

**Untersuchungen zur funktionellen Expression des  
humanen Glukosetransporters GLUT4 in der Hefe  
*Saccharomyces cerevisiae* und der Nachweis möglicher  
Interaktionspartner**

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

vorgelegt durch Silke Dlugai  
aus Düsseldorf (geb. in Hilden)

Düsseldorf 2003

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

Referent: Prof. Dr. C. P. Hollenberg

1. Koreferentin: Prof. Dr. E. Knust

2. Koreferent: Prof. Dr. E. Boles

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2003

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Hexosetransporter von <i>S. cerevisiae</i> .....	6
1.1.1	Ein hexosetransport-defizienter Hefestamm.....	8
1.2	Glukosetransporter von Säugern .....	8
1.2.1	Ein Vergleich der homologen Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 ...	11
1.2.2	Unterschiedliche Insulinsignalwege induzieren GLUT4-Translokation ....	11
1.2.3	GLUT4-Transportmotive .....	14
1.2.4	Durch Glukosetransportdefekte ausgelöste Krankheiten.....	16
1.2.5	Heterologe GLUT-Expression in Hefe .....	18
1.3	Einfluß der Membrankomponenten auf Transportproteine .....	19
1.4	Das Split-Ubiquitin-System .....	22
1.5	Das Ziel dieser Arbeit.....	23
2	Material und Methoden.....	24
2.1	Stämme und Medien.....	24
2.1.1	Bakterienstämme.....	24
2.1.2	Medien und Anzucht von <i>E. coli</i> .....	24
2.1.3	Hefestämme .....	24
2.1.4	Medien und Anzucht von Hefestämmen.....	26
2.2	Plasmide .....	27
2.3	Synthetische Oligonukleotide.....	30
2.4	Genbanken .....	34
2.5	Chemikalien und Enzyme .....	34
2.6	Antikörper.....	35
2.7	Transformationen.....	36
2.7.1	Transformation von <i>E. coli</i> .....	36
2.7.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	36
2.8	Präparation von DNA .....	36

---

---

2.8.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	36
2.8.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	36
2.8.3	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	37
2.9	Enzymatische Modifikation von DNA .....	37
2.9.1	DNA-Restriktion .....	37
2.9.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	38
2.9.3	Ligation .....	38
2.10	PCR-Amplifizierung von DNA .....	38
2.11	Reverse Transkriptions-PCR von mRNA .....	39
2.12	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	40
2.13	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	40
2.14	Sequenzierung von DNA.....	41
2.15	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	41
2.16	Elektrophoretische Trennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen..	41
2.17	Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse.....	41
2.18	Spezifischer Nachweis der Proteine Glut4, Pep12 und Dpm1 .....	42
2.19	Zellfraktionierung durch Saccharosegradientenzentrifugation .....	42
2.20	Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität.....	43
2.20.1	Quantitative Enzymtests .....	43
2.20.2	Qualitative Enzymtests („X-Gal Overlay-Assay“) .....	44
2.21	Kreuzung von Hefestämmen, Tetradenanalyse und Bestimmung des Paarungstyps.....	44
2.22	Gen-Deletion in <i>S. cerevisiae</i> .....	44
2.23	Klonierung von DNA-Fragmenten durch <i>in vivo</i> -Rekombination.....	45
2.24	Split-Ubiquitin System .....	46
2.25	Präparation der Membransterole aus <i>S. cerevisiae</i> .....	46
2.26	Gaschromatographische Analyse .....	46

---

---

3	Ergebnisse .....	48
3.1	Heterologe Expression des humanen Glukosetransporters GLUT4 in einem hexosetransport-defizienten Hefestamm .....	48
3.1.1	Charakterisierung genomischer <i>fgy41-49</i> Suppressormutanten.....	48
3.1.2	Komplementation von <i>fgy41-49</i> mit einer Genbank.....	50
3.1.2.1	<i>Isolierung und Charakterisierung verschiedener Genbankplasmide.....</i>	51
3.1.3	Konstruktion von GLUT4-Suppressormutanten mit einer Transposongenbank.....	53
3.1.4	Deletion von <i>YLR143w</i> und <i>ERG4</i> .....	55
3.1.5	Deletion weiterer <i>ERG</i> -Gene zur Klärung der Ergosterolfunktion .....	55
3.1.5.1	<i>Gaschromatographische Analyse der Ergosterol-Deletionsmutanten.....</i>	58
3.1.6	Intrazelluläre Lokalisierung von GLUT4 .....	59
3.2	Interaktionsstudien mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems (SUS) .....	61
3.2.1	Etablierung und Optimierung des Split-Ubiquitin-Systems (SUS).....	64
3.2.1.1	<i>Konstruktion geeigneter Hefestämme für das SUS-System .....</i>	64
3.2.1.2	<i>Konstruktion der SUS-Plasmide .....</i>	64
3.2.1.3	<i>Unterschiedliche Hintergrundaktivität der Cub-Plasmide.....</i>	69
3.2.2	Interaktion zwischen GLUT-Transportproteinen .....	70
3.2.2.1	<i>Bestimmung der GLUT4/GLUT4-Interaktion.....</i>	70
3.2.2.2	<i>Bestimmung der GLUT1/GLUT1-Interaktion.....</i>	72
3.2.2.3	<i>Bestimmung der GLUT4/GLUT1-Interaktion.....</i>	73
3.2.3	Interaktion zwischen Hxt9 Transportproteinen.....	74
3.2.4	SUS-Nachweis mit dem RUra3-Reporterprotein.....	75
3.2.4.1	<i>Hintergrundaktivität der CubURA3-Plasmide.....</i>	75
3.2.4.2	<i>Interaktion zwischen GLUT1/GLUT1 und Hxt9/Hxt9.....</i>	76
3.2.5	Erg4 Interaktionsstudien .....	77
3.2.5.1	<i>Interaktionsnachweis zwischen Erg4 und GLUT1, Hxt9, CD147, Fgy1 ...</i>	79
3.2.5.2	<i>Erg4 Interaktionsnachweis mit Hxt1 und Shr3.....</i>	80

---

---

3.2.6	Entwicklung einer cDNA-Genbank zur Suche nach mit GLUT4 interagierenden Proteinen .....	82
3.2.6.1	<i>Konstruktion geeigneter Vektoren.....</i>	<i>82</i>
3.2.6.2	<i>UBC9-Interaktionstest mit GLUT4 und GLUT1 .....</i>	<i>84</i>
3.2.6.3	<i>Konstruktion einer cDNA-Bank .....</i>	<i>84</i>
3.2.6.4	<i>GLUT4-Interaktionsnachweis mit Skelettmuskelproteinen.....</i>	<i>87</i>
4	Diskussion .....	89
4.1	Konstruktion eines GLUT4-exprimierenden Hefestammes.....	89
4.1.1	Charakterisierung der <i>fgy4X</i> -Mutationen .....	90
4.1.2	Identifizierung eines endogenen Hefefaktors, der die funktionelle GLUT4-Expression inhibiert .....	91
4.2	Interaktion zwischen GLUT4 und homologen Transportproteinen.....	98
4.3	Vor- und Nachteile des SUS-Systems .....	101
4.4	Entwicklung einer cDNA-Genbank aus humaner Skelettmuskel-RNA.....	102
5	Zusammenfassung .....	104
6	Literaturverzeichnis .....	105
7	Abkürzungsverzeichnis.....	119

---

## 1 EINLEITUNG

Die Fähigkeit, den einfachen Zucker Glukose über die Plasmamembran zu transportieren, ist ein Merkmal fast aller Zellen, vom einfachen Bakterium bis hin zur hoch spezialisierten Säugerzelle. Glukose wird für die Produktion von ATP verwendet und für die Bildung zuckerhaltiger Makromoleküle (Newsholme und Leech, 1985). Der Transport hydrophiler Zuckermoleküle über den hydrophoben Kern der Plasmamembran wird dabei von verschiedenen Mechanismen gewährleistet. In Bakterien wird Glukose z.B. mit Hilfe von Protonen-Symport-Systemen, Substrat bindenden Transportern und Gruppentranslokations-Systemen aufgenommen, wohingegen in Eukaryonten Na<sup>+</sup>-abhängige Cotransporter und einfache Uniporter den Glukosetransport vermitteln (Walmsley *et al.*, 1998; Saier, 2000). Uniportersysteme werden auch als passive Carrier bezeichnet, weil sie ein Substrat entlang eines Konzentrationsgradienten energieunabhängig durch erleichterte Diffusion transportieren. Die *HXT*-Gene der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und die *GLUT*-Gene der Säuger kodieren für Proteine, die Hexosen durch erleichterte Diffusion transportieren. Sie gehören einer großen Transporter-Superfamilie an (MFS, „major facilitator superfamily“), die z.B. verschiedene Kohlenstoffquellen oder Aminosäuren transportieren, sich aus 12 Transmembransegmenten zusammensetzen und aufgrund konservierter Aminosäurereste und Motive zum Teil starke Homologien aufweisen (Marger und Saier, 1993; Baldwin, 1993; Boles und Hollenberg, 1997; Kruckeberg, 1996; Mueckler, 1994; Pao *et al.*, 1998; Walmsley *et al.*, 1998).

### 1.1 Hexosetransporter von *S. cerevisiae*

Die fakultativ anaerobe Hefe *S. cerevisiae* verwertet ein breites Spektrum an Mono-, Di- und Oligosacchariden, Ethanol, Acetat, Glycerol, Pyruvat und Lactat. Um den Zuckertransport über die Plasmamembran zu erleichtern, besitzt sie verschiedene Proteine, deren Regulation dabei vom Hefestamm und der Verfügbarkeit der einzelnen Zuckermoleküle abhängt. *S. cerevisiae* verwendet eine Anzahl von Hexose-Monosacchariden wie Glukose, Fruktose, Mannose und Galaktose als Substrate bzw. als Energie und Kohlenstofflieferanten. Dabei wird die Glukose als Nährstoff bevorzugt, was anhand des sehr komplex regulierten Glukosemetabolismus deutlich wird. Die Hefe besitzt 34 Gene, die für die sogenannte Zuckerpermease-Familie kodieren, worunter 18 Gene speziell für Hexosetransporter-verbundene Proteine, *HXT1-17* und *GAL2*, kodieren. Sequenzvergleiche ergaben konservierte Bereiche innerhalb der transmembranen Helices und Unterschiede in der Sequenz und Länge der N- und C-terminalen cyto-

plasmatischen Regionen (Kruckeberg, 1996). Die Hexosetransporter Hxt1-Hxt4, Hxt6 und Hxt7 sind dabei derzeit am besten untersucht und für die Hefe metabolisch relevant, sie katalysieren die Aufnahme von Glukose, Fruktose und Mannose (Reifenberger, *et al.*, 1995; 1997) und unterscheiden sich in ihrer unterschiedlichen Affinität für Hexosen (Kruckeberg, 1996). In *S. cerevisiae* wurden zwei Aufnahmesysteme beschrieben, ein konstitutiv, nieder-affines System (hoher  $K_m$ , zwischen 15-20 mM) und ein Glukose-reprimiertes, hoch-affines System (niedriger  $K_m$ , zwischen 1-2 mM). Beide Systeme setzen sich aus mehreren Transportproteinen zusammen, wobei die Synthese der jeweiligen Glukosetransporter je nach verfügbarer Glukosemenge durch eine regulierte *HXT*-Genexpression gewährleistet wird (Özcan und Johnston, 1999). Die *HXT1*-Transkription wird durch hohe Glukosekonzentrationen induziert, was darauf hindeutete, daß es für einen nieder-affinen Transporter mit hohem  $K_m$ -Wert kodiert. Für Hxt1 konnte ein  $K_m$ -Wert von 100 mM beschrieben werden (Reifenberger *et al.*, 1997). Die Expression von *HXT3* wird sowohl durch niedrige als auch durch hohe Glukosekonzentrationen induziert und es vermittelt in einer *hxt*-Nullmutante einen Glukosetransport mit einer niedrigen Affinität und einem  $K_m$ -Wert von 60 mM. Hxt1 und Hxt3 scheinen verantwortlich für den Glukosetransport in Zellen, die mit hohen Glukosekonzentrationen wachsen (Boles und Hollenberg, 1997; Reifenberger *et al.*, 1997; Özcan und Johnston, 1999). Die Expression von *HXT2*, *HXT6* und *HXT7* wird hingegen durch niedrige Glukosekonzentrationen induziert. Es konnte für Hxt6 und Hxt7 in einer *hxt*-Nullmutante ein  $K_m$ -Wert von 1-2 mM ermittelt werden. Im Fall von Hxt2 konnte eine biphasische Aufnahmekinetik beobachtet werden mit einem  $K_m$ -Wert von 1,5 mM und 60 mM (Reifenberger *et al.*, 1997). Die transkriptionelle Regulation von *HXT4* stimmt nicht mit der angenommenen Funktion überein. Die Induktion durch niedrige Glukosekonzentrationen weist auf einen hoch-affinen Transporter hin, jedoch vermittelt *HXT4* in einer *hxt*-Nullmutante kein Wachstum auf niedrigen Glukosekonzentrationen (5 mM), sondern kodiert für ein Protein mit einer intermediären Affinität für Glukose ( $K_m = 9$  mM). Über die Funktion der anderen Hexosetransporter der Hefe, Hxt5 und Hxt8 bis Hxt17 ist bislang noch recht wenig bekannt (Boles und Hollenberg, 1997).

Der Metabolismus der Hefe unterliegt der sogenannten Katabolitrepression oder Glukoserepression. Das bedeutet, daß in Anwesenheit von Glukose, unabhängig von der Sauerstoffverfügbarkeit, die Synthese der Enzyme für die Disaccharid- (Saccharose und Maltose) und Galaktoseverwertung, für das Wachstum auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Ethanol, Acetat, Glyzerol, Pyruvat und Lactat) und die Entwicklung der Mitochondrien reprimiert sind (Carlson, 1998; 1999;

Gancedo, 1998; Trumbly, 1992). Die Transkription der Glukose-reprimierten Gene wird dabei durch die Bindung von Mig1, einem Zink-Finger Transkriptionsrepressor, unterdrückt. Die Bindung von Mig1 an die Promotoren der Gene rekrutiert die Ko-Repressoren Ssn6 und Tup1 an die DNA (Ostling *et al.*, 1996; Treitel und Carlson, 1995). Bei der Glukoseinduktion wird die Synthese der Proteine stimuliert, die beim Glukosemetabolismus eine Rolle spielen, wie Hexosetransportproteine und glykolytische Enzyme (Boles und Hollenberg, 1997; Özcan und Johnston, 1999).

### 1.1.1 Ein hexosetransport-defizienter Hefestamm

Die Hexosetransporter Hxt1-17 (außer Hxt12), Gal2 und drei Mitglieder der Maltosetransporter Familie (Agt1, Mph2, Mph3) sind in der Lage, Hexosen zu transportieren. Um die Funktion der Hexosetransporter Familie in *S. cerevisiae* näher studieren zu können, wurde ein Hefestamm konstruiert (Wieczorke *et al.*, 1999), der in den Genen *HXT1-17*, *GAL2*, *AGT1*, *MPH2*, *MPH3* deletiert war. Dieser sogenannte „hxt-Nullstamm“ (EBY.VW4000) war nicht mehr in der Lage, die Hexosen Glukose, Fruktose, Mannose und Galaktose aufzunehmen und somit auch nicht mehr in der Lage, auf diesen Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Der „hxt-Nullstamm“ stellt ein optimales Expressionssystem dar, um Hexosetransporter anderer Organismen heterolog zu exprimieren und zu charakterisieren.

## 1.2 Glukosetransporter von Säugern

Verschiedene Kinetiken, hormonelle Regulation und die Sensitivität gegenüber Inhibitoren ließen lange Zeit vermuten, daß die Zuckertransportproteine der verschiedenen Säugerzellen nicht identisch waren. Erst die Aufreinigung des Glukosetransporters GLUT1 aus Erythrozyten im Jahr 1977 durch Kasahara und Hinkle und die anschließende Klonierung und Sequenzierung (Mueckler *et al.*, 1985) führte dazu, daß homologe Transporter aus anderen Geweben identifiziert werden konnten. Bislang konnten 12 Glukosetransporter identifiziert werden, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie der GLUT-Familie zugeordnet und in Klassen unterteilt werden konnten (Joost und Thorens, 2001; Joost *et al.*, 2002). Die Klasse I besteht aus den umfassend charakterisierten Glukosetransportern GLUT1 bis GLUT4, die sich aufgrund ihrer gewebspezifischen Distribution unterscheiden. Der Klasse II gehören der Fruktose-spezifische Transporter GLUT5 und drei verwandte Proteine GLUT7, GLUT9 und GLUT11 an. Die Klasse III ist

charakterisiert durch das Fehlen einer Glykosylierungsstelle in der ersten extrazellulären Linkerdomäne und durch das Vorkommen einer solchen Domäne in Loop 9. Zu den Transportern GLUT6, GLUT8, GLUT10 und GLUT12 der Klasse III zählt auch der Protonen-Myoinositol-Symporter HMIT. Ein Vergleich der GLUT's mit den Homologen in Hefe, *C. elegans* und in *Drosophila* (Doege *et al.*, 2000) deutet darauf hin, daß das Genom dieser Spezies die gleiche oder sogar eine höhere Zahl an Zuckertransportfaszilitatoren umfaßt, die eine signifikante Ähnlichkeit zur GLUT-Familie aufweisen (Joost und Thorens, 2001). Die diversen Klasse I GLUT's scheinen sich in Säugern spezifisch entwickelt zu haben, da nur ein *Drosophila* Homologes mit 35% Übereinstimmung zu GLUT1 gefunden werden konnte. Nähere Verwandte zu den Klasse III GLUT's 6 und 8 sind der Hefe Inositoltransporter und der bakterielle Xylose und Arabinose-Protonen-Symporter mit 28% identischen Aminosäuren (Joost und Thorens, 2001).

Die Hauptfunktion der Glukosetransporter in Säugerzellen ist der Austausch von Glukose über erleichterte Diffusion zwischen dem Blut und dem Zytoplasma der Zelle, wobei sie zwischen den drei Glukose-Hauptorten, dem Blut, den extrazellulären Körperflüssigkeiten und dem zellulären Zytoplasma vermitteln (Mueckler, 1994). Die Charakterisierung einiger GLUT-Proteine durch Expression in heterologen Systemen wie z.B. *Xenopus-Oozyten* (Baldwin, 1993; Gould *et al.*, 1991) oder Hefe (Kasahara und Kasahara, 1996; 1997) konnte die Erforschung der Eigenschaften erleichtern, da die meisten Säugerzellen mehrere unterschiedliche Glukosetransporter exprimieren. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die molekulare Funktion wie z.B. die Substratspezifität, Affinität, Regulation der zellulären Lokalisierung und der Mechanismus des zellulären Traffickings der noch wenig erforschten GLUT-Proteine zu klären. Eine wichtige Frage, die es derzeit zu klären gilt, ist, inwieweit sich Defekte im Kohlenstoffmetabolismus auf Krankheiten in Säugern auswirken.

**Tab. 1: Die Familie der Säugetier-Glukosetransporter (GLUT).** Eine Übersicht über das Vorkommen, Eigenschaften und Referenzen.

<b>Transporter</b>	<b>Distribution</b>	<b>Biologische Aufgabe</b>	<b>Referenz</b>
GLUT1	Ubiquitär, vor allem in Erythrozyten und Gehirn (Blut/Hirn-Schranke)	Genereller basaler Glukose-transport; Transport über die Blut/Hirn-Schranke	(Mueckler <i>et al.</i> , 1985; Baldwin, 1993; Brown 2000; Mueckler, 1994)
GLUT2	Leber, pankreatische $\beta$ -Zellen, Niere, Dünndarm	Intestinale und renale Absorption; pankreatische und hepatische Kontrolle der Glukose-Homeostasis	(Fukumoto <i>et al.</i> , 1988; Baldwin, 1993; Brown, 2000; Mueckler, 1994)
GLUT3	Gehirn (Neuronen)	Aufnahme von Glukose in die Neuronen des Gehirns	(Kayano <i>et al.</i> , 1988; Baldwin, 1993; Brown, 2000; Mueckler, 1994)
GLUT4	Adipozyten, Skelettmuskelzellen, Herzmuskeln	Glukosetransport in Zellen Insulin-sensitiver Gewebe	(Fukumoto <i>et al.</i> , 1989; Baldwin, 1993; Brown, 2000; Mueckler, 1994)
GLUT5	Dünndarm-Schleimhaut	Fruktose-Transporter	(Kayano <i>et al.</i> , 1990; Baldwin, 1993; Brown, 2000; Mueckler, 1994)
GLUT6 (GLUT9)	Gehirn, Milz; Leukozyten	Nieder affiner Glukose-transporter, evtl. Zucker-Anionen-Transporter	(Doege <i>et al.</i> , 2000; Joost <i>et al.</i> , 2001)
GLUT7	bislang unbekannt	bislang unbekannt, hat Ähnlichkeit zu GLUT5	(Joost und Thorens, 2001)
GLUT8 (GLUTX1)	Hoden, geringe Anteile auch in Muskelzellen und Gehirn	Glukosetransporter, durch Fruktose inhibiert, evtl. durch Insulin reguliert	(Doege <i>et al.</i> , 2000; Carayannopoulos <i>et al.</i> , 2000; Ibberson <i>et al.</i> , 2000)
GLUT9 (GLUTX)	ausschließlich in Niere und Leber	Funktion bislang unbekannt	(Phay <i>et al.</i> , 2000)
GLUT10	Leber und Pankreas	Funktion bislang unbekannt	(McVie-Wylie <i>et al.</i> , 2001)
GLUT11 (GLUT10)	Herz- und Skelettmuskel-muskelzellen	Fruktosetransporter mit geringer Affinität für Glukose, evtl. Regulation der Glukosehomeostasis	(Doege <i>et al.</i> , 2001)
GLUT12	Herz und Prostata	Funktion bislang unbekannt	(Rogers <i>et al.</i> , 1998)
HMIT	Gehirn	Inositoltransporter	(Uldry <i>et al.</i> , 2001)

### 1.2.1 Ein Vergleich der homologen Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4

Die Säugerproteine GLUT1 und GLUT4 sind die wohl am besten erforschten und charakterisierten Glukosetransporter der GLUT-Familie. GLUT1 ist die Glukosetransporter-Isoform, die in fast allen menschlichen Zellen vorkommt und eine zentrale Rolle im Metabolismus spielt. Der durch GLUT1 vermittelte Glukosetransport findet vor allem in Erythrozyten statt, wo es mit einem Anteil von 6% das am stärksten vertretene Membranprotein ist, und in endo- und epithelialen Zellen, welche zusammen die Blut/Gewebe-Schranke bilden (Takata *et al.*, 1990; Baldwin, 1993). Die GLUT1-Transporter aus Mensch, Ratte, Maus, Kaninchen und Schwein bestehen alle aus 492 Aminosäureresten und besitzen mehr als 97% Sequenzhomologie (Mueckler *et al.*, 1985; Birnbaum *et al.*, 1986; Asano *et al.*, 1988; Kaestner *et al.*, 1989; Weiler Guttler *et al.*, 1989). Untersuchungen haben ergeben, daß GLUT1 eine breite Substratspezifität aufweist und neben Hexosen auch Pentosen transportiert. Der  $K_m$ -Wert für zero-trans Aufnahmemessungen von Glukose bei einer physiologischen Temperatur von 37°C ergab für GLUT1 in menschlichen Zellen einen Wert von annähernd 7 mM, womit der Wert dicht an der durchschnittlichen Blutzucker-Konzentration von 5 mM liegt (Lowe und Walmsley, 1986).

Der Glukosetransporter GLUT4, der mit 65% identischen Aminosäuren ein naher Verwandter von GLUT1 ist, wird im Vergleich zu GLUT1 ausschließlich in insulin-sensitivem Gewebe, wie Fett, Skelett- und Herzmuskeln exprimiert (James *et al.*, 1988; 1989; Olson und Pessin, 1996). In basalen, nicht durch Insulin stimulierten Zellen, ist GLUT4 in tubulovesikulären Strukturen und in kleinen intrazellulären Vesikeln im Zytoplasma verteilt lokalisiert (Klip *et al.*, 1994; Kandrор und Pilch, 1996; Olson und Pessin, 1996; Rea und James, 1997; Pessin *et al.*, 1999).

### 1.2.2 Unterschiedliche Insulinsignalwege induzieren GLUT4-Translokation

In Abwesenheit von Insulin befindet sich der Hauptanteil des GLUT4 Proteins in einem sogenannten „steady-state“-Zustand im Inneren der Zelle. Dieser Zustand wird durch eine geringe Recyclingrate bedingt, die fast 5-fach geringer ist als z.B. die des Transferrinrezeptors (Tfr) (Tanner und Lienhard, 1987; Yang und Holman, 1993). Das Insulinsignal steigert die GLUT4 Exozytoserate um ein 5-Faches, während die Endozytoserate an der Zelloberfläche nur um ein 2-Faches verringert wird (Jhun *et al.*, 1992; Holman *et al.*, 1994; Yeh *et al.*, 1995).

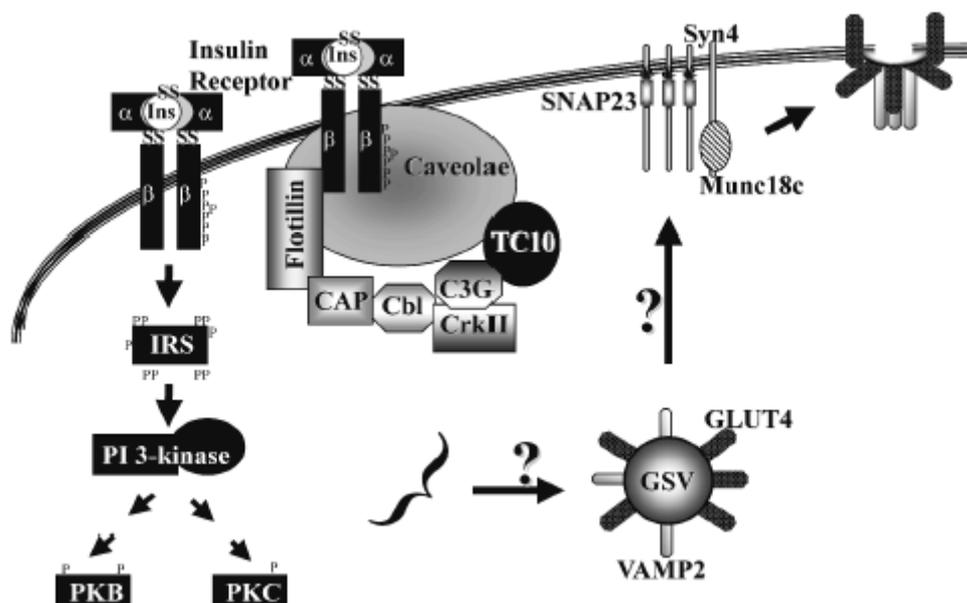
Die durch Insulin stimulierte Translokation von GLUT4 aus den Speicherkompartimenten zur Plasmamembran ist ein Prozeß aus vielen Einzelschritten.

Zuerst bindet Insulin an die Insulinrezeptoren der Zelle und die intrinsische Proteinkinase der Rezeptor  $\beta$ -Untereinheit wird aktiviert. Es kommt zu einer Autophosphorylierung des Insulinrezeptors und einer Phosphorylierung der Tyrosinreste verschiedener proximaler Proteine, wodurch zwei getrennte Signalwege aktiviert werden (Saltiel, 2001). Neben dem PI3-Kinase Signalweg konnte auch ein CAP/Cbl abhängiger Signalweg identifiziert werden, der bei der GLUT4 Translokation zur Plasmamembran eine Rolle spielt (Thurmond und Pessin, 2001). Beim PI3-Kinase Signalweg werden die Tyrosinreste der Insulin-Rezeptor-Substrat Proteine (IRS) phosphoryliert, welche dann die PI3-Kinase aus dem Cytosol an die Plasmamembran rekrutieren. Die PI3-Kinase phosphoryliert das PIP<sub>2</sub> der inneren Membran der Plasmamembran, wodurch die Serin/ Threonin-Kinasen Akt und die atypischen PKC's rekrutiert und aktiviert werden. Diese Kinasen phosphorylieren wiederum weitere Moleküle, die zu einer Abschnürung von GLUT4 Vesikeln führen, welche dann an die Zellperipherie gelangen (White, 1998; Oatey *et al.*, 1999; Alessi, *et al.*, 1997; Stokoe *et al.*, 1997; Currie *et al.*, 1999; Hill, *et al.*, 1999, Kohn *et al.*, 1996). Es wird angenommen, daß der PI3-Kinase/Akt-Signalweg die GLUT4 Vesikelabschnürung reguliert, aber nicht an der Vesikelfusion mit der Zelloberfläche beteiligt ist. Beim Cbl/CAP-Signalweg werden Tyrosinreste des an den Insulinrezeptor gebundenen Proto-Onkoproteins Cbl phosphoryliert, was zur Assoziation des Adapterproteins CAP mit Cbl führt (Ahmed *et al.*, 2000; Ribon und Saltiel, 1997; Ribon *et al.*, 1998). Der Cbl/CAP Komplex dissoziiert vom aktivierten Insulinrezeptor und gelangt durch Bindung an das Protein Flotillin zu Lipidraft-Domänen in der Plasmamembran. Hierbei wird unabhängig von der Aktivierung der PI3-Kinase ein Signal für die GLUT4 Translokation vermittelt (Baumann *et al.*, 2000; 2001).

Das Andocken und die Fusion der GLUT4 Vesikel mit der Plasmamembran weist ähnliche Merkmale und identische Proteine wie die Vesikelabschnürung bei der synaptischen Reizweiterleitung auf. Bei der GLUT4 Aufreinigung aus den Speicherkompartimenten konnten ebenfalls die vesikel-SNARE Isoformen Synaptobrevin (VAMP2) und Cellubrevin (VAMP3) isoliert werden (Cain *et al.*, 1992; Cheatham *et al.*, 1996; Mastick und Saltiel, 1997; Olson *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1998). In Skelettmuskelzellen konnten zwei verschiedene GLUT4 Speicher-vesikelformen nachgewiesen werden, wobei die einen durch Insulin reguliert werden und die anderen durch Bewegung und Muskelkontraktion (Aledo *et al.*, 1997; Ploug *et al.*, 1998; Millar *et al.*, 1999). Es wird angenommen, daß die Synaptobrevin 2 enthaltenden GLUT4 Kompartimente durch Insulin reguliert und die Cellubrevin 3 enthaltenden GLUT4 Kompartimente durch Bewegung bzw. Muskelkontraktion, osmotischen Schock und GTP $\gamma$ S reguliert werden. Als target-

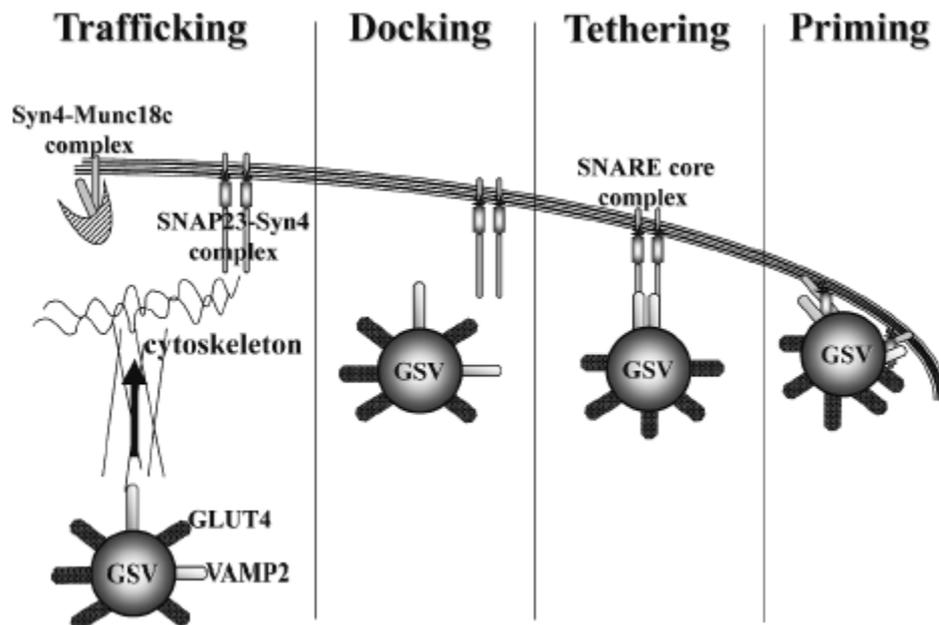
SNARE Proteine für die Insulin stimulierte GLUT4 Translokation wurden das Syntaxin 4 und SNAP23 identifiziert (Volchuk *et al.*, 1996; Olson *et al.*, 1997; Rea *et al.*, 1998; Kawanishi *et al.*, 2000). Syntaxin 4 ist über seine Transmembran-domänen in der Plasmamembran lokalisiert und SNAP23 über zwei palmytylierte Reste am N-Terminus. Weitere bislang bekannte und an der SNARE-Assoziation beteiligte Proteine sind die SM-Proteine (Sec1/Munc18), Rab Effektorproteine, Synip (Syntaxin 4 interagierendes Protein), Pantophysin und Cellugyrin und VAP-23 (Thurmond und Pessin, 2001). Die Insulin stimulierte Translokation von GLUT4 aus den Speichervesikeln, aber nicht aus recycelnden Endosomen, kann durch das Botulinus clostridium Toxin gehemmt werden, indem es zu einer spezifischen Spaltung der v-SNARE und t-SNARE Komponenten führt (Foran *et al.*, 1999). Inwiefern das mikrotubuläre Zytoskelett eine Rolle bei der Insulin-stimulierten GLUT4 Translokation spielt, ist noch weit unbekannt. Man postuliert derzeit, daß die GLUT4 Vesikel mit Hilfe des Kinesinmotors direkt zur Plasmamembran geleitet werden oder die mikrotubulären Strukturen die Speichervesikel in einem „Wartestadium“ halten, bis es zu einem Insulinsignal kommt (Fletcher *et al.*, 2000).

**Abb. 1: Das Modell zeigt die Beziehung zwischen dem PI-3 Kinase und dem CAP/Cbl-Signalweg und der noch unbekanntem Signalweiterleitung zu den GLUT4 Speichervesikeln (GSV).** Die Speichervesikel enthalten das v-SNARE Molekül (VAMP2) und die Plasmamembran enthält die t-SNARE Moleküle SNAP23 und Syntaxin 4 (Syn4), plus das Syntaxin 4 bindende Protein Munc18c, welches ebenfalls an der Vesikelfusion beteiligt ist.



Thurmond und Pessin (2001)

**Abb. 2: Modell der GLUT4 Translokation:** 1) Vesikel Trafficking, 2) Andocken, 3) Halten, 4) Fusion und die beteiligten Hilfsproteine.



Thurmond und Pessin (2001)

### 1.2.3 GLUT4-Transportmotive

GLUT4 gehört zu einer kleinen Gruppe von Proteinen, die über den Sekretionsweg transportiert, in spezifischen Kompartimenten nach dem Golgi gespeichert werden und deren Translokation zur Plasmamembran durch Stimulation stark reguliert ist bzw. die bei ausbleibender Stimulation wieder zu den Speicherkompartimenten zurückkehren. Der Prozeß des GLUT4-Traffickings ist das Resultat verschiedener Transportmotive innerhalb der N- und C-terminalen Domänen (Lalioi *et al.*, 2001). Hierzu zählen zum einen Dileucin- und Phenylalanin-Signale, die häufig in solchen Membranproteinen gefunden wurden, welche im *trans*-Golgi-Netzwerk sortiert oder durch Endozytose internalisiert werden. Zum anderen scheint eine Folge aus sauren Aminosäureresten und ein Tyrosinrest an der Sortierung im Post-*trans*-Golgi-Netzwerk verantwortlich zu sein (Lalioi *et al.*, 2001). Die durch die Transportmotive bedingte zeitliche und präzise Abstimmung von Retention und Trafficking deutet darauf hin, daß das Fett- und Muskelgewebe die Glukosehomeostasie des kompletten menschlichen Körpers kontrolliert.

Unabhängige Studien haben gezeigt, daß eine auf Clathrin basierende Machinerie, welche Membranproteine vom *trans*-Golgi-Netzwerk und der Plasmamembran in das tubulovesikuläre System dirigiert, oft zwei strukturell unterschiedliche Transportmotive erkennt, das sogenannte Phenylalanin/Tyrosin- und das

Dileucin-Motiv (Chen *et al.*, 1990; Collawn *et al.*, 1990; Letourneur und Klausner, 1992; Matter *et al.*, 1994). Trotz der strukturellen Unterschiede besitzen beide die Fähigkeit, Clathrinadapter zur Membran zu rekrutieren, welche die Verpackung der Membranproteine zum Transport in Clathrin beschichtete Vesikel einleiten. Untersuchungen anhand von GLUT4/GLUT1- und GLUT4/Tfr-Chimären haben gezeigt, daß das C-terminale Dileucinmotiv den Transport vom *trans*-Golgi zu den Endosomen reguliert und das N-terminale F<sub>5</sub>QQI-Motiv das GLUT4-Recycling von der Zelloberfläche zu den Speicherkompartimenten vermittelt (Melvin *et al.*, 1999; Palacios *et al.*, 2001).

**Tab. 2: In GLUT4 identifizierte Transportmotive und die Übereinstimmung zu anderen Membranproteinen.**

Transport-motivmuster	Strukturelle Motive	Transportschritt	Bestimmungsort
YXX $\Phi$ / FXX $\Phi$ -	$\Phi$ =L,I,M,V,F	<i>Trans</i> -Golgi Netzwerk	Späte Endosomen, Lysosomen (Guarnieri <i>et al.</i> , 1993), basolaterale Membran (Matter <i>et al.</i> , 1994).
		Plasmamembran	Frühe Endosomen (Chen <i>et al.</i> , 1990; Collawn <i>et al.</i> , 1990; Letourneur und Klausner, 1992).
		Frühe Endosomen	Recycling zu Lysosomen (Melvin <i>et al.</i> 1999; Palacios <i>et al.</i> , 2001).
LL LM	LI Folge aus sauren oder basischen Resten aufwärts gerichtet	<i>Trans</i> -Golgi Netzwerk	Benachbarte Speicher (Martinez-Arca <i>et al.</i> , 2000), Prozessierungs (Pieters <i>et al.</i> , 1993) und Recycling Kompartimente, Lysosomen (Letourneur und Klausner, 1992; Sandoval <i>et al.</i> , 1994) basolaterale Membran (Matter <i>et al.</i> , 1994).
		Plasmamembran Endosomen	Frühe Endosomen (Aiken <i>et al.</i> , 1994) Recycling zum <i>trans</i> -Golgi Netzwerk (Tikkanen <i>et al.</i> , 2000).
C-terminale Folge saurer Aminosäuren		Post- <i>trans</i> -Golgi Netzwerk	Endosomen (Nielsen <i>et al.</i> , 2001) und Speicherkompartimente (Martinez-Arca <i>et al.</i> , 2000) und Prozessierung (Nielsen <i>et al.</i> , 2001; Xiang <i>et al.</i> , 2000).

Bislang konnten zwei verschiedene Insulin-Signalwege identifiziert werden und unterschiedliche Transportmotive innerhalb des GLUT4 Proteins, die über die GLUT4 Translokation zur Plasmamembran Aufschluß geben. Es ist aber weiterhin

ungeklärt, inwiefern das Insulinsignal über die verschiedenen Signalwege zu den GLUT4 Speicherkompartimenten gelangt und eine GLUT4 Vesikelverschmelzung mit der Plasmamembran auslöst. Mit Hilfe von Two-Hybrid-Interaktionsstudien, Co-Immunoprecipitationsanalysen und Gradientenzentrifugation konnten weitere Proteine gefunden werden, die direkt mit GLUT4 interagieren, deren Funktion im Zusammenhang mit der GLUT4 Translokation aber noch unerforscht ist. Dazu gehören die schwere Myosinkette ( $\beta$ -Isoform) des menschlichen Herzmuskels, die bifunktionelle glykolytische Fruktose-1,6-bisphosphataldolase aus menschlichen Fettzellen, das Sentrin konjugierende Enzym Ubc9 aus Fettzellen der Maus und das Adapterprotein Daxx aus menschlichen Herzmuskelzellen (Lee *et al.*, 1997; Kao *et al.*, 1999; Giorgino *et al.*, 2000; Lalioti *et al.*, 2002). Ebenso konnten Proteine identifiziert werden, die mit den GLUT4 Speichervesikeln direkt assoziieren bzw. ebenfalls Bestandteile dieser Vesikel sind. Hierzu gehört das GLUT4 Vesikel Markerprotein IRAP (Insulin-Responsive-Aminopeptidase), welches vollständig mit GLUT4 in insulinempfindlichem Gewebe kolokalisiert (Thoidis und Kandror, 2001) und das insulin-sensitive kleine GTP-Bindeprotein Rab11, welches das Vesikel Trafficking durch die recycelnden Endosomen zur Plasmamembran kontrollieren soll und selbst durch Insulin zur Plasmamembran rekrutiert wird (Ubré *et al.*, 1993; Ullrich *et al.*, 1996; Ren *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1998; Kessler *et al.*, 2000). Aus Untersuchungen in Hefe ist bekannt, daß Rab Proteine bei der Bildung des SNARE Komplexes benötigt werden (Sogaard *et al.*, 1994). Es wurde gezeigt, daß die Kinase Akt-2 Proteine der GLUT4 Vesikel phosphoryliert und es wird spekuliert, daß auch Rab11 phosphoryliert wird, welches dann die Verbindung zwischen der Signalkaskade und der Vesikelfusion an der Plasmamembran herstellt (Calera *et al.*, 1998; Kupriyanova und Kandror, 1999; Kessler *et al.*, 2000).

Weitere noch unbekannte Proteine, die eine Verbindung zwischen den Insulinsignalkaskaden und den GLUT4 Speichervesikeln herstellen, müssen identifiziert werden, um den genauen Prozeß der GLUT4 Translokation zur Plasmamembran zu verstehen.

#### 1.2.4 Durch Glukosetransportdefekte ausgelöste Krankheiten

Defekte im Glukosetransport scheinen sehr selten, auch wenn bis heute noch nicht alle möglichen Defizienzen identifiziert wurden. Die Entdeckung der ersten Mutationen in einem Gen, das für einen Transporter der GLUT-Familie kodiert, und einer damit verbundenen Störung des Kohlenhydratmetabolismus, wurde 1949 durch Fanconi und Bickel gemacht (Fanconi und Bickel, 1949). Mutationen

im *GLUT2*-Gen hatten unter anderem eine Akkumulation von Glykogen, eine Glukose und Galaktose Intoleranz, Hypoglykämie und ein gehemmtes Wachstum zur Folge (Santer *et al.*, 1997; 2002). Diese angeborene, äußerst seltene autosomal rezessive Störung ist in der Literatur unter dem Fanconi-Bickel-Syndrom oder der Typ I Glykogenspeicherkrankheit bekannt. Kurze Zeit später fand man Mutationen im *GLUT1*-Gen, die für eine Beeinträchtigung des Glukosetransportes an der Gehirn/Gewebe-Schranke verantwortlich waren (Klepper *et al.*, 1999). Diese autosomal dominante Störung, die durch eine hohe Rate an spontanen Neumutationen entsteht, ist auch als Glukosetransporter-Protein-Syndrom (GTPS) bekannt (Seidner *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000; Klepper *et al.*, 2001). Defekte der aktiven Na<sup>+</sup>/Glukose-Transporter SGLT1 und SGLT2 konnten für eine Glukose/Galaktose-Mangelabsorption und eine angeborene renale Glukosurie verantwortlich gemacht werden (Brown, 2000). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß auch in Knorpelzellen multiple Isoformen der GLUT-Familie exprimiert werden und ein metabolisches Glukoseungleichgewicht eine degenerative Störung der Knorpelbildung bzw. eine Gelenkstörung zur Folge hat (Mobasheri *et al.*, 2002). Eine weitere Studie aus diesem Jahr konnte zeigen, daß die Mitglieder der GLUT-Familie in Krebszellen oft überexprimiert vorliegen und der erhöhte Energiebedarf für die unkontrollierte Zellproliferation sogar dazu führt, daß GLUT-Isoformen exprimiert werden, die unter normalen Bedingungen in den jeweiligen Geweben nicht vorkommen (Medina und Owen, 2002).

Man geht heute davon aus, daß die weitverbreitete Form des Typ II Diabetes oder der nicht Insulin-abhängige Diabetes mellitus (NIDDM) ebenfalls durch Defekte im Glukosemetabolismus hervorgerufen wird. Es konnte gezeigt werden, daß eine Insulinresistenz durch reduzierte Glukoseaufnahme bei normaler Insulinkonzentration das Resultat polygener Defekte und äußerer Faktoren ist (Czech, 1995; Reaven, 1995; Kahn, 1994). In GLUT4-Überexpressions und „knocked-out“-Experimenten mit Mäusen konnte gezeigt werden, daß eine reduzierte Expression von GLUT4, eine verminderte Glukosetransportaktivität und eine Störung der Translokation von GLUT4-Speichervesikeln zur Plasmamembran mögliche Ursachen für eine verminderte Glukoseaufnahme sein können (Eriksson *et al.*, 1992; Garvey *et al.*, 1989; 1991). Da bislang keine Mutationen des humanen *GLUT4*-Gens identifiziert werden konnten, fehlen die Beweise für einen Zusammenhang zwischen dem GLUT4-Polymorphismus und NIDDM (Bjorbaek *et al.*, 1994; Lesage *et al.*, 1997).

### 1.2.5 Heterologe GLUT-Expression in Hefe

Die Charakterisierung und Erforschung verschiedener Säuger-GLUT-Isoformen konnte mit Hilfe transgener Mäusemodelle (Katz *et al.*, 1995; 1996) und heterologer Expressionssysteme wie *Xenopus Oocyten*, Zellkulturen, Insektenzellen und Hefe durchgeführt werden (Baldwin, 1993; Mueckler, 1994; Kasahara und Kasahara, 1996; 1997). Nachteile der heterologen Expressionssysteme waren unter anderem eine verminderte Aktivität der heterolog exprimierten Transporter, endogene Transporter, die intrazelluläre Retention der Transportproteine und auch die Expression inaktiver Transporter.

Der Vorteil der Hefe als Expressionssystem bei der Erforschung heterologer Proteine ist zum einen die schnelle Verdopplung und zum anderen eine leichte Manipulierbarkeit des relativ kleinen, haploiden und bereits sequenzierten Hefegenoms ( $1,4 \times 10^7$  bp) und die funktionelle Übertragbarkeit vieler grundlegender Mechanismen auf ähnliche Mechanismen in höheren Eukaryonten, wie Signalkaskaden, Sekretionswege und der Kohlenstoff-Metabolismus. Die Verfügbarkeit existierender Mutanten mit Defizienzen im Membrantransport (Zucker, Aminosäuren, Lipide etc.) bietet sich für die Analyse heterolog exprimierter Proteine insofern an, als daß man mit Hilfe von Komplementationstests sehr einfach die Funktionalität der Proteine testen und mögliche inhibierende Effekte, die durch hefeeigene Faktoren bestimmt sein können, durch die Herstellung weiterer Gendeletionen reduzieren kann. Oft sind heterologe Membrantransporter aufgrund von Fehlfaltung oder unzureichender Modifikation inaktiv oder werden in Kompartimenten des sekretorischen Weges (ER, Golgi, sekretorische Vesikel) zurückgehalten und gar nicht an der Zelloberfläche lokalisiert (Kasahara und Kasahara, 1996; 1997).

Die heterologe Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 wurde in einer früheren Studie in einem Hefestamm untersucht, der keine endogenen Hexosetransporter mehr besaß (siehe Abschnitt 1.1.1) (Wieczorke *et al.*, 2002). Um die heterologen Glukosetransporter funktionell zu exprimieren, waren zusätzliche Mutationen in diesem Stamm notwendig. Trotz der GLUT1-Lokalisierung an der Plasmamembran, war der Transporter erst in einem *fgy1-1*-Mutantenstamm funktionell. Die Funktion von Fgy1 (**f**unctional expression of **g**lut1 in **y**east) ist noch weitgehend unbekannt, man geht davon aus, daß es in der Hefe als Hilfsprotein die Aktivität von Plasmamembranproteinen reguliert (Wieczorke *et al.*, 2002). GLUT4 wurde in intrazellulären Strukturen zurückgehalten und erst in  $\Delta hxt fgy1-1 fgy4X$  Mutantenstämmen funktionell in der Plasmamembran exprimiert.

### 1.3 Einfluß der Membrankomponenten auf Transportproteine

In früheren Studien konnte gezeigt werden, daß die Membranzusammensetzung der Zellen einen direkten Einfluß auf die Aktivität von endogenen Membranproteinen und heterolog exprimierten Plasmamembrantransportern hat (Saeki *et al.*, 1991; Krishnamurthy und Prasad, 1999; Kaur und Bachhawat, 1999). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, daß ein Mangel an Phosphatidyl-Ethanolamin einen direkten Einfluß auf die Aktivität von Aminosäuretransportern und auf die Translokation der Can1 Permease zur Zelloberfläche hat (Opekarova *et al.*, 2002). Die Bindung von Membranproteinen an sogenannte Lipidrafts spielt eine wichtige Rolle bei der Translokation zur Plasmamembran (Bagnat *et al.*, 2000). Lipidrafts wurden zuerst in Säugerzellen entdeckt, wo sie sich durch eine laterale Assoziation von Sphingolipiden und Cholesterol bilden und als Plattform bei der Sortierung von Proteinen und Lipiden dienen (Simons und van Meer, 1988; Simons und Ikonen, 1997). In Hefe setzen sich Lipidrafts aus Sphingolipiden und Ergosterol zusammen und man geht davon aus, daß sie nur zur Zelloberfläche und nicht zur Vakuole dirigiert werden (Bagnat *et al.*, 2000).

Biologische Membranen bestehen hauptsächlich aus Proteinen und Lipiden und dienen der Zelle als hochselektive Permeabilitätsschranke. Sie besitzen molekulare Pumpen und Kanäle, die die Molekül- und Ionenzusammensetzung des intrazellulären Mediums regulieren. Die drei Membranhauptlipide sind Phospholipide, Glykolipide und Cholesterin. Phospholipide leiten sich von Glycerin oder dem komplexeren Sphingosin ab. Die sogenannten Phosphoglyceride bestehen aus einem Glycerinrückgrat, zwei Fettsäureketten und einem phosphorylierten Alkohol. Dabei hat die Länge der Fettsäureketten in den Membranlipiden einen Einfluß auf die Membranfluidität. Mögliche Alkoholkomponenten in Phosphoglyceriden können das Serin, Ethanolamin, Cholin, Glycerin oder Inositol sein. Glykolipide sind zuckerhaltige Lipide, bei denen die Aminogruppe des Sphingosingerüsts mit einer Fettsäure acetyliert ist. Cholesterin kommt hauptsächlich in Eukaryonten vor und fehlt in den meisten Prokaryonten. Man geht davon aus, daß es entstand als die Erdatmosphäre aerob wurde, da die Plasmamembran der eukaryontischen Zellen reich an Cholesterin sind, wohingegen die Membranen der Organellen weniger von diesem neutralen Lipid enthalten (Paltauf *et al.*, 1992; Parks und Casey, 1995; Zinser und Daum, 1995). Prokaryonten regulieren die Fluidität ihrer Membranen durch Variation der Doppelbindungsanzahl und der Länge der Fettsäureketten. Bei Eukaryonten ist das Cholesterin der Hauptregulator der Membranfluidität. Es besteht aus einem Steroidgerüst mit einer Hydroxylgruppe an dem einen Ende und einem

beweglichen Kohlenwasserstoffschwanz an dem anderen Ende. Das Hauptsterol der Hefe und pathogener Pilze ist Ergosterol, welches dem Cholesterol in seiner Struktur sehr ähnlich ist. Weshalb die Hefe Ergosterol statt Cholesterol in seine Phospholipid-Bilayermembran einbaut, ist noch nicht geklärt, man geht aber davon aus, daß es eine Anzahl von Zellfunktionen effektiver ausführt als andere Sterole. Einer der Hauptunterschiede zwischen Ergosterol und Cholesterol ist eine Doppelbindung zwischen den C-Atomen 7 und 8, wodurch ein konjugiertes Diensystem im B-Ring des Steroidgerüsts gebildet wird. Außerdem besitzt Ergosterol eine ungesättigte Seitenkette mit einer Methylgruppe am C-24-Atom.

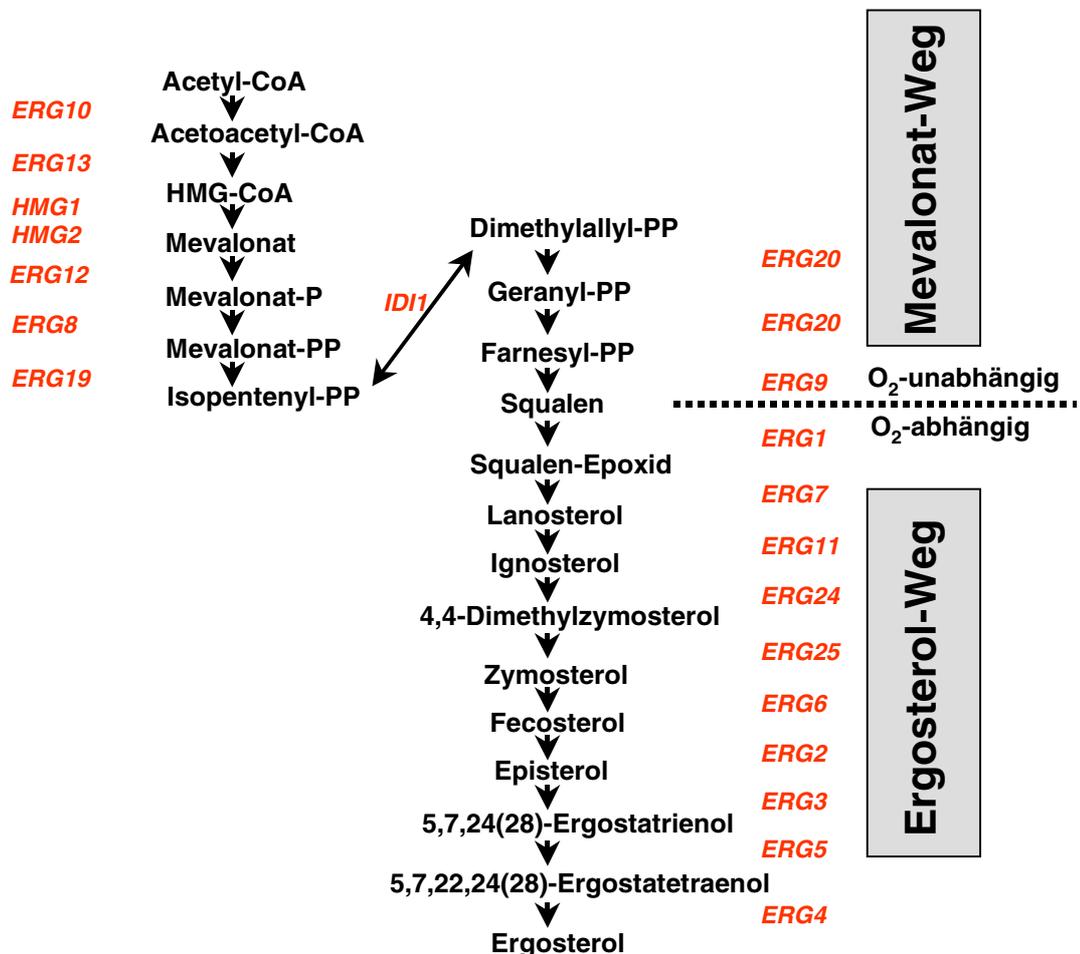
Ergosterol und seine Biosynthese sind bei der Bekämpfung von Pilzkrankungen ein Hauptziel in der Entwicklung von Antifungiziden. Einige Wirkstoffe, zum Beispiel polyene Antibiotika, blockieren gezielt die Ergosterolbiosynthese von Pilzen, haben aber keinen Einfluß auf die Cholesterolsynthese des Wirtsorganismus. Eine der Hauptfunktionen von Ergosterol ist auch in Hefe die Erhaltung der Membranfluidität gegenüber äußerlichen Einflüssen, wie Mediumwechsel und Temperaturschwankungen. Die Ergosterolsynthese ist ein aerober Prozeß, der molekularen Sauerstoff und Häm erfordert (Parks und Casey, 1995). Die Biosynthese vom Acetyl-CoA bis zum Squalen ist unabhängig von Sauerstoff, die weitere Synthese vom Squalen zum Ergosterol verläuft sauerstoffabhängig (Abb. 3). Bei anaerobem Wachstum muß die Hefe das metabolisch aufwendig zu erzeugende Ergosterol aus dem Medium aufnehmen. Im Vergleich zur Plasmamembran befinden sich in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien kaum Sterole (Zinser *et al.*, 1993; Zinser und Daum, 1995). Das ist ein Hinweis auf ein intrazelluläres Trafficking der synthetisierten Sterole zu den entsprechenden Kompartimenten. Untersuchungen haben gezeigt, daß das Ergosterol, welches ca. 50% der Sterole in der Hefe ausmacht, nicht verestert in der Plasmamembran integriert vorliegt. Die z.B. mit Fettsäuren veresterten Sterole bilden inaktive Speicherformen, die durch Hydrolyse wieder in freies Sterol und Fettsäuren gespalten werden können. Diesen Vorgang macht sich die Hefe bei der Membranbiogenese zu Nutze, wenn die Sterolsynthese z.B. durch äußerliche Einflüsse gehemmt ist.

In *S. cerevisiae* bilden sogenannte Lipid-Partikel Speichereinschlüsse für Tri-Acylglyzerole (TAG) und man geht davon aus, daß sie am Sterolmetabolismus und Transport beteiligt sind (Leber *et al.*, 1995b; Zinser und Daum, 1995). Die C-24 Methyltransferase (Erg6), ein Schlüsselenzym der letzten Schritte der Ergosterolbiosynthese, konnte fast ausschließlich in Lipid-Partikeln nachgewiesen werden (Gaber *et al.*, 1989; Hardwick und Pelham, 1994). So konnte auch gezeigt werden, daß Lipid-Partikel neben den Tri-Acylglyzerolen zu 50% aus veresterten

Sterolen, wie Ergosterol und einigen Sterolintermediaten wie Zymosterol und Fecosterol, bestehen, wohingegen Phospholipide oder Proteine in sehr geringen Anteilen gefunden wurden.

Im Gegensatz dazu macht das Ergosterol 95% der freien Sterole der Plasmamembran aus. Nach der Sterolsynthese in mikrosomalen Fraktionen, werden die Sterole im Endoplasmatischen Retikulum mit Fettsäuren verestert und in Lipid-Partikeln gespeichert (Leber *et al.*, 1995), bis sie an der Plasmamembran wieder hydrolytisch gespalten werden. Ein ähnliches Modell wird für die Translokation von Cholesterolestern postuliert (Leber *et al.*, 1995b).

Abb. 3: Die Sauerstoff abhängigen und unabhängigen Schritte der Ergosterolbiosynthese und die beteiligten Gene.



#### 1.4 Das Split-Ubiquitin-System

Das Split-Ubiquitin-System wurde zum ersten Mal durch Johnsson und Varshavsky beschrieben, um Proteininteraktionen *in vivo* nachzuweisen (Johnsson und Varshavsky, 1994). Ubiquitin ist ein Polypeptid aus 76 Aminosäuren, welches in einen N-terminalen Bereich (Nub: Aminosäuren 1-37) und einen C-terminalen Bereich (Cub: Aminosäuren 35-76) unterteilt werden kann. Die Ko-Expression des Nub- und des Cub-Bereichs als lösliche, zytosolische Polypeptide führt zu einer Zusammenlagerung beider Fragmente zu einer nativen Struktur, die als Substrat von der zytosolischen Ubiquitin-spezifischen Protease (UBPs) erkannt werden kann. Ein Austausch der Aminosäure Isoleucin an Position 13 im Nub gegen ein Glycin (Nub-G) setzt die Assoziation der beiden Ubiquitinhälften soweit herab, daß eine Interaktion beider Hälften nicht mehr von alleine möglich ist. Erst wenn die Nub-G- und Cub-Hälften an Proteine fusioniert werden, die miteinander interagieren, wird die Interaktion der Ubiquitinhälften möglich. Ein an die Cub-Hälfte fusioniertes Reporterprotein wird nach der Re-Assoziation von der Ubiquitin-spezifischen Protease abgespalten und kann spezifische Reportergene aktivieren. Eine modifizierte Version des Systems wurde entwickelt, um Membranprotein-Interaktionen zu identifizieren, die mit dem konventionellen Two-Hybrid-System in Hefe nicht möglich waren (Stagljar *et al.*, 1998; Stagljar und te Heesen, 2000). In diesem modifizierten Split-Ubiquitin-System wurden Nub und Cub an membran-gebundene Proteine fusioniert. Ein Reporterprotein „PLV“ bestehend aus Protein A (zur Detektion des Proteins mit IgG), Lex A (DNA-Bindeprotein) und dem Transkriptionsaktivator VP16 wird hierbei C-terminal an Cub fusioniert. Eine Assoziation der beiden Ubiquitinhälften führt zur Spaltung des PLV-Reporterproteins, welches in den Zellkern gelangt und dort z.B. das  $\beta$ -Galaktosidase-Reportergen aktiviert. Die Interaktion zweier Membranproteine kann durch enzymatische Messung der Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase gemessen werden.

## 1.5 Das Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte durch Klonierung und Charakterisierung von *FGY4X* ein hefeeigener Faktor identifiziert werden, der für die GLUT4-Retention in intrazellulären Strukturen in dem hier untersuchten Hefestamm verantwortlich ist. Desweiteren sollte mit Hilfe des in der Hefe etablierten Split-Ubiquitin-Systems nach Proteinen gesucht werden, die mit GLUT4 interagieren. Dabei war von großem Interesse, ob GLUT4 auch mit sich selbst und aufgrund der großen Homologie auch mit dem humanen Glukosetransporter GLUT1 und den Hexosetransportern Hxt1 und Hxt9 aus Hefe interagiert. In Interaktionstests mit einer cDNA-Genbank aus menschlichem Skelettmuskelgewebe sollte nach speziellen Säugerproteinen gesucht werden, die möglicherweise mit GLUT4 interagieren. Die Charakterisierung der bereits bekannten mit GLUT4 interagierenden Proteine wurde zum größten Teil in Two-Hybrid-Anaylsen und Coimmunopräzipitationstests durchgeführt und beschränkte sich auf den Interaktionsnachweis mit GLUT4-Proteindomänen (N- und C-Terminus). Das Split-Ubiquitin-System bietet die Möglichkeit eine Interaktion zwischen zwei Membranproteinen und/oder einem Membranprotein und einem cytosolischen Protein in seiner nativen Form nachzuweisen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Stämme und Medien

#### 2.1.1 Bakterienstämme

**Tab. 3: *Escherichia coli* (*E. coli*).**

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

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

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

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

#### 2.1.3 Hefestämme

**Tab. 4: *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*).**

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
CEN.PK2-1C (=VW1A)	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2</i>	K.-D. Entian
CEN.PK2-1C (=VW1B)	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2</i>	K.-D. Entian
EBY109A	<i>MATa leu1</i>	E. Boles, Düsseldorf
EBY109B	<i>MAT<math>\alpha</math> leu1</i>	E. Boles, Düsseldorf
EBY139A	<i>MATa</i>	E. Boles, Düsseldorf
L40	<i>MATa trp1 leu2 his3 LYS2::lexA-HIS3 URA3::lexA-LacZ</i>	(Vojtek <i>et al.</i> , 1993)
YG673	<i>MATa trp1 leu2 his3 LYS2::lexA-HIS3 URA3::lexA-LacZ WBP1::pRS305(<math>\Delta wbp1CubProtALexAVP16</math>)</i>	(Stagljär <i>et al.</i> , 1998)

EBY.18ga	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2</i>	(Wieczorke <i>et al.</i> , 1999)
EBY.S7	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2</i>	(Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)
EBY.VW4000	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2</i>	(Wieczorke <i>et al.</i> , 1999)
EBY.F4-(1-9)	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 fgy41-49 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2</i>	(Wieczorke <i>et al.</i> , 2002)

**Tab. 5: Stämme von *S. cerevisiae*, die im Rahmen dieser Arbeit konstruiert wurden.**

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Quelle/Referenz</b>
EBY.S7α (=SDY.010)	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2</i>	diese Arbeit
SDY.013	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 fgy41 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2 lexA::lacZ::URA3</i>	diese Arbeit
SDY.014	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 fgy44 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2 lexA::lacZ::URA3</i>	diese Arbeit
SDY.015	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 fgy47 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2 lexA::lacZ::URA3</i>	diese Arbeit
SDY.020	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 ers1::kanMX leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2</i>	diese Arbeit
SDY.022	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 erg4::kanMX leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2</i>	diese Arbeit
SDY.024	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 erg5::kanMX leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2</i>	diese Arbeit
SDY.025	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 erg4::kanMX leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2</i>	diese Arbeit
SDY.026	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 erg4::HIS3MX6 erg5::kanMX leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2</i>	diese Arbeit
SDY.028	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 erg4::kanMX leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup> SUC2 lexA::lacZ::URA3</i>	diese Arbeit
SDY.029	<i>MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 SUC2 erg5::kanMX leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>C</sup></i>	diese Arbeit

#### 2.1.4 Medien und Anzucht von Hefestämmen

Vollmedium (YEP):	1% Hefeextrakt, 2% Bacto-Pepton, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegebenen Konzentration.
Synthetisches Minimalmedium (YNB):	0,67% Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids, pH 6,3, Aminosäure/Nukleobase-Lösung, Kohlenstoffquelle in der jeweils 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).

Als Kohlenstoffquelle wurden Glukose und Maltose verwendet, die mit dem Medium autoklaviert wurden. Feste Nährböden enthielten zusätzlich 1,8% Agar. Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen wurde auf die Zugabe der entsprechenden Aminosäuren oder Nukleobasen verzichtet. Für die Selektion auf Verlust eines Plasmids mit *URA3*-Marker (*ura<sup>-</sup>*-Zellen) wurden YNB-Agarplatten benutzt, die neben 0,44 mM Uracil zusätzlich 1 mg/ml 5-FOA enthielten (Boeke *et al.*, 1984). Die Selektion auf Geneticinresistenz wurde auf Vollmediumplatten mit 200 µg/ml G418 durchgeführt.

Die Anzucht der Hefezellen erfolgte bei 30°C.

## 2.2 Plasmide

Tab. 6: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Quelle/Referenz	Beschreibung
pUG6	(Güldener <i>et al.</i> , 1996)	DNA-Vorlage für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Deletion von Genen mit dem <i>loxP::kanMX::loxP</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
YCplac33	(Gietz und Sugino, 1988)	CEN/ARS-Vektor mit <i>URA3</i> -Selektionsmarker
YCplac111	(Gietz und Sugino, 1988)	CEN/ARS-Vektor mit <i>LEU2</i> -Selektionsmarker
YEplac112	(Gietz und Sugino, 1988)	2 $\mu$ -Vektor mit <i>TRP1</i> -Selektionsmarker
YEplac181	(Gietz und Sugino, 1988)	2 $\mu$ -Vektor mit <i>LEU2</i> -Selektionsmarker
YEplac195	(Gietz und Sugino, 1988)	2 $\mu$ -Vektor mit <i>URA3</i> -Selektionsmarker
YCp50-HO	E. Boles, Düsseldorf	Plasmid für die Expression der HO-Endonuklease der Hefe in einem <i>URA3</i> -Vektor
pSH47	(Güldener <i>et al.</i> , 1996)	Cre-Rekombinase hinter dem <i>GAL2</i> -Promotor der Hefe; <i>URA3</i> -Selektionsmarker
p426MET25	(Mumberg <i>et al.</i> , 1994)	2 $\mu$ -Expressionsvektor mit <i>URA3</i> -Selektionsmarker, <i>MET25</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pLexA(ox5)	(Rosenbaum, 1993)	<i>GAL1::lacZ</i> Fusionsplasmid zur genomischen Integration in das <i>URA3</i> -Gen, mit 5 <i>lexA</i> Operatorregionen -167 bp vor dem Transkriptionsstart
pNub-WT-ALG5	(Stagljar <i>et al.</i> , 1998)	2 $\mu$ -Klonierungsvektor für die N-terminale Fusion von Proteinen mit dem Ubiquitin-N-Terminus, <i>TRP1</i> -Marker, <i>CUP1</i> -Promotor und -Terminator
pNub-G-ALG5	(Stagljar <i>et al.</i> , 1998)	wie pNub-WT-ALG5 mit mutiertem Ubiquitin-N-Terminus (Ile13Gly)
pRS305 ( $\Delta$ wbp1CubProtA LexAVP16)	(Stagljar <i>et al.</i> , 1998)	Insertionsvektor für die C-terminale Fusion von Proteinen mit dem Ubiquitin-C-Terminus plus Reporterprotein PLV, <i>LEU2</i> -Marker, kein Origin
pCPLV	te Heesen, Zürich	2 $\mu$ -Expressionsplasmid zur konstitutiven Expression des Fusionsproteins Cub-PLV, <i>ADH1</i> -Promotor und -Terminator, <i>LEU2</i> -Marker
pRS313-STE2	(Johnsson und Varshavsky, 1994)	<i>STE2</i> hinter dem <i>CUP</i> -Promotor und vor der <i>Cub-RURA3</i> Gensequenz, CEN/ARS-Vektor mit <i>HIS3</i> -Selektionsmarker
YEph2-rGLUT1	(Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)	<i>GLUT1</i> der Ratte hinter dem <i>HXT2</i> -Promotor in 2 $\mu$ -Vektor mit <i>TRP1</i> -Selektionsmarker und <i>GAL2</i> -Terminator

YEpH2-rGLUT4	(Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)	<i>GLUT4</i> der Ratte hinter dem <i>HXT2</i> -Promotor in 2 $\mu$ -Vektor mit <i>TRP1</i> -Selektionsmarker und <i>GAL2</i> -Terminator
YEp4H7-hsGLUT1	(Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)	<i>GLUT1</i> des Menschen hinter dem verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in 2 $\mu$ -Vektor mit <i>URA3</i> -Selektionsmarker und <i>CYC1</i> -Terminator
YEp4H7-hsGLUT4	(Wieczorke <i>et al.</i> , 2001)	<i>GLUT4</i> des Menschen hinter dem verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in 2 $\mu$ -Vektor mit <i>URA3</i> -Selektionsmarker und <i>CYC1</i> -Terminator
YEpkHXT7	(Krampe <i>et al.</i> , 1998)	<i>HXT7</i> hinter verkürztem <i>HXT7</i> -Promotor in 2 $\mu$ -Vektor mit <i>URA3</i> -Selektionsmarker und <i>CYC1</i> -Terminator
pTHHXT9	(Hammacher, 2001)	<i>HXT9</i> hinter verkürztem <i>HXT7</i> -Promotor in 2 $\mu$ -Vektor mit <i>URA3</i> -Selektionsmarker und <i>CYC1</i> -Terminator
YCpFGY1-CubPLV	(Voss, 2001)	<i>FGY1</i> mit eigenem Promotor in CEN/ARS-Plasmid mit <i>LEU2</i> -Selektionsmarker, C-terminale Fusion mit <i>CUBPLV</i>
YCpCD147-CubPLV	(Makuc, 2002)	<i>CD147</i> des Menschen hinter verkürztem <i>HXT7</i> -Promotor in CEN/ARS-Plasmid mit <i>LEU2</i> -Selektionsmarker, C-terminale Fusion mit <i>CUBPLV</i>
YIp5	(Botstein <i>et al.</i> , 1979)	Integrationsplasmid mit <i>AMP<sup>R</sup></i> -Selektionsmarker und <i>URA3</i> -Selektionsmarker

**Tab. 7: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide.**

<b>Plasmid</b>	<b>Beschreibung/Referenz</b>
pNub-WT-hsGLUT4	<i>GLUT4</i> des Menschen gegen <i>ALG5</i> im pNub-WT- <i>ALG5</i> ausgetauscht, N-terminale Fusion mit <i>NUB</i>
pNub-G-hsGLUT4	<i>GLUT4</i> des Menschen gegen <i>ALG5</i> im pNub-G- <i>ALG5</i> ausgetauscht, N-terminale Fusion mit <i>NUB</i>
pNub-WT-hsGLUT1	<i>GLUT1</i> des Menschen gegen <i>ALG5</i> im pNub-WT- <i>ALG5</i> ausgetauscht, N-terminale Fusion mit <i>NUB</i>
pNub-G-hsGLUT1	<i>GLUT1</i> des Menschen gegen <i>ALG5</i> im pNub-G- <i>ALG5</i> ausgetauscht, N-terminale Fusion mit <i>NUB</i>
pNub-WT-HXT9	<i>HXT9</i> der Hefe gegen <i>ALG5</i> im pNub-WT- <i>ALG5</i> ausgetauscht, N-terminale Fusion mit <i>NUB</i>
pNub-G-HXT9	<i>HXT9</i> der Hefe gegen <i>ALG5</i> im pNub-G- <i>ALG5</i> ausgetauscht, N-terminale Fusion mit <i>NUB</i>
pNub-WT-ERG4	<i>ERG4</i> der Hefe gegen <i>ALG5</i> im pNub-WT- <i>ALG5</i> ausgetauscht, N-terminale Fusion mit <i>NUB</i>
pNub-G-ERG4	<i>ERG4</i> der Hefe gegen <i>ALG5</i> im pNub-G- <i>ALG5</i> ausgetauscht, N-terminale Fusion mit <i>NUB</i>

pNub-WT-UBC9	<i>UBC9</i> des Menschen gegen <i>ALG5</i> im pNub-WT- <i>ALG5</i> ausgetauscht, N-terminale Fusion mit <i>NUB</i>
pNub-G-UBC9	<i>UBC9</i> des Menschen gegen <i>ALG5</i> im pNub-G- <i>ALG5</i> ausgetauscht, N-terminale Fusion mit <i>NUB</i>
pRShsGLUT4-CubPLV	<i>GLUT4</i> des Menschen mit verkürztem <i>HXT7</i> -Promotor von YEp4H7-hsGLUT4 amplifiziert und gegen $\Delta wbp1$ im Insertionsplasmid pRS305( $\Delta wbp1$ -Cub-ProtA-LexA-VP16) ausgetauscht
YCpH7hsG4-CubPLV	<i>GLUT4</i> des Menschen mit verkürztem <i>HXT7</i> -Promotor und C-terminaler Fusion von CubPLV von pRShsGLUT4-CubPLV amplifiziert und über homologe RP/UP-HOM-Stellen in YCplac111 kloniert
YCpMet25hsG4-CubPLV	<i>MET25</i> -Promotor von p426MET25 gegen verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in YCpH7hsG4-CubPLV ausgetauscht
YCpFGY1hsG4-CubPLV	<i>FGY1</i> -Promotor von YCpFGY1-CubPLV gegen verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in YCpH7hsG4-CubPLV ausgetauscht
YCpH7hsG1-CubPLV	<i>GLUT1</i> des Menschen mit verkürztem <i>HXT7</i> -Promotor von YEp4H7-hsGLUT1 gegen <i>GLUT4</i> mit verkürztem <i>HXT7</i> -Promotor in YCpH7hsG4-CubPLV ausgetauscht
YCpH7HXT9-CubPLV	<i>HXT9</i> der Hefe mit verkürztem <i>HXT7</i> -Promotor von pTHHXT9 gegen <i>GLUT4</i> mit verkürztem <i>HXT7</i> -Promotor in YCpH7hsG4-CubPLV ausgetauscht
YCpH7ERG4-CubPLV	<i>ERG4</i> der Hefe gegen <i>GLUT4</i> in YCpH7hsG4-CubPLV ausgetauscht
YCpH7HXT1-CubPLV	<i>HXT1</i> der Hefe gegen <i>GLUT4</i> in YCpH7hsG4-CubPLV ausgetauscht
YCpH7SHR3-CubPLV	<i>SHR3</i> der Hefe gegen <i>GLUT4</i> in YCpH7hsG4-CubPLV ausgetauscht
pRShsG1-CubURA	<i>GLUT1</i> des Menschen von YEp4H7-hsGLUT1 gegen <i>STE2</i> im pRS313- <i>STE2</i> ausgetauscht, hinter <i>CUP</i> -Promotor und vor der <i>Cub-RURA3</i> Gensequenz
pRSHXT9-CubURA	<i>HXT9</i> der Hefe von pTHHXT9 gegen <i>STE2</i> im pRS313- <i>STE2</i> ausgetauscht, hinter <i>CUP</i> -Promotor und vor der <i>Cub-RURA3</i> Gensequenz
YEpGB1	Im Rahmen der Komplementation von <i>fgy4X</i> aus einer Hefe-Genbank isoliertes und sequenziertes Plasmid mit den ORF's <i>CTR3</i> , <i>YLR412w</i> , <i>YLR423w</i> und <i>YLR414c</i> des Chromosoms XII; <i>URA3</i> -Selektionsmarker
YEpGB2	Im Rahmen der Komplementation von <i>fgy4X</i> aus einer Hefe-Genbank isoliertes und sequenziertes Plasmid mit den ORF's <i>TRP1</i> , <i>GAL3</i> und <i>SNO2</i> des Chromosoms IV; <i>URA3</i> -Selektionsmarker
YEpGB3	Im Rahmen der Komplementation von <i>fgy4X</i> aus einer Hefe-Genbank isoliertes und sequenziertes Plasmid mit dem ORF <i>FGY1</i> des Chromosoms XIV; <i>URA3</i> -Selektionsmarker
YEpGB5	Im Rahmen der Komplementation von <i>fgy4X</i> aus einer Hefe-Genbank isoliertes und sequenziertes Plasmid mit den ORF's <i>SSK22</i> , <i>SOL2</i> , <i>ERS1</i> und <i>YCR076c</i> des Chromosoms III; <i>URA3</i> -Selektionsmarker

YEpYLR411/412	Multicopy-Suppressorplasmid des Wachstums der GLUT4 exprimierenden <i>fgy4</i> -Mutante EBY.F4-7 auf Glukosemedium
YEpYLR411	Multicopy-Suppressorplasmid des Wachstums der GLUT4 exprimierenden <i>fgy4</i> -Mutante EBY.F4-7 auf Glukosemedium

## 2.3 Synthetische Oligonukleotide

**Tab. 8: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.**

Oligo	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
3'-LD-PCR	TCGCCCGGAATTAGCTTGGCTGC AGGAATTCGATATCAAGCT	Abwärts-Primer zu 5'-LD-PCR, homolog zur Sequenz hinter <i>ALG5</i>
5'-LD-PCR	GAAAATTC AAGACAAGGAAGGGA TCCCTGGTGGG	Aufwärts-Primer zur Klonierung von cDNA-Fragmenten als Fusion hinter <i>NUB</i> in pNub-WT/G- <i>ALG5</i>
a1-ERG3	CATCGCAAGTTACGACGCGTT	Aufwärts-Primer; Nachweis einer <i>erg3</i> -Deletion
a4-ERG3	GTCATAGTTGTTTATGGACG	Abwärts-Primer zu a1-ERG3
a1-ERG4	GCAAGTGATGTGCAAATTGTC	Aufwärts-Primer, Nachweis einer <i>erg4</i> -Deletion
a4-ERG4	CATTACAAAAC T GACCC	Abwärts-Primer zu a1-ERG4
a1-ERG5	CATCACAAGCAGCTGCTCGTT	Aufwärts-Primer; Nachweis einer <i>erg5</i> -Deletion
a2-ERG5	CATACCATGTTTTAGTGTAAG	Abwärts-Primer zu a1-ERG5
a3-ERG5	CTGCAGACATGGCCATGAAGA	Aufwärts-Primer; Nachweis einer <i>erg5</i> -Deletion
a4-ERG5	AACATCCTTCTTGATTGCAA	Abwärts-Primer zu a1-ERG5 und zu a3-ERG5
a1-ERG6	GATGCAACAGGGTAAGATCAG	Aufwärts-Primer; Nachweis einer <i>erg6</i> -Deletion
a4-ERG6	GCAAGAAATCCAATGGCTTTC	Abwärts-Primer zu a1-ERG6
a1-ERS1	GGAGGGTCAGGATCTGGCTTTA	Aufwärts-Primer; Nachweis einer <i>ers1</i> -Deletion
a4-ERS1	GATTCCGTCAAAC T TCCGATG	Abwärts-Primer zu a1-ERS1
a1YLR143	GATTATGGGTT CGAATAGTAC	Aufwärts-Primer; Nachweis einer <i>ylr143</i> -Deletion
a4YLR143	CGAAAATAAAAT T GATCACGC	Abwärts-Primer zu a1YLR143
CUPGLT4URA1	GATATTAAGAAAAACAACTGTAA CGAATTCATGCCGTCGGGCTTCC AACAGATA	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer Fusion des humanen <i>GLUT4</i> mit <i>CUB RURA3</i> (Homologie zum <i>CUP</i> -Promotor)
CUPGLT4URA2	CAATCTTTGTTGATCTGGAGGGA TACCGGTCGACCCCTCGACGTC GTTCTCATCTGGCCCTAA	Abwärts-Primer zu CUPGLT4URA1; Homologie zur <i>CUB</i> -Gensequenz im pRS313-STE2

CUPhsGLUT1	GATATTAAGAAAAACAACTGTAA CGAATTCATGGAGCCCAGCAGCA AGAAGCTG	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer Fusion des humanen <i>GLUT1</i> mit <i>CUBRURA3</i> (Homologie zum <i>CUP</i> -Promotor)
CUPHXT7	GATATTAAGAAAAACAACTGTAA CGAATTCATGTCAACAAGACGCTG CTATTGCA	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer Fusion von <i>HXT7</i> mit <i>CUBRURA3</i> (Homologie zum <i>CUP</i> -Promotor)
CUPHXT9	GATATTAAGAAAAACAACTGTAA CGAATTCAAAAATGTCCGGTGTT AATAATACA	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer Fusion von <i>HXT9</i> mit <i>CUBRURA3</i> (Homologie zum <i>CUP</i> -Promotor)
ERG4Cub1	ACAAAAACAAAAAGTTTTTTTAAAT TTTAATCAAAAAATGGCAAAGGAT AATAGTGAGAAGCTGCAG	Aufwärts-Primer zu Herstellung einer Fusion von <i>ERG4</i> mit <i>CUBPLV</i> , bindet am <i>ERG4</i> Start (Homologie zu <i>HXT7</i> -Promotor im YCpH7hsG4-CubPLV)
ERG4Cub2	CTGGAGGGATCCCCCCCGACAT GGTGCACCCCTCGACGAAAACAT AAGGAATAAAGACGTAAGGGCA	Abwärts-Primer zu ERG4Cub1, bindet das Ende von <i>ERG4</i> ohne Stopkodon (Homologie zu <i>CUB</i> im YCpH7hsG4-CubPLV)
FGY1hsG4	CATTTTCAATTGTTCTGAAAGTGG TTTGCGATGCCGTCGGGCTTCCA ACAG	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer Fusion des humanen <i>GLUT4</i> mit <i>CUBPLV</i> (Homologie zum <i>FGY1</i> -Promotor in YCpFGY1-CubPLV)
GLT4CUB1	ACGCGTCGACGTAGGAACAATTT CGGGCCCCTGC	Aufwärts-Primer zur Klonierung einer Fusion des humanen <i>GLUT4</i> mit verkürztem <i>HXT7</i> -Promotor in pRS305; <i>SalI</i> -Site am 5'-terminalen Ende
GLT4CUB	ATTAAGTCGACGTCGTTCTCATC TGGCCC	Abwärts-Primer zu GLT4CUB1, bindet das Ende des humanen <i>GLUT4</i> ohne Stopkodon; <i>SalI</i> -Site am 5'-terminalen Ende
GLT4NUB	CAAGGAAGGGATCCCTGGTGGG TCGACCATGATGCCGTCGGGCT TCCAACAG	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer Fusion des humanen <i>GLUT4</i> (Homologie zu <i>NUB</i> in pNub-WT/G-ALG5)
GLT4NUB2	AATGATAATAATAACATAAAAATA ATTACTTCAGTCGTTCTCATCTG GCC	Abwärts-Primer zu GLT4NUB, bindet das Ende des humanen <i>GLUT4</i> (homolog zur Sequenz hinter ALG5)
hsG1Cub	GATCAATCTTTGTTGATCTGGAG GGATACCGGTCGACCCCTCGAC CACTTGGGAATCAGCCCCCAGG GG	Abwärts-Primer zu CUPhsGLUT1 und zu p426H7-1, bindet das Ende des humanen <i>GLUT1</i> ohne Stopkodon (Homologie zu <i>CUB</i> in pRS313-STE2 und in YCpH7hsG4-CubPLV)
HXT1Cub1	ACAAAAACAAAAAGTTTTTTTAAAT TTTAATCAAAAAATGAATTCAACT CCCGATCTAATATCTCCTCAG	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer Fusion von <i>HXT1</i> mit <i>CUBPLV</i> , bindet am <i>HXT1</i> Start (Homologie zu <i>HXT7</i> -Promotor im YCpH7hsG4-CubPLV)
HXT1Cub2	CTGGAGGGATCCCCCCCGACAT GGTGCACCCCTCGACTTTCTCTGC TAAACAACTCTTGTAATAATGG	Abwärts-Primer zu HXT1Cub1, bindet das Ende von <i>HXT1</i> ohne Stopkodon (Homologie zu <i>CUB</i> im YCpH7hsG4-CubPLV)

HXT7Cub	GATCAATCTTTGTTGATCTGGAG GGATACCGGTTCGACCCCTCGACT TTGGTGCTGAACATTCTCTTGTA	Abwärts-Primer zu CUPHXT7 und zu p426H7-1, bindet das Ende von <i>HXT7</i> ohne Stopkodon (Homologie zu <i>CUB</i> in pRS313-STE2 und YCpH7hsG4-CubPLV)
HXT9Cub	GATCAATCTTTGTTGATCTGGAG GGATACCGGTTCGACCCCTCGAC GCTGGAAAAGAACCTCTTGTAGA T	Abwärts-Primer zu CUPHXT9 und zu p426H7-1, bindet das Ende von <i>HXT9</i> ohne Stopkodon (Homologie zu <i>CUB</i> in pRS313-STE2 und YCpH7hsG4-CubPLV)
k2-kanMX	TTGTCGCACCTGATTGCCCG	Verifizierung von Gendeletionen, Binde- stelle im <i>kanMX</i> -Gen
k3-kanMX	TATGGAAGTGCCTCGGTGAG	Verifizierung von Gendeletionen, Binde- stelle im <i>kanMX</i> -Gen
MetGlt4Cub1	ATTAACCCTCACTAAAGG	Aufwärts-Primer zur Klonierung des <i>MET25</i> -Promotors (Homologie zu YCpH7hsG4-CubPLV vor <i>HXT7</i> -Pro- motor)
MetGlt4Cub2	GGAGCCTATCTGTTGGAAGCCC GACGGCATGGGGGATCCACTAG TTCTAGAG	Abwärts-Primer zu MetGlt4Cub1, bindet am <i>MET25</i> -Promotor Ende (Homologie zu <i>GLUT4</i> in YCpH7hsG4-CubPLV)
M13forward- 21(UP)	GTA AACGACGGCCAGT	Sequenzierprimer
M13rev (RP)	AAACAGCTATGACCATG	Sequenzierprimer
M13pUC(-40)	GTTTTCCCAGTCACGAC	Abwärts-Sequenzierprimer, bindet in <i>lacZ</i> , -40 bp vor terminalem Repeat des mTn3- <i>lacZ/LEU2</i>
NubERG4a	CAAGGAAGGGATCCCTGGTGGG TCGACCATGATGGCAAAGGATAA TAGTGAGAAGCTG	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer Fusion von <i>ERG4</i> (Homologie zu <i>NUB</i> in pNub-WT/G-ALG5)
NubERG4b	AATGATAATAATAACATAAAAATA ATTACTCTAGAAAACATAAGGAA TAAAGACG	Abwärts-Primer zu NubERG4a, bindet das Ende von <i>ERG4</i> (homolog zur Sequenz hinter <i>ALG5</i> )
NubGLT1a	CAAGGAAGGGATCCCTGGTGGG TCGACCATGATGGAGCCCAGCA GCAAGAAGCTG	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer Fusion des humanen <i>GLUT1</i> (Homologie zu <i>NUB</i> in pNub-WT/G- ALG5)
NubGLT1b	AATGATAATAATAACATAAAAATA ATTACTTACACTTGGGAATCAG CCCCAG	Abwärts-Primer zu NubGLT1a, bindet das Ende des humanen <i>GLUT1</i> (homolog zur Sequenz hinter <i>ALG5</i> )
NubHXT9a	CAAGGAAGGGATCCCTGGTGGG TCGACCATGATGTCCGGTGTAA TAATACATCC	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer Fusion von <i>HXT9</i> (Homologie zu <i>NUB</i> in pNub-WT/G-ALG5)
NubHXT9b	AATGATAATAATAACATAAAAATA ATTACTTTAGCTGGAAAAGAACC TCTTGTAG	Abwärts-Primer zu NubHXT9a, bindet das Ende von <i>HXT9</i> (homolog zur Sequenz hinter <i>ALG5</i> )
Oligo(A)	GACAAGGAAGGGATCCCTGGTG GGTCGACCATGCAGGCCGGG	Aufwärts-Primer zur cDNA-Synthese, bindet die ss-cDNA am 3'-terminalen Ende (Bindestelle für 5'-LD-PCR)
Oligo(B)	GACAAGGAAGGGATCCCTGGTG GGTCGACCATGAGGCCGGG	Aufwärts-Primer zur cDNA-Synthese, Linkersequenz eine Base weniger als in Oligo(A), sonst identisch

Oligo(C)	GACAAGGAAGGGATCCCTGGTG GGTCGACCATGGGCCGGG	Aufwärts-Primer zur cDNA-Synthese, Linkersequenz eine Base weniger als Oligo(B), sonst identisch
Oligo(dT)	GGCTGCAGGAATTTCGATATCAAG CTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT TTTTTTTTTVN	Abwärts-Primer zur cDNA-Synthese, bindet Poly(A)-RNA (Homologie zur Sequenz hinter <i>ALG5</i> in pNub-WT/G- <i>ALG5</i> )
p426H7-1	CTAGAGCTCGTAGGAACAATTC GG	Aufwärts-Primer zur Klonierung des verkürzten <i>HXT7</i> -Promotors, bindet -392 bp vor dem Startkodon
RP-HOM	TGTGAGCGGATAACAATTCACA CAGGAAACAGCTATGACCATG	Aufwärts-Primer für die Klonierung von DNA-Fragmenten in die von Gietz und Sugino (1988) beschriebenen Vektoren über homologe Rekombination in Hefe
UP-HOM	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGA CGTTGTA AACGACGGCCAGT	Abwärts-Primer zu RP-HOM
S1-ERG3	ATGGATTTGGTCTTAGAAGTCGC TGACCATTATGTCTTAGACTTCG TACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärts-Primer zur Amplifizierung eines <i>kanMX</i> DNA-Fragments zur Deletion von <i>ERG3</i>
S2-ERG3	TCAGTTGTTCTTCTTGGTATTTGG GTCGTTTTTCATAGATTCTGCATA GGCCACTAGTGGATCTG	Abwärts-Primer zu S1-ERG3
S1-ERG4	ATGGCAAAGGATAATAGTGAGAA GCTGCAGGTGCAGGGAGAGTTC GTACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärts-Primer; Amplifizierung eines <i>kanMX</i> DNA-Fragments zur Deletion von <i>ERG4</i>
S2-ERG4	CTAGAAAACATAAGGAATAAAGA CGTAAGGGCAATGTTTACAGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG	Abwärts-Primer zu S1-ERG4
S1-ERG5	ATGAGTTCTGTGCGAGAAAATAT AATACAACATGCCACTCATTTTCTG ACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärts-Primer für die Amplifizierung eines <i>kanMX</i> DNA-Fragments zur Deletion von <i>ERG5</i>
S2-ERG5	TTATTCGAAGACTTCTCCAGTAAT TGGGTCTCTTTTTTGAAGCATA GGCCACTAGTGGATCTG	Abwärts-Primer zu S1-ERG5
S1-ERG6	ATGAGTGAAACAGAATTGAGAAA AAGACAGGCCCAATTCATTTCTG TACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärts-Primer für die Amplifizierung eines <i>kanMX</i> DNA-Fragments zur Deletion von <i>ERG6</i>
S2-ERG6	TTATTGAGTTGCTTCTTGGGAAG TTTGGGAGGGGTTTTCGGCGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG	Abwärts-Primer zu S1-ERG6
S1-ERS1	ATGGTGTGCTTAGACGATATACT AGGTATCGTGTATGTTACGTCAT GGTTCGTACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärts-Primer für die Amplifizierung eines <i>kanMX</i> DNA-Fragments zur Deletion von <i>ERS1</i>
S2-ERS1	CTACAGCGGGTACTCTGACGCCA GATCATGGCCTCGAGATCGATAT ACGCATAGGCACTAGTGGATCTG	Abwärts-Primer zu S1-ERS1
S1YLR143	ATGAAGTTTATAGCATTAAATCA GGTGGGAAGGACTCGTTCGTAC GCTGCAGGTCGAC	Aufwärts-Primer für die Amplifizierung eines <i>kanMX</i> DNA-Fragments zur Deletion von <i>YLR143</i>

---

S2YLR143	TTAGGAACGAATATGCAACCCAA AGCGGTGTTCTTTACCACGGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG	Abwärts-Primer zu S1YLR143
seq1cDNA	GACCGGTAAAACCATAACATTGG	Aufwärts-Sequenzierprimer, bindet im <i>NUB</i> von pNub-Plasmiden
seq2cDNA	GTCACCTTTAAAATTTGTATACAC	Abwärts-Sequenzierprimer zu seq1cDNA
seqHIS	TTAGGATTTGCCACTGAGGTT	Verifizierung von Gendeletionen, Binde- stelle im <i>HIS3MX</i> -Gen
SHR3Cub1	ACAAAAACAAAAAGTTTTTTTAAAT TTTAATCAAAAAATGTTCTCATAT TCAGATTTCTGTTCTATCGG	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer Fusion von <i>SHR3</i> mit <i>CUBPLV</i> , bindet am Start von <i>SHR3</i> (Homologie zu <i>HXT7</i> -Promotor in YCpH7hsG4-Cub PLV)
SHR3Cub2	CTGGAGGGATCCCCCCCGACAT GGTCGACCCCTCGACTTTTTTGG CGTTCTTCCTCTTTTGAGCACC	Abwärts-Primer zu SHR3Cub1, bindet das Ende von <i>SHR3</i> ohne Stopkodon (Homologie zu <i>CUB</i> in YCpH7hsG4- CubPLV)
Ubc9-RT1	GACAAGGAAGGGATCCCTGGTG GGTCGACCATGATGTCGGGGAT CGCCCTCAGC	Aufwärts-Primer zur Herstellung einer Fusion von <i>mUBC9</i> (Homologie zu <i>NUB</i> im pNub-WT/G-ALG5)
Ubc9-RT2	AATGATAATAATAACATAAAAATA ATTACTTTATGAGGGGGCAAACCT TCTTCGC	Abwärts-Primer zu Ubc9-RT1, bindet das Ende von <i>mUBC9</i> (homolog zur Sequenz hinter <i>ALG5</i> )

---

## 2.4 Genbanken

Es wurde eine *S. cerevisiae* DNA-Bank mit chromosomalen Fragmenten des Stammes EBY.VW5000 (Wieczorke *et al.*, 1999) im 2 $\mu$ -Vektor YEplac195 verwendet (Hamacher, 2001). Es wurde ebenfalls eine *S. cerevisiae* miniTn3::*lacZ*::*LEU2*-Bank mit chromosomalen Fragmenten im Vektor pHSS6 verwendet (Seifert *et al.*, 1986; Burns *et al.*, 1994).

## 2.5 Chemikalien und Enzyme

---

Acros Organics	Fruktose, Galaktose, Lysin, Maltose, Natriumacetat
Braun-Melsungen	Glasperlen 0,45 mm $\varnothing$
BTS	X-Gal
Caesar & Loretz	Glukose
Calbiochem	G418/Geneticin
Clontech	Advantage-GC 2 PCR-System, Human Skeletal Muscle Poly A <sup>+</sup> -RNA, Powerscript Reverse Transkriptase System
Difco	Bacto Agar, Pepton, Trypton, Yeast Extract, Yeast Nitrogen Base
Fluka	Hexan, Kupfersulfat

Fuji	Röntgenfilme
GibcoBRL	Agarose, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase
Janssen Chimica	Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO)
J.T. Baker	Ethanol, Kaliumacetat (KAc), $K_2HPO_4$ , $KH_2PO_4$ , KOH, $MgCl_2$ , NaCl, NaOH, PEG4000
Kodak	Röntgenfilme
MBI	Lambda-DNA
Merck	Adenin, Ammoniumperoxidsulfat (APS), Chloroform, DMF, EDTA, HCl, Isopropanol, Leucin, Methanol, $MgSO_4$ , $Na_2HPO_4$ , $NaH_2PO_4$ , NaOH, Nonadecan, Pyrogallol, TEMED, Twenn20, Uracil
Millipore	Immobilon-N PVDF-Membran
MWG Biotech	Synthetische Oligonukleotide
New England Biolabs	Restriktionsendonukleasen, BSA
Oxoid	Agar, Pepton
PCR Inc. Florida	5-FOA
Pierce	SuperSignal ULTRA Chemiluminescent Substrate
Qiagen	PCR Purification Kit, Plasmid Mini Kit, QIAEX II Gel Extraction Kit
Riedel-de-Haen	Essigsäure, Ethanol, Methanol, $MnCl_2$
Roche	Alkalische Phosphatase, Antimycin A, Expand High Fidelity PCR System, Protease Inhibitoren "Complete", T4-DNA-Ligase
Roth	Ampicillin, $\beta$ -Mercaptoethanol, Bromphenolblau, Dithiothreitol (DTT), Gel30 Acrylamid, Glycerin, Glycin, Isopropanol, KCl, Saccharose, PEG1000, PEG3350
Seikagaku Kogyo Co. Ltd.	Zymolyase
Serva	Ammoniumperoxidsulfat (APS), Albumin Bovine Fraction (BSA), $CaCl_2$ , Glycerin, Maltose, Natriumdodecylsulfat (SDS), Tween20, X-Gal
Sigma	Antimycin A, Ampicillin, Cholesterol, Ergosterol, Ethidiumbromid, 2-Desoxy-D-Glukose, Lithiumacetat, ONPG, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), PonceauS, "Prestained" Molekulargewichtsstandard, Tris-Puffer
Sigma ARK	Synthetische Oligonukleotide
Whatman	3 MM Papier

## 2.6 Antikörper

### Im Rahmen dieser Arbeit verwendete polyklonale Antikörper:

anti-Dpm1	Molecular Probes
anti-Pep12	Molecular Probes
anti-GLUT4	Calbiochem
anti-Kaninchen IgG (H+L) Peroxidase Konjugat	Dianova
anti-Maus IgG Peroxidase Konjugat	Roche

## 2.7 Transformationen

### 2.7.1 Transformation von *E. coli*

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

### 2.7.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* Stämmen erfolgte nach der Methode von Klebe *et al.* (1983), modifiziert nach Dohmen *et al.* (1991). Alternativ wurden die Zellen nach der Lithiumacetat-Methode von Gietz und Woods (1994) mit Plasmid-DNA bzw. DNA-Fragmenten transformiert. Zur Selektion auf Geneticinresistenz wurden die Zellen nach der Transformation zunächst für 4h bei 30°C in flüssigem Vollmedium inkubiert und erst im Anschluß auf G418-haltigem Medium ausplattiert.

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

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

Die Zellen aus einer stationären Hefekultur (5 ml) wurden durch Zentrifugation geerntet und in 400 µl Puffer P1 (Plasmid Mini Kit, Firma Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von 400 µl Qiagen Puffer P2 und 2/3 Volumen Glasperlen (Ø 0,45 mm) erfolgte ein Zellaufschluß durch fünfminütiges Schütteln auf einem Vibrax (Janke&Kunkel, Vibrax VXR) bei 4°C. Nach Überführung von 0,5 ml Überstand in ein neues Reaktionsgefäß wurden 0,25 ml Qiagen Puffer P3 hinzugegeben und gemischt. Einer zehnmütigen Inkubation auf Eis folgte eine Zentrifugation für 15 min mit 10000 rpm. Der Überstand wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß

überführt und die DNA durch Zugabe von 0,75 ml Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt. Die DNA wurde im Anschluß durch Zentrifugation für 30 min mit 13000 rpm sedimentiert, das Sediment mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und schließlich in 20µl Wasser resuspendiert. 2µl dieser DNA wurden für die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

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

Die Zellen aus einer stationären Hefekultur (5 ml) wurden durch Zentrifugation (13000 rpm) in einem Reaktionsgefäß geerntet. Nach Zugabe von 250 µl einer Lösung aus 0,1 M EDTA (pH 7,5), 14 mM β-Mercaptoethanol und 150 µg/ml Zymolyase zu dem Hefepellet mußte die Suspension für 2-3 h bei 37°C inkubieren, dabei wurde zwischenzeitlich invertiert. Als sich die Zellen im Spheroblastenstadium befanden, wurden 50 µl eines Minipräp-Mixes (0,25 M EDTA, pH 8,5; 0,5 M Tris; 2,5% SDS) hinzu gegeben und der Ansatz für 30 min in einem Wasserbad bei 65°C unter regelmäßigem Invertieren inkubiert. Nach Zugabe von 63 µl 5 M KAc wurde erneut invertiert und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluß folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 13000 rpm für 10 min. Der Überstand wurde entnommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 720 µl eiskaltem 98%igem Ethanol durch Invertieren präzipitiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm für 5 min wurde der Überstand verworfen und 130 µl RNaseA (1 mg/ml in Wasser gelöst) zu dem noch nicht getrockneten DNA-Sediment gegeben. Das Präzipitat löste sich bei 37°C, dies kann ca. 30 min dauern, es kann auch leicht gevortext werden. Durch Zugabe von 130 µl Isopropanol und leichtem Invertieren wurde die DNA durch Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm für 5 min repräzipitiert. Das Präzipitat wurde mit 70%igem kaltem Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Durch Zugabe von 40 µl Wasser wurde die DNA bei 37°C resuspendiert. Die Ausbeute betrug ca. 10 µg DNA. Zur Kontrolle wurden 8 µl der genomischen DNA in einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt.

## 2.9 Enzymatische Modifikation von DNA

### 2.9.1 DNA-Restriktion

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

### 2.9.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

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

### 2.9.3 Ligation

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

## 2.10 PCR-Amplifizierung von DNA

Die Polymerasekettenreaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit dem „Expand High Fidelity PCR-System“ (Roche) durchgeführt. Jeder Ansatz bestand aus 1-10 ng Plasmid-DNA als Synthesevorlage, 0,2 mM dNTP-Mix, 1x Puffer 2 (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 2-3 U Polymerase und je 100 pmol der entsprechenden Oligonukleotide.

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

- |                  |  |
|------------------|--|
| 1. Denaturierung | 30-45 s, 95°C                          |
| 2. Annealing     | 30-45 s, 50-56°C                       |
| 3. Synthese      | 1 min pro 1 kb zu amplifizierender DNA |
|                  | Produkte < 3 kb bei 72°C               |
|                  | Produkte > 3 kb bei 68°C               |

Bei präparativen Ansätzen wurde im Anschluß an den letzten Syntheseschritt zusätzlich eine um das Doppelte verlängerte Extensionsphase hinzugefügt. Die Reaktionsprodukte wurden in einem Agarosegel überprüft und bei Bedarf aufgereinigt. Dies erfolgte entweder mittels Isolierung aus einem Agarosegel (Abschnitt 2.12) oder durch Verwendung des „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers.

Für eine PCR-Reaktion mit ganzen Zellen wurden anstelle von DNA als Synthesevorlage ein bis zwei Hefekolonien (Volumen ca. 3 µl) mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte abgenommen, in das Reaktionsgefäß gegeben und durch 2 min Erhitzen in der Mikrowelle aufgeschlossen. Im Anschluß wurden die übrigen Komponenten des Ansatzes zugegeben.

## 2.11 Reverse Transkriptions-PCR von mRNA

Die reverse Transkriptions-PCR unterteilt sich in die „First-Strand“ cDNA-Synthese und die „Long Distance“ Amplifikations-PCR. Die „First-Strand“ cDNA Synthese wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl mit dem „PowerScript™ Reverse Transcriptase“ System (CLONTECH) durchgeführt. Jeder Ansatz bestand aus 250-1000 ng RNA (Human Skeletal Muscle Poly A<sup>+</sup> RNA; CLONTECH) als Synthesevorlage, 2 mM dNTP-Mix, 5x First-Strand Buffer, 20 mM DTT, 1 U Reverse Transkriptase und je 500 ng eines entsprechenden Oligo(dT)-Primers. In einem Fall wurde noch 500 ng eines Verlängerungs-Oligonukleotids hinzugeben.

Die RNA, der Oligo(dT)-Primer und Wasser wurden vor der reversen Transkriptionsreaktion für 10-15 min bei 70-85°C in einem programmierbaren Thermoblock erhitzt und danach sofort auf Eis abgekühlt, um mögliche RNA-Sekundärstrukturen zu entfernen. Nach Zugabe von Puffer, dNTP-Mix, DTT und Reverser Transkriptase wurde der Ansatz für 15 min bei 25-30°C inkubiert, bevor die eigentliche Reaktion für 50-70 min bei 42-65°C ebenfalls in einem Thermoblock stattfand. Ein zusätzlicher Verlängerungsprimer konnte nach ca. 10 min noch zu der eigentlichen Reaktion hinzu gegeben werden. Die Reaktion stoppte bei 75°C für 15 min und wurde dann auf Raumtemperatur abgekühlt. Durch Zugabe von 2 U RNaseH für 20 min bei 37°C wurden die DNA:RNA-Hybride aufgelöst. 2 µl der First-Strand cDNA wurden unverdünnt in die „Long-Distance“ PCR eingesetzt.

Die „Long-Distance“ cDNA-Synthese wurde in einem Gesamtvolumen von 50µl mit dem „Advantage®-GC 2 PCR“-System (CLONTECH) durchgeführt. Jeder Ansatz bestand aus 100-200 ng First-Strand cDNA, 5x GC2 PCR Buffer, 5 M GC

Melt, 50x dNTP Mix (jedes 10 mM), 50x Advantage-GC 2 Polymerase-Mix und einem Mix aus den jeweiligen Oligonukleotiden (je 10  $\mu$ M).

Die PCR-Reaktion wurde nach der „Hot-start“-Methode in einem programmierbaren Thermoblock der Firma Techne durchgeführt. Bei dieser Methode wird den Synthesezyklen eine Denaturierungsphase von 3 min vorgeschaltet. Der Taq-Start-Antikörper, der eine enzymatische Aktivität der Polymerase während des Pipettierens verhindert, wurde bei 94°C denaturiert und die Polymerase wurde aktiv. Die Bedingungen der weiteren PCR-Schritte (Denaturierung, und DNA-Synthese) wurden wie folgt gewählt:

- |                  |  |
|------------------|--|
| 1. Denaturierung | 40s, 94°C  |
| 2. Synthese      | 1 min pro 1 kb zu amplifizierender DNA<br>6 min, 68°C (Produkte zwischen 5-9 kb) |
| 3. Verlängerung  | 6 min, 68°C  |

Die Schritte 1 und 2 wurden 35 mal wiederholt. Die Reaktionsprodukte wurden in einem Agarosegel überprüft und bei Bedarf aufgereinigt. Dies erfolgte entweder mittels Isolierung aus einem Agarosegel (Abschnitt 2.13) oder durch Verwendung des „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers.

## 2.12 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

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

## 2.13 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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

## 2.14 Sequenzierung von DNA

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

## 2.15 Bestimmung der Proteinkonzentration

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

## 2.16 Elektrophoretische Trennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

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

## 2.17 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse

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

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Membran für 1 h in PBS/Tween (10 mM Natriumphosphat, pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,1% Tween20; „PBSTB“) mit 3% BSA blockiert. Die Reaktion mit dem Primärantikörper (spezifische Verdünnung in 6 ml PBSTB) erfolgte je nach Antikörper bei Raumtemperatur über Nacht. Danach wurde der Filter 2x mit PBS/Tween-Puffer gewaschen und anschließend für 2 h mit dem sekundären Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Goat Anti-Rabbit-IgG (H+L) Peroxidase-Konjugat der Firma Dianova (1:10000 in PBSTB verdünnt) oder ein Goat Anti-Mouse IgG Peroxidase-Konjugat der Firma Roche (1:12500 in PBSTB verdünnt) eingesetzt und die Membran anschließend 3x mit PBS/Tween-Puffer gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch eine Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenz-Reaktion nach Zugabe eines Chemilumineszenz-Substrates (SuperSignal ULTRA Chemiluminescent Substrate, Firma Pierce) und anschließende Detektion durch Auflegen eines Röntgenfilms.

## 2.18 Spezifischer Nachweis der Proteine Glut4, Pep12 und Dpm1

Der Antikörper gegen GLUT4 (Calbiochem) wurde 1:6000 verdünnt eingesetzt. Er richtet sich gegen eine GLUT4-spezifische, aus zwölf Aminosäuren bestehende Sequenz im C-Terminus des Proteins. Der Antikörper gegen das Pep12-Protein (Molecular Probes) wurde 1:1500 verdünnt eingesetzt und der Antikörper gegen das Dpm1-Protein (Molecular Probes) wurde 1:120 verdünnt eingesetzt.

## 2.19 Zellfraktionierung durch Saccharosegradientenzentrifugation

Die Zellen einer 100 ml Hefekultur ( $OD_{600}=0,5-0,8$ ) wurden in einem Falcon-Tube für 8 min bei 2500 rpm zentrifugiert und das Zellsediment in 5 ml STED10 (10% Saccharose; 10 mM Tris/HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA; 1 mM DTT) ohne Proteaseinhibitoren resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 6 min bei 2500 rpm wurde das Zellsediment in 250  $\mu$ l STED10 mit Proteaseinhibitoren (0,2 mM PMSF; Protease-Inhibitor „Complete“, Firma Roche) resuspendiert und in ein Reagenzglas überführt. Nach Zugabe von Glasperlen ( $\varnothing$  0,45 mm) bis zum Meniskus der Flüssigkeit wurde die Suspension für 3 min auf einem Vibrax geschüttelt. Nach Zugabe von 1 ml eiskalter STED10 Lösung mit Proteaseinhibitoren wurde der Ansatz gemischt und der Überstand für 5 min mit 3000 rpm bei 4°C zentrifugiert, um Glasperlen und Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand wurde entnommen und auf einen Saccharose-Gradienten gegeben.

Die Herstellung des Gradienten erfolgte nach Kölling und Hollenberg (1994) in einem SW40-Zentrifugationsgefäß (Beckmann), indem 4 ml STED50 (wie STED10, jedoch mit 53% Saccharose), 4 ml STED36 (wie STED10, jedoch mit 36% Saccharose) und 4 ml STED20 (wie STED10, jedoch mit 20% Saccharose) sorgfältig übereinandergeschichtet wurden. Das Gefäß wurde gründlich mit Parafilm verschlossen und vorsichtig in eine horizontale Lage gebracht. Nach dreistündiger Diffusion bei 4°C wurde der nun annähernd kontinuierliche Gradient aufgerichtet und mit dem Zellextrakt überschichtet. Nach Zentrifugation für exakt 14 h in einem Beckmann SW40-Rotor mit 114000 g wurden Fraktionen á 700 µl vom Gradienten abgenommen. Aliquots wurden mit dem gleichen Volumen 2x Probenpuffer (100 mM Tris/HCl, pH 6,8; 4 mM EDTA; 4% SDS; 20% Glycerin; 0,02% Bromphenolblau) versetzt und hiervon wurden jeweils 25 µl elektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 2.16). Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte durch Western-Analyse (Abschnitt 2.17).

## 2.20 Bestimmung der $\beta$ -Galaktosidaseaktivität

### 2.20.1 Quantitative Enzymtests

Die Bestimmung der Enzymaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase erfolgte nach Miller (1972). 5 ml Hefekultur wurden bei einer  $OD_{600}$  von 2 geerntet und zweimal mit kaltem Phosphat-Puffer (50 mM  $K_iPO_4$ ; pH 7,0) gewaschen. Der Zellaufschluß erfolgte nach Zugabe von 0,2 g Glasperlen ( $\varnothing$  0,45 mm) und 5 min kräftigem Schütteln auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) bei 4°C. Im Anschluß wurden je nach Zelldichte 0,2-0,5 ml kalter Phosphatpuffer zugegeben, gut gemischt und die Glasperlen durch Zentrifugation für 10 min mit 10000 rpm bei 4° abgetrennt. Der von den Zelltrümmern getrennte Rohextrakt wurde zur Proteinbestimmung (Abschnitt 2.15) und für die Messung der Enzymaktivität eingesetzt.

Die Enzymreaktion wurde bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 1 ml lacZ-Puffer (60 mM  $Na_2HPO_4$ ; 40 mM  $NaH_2PO_4$ ; 10 mM KCl; 1 mM  $MgSO_4$ ; 1 mg/ml ONPG; pH 7,0) durchgeführt und durch Zugabe des Rohextraktes gestartet. Nach eintretender Gelbfärbung, spätestens aber nach 30 min Inkubation, wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml einer 1 M  $Na_2CO_3$ -Lösung gestoppt. Die Intensität der Gelbfärbung wurde spektralphotometrisch bei 420 nm gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient von 2-Nitrophenol beträgt unter diesen Bedingungen  $4,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### 2.20.2 Qualitative Enzymtests („X-Gal Overlay-Assay“)

Die qualitative Bestimmung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität erfolgte durch Lyse von auf Agarplatten gewachsenen Zellen durch Überschichtung mit heißem Aufschlußpuffer (0,2% SDS; 2% DMF; 0,8 mg/ml X-Gal; 0,5% Agarose; 0,5 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 7,2). X-Gal wird von der  $\beta$ -Galaktosidase der aufgeschlossenen Zellen zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Nach der Überschichtung wurden die Platten bei 37°C inkubiert und die Blaufärbung dokumentiert.

### 2.21 Kreuzung von Hefestämmen, Tetradenanalyse und Bestimmung des Paarungstyps

Die haploiden Kreuzungspartner wurden in flüssigem Vollmedium oder auf einer Agarplatte mit Vollmedium miteinander gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 3-4 h bei 25°C wurden Zygoten mit Hilfe eines Mikromanipulators isoliert. Die diploiden Zellen wurden 1-2 Tage in 5 ml Vollmedium bis zur stationären Phase herangezogen, mit Wasser gewaschen und auf Agarplatten mit 2% Kaliumacetat aufgebracht. Nach 3-5 Tagen wurden die sporulierenden Zellen in 0,5 ml Wasser aufgenommen und die Ascuswände durch Zugabe von 20  $\mu$ l Zymolyaselösung (0,2 mg/ml) für 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Sporen wurden mittels eines Mikromanipulators isoliert und zum Auskeimen auf einer YEP-Platte mit 2% Glukose oder 1% Maltose abgelegt. Für die Bestimmung des Paarungstyps wurden die zu prüfenden Stämme wie beschrieben mit den Testerstämmen EBY.109A (*MATa*) und EBY.109B (*MAT $\alpha$* ) gekreuzt und auf Minimalmedium ausgestrichen. Zellen, die mit EBY.109A gekreuzt worden waren und Wachstum auf Minimalmedium zeigten, gehörten dem Paarungstyp  $\alpha$  an, bzw. solche nach Kreuzung mit EBY.109B dem Paarungstyp *a*.

### 2.22 Gen-Deletion in *S. cerevisiae*

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

In PCR-Reaktionen (Abschnitt 2.10) wurden zunächst DNA-Deletionskassetten synthetisiert. Neben einem von *loxP*-Erkennungssequenzen eingefassten Geneticin-Resistenzgen wiesen diese Fragmente an ihren Enden homologe Bereiche zu den 5'- bzw. 3'-flankierenden Sequenzen des zu deletierenden Gens oder der zu deletierenden DNA-Region auf. Diese mindestens 30 bp langen Bereiche befanden sich bereits als "Anhang" an den Oligonukleotiden, die für die PCR-Reaktion eingesetzt wurden. Alternativ wurden Gene mit einer *HIS3::MX6*-Reporterkassette deletiert (Güldener *et al.*, 2002) Nach Transformation der PCR-Produkte in die Hefe (Abschnitt 2.7.2) erfolgte auf Vollmedium mit 200 mg/ml G418 eine Selektion auf Geneticin-resistente Klone. Ebenso erfolgte nach Transformation der *HIS3::MX6*-Kassette eine Selektion auf Medium ohne Histidin. Die Deletionen wurden durch PCR-Reaktionen mit ganzen Zellen (Abschnitt 2.10) unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide verifiziert. Um den Geneticin-Resistenzmarker bzw. das *HIS3*-Gen zu regenerieren, kann man die Zellen mit einem Plasmid transformieren, welches das Gen für das Enzym Cre-Rekombinase hinter einem induzierbaren *GAL2*-Promotor trägt (Tab. 6: Plasmide). Nach Inkubation der Transformanten für 1-2 Tage auf Galaktose- oder Maltosemedium werden die Kolonien auf G418-haltiges Medium bzw. auf Medium ohne Histidin replikaplattiert und G418-sensitive Kolonien bzw. Histidin-auxotrophe Kolonien isoliert. Die durch die Cre-Rekombinase vermittelte Exzision des *kanMX*-Gens bzw. des *HIS3MX*-Gens wird dann in einer PCR-Reaktion mit den entsprechenden Oligonukleotiden überprüft.

### 2.23 Klonierung von DNA-Fragmenten durch *in vivo*-Rekombination

Für die *in vivo*-Klonierung von DNA-Fragmenten in *S. cerevisiae* wurde zunächst das zu klonierende Gen in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide besaßen spezifische 5'-terminale Anhänge mit Homologie zu den 5'- und 3'-flankierenden Sequenzen des Integrationsbereichs im Zielvektor. Der Vektor wurde durch Restriktion (Abschnitt 2.9.1) im Integrationsbereich linearisiert, über ein Agarosegel gereinigt (Abschnitt 2.13) und zusammen mit dem PCR-Produkt in die Hefe transformiert (Abschnitt 2.7.2). Die Zellen wurden im Anschluß auf synthetischem Selektivmedium mit 2% Glukose oder 1% Maltose ausplattiert. Für die Selektion auf den Auxotrophiemarker des Vektors wurde auf den Zusatz der entsprechenden Aminosäuren bzw. Base zum Medium verzichtet. Auf diese Weise wurden nur solche Transformanten erhalten, die aufgrund homologer Rekombination des DNA-Fragments in den linearisierten Vektor innerhalb der Zelle wieder ein stabiles, zirkularisiertes Plasmid besaßen. Die Plasmide wurden

aus Hefe isoliert (Abschnitt 2.8.2), in *E. coli* amplifiziert (Abschnitt 2.7.1) und durch eine darauffolgende Restriktionsanalyse überprüft (Abschnitt 2.9.1).

## 2.24 Split-Ubiquitin System

Das Split-Ubiquitin-System wurde verwendet, um die Interaktion zweier Membranproteine bzw. eines Membranproteins und eines löslichen Proteins nachzuweisen (Stagljar *et al.*, 1998). Im Gegensatz zum Two-Hybrid-System wird hier der Nachweis einer Interaktion nicht nur mit Proteindomänen sondern mit ganzen Proteinen durchgeführt, die sich zudem noch an ihrem tatsächlichen Wirkort befinden können. Die notwendigen Vektoren und Überprüfungsstämme wurden freundlicherweise von Dr. Stephan te Heesen zur Verfügung gestellt. In einzelnen Fällen mußten die Vektoren leicht modifiziert werden.

## 2.25 Präparation der Membransterole aus *S. cerevisiae*

Zellen einer 100 ml Hefekultur, die 49 h bei 30°C bis zur stationären Phase gewachsen waren, wurden so geerntet, daß 175 OD<sub>600</sub>-Einheiten in 5 ml 0,5 N HCl resuspendiert wurden. Die Suspension wurde für 20 min in 50 ml Falcon-Tubes in einem Wasserbad gekocht. Nachdem die labilisierten Zellen auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden wegen starker Hitzebildung nach und nach 3 g KOH-Plättchen hinzu gegeben. Nach Auflösung des KOH wurden 12,5 ml einer methanolischen Pyrogallol-Lösung (0,25 g/l) hinzu gegeben. Als Extraktionsstandard wurden ebenfalls 10 µl einer Cholesterol-Lösung (10 mg/ml, gelöst in Chloroform/Methanol im Verhältnis 4:1) zugegeben. Das Verseifungsgemisch inkubierte für 1 h und 45 min bei 70°C im Wasserbad. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Sterole 2x mit 20 ml Hexan extrahiert. Die kombinierten Hexanphasen wurden in einem Rotationsverdampfer eingengt und der Rückstand 2x mit 1 ml Chloroform mit 0,2 g/l Nonadecan als internem Standard gelöst. Die gelösten Sterole wurden in Braunglasflaschen bei -20°C gelagert.

## 2.26 Gaschromatographische Analyse

Die GC-Analytik wurde mit einem Gaschromatographen (GC-17-A) der Firma Shimadzu durchgeführt, ausgestattet mit einem Autoinjector AOC-17 (Shimadzu). Es wurden folgende Bedingungen gewählt. Als Säule diente eine 25 m lange FS-SE-52-CB-0.25 (CS-Chromatographie Service GmbH) mit einem Innendurchmesser von 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,22 µm, die mit einem Temperaturprogramm (150°C 2 min, 15°C/min bis 250°C, 250°C für 30 min) im Split-Modus

(8:1) gefahren wurde. Die Injektortemperatur betrug 270°C und die Detektor-temperatur 300°C. Als Detektor diente ein Flammenionisationsdetektor (Empfindlichkeit 0) und das Trägergas war Helium.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Heterologe Expression des humanen Glukosetransporters GLUT4 in einem hexosetransport-defizienten Hefestamm

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, konnte ein Hefestamm entwickelt werden, der keine endogenen Hexosetransporter mehr besitzt (Wieczorke *et. al.*, 1999). Dieser Stamm EBY.18ga (*MATa Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2*), der nicht mehr in der Lage war, auf Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen, stellte ein optimales Expressionssystem für die Charakterisierung von Glukosetransportern anderer Organismen dar. Die funktionelle Expression der humanen Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 in diesem hexosetransport-defizienten Hefestamm bedurfte allerdings weiterer hefeeigener Mutationen (Wieczorke *et. al.*, 2002). Eine zusätzliche Mutation im Gen *FGY1*, die zur funktionellen Expression von GLUT1 führte, reichte jedoch nicht aus, den Glukosetransporter GLUT4 in dem Stamm EBY.S7 (*hxt<sup>-</sup> fgy1-1*) funktionell zu exprimieren. Neun weitere Mutanten EBY.F4 (*hxt<sup>-</sup> fgy1-1 fgy4X*) wurden isoliert, die neben der genomischen *fgy1-1*-Mutation zusätzliche Mutationen im Genom aufwiesen und die in der Lage waren, GLUT4 funktionell zu exprimieren. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die noch unbekanntes *fgy4X*-Mutationen zu charakterisieren.

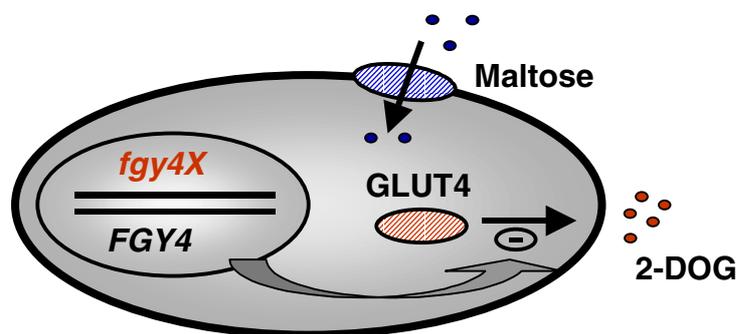
##### 3.1.1 Charakterisierung genomischer *fgy41-49* Suppressormutanten

Die genomischen *fgy4X*-Mutationen der Stämme EBY.F4(1-9) (*MATa hxt<sup>-</sup> fgy1-1 fgy41-49*) sollten über Kreuzungsanalyse mit dem Ausgangsstamm EBY.S7 näher charakterisiert werden. Da beide Stämme den *MATa* Paarungstyp besaßen, wurde zuvor über Kreuzungsanalyse ein Stamm EBY.S7 mit *MATα* Paarungstyp konstruiert. Dazu wurde der Stamm EBY.S7 (*MATa hxt<sup>-</sup> fgy1-1*) mit dem korrespondierenden parental Hefestamm EBY.18ga (*MATα hxt<sup>-</sup>*) gekreuzt. Der Stamm EBY.S7 wurde zur Selektion auf glukosehaltigem Medium ohne Uracil mit einem Plasmid transformiert, welches den ORF (offener Leserahmen) für den Glukosetransporter GLUT1 und das *URA3*-Gen für die Uracilsynthese trug. Ebenso wurde der Stamm EBY.18ga zur Selektion auf Medium ohne Leucin zuvor mit einem Plasmid transformiert, welches das *LEU2*-Gen trug, welches für ein Enzym der Leucinsynthese kodiert. Nach der Sporulation des heterozygot-diploiden Stammes EBY.S7d (*MATa/α hxt<sup>-</sup> fgy1-1/FGY1*) konnte in der anschließenden Tetradenanalyse ein EBY.S7 Mutantenstamm des Paarungstyps

$\alpha$  isoliert werden. Nur die haploiden Sporen, die das *fgy1-1* Allel und das GLUT1-Plasmid besaßen, konnten auf glukosehaltigem Medium wachsen.

Um zu zeigen, ob es sich bei den *fgy4X*-Mutationen um rezessive oder dominante Mutationen handelte, wurden die Mutanten mit dem entsprechenden parentalen Hefestamm EBY.S7 (*MAT $\alpha$* ) gekreuzt. Die Stämme EBY.F4(1-9) (*MAT $\alpha$  hxt<sup>-</sup> fgy1-1 fgy41-49*) wurden zur Selektion auf glukosehaltigem Medium zuvor mit dem Plasmid YEpH2-rGLUT4 transformiert. Von den aus der Kreuzung resultierenden heterozygot-diploiden Stämmen EBY.F4d(1-9) (*MAT $\alpha/\alpha$  hxt<sup>-</sup> fgy1-1/fgy1-1 fgy4X/FGY4*) waren acht nicht mehr in der Lage auf Medium mit 0,2% Glukose zu wachsen und zeigten auf 1% Maltosemedium mit 5 mM 2-DOG keine Sensitivität gegenüber dem toxischen Glukose-Analog. Ein diploider Stamm wuchs sichtbar schlechter auf Medium mit Glukose als der korrespondierende haploide Stamm. Nach der Aufnahme des für die Zelle toxischen 2-DOG wird dieses zu 2-Desoxy-Glukose-6-Phosphat umgewandelt. Es kann ebenfalls die Glukoserepression vermitteln, aber nicht weiter vergoren werden. Die Toxizität wird auf eine Hemmung der Zellwandsynthese zurückgeführt (Bielely *et al.*, 1972; Heredia *et al.*, 1968). Es handelte sich in acht Fällen um rezessive *fgy4X*-Mutationen und in einem Fall um eine zum Teil dominante Mutation.

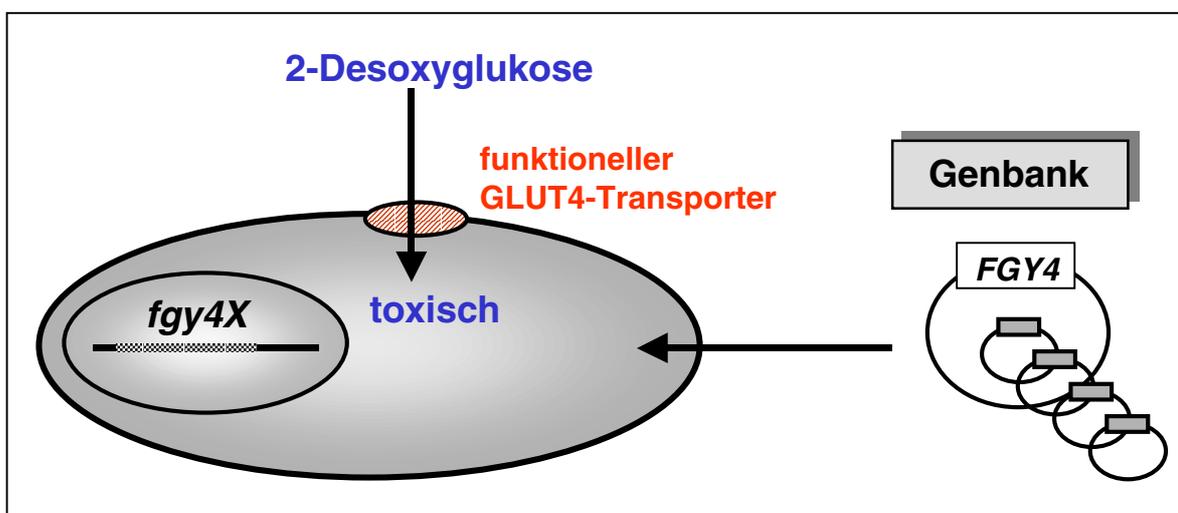
**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Unterdrückung des rezessiven Allels *fgy4X* durch das dominante Wildtypallel *FGY4* und der dadurch vermittelten Rezessivität der heterozygot-diploiden Stämme EBY.F4 gegenüber dem toxischen Glukose-Analog 2-DOG. Das Wachstum der Zellen wird durch die Maltose Aufnahme als Kohlenstoffquelle aus dem Medium gewährleistet.



### 3.1.2 Komplementation von *fgy41-49* mit einer Genbank

Die in den Stämmen EBY.F4(1-9) betroffenen rezessiven Allele *fgy41-49* wurden durch Komplementation mit einer Genbank charakterisiert. Jene GLUT4-Transformanten der Stämme EBY.F4 (1/3/4/6/7), die sehr gute Transformationseigenschaften aufwiesen, wurden mit einer Genbank transformiert (siehe Abschnitt 2.4). Die Transformanten wurden zunächst auf synthetischem Medium ohne Tryptophan und Uracil mit 1% Maltose als Kohlenstoffquelle herangezogen, bevor sie auf das gleiche Medium mit zusätzlich 5 mM 2-DOG replikaplatziert wurden. Das in den *fgy4X*-Mutanten funktionell exprimierte GLUT4 vermittelte die Aufnahme des toxischen 2-DOG, wodurch die Zellen auf Maltosemedium mit 2-DOG nicht wachsen konnten. Enthält das Plasmid der Genbank jedoch das zu *fgy4X* korrespondierende Wildtyp-Allel, so wird die durch das rezessive *fgy4X*-Allel vermittelte GLUT4-Aktivität durch das dominante Wildtyp-Allel wieder unterdrückt. Besitzen die Zellen keinen funktionellen Glukosetransporter mehr, wird das Wachstum durch die im Medium ebenfalls enthaltene Maltose gewährleistet und die Zellen sind gegenüber 2-DOG resistent. Das Wachstum der Zellen, die nicht mehr sensitiv gegenüber 2-DOG waren, wurde im Kontrollexperiment auf Medium mit 0,2% Glukose getestet. Es zeigte sich, daß alle 2-DOG-resistenten Klone nicht mehr auf Glukose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen konnten.

**Abb. 5: Schematische Darstellung der Komplementation der rezessiven Allele *fgy4X* mit einer Genbank.** Das dominante Wildtypallel *FGY4X* eines Genbankplasmids führt zur Inhibierung der durch GLUT4 vermittelten Glukoseaufnahme und vermittelt 2-DOG-Resistenz.



### 3.1.2.1 Isolierung und Charakterisierung verschiedener Genbankplasmide

Mit der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Methode der Komplementation der *fgy4X*-Mutanten mit einer Genbank konnten 4 verschiedene Genbankplasmide in 3 unabhängigen Screens aus Hefe isoliert werden. Die Plasmide wurden entsprechend ihrer Isolierung mit YEpGB1, YEpGB2, YEpGB3 und YEpGB5 bezeichnet und die inserierten DNA-Fragmente durch Ansequenzierung beider Seiten mit dem M13forward-21 und dem M13rev Primer identifiziert. Das Plasmid YEpGB1 enthielt einen ca. 8,8 kb großen Bereich genomischer DNA, der dem Chromosom XII zugeordnet werden konnte. Folgende zum Teil noch unbekannte Gene konnten identifiziert werden, *CTR3* (*YLR411w*), *YLR412w*, *YLR413w* und *YLR414c*. Das Plasmid YEpGB2 enthielt einen ca. 7,4 kb großen Bereich genomischer DNA, der dem Chromosom IV zugeordnet wurde. In diesem Bereich lagen die Gene *TRP1*, *GAL3* und *SNO2*. Das Plasmid YEpGB5 enthielt einen ca. 8,9 kb großen Bereich genomischer DNA, der dem Chromosom III zugeordnet werden konnte. Die Gene *SSK22*, *SOL2*, *ERS1* und *YCR076c* wurden diesem Bereich zugeordnet. Bei Plasmid YEpGB3 konnte bereits durch einfache Restriktionskartierung gezeigt werden, daß es die gleichen DNA-Fragmente aufwies, wie ein bereits durch R. Wiczorke in einem früheren Genbankscreen isoliertes Plasmid, welches das Gen *YNL094w* (*FGY1*) trug. Durch Restriktionsanalyse und Konstruktion unterschiedlicher Subklone aller Genbankplasmide konnten die im folgenden beschriebenen Gene für die Komplementation der *fgy4X*-Mutationen verantwortlich gemacht werden. Die zum Teil unbekanntene Gene des Plasmids YEpGB1 wurden über Restriktion aus dem Plasmid geschnitten und durch Ligation in den episomalen Vektor YEplac195 kloniert. Anschließend wurden die Plasmide mit dem Plasmid YEpH2-rGLUT4 in den Stamm EBY.F4-7 kotransformiert und das Wachstum der Transformanten auf synthetischem Medium mit 0,2% Glukose untersucht. Die Transformanten mit den Plasmiden YEpYLR411/412 und YEpYLR411 zeigten kein Wachstum auf Medium mit Glukose, wohingegen die Transformanten mit den Plasmiden YEpYLR413/414 und YEplac195 deutlich auf Medium mit Glukose wuchsen. Dieses Ergebnis zeigte deutlich, daß die GLUT4-Transformanten in Anwesenheit des Gens *YLR411* (*CTR3*) nicht mehr auf glukosehaltigem Medium wachsen konnten. Da das Gen *CTR3* für einen hochaffinen Kupfertransporter kodiert, schien es sich in diesem Fall um einen Multicopy-Suppressor zu handeln. Das bedeutet, durch eine hohe Kopienzahl eines Gens bzw. des entsprechenden Proteins kann es zur Unterdrückung zellulärer Abläufe kommen, die zur Ausprägung des gesuchten Phänotyps führen, auch wenn dieses Gen unter normalen Umständen nicht mit dem gesuchten Phänotyp in Verbindung gebracht werden würde. In diesem Fall könnte man spekulieren, daß die gesteigerte Synthese des Kupfertransporters zu

einer vermehrten Translokation über die Vesikel des sekretorischen Weges geführt hat und die GLUT4-Translokation durch das Übermaß an Kupfertransportproteinen unterdrückt wurde.

Von den Genen *TRP1*, *GAL3* und *SNO2* des Plasmids YEpGB2 konnte das *TRP1*-Gen für das Wachstumsverhalten der Transformanten auf glukosehaltigem Medium verantwortlich gemacht werden. Wenn die Transformanten das Plasmid YEpH2-rGLUT4 mit dem *TRP1*-Selektionsmarkergen verlieren, sich aber auf dem Genbankplasmid, welches das *URA3*-Selektionsmarkergen enthält, zufällig das *TRP1*-Gen befindet, so wachsen die Zellen nicht mehr auf Medium mit 0,2% Glukose, da sie keinen Glukosetransporter mehr exprimieren. Sie können aber auf maltosehaltigem Medium mit 2-DOG ohne Zusatz von Uracil und Tryptophan wachsen, da sie die Gene *URA3* und *TRP1* auf demselben Plasmid tragen.

Dem Plasmid YEpGB3 konnte durch einfache Restriktionskartierung das Gen *FGY1* zugeordnet werden. Die GLUT4-Transformanten wuchsen mit dem YEpGB3-Plasmid nicht auf glukosehaltigem Medium, da die *fgy1-1*-Mutation durch das *FGY1*-Allel unterdrückt wurde, welche für das Wachstum der Transformanten mit GLUT4 zusätzlich notwendig ist.

Da die Funktion der meisten Gene des Plasmids YEpGB5 bereits bekannt waren, schien das Gen *ERS1* bzw. das entsprechende Protein im Vergleich zu den anderen identifizierten Genen am wahrscheinlichsten für die *fgy4X*-Komplementation verantwortlich zu sein. *Ers1* ist ein integrales Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums mit voraussichtlich 7 Transmembransegmenten, welches in der Literatur als Suppressor der *erd1*-Mutation beschrieben wird. Aus diesem Grund wurde das Gen *ERS1* im Stamm EBY.S7 mit der *kanMX*-Deletionskassette (Oligonukleotide S1-ERS1/S2-ERS2 und a1-ERS1/a4-ERS1) deletiert und das Wachstum des Stammes EBY.S7  $\Delta$ *ers1* (SDY.020) mit GLUT4 auf glukosehaltigem Medium untersucht. Der *ers1*-Deletionsstamm zeigte ebenso wie der Stamm EBY.S7 mit GLUT4 ein schwaches Wachstum auf glukosehaltigem Medium. Der Versuch hat deutlich gezeigt, daß das Gen *ERS1* auf dem Genbankplasmid YEpGB5 nicht für die Komplementation der *fgy4X*-Mutationen verantwortlich war. Aus diesem Grund wurden auch von dem Plasmid YEpGB5 Subklone erstellt. GLUT4-Transformanten, die zusätzlich mit den Plasmiden YEplacSSK22, YCplacYLR076/*ERS1* und YEplacYLR076/*ERS1* transformiert wurden, zeigten deutliches Wachstum auf glukosehaltigem Medium und kein Wachstum auf Medium mit 1% Maltose plus 2-DOG. Die Gene *SSK22*, *YLR076* und *ERS1* waren also nicht für die Komplementation der *fgy4X*-Mutationen verantwortlich. Das einzige Gen, welches nicht subkloniert werden konnte, war

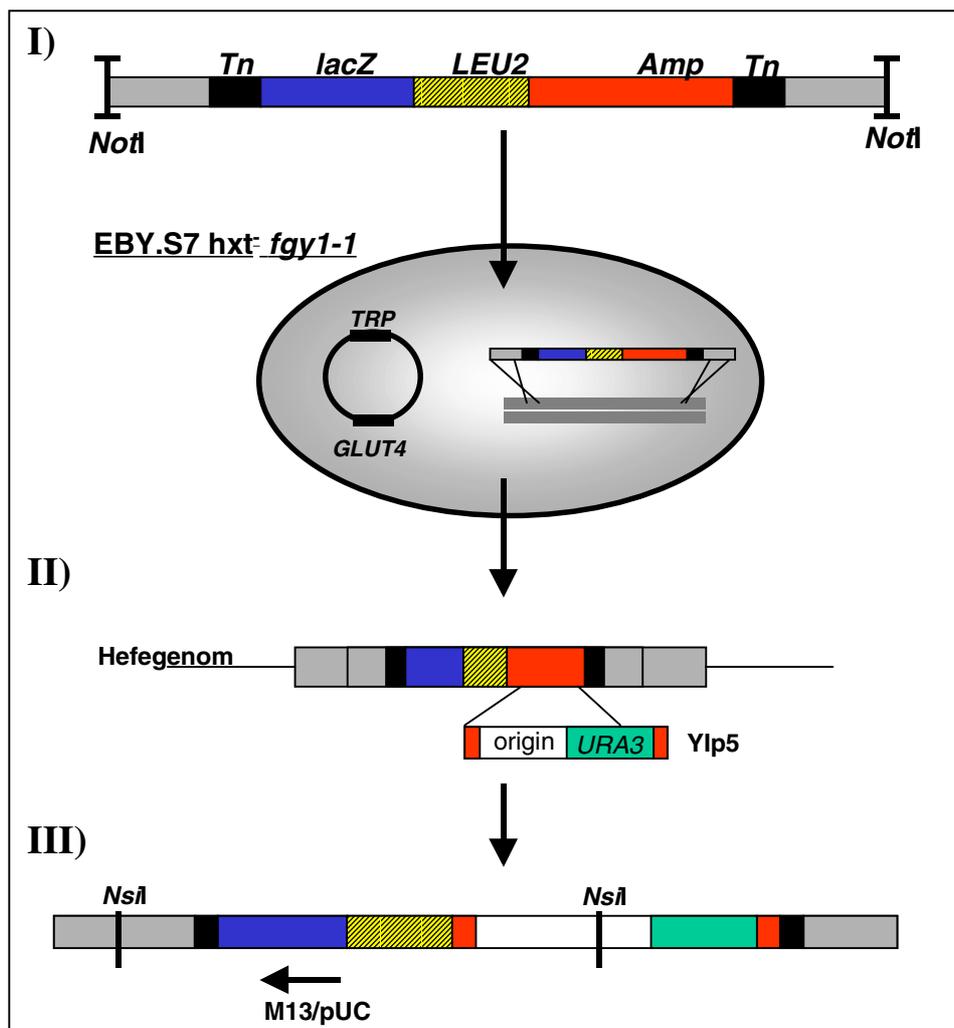
das Gen *SOL2*. Man geht davon aus, daß *SOL2* sehr wahrscheinlich für eine 6-Phosphogluconolaktase kodiert, was allerdings noch nicht eindeutig bestätigt wurde. Es wäre denkbar, daß es durch die Überexpression von *SOL2* durch das Genbankplasmid zu einer Überproduktion von 6-Phosphogluconat gekommen ist, welches sich toxisch auf die Zellen auswirkte (Lobo und Maitra, 1982) und die Zellen deshalb nicht mehr in der Lage waren, auf glukosehaltigem Medium zu wachsen.

### 3.1.3 Konstruktion von GLUT4-Suppressormutanten mit einer Transposongenbank

Nachdem die Komplementation der *fgy4X*-Allele in den Stämmen EBY.F4(1-9) mit einer Genbank auch nach mehreren Versuchen nicht die gesuchten Wildtyp-Allele *FGY4X* hervorbrachte, wurden mit Hilfe einer Insertionsgenbank neue *fgy4X*-Suppressormutanten erzeugt. Die Insertionsgenbank besteht aus Plasmiden mit Hefe-DNA-Fragmenten, die in *E. coli* mit einem mini-Tn3::*lacZ*::*LEU2* Transposon mutagenisiert wurden (Seifert *et al.*, 1986; Burns *et al.*, 1994) (Abbildung 6). Die mutagenisierte Hefe-DNA Sequenz wurde mit dem Restriktionsenzym *NotI* aus dem Vektor geschnitten und in den zu mutagenisierenden Stamm transformiert. Nach der Transformation in einen EBY.S7 GLUT4-Transformantenstamm haben sich Fragmente der Genbank über homologe Rekombination in das Hefegenom inseriert. Die Transformanten (ca. 5000) wurden auf synthetischem Medium mit 1% Maltose ohne Tryptophan und Leucin ausplattiert und auf das gleiche Basismedium mit 1% Glukose ohne Tryptophan und Leucin replikaplattiert. Es zeigte sich bei zwei GLUT4-Transformantenkolonien deutliches Wachstum auf Glukosemedium. Fragmente der Transposongenbank waren in Gensequenzen inseriert, deren Genprodukte sich inhibierend auf die GLUT4-Translokation zur Plasmamembran bzw. die Transporteraktivität auswirkten. Um die ausgeschalteten Gene näher zu charakterisieren, wurde ein zuvor linearisiertes Insertionsplasmid YIp5, welches für Hefe (*URA3*-Gen) und *E. coli* (*AMP*-Resistenzgen) selektierbare Gene trägt, in die Zellen der beiden positiven Hefekolonien transformiert. Nach Insertion von YIp5 über homologe Rekombination in das *AMP*-Gen des Bakterientransposons, wurde die gesamte chromosomale DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym *NsiI* geschnitten. Hierbei wurde auch ein Teil des Gens, in welches das Transposon sich inseriert hatte, mit herausgeschnitten. Nach Zugabe einer T4-Ligase wurden die zirkularisierten DNA-Fragmente in *E. coli* transformiert und die Zellen, die den Vektor mit dem Gen für Ampicillinresistenz trugen, wuchsen auf Medium mit Ampicillin Zusatz. Die Plasmide wurden aus *E. coli* isoliert und mit einem

M13/pUC-Sequenzierprimer, der im Transposon bindet, wurde die genomische DNA, die ebenfalls mit herausgeschnitten wurde, ansequenziert. Die Sequenzierung ergab, daß sich das Transposon in der einen Transformante in das Gen *YLR143w* und in der anderen Transformante in das Gen *ERG4* inseriert hatte. Die Funktion des Gens *YLR143w* ist noch weitgehend unbekannt, das Gen *ERG4* kodiert für das letzte Enzym der Ergosterolbiosynthese. Ein Kontrollversuch sollte nun zeigen, ob eine Deletion des Gens *YLR143w* bzw. des Gens *ERG4* im Stamm EBY.S7 wirklich zur funktionellen Expression des GLUT4 Glukose-transporters führt.

**Abb. 6: Schematische Darstellung der homologen Rekombination einer bakteriellen Insertionsgenbank in das Hefegenom.** Nach Insertion eines weiteren Plasmids Ylp5 wird die chromosomale DNA isoliert, mit *NsiI* geschnitten und zirkularisiert. Mit einem entsprechenden Primer kann ein Teil des chromosomalen DNA-Abschnitts, in den die Genbank sich inseriert hatte, sequenziert werden.



### 3.1.4 Deletion von *YLR143w* und *ERG4*

Die Deletion der Gene *YLR143w* und *ERG4* wurde nach der in Abschnitt 2.22 beschriebenen Methode durchgeführt. Für die PCR-Synthese der *kanMX*-Deletionskassetten wurden die Oligonukleotidpaare S1YLR143/ S2YLR143 und S1-ERG4/S2-ERG4 bzw. für die Überprüfung der Deletionen die Oligonukleotide a1YLR143/a4YLR143; a1-ERG4/a4-ERG4 sowie k2kanMX/k3kanMX eingesetzt (Tabelle 8). Die daraus resultierenden Stämme EBY.S7  $\Delta ylr143$  und EBY.S7  $\Delta erg4$  (SDY.022) wurden zur Kontrolle mit dem Plasmid YEpH2-rGLUT4 transformiert und das Wachstum auf Medium mit 0,2% und 2% Glukose als Kohlenstoffquelle untersucht. Deutliches Wachstum konnte nur im *erg4*-Deletionsstamm beobachtet werden, welcher in weiteren Versuchen mit SDY.022 bezeichnet wird. Das *ERG4*-Gen kodiert für eine Sterol-C-24(28)-Reduktase, welche den letzten Schritt der Ergosterolbiosynthese katalysiert. Durch *in vitro* Messungen der Erg4-Aktivität in subzellulären Fraktionen und *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, daß Erg4 eine Komponente des endoplasmatischen Retikulums ist und nicht in Lipidpartikeln vorkommt. Aufgrund der angenommenen acht Transmembranregionen nimmt man an, daß Erg4 in der Bilayermembran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist. Eine Deletion des *ERG4*-Gens hat zur Folge, daß der entsprechende Hefestamm kein Ergosterol mehr produziert und es zu einer Akkumulation der Vorstufe Ergosta-5,7,22,24(28)-Tetraen-3 $\beta$ -ol in der Zelle kommt (Zweytick *et al.*, 2000). Da die Expression von Erg4 nicht essentiell für die Lebensfähigkeit von Hefezellen ist, führt eine Deletion des Gens auch nicht zur Sterolauxotrophie (Chen *et al.*, 1991; Lai *et al.*, 1994; Lees *et al.*, 1995). Ergosterol ist der Hauptbestandteil der Plasmamembran der Hefe und hat einen Einfluß auf die Membranpermeabilität, Fluidität und die Aktivität membrangebundener Proteine (Cobon und Haslam, 1973; Lees *et al.*, 1979; 1989; Bard *et al.*, 1978; Kleinhans *et al.*, 1979).

### 3.1.5 Deletion weiterer *ERG*-Gene zur Klärung der Ergosterolfunktion

Es stellte sich nun die Frage, inwieweit sich eine Deletion des Gens *ERG4* bzw. ein Fehlen der Erg4 Sterolreduktase auf die Aktivität von GLUT4 ausüben konnte. Es wäre denkbar, daß das Enzym Erg4 einen direkten Einfluß auf den Transporter GLUT4 ausübt bzw. auf seine Translokation zur Plasmamembran. Es wäre aber auch möglich, daß das Syntheseprodukt Ergosterol, welches über 90% des Membransterols in der Hefe ausmacht, einen hemmenden Einfluß auf die Funktion des GLUT4-Transporters in der Plasmamembran hat. Ob das Ergosterol einen Einfluß hat, wurde in einem *erg5*-Deletionsstamm untersucht, welcher ebenfalls kein Ergosterol synthetisieren kann. *ERG5* kodiert für das vorletzte

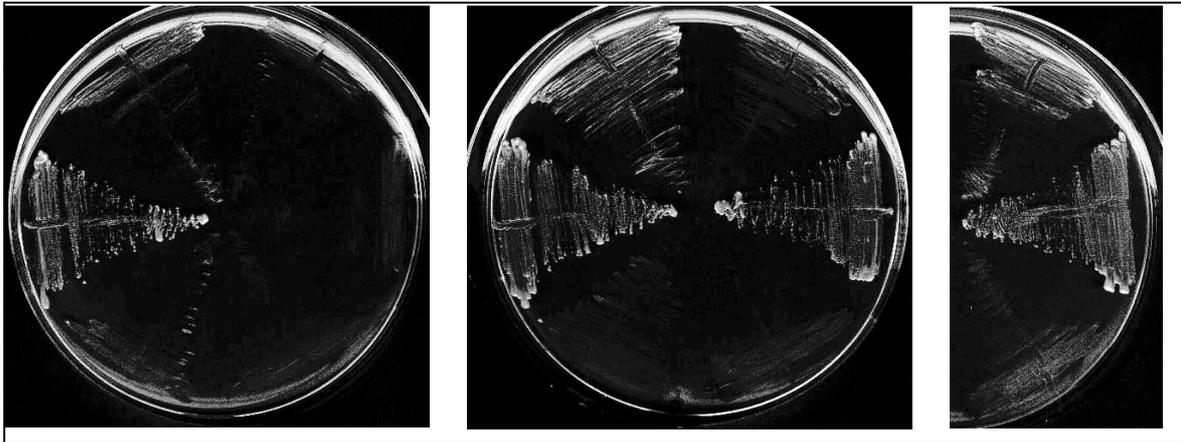
Enzym der Ergosterolbiosynthese und durch ein Fehlen dieses Enzyms akkumuliert sich die Sterolvorstufe Ergosta-5,7-Dienol in der Plasmamembran (Smith *et al.*, 1996). Sollte jedoch Ergosterol einen hemmenden Einfluß haben, müßte GLUT4 in einem *erg5*-Deletionsstamm aktiv sein. Die PCR-Synthese der *kanMX*-Deletionskassette wurde mit dem Oligonukleotidpaar S1-ERG5/S2-ERG5 durchgeführt und die Überprüfung der Deletion mit den Oligonukleotiden a1-ERG5/a4-ERG5; a2ERG5/a3ERG5 sowie k2kanMX/k3kanMX. Der GLUT4-Transporter war in dem daraus resultierenden Stamm EBY.S7  $\Delta$ *erg5* (SDY.024) nicht aktiv. Dieser Stamm produzierte zwar kein Ergosterol mehr, besaß allerdings noch das Gen *ERG4*, das für die Sterolreduktase kodiert. Ein *erg4erg5*-Doppeldelentionsstamm wurde konstruiert, um zu zeigen, ob vielleicht doch das Protein Erg4 einen direkten Einfluß auf die GLUT4-Aktivität hat. Die PCR-Synthese der *HIS3MX*-Deletionskassette wurde mit dem Oligonukleotidpaar S1-ERG4/S2-ERG4 und dem Plasmid pFA6a-HIS3MX als Vorlage durchgeführt. Die Deletion des *ERG4*-Gens wurde in dem *erg5*-Deletionsstamm SDY.024 durchgeführt und mit den Oligonukleotiden seqHIS/a4-ERG4 überprüft. Der *erg4erg5*-Doppeldelentionsstamm zeigte überraschenderweise wieder Wachstum mit GLUT4 auf glukosehaltigem Medium und wird im folgenden mit SDY.026 bezeichnet. Die Deletion der Gene *ERG3* und *ERG6* mit den Oligonukleotiden S1-ERG3/S2-ERG3 und S1-ERG6/S2-ERG6 war nach mehrfachen Versuchen nicht möglich. Die Überprüfung der Transformanten mit den Oligonukleotiden a1-ERG3/a2-ERG3 und a1-ERG6/a4-ERG6 ergab in allen Fällen nur die Wildtypsituation. Das Wachstum der verschiedenen Ergosterolmutanten mit GLUT4 auf Glukosemedium ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. Zum Vergleich wurde auch das Wachstum der Mutanten mit GLUT1 getestet.

**Tab. 9: Wachstumsverhalten der Stämme EBY.VW.4000, EBY.S7, SDY.022, SDY.024 und SDY.026 auf synthetischem Komplettmedium ohne Tryptophan und mit 0,1% Glukose als Kohlenstoffquelle.** Die Zellen wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert. (+) gutes Wachstum, (+/-) mäßiges Wachstum, (-) kein Wachstum.

Stamm	Genotyp	Plasmid	Wachstum 0,1% Glukose
EBY.VW4000	<i>hxt<sup>-</sup> FGY1</i>	YEplac112	-
		YE $\phi$ H2-rGLUT1	-
		YE $\phi$ H2-rGLUT4	-
EBY.S7	<i>hxt<sup>-</sup> fgy1-1</i>	YEplac112	-
		YE $\phi$ H2-rGLUT1	+
		YE $\phi$ H2-rGLUT4	-

SDY.022	<i>hxt<sup>-</sup> fgy1-1 Δerg4</i>	YEplac112	-
		YE $\rho$ H2-rGLUT1	+
		YE $\rho$ H2-rGLUT4	+
SDY.024	<i>hxt<sup>-</sup> fgy1-1 Δerg5</i>	YEplac112	-
		YE $\rho$ H2-rGLUT1	+
		YE $\rho$ H2-rGLUT4	-
SDY.026	<i>hxt<sup>-</sup> fgy1-1 Δerg4Δerg5</i>	YEplac112	-
		YE $\rho$ H2-rGLUT1	+
		YE $\rho$ H2-rGLUT4	+/-

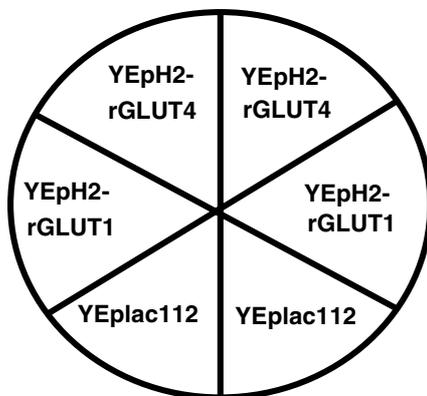
Abb. 7: Wachstumsverhalten der Stämme EBY.S7, EBY.VW.4000, SDY.022, SDY.024, SDY.026 auf Agarplatten mit synthetischem Komplettmedium ohne Tryptophan und mit 0,1% Glukose als Kohlenstoffquelle. Die Zellen wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert.



*Δhxt1-17 fgy1-1 Δhxt1-17*

*Δhxt1-17 fgy1-1 Δerg4*     *Δhxt1-17 fgy1-1 Δerg5*

*Δhxt1-17 fgy1-1 Δerg4Δerg5*



### 3.1.5.1 Gaschromatographische Analyse der Ergosterol-Deletionsmutanten

Um tatsächlich ausschließen zu können, daß die Ergosterolmutantenstämme kein Ergosterol mehr produzieren, wurden die Membransterole der Ergosterol-Deletionsmutanten und eines Wildtypstammes isoliert, verseift und gaschromatographisch je nach Siedepunkt aufgetrennt (Abschnitt 2.25 und 2.26). Als interner Standard wurde den Isolaten bei der Präparation Cholesterol zugesetzt. Die Auftrennung der Sterole ist in folgender Abbildung dargestellt.

**Abb. 8: Gaschromatographische (GC) Auftrennung der aus Hefe isolierten Membransterole nach Siedepunkt.** Die flüssigen Hefekulturen wurden für 49 h bei 30°C auf einem Schüttelinkubator bis zur stationären Wachstumsphase inkubiert. Es wurden 175 OD<sub>600</sub>-Einheiten geerntet und die Sterole daraus isoliert. GC beschrieben unter Abschnitt „Methoden“ A) Stamm EBY.S7 (rot) im Vergleich zu Stamm SDY.022 ( $\Delta erg4$ ) (grün). B) Stamm SDY.024 ( $\Delta erg5$ ) (grün) im Vergleich zu Stamm SDY.026 ( $\Delta erg4 \Delta erg5$ ) (rot). Peak 1: Squalen, 2: Cholesterol, 3: Ergosterol, 4: Ergosterol-Vorstufe (Ergostatetraenol), 5: Ergosterol-Vorstufen (Ergostatrienol/Ergostadienol).

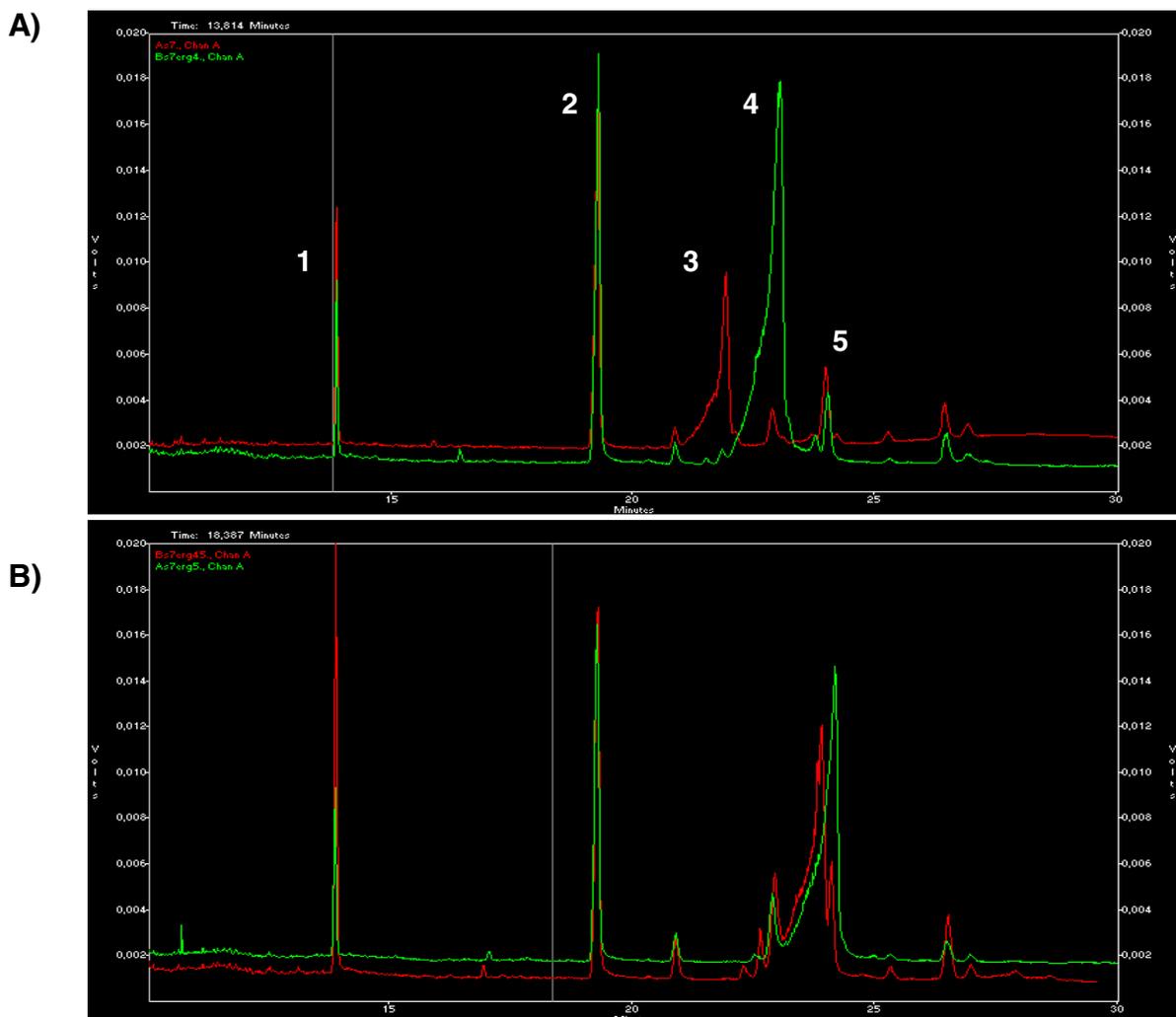


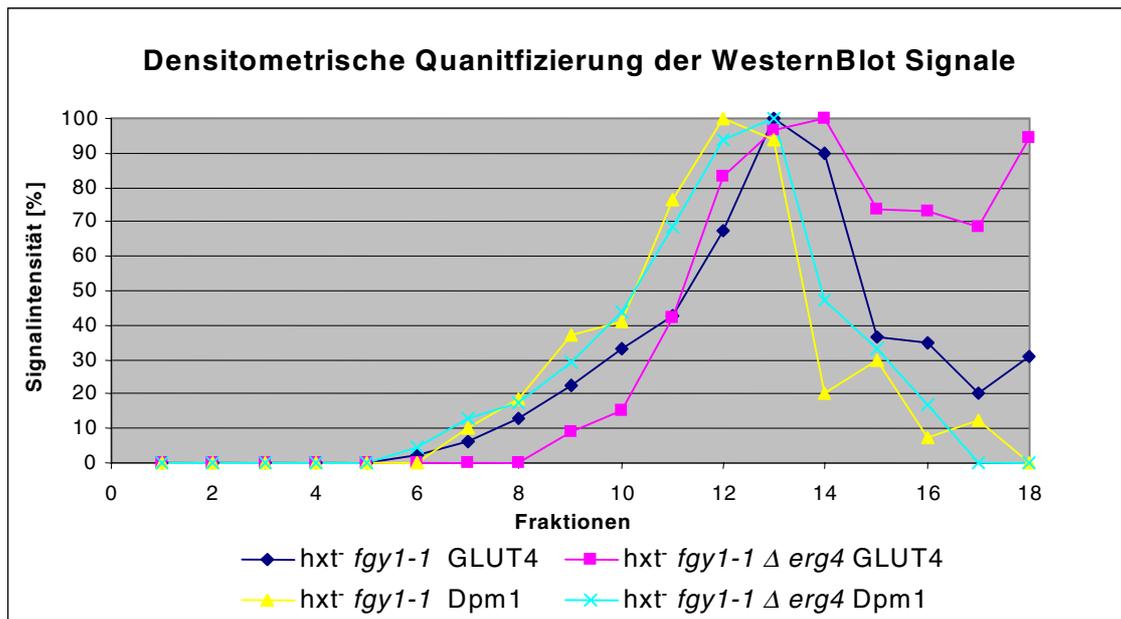
Abbildung 8 zeigt die gaschromatographische Auftrennung der Membransterole der Stämme EBY.S7, SDY.022, SDY.024 und SDY.026. Die Peaks 2 (Cholesterol) und 3 (Ergosterol) konnten mit Hilfe von entsprechenden Standards zugeordnet werden, die Peaks 1 (Squalen), 4 und 5 wurden mit Hilfe von vergleichbaren Chromatogrammen aus der Literatur zugeordnet (Le Fur *et al.*, 1999; Baudry *et al.*, 2001; Gachotte *et al.*, 2001; Darnet *et al.*, 2001). Die Chromatogramme belegen eindeutig, daß Ergosterol nur in dem Wildtypstamm gebildet wurde, der alle Gene der Ergosterolbiosynthese besaß. Bereits die Deletion eines der *ERG*-Gene führt dazu, daß sich bestimmte Ergosterolvorstufen ansammeln und das Endprodukt Ergosterol nicht mehr gebildet wird. Das Chromatogramm des Stammes SDY.022 läßt sehr gut erkennen, daß durch die Deletion des Gens *ERG4* kein Ergosterol gebildet wurde, es jedoch zu einer Akkumulation der direkten Vorstufe kam. Der *erg5*-Deletionsstamm und der *erg4erg5*-Doppeldeletionsstamm zeigten fast identische Chromatogramme, auch hier war eindeutig kein Ergosterol-Peak zu erkennen. Die Peaks der akkumulierten Vorstufen zeigten eine leichte Verschiebung, was darauf hindeutet, daß sich in diesen Stämmen nicht die gleichen Ergosterolvorstufen ansammeln. Man hätte vermutet, daß sich in beiden Stämmen Ergostatrienol ansammelt, da in beiden Fällen *ERG5* deletiert war. Wie bereits in der Literatur bestätigt, verläuft die Ergosterolbiosynthese nicht linear. Das bedeutet, daß das Ergostatrienol in einem *erg5*-Deletionsstamm durch die Sterolreduktase Erg4 weiter zu Ergostadienol umgewandelt wird (Smith *et al.*, 1996). Dieser Versuch hat gezeigt, daß es keinen direkten Einfluß von Ergosterol auf GLUT4 gibt, da auch die *erg5*-Deletionsmutante, in welcher GLUT4 nicht funktionell exprimiert wird, kein Ergosterol bildet.

### 3.1.6 Intrazelluläre Lokalisierung von GLUT4

Nachdem die Lokalisierung des Transporterproteins GLUT4 bereits in früheren Versuchen durch eine Fusion des grünfluoreszierenden Proteins GFP in intrazellulären Strukturen gezeigt werden konnte (Wieczorke 2001), sollte nun gezeigt werden, wie sich die intrazelluläre Lokalisierung bzw. Verteilung von GLUT4 in einer *erg4*-Deletionsmutante verhält. Hierzu wurden Fraktionierungsexperimente durchgeführt. Es wurden Zellextrakte aus Kulturen, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, mit Saccharosegradienten fraktioniert und das Verteilungsmuster von GLUT4 mit dem der Markerproteine Dpm1 (Dolichol-P-Mannosyltransferase) und Pep12 (endosomales Syntaxin) durch anschließendes Western-Blotting verglichen. Dpm1 ist ein ca. 30 kDa großes Protein, welches in der Hefe in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist und Pep12 ist ein ca. 37 kDa großes Protein der späten Endosomen. Es wurden



B)



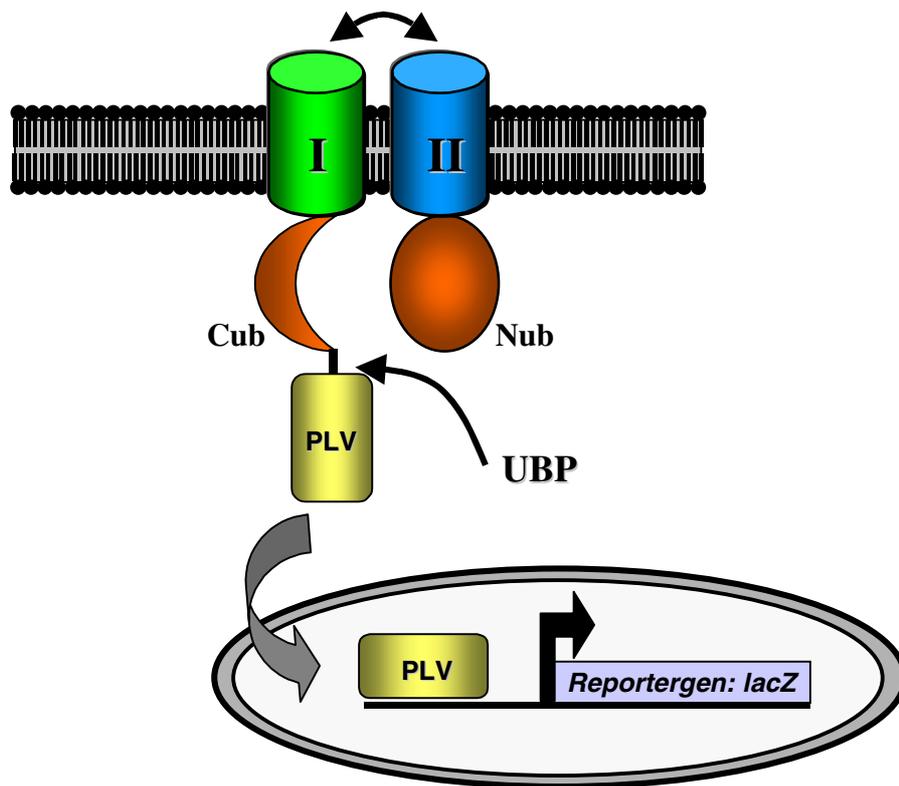
### 3.2 Interaktionsstudien mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems (SUS)

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit sollte ein auf dem Split-Ubiquitin-System basierender Genbankscreen in Hefe sein, in dem mit cDNA aus menschlichem Skelettmuskelgewebe nach Proteinen gesucht werden sollte, die mit GLUT4 interagieren. In Two-Hybrid-Experimenten und mit Ko-Immunopräzipitationsexperimenten konnten bereits Proteine gefunden werden, die mit dem C-Terminus von GLUT4 interagieren. Dazu gehört die Fruktose-1,6-bisphosphataldolase, das Sentrin konjugierende Enzym Ubc9 und Daxx (death-associated protein), ein mit dem Fas-Rezeptor und dem Typ II TGF- $\beta$  Rezeptor assoziiertes Protein (Kao *et al.*, 1999; Giorgino *et al.*, 2000; Lalioti *et al.*, 2002). Weitere noch unbekannte mit GLUT4 interagierende Proteine könnten Aufschluß über die Vermittlung des Insulinsignals an die vesikulären GLUT4-Speicherkompartimente in Säugerzellen geben.

Proteine und ihre jeweilige Aufgabe im zellulären Ablauf lassen sich am besten untersuchen und verstehen, wenn man mögliche Interaktionspartner nachweisen kann. Eine in der Hefe sehr beliebte Methode ist das Two-Hybrid-System für die *in vivo* Analyse von Protein-Protein-Interaktionen (Bartel und Fields, 1995), jedoch ist diese Methode beschränkt auf die Analyse löslicher Proteine bzw. löslicher Proteindomänen, da der Nachweis direkt im Zellkern stattfindet. Die Interaktion zwischen integralen Membranproteinen läßt sich mit dieser Methode nicht nachweisen, da sie nicht in den Zellkern gelangen können. Eine gute Alternative

stellt das Split-Ubiquitin-System dar (Johnsson und Varshavsky; 1994a; 1994b; Varshavsky, 1997b; Stagljar *et al.*, 1998). Ubiquitin ist ein konserviertes Protein aus 76 Aminosäuren, welches normalerweise als Abbausignal an den N-Terminus von Proteinen fusioniert wird. Neu synthetisierte Ubiquitin(Ub)-Fusionsproteine werden unmittelbar nach ihrer Synthese von den Ub-spezifischen Proteasen (UBP's) erkannt und hinter der letzten Aminosäure des Ubiquitins an der Ubiquitin-Polypeptid-Verbindung geschnitten. Diese Reaktion erfordert allerdings eine korrekte Konformation des Ubiquitins. Wird die C-terminale Hälfte des Ub (Reste 35-76, Cub) als Fusion mit einem Reporterprotein exprimiert (Cub-PLV), so erfolgt die Abspaltung des Reporters nur dann, wenn in derselben Zelle die N-terminale Hälfte des Ub (Reste 1-37, Nub) koexprimiert wird. Die Effizienz der Reassoziaton beider Ubiquitinhälften wird herabgesetzt, wenn anstelle des nativen Nub ausgesuchte Nub-Mutationen eingesetzt werden, die nur noch schwach an Cub binden. Werden Cub und eine Nub-Mutante an zwei Proteine fusioniert, die miteinander interagieren, erhöht sich die lokale Konzentration der Ub-Peptide, die Reassoziaton zum Ubiquitin wird gefördert und das Reporterprotein wird effizient vom Cub abgespalten. Ein mögliches Reporterprotein ist das PLV, das sich aus dem ProteinA, der DNA-Bindedomäne LexA und dem Transkriptionsaktivator VP16 zusammensetzt. Das abgespaltene PLV gelangt in den Zellkern und aktiviert dort z.B. *lacZ*- oder *HIS3*-Reporter Gene. Die Interaktion kann dann durch Messung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität oder durch Wachstum auf Medium ohne Histidin nachgewiesen werden.

**Abb. 10: Schematische Darstellung des „Split-Ubiquitin-Systems“.** Das System dient dem Nachweis der Interaktion zweier Membranproteine bzw. eines Membranproteins mit einem cytosolischen Protein. Die zu untersuchenden Proteine werden mit je einer Hälfte des Ubiquitinmoleküls fusioniert, wobei an die C-terminale Hälfte ein Reporterprotein PLV (ProteinA, LexA, VP16) fusioniert ist. Cub = C-terminale Ubiquitinhälfte, Nub = N-terminale Hälfte. Bei Interaktion der Membranproteine wird die Reassoziierung der Ubiquitinhälften von einer ubiquitinspezifischen Protease (UBP) erkannt und das Reporterprotein abgespalten. Dieses gelangt in den Zellkern und aktiviert dort Reportergene (z.B. *lacZ*-Gen, *HIS3*-Gen).



Ein weiteres Reporterprotein ist das Hefeprotein Ura3, welches an der Uracilbiosynthese beteiligt ist und an seinem N-Terminus mit einem Abbausignal (Argininrest) versehen wird (RUra3p) (Wittke *et al.*, 1999; 2000). Wird das Reporterprotein nach erfolgter Reassoziierung der Ubiquitinhälften abgespalten, wird das Arginin am N-Terminus freigelegt und das RUra3 nach der N-End-Regel effizient abgebaut (Varshavsky, 1997a). Die Zellen werden phänotypisch Uracil-auxotroph und können auf Nährmedium ohne Uracil nicht mehr wachsen. Da 5-Fluor-Orotsäure (5-FOA) von Ura3 in das toxische 5-Fluor-Uracil umgewandelt wird, kehrt sich die Situation auf Medien, die 5-FOA enthalten, um. Eine Reassoziierung der Ubiquitinhälften führt zum Überleben der Zellen, während Zellen, die hauptsächlich ungeschnittenes Cub-RUra3 enthalten, auf FOA-haltigem Medium sterben.

### 3.2.1 Etablierung und Optimierung des Split-Ubiquitin-Systems (SUS)

Die Überprüfung und Etablierung des Split-Ubiquitin-Systems wurde in unserem Labor zuvor mit GLUT4, GLUT1 und hefeeigenen Hexosetransportern durchgeführt. Hierfür war es notwendig, die bereits für das System existierenden Vektoren entsprechend zu modifizieren und für den Nachweis geeignete Hefestämme zu konstruieren.

#### 3.2.1.1 Konstruktion geeigneter Hefestämme für das SUS-System

Eine Voraussetzung für den Interaktionsnachweis mittels des Split-Ubiquitin-Systems war ein genetisch veränderter Hefestamm, der das jeweilige Reporter-gen in das Genom integriert hatte. Ein *GAL1::lacZ*-Fusionsplasmid (pLexA(ox5)), welches 167 bp vor dem Transkriptionsstart 5 *lexA*-Operatorregionen besitzt, wurde zur Integration in das Hefegenom über eine *StuI*-Restriktionsstelle im *URA3*-Gen linearisiert. Dieses linearisierte Integrationsplasmid wurde über homologe Rekombination in den *ura3-52*-Locus der Hefestämme EBY.F4-1, EBY.F4-4, EBY.F4-7 und SDY.022 inseriert. Eine Interaktion konnte in diesen Stämmen insofern nachgewiesen werden, als daß das Reporterprotein PLV in den Zellkern gelangen und dort durch Bindung an die *lexA*-Operatorregionen das *lacZ*-Gen aktivieren konnte.

#### 3.2.1.2 Konstruktion der SUS-Plasmide

Zum Nachweis der Interaktion mußte ein Teil der Proteine N-terminal mit Nub fusioniert und ein Teil C-terminal mit Cub-PLV bzw. Cub-RURA3 fusioniert in der Zelle vorliegen. Hierzu sind die für das System ursprünglich konstruierten Vektoren, die uns freundlicherweise von Dr. Stephan te Heesen zur Verfügung gestellt wurden, modifiziert worden. Das Gen *ALG5* der Plasmide pNub-WT-ALG5 bzw. pNub-G-ALG5 sowie das mutierte Gen *wbp1* des Insertionsplasmides pRS305( $\Delta$ wbp1-Cub-ProtA-LexA-VP16) wurden in *in vivo* Klonierungen gegen die Gene der zu untersuchenden Proteine ausgetauscht. Ein geeigneter CubURA3-Vektor war das Plasmid pRS313-STE2, welches freundlicherweise aus der Arbeitsgruppe Kölling (Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurde.

Das *GLUT4*-Gen wurde in einer PCR-Reaktion mit dem Oligonukleotidpaar GLT4NUB/GLT4NUB2 und dem Plasmid YEp4H7-hsGLUT4 als Vorlage amplifiziert. Die Primer binden im Bereich des Start- und Stopkodons des *GLUT4*-Gens und besitzen homologe Sequenzen zum Promotor- und Terminationsbereich der

Plasmide pNub-WT-ALG5 bzw. pNub-G-ALG5. Die PCR-Produkte wurden über homologe Rekombination in der Hefe in die zuvor mit *XhoI*, *BglII* und *SacI* geschnittenen und linearisierten Nub-Plasmide hinter deren *CUP*-Promotor kloniert. Die so entstandenen Plasmide **pNub-WT-hsGLUT4** und **pNub-G-hsGLUT4** wurden aus Hefe isoliert, in *E. coli* amplifiziert und überprüft und für anschließende Interaktionstests verwendet. In einer zweiten PCR-Reaktion wurde das *GLUT4*-Gen mit dem verkürzten *HXT7*-Promotor mit dem Oligonukleotidpaar GLT4CUB1/ GLT4CUB und dem Plasmid YEp4H7-hsGLUT4 als Vorlage so amplifiziert, daß es kein eigenes Stopkodon enthielt und direkt als Fusion „in frame“ vor die Cub-PLV-Sequenz des Plasmids pRS305 kloniert werden konnte. Das PCR-Produkt wurde mit *Sall* an seinen Enden geschnitten und über Ligation in den mit *XhoI* geschnittenen Vektor pRS305 kloniert. Das resultierende Insertionsplasmid pRShsGLUT4-CubPLV sollte im *LEU2*-Selektionsmarkergen geschnitten und über homologe Rekombination in den Leucin-Locus des Hefegenoms integriert werden. Da dies nach mehrfachen Versuchen nicht gelang, wurde die komplette Sequenz HXT7hsGLUT4-Cub-PLV des Plasmids pRShsGLUT4-CubPLV in einer PCR-Reaktion mit dem Oligonukleotidpaar RP-HOM/UP-HOM amplifiziert und über homologe Rekombination in Hefe in das Centromerplasmid YCplac111, welches zuvor mit *KpnI*/*BamHI* geschnitten wurde, kloniert. Das resultierende Plasmid **YCpH7hsG4-CubPLV** wurde aus Hefe isoliert, in *E. coli* amplifiziert, über Restriktionskartierung überprüft und für anschließende Interaktionstests verwendet.

Der starke, konstitutive *HXT7*-Promotor (verkürzte Version ohne Mig1-Repressorbindestellen) im Plasmid YCpH7hsG4-CubPLV wurde gegen den regulierbaren *MET25*-Promotor und den schwachen *FGY1*-Promotor ausgetauscht. In einer PCR-Reaktion wurde der Bereich des *MET25*-Promotors mit dem Oligonukleotidpaar MetGlt4Cub1/MetGlt4Cub2 und dem Plasmid p426 MET25 als Vorlage amplifiziert. Die Primer hatten homologe Sequenzanhänge zu dem Bereich vor dem verkürzten *HXT7*-Promotor und dem *GLUT4*-Gen im Plasmid YCpH7hsG4-CubPLV. Durch die Transformation des PCR-Produktes und des zuvor mit *KpnI* geschnittenen Plasmids YCpH7hsG4-CubPLV in den Stamm EBY.F4-4 entstand über homologe Rekombination das Plasmid **YCpMet25hsG4-CubPLV**. Ebenso sollte das *GLUT4*-CubPLV-Konstrukt von dem schwachen *FGY1*-Promotor reguliert werden. In einer früheren Klonierungsreaktion wurde der verkürzte *HXT7*-Promotorbereich und das *GLUT4*-Gen im Plasmid YCpH7hsG4-CubPLV gegen das Gen *FGY1* samt *FGY1*-Promotorbereich ausgetauscht und es entstand das Plasmid YCpFGY1-CubPLV (D.Voss, 2001). Mit dem Oligonukleotidpaar FGY1hsG4/CUPGLT4URA2 und dem Plasmid YCpH7hsG4-CubPLV als Vorlage

wurde das *GLUT4*-Gen amplifiziert. Die Primer hatten homologe Sequenzanhänge zu dem *FGY1*-Promotorbereich und dem CubPLV-Sequenzbereich des Plasmids YCpFGY1-CubPLV. Durch Transformation des PCR-Produktes und des zuvor mit *XhoI/XbaI* geschnittenen Plasmids YCpFGY1-CubPLV in den Stamm EBY.F4-7 entstand durch homologe Rekombination das Plasmid **YCpFGYhsG4-CubPLV**.

Da ein Teil der Oligonukleotide auch für die Konstruktion geeigneter CubURA3-Plasmide verwendet werden konnte, wurden die CubPLV- und CubURA3-Plasmide mit *GLUT1* und *HXT9* parallel konstruiert. In zwei PCR-Reaktionen wurde mit den Oligonukleotidpaaren p426H7-1/hsG1Cub und CUPhsGLUT1/hsG1Cub und dem Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 als Vorlage das humane *GLUT1*-Gen amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden entsprechend ihrer Sequenzanhänge über homologe Rekombination in dem Stamm EBY.F4-7 *lexA::lacZ::URA3* in das zuvor mit *XhoI* geschnittene Plasmid YCpH7hsG4-CubPLV und in das zuvor mit *EcoRI* geschnittene Plasmid pRS313-STE2 kloniert, aus Hefe isoliert, in *E. coli* amplifiziert und überprüft, so daß die Plasmide **YCpH7hsG1-CubPLV** und **pRShsG1-CubURA** entstanden. Nach dem gleichen Prinzip wurde das hefeeigene *HXT7*-Gen mit den Oligonukleotidpaaren p426H7-1/HXT7Cub und CUPHXT7/HXT7Cub und dem Plasmid YEpKHXT7 als Vorlage amplifiziert und in die Cub-Vektoren kloniert. Nach der Isolation der Plasmide aus Hefe ließen sich diese nicht in *E. coli* amplifizieren. Ebenso wurde das hefeeigene *HXT9*-Gen mit den Oligonukleotidpaaren p426H7-1/HXT9Cub und CUPHXT9/HXT9Cub und dem Plasmid pTHHXT9 als Vorlage amplifiziert und in die Cub-Vektoren kloniert, so daß die Plasmide **YCpH7HXT9-CubPLV** und **pRSHXT9-CubURA** entstanden. Auf diese Weise wurde auch versucht, *GLUT4* in das CubURA3-Plasmid zu klonieren. Das *GLUT4*-Gen wurde mit dem Oligonukleotidpaar CUPGLT4URA1/CUPGLT4URA2 von der Plasmidvorlage YEp4H7-hsGLUT4 amplifiziert und über homologe Rekombination in das Plasmid pRS313-STE2 kloniert. Nach der Isolation aus Hefe und Amplifikation in *E. coli* konnte kein Plasmid YCpHsG4-CubURA isoliert werden.

Nachdem die CubPLV- und CubURA-Plasmide für Interaktionstests der Glukosetransporter *GLUT1* und *Hxt9* konstruiert waren, wurden entsprechende Nub-Konstrukte erstellt. In einer PCR-Reaktion wurde mit dem Oligonukleotidpaar NubGLT1a/NubGLT1b und der Plasmidvorlage YEp4H7-hsGLUT1 das *GLUT1*-Gen amplifiziert. Das PCR-Produkt hatte homologe Sequenzanhänge und konnte über Rekombination in dem Stamm EBY.F4-3 in das zuvor mit *XhoI/BglII/SacI* geschnittene Plasmid pNub-G-ALG5 bzw. pNub-WT-ALG5 kloniert werden und das *ALG5*-Gen ersetzen, so daß die Plasmide **pNub-G-hsGLUT1** und **pNub-WT-**

**hsGLUT1** entstanden. Nach dem gleichen Prinzip wurde auch das *HXT9*-Gen in einer PCR-Reaktion mit dem Oligonukleotidpaar NubHXT9a/NubHXT9b und der Plasmidvorlage pTHHXT9 amplifiziert und in die Plasmide pNub-G-ALG5 bzw. pNub-WT-ALG5 kloniert. Die Plasmide **pNub-G-HXT9** und **pNub-WT-HXT9** wurden aus Hefe isoliert, in *E. coli* amplifiziert und über Restriktionsanalyse überprüft.

Zur Konstruktion geeigneter Erg4-Vektoren wurde das *GLUT4*-Gen im Plasmid YCpH7hsG4-CubPLV und das Gen *ALG5* in den Plasmiden pNub-G-ALG5 und pNub-WT-ALG5 durch das *ERG4*-Gen ersetzt. In zwei PCR-Reaktionen wurde *ERG4* mit den Oligonukleotidpaaren ERG4Cub1/ERG4Cub2 und NubERG4a/NubERG4b mit genomischer DNA als Vorlage amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden mit den zuvor linearisierten Plasmiden YCpH7hsG4-CubPLV bzw. pNub-G-ALG5 und pNub-WT-ALG5 in den Stamm VW1A transformiert und über homologe Rekombination der entsprechenden Sequenzanhänge wurden die Plasmide **YCpH7ERG4-CubPLV**, **pNub-G-ERG4** und **pNub-WT-ERG4** kloniert.

Die Gene *HXT1* und *SHR3* wurden mit den Oligonukleotidpaaren HXT1Cub1/HXT1Cub2 und SHR3Cub1/SHR3Cub2 in einer PCR-Reaktion mit genomischer DNA als Vorlage amplifiziert und mit dem linearisierten Plasmid YCpH7hsG4-CubPLV in den Stamm VW1A transformiert. Die Klonierung erfolgte über homologe Rekombination, wobei das *GLUT4*-Gen gegen die entsprechenden Gene ausgetauscht wurde. Die Plasmide **YCpH7HXT1-CubPLV** und **YCpH7SHR3-CubPLV** wurden aus Hefe isoliert, in *E. coli* amplifiziert und über Restriktionsanalyse überprüft.

Nach der Konstruktion der SUS-Plasmide wurden diese zum Teil auf Funktionalität überprüft. Das bedeutet, die Glukosetransporter GLUT4, GLUT1, Hxt9 und Hxt1 sollten trotz C- und N-terminaler Fusionen noch in der Lage sein, Glukose zu transportieren. Die Funktionalität wurde mit unterschiedlichen Glukosekonzentrationen gemessen, da die untersuchten Transporter verschiedene Substrataffinitäten besitzen.

**Tab. 10: Funktionalitätstest der SUS-Plasmide, die Gene für Glukosetransporter tragen.** Die hexosetransport-defizienten Stämme EBY.F4-7 und SDY.028 wurden mit den SUS-Plasmiden transformiert und auf synthetischem Medium mit den angegebenen Glukosekonzentrationen ausgestrichen. Die C- und N-terminalen Fusionen sollten die Transporteigenschaften nicht beeinflussen. (-) kein Wachstum, (+) Wachstum, (++) sehr gutes Wachstum, (n.d.) nicht getestet.

---

**Stamm EBY.F4-7**

<b>Plasmide</b>	<b>0,2% Glukose</b>	<b>2% Glukose</b>
YCpH7hsG4-CubPLV	-	-
YCpH7hsG1-CubPLV	n.d.	-
YCpH7HXT9-CubPLV	n.d.	++
pNub-G/WT-hsGLUT4	+	-
pNub-G/WT-hsGLUT1	++	n.d.
pNub-G/WT-HXT9	++	++

---



---

**Stamm SDY.028**

<b>Plasmide</b>	<b>0,2% Glukose</b>	<b>1% Glukose</b>
YCpH7hsG4-CubPLV	+	-
YCpH7hsG1-CubPLV	++	++
YCpH7HXT1-CubPLV	-	++

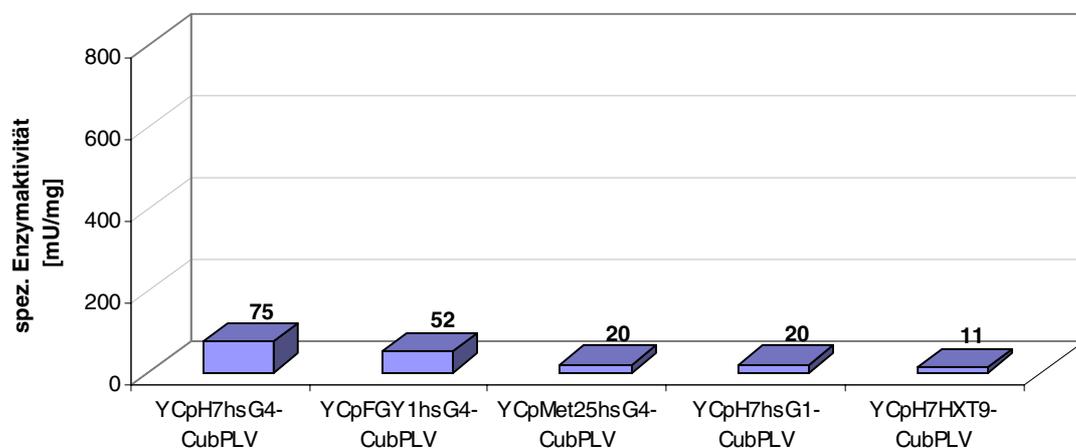
---

Die Wachstumstests haben gezeigt, daß die N-terminale Fusion in den Nub-Konstrukten keine negativen Auswirkungen auf die Glukosetransporteigenschaften von GLUT4, GLUT1 und Hxt9 hatte. Die Transformanten zeigten eindeutig Wachstum auf glukosehaltigem Medium. Auch die C-terminale Fusion in den Cub-Konstrukten hatte keinen negativen Einfluß auf die Glukosetransporter Hxt9 und Hxt1 in den untersuchten Stämmen. Die Glukosetransporteigenschaft der GLUT1- und GLUT4-Cub-Fusionsproteine konnte nur im Stamm SDY.028 bestätigt werden. Im Stamm EBY.F4-7 konnte mit den Plasmiden YCpH7hsG1-CubPLV und YCpH7hsG4-CubPLV kein Wachstum auf Glukosemedium beobachtet werden.

### 3.2.1.3 Unterschiedliche Hintergrundaktivität der Cub-Plasmide

Während der Etablierung des Split-Ubiquitin-Systems konnte beobachtet werden, daß bereits die Transformation des Plasmids YCpH7hsG4-CubPLV ohne die entsprechenden Nub-Plasmide ausreichte, das *lacZ*-Reporter gen zu aktivieren. Es stellte sich die Frage, weshalb das Reporterprotein abgespalten werden konnte, wenn es aufgrund eines fehlenden Nub-Konstruktes nicht zur Reassoziaton beider Ubiquitinhälften kommen konnte. Es wäre denkbar, daß aufgrund des starken *HXT7*-Promotors zu viele GLUT4-CubPLV-Fusionsproteine konstitutiv exprimiert wurden und ein Teil der Proteine durch natürlichen Abbau in der Zelle degradiert wurden. Dabei könnte es zur Freisetzung des Reporterproteins gekommen sein, welches in den Zellkern gelangen und das *lacZ*-Gen aktivieren konnte. Durch die Verwendung schwächerer bzw. regulierbarer Promotorbereiche sollte die Hintergrundaktivität bzw. ein Abspalten des Reporters ohne eine Cub/Nub-Reassoziaton vermieden werden. Die Hintergrundaktivität der GLUT4-CubPLV-Plasmide mit unterschiedlichen Promotorbereichen wurde sowohl qualitativ mit X-Gal-Overlays (Daten identisch, daher nicht gezeigt) als auch quantitativ bestimmt und mit der Hintergrundaktivität der HXT9-CubPLV- bzw. GLUT1-CubPLV-Konstrukte verglichen.

**Abb. 11: Quantitative  $\beta$ -Galaktosidase messung zur Bestimmung der Hintergrundaktivität verschiedener CubPLV-Plasmide in dem Stamm SDY.015.** Die Zellen wurden 5 h bei 30°C in synthetischem Komplettmedium mit 1% Maltose ohne Zugabe von Leucin rangezogen und wie in Abschnitt 2.20.1 beschrieben behandelt. Die Hintergrundaktivität ist durch die erhöhte spezifische Enzymaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase dargestellt und in mU/mg angegeben.



Anhand der Ergebnisse der quantitativen Messung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität ist eindeutig zu erkennen, daß die Hintergrundaktivität der Transformanten mit dem Plasmid YCpH7hsG4-CubPLV mit 75 mU/mg am höchsten ist. Obwohl der *FGY1*-Promotor deutlich schwächer ist als der verkürzte *HXT7*-Promotor, ist auch in den Transformanten mit dem Plasmid YCpFGYhsG4-CubPLV eine relativ hohe Hintergrundaktivität zu beobachten. Die Transformanten mit dem regulierbaren *MET25*-Promotor zeigten sowohl auf Medium mit als auch ohne Methionin die gleiche geringe Hintergrundaktivität, weshalb hier nur ein Ergebnis gezeigt ist. Trotz des starken *HXT7*-Promotors waren die Hintergrundaktivitäten der Transformanten mit den GLUT1- und HXT9-CubPLV-Plasmiden eindeutig geringer.

### 3.2.2 Interaktion zwischen GLUT-Transportproteinen

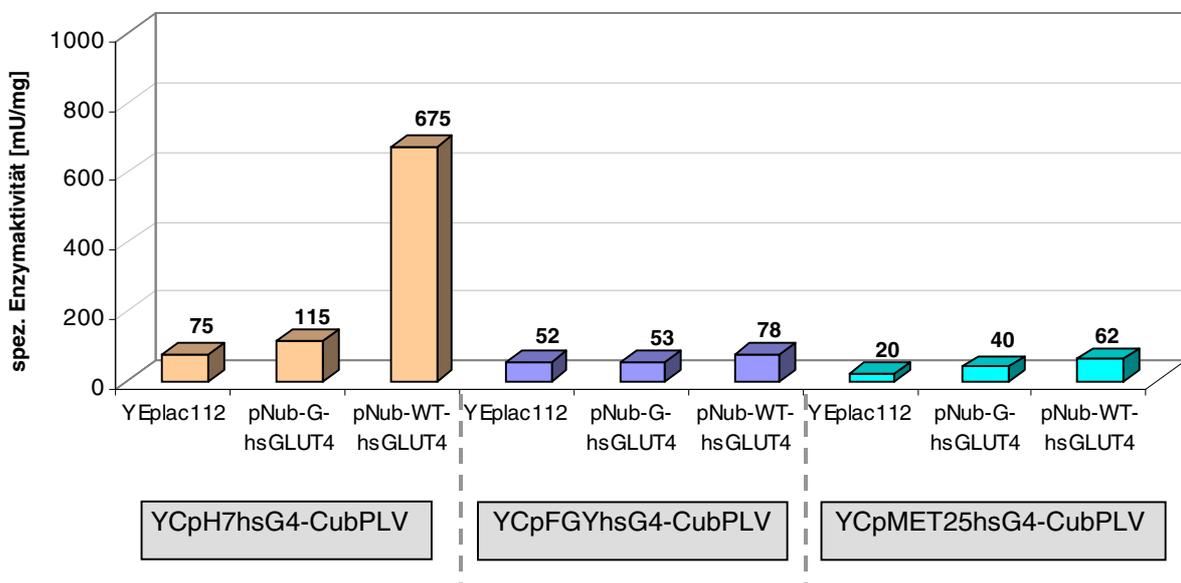
Es ist bereits mehrfach publiziert, daß Transportproteine, wie zum Beispiel die Proteine der ABC-Transporter als Homodimere oder sogar als Homotetramere in der Membran vorliegen und einen Transportkanal aus mehreren Untereinheiten formen können. Es konnte bereits für den Erythrozyten Zuckertransporter GLUT1 gezeigt werden, daß er einen allosterischen, oligomeren Komplex aus vier GLUT1-Untereinheiten bildet (Hebert & Carruthers, 1991; 1992). Dabei wird die GLUT1-Tetramerisierung durch eine einzelne intramolekulare Disulfidbrücke vermittelt (Zottola *et al.*, 1995). Sollten die GLUT1-Transportproteine, wie in der Literatur bereits dokumentiert, auch in der Hefe als Homodimere vorliegen, müßte man eine Interaktion zweier GLUT1-Proteine mit dem Split-Ubiquitin-System nachweisen können. Ebenso sollte mit diesem System gezeigt werden, ob vielleicht auch zwei GLUT4-Proteine miteinander interagieren und einen homodimeren Transportkanal bilden.

#### 3.2.2.1 Bestimmung der GLUT4/GLUT4-Interaktion

Zur Bestimmung der Interaktion zwischen zwei GLUT4-Proteinen wurden die verschiedenen GLUT4-CubPLV-Plasmide zusammen mit den Nub-GLUT4-Plasmiden in den Stamm EBY.F4-7 *lexA::lacZ::URA3* (SDY.015) transformiert. Es sollte getestet werden, inwieweit die unterschiedlichen Promotoren in den Cub-Plasmiden die Interaktion beeinflussen konnten. Als Negativ- bzw. Hintergrundaktivitätskontrolle wurden die Cub-Plasmide ohne entsprechendes Nub-Plasmid transformiert und als Positivkontrolle dienten die Nub-Plasmide mit der Wildtypversion des Ubiquitins. Die Interaktion wurde zuerst mit X-Gal-Overlays (Daten

nicht gezeigt) getestet und anschließend durch quantitative  $\beta$ -Galaktosidase-messungen bestätigt. Das Ergebnis ist folgendem Diagramm zu entnehmen.

**Abb. 12: Quantitative  $\beta$ -Galaktosidase-messung zur Bestimmung der Interaktion zwischen zwei GLUT4-Proteinen, die durch verschieden starke Promotorbereiche reguliert werden.** Durch die Farben der Balken sollen die unterschiedlichen Promotorbereiche der Cub-Plasmide verdeutlicht werden (Orange = YCpH7hsG4-CubPLV, Violett = YCpFGYhsG4-CubPLV, Grün = YCpMET25hsG4-CubPLV). Die Zellen wurden 5 h bei 30°C in synthetischem Kompletmedium mit 1% Maltose ohne Zugabe von Leucin und Tryptophan rangezogen und wie in Abschnitt 2.20.1 beschrieben behandelt. Die Proteininteraktion ist durch die erhöhte spezifische Enzymaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase dargestellt und in mU/mg angegeben.



Der Vergleich zeigt deutlich, daß die Konstrukte mit dem schwachen *FGY1*-Promotor und dem regulierbaren *MET25*-Promotor für weitere Tests nicht zu verwenden waren. Die WT-Nub-Konstrukte schienen zwar schwach mit den Cub-PLV-Konstrukten zu interagieren, aber die Positivkontrolle sollte sich deutlicher von der Negativkontrolle hervorheben. Im Fall der Konstrukte mit dem konstitutiv exprimierbaren *HXT7*-Promotor erkennt man zwar den höchsten Wert für die Hintergrundaktivität, aber vergleicht man diesen mit dem Wert der tatsächlichen Interaktion von GLUT4 und dem der Positivkontrolle, so ist die Tatsache der Hintergrundaktivität in weiteren Tests zu vernachlässigen. Weitere Interaktionstests wurden aufgrund dieser Ergebnisse nur noch mit dem starken *HXT7*-Promotor durchgeführt.

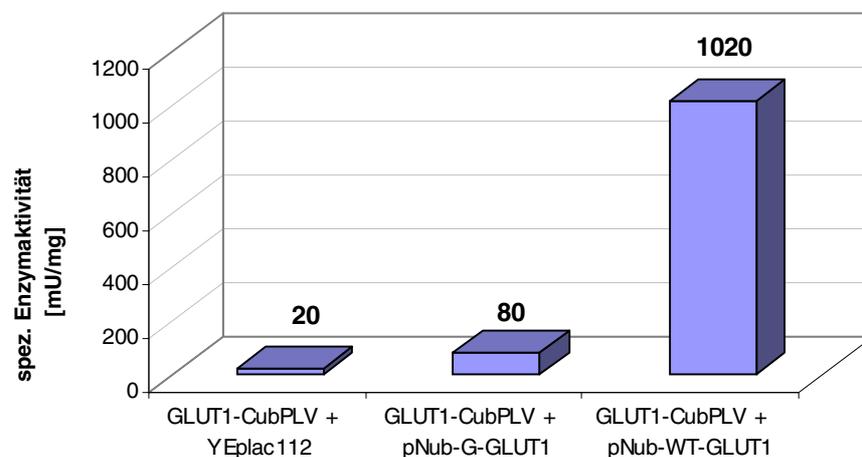
### 3.2.2.2 Bestimmung der GLUT1/GLUT1-Interaktion

Zur Bestimmung der Interaktion zwischen zwei GLUT1-Proteinen wurde das GLUT1-CubPLV-Plasmid zusammen mit den Nub-GLUT1-Plasmiden in den Stamm EBY.F4-7 *lexA::lacZ::URA3* (SDY.015) transformiert. Es sollte getestet werden, ob die GLUT1-Transportproteine auch in der Hefe als Oligomere vorliegen. Als Negativkontrolle wurde das Cub-Plasmid ohne entsprechendes Nub-Plasmid transformiert und als Positivkontrolle diente das Nub-Plasmid mit der Wildtypversion des Ubiquitins. Die Interaktion wurde zuerst mit einem X-Gal-Overlay bestimmt und anschließend durch quantitative  $\beta$ -Galaktosidase-messungen bestätigt.

**Tab. 11: Ergebnis des qualitativen X-Gal-Overlays zu Bestimmung der Interaktion zwischen zwei GLUT1-Proteinen in dem Stamm SDY.015.** Als Positivkontrolle wurde das Plasmid YCpH7hsG1-CubPLV mit dem Nub-Plasmid transformiert, welches die Wildtypversion des Ubiquitins enthielt und als Negativkontrolle mit einem Tryptophan exprimierenden Plasmid.

Plasmide	X-Gal-Farbreaktion
YCpH7hsG1-CubPLV + YEplac112	blau nach ca. 45 min
YCpH7hsG1-CubPLV + pNub-G-hsGLUT1	blau nach ca. 35 min
YCpH7hsG1-CubPLV + pNub-WT-hsGLUT1	blau nach ca. 25 min

**Abb. 13: Quantitative  $\beta$ -Galaktosidasemessung zur Bestimmung der Interaktion zwischen zwei GLUT1-Proteinen in dem Stamm SDY.015.** Die Zellen wurden für 5 h bei 30°C in synthetischem Komplettmedium mit 1% Maltose ohne Zugabe von Leucin und Tryptophan rangezogen und wie in Abschnitt 2.20.1 beschrieben behandelt. Die spezifische Enzymaktivität ist in mU/mg angegeben.

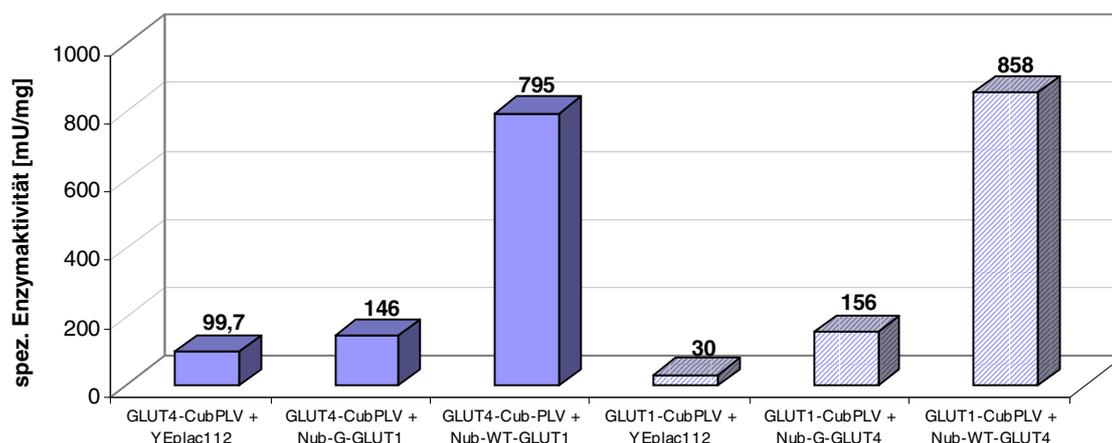


Die Ergebnisse der quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase-Messung bestätigten die Ergebnisse des qualitativen X-Gal-Overlays (Tabelle 11). Es besteht eine schwache Interaktion zwischen zwei GLUT1-Proteinen, wenn man die spezifische Enzymaktivität von 80 mU/mg mit der Enzymaktivität der Negativkontrolle mit 20 mU/mg und mit der maximal möglichen Enzymaktivität von 1020 mU/mg der Positivkontrolle vergleicht.

### 3.2.2.3 Bestimmung der GLUT4/GLUT1-Interaktion

Nachdem die Interaktion zwischen zwei GLUT4-Proteinen und zwei GLUT1-Proteinen untersucht wurde, stellte sich die Frage, ob aufgrund der starken Homologie zwischen GLUT4 und GLUT1 evtl. auch hier eine Interaktion möglich ist. Die Interaktion zwischen GLUT4 und GLUT1 wurde ebenfalls quantitativ mit  $\beta$ -Galaktosidase-Assays bestimmt und dabei spielte es keine Rolle, ob man GLUT4 oder GLUT1 mit dem Reporterprotein fusionierte.

**Abb. 14: Quantitative  $\beta$ -Galaktosidasemessung zur Bestimmung der Interaktion zwischen GLUT4 und GLUT1 in dem Stamm SDY.015.** Die Zellen wurden 5 h bei 30°C in synthetischem Kompletmedium mit 1% Maltose ohne Zugabe von Leucin und Tryptophan rangezogen und wie in Abschnitt 2.20.1 beschrieben behandelt. Die Proteininteraktion ist durch die erhöhte spezifische Enzymaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase dargestellt und in mU/mg angegeben.

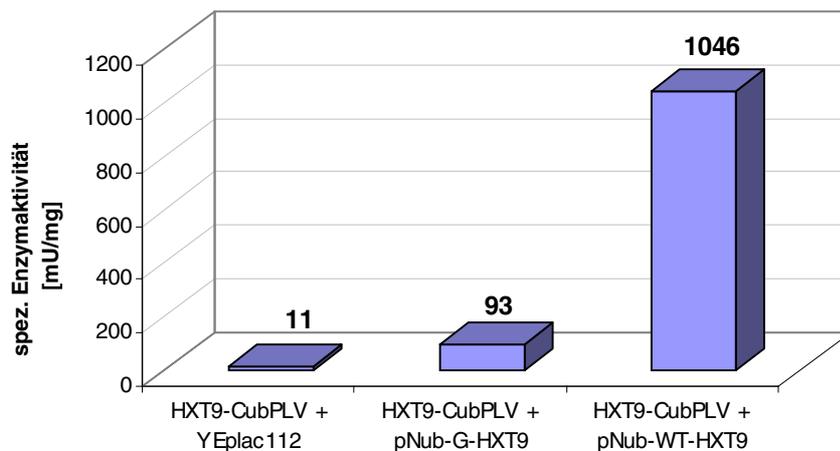


Das Diagramm zeigt deutlich, daß auch zwischen GLUT4 und GLUT1 eine schwache Interaktion gemessen werden konnte. Dabei hat es keine Rolle gespielt, ob man GLUT4 oder GLUT1 mit dem CubPLV-Konstrukt fusioniert hat. Eine Interaktion zwischen GLUT4 und GLUT1 könnte auf die Bildung eines heterodimeren Transportkomplexes in der Hefe hindeuten.

### 3.2.3 Interaktion zwischen Hxt9 Transportproteinen

Nachdem mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems eine schwache Interaktion zwischen humanen Glukosetransportproteinen in der Hefe gemessen werden konnte, sollte gezeigt werden, ob auch eine Interaktion zwischen hefeeigenen Glukosetransportproteinen besteht. Hierzu wurde der Glukosetransporter Hxt9 untersucht. Die entsprechenden Cub- und Nub-Plasmide wurden in den Stamm EBY.F4-7 *lexA::lacZ::URA3* (SDY.015) transformiert und die Interaktion sowohl in einem X-Gal-Overlay (Daten nicht gezeigt) als auch in einem quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase-Assay untersucht. Das Ergebnis der Messung ist dem folgenden Diagramm zu entnehmen.

**Abb. 15: Quantitative  $\beta$ -Galaktosidasemessung zur Bestimmung der Interaktion zwischen zwei Hxt9-Proteinen in dem Stamm SDY.015.** Die Zellen wurden 5 h bei 30°C in synthetischem Kompletmedium mit 1% Maltose ohne Zugabe von Leucin und Tryptophan rangezogen und wie in Abschnitt 2.20.1 beschrieben behandelt. Die Proteininteraktion ist durch die erhöhte spezifische Enzymaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase dargestellt und in mU/mg angegeben.



Die Ergebnisse des  $\beta$ -Galaktosidase-Assays bestätigen eine schwache Interaktion zwischen zwei Hxt9 Transportproteinen, wenn man die spezifische Enzymaktivität von 93 mU/mg mit der Enzymaktivität der Negativkontrolle mit 11 mU/mg und mit der maximal möglichen Enzymaktivität von 1046 mU/mg der Positivkontrolle vergleicht. Die gemessene Interaktion ist vergleichbar mit der Interaktion, die zwischen zwei GLUT1-Proteinen gemessen wurde (Abbildung 13).

### 3.2.4 SUS-Nachweis mit dem RUra3-Reporterprotein

Die bereits gezeigten Interaktionen zwischen humanen Glukosetransportern und dem Hxt9 Glukosetransporter der Hefe basierten auf enzymatischen Messungen der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität. Eine Interaktion zwischen den untersuchten Proteinen führte zur Abspaltung des Reporterproteins PLV, welches anschließend das *lacZ*-Reporterergen im Zellkern aktivierte. Eine weitere Möglichkeit, Interaktionen mit dem Split-Ubiquitin-System nachzuweisen, basiert auf Wachstumstests. Wenn man das RUra3-Reporterprotein an die Cub-Sequenz fusioniert, wird dieses bei einer Interaktion abgespalten und abgebaut und die Zellen sind nicht mehr in der Lage, auf Medium ohne Uracil zu wachsen. Im Kontrollexperiment wachsen diese Zellen, bei denen es durch Interaktion zweier Proteine zur Reassoziierung der Ubiquitinhälften kommt, auf Medium mit Zusatz von 5-FOA.

#### 3.2.4.1 Hintergrundaktivität der CubURA3-Plasmide

Der Nachweis der Interaktion mit dem Ura3-Reporterprotein wurde für die Transporter GLUT1 und Hxt9 durchgeführt werden. Die Konstruktion entsprechender Cub-Plasmide ist in Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben. Zur Überprüfung der Hintergrundaktivität wurden die Cub-URA3-Plasmide zunächst ohne ein entsprechendes Nub-Plasmid in den Stamm EBY.F4-7 transformiert und auf Selektivmedium ausgestrichen. Als Negativkontrolle wurde das Ausgangsplasmid pRS313-STE2 und Plasmide ohne Split-Ubiquitin-Sequenzen transformiert. Das Ergebnis der Wachstumstests ist in nachfolgender Tabelle gezeigt.

**Tab. 12: Überprüfung der CubURA-Plasmide auf Hintergrundaktivität des Reporterproteins Ura3 in dem Stamm EBY.F4-7.** Die Transformanten wurden auf synthetischem Komplettmedium mit 1% Maltose ausgestrichen, einmal mit Zusatz von FOA, einmal ohne Zugabe von Uracil. (-) kein Wachstum, (++) sehr gutes Wachstum.

Plasmid	1% Maltose mit FOA	1% Maltose ohne Uracil
pRShsGLUT1-CubURA	-	++
pRSHXT9-CubURA	-	++
pRS313-STE2	-	++

Der Wachstumstest hat gezeigt, daß alle Transformanten kein Wachstum auf Medium mit FOA zeigten, was bedeutet, daß in den Zellen das toxische FOA-Uracil gebildet wurde und das Ura3-Reporterprotein nicht abgespalten wurde. Das Ergebnis wurde auch durch das Wachstum auf Medium ohne Uracil bestätigt.

### 3.2.4.2 Interaktion zwischen GLUT1/GLUT1 und Hxt9/Hxt9

Die mit quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase-Assays gezeigte Interaktion zwischen zwei GLUT1-Proteinen bzw. zwei Hxt9-Proteinen sollte nun auch durch Fusion der Proteine an den Ura3-Reporter mit Wachstumstests bestätigt werden. Hierzu wurden die Plasmide pRShsGLUT1-CubURA und pRSHXT9-CubURA sowohl ohne als auch mit den jeweiligen Nub-Plasmiden in den Stamm EBY.F4-7 transformiert. Eine Interaktion konnte durch Wachstum auf entsprechendem Selektivmedium bestätigt werden.

**Tab. 13: Bestimmung der Interaktion zwischen zwei GLUT1- und zwei Hxt9-Proteinen in dem Stamm EBY.F4-7 durch Wachstum auf synthetischem Medium mit 1% Maltose.** Wachstum auf Medium ohne Uracil bedeutet, daß das Reporterprotein Ura3 nicht abgespalten wird. Wachstum auf Medium mit FOA-Zusatz bedeutet, daß das Reporterprotein Ura3 abgespalten wird. (+++) sehr gutes Wachstum, (++) gutes Wachstum, (+/-) schlechtes Wachstum, (-) kein Wachstum.

Plasmide	Wachstum	
	1% Maltose ohne Uracil	1% Maltose mit FOA
pRShsGLUT1-CubURA + YEplac112	+++	-
pRShsGLUT1-CubURA + pNub-G-hsGLUT1	+/-	-
pRShsGLUT1-CubURA + pNub-WT-hsGLUT1	-	++
pRSHXT9-CubURA + YEplac112	++	-
pRSHXT9-CubURA + pNub-G-HXT9	-	-
pRSHXT9-CubURA + pNub-WT-HXT9	-	-
p423HXT7 + YEplac112	-	++

Der Wachstumstest bestätigte ebenfalls eine Interaktion zwischen zwei GLUT1-Proteinen, da Wachstum der Transformanten mit dem mutierten GLUT1-Nub-Konstrukt auf Medium ohne Uracil beobachtet werden konnte, das jedoch sehr langsam war. Das Hintergrundwachstum ist damit zu begründen, daß das Ura3-Reporterprotein nicht in allen Zellen abgespalten und somit abgebaut wurde. Die GLUT1-Interaktion hat sich nicht durch Wachstum der Transformanten auf Medium mit FOA-Zusatz bestätigt.

Auch im Fall von Hxt9 bestätigte sich eine Interaktion durch Wachstumstests. Die Transformanten, die das mutierte Hxt9-Nub-Plasmid enthielten, konnten nicht auf Medium ohne Uracil wachsen. In diesen Zellen wurde das Ura3-Protein durch die Interaktion zwischen zwei Hxt9-Proteinen abgespalten und abgebaut. Die Inter-

aktion konnte auch hier nicht durch Wachstum der Transformanten auf Medium mit FOA bestätigt werden.

Da das Split-Ubiquitin-System mit dem Ura3-Reporterprotein weder im Fall von GLUT1, noch im Fall von Hxt9 bei Wachstum auf Medium mit FOA eindeutige Ergebnisse zeigte, wurden die meisten Interaktionstests weiterhin durch den Nachweis mit dem PLV-Reporterprotein durchgeführt. Der Nachweis mit Hilfe des Ura3-Reporterproteins stellte sich als nicht sensitiv genug heraus.

### 3.2.5 Erg4 Interaktionsstudien

Wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, führte eine zusätzliche Deletion des Gens *ERG4* im Stamm EBY.S7 dazu, daß der humane Glukosetransporter GLUT4 funktionell exprimiert werden konnte und der Stamm wieder auf Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle wachsen konnte. Weitere Deletionen der Gene für die letzten Enzyme der Ergosterolbiosynthese haben gezeigt, daß nicht ein Fehlen des Plasmamembransterols Ergosterol für die Funktion von GLUT4 verantwortlich ist. Die Funktionalität von GLUT4 war immer dann gegeben, wenn das Gen *ERG4* deletiert war. Diese Tatsache ließ die Vermutung zu, daß evtl. das Protein Erg4, welches im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, einen direkten Einfluß auf die Translokation des Glukosetransporters zur Zelloberfläche haben könnte. Mit Dichtegradientenzentrifugation konnte gezeigt werden, daß GLUT4 in einem Stamm ohne zusätzliche *erg4*-Deletion zum Teil mit dem endoplasmatischen Retikulum Protein Dpm1 kolokalisiert. Wenn Erg4 zusätzlich eine regulatorische Funktion ausübt und direkt mit GLUT4 interagiert, sollte dies ebenfalls mit dem Split-Ubiquitin-System nachzuweisen sein. Die notwendigen GLUT4-Plasmide konnten aus früheren Tests verwendet werden, die Konstruktion der entsprechenden Erg4-Cub- und Nub-Plasmide ist in Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben.

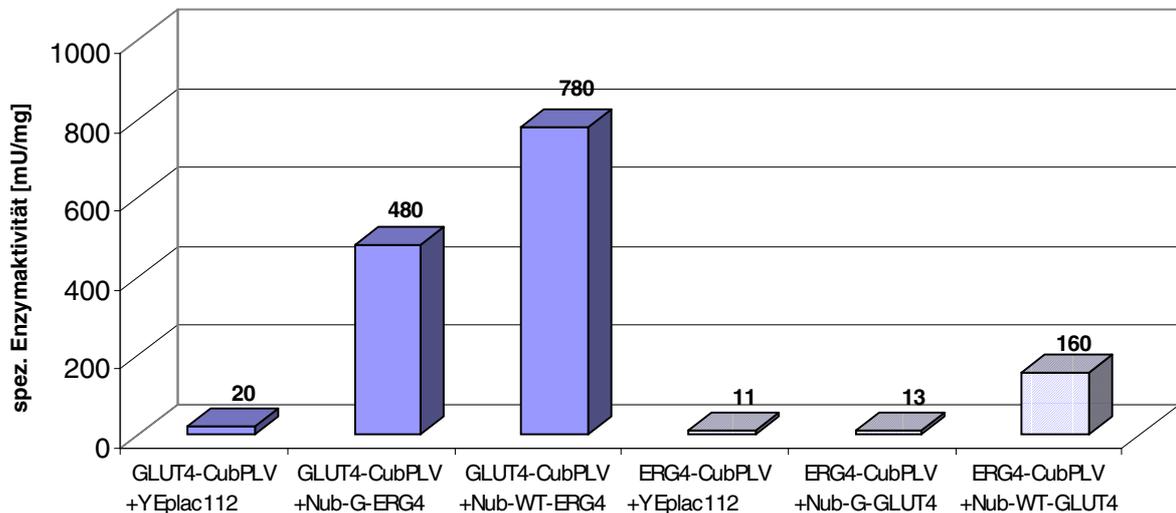
Die GLUT4-Cub- und Nub-Plasmide wurden mit den entsprechenden ERG4-Cub- und Nub-Plasmiden in den Stamm SDY.028 (*hxt<sup>-</sup> fgy1-1 Δerg4 lexA::lacZ::URA3*) transformiert und qualitative X-Gal-Overlays der Transformanten ergaben folgendes Ergebnis.

**Tab. 14: Ergebnis des qualitativen X-Gal-Overlays zur Bestimmung der Interaktion zwischen GLUT4 und Erg4 in dem Stamm SDY.028 (*hxt<sup>-</sup> fgy1-1 Δerg4 lexA::lacZ::URA3*).** Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pCPLV transformiert und als Negativkontrolle das Plasmid YCpH7hsG4-CubPLV und YCpH7ERG4-CubPLV mit einem Tryptophan exprimierenden Plasmid.

<b>Plasmide</b>	<b>X-Gal-Farbreaktion</b>
YCpH7hsG4-CubPLV + YEplac112	blau nach ca. 30 min
YCpH7hsG4-CubPLV + pNub-G-ERG4	blau nach 8 min
YCpH7hsG4-CubPLV + pNub-WT-ERG4	blau nach 8 min
YCpH7ERG4-CubPLV + YEplac112	blau nach ca. 1 h
YCpH7ERG4-CubPLV + pNub-G-GLUT4	blau nach ca. 1 h
YCpH7ERG4-CubPLV + pNub-WT-GLUT4	blau nach ca. 15 min
pCPLV + YEplac112	blau nach 8 min

Die Transformanten, die das GLUT4-CubPLV-Konstrukt mit den jeweiligen ERG4-Nub-Plasmiden trugen, färbten sich nach ca. 8 min zeitgleich blau. Da die entsprechende Negativkontrolle sich erst nach 30 min färbte und sich die Kolonien mit dem mutierten Nub-Konstrukt ebenso schnell färbten wie die WT-Kontrolle, ist dies ein Hinweis auf eine Interaktion zwischen GLUT4 und Erg4. Die Transformanten, die das ERG4-CubPLV-Konstrukt mit den jeweiligen GLUT4-Nub-Plasmiden trugen, färbten sich nicht zeitgleich blau. Die Kolonien mit dem mutierten Nub-Konstrukt färbten sich ebenso wie die Negativkontrolle erst nach 1 h blau, wohingegen die Kolonien der WT-Kontrolle schon nach 15 min eine Blaufärbung zeigte. In diesem Fall kann man nicht von einer Interaktion zwischen Erg4 und GLUT4 ausgehen. Quantitative  $\beta$ -Galaktosidase-Assays sollten die Ergebnisse des X-Gal-Overlays bestätigen.

**Abb. 16: Quantitative  $\beta$ -Galaktosidase-messung zur Bestimmung der Interaktion zwischen GLUT4 und Erg4 in dem Stamm SDY.028.** Die Zellen wurden 5 h bei 30°C in synthetischem Kompletmedium mit 1% Maltose ohne Zugabe von Leucin und Tryptophan rangezogen und wie in Abschnitt 2.20.1 beschrieben behandelt. Die Proteininteraktion ist durch die erhöhte spezifische Enzymaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase dargestellt und in mU/mg angegeben.



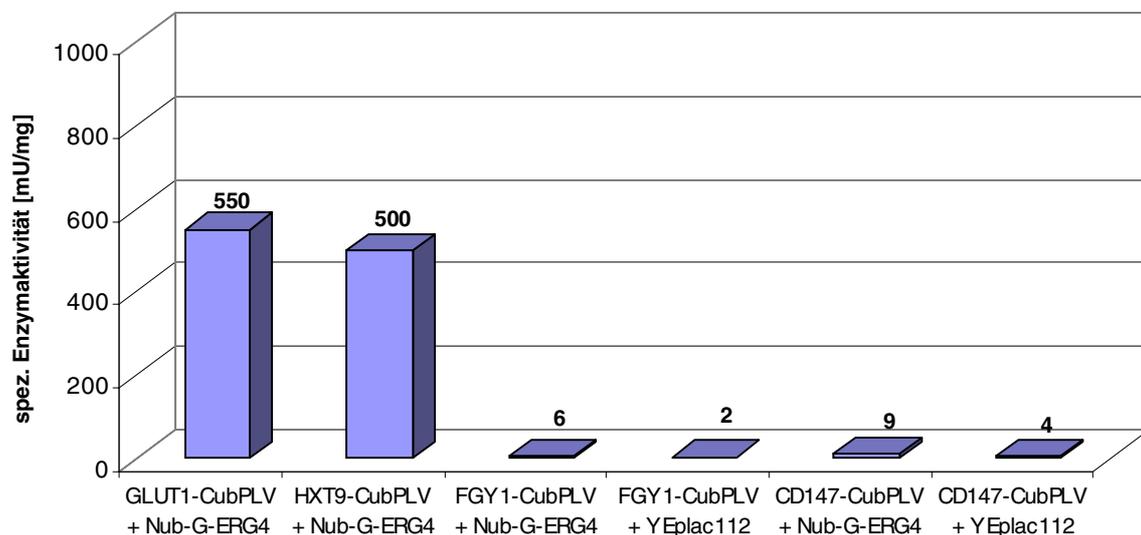
Auch der quantitative Interaktionsnachweis bestätigte eine Interaktion zwischen GLUT4 und Erg4, wenn CubPLV an GLUT4 fusioniert vorlag. In den Fällen, wo das CubPLV an Erg4 fusioniert war, kam es bereits bei der WT-Nub-Kontrolle nur zu einer schwachen Induktion der  $\beta$ -Galaktosidase, was darauf hindeutet, daß das Erg4-CubPLV-Fusionsprotein evtl. falsch gefaltet in den Zellen vorlag und die Cub- und Nub-Hälften nicht vollständig reassoziieren konnten. Weitere Interaktionstests wurden daraufhin nur mit den pNub-ERG4-Plasmiden durchgeführt.

### 3.2.5.1 Interaktionsnachweis zwischen Erg4 und GLUT1, Hxt9, CD147, Fgy1

Nachdem eine Interaktion zwischen Erg4 und GLUT4 nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob Erg4 aufgrund seiner Lokalisierung im endoplasmatischen Retikulum evtl. auch mit anderen Plasmamembrantransportproteinen interagiert oder ob die Interaktion mit GLUT4 sehr spezifisch ist. Es wäre gut möglich, daß es nicht zu einer wirklichen Interaktion zwischen Erg4 und GLUT4 kommt, sondern eine Reassoziierung der beiden Ubiquitinhälften aufgrund der räumlichen Nähe zustande kommt, wenn GLUT4 das endoplasmatische Retikulum auf dem Weg zur Plasmamembran passiert. Diese Vermutung sollte auch in Interaktionstests mit den Glukosetransportern GLUT1 und Hxt9 untersucht werden. Zur Kontrolle sollte eine Interaktion zu Proteinen untersucht werden, die keine Transport-

proteine waren und nicht in der Plasmamembran lokalisiert waren. Es wurde die Interaktion von Erg4 mit dem Protein CD147 und zu Fgy1 untersucht. Das humane Protein CD147 und das hefeeigene Protein Fgy1 besitzen vermutlich eine Transmembrandomäne und man geht davon aus, daß sie in der Zelle möglicherweise Hilfsfunktionen ausüben (Kirk *et al.*, 2000) Quantitative  $\beta$ -Galaktosidasemessungen wurden mit folgenden Konstrukten durchgeführt.

**Abb. 17: Quantitative  $\beta$ -Galaktosidasemessung zur Bestimmung der Interaktion zwischen Erg4 und GLUT1, Hxt9, Fgy1 und CD147 in dem Stamm SDY.028.** Die Zellen wurden 5 h bei 30°C in synthetischem Komplettmedium mit 1% Maltose ohne Zugabe von Leucin und Tryptophan rangezogen und wie in Abschnitt 2.20.1 beschrieben behandelt. Die Proteininteraktion ist durch die erhöhte spezifische Enzymaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase dargestellt und in mU/mg angegeben.



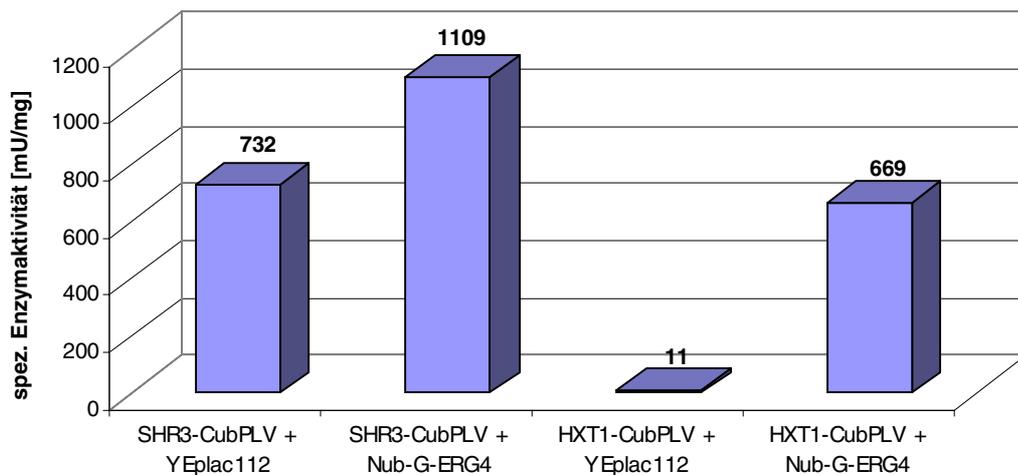
Die Ergebnisse des quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase-Assays zeigten deutlich, daß auch eine Interaktion zwischen Erg4 und den Glukosetransportern GLUT1 und Hxt9 besteht. Interessant war die Tatsache, daß keine Interaktion zwischen Erg4 und den Hilfsproteinen CD147 und Fgy1 gemessen werden konnte. Um zu klären, ob Erg4 generell mit Transportproteinen interagiert, wurden weitere Tests durchgeführt.

### 3.2.5.2 Erg4 Interaktionsnachweis mit Hxt1 und Shr3

Nachdem eine Interaktion zwischen Erg4 und zwei Plasmamembrantransportproteinen nachgewiesen werden konnte, sollten weitere Proteine getestet werden. Es wurden weiterhin der hefeeigene, niederaffine Glukosetransporter Hxt1 und

das hefeeigene Hilfsprotein (Chaperon) Shr3, ein integrales Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums, das aus vermutlich 4 Transmembrandomänen besteht, untersucht. Für Shr3 werden verschiedene Aufgaben in der Zelle postuliert. Es soll an der Proteinfaltung, dem Transport kleiner Moleküle und dem Vesikeltransport beteiligt sein und vor allem wird es benötigt, um AS-Permeasen zur Zelloberfläche zu dirigieren (Ljungdahl *et al.*, 1992; Kuehn *et al.*, 1996; Gilstring *et al.*, 1996; 1999) Die Konstruktion der notwendigen Plasmide ist in Abschnitt 3.2.1.2 beschrieben. Die entsprechenden Cub- und Nub-Plasmide wurden in den Stamm SDY.028 transformiert und die Interaktion durch die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase bestimmt.

**Abb. 18: Quantitative  $\beta$ -Galaktosidasemessung zur Bestimmung der Interaktion zwischen Erg4 und Shr3 bzw. Hxt1 in dem Stamm SDY.028.** Die Zellen wurden 5 h bei 30°C in synthetischem Kompletmedium mit 1% Maltose ohne Zugabe von Leucin und Tryptophan rangezogen und wie in Abschnitt 2.20.1 beschrieben behandelt. Die Proteininteraktion ist durch die erhöhte spezifische Enzymaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase dargestellt und in mU/mg angegeben.



Das Protein Shr3 des endoplasmatischen Retikulums schien zwar mit Erg4 zu interagieren, allerdings zeigte sich eine sehr hohe Hintergrundaktivität. Kaum Hintergrundaktivität war bei dem Hxt1-Cub-PLV-Fusionsprotein zu messen, weshalb die hier gezeigte spezifische Enzymaktivität von 669 mU/mg eindeutig auf eine Interaktion von Hxt1 mit Erg4 schließen ließ.

Aufgrund der Tatsache, daß Erg4 nicht nur mit GLUT4, sondern auch mit den Glukosetransportern GLUT1, Hxt9 und Hxt1 interagiert, stellte sich nun die Frage, ob die Aktivität von GLUT4 tatsächlich durch eine direkte Interaktion mit Erg4 inhibiert wird. Sollte die Erg4 Sterolreduktase neben seiner katalytischen

Funktion auch eine regulatorische Funktion auf die GLUT4-Translokation ausüben, dann stellt sich die Frage, warum die Translokation der Transporter GLUT1, Hxt9 und Hxt1 nicht ebenfalls durch direkte Interaktion mit Erg4 inhibiert wird.

Es konnte nicht eindeutig bewiesen werden, ob das Protein Erg4 eine inhibierende Wirkung auf die GLUT4-Funktion bzw. seine Translokation zur Zelloberfläche hat, oder ob die Sterolzusammensetzung der Plasmamembran die Transporteraktivität negativ beeinflusst.

### 3.2.6 Entwicklung einer cDNA-Genbank zur Suche nach mit GLUT4 interagierenden Proteinen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von cDNA aus menschlichem Skelettmuskelgewebe nach Proteinen zu suchen, die mit GLUT4 interagieren. GLUT4 wird in Säugern vorwiegend in Skelettmuskel- und Fettzellen exprimiert, wo es solange in intrazellulären Vesikeln gespeichert wird, bis es durch ein Insulin vermitteltes Signal, daß auf noch weitgehend ungeklärte Weise von der Zelloberfläche zu den GLUT4-Speicherkompartimenten geleitet wird, zu einer vermehrten Einlagerung des Transporters in die Plasmamembran kommt. Die Entdeckung weiterer mit GLUT4 interagierender Proteine könnte klären, in wieweit die GLUT4-Translokation durch das Insulinsignal beeinflusst wird und wie sich weitere Faktoren wie z.B. Muskelbewegung auswirken (Aledo *et al.* 1997, Ploug *et al.* 1998, Millar *et al.* 1999). Hierzu wurde die Hefe als Expressionssystem verwendet, da mit Hilfe der in Hefe etablierten Methode des „Split-Ubiquitin-Systems“ (siehe Abschnitt 3.2) die Interaktion des Membranproteins GLUT4 mit anderen Membranproteinen und auch cytosolischen Proteinen nachgewiesen werden kann. In früheren Versuchen konnte in Two-Hybrid-Experimenten mit einer cDNA-Bank aus Fettzellen der Maus gezeigt werden, daß das Sentrin konjugierende Enzym mUbc9 mit dem C-Terminus von GLUT4 und GLUT1 interagiert (Giorgino *et al.*, 2000). Aus diesem Grund sollte mit der Split-Ubiquitin-Methode zuerst eine Interaktion zwischen GLUT4 und UBC9 nachgewiesen werden, bevor mit einer Genbank nach unbekanntem Proteinen gesucht werden sollte.

#### 3.2.6.1 Konstruktion geeigneter Vektoren

Das Protein UBC9 sollte mit der N-terminalen Hälfte und GLUT4 entsprechend mit der C-terminalen Hälfte des Ubiquitins fusioniert werden, damit eine Interaktion durch Reassoziierung der Ubiquitinhälften und der damit verbundenen Freisetzung

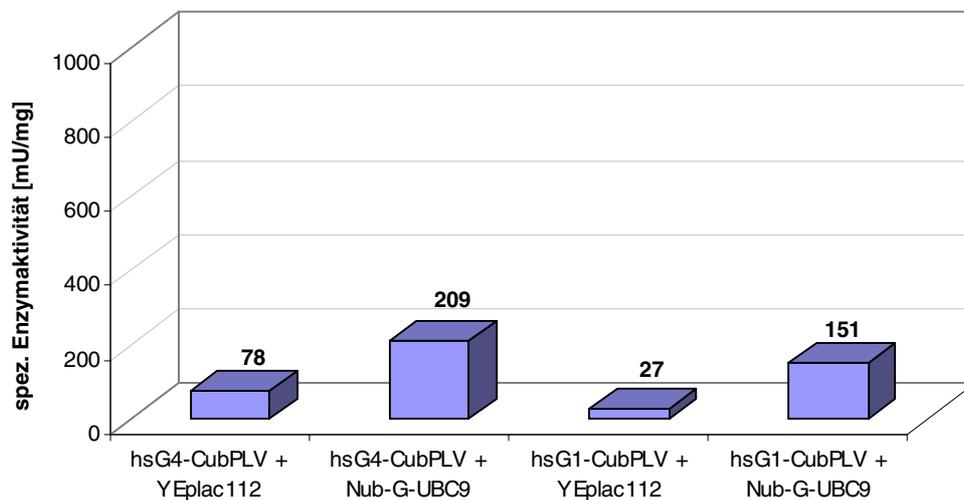
des Reporterproteins nachgewiesen werden konnte. Das Plasmid YCpH7hsG4-CubPLV konnte aus früheren Versuchen verwendet werden. Die Plasmide pNub-G-UBC9 und pNub-WT-UBC9 wurden wie folgt kloniert.

Die Poly(A<sup>+</sup>)-RNA aus menschlichem Skelettmuskelgewebe (CLONTECH) wurde zuerst in entsprechende cDNA umgeschrieben. In einer „First-Strand“ cDNA-Synthese (Abschnitt 2.11) wurde mit dem Oligonukleotid Ubc9-RT2 und der Poly(A<sup>+</sup>)-RNA als Vorlage durch Zugabe von reverser Transkriptase einzelsträngige cDNA geschrieben. Der Primer hat die RNA im Bereich des *UBC9*-Stopkodons gebunden und hatte einen homologen Anhang zu dem Plasmid pNub-G-ALG5 bzw. pNub-WT-ALG5. In einer „Long-Distance“ PCR-Reaktion (Abschnitt 2.11) wurde mit dem Oligonukleotidpaar Ubc9-RT1/Ubc9-RT2 und der einzelsträngigen cDNA aus der „First-Strand“ cDNA-Synthese doppelsträngige *UBC9*-cDNA amplifiziert. Der Primer Ubc9-RT1 hat die cDNA im Bereich des *UBC9*-Startkodons gebunden und hatte einen homologen Anhang zu der Nub-Sequenz in dem Plasmid pNub-G-ALG5 bzw. pNub-WT-ALG5. Die PCR-Produkte aus unabhängigen PCR-Reaktionen wurden mit den Nub-Plasmiden, die zuvor mit *SacI/BglII/XhoI* geschnitten wurden, in den Wildtypstamm VW1B (*MAT $\alpha$* ) transformiert und über homologe Rekombination sollte das Gen *ALG5* durch *UBC9* ersetzt werden. Die Transformanten wurden entsprechend des Plasmidmarkers für die Tryptophansynthese auf synthetischem Medium mit 1% Maltose ohne Tryptophan ausplattiert. Anstelle einer Plasmidpräparation aus Hefe wurden die Transformanten anschließend durch Replikaplattierung mit dem Stamm SDY.028 (*MAT $\alpha$  hxt<sup>-</sup> fgy1-1  $\Delta$ erg4 lexA::lacZ::URA3*), welcher zuvor mit dem Plasmid YCpH7hsG4-CubPLV transformiert wurde, gepaart. Die heterozygot-diploiden Kolonien wurden nach einer weiteren Replikaplattierung auf entsprechendes Selektivmedium ohne Tryptophan und Leucin mit X-Gal überschichtet. Nach ca. 30 min konnten blau gefärbte diploide Kolonien beobachtet werden, was ein direkter Hinweis auf eine Interaktion zwischen GLUT4 und UBC9 war. Zur Kontrolle wurden auch Transformanten mit dem Plasmid pNub-WT-hsGLUT4 und dem Plasmid YEplac112 mit dem Stamm SDY.028 gepaart. Die Negativkontrolle zeigte erst nach 35-40 min und die Positivkontrolle bereits nach 10 min blaue Kolonien. Die blau gefärbten Kolonien wurden den Kolonien der Ursprungsplatte zugeordnet. Aus den Ursprungskolonien wurden die Plasmide isoliert, in *E. coli* amplifiziert und über Restriktionsanalyse überprüft.

### 3.2.6.2 UBC9-Interaktionstest mit GLUT4 und GLUT1

Aufgrund der Two-Hybrid-Ergebnisse sollte eine Interaktion zwischen UBC9 und GLUT4 bzw. GLUT1 auch im Split-Ubiquitin-System nachzuweisen sein. Die Ergebnisse des quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase-Assays sind nachfolgend dargestellt.

**Abb. 19: Quantitative  $\beta$ -Galaktosidasemessung zur Bestimmung der Interaktion zwischen UBC9 und GLUT4 bzw. GLUT1 in dem Stamm SDY.028.** Die Zellen wurden 5 h bei 30°C in synthetischem Komplettmedium mit 1% Maltose ohne Zugabe von Leucin und Tryptophan rangezogen und wie in Abschnitt 2.20.1 beschrieben behandelt. Die Proteininteraktion ist durch die erhöhte spezifische Enzymaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase dargestellt und in mU/mg angegeben.



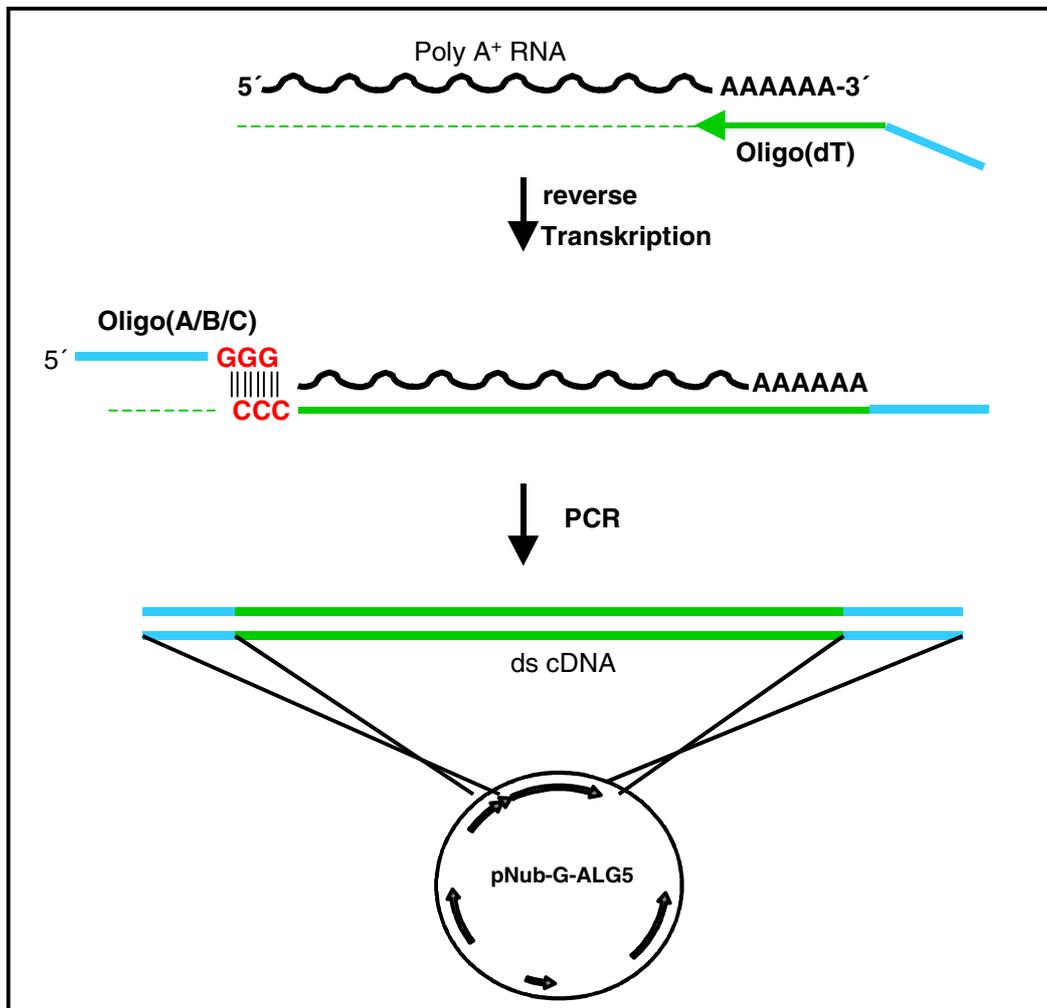
Die erhöhten spezifischen Enzymaktivitäten zeigten, daß sowohl zwischen UBC9 und GLUT4 als auch zwischen UBC9 und GLUT1 verglichen mit den Negativkontrollen eine leichte Interaktion vorhanden war. Aufgrund des positiven Tests mit dem menschlichen UBC9, sollte nach dem gleichen Prinzip eine menschliche cDNA-Bank konstruiert werden.

### 3.2.6.3 Konstruktion einer cDNA-Bank

Die cDNA-Bank wurde nach der Anleitung der „MATCHMAKER Two-Hybrid Library Construction & Screening procedure“ der Firma CLONTECH erstellt. Die Poly(A<sup>+</sup>)-RNA wurde wie in Abschnitt 2.11 beschrieben mit dem Oligonukleotid Oligo(dT) zuerst in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. Der Primer bestand aus einer Folge von 30 Thymidinen, die komplementär an die Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende der RNA gebunden hat, und einem homologen Anhang zu dem Plasmid

pNub-G-ALG5. Die Tatsache, daß die reverse Transkriptase das synthetisierte cDNA-Produkt am Ende jeweils noch um 3-5 Cytidinreste verlängert, wurde insofern genutzt, daß während der „First-Strand“ cDNA-Synthese noch ein weiteres Oligonukleotid zu dem Ansatz gegeben wurde. Dieses Oligonukleotid enthielt an seinem 3'-Ende drei Guanosinreste, die komplementär an die drei überstehenden Cytidine des synthetisierten RNA:DNA-Hybrids binden sollten. Nachdem das zweite Oligonukleotid die RNA am 5'-Ende somit künstlich verlängert hatte, sollte die reverse Transkriptase den bereits synthetisierten cDNA-Strang nach Vorlage des zweiten Oligonukleotids weiter synthetisieren. Das zweite Oligonukleotid hatte ebenfalls einen homologen Anhang zu dem Nub des Plasmids pNub-G-ALG5. Weil es möglich sein konnte, daß die cDNA-Synthese aufgrund von RNA-Sekundärstrukturen vorzeitig abbricht und die cDNA-Bank vielleicht nur aus unvollständigen offenen Leserastern (ORF's) bestehen konnte, sollte auf jeden Fall sichergestellt sein, daß auch die Synthese bzw. Interaktion von Proteindomänen möglich ist. Aus diesem Grund und weil die Poly(A<sup>+</sup>)-RNA's eine untranslatierte 5'-Region (UTR) unbestimmter Länge besitzt wurden drei verschiedene cDNA-Synthesen durchgeführt, in denen sich das später hinzu gegebene Oligonukleotid (Oligo(A), Oligo(B), Oligo(C)) in der Sequenz zwischen dem homologen Anhang und den drei Guanosinresten am 3'-Ende jeweils um eine Base unterschied. Somit wurde gesichert, daß sich vollständige sowie unvollständige ORF's korrekt in den Leserahmen einfügen konnten und die Fusion von Nub an korrekt translatierte Proteine und Proteindomänen möglich war. Die so erzeugte cDNA wurde dann in einer „Long-Distance“ PCR-Reaktion mit dem Oligonukleotidpaar 5-LD-PCR/3-LD-PCR amplifiziert, über Säulen der Firma Qiagen gereinigt und in einem Agarosegel überprüft. In allen Fällen zeigte sich ein diffuser cDNA-Streifen, der im Vergleich zum Größenstandard von 0,2 bis 1 kB reichte. Die PCR-Produkte wurden über homologe Rekombination in dem Wildtypstamm VW1B (*MAT $\alpha$* ) in das Plasmid pNub-G-ALG5 kloniert. Die Transformanten wurden wie in Abschnitt 3.2.6.1 beschrieben mit dem Stamm SDY.028 gepaart, der zuvor mit dem Plasmid YCpH7hsG4-CubPLV transformiert wurde. Die heterozygot-diploiden Kolonien wurden nach einer weiteren Replikaplattierung auf entsprechendes Selektivmedium mit X-Gal überschichtet. Aus den 13 Kolonien, die sich schneller als die Negativkontrolle (Hintergrundaktivität) blau färbten, wurden die Plasmide isoliert und in *E. coli* amplifiziert.

**Abb. 20: Schematische Darstellung der Konstruktion einer cDNA-Bank.** In einer „First-Strand“ cDNA-Synthese wird Poly(A<sup>+</sup>)-RNA mit entsprechenden Oligonukleotiden durch reverse Transkription in einzelsträngige cDNA umgeschrieben. In einer „Long-Distance“ PCR-Reaktion wird die einzelsträngige cDNA mit entsprechenden Oligonukleotiden, die homologe Anhänge zu dem Zielvektor besitzen, zu doppelsträngiger cDNA amplifiziert. Über homologe Rekombination in Hefe werden die PCR-Produkte in den Zielvektor kloniert.



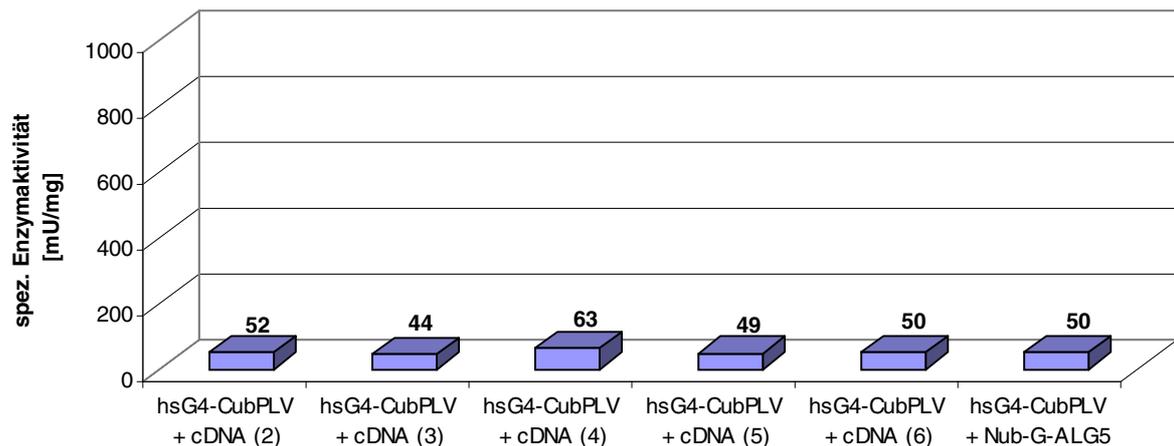
In einer PCR-Reaktion sollte zuerst mit dem Oligonukleotidpaar seq1cDNA/seq2cDNA geprüft werden, welche der isolierten Plasmide tatsächlich cDNA-Fragmente enthielten. Vier der 13 isolierten Plasmide wurden mit dem Oligonukleotid seq1cDNA ansequenziert und die Sequenzen mit bekannten Sequenzen der Datenbank verglichen. Das Plasmid pNub-G-C16.4 enthielt ein 228 bp großes cDNA-Insert, welches mit dem für den C-Terminus kodierenden Bereich des Gens APOBEC1 übereinstimmte. APOBEC1 kodiert für die katalytische Untereinheit des Apolipoproteins B mRNA editierenden Enzyms. Es ist ein RNA-Bindeprotein, welches in der Zelle am Lipid-, Fettsäure- und Sterolmetabolismus beteiligt ist. Die

cDNA war nicht in den Leserahmen der Nub-Sequenz eingefügt, so daß kein Nub-APOBEC1-Fusionsprotein entstehen konnte. Das Plasmid pNub-G-B25.2 enthielt ein ca. 500 bp großes cDNA-Insert, welches in 40 Basen mit dem für den C-Terminus kodierenden Bereich des Gens FPGS übereinstimmte. FPGS kodiert für eine Folylpolyglutamatsynthase, jedoch hatte sich die cDNA ebenfalls nicht in den Leserahmen der Nub-Sequenz eingefügt, so daß kein Nub-FPGS-Fusionsprotein gebildet werden konnte. Das Plasmid pNub-G-B25.1 enthielt ein 140 bp großes cDNA-Insert, welches keinem bekannten Gen der Datenbank entsprach. Es konnten lediglich ähnliche Sequenzen in menschlichen mitochondrialen Klonen gefunden werden. Hierbei bestand Ähnlichkeit zu Untereinheiten der Cytochrom-C-Oxidase, zur ATP-Synthase 6 und zu NADH-Dehydrogenase Untereinheiten. Die cDNA war auch hier nicht in den Leserahmen eingefügt. Das Plasmid pNub-G-3.17.1 enthielt ein 200 bp großes cDNA-Insert, welches in 76 Basen mit dem für den C-Terminus kodierenden Bereich des Gens FHL3 übereinstimmte. FHL3 kodiert für eine Skelettmuskel LIM-Domäne, jedoch war auch dieses cDNA-Insert nicht im Leserahmen eingefügt. Es zeigte sich, daß sich die cDNA in keinem der untersuchten Plasmide in den Leserahmen der Nub-Sequenz integriert hatte. Die beobachtete Blaufärbung der Transformanten im X-Gal-Overlay war also durch eine Interaktion zwischen GLUT4 und kurzen Nub-Fusionspeptiden hervorgerufen worden, die bei der Translation der nicht korrekt in den Leserahmen integrierten cDNA's entstanden waren. Die Tatsache, daß sich bei den X-Gal-Overlays einige Kolonien schneller blau färbten, kann auch darin begründet sein, daß einige Nub-Fusionsproteine evtl. eine toxische Wirkung auf die Zellen ausübten und das X-Gal schneller von der freigesetzten  $\beta$ -Galaktosidase in den blauen Farbstoff umgewandelt werden konnte.

#### *3.2.6.4 GLUT4-Interaktionsnachweis mit Skelettmuskelproteinen*

Die Plasmide, die nach dem X-Gal-Overlay ebenfalls aus positiven Kolonien isoliert und nicht sequenziert wurden, sind in quantitativen  $\beta$ -Galaktosidase-Assays überprüft worden. Erst wenn sich auch in diesem Interaktionstest eine deutliche Interaktion bestätigt hätte, wären die Plasmide sequenziert worden.

**Abb. 21: Quantitative  $\beta$ -Galaktosidasemessung zur Bestimmung der Interaktion zwischen GLUT4 und Proteinen bzw. Proteindomänen aus menschlichem Skelettmuskelgewebe in dem Stamm SDY.028.** Verschiedene pNub-G-cDNA-Plasmide aus Transformanten, die sich im X-Gal-Overlay blau färbten, wurden getestet. Die Plasmide wurden mit „cDNA(x)“ entsprechend ihrer Isolierung bezeichnet. Als Negativkontrolle wurde das Ausgangsplasmid pNub-G-ALG5 transformiert. Die Zellen wurden 5 h bei 30°C in synthetischem Medium mit 1% Maltose ohne Zugabe von Leucin und Tryptophan rangezogen und wie in Abschnitt 2.20.1 beschrieben behandelt. Die Proteininteraktion ist durch die erhöhte spezifische Enzymaktivität der  $\beta$ -Galaktosidase dargestellt.



Die  $\beta$ -Galaktosidase-messung zeigte deutlich, daß sich die gemessenen spezifischen Enzymaktivitäten der Transformanten mit verschiedenen isolierten und retransformierten pNub-cDNA-Plasmiden nicht von der Negativkontrolle (letzter Balken) unterschieden. In allen Fällen konnte ebenfalls nur die Hintergrundaktivität der verschiedenen Konstrukte gemessen werden. Das Ergebnis der X-Gal-Overlays konnte durch die quantitative Messung der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität nicht bestätigt werden. Nachdem bereits annähernd 9.000 Transformanten im X-Gal-Overlay untersucht wurden, sind weitere Transformationen der cDNA-Bank nötig, um Integrationskandidaten zu isolieren. Es sollte möglich sein, Kolonien zu finden, die sich im X-Gal-Overlay positiv verhalten bzw. sich noch schneller und deutlicher blau färben als die Negativkontrolle. Mit dieser Methode ist es durchaus möglich, Proteine oder Proteindomänen zu finden, die mit GLUT4 interagieren.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Konstruktion eines GLUT4-exprimierenden Hefestammes

Die ersten Untersuchungen bezüglich der heterologen Expression von Glukosetransportern aus Säugetieren in Hefe wurden Mitte der Neunziger Jahre von Kasahara und Kasahara durchgeführt (Kasahara und Kasahara, 1996; 1997). Hierzu wurde ein *S. cerevisiae*-Stamm verwendet, dessen Glukosetransporter *HXT2* und das *SNF3*-Gen, welches für einen Glukosesensor kodiert, deletiert waren. Die Deletion von *SNF3* führte dazu, daß die meisten hoch- und intermediär-affinen Glukosetransporter nicht mehr induziert wurden. Lokalisierungsexperimente mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie haben jedoch gezeigt, daß die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 aus Ratte in intrazellulären Strukturen der Hefe zurückgehalten werden und nicht zur Zelloberfläche transloziert werden. Um zu testen, ob die in Hefe heterolog exprimierten Glukosetransporter dennoch Glukosetransportaktivität aufweisen, wurden Liposomen aus den Membranfraktionen des verwendeten Hefestammes rekonstituiert und der Glukosetransport in zero-trans Influx-Messungen mit radioaktiver Glukose gemessen. Für GLUT1 konnte ein  $K_m$ -Wert von 3,5 mM und für GLUT4 von 12 mM bestimmt werden (Kasahara und Kasahara, 1996; 1997). Die Vermutung, daß die Glukosetransporter-Isoformen aufgrund fehlender Glykosylierung in der Hefe inaktiv vorlagen, konnte somit widerlegt werden (Kasahara und Kasahara, 1996; 1997). Eine Erklärung für die Retention der Glukosetransporter aus Säugetieren könnte auch der Einfluß endogener Hefefaktoren sein, die die Transporter-Translokation zur Zelloberfläche verhindern.

Weitere Experimente zur Charakterisierung der Glukosetransporteigenschaften und der Lokalisierung der Glukosetransporter aus Säugetieren wurden in einem Hefestamm durchgeführt, der keine endogenen Hexosetransporter ( $hxt^-$ ) mehr besitzt (Wieczorke *et al.*, 1999; 2002). Die Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 aus Mensch und Ratte in einem hexosetransport-defizienten Hefestamm ( $hxt^-$ ) hat jedoch gezeigt, daß die heterolog exprimierten Glukosetransporter das Wachstum des Hefestammes auf Glukose als einziger Kohlenstoffquelle nicht wieder herstellen konnten (Wieczorke *et al.*, 2002). GFP-Fusionen der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 haben die Ergebnisse von Kasahara und Kasahara in dem  $hxt^-$ -Stamm nur für GLUT4 bestätigt. Es konnte gezeigt werden, daß GLUT1 in dem  $hxt^-$ -Stamm an der Zelloberfläche lokalisiert und daß GLUT4 in intrazellulären Strukturen zurückgehalten wird. Bei der Suche nach GLUT1- und GLUT4-Suppressormutanten konnte durch UV-Mutagenese

eine hefeeigene *fgy1-1*-Mutation („functional expression of GLUT1 in yeast“) identifiziert werden, die zur funktionellen Expression von GLUT1 im *hxt<sup>-</sup>*-Stamm führte. Während für die funktionelle Expression des Wildtyp-GLUT1 eine einzelne genomische Mutation im *FGY1*-Gen ausreicht, wird für GLUT4 eine weitere Mutation benötigt, die die intrazelluläre Retention des Transporters aufhebt. Während der Suche nach spontanen Suppressoren des Glukosetransportdefektes von GLUT4-exprimierenden *hxt<sup>-</sup> fgy1-1*-Zellen konnten Mutanten isoliert werden, die mit *fgy4X* („functional expression of GLUT4 in yeast“; X steht für die unterschiedlichen *FGY4*-Allele oder unterschiedliche betroffene Gene von 1 bis 9) bezeichnet wurden und in Kombination mit der *fgy1-1*-Mutation auch die funktionelle Expression von GLUT4 in Hefe erlauben.

#### 4.1.1 Charakterisierung der *fgy4X*-Mutationen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß es sich bei acht von neun *fgy4X*-Mutationen um rezessive Mutationen handelte. Die rezessiven Allele *fgy41-49* sollten durch Komplementation mit einer Genbank identifiziert werden. Es konnten vier GLUT4-Transformanten isoliert werden, die in Wachstumstests durch Komplementation mit einem Genbankplasmid Resistenz gegenüber dem toxischen Glukoseanalog 2-DOG aufwiesen und nicht mehr in der Lage waren, auf glukosehaltigem Medium zu wachsen. Nach der Sequenzierung der entsprechenden Genbankplasmide wurden die identifizierten Genbereiche subkloniert. In einem Fall konnte das Gen *CTR3*, das für einen hoch-affinen Kupfertransporter kodiert, als Multicopy-Suppressor für die Komplementation verantwortlich gemacht werden. Es ist gut möglich, daß durch eine vermehrte Expression des Kupfertransporters eine Überlastung des Sekretionsweges zu einer Blockierung der GLUT4-Sekretion geführt hat und durch das Fehlen eines funktionellen Glukosetransporters in der Plasmamembran kein Wachstum der Zellen auf glukosehaltigem Medium mehr möglich war. Auf einem weiteren Genbankplasmid konnte das *TRP1*-Gen für das Wachstumsverhalten der Transformanten auf glukosehaltigem Medium verantwortlich gemacht werden. Wenn es in den Transformanten zum Verlust des GLUT4-Plasmides gekommen ist, welches ein *TRP1*-Gen als Selektionsmarker trägt, und das Genbankplasmid, welches ein *URA3*-Selektionsmarkergen enthält, zufällig ein *TRP1*-Gen trägt, waren die Zellen nicht mehr in der Lage auf glukosehaltigem Medium zu wachsen, da sie keinen funktionellen Glukosetransporter mehr exprimierten. Das Wachstum auf Maltosemedium ohne Tryptophan und ohne Uracil wurde dann alleine durch das Genbankplasmid gewährleistet, welches sowohl das *URA3*-Selektionsmarkergen als auch ein *TRP1*-Gen enthielt. Ein anderes Genbankplasmid enthielt

das *FGY1*-Gen, welches die *fgy1-1*-Mutation der Transformanten unterdrückte, weshalb die Zellen nicht mehr auf glukosehaltigem Medium wachsen konnten. Die *fgy1-1*-Mutation ist eine Voraussetzung für die funktionelle Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4. Von den identifizierten Genen *SSK22*, *SOL2*, *ERS1*, *YCR076c* des letzten Genbankplasmides konnten bis auf *SOL2* alle Gene subkloniert werden. Es zeigte sich jedoch, daß keines der subklonierten Gene für den Wachstumsdefekt der GLUT4-Transformanten verantwortlich gemacht werden konnte. Aus diesem Grund konnte nur das Gen *SOL2* für den Wachstumsdefekt der GLUT4-Transformanten verantwortlich sein. *SOL2* kodiert sehr wahrscheinlich für eine 6-Phosphoglukonolaktase, die an der Umwandlung von 6-Phosphoglukonolaktat zu 6-Phosphoglukonat beteiligt ist. Eine Überexpression von *SOL2* durch das Genbankplasmid könnte zur Überproduktion des für die Zelle toxischen 6-Phosphoglukonats geführt haben, was in diesem Fall dazu geführt hat, daß die Zellen nicht mehr in der Lage waren, auf glukosehaltigem Medium zu wachsen (Lobo und Maitra, 1982).

#### 4.1.2 Identifizierung eines endogenen Hefefaktors, der die funktionelle GLUT4-Expression inhibiert

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe einer Insertionsgenbank (Transposon-genbank) zwei *hxt<sup>-</sup> fgy1-1 fgy4X*-Mutanten isoliert, die in der Lage waren, mit GLUT4 wieder auf Glukosemedium zu wachsen. Genfragmente der Transposon-Genbank hatten sich in einem Fall spontan in das Gen *ERG4* und in dem anderen Fall spontan in das Gen *YLR143w* integriert, wodurch die jeweiligen Gene inaktiviert wurden. Die Deletion der Gene *ERG4* und *YLR143w* im *fgy1-1*-Mutantenstamm hat gezeigt, daß nur das *ERG4*-Genprodukt einen negativen Einfluß auf die GLUT4-Translokation zur Zelloberfläche bzw. auf die Funktionalität von GLUT4 hatte. Weshalb die Deletion von *YLR143w* in einem *fgy1-1*-Mutantenstamm nicht den gleichen Phänotyp wie die Transposon-Insertionsmutante hervorgebracht hat und zur funktionellen Expression von GLUT4 geführt hat, könnte unterschiedliche Gründe haben. Zum einen könnte eine zusätzliche Mutation im *hxt<sup>-</sup> fgy1-1*-Mutantenstamm in Wirklichkeit dafür verantwortlich gewesen sein, daß die *ylr143w*-Insertionsmutante mit GLUT4 Wachstum auf Glukosemedium zeigte. Zum anderen ist es auch möglich, daß sich parallel zur Transposoninsertion in *YLR143w* noch ein weiteres Genfragment in ein zusätzliches Gen inseriert hat, dessen Genprodukt tatsächlich einen Einfluß auf die GLUT4-Translokation ausübt, aber welches in der Analyse nicht identifiziert wurde.

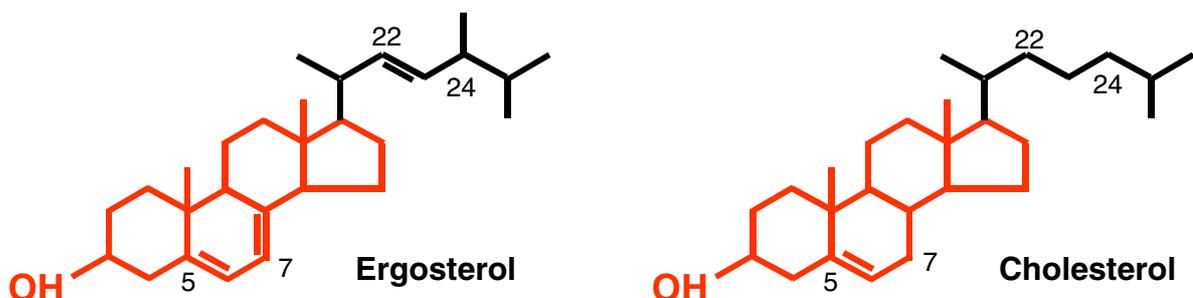
*ERG4* kodiert für eine Sterol-C-24(28)-Reduktase, welche den letzten Schritt der Ergosterolbiosynthese katalysiert. Eine Deletion des *ERG4*-Gens führt dazu, daß der jeweilige Hefestamm kein Ergosterol mehr produziert und die Vorstufe Ergosta-5,7,22,25(28)-Tetraen-3 $\beta$ -ol in der Zelle akkumuliert (Zweytick *et al.*, 2000). Ergosterol ist mit ca. 89.5 % das Hauptsterol in der Plasmamembran der Hefe und für die Membranpermeabilität, Fluidität und Aktivität von Membranproteinen verantwortlich (Cobon und Haslam, 1973; Lees *et al.*, 1979; 1989; Bard *et al.*, 1978; Kleinhans *et al.*, 1979; Zweytick *et al.*, 2000). Es stellte sich die Frage, ob das Ergosterol in der Hefemembran evtl. einen negativen Einfluß auf die GLUT4-Funktionalität bzw. die Translokation zur Zelloberfläche haben konnte, da das Hauptsterol der Säugerzellen das verwandte, aber strukturell unterschiedliche Cholesterol ist (Abb. 22). Ebenso konnte nicht ausgeschlossen werden, daß Erg4, welches in der Membran des endoplasmatischen Retikulums lokalisiert ist, einen direkten Einfluß auf die GLUT4-Translokation vom endoplasmatischen Retikulum zur Zelloberfläche hat. Saccharosedichte-Gradienten-Experimente zeigten, daß GLUT4 in einem *ERG4*-Wildtypstamm zum größten Teil mit dem endoplasmatischen Retikulum Markerprotein Dpm1 kolokalisierte, was darauf hindeutet, daß GLUT4 am oder im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wird. In einem *erg4*-Deletionsstamm konnte eine deutliche Verschiebung von GLUT4 zu Fraktionen höherer Dichte beobachtet werden, in denen sich Proteine der Plasmamembran (z.B. Pma1) akkumulieren. Zur Klärung dieser Fragen wurde die GLUT4-Funktionalität ebenfalls in einer *erg5*-Deletionsmutante und einer *erg4erg5*-Doppeldelentionsmutante überprüft. *ERG5* kodiert für eine C-22-Steroldesaturase, welche den vorletzten Schritt der Ergosterolbiosynthese katalysiert. Ebenso wie *ERG4* ist auch *ERG5* nicht essentiell für die Hefe, da sowohl bei einer *erg4*- als auch einer *erg5*-Deletion die akkumulierten Sterolintermediate in die Hefemembran eingelagert werden. Obwohl weder die *erg5*-Deletionsmutante noch die Doppeldelentionsmutante kein Ergosterol mehr produzierten, was anhand von gaschromatographischen Analysen bestätigt wurde, zeigte sich nur in der *erg4erg5*-Doppeldelentionsmutante mit GLUT4 Wachstum auf glukosehaltigem Medium. Dieses Ergebnis hat deutlich gezeigt, daß sowohl das Hauptsterol Ergosterol als auch das in einer *erg5*-Deletionsmutante gebildete Ergosta-5,7-dienol einen negativen Einfluß auf die GLUT4-Translokation haben müssen.

Mit Hilfe von Split-Ubiquitin-Interaktionstests konnte sowohl eine Interaktion zwischen Erg4 und GLUT4 nachgewiesen werden als auch eine ebenso starke Interaktion zwischen Erg4 und dem humanen Glukosetransporter GLUT1 und den hefeeigenen Hexosetransportern Hxt1 und Hxt9. Da weder die Funktionalität noch

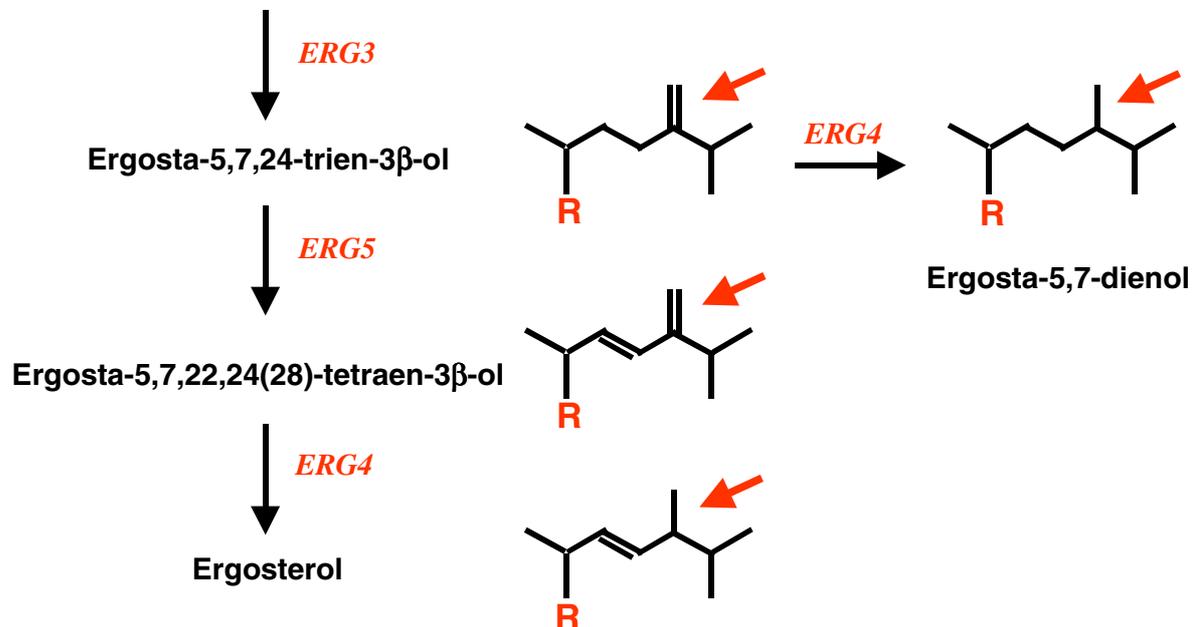
die Translokation der Transporter GLUT1, Hxt1 und Hxt9 in einem *ERG4*-Wildtypstamm negativ beeinflusst werden, kann man davon ausgehen, daß die Interaktion zwischen Erg4 und den untersuchten Membrantransportproteinen nicht spezifischer Natur ist, sondern allein durch die Tatsache zu begründen ist, daß die Transportproteine auf ihrem Weg durch das endoplasmatische Retikulum und bei der Bildung sekretorischer Vesikel in die räumliche Nähe des dort lokalisierten Erg4 gebracht werden und es somit zur Interaktion kommt.

Nachdem die Ergebnisse gezeigt haben, daß sowohl Ergosterol als auch Ergostadienol einen direkten Einfluß auf GLUT4 haben müssen, die Sterolreduktase Erg4 jedoch keinen direkten Einfluß auf GLUT4 zu haben scheint, stellte sich weiterhin die Frage, weshalb GLUT4 in einem *erg4*- bzw. einem *erg4 erg5*-Deletionsstamm funktionell exprimiert wurde, in einem *erg5*-Deletionsstamm jedoch nicht. Wie bereits in der Literatur beschrieben, verläuft die Ergosterolbiosynthese nicht linear. Das bedeutet, auch wenn die Deletion eines *ERG*-Gens zur Akkumulation eines Sterolintermediates führt, kann dieses dennoch von den Enzymen, die in der Ergosterolbiosynthese folgen, weiter umgesetzt werden. In diesem Fall bedeutet es, daß die in einem *erg5*-Deletionsstamm akkumulierte Sterolzwischenstufe Ergostatrienol durch die Sterolreduktase Erg4 weiter zu Ergostadienol umgewandelt wird (Smith *et al.*, 1996). Wenn man die Sterolintermediate der Plasmamembranen der verschiedenen *erg*-Deletionsmutanten vergleicht, so fällt auf, daß GLUT4 immer dann funktionell exprimiert wird, wenn die Sterolseitenkette eine Methylengruppe am C-24 Atom aufweist (Abb. 23). In einer *erg4*-Deletionsmutante ist das Hauptsterol der Plasmamembran Ergostatetraenol und in einer *erg4erg5*-Doppeldeletionsmutante ist Ergostatrienol das Hauptsterol.

**Abb. 22: Struktureller Unterschied zwischen dem Hauptsterol „Ergosterol“ der Hefe und dem Hauptsterol „Cholesterol“ in Säugerzellen.** Ein Hauptunterschied ist die zusätzliche Methylgruppe am C-24-Atom im Ergosterol.



**Abb. 23: Darstellung der letzten enzymatischen Schritte der Ergosterolbiosynthese.** Die Ergosterolbiosynthese verläuft nicht strikt linear, das bedeutet, in einer *erg5*-Deletionsmutante wird das Zwischenprodukt Ergostatrienol von der Sterolreduktase Erg4 zu Ergostadienol umgewandelt.



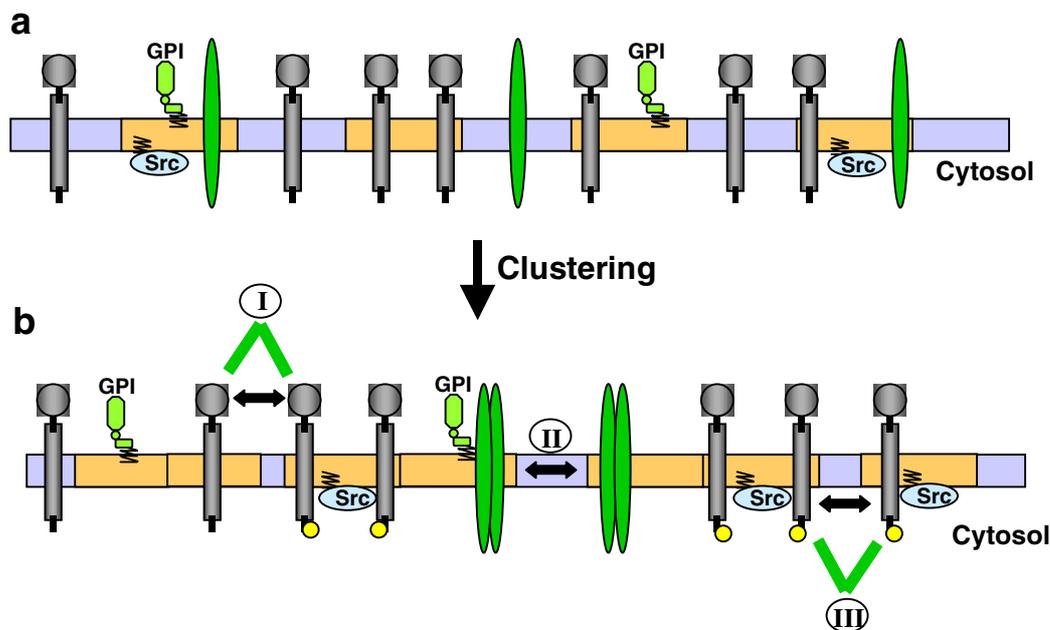
Es ist gut möglich, daß die GLUT4-Transportproteine bei der Bildung der sekretorischen Vesikel am endoplasmatischen Retikulum (ER) durch eine direkte Bindung an die Methylgruppe der Sterolseitenkette an die Sterolintermediate Ergostatetraenol bzw. Ergostatrienol, deren Synthese durch ER-lokalisierte Enzyme erfolgt, zur Plasmamembran gelangen. Das würde auch bedeuten, daß die Methylgruppe der Sterolseitenkette im Fall von Ergosterol und Ergostadienol zu einer Hemmung der GLUT4-Translokation führt, falls keine Bindung über die Methylgruppe an GLUT4 möglich ist. Diese Annahme wird gestützt durch die Vorgänge des Proteintransports in Säugerzellen und die Beteiligung sogenannter Lipid-Rafts an der Vesikelbildung und Translokation von Proteinen zur Plasmamembran, wo es zu einer direkten Interaktion zwischen Cholesterol und Membranproteinen kommt. Es konnte gezeigt werden, daß Cholesterol die Funktion integraler Membranproteine durch direkte Bindung beeinflussen kann. Transportproteine wie der Serotonintransporter (SERT) oder der GABA-Transporter (GAT) zeigten bei einer verminderten Cholesterolkonzentration in der Zelle eine deutliche Reduzierung der Substrataffinität und der maximalen Transportrate und auch Rezeptorproteine wie der Transferrin-Rezeptor oder der Nikotin-Acetylcholinrezeptor wurden negativ beeinflusst (Scanlon *et al.*, 2001; Shouffani und Kanner, 1990; Nunez und Glass, 1982; Narayanaswami und McNamee,

1993; Fernandez-Ballester *et al.*, 1994). Ebenso wie die Translokation und Aktivität einiger Säugerproteine durch die Bindung an Cholesterol beeinflusst werden kann, wäre es auch vorstellbar, daß das Ergosterol in der Hefe eine ähnliche Aufgabe bei Hefeproteinen übernimmt. Dann könnte es ebenfalls möglich sein, daß Säugerproteine vielleicht eine spezielle Erkennungssequenz für die Cholesterolbindung besitzen, die jedoch nicht von Ergosterol erkannt wird.

In Säugerzellen spielen Lipid-Rafts eine große Bedeutung bei der Protein-sortierung, Vesikelformation, Vesikeltranslokation, dem Andockprozeß und der Fusion von sekretorischen Vesikeln. Lipid-Rafts sind dynamische Lipid-Domänen, die mit Cholesterol und Sphingolipiden angereichert sind. Diese Mikrodomänen können durch Protein-Protein-Interaktion oder Protein-Lipid-Interaktion selektiv Proteine aufnehmen und wieder entlassen (Ikonen, 2001). Man geht davon aus, daß Lipid-Rafts auch selektiv die apikale Protein- und Lipid-Lokalisierung in Epithelzellen vermitteln (Simons und Ikonen, 1997). Es zeigte sich, daß Lipid-Rafts an der vesikotubulären Verschmelzung beteiligt sind und diese viel stärker bei der Sekretion als Vermittler zwischen dem ER und dem Golgi-Komplex operieren als die bisher vermuteten sekretorischen Vesikel. Tubuläre Strukturen sind auch beteiligt am intra-Golgi-Transport, am retrograden Golgi-ER-Transport und am Transport zwischen dem Transgolginetzwerk (TGN) und der Plasmamembran (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2000; Polishchuk *et al.*, 2000). Eine Protein-Oligomerisierung wird ebenfalls durch die Assoziierung mit intrazellulären Membran-Lipid-Rafts vermittelt und erleichtert (Marchand *et al.*, 2002). Membranproteine können in drei Kategorien unterteilt werden, jene, die hauptsächlich in Rafts vorkommen, jene, die in der ungeordneten „flüssigen“ Phase der Membran lokalisiert sind, und solche, die sich ständig in und aus Rafts bewegen. Konstitutive Raft-Proteine sind z.B. GPI-verankerte Proteine, doppelt-acetylierte Proteine, wie die Tyrosinkinasen der Src-Familie,  $G_{\alpha}$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine, Cholesterol-gebundene und palmitylierte Proteine, sowie Transmembranproteine, wie z.B. einige Transport- oder Sensorproteine (Simons und Toomre, 2000). Die Entfernung des Cholesterols aus Rafts, zum Beispiel mit Hilfe von Komplexbildnern, führt zur Dissoziation der meisten Proteine aus den Rafts und zum Verlust der Proteinfunktionalität. Es konnte gezeigt werden, daß Signalproteine in Rafts in einer „off“-Phase gehalten werden und erst nach Zusammenschluß mehrerer Rafts zu einer großen Plattform auf Proteine des gleichen Signaltransduktionsweges treffen, wodurch sie dann aktiviert werden (Simons und Ehehalt, 2000). Hieran beteiligt sind auch sogenannte „Caveolae“-Strukturen, die durch kleine Oberflächeneinschlüsse in einigen Zellen, wie z.B. Fettzellen, Endothelzellen und Muskelzellen, an der Plasmamembran entstehen.

Man nimmt an, daß diese Caveolae-Strukturen durch eine Anhäufung von Rafts an der Zelloberfläche gebildet werden und die Polymerisierung mit Hilfe von drei Caveolinproteinen eingeleitet wird (Kurzchalia und Parton, 1999; Drab *et al.*, 2001).

**Abb. 24: Mechanismen des Raft-Clusterings.** a) Kleine Rafts (orange) in der Plasmamembran, die nur wenige Proteine enthalten. b) Raftdomänen durch Zusammenlagerung gewachsen, wodurch es zur Durchmischung der Proteine kommt. Raft-Zusammenlagerung wird gefördert durch (I) extrazelluläre Liganden, Antikörper oder Lektine, (II) innerhalb der Membran durch Oligomerisierung, oder (III) durch zytosolische Argentinien (Zytoskelett-Elemente, Adapterproteine). Raft-Clustering erfolgt an der Plasmamembran und intrazellulär, z.B. im endosomalen Lumen. Ligandenbindung oder Oligomerisierung verändern Proteinverteilung in oder aus den Rafts. Gesteigerte Raft-Affinität eines Proteins und seine Aktivierung innerhalb der Rafts (z.B. Phosphorylierung durch Kinasen der Src-Familie [gelb]) kann eine Kaskade von Ereignissen auslösen, oder eine weitere Raft-Zusammenlagerung. (Simons und Ehehalt, 2002).



In einem Paper aus diesem Jahr wurde gezeigt, daß mehr als 70% der an der GLUT4-Vesikelfusion beteiligten v-SNARE-Proteine (VAMP2) und ca. 35% der t-SNARE-Proteine (SNAP-23 und Syntaxin 4) in Fettzellen mit den Plasmamembran-Lipidrafts assoziiert sind (Chamberlain und Gould, 2002). Diese Studie hat ebenfalls gezeigt, daß eine Insulinstimulation keinen Effekt auf die Plasmamembran-Raft-Assoziierung von SNAP-23 und Syntaxin 4 hatte, jedoch die VAMP2-Insertion in die Plasmamembran-Rafts induziert hat. Lipid-Rafts sind eine wichtige Plattform für die GLUT4-Vesikelfusion und man nimmt an, daß solche Rafts eine Verbindung zwischen dem Insulinsignal und dem Membrantransport herstellen (Chamberlain und Gould, 2002).

Ähnlich wie für Säugerzellen beschrieben (Harder und Simons, 1997; Anderson, 1998; Brown und London, 1998), scheint es auch in der Hefe durch die Assoziation zwischen Ergosterol und Sphingolipiden zur Bildung sogenannter „Lipid-Rafts“ zu kommen, die als Plattform für die Rekrutierung und die Internalisierung spezifischer Proteine dienen (Munn *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu Säugerzellen, wo die Bildung der Lipid-Rafts im Golgi-Komplex stattfindet, werden diese in Hefezellen bereits im endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet (Bagnat *et al.*, 2000). Die Ergebnisse der Saccharosegradienten-Experimente deuten darauf hin, daß die GLUT4-Translokation auch in Hefe ebenfalls über Lipid-Rafts gesteuert sein könnte, da GLUT4 in einem *ERG4*-Wildtypstamm mit dem ER-Marker Dpm1 kolokalisiert, was darauf hindeutet, daß GLUT4 am ER zurückgehalten wird. Es wäre möglich, daß es bei der Bildung der Lipid-Rafts im ER zwischen dem Ergosterol der Hefe und GLUT4 nicht zu einer Interaktion kommt, und GLUT4 aus diesem Grund nicht über die Lipid-Rafts zur Plasmamembran transloziert wird. Es wäre auch denkbar, daß sich die Lipid-Rafts in einer *erg4*- und einer *erg4erg5*-Deletionsmutante aus den Ergosterolvorstufen Ergostatrienol oder Ergostatetraenol zusammensetzen, es zu einer direkten Interaktion über die Methylengruppe der Sterolseitenkette mit GLUT4 kommt und die Translokation zur Plasmamembran somit ermöglicht wird.

In Säugerzellen wird GLUT4 ebenfalls in intrazellulären Strukturen zurückgehalten, jedoch ist diese Retention nicht mit der GLUT4-Retention in Hefe vergleichbar. Die Glukosetransportproteine werden in Fett- und Muskelzellen nach der Synthese in speziellen Speicherkompartimenten angereichert und erst durch ein Insulinsignal, welches eine Signalkaskade auslöst, kommt es zur vermehrten GLUT4-Translokation zur Plasmamembran. Man geht davon aus, daß in Säugerzellen die Bildung der Lipid-Rafts erst nach dem Insulinsignal an der GLUT4-Translokation zur Zelloberfläche beteiligt sind. Beim Vergleich der GLUT4-Translokation in Säuger- und Hefezellen ist also zu berücksichtigen, daß die GLUT4-Translokation in Hefe ohne ein Insulinsignal eingeleitet wird und die Hefe keine spezifischen GLUT4-Speichervesikel besitzt.

Es stellt sich allerdings die Frage, weshalb der humane Glukosetransporter GLUT1 auch in Zellen, die Ergosterol als vorrangiges Membransterol enthalten, nicht intrazellulär zurückgehalten wird und weshalb die humanen Glukosetransporter GLUT2, 3 und 5 weder in einer *fgy1-1*-Mutante noch in einer *fgy1-1 Δerg4*-Mutante funktionell exprimiert werden können (Daten nicht gezeigt). Es ist nicht auszuschließen, daß die Hefe weitere endogene Faktoren besitzt, die die funktionelle Expression der Glukosetransporter GLUT2, 3 und 5 negativ beeinflussen. Um die genauen Abläufe der Sterol-GLUT4-Interaktion bei einer evtl.

Bildung von Lipid-Rafts im endoplasmatischen zu verstehen und zu bestätigen, wäre der nächste Schritt die Deletion des *ERG6*-Gens in einer *fgy1-1*-Mutante. *ERG6* kodiert für eine C-24-Sterolmethyltransferase, welche den Schritt vom Zymosterol zum Fecosterol katalysiert und welche durch das Hinzufügen einer Methylengruppe an das C-24-Atom in der Sterolseitenkette verantwortlich ist. Sollte es tatsächlich bei der Bildung von Lipid-Rafts im ER zu einer Interaktion zwischen GLUT4 und der Methylengruppe in der Sterolseitenkette der Ergosterol-intermediate kommen, dürfte GLUT4 in einer *erg6*-Deletionsmutante durch das hier entstehende Zymosterol nicht gebunden werden und auch nicht zur Zelloberfläche transloziert werden. Wenn GLUT4 in einer *erg6*-Deletionsmutante nicht funktionell exprimiert werden kann, dürften weitere Saccharosegradient-Experimente Aufschluß über den Grad der GLUT4-Retention geben. Ebenso könnten in diesem Zusammenhang weitere Saccharosegradienten-Experimente auch Aufschluß über den Grad der GLUT4-Retention bzw. Translokation in einer *erg5*- und einer *erg4erg5*-Deletionsmutante geben. Die Eigenschaft der Lipid-Rafts, in Dichtegradienten in Form von Detergenz-unlöslichen Glykolipid-angereicherten Komplexen (DIGs) zu schweben, bietet die Möglichkeit, sie durch Isolation aus Hefe auf ihre Zusammensetzung zu überprüfen (Bagnat *et al.*, 2000). In einem *erg4*- und einem *erg4erg5*-Deletionsstamm sollte man nach der oben beschriebenen Theorie GLUT4 als ein Bestandteil der DIGs in anschließenden SDS/PAGEs charakterisieren können, in einem *erg5*-Deletionsstamm hingegen nicht.

#### 4.2 Interaktion zwischen GLUT4 und homologen Transportproteinen

Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, daß die Aktivität einiger Proteine durch die Bildung makromolekularer Proteinkomplexe beeinflusst und reguliert wird. Man kennt homooligomere und heterooligomere Komplexe (Wes *et al.*, 1999; Veenhoff *et al.*, 2002; Reinders *et al.*, 2002). Mit Hilfe des in Hefe etablierten Two-Hybrid-Interaktionssystems konnten systematisch oligomere Strukturen löslicher Proteine nachgewiesen werden (Ito *et al.*, 2000, 2001; Schwikowski *et al.*, 2000). Da dieses System jedoch auf den Nachweis der Interaktion löslicher Proteine bzw. auf Proteindomänen begrenzt ist, weiß man noch wenig über die Interaktion von Membranproteinen und die Bildung möglicher oligomerer Komplexe. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, daß Chlorid- und Kaliumkanäle als Dimere und Tetramere in der Membran existieren (Ludewig *et al.*, 1996) und auch für einige bakterielle Transporter löslicher Substanzen konnte eine Oligomerisierung nachgewiesen werden (Heuberger *et al.*, 2002; Veenhoff *et al.*, 2002).

Ein bereits sehr gut untersuchter Metabolitransporter ist der humane Erythrozyten-Transporter GLUT1. Studien haben gezeigt, daß dieser als Homotetramer bzw. als Dimer aus Dimeren in der Plasmamembran vorliegt und der Status jeder einzelnen Untereinheit Einfluß auf die anderen Untereinheiten hat, wodurch die Funktion des Glukosetransporters kontrolliert wird (Hebert und Carruthers, 1992; Zottola *et al.*, 1995; Hamill *et al.*, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe des in der Hefe etablierten und modifizierten Split-Ubiquitin-Systems (SUS) die Interaktion zwischen zwei identischen Glukosetransportproteinen und auch zwischen unterschiedlichen Glukosetransportproteinen untersucht. Es stellte sich nämlich die Frage, ob der humane Glukosetransporter GLUT1, der in der Hefe funktionell exprimiert werden kann, hier ebenfalls als Oligomer vorliegt und ob dies auch für GLUT4 gilt. Die in dieser Arbeit zu untersuchenden Proteine wurden mit je einer Hälfte des Ubiquitinmoleküls fusioniert, wobei an die C-terminale Hälfte von Ubiquitin (Cub) noch zusätzlich ein Reporterprotein fusioniert wurde. Durch Interaktion der zu untersuchenden Proteine wurden der N-terminale Teil (Nub) und der C-terminale Teil (Cub) in räumliche Nähe gebracht, so daß wieder ein natives Ubiquitinmolekül entstehen konnte. Das Ubiquitinmolekül wurde von einer Ubiquitin-spezifischen Protease erkannt, welche dann das Reporterprotein „PLV“ oder „RUra3“ abgespalten hat. Das Reporterprotein „PLV“ gelangte in den Zellkern und aktivierte dort ein spezifisches Reporterogen, in diesem Fall das *lacZ*-Gen. Die Expression des *lacZ*-Gens wurde zuerst qualitativ mit Hilfe von X-Gal-Overlays und anschließend quantitativ durch Messung der Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase bestimmt. Das nach der Interaktion der Ubiquitinhälften abgespaltene Reporterprotein „RUra3“ wurde anschließend sofort nach der „N-End-Rule“ in der Zelle abgebaut, so daß die Zellen Uracil-auxotroph wurden und nicht mehr in der Lage waren, auf Medium ohne Uracil zu wachsen. In SUS-Tests konnte gezeigt werden, daß eine schwache Interaktion zwischen zwei GLUT1- und auch zwischen zwei GLUT4-Proteinen besteht, die im prozentualen Vergleich identisch ist. Aufgrund der starken Homologie zwischen den Glukosetransportproteinen GLUT1 und GLUT4 war es ebenfalls denkbar, daß es auch zur Bildung heterodimerer Transportkomplexe kommen kann. Auch in diesem Fall konnte durch SUS-Tests eine schwachen Interaktion zwischen GLUT1 und GLUT4 bestätigt werden. Es stellte sich jedoch die Frage, ob eine in Hefe gezeigte Interaktion zwischen GLUT1 und GLUT4 auch in Säugerzellen physiologisch signifikant sein kann, da beide Glukosetransporter-Isoformen in dem selben Gewebe exprimiert werden. Es wird derzeit spekuliert, daß die Bildung heterologer Transportkomplexe eine zusätzliche Dynamik und Flexibilität in Bezug auf die Regulation des Stofftransportes haben könnte (Reinders *et al.*, 2002). Allerdings ist zu bemerken, daß die Interaktion deutlich stärker ist, wenn das GLUT1-Protein

C-terminal mit dem Cub-PLV-Protein und das GLUT4-Protein N-terminal mit dem Nub-G-Protein fusioniert ist. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß eine N-terminale Fusion an GLUT4 nicht zum Verlust der Funktionalität führt, was bedeutet, daß der Transporter zur Plasmamembran transloziert wird und dort mit GLUT1 oder sich selbst interagieren kann. Eine C-terminale Fusion an GLUT4 kann zum einen durch mögliche Fehlfaltung zur Degradation und gleichzeitig zum Verlust der Funktionalität führen, was auch die starke Hintergrundaktivität in diesen Tests erklären würde. Zum anderen es ist aber auch möglich, daß die Cub-Bindestelle durch Faltung des Fusionsproteins nicht mehr frei für die Nub-Hälfte zugänglich ist und es hierdurch zu einer schwächeren Interaktion kommt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß unterschiedliche GLUT-Transporter miteinander interagieren und im Vergleich dazu konnten Reinders *et al.* in Split-Ubiquitin-Interaktions-Versuchen in Hefe mit pflanzlichen Suc-Transportern zeigen, daß auch unterschiedliche Suc-Transporter miteinander interagieren. Es wird spekuliert, daß die Bildung heterooligomerer Komplexe eine zusätzliche Dynamik und Flexibilität in Bezug auf die Regulation des Saccharose-Transportes bedeutet (Reinders *et al.*, 2002). Ebenso konnte eine schwache Interaktion zwischen Sut2 und dem verwandten Hexosetransporter Stp1 gezeigt werden (Reinders *et al.*, 2002). In dieser Arbeit zeigte sich eine schwache Interaktion zwischen GLUT4 und den verwandten Glukosetransportern Hxt1 und Hxt9. Diese Ergebnisse haben gezeigt, daß strukturell verwandte Mitglieder einer Superfamilie ebenfalls in der Lage sind, miteinander zu interagieren, wenn auch in einem geringeren Ausmaß. Es ist gut möglich, daß die schwachen Interaktionen durch die Ko-Existenz der Proteine in dem selben Zellkompartiment zustande kommen, was auch die Interaktion zwischen dem ER-lokalisierten Erg4 mit verschiedenen Transportproteinen erklären würde. Die Kollision von Membranproteinen, die nicht Teil eines Komplexes sind, aber im selben Zellkompartiment lokalisiert sind, konnte schon früher am Beispiel von Proteinen des endoplasmatischen Retikulums in Hefe gezeigt werden (Wittke *et al.*, 1999). Die derzeit viel diskutierte Bildung von Lipid-Rafts als große Membrankomplexe, die an der Proteintranslokation beteiligt sind, könnte ebenfalls eine Erklärung für die schwache Interaktion aufgrund räumlicher Nähe sein (Simons und Toomre, 2000).

Mit Hilfe des Split-Ubiquitin-Systems konnte zusätzlich gezeigt werden, daß zwischen GLUT4 und Fgy1 keine direkte Interaktion besteht. Eine *fgy1-1*-Mutation ist zwar eine Voraussetzung für die funktionelle Expression des humanen Glukosetransporters GLUT4 in Hefe, allerdings scheint sich Fgy1 nicht durch direkte Interaktion auf die Funktionalität bzw. Translokation von GLUT4 auszu-

wirken. Die tatsächliche Funktion von Fgy1 bei der funktionellen Expression von GLUT1 und GLUT4 ist noch weitgehend unbekannt.

### 4.3 Vor- und Nachteile des SUS-Systems

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Split-Ubiquitin-System (SUS) zum Nachweis der Interaktion zwischen Membranproteinen wurde ursprünglich zum Nachweis der *in vivo* Interaktion zwischen zytosolischen Proteinen von Johnsson und Varshavsky entwickelt (Johnsson und Varshavsky, 1994). Später wurde es verwendet, um Interaktionen zwischen Proteinsignalsequenzen und einem Mitglied der ER-Translokationsmaschinerie aufzudecken (Dünnwald *et al.*, 1999), um nach Proteinen in der direkten Umgebung von Membranproteinen zu suchen (Wittke *et al.*, 1999), um die Interaktion zwischen transkriptionellen Regulatoren zu studieren (Laser *et al.*, 2000; Rojo-Niersbach *et al.*, 2000) und um die Faltungsmechanismen löslicher Proteine zu bestimmen (Raquet *et al.*, 2001). Es diente ebenfalls dazu, die Interaktion zwischen Membranproteinen zu studieren, da dies mit dem konventionellen in Hefe etablierten Two-Hybrid-System nicht möglich war (Stagljar *et al.*, 1998; Stagljar und te Heesen, 2000). Die Wahl der jeweiligen Reporterproteine kommt auf die Art des Interaktionsnachweises an, da es sowohl bei der Verwendung des Reporterproteins „PLV“ als auch mit „RUra3“ Vor- und Nachteile gibt, was sich im Rahmen dieser Arbeit eindeutig herausgestellt hat. Der Vorteil des Reporterproteins PLV war, daß eine Interaktion zwischen zwei Proteinen bereits durch X-Gal-Overlays mit den Transformations-Agarplatten nachgewiesen werden konnte. Außerdem konnte die Stärke der Interaktion durch die quantitative Messung der Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase bestimmt werden und mit anderen Proteinen verglichen werden. Ein Nachteil des Reporterproteins PLV ist, daß es z.B. durch Fehlfaltung, wie es für GLUT4 angenommen wurde, zur Degradation des mit dem Cub-PLV-fusionierten Proteins kommen kann, wodurch es ebenfalls zur Freisetzung des PLV und einer Expression des *lacZ*-Gens kommen kann. Die Stärke der Hintergrundaktivität läßt sich mit einfachen X-Gal-Overlays nicht bestimmen, hierzu sind quantitative Messungen der  $\beta$ -Galaktosidase besonders wichtig. Der Vorteil des RUra3-Reporterproteins ist die Tatsache, daß man eine Interaktion zwischen zwei Proteinen bereits durch einfache Wachstumstests auf Agarplatten nachweisen kann oder die Wachstumsgeschwindigkeit in Flüssigmedium pro Minute messen kann. Findet keine Interaktion zwischen den zu untersuchenden Proteinen statt, wird das Ura3-Protein als Fusionsprotein gebildet und die Zellen sind in der Lage, Uracil selbst zu synthetisieren und auf Uracil-freiem Medium zu wachsen. Bei einer Interaktion wird das Ura3-Protein abgespalten und abgebaut und die Zellen können im

Kontrollexperiment auf Medium mit FOA wachsen. FOA (Fluor-Orotsäure) wird dem Medium als Indikator zugegeben, da es in Zellen, die Ura3 synthetisieren, in das toxische Fluor-Uracil umgewandelt wird, und diese Zellen dann auf Medium mit FOA nicht mehr wachsen können. Der Nachteil des RUra3-Reporterproteins ist, daß man nur zwischen Wachstum und Nicht-Wachstum unterscheiden kann, also auf Interaktion oder Nicht-Interaktion schließen kann. Im Fall von Protein-degradation wird das Ura3-Protein ebenfalls abgebaut und man kann durch einfache Wachstumstests nicht eindeutig zwischen Hintergