression zu behindern. So zeigte die *pyk1 mae1 jen1*-Mutante, die MCT1 exprimierte und in der ERG4 deletiert war, ein langsameres Wachstum als die Mutante, die das ERG4-Wildtypgen besaß. Vermutlich hat in diesem Fall die veränderte Membranzusammensetzung einen negativen Effekt auf die Expression von MCT1. Es wäre denkbar, daß nach dem Substrattransport die Rückkehr des leeren Transporters in die Ausgangsposition, was den limitierenden Schritt beim Transport darstellt (Juel und Halestrap, 1999), langsamer erfolgt, da sich die Fluidität der Membran verändert hat. Das Wachstum der Mutante ist dann aufgrund des reduzierten Transports verlangsamt. Andererseits ist auch eine geringere Anzahl der MCT1-Proteine, die in die veränderte Plasmamembran inserieren, möglich. Es kann darüber spekuliert werden, daß die Deletion von ERG4 sogar grundsetzlich zur Behinderung der heterologen Expression von Transportern in der Hefe führt. Sicher ist jedenfalls, daß die Deletion von ERG4 die Expression der heterologen Monocarboxylattransporter MCT1 und MCT2 nicht fördert.

#### 4.3 Suche nach dem mitochondrialen Pyruvattransporter der Hefe

Für alle Mch-Proteine konnte durch *MCH*-GFP-Fusionen eine intrazelluläre Lokalisation gezeigt werden (Abb. 7). Für Mch3 konnte die festgestellte Lokalisation in den Mitochondrien sogar bestätigt werden (s. Abb. 8; Makuc *et al.*, 2000). Da die Lokalisation der übrigen Mch-Proteine nicht genauer bestimmt wurde, läßt sich bei ihnen eine mitochondriale Lokalisation nicht gänzlich ausschließen. Aufgrund der intrazellulären, möglicherweise mitochondrialen, Lokalisation der Mch-Proteine

und der reduzierten Trockenmasseausbeute des *mch1-5*-Deletionstammes bei Anzucht im aeroben, Glukose-limitierten Chemostaten wurde eine Beteiligung eines oder mehrerer Mch-Proteine am mitochondrialen Pyruvattransport postuliert (Makuc et al., 2000). Diese Vermutung wurde aufgestellt, da die pda1-Mutante unter gleichen Bedingungen den gleichen Phänotyp zeigt (Pronk *et al.*, 1994). Die reduzierte Trockenmasseausbeute der *pda1*-Mutante wurde auf den verringerten ATP-Gewinn zurückgeführt, der in der Verwertung des Pyruvats über den Pdhbypass begründet liegt. Es wurde postuliert, daß die geringere ATP-Ausbeute eine verringerte Biomasseproduktion zur Folge hat. Durch die Deletion des mitochondrialen Pyruvattransporters wäre auch nur noch eine Verwertung des Pyruvats über den Pdh-bypass möglich, was zum gleichen Phänotypen wie bei der *pda1*-Mutante führen würde. Da dieser Phänotyp bei der *mch1-5*-Mutante vorlag, wurde postuliert, daß eines der Mch-Proteine der mitochondriale Pyruvattransporter ist. Die Pyruvattransportmessungen an isolierten Mitochondrien des *mch1-5*-Deletionsstammes zeigten jedoch keinen Unterschied zu den Transportmessungen der Wildtypmitochondrien, so daß keine signifikante Beteiligung eines der Mch-Proteine am mitochondrialen Pyruvattransport vorzuliegen scheint (Makuc et al., 2000).

Auch die Untersuchungen von Deletionsmutanten, in denen zusätzlich zu den MCH-Genen Gene deletiert wurden, die an der Bereitstellung von mitochondrialem Acetyl-CoA beteiligt sind, sprechen gegen eine Pyruvattransportaktivität der Mch-Proteine in den Mitochondrien. Die Existenz eines Acetyl-Carnitin-Carriers in den Mitochondrien wurde schon von Pronk et al. (1994) postuliert. Sie zeigten, daß in den Mitochondrien einer pda1-Mutante kein Coenzym A verbraucht wird, wie es bei der Umwandlung des Pyruvats zum Acetyl-CoA in den Mitochondrien durch die Pyruvatdehydrogenase der Fall ist. Da die *pda1*-Mutante aber im Glukose-limitierten Chemostaten wachsen kann, muß es einen Transporter geben, der das im Zytoplasma synthetisierte Acetyl-CoA in die Mitochondrien transportiert. Von Palmieri et al. (1999) wurde ein Acyl-Carnitin-Carrier identifiziert, der vom Gen YOR100c kodiert wird. Die Deletion dieses Acyl-Carnitin-Carriers (CRC1) im mch1-5-Deletionsstamm führte jedoch nicht zum Wachstumsdefekt auf Pyruvat. Dies sollte jedoch bei der Deletion des mitochondrialen Pyruvattransporters zusätzlich zum Acyl-Carnitin-Carrier der Fall sein, da kein Acetyl-CoA mehr in den Tricarbonsäurezyklus (TCA) einfließen kann (s. Abb. 21). Bei Betrachtung der Tatsache, daß für das von YOR100c kodierte Protein eine Acyl-Carnitin-Transportaktivität nur an rekonstituierten Liposomen nachgewiesen worden war (Palmieri et al., 1999), kann die Existenz eines weiteren Acyl-Carnitin-Carriers in der Hefe nicht ausgeschlossen werden. Dieser könnte dann ein Wachstum auf Pyruvat-haltigem Medium ermöglichen. In diesem Fall kann eine Beteiligung eines der Mch-Proteine am mitochondrialen Pyruvattransport nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Weiterhin kann einem der Mch-Proteine eine Transportaktivität für Pyruvat in den Mitochondrien auch dann nicht abgesprochen werden, wenn zusätzlich noch ein weiterer mitochondrialer Pyruvattransporter existiert, da auch in diesem Fall das Wachstum der *crc1 mch1-5*-Mutante auf Pyruvat dem des Wildtyps entspräche.

Durch die Deletion von ALD7, der mitochondrialen Acetaldehyddehydrogenase, wurde ein vergleichbarer Versuchsansatz wie mit der YOR100c-Deletion im mch1-5-Deletionsstamm geschaffen, da auch in diesem Fall, falls eines der Mch-Proteine ein mitochondrialer Pyruvattransporter ist, Acetyl-CoA nicht in den TCA-Zyklus einfließen kann (s. Abb. 23). In diesem Fall ist jedoch die Existenz mehrerer Acyl-Carnitin-Carrier unbedeutend, da schon die Bildung von Acetyl-CoA durch die ALD7-Deletion verhindert wird. Zwar liegt im Zytoplasma Ald6, die zytoplasmatische Acetaldehyddehydrogenase vor (Meaden et al., 1997), diese kann das Fehlen von Ald7 jedoch nicht vollständig komplementieren (Boubekeur et al., 1999). Doch auch bei der ald7 mch1-5-Mutante konnte kein Wachstumsdefekt auf Pyruvat beobachtet werden. Genau wie bei den Versuchen mit der crc1 mch1-5-Mutante kann jedoch auch hier nicht gänzlich ausgeschlossen werden, daß eines der Mch-Proteine am mitochondrialen Pyruvattransport beteiligt ist, wenn die Existenz eines weiteren Pyruvattransporters in Betracht gezogen wird. Sollte jedoch eines der Mch-Proteine tatsächlich am Pyruvattransport in den Mitochondrien mitwirken, kann nur eine geringfügige Beteiligung vorliegen, die von der Transportaktivität eines weiteren Pyruvattransporters überlagert wird. Der zusätzliche mitochondriale Pyruvattransporter konnte jedoch auch durch einen synthetisch-letalen "Screen", der in der ald7 mch1-5-Mutante durchgeführt wurde, nicht identifiziert werden (3.3.3). Möglicherweise war der gewählte Stichprobenumfang zu klein, so daß die gewünschte Mutante nicht unter den untersuchten Mutanten ausfindig gemacht werden konnte.

#### 4.3.1 Sukzessive Deletion der MCF-Gene

Da der unbekannte mitochondriale Pyruvattransporter vermutlich unter den 23 noch unbekannten Mitglieder der insgesamt 35 Mitglieder der "mitochondrial carrier family" (MCF) zu finden ist, wurden die Gene *YDL198c, YER053c, YPL134c und YOR222w* der MCF im Rahmen einer sukzessiven Deletion aller MCF-Gene als erste deletiert. Da angenommen wurde, daß es mehr als einen mitochondrialen Pyruvattransporter gibt, wurden die Proteine ausgesucht, die eine hohe Homologie zu einem weiteren Mitglied der MCF aufwiesen. Auch der hohe

CAI und die induzierte Genexpression unter Glukose-limitierten Bedingungen zeichnete die ausgewählten Proteine als putative mitochondriale Pyruvattransporter aus (Nelson et al., 1998; Belenkiy et al., 2000). Pyruvataufnahmemessungen an isolierten Mitochondrien der Vierfachmutante zeigten jedoch keinen Unterschied zum Pyruvattransport von Wildtypmitochondrien, so daß ausgeschlossen werden kann, daß der mitochondriale Pyruvattransporter von einem dieser vier Gene der MCF kodiert wird. Für die Gene YPL134c und YOR222w, die eine Homologie von über 60% aufweisen (Nelson et al., 1998), konnte inzwischen die Funktion ermittelt werden. Palmieri et al. (2000) zeigten, daß es sich dabei um Transporter handelt, die 2-Oxoglutarat und 2-Oxoadipat aus den Mitochondrien in das Zytoplasma transportieren. Für das von YER053c kodiert Protein wurde von Takabatake et al. (2001) gezeigt, daß es nicht in den Mitochondrien, sondern in der Vakuole lokalisiert ist. Dies ist ungewöhnlich, da für Yer053c aufgrund seiner vorhergesagten Struktur mit den sechs Transmembrandomänen und der Konsensussequenz, die alle Mitgleider der MCF aufweisen (Kuan und Saier, 1993), eine Lokalisation in den Mitochondrien postuliert wurde. Andereseits wurde schon häufiger die postulierte Lokalisation eines Proteins durch genauere Untersuchungen widerlegt. So ist für den Monocarboxylatransporter MCT1 der Ratte zusätzlich zur Lokalisation in der Plasmamembran eine Lokalisation in den Mitochondrien festgestellt worden (Brooks et al., 1999), obwohl seine Struktur auf eine Lokalisation in der Plasmamembran hindeutet. Im Rahmen dieser Arbeit ist auch für das Mch3-Protein eine mitochondriale Lokalisation ermittelt worden (s. Abb. 8; Makuc et al., 2000), die von der aufgrund der Strukturähnlichkeit zu anderen Plasmamembrantransportern postulierten Plasmamembranlokalisation abweicht. Da im Fall von Yer053c die Lokalisation jedoch mittels eines FLAG-Epitops bestimmt worden ist, welches an den C-Terminus von YER053c fusioniert wurde (Takabatake et al., 2001), bleibt die beobachtete Lokalisation zweifelhaft, da es sich auch um ein Artefakt handeln könnte. Die Fusion könnte auch zur Mißlokalisation des Proteins in der Vakuole, dem Abbauort von Proteinen, geführt haben, so daß sie die natürliche Lokalisation von Yer053c nicht widerspiegelt.

Für das vom Gen YDL198c kodierte Protein ist bis heute noch keine Funktion bekannt. Der Wachstumsdefekt der *ydl198c*-Mutante auf synthetischem Medium mit Glukose, der durch die Zugabe von Arginin und teilweise auch durch die Zugabe von Ornithin komplementierbar ist, deutet auf eine Beteiligung des Proteins am mitochondrialen Arginin- oder Ornithintransport hin. Ein Ornithintransporter in den Mitochondrien, *ARG11*, ist schon identifiziert worden (Crabeel *et al.*, 1996; Palmieri *et al.*, 1997). Eine *arg11*-Mutante weist einen reduzierten

Arginin- und Ornithintransport in den Mitochondrien auf (Soetens *et al.*, 1998). Die Arginin- und Ornithinaufnahmemessungen an isolierten Mitochondrien der *ydl198c*-Mutante zeigten jedoch keinen Unterschied im Vergleich zu den Transportmessungen an Mitochondrien des Wildtyps. Es konnte somit nicht bestätigt werden, daß es sich bei dem Protein Ydl198c um einen mitochondrialen Ornithin- oder Arginintransporter handelt. Daß der Wachstumsdefekts der *ydl198c*-Mutante durch Ornithinzugabe auf Ammonium-freiem Medium besser komplementiert wurde als auf Ammonium-haltigem Medium, könnte durch die auf diesem Medium nicht aktive generelle Aminosäurepermease Gap1 erklärt werden. Die Expression von *GAP1* wird durch Ammonium reprimiert (Jauniaux und Grenson, 1990). Da Ornithin auch von Gap1 transportiert wird, ist der Ornithintransport auf Ammonium-haltigem Medium geringer als auf Ammonium-freien Medium, so daß auch der Wachstumsdefekt der *ydl198c*-Mutante schlechter komplementiert wird.

## 4.4 Suche nach dem Acetattransporter der Plasmamembran in *S. cerevisiae*

#### 4.4.1 Yhl008c als mutmaßlicher Acetattransporter der Plasmamembran

In der Hefe S. cerevisiae konnte bis heute nur ein Transporter identifiziert werden, der Acetat über die Plasmamembran transportieren kann. Jen1, für den eine Transportaktivität für Pyruvat und Lactat nachgwiesen werden konnte (Casal et al., 1999; Akita et al., 2000), ist auch in der Lage, Acetat über die Plasmamembran zu transportieren. Neben Jen1 wurde jedoch die Existenz eines weiteren Acetattransportsystems beschrieben (Casal et al., 1996; Paiva et al., 1999), das jedoch bis heute nicht identifiziert werden konnte. Da dieser unbekannte Acetattransporter auch eine Transportaktivität für Formiat besitzt, wurde für das vom Gen YHL008c kodierte Protein aufgrund seiner Ähnlichkeit zu bakteriellen Formiat-Nitrat-Transportern eine Acetattransportaktivität postuliert (Paulsen et al., 1998). Die uneingeschränkte Fähigkeit des yhl008c jen1 mch1-5-Deletionsstamm auf Acetat-haltigem Medium zu wachsen (3.4.1) läßt eine signifikante Beteiligung des Yhl008c-Proteins am Acetattransport über die Plasmamembran jedoch ausschließen. Auch mittels Acetattransportmessungen konnte kein reduzierter Acetattransport in der Mutante nachgewiesen werden (Makuc et al., 2000). Da der Acetattransporter im *yhl008c jen1 mch1-5*-Deletionsstamm noch aktiv ist, kann er eine mögliche, geringe Transportaktivität der Mch-Proteine als auch von Yhl008c überlagern, wie es auch beim Jen1-Transporter der Fall ist.

Somit kann eine geringe Transportaktivität der Mch-Proteine und des Yhl008c-Proteins nicht mit endgültiger Gewißheit ausgeschlossen werden.

#### 4.4.2 Sef1 als mutmaßlicher Acetattransporter der Plasmamembran

Der gesuchte Acetattransporter konnte auch durch die Isolierung der Ac16b-Mutante und anschließende Identifizierung des mutmaßlich mutierten Gens in dieser Mutante, SEF1, nicht ausfindig gemacht werden. Sowohl die Ac16b-Mutante als auch die *sef1*-Mutante zeigten nicht nur einen Wachstumsdefekt auf Acetat-haltigem, sondern auch auf Pyruvat-haltigem Medium. Bei der sef1-Mutante war sogar das Wachstum auf Ethanol-haltigem Medium verlangsamt (Abb. 27). Die Pyruvat- und Acetataufnahmemessungen in der sef1-Mutante spiegelten das Ergebnis der Wachstumstests insoweit wider, als daß sowohl der Transport von Pyruvat als auch von Acetat im Vergleich zum Wildtyp reduziert war (s. Abb. 28). Der Pyruvattransport war sogar stärker beeinträchtigt als der Acetattransport in der sef1-Mutante. Dies deutet darauf hin, daß Sef1 sowohl am Pyruvat- als auch am Acetattransport beteiligt ist. So übt Sef1 möglicherweise eine übergeordnete Funktion aus, wie beispielsweise die Regulation des Pyruvatund Acetattransporters. Denkbar wäre dabei eine Funktion als Transkriptionsfaktor, wie sie für Sef1 bereits postuliert worden ist (http://genomewww4.stanford.edu/cgi-bin/SGD/). Eine regulatorische Funktion wurde auch für das mutierte Gen in der Ace12-Mutante postuliert. Die Ace12-Mutante kann nicht nur auf Acetat-haltigem, sondern auch auf Lactat-haltigem Medium nicht wachsen (Paiva et al., 1999). Da das Wachstum der sef1-Mutante auf Acetat-haltigem Medium sehr stark beeinträchtigt war, der Transport von Acetat im Vergleich zum Wildtyp aber nur um 40% reduziert war, kann eine zusätzliche Beteiligung von Sef1 am Metabolismus nicht ausgeschlossen werden. Da die Ac16b-Mutante auf Ethanol-haltigem Medium besser wachsen konnte als die sef1 yhl008c jen1 mch1-5-Mutante, ist fraglich, ob SEF1 das mutierte Gen in der Ac16b-Mutante darstellt. Es ist wahrscheinlicher, daß die Überexpression von SEF1 den Wachstumsdefekt der Ac16b-Mutante auf Acetat komplementieren konnte ohne jedoch das defekte Gen derselben darzustellen.

#### 4.4.3 Stl1 als mutmaßlicher Acetattransporter der Plasmamembran

Die Funktion des Transporter Stl1, der durch die Untersuchung der Hexosetransporter-Familie identifiziert worden war (Wiezcorke *et al.*, 1999), wurde auch hinsichtlich einer Beteiligung am Acetatransport über die Plasmamembran untersucht. Er wies eine Ähnlichkeit zu drei Proteinen von *Aspergillus niger* auf, deren Gene nur durch Acetat oder Pyruvat induziert werden (persönliche Mitteilung von G. Ruijter, Niederlande). Doch weder ein Wachstumsdefekt noch ein reduzierter Acetatransport konnte bei einer Deletion von *STL1* in der *jen1*-Mutante beobachtet werden, so daß der gesuchte Acetattransporter auch von diesem Gen nicht kodiert wird (Abb. 29). Seine Identität bleibt weiterhin unbekannt.

## **5 ZUSAMMENFASSUNG**

Der Transport von Monocarboxylsäuren bzw. den entsprechenden Carboxylatanionen, wie z.B. Pyruvat, Lactat und Acetat, über die Plasmamembran als auch über intrazelluläre Membranstrukturen ist sowohl in der Hefe *S. cerevisiae* als auch in Säugerzellen von großer Bedeutung. In Säugerzellen vermitteln die Proteine der Monocarboxy-lattransporter-Familie (MCT) die Aufnahme und die Sekretion von Monocarboxylaten und z.T. auch von aromatischen Aminosäuren.

In dieser Arbeit wurde der Monocarboxylattransport in S. cerevisiae charakterisiert. Nach der Sequenzierung des Hefegenoms wurde eine Familie von fünf Genen identifiziert, die für Proteine mit Ähnlichkeit zu den Monocarboxylattransportern der Säuger kodieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese Monocarboxylattransporter-Homologen (Mch) hinsichtlich ihrer Funktion, Lokalisation und Regulation untersucht. Es konnte bei keinem dieser Proteinen weder eine Import- noch eine Exportfunktion für Monocarboxylate wie Pyruvat, Lactat und Acetat festgestellt werden. Sowohl die verschiedenen mch-Mutanten als auch ein mch1-5-Deletionsstamm wuchsen auf den getesteten Kohlenstoffquellen (Pyruvat, Acetat, Lactat, Glukose und Ethanol) mit Wachstumsraten wie der Wildtypstamm. Auch die Aufnahme- und Sekretionsraten von Monocarboxylaten waren nicht von denen des Wildtypstammes zu unterscheiden. Erst die zusätzliche Deletion des JEN1-Lactattransportergens führte zu einem Wachstums- und Aufnahmedefekt von Lactat und Pyruvat. Die Transkription der MCH-Gene wurde z.T. durch aromatische Aminosäuren reguliert. Für Mch3 konnte eine Lokalisation in den Mitochondrien festgestellt werden und auch die anderen Mch-Proteine zeigten intrazelluläre Lokalisationen. Die angenommene Funktion der Mch-Proteine als mitochondriale Pyruvatoder Aminosäuretransporter konnte jedoch nicht bestätigt werden. Mehrere Strategien zur Suche nach einem Acetattransporter in S. cerevisiae blieben bisher erfolglos.

Es wurde ein funktionelles Hefe-Expressionssystem für heterologe Monocarboxylattransporter entwickelt. Dieses basiert auf einem Hefestamm, der durch Deletion der Gene, die für die Pyruvatkinase (*PYK1*) und das Malatenzym (*MAE1*) kodieren, Pyruvatauxotroph auf Medien mit Ethanol als Kohlenstoffquelle ist und durch die Deletion des Lactat-/Pyruvattransportergens *JEN1* auf die Expression eines funktionellen heterologen Monocarboxylattransporters angewiesen ist. In diesem Stamm konnte MCT1 der Ratte erfolgreich funktionell exprimiert und charakterisiert werden. Dabei stellte es sich heraus, daß durch zusätzliche Expression von CD147 der Ratte, einem Protein der Immunglobulin-Superfamilie, sowohl der Transport von MCT1 zur Plasmamembran als auch die Aktivität des Transporters gesteigert werden konnte. Mit Hilfe des "Split-Ubiquitin"-Systems konnten direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen CD147 und MCT1 bzw. MCT2 festgestellt werden. Damit konnte die Funktion von CD147 als eine Art Hilfsprotein bei der Expression von Monocarboxylattransportern bestätigt werden.

## **6 LITERATURVERZEICHNIS**

- Abumrad, N. Coburn, C. und Ibrahimi, A. (1999) Membrane proteins implicated in longchain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim. Biophys. Acta* 1441: 4-13.
- Akita, O., Nishimori, C., Shimamoto, T., Fujii, T., und lefuji, H. (2000) Transport of pyruvate in *Saccharomyces cerevisiae* and cloning of the gene encoding pyruvate permease *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 980-984.
- Andrade, R.P. und Casal, M. (2001) Expression of the lactate permease gene *JEN1* from yeast *Saccharomyces cerevisiae. Fungal Genet. Biol.* 32: 105-111.
- André, B. (1995) An overview of membrane transport proteins in *S. cerevisiae*. Yeast 11: 1575-1611.
- Baker, S.K., Tarnopolsky, M.A. und bonen, A. (2001) Expression of MCT1 and MCT4 in patient with mitochondrial myopathy. *Muscle Nerve* 24: 394-398.
- Bard, M., Lees, N.D., Burrows, L.S. und Kleinhaus, F.W. (1978) Differences in crystal violet uptake and cation-induced death among yeast sterol mutants. *J. Bacteriol*. 135: 1146-1148.
- Belenkiy, R., Haefele, A., Eisen, M.B. und Wohlrab, H. (2000) The yeast mitochondrial transport proteins: new sequences and consensus residues, lack of direct relation between consensus residues and transmembrane helices, expression patterns of the transport protein genes, and protein-protein interactions with other proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1467:207-218.
- Bergersen, L., Waerhaug, O., Helm, J., Thomas, M., Laake, P., Davies, A.J., Wilson, M.C., Halestrap, A.P. und Ottersen, O. (2000) A novel postsynaptic density protein: the monocarboxylate transporter MCT2 is co-localized with δ-glutamate receptors in postsynaptic density of parallel fiber-Purkinje cell synapses. *Experimental Brain Research* 136: 523-534.
- Bergmeyer H.U. (1974) Methoden der Enzymatischen Analyse. Weinheim, Germany: Verlag Chemie.
- Betz, B. (1997) Funktionelle Charakterisierung und subzelluläre Lokalisierung von möglichen Transportproteinen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- 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 kinase in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol*. 80: 1730-1734.
- Boeke, J.D., Lacroute, F. und Fink, G.R. (1984) A positive seletion for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-flouro-orotic acid resistence. *Mol. Gen. Genet*.197: 345-346.
- Bojunga, N. und Entian, K.D. (1999) Cat8, the activator of gluconeogenetic genes in Saccharomyces cerevisiae, regulates carbon source-dependent expression of NADP-dependent cytosolic isocitrate dehydrogenase (Idp2p) and lactate permease (Jen1). Mol. Gen. Genet. 262: 869-875.

- Boles, E. und Zimmermann F.K. (1993) Induction of pyruvate decarboxylase in glycolysis mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with the concentration of three-carbon glycolytic metabolites. *Arch. Microbiol.* 160: 324-328.
- Boles, E., Schulte, F., Miosga, T., Freidel, K., Schlüter, E., Zimmermann F.K., Hollenberg, C.P. und Heinisch J.J.(1997) Characterization of a glucose-repressed pyruvate kinase (Pyk2) in *Saccharomyces cerevisiae* that is catalytically insensitive to fructose-1,6-bisphosphate. *J. Bacteriol.* 179: 2987-2993.
- Boles, E., de Jong.Gubbels, P. und Pronk, J.T. (1998) Identification and characterization of *MAE1*, the *Saccharomyces cerevisiae* structual gene encoding mitochondrial malic enzyme. *J. Bacteriol.* 180: 2875-2882.
- Bonen, A., Mc Cullagh, K.J.A., Putman, C.T., Hultman, E., Jones, N.L. und Heigenhauser, G.J.F. (1998) Short-term training incraeses human muscle MCT1 and femoral venous lactate in relation to muscle lactate. *Am. J. Physiol.* 274: E102-107.
- Boubekeur, S., Bunoust, O. Camougrand, N. Castroviejo, M. Rigoulet, M. und Guerin, B. (1999) A mitochondrial pyruvate dehydrogenase bypass in the yeast *Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem.* 274: 21044-21048.
- Bröer, S., Rahman, B., Pellegri, G., Pellerin, L., Martin, J.-L., Verleysdonk, S., Hamprecht, B und Magistretti, P.J. (1997) Comparison of lactate transport in astroglia cells and monocarbocylate transporter 1(MCT1) expressing *Xenopus laevis* oocytes. *J. Biol. Chem.* 272: 30096-30102.
- Bröer, S., Schneider, H.P., Bröer, A., Rahman, B., Hamprecht, B. und Deitmer, J.W. (1998) Charactrerization of the monocarboxylate transporter1 expressed in *Xenopus laevis* oocytes by changes in cytosolic pH. *Biochem. J.* 333: 167-174.
- Bröer, S., Bröer, A., Schneider, H.P., Stegen, C., Halestrap, A.P. und Deitmer, J.W. (1999) Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. J.* 341: 529-535.
- Brooks, G.A., Brown, M.A., Butz, C.E., Sicurello J.P. und Dubouchaud, H. (1999) Cardiac and skeletal muscle mitochondria have a monocarboxylate transporter MCT1. *J. Appl. Physiol.* 87: 1713-1718.
- 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.
- Burke, R.L., Tekamp-Olson, P. und Najarian, R. (1983) The isolation, characterization and sequence of the pyruvate kinase gene of *Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem.* 258: 2193-2201.
- Carpenter, L., Poole, R.C. und Halestrap, A.P. (1996) Cloning and sequencing of the monocarboxylate transporter from mouse Ehrlich Lettre tumor cell confirms ist identity as MCT1 and demonstrates that glycosylation is not required. *Biochim. Biophys. Acat* 1279: 157-163.
- Casal, M., Blázquez, M., Gamo, F.J., Gancedo, C. und Leao, C. (1995) Lack of lactate proton symport avtivity in *pck1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microb Lett.* 128: 279-282.

- Casal, M. und Leao, C. (1995) Utilization of short-chain monocarboxylic acids by the yeast *Torulaspora delbrueckii*: specificity of the transport systems and their regulation. *Biochem. Biophys. Acta* 1267:122-130.
- Casal, M., Cardoso, H. und Leao, C. (1996) Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 142: 1385-1390.
- Casal, M., Paiva, S., Andrade, R.P., Gancedo, C. und Leao C. (1999) The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by *JEN1. J. Bacteriol.* 181:2620-2623.
- Cássio, F. Leao, C. und van Uden, N. (1987) Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae. Appl. Environ. Microbiol.* 53: 509-513.
- Celenza, J.L. und Carlson, M. (1986) A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* 233: 1175-1180.
- Ciriacy, M. und Breitenbach, I. (1979) Physiological effects of seven different blocks in glycolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol*. 139: 152-160.
- Crabeel, M., Soetens, O., De Rijcke, M., Pratiwi, R. und Pankiewicz, R. (1996) The ARG11 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes a mitochondrial integral membrane protein required for arginine biosynthesis. J. Biol. Chem. 271: 25011-25018.
- De Antoni, A, D'Angelo, M., Dal Pero, F., Sartorello, F., Pandolfo, D, Pallavicini, A., Lanfranchi, G. und Valle, G. (1997) The DNA sequence of cosmid 13-14b from chromosome XIV of *Saccharomyces cerevisiae* reveals an unusually high number of overlapping open reading frames. *Yeast* 13: 261-266.
- Deuticke, B., Beyer, E. und Forst, B. (1982) Discrimination of three parallel pathways of L-lactate transport in the human erythrocyte membrane by inhibitors and kinetic properties. *Biochim. Biopys. Acta* 684: 96-110.
- Dimmer, K.S., Friedrich, B., Lang, F., Deitmer, J.W. und Bröer, S. (2000) The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochem. J.* 350: 219-227.
- Dlugai, S. (1999) Molekulargenetische und proteinchemische Untersuchung zur Funktion eines Glukosesensors (Snf3) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- 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.
- Fields, S. und Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245-246.
- Fishbein, W.N. (1986) Lactate transporter defect: a new disease of muscle. *Science* 234:1254-1256.
- Fossum, S., Mallett, S. und Barclay, A.N. (1991) The MRC OX-14 antigen is a member of the immunoglobulin superfamily with an unusual transmembrane sequence. *Eur. J. Immunol.* 21: 671-679.

- Fox, J.E., Meredith, D. und Halestrap, A.P. (2000) Characterization of human monocarboxylate transporter 4 substantiates its role in lactic acid efflux from skeletal muscle. *J. Physiol.* 529: 285-293.
- Furthmayr, H. (1978) Structual comparison of glycophorins and immunochemical analysis of genetic variants. *Nature* 271: 519-524.
- Garcia, C.K., Li, X., Luna, J. und Francke, U. (1994) cDNA cloning of the human monocarboxylate transporter 1 and chromosomal localization of the SLC16A1 locus to 1p13.2-p12. *Genomics* 23: 500-503
- Garcia, C.K., Goldstein, J.L., Pathak, R.K., Anderson, R.G.W. und Brown, M.S. (1994) Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate and other monocarboxylates: implication for the cori cycle. *Cell* 76: 865-873.
- Garcia, C.K., Brown, M.S., Pathak, R.K. und Goldstein, J.L. (1995) cDNA Cloning of MCT2, a Second Monocarbocylate Transporter Expressed in Different Cells than MCT1. *J. Biol. Chem.* 270: 1843-1849
- Garrel, J.I. (1997) The yeast proteome handbook. 2<sup>nd</sup> ed. Proteome Inc., Beverly, Maas.
- Gawaz, M.D. und Klingenberg, M.G. (1990) Structure-function studies of adenine nucleotide transport in mitochondria. II. Biochemical analysis of distinct *AAC1* and *AAC2* proteins in yeast. *J. Biol. Chem.* 265: 14202-14208.
- 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.
- Green, N.M. (1991) The semiotics of charge. Nature 351: 349-350.
- Groves, J.D. und Tanner, M.J.A. (1992) Glycophorin A facilitates the expression of human band3-mediated anion transport in *Xenopus* Oocytes. *J. Biol. Chem.* 267: 22163-22170.
- Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J. und Hegemann J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucl. Acids Res.* 24: 2519-2524.
- Güldener, U., Heinisch, J., Köhler, G.J., Voss, D und Hegemann, J.H. (2002) A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knock-outs in budding yeast. *Nucleid Acid Res.* 30: No. 6e23
- Guiard, B. (1985) Structure, expression and regulation of the nuclear gene encoding a mitochondrial protein: the yeast L(+)-lactate cytochrome c oxidoreductase (cytochrome b2). *EMBO J.* 4: 3265-3272.
- Halestrap, A.P. (1976) Transport of lactate and pyruvate into human erythorcytes. *Biochem. J.* 156: 193-207.
- Halestrap, A.P. und Price, N.T. (1999) The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem. J.* 343: 281-299.
- Harlow, E. und Lane, D. (1988) Antibodies A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Holyoak, C.D. Bracey, D., Piper, P.W. Kuchler K. und Coote, P.J. (1999) The Saccharomyces cerevisiae weak-acid-inducible ABC transporter Pdr12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an energy-dependent mechanism. J. Bacteriol. 181: 4644-4652.

- Iraqui, I., Vissers, S., André, B. und Urrestarazu, A. (1999) Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cel. Biol.* 19: 3360-3371.
- Jackson, V.N., Price, N.T. und Halestrap, A.P. (1995) cDNA cloning of MCT1, a monocarboxylate transporter from rat skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1238: 193-196.
- Jackson, V.N., Price, N.T., Carpenter, L. und Halestrap, A.P. (1997) Cloning of the monocarboxylate transporter isoform MCT2 from rat testis provides evidence that expression in tissues is species-specific and may involve posttranslational regulation. *Biochem. J.* 324: 447-453.
- Jauniaux. J.-C., Urrestarazu, A. und Wiame, J.-M. (1978) Arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: subcellulär localization of the enzymes. *J. Bacteriol*. 133: 1096-1107.
- Jauniaux, J.-C. und Grenson, M. (1990) GAP1, the general amino acid permease gene of Saccharomyces cerevisiae. Nucleotide sequence, protein similarity with other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. Eur. J. Biochem. 190: 39-44.
- Johnsson, N. und Varshavsky, A. (1994) Split ubiquitin as a sensor of protein interaction *in vivo*. *Biochemistry* 91: 10340-10344.
- Juel, C. (2001) Current aspects of lactate exchange: lactate/H<sup>+</sup> transport in human skeletal muscle. *Eur. J. Appl. Physiol.* 86:12-16.
- Juel, C und Halestrap, A.P. (1999) Lactat transport in skeletal muscle role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J. Physiol*. 517.3: 633-642.
- 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 acuds activated by the heavy chain of 4F2 antigen (CD98). *J. Biol. Chem.* 273: 23629-23632.
- Kaur, R. und bachhawat, A.K. (1999) The yeast multidrug resistance pump, Pdr5, confers reduced drug resistance in erg mutants of *Saccharomyces cerevisiae. Microbiology* 145: 809-818.
- Kasinrerk, W., Fiebiger, E., Stevanová, I., Baumruker, T., Knapp, W. und Stockinger, H. (1992) Human leucocyte activation antigen M6, a member of the Ig superfamily, is the species homologue of the rat OX-47, mouse basigin, and chicken HT7 molecule. *J. Immunol.* 149:847-854.
- Kim, C.M., Goldstein, J.L. und Brown, M.S. (1992) cDNA cloning of MEV, a mutant protein that facilitates cellular uptake of mevalonate, and identification of the point mutation responsible for ist gain of function. *J. Biol. Chem.* 267: 23113-23121.
- Kim, D.K., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Matsuo, H., Cha, S. H. und Endou, H. (2001) Expression, cloning of a Na+-independent aromatic amino acid transporter with structual similarity to H<sup>+</sup>/monocarboxylate transporters. *J. Biol. Chem.* 276:17221-17228.
- Kirk, P., Wilson, M.C., Heddle, C. Brown, M.H., Barclay, A.N. und Halestrap, A.P. (2000) CD147 is tightly associated with lactat transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J.* 19:3896-3904.

- Klebe, R.J., Harries, J.V., Sharp, Z.D. und Douglas, M.G. (1983): A general method for ployethyle-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* 25:333-341.
- Koehler-Stec, E.M., Simpson, I.A., Vannucci, S.J., Landschulz, K.T. und Landschulz, W.H. (1998) Monocarboxylate transporter expression in mouse brain. *Am. J. Physiol.* 275: E516-524.
- Kölling, R. und Hollenberg, C.P. (1994) The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiqinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* 13: 3261-3271.
- Krishnamurthy, S.S. und Prasad R. (1999) Membrane fluidity affects functions of Cdr1p, a multidrug ABC transporter of *Candida albicans. FEMS Microbiol. Letters* 173: 475-481.
- Kuan, J. und Saier Jr., M.H. (1993) The mitochondrial carrier family of transport proteins: Structural, functional, and evolutionary relationships. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28: 209-233.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structual proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lafreniere, R.G., Carrel, L. und Willard, H.F. (1994) A novel transmembrane transporter encoded by XPCT gene in Xp13.2. *Human Mol. Gen.* 3: 1133-1139.
- Lafuente, M.J. und Gancedo, C. (1999) Disruption and basic functional analysis of six novel ORFs of chromosome XV from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 935-943.
- Lees, N.D., Bard, M., Kemple, M.D. Hank, R.A. und Kleinhaus, F.W. (1979) ESR determination of membrane order parameter in yeast sterol mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 553: 469-475.
- Lin, R.Y., Vera, J.C., Chaganti, R.S. und Golde, D.W. (1998) Human monocarboxylate transporter 2 (MCT2) is a high affinity pyruvate transporter. *J. Biol. Chem.* 273: 28959-28965.
- Lodi, T., Fontanesi, F. und Guiard, B. (2002) Co-ordinate regulation of lactate metabolism genes in yeast: the role of the lactate permease *JEN1. Mol. Genet. Genomics* 266: 838-847.
- Makuc, J., Paiva, S., Schauen, M., Krämer, R., André, B., Casal, M., Leao, C. und Boles, E. (2001) The putative monocarboxylate permeases of the *yeast Saccharomyces cerevisiae* do not transport monocarboxylate acids across the plasma membrane. *Yeast* 18: 1131-1143.
- Maniatis, T., Fritsch, E:F: und Sambrook, J. (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Springer Harbor Laboratory, New York.
- 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 membres of a permease family. *Nature* 395: 288-291.
- Mc Cullagh, K.J.A., Poole, R.C., Halestrap, A.P., O'Brien, M. und Bonen, A. (1996) Role of the lactate transporter (MCT1) in skeletal muscles. *Am. J. Physiol.* 271: E143-150.

- Meaden, P.G., Dickinson, F.M., Mifsud, A., Tessier, W., Westwater, J., Bussey, H. und Midgley, M. (1997) The ALD6 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes a cytosolic, Mg2+-activated acetaldehyde dehydrogenase. Yeast 13: 1319-1327.
- Merezhinskaya, N., Fishbein, W.N., Davis, J.I. und Foellmer, J.W. (2000) Mutations in MCT1 cDNA in patients with symptomatic deficiency in lactate transport. *Muscle Nerve* 23: 90-97.
- Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Springer Harbor Laboratory, New York, Ed.3<sup>rd</sup>.
- Mumberg, D., Müller, R. und Funk, M. (1994) Regulatable promotors of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucl. Acids Res.* 22:5767-5768.
- Nelissen, B., De Wachter, R. und Goffeau, A. (1997) Classification of all putative permeases and other membrane plurispanners of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *S. cerevisiae. FEMS Microbiol. Rev.* 21: 113-134.
- Nelson, D.R., Felix, C.M. und Swanson, J.M. (1998) Highly conserved charge-pair networks in the mitochondrial carrier family. *J. Mol. Biol.* 277: 285-308.
- Paiva, S., Althoff, S., Casal, M. und Leao, C. (1999) Transport of acetat in mutants of Saccharomyces cerevisiae defective in monocarboxylate permeases. FEMS Microbiol. Lett. 170: 301-306.
- Palmieri, L., De Marco, V., Iacobazzi, V., Palmieri, F., Runswick, M.J. und Walker, J.E. (1997) Identification of the yeast *ARG-11* gene as a mitochondrial ornithine carrier involved in arginine biosynthesis. *FEBS Lett*. 410: 447-451.
- Palmieri, L., Lasorsa, F.M., Iacobazzi, V., Runswick, M.J., Palmieri, F. und Walker, J.E. (1999) Identification of the mitochondrial carnitin carrier in *Saccharomyces cerevisiae. FEBS Lett.* 462: 472-476.
- Palmieri, L., Agrimi, G., Runswick, M.J., Fearnley, I.M., Palmieri, F. und Walkers J.E. (2001) Identification in *Saccharomyces cerevisiae* of two isoforms of a novel mitochondrial transporter for 2-oxoadipate and 2-oxoglutarate. *J. Biol. Chem.* 276: 1916-1922.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T. und Saier, M.H. (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1-34.
- Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Nelissen, B., Goffeau, A. und Saier Jr., M.H. (1998) Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *S. cerevisiae. FEBS Lett.* 430: 116-125.
- Pellet, P.E., McKnight, J.L.C., Jenkins, F.J. und Roizman, B. (1985) Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence of a protein encoded in a small herpes simplex virus DNA fragment capable of *trans*-inducing α genes. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 82:5870-5874.
- Philp, N.J., Chu, P., Pan,T.C., Chu, M.L., Stark, K., Boettiger, D., Yoon, H. und Kieber-Emmons, T. (1995) Developmental expression and molecular cloning of REMP, a novel retinal epithelial membrane protein. *Exp. Cell Res.* 219: 64-73.

- Philp, N.J., Yoon, H. und Grollman, E.F. (1998) Monocarboxylate transporter MCT1 is located in the apical membrane and MCT3 in the basolateral membrane of rat RPE. *Am. J. Physiol.* 274: R1824-1828.
- Philp, N.J., Yoon, H. und Lombardi, L. (2001) Mouse MCT3 gene is expressed preferentially in retinal pigment and choroid plexus epithelia. *Am. J. Phsyiol. Cell Physiol.* 280: C1319-1326.
- Piper, P., Mahé, Y., Thompson, S., Pandjaitan, R., Holyoak, C., Egner, R., Mühlbauer, M., Coote, P. und Kuchler, K. (1998) The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *EMBO J.* 17: 4257-4265.
- Poole, R.C. und Halestrap, A.P. (1993) Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am. J. Physiol.* 264: C761-C782.
- Poole, R.C., Sansom, C.E. und Halestrap, A.P. (1996) Studies of the membrane topology of the rat erythrocyte H<sup>+</sup>/lactate cotransporter (MCT1). *Biochem. J.* 320: 817-824.
- Price N.T., Jackson, V.N. und Halestrap A.P. (1998) Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochem. J.* 329: 321-328.
- Pronk, J.T., Thibaut, J.W., Luttik, M.A.H., *et al.* (1994) Energetic aspects of glucose metabolism in a pyruvate-dehydrogenase-negative mutant of *Saccharomyces cerevisiae. Microbiology.* 140: 601-610.
- Rahman, B.R., Bröer, A., Deitmer, J.W. und Bröer, S. (1999) Helix 8 and helix 10 are involved in substrate recognition in the rat monocarboxylate transporter MCT1. *Biochem.* 38: 11577-11584.
- Rothstein, R.J. (1983) One step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol*. 101: 202-211.
- Russnak, R., Konczal, D. und McIntire, S.L. (2001) A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. *J. Biol. Chem.* 276: 23849-23857.
- Saier, M.H. (1994) Computer-aided analysis of transport protein sequence gleaning evidence concerning function, structure, biogenesis, and evolution. *Microbiol. Rev.* 58: 71-93.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C. und Fink, G.R. (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>- ATPases. *Nature* 319: 689-693.
- Siebert, P.D., Fukuda, M. (1986) Isolation and characterization of human glycophorin A cDNA clones by a synthetic oligonucleotide approach: Nucleotide sequence and mRNA structure. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 83: 1665- 1669.
- Soetens, O., Crabeel, M., El Moualij, B., Duyckaerts, C. und Sluse F. (1998) Transport of arginine into isolated mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem*. 258: 702-709.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. und Te Hessen, S. (1998) A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interaction between membrane proteins *in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5187-5192.
- Stagljar, I und te Hessen, S. (2000) Detecting interactions between membrane proteins in vivo using chimeras. *Methods Enzymol.* 327: 190-198.

- Van Belle, D. und André, B. (2001) A genomic view of yeast membrane transporters. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13: 389-398.
- Vojtek, A.B., Hollenberg, J.A und Cooper, J.A. (1993) Mammalian RAS interacts directly with the serine/threonine kinase RAF. *Cell* 74: 205-214.
- Walsh, M.C., Smits, H.P., Scholte, M. und van Dam, K. (1994) Affinity of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated durcing growth on glucose. *J. Bacteriol.* 176: 953-958.
- Walsh, R.B., Clifton, D., Horak, J. und Fraenkel, D.G. (1991) *Saccharomyces cerevisiae* null mutants in glucose phosphorylation: metabolism and invertase eypression. *Genetics* 128: 521-527.
- Wiezcorke, R. Molekulargenetische und physiologische Untersuchung zur Funktion von *FGY1* bei der heterologen Expression von Glukosetransportern in der Hefe *Sacchromyces cerevisiae*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstal, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P. und Boles, E. (1999) Concurrent knoch-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexose in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* 464:123-128.
- Wilson, M.C., Meredith, D. und Halestrap, A.P. (2001) Fluorescence resonance energy transfer studies on the interaction between the lactate transporter MCT1 and CD147 provide information on the topology and stoichiometry of the complex *in situ*. J. Biol. Chem. 277: 3666-3672.
- Wilson, M.C.; Jachson, V.N., Heddle, C., Price, N.T., Pilegaard, H., Juel, C, Bonen, A., Montgomery, I., Hutter, O.F. und Halestrap A.P. (1998) Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalayzed by the monocarboxylate transporter isoform MCT3. *J. Biol. Chem.* 273:15920-15926
- Wiemken, A., Matile, P. und Moor, H. (1970) Vacuolar dynamics in synchronously budding yeast. *Arch. Microbiol.* 2: 89-103.
- Wirth, R. (1989) Elektroporation: Eine alternative Methode zur Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA. *Forum Mikrobiol*. 11:507-515.
- Wittke, S, Lewke, N., Müller, S. und Johnsson, N. (1999) Probing the molecular environment of membrane proteins In Vivo. *Mol. Biol. Cell* 10:2519-2530.
- Yoon,H. Fanelli, A., Grollman E.F. und Philp N.J. (1997) Identification of a unique monocarboxylate transporter (MCT3) in retinal pigment epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234: 90-94.
- Yoon, H., Donoso, L.A. und Philp, N.J. (1999) Cloning of the human monocarboxylate transporter MCT3 gene: localization to chromosome 22p12.3-p13.2. *Genomics* 60: 366-370.
- Young, M.T., Bechmann, R., Toye, A.M. und Tanner, M.J.A. (2000) Red-cell glycophorin a-band 3 interaction associated with the movement of band 3 to the cell surface. *Biochem. J.* 350: 53-60.
- Zamenhoff, S, (1957) Preparation and assay of desoxyribonucleic acids from animals tissue. *Methods Enzymol.* 3:696-704.
- Zhao, C., Wilson, M.C., Schuit, F., Halestrap, A.P. und Rutter, G.A. (2001) Expression and distribution of lactate/monocarboxylate transporter isoforms in pancreatic islets and the exocrine pancreas. *Diabetes* 50: 361-366.

- Zimmermann, F.K. (1975) Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* 31: 71-81.
- Zweytick, D., Hrastnik, C., Kohlwein, S.D. und Daum, G. (2000) Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24(28) reductase, Erg4, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* 470: 83-87.

## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Ala	Alanin
ALP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumablumin
bzw.	beziehungsweise
Ci	Curie
Cys	Cystein
<sup>14</sup> C	radioaktives Kohlenstoffisotop
cpm	Zerfälle pro Minute
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindol
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
EMS	Ethylmethansulfonat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FOA	5-fluoro-orotic acid
G418	Geneticin
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Glu	Glutamat
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HMW	Molekulargewichtsstandart "High molecular weight, prestained"
kb	Kilobasen
KAc	Kaliumacetat
kDa	Kilodalton
LiAc	Lithiumacetat

Lys	Lysin
MCF	"mitochondrial carrier famliy"
MCH	Monocarboxylattransporter-Homologe
MCT	Monocarboxylattransporter
MDR	"multi drug resistance"
Met	Methionin
mg	Milligramm
min	Minuten
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
ONPG	2-Nitrophenyl-β-d-galaktopyranosid
ORF	"open reading frame"
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEP	Phosphenolpyruvat
PMSF	Phenylmethylsulgonylfluorid
Pyr	Pyruvat
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Sekunde
S. c.	Saccharomyces cerevisiae
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
U	Einheit der Enzymaktivität
Ura	Uracil
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-ß-D-galaktopyranosid
YNB	Yeast Nitrogen Base
z. B.	zum Beispiel

#### Danksagungen

Ich möchte Herrn Priv.-Doz. Dr. Eckhard Boles für die Bereitstellung des Themas, die gute Betreuung der Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und die vielen wertvollen Tips und Anregungen danken.

Herrn Prof. Dr. Ernst danke ich für die freundliche Übernahme des Referats.

Frau Prof. Dr. Knust danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bei den gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Boles möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft sowie die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

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

Dr. Andreas Kranz danke ich für seine Hilfe bei den auftretenden technischen Problemen.

Frau Anna Nagy danke ich für die stetige Hilfe bei der Bereitstellung von Laborutensilien.

Ein großes, herzliches Dankeschön gilt meiner Mutter und Marcus, die stets ein offenes Ohr für mich hatten und mir jederzeit zur Seite standen.

#### Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, den 17.5.2002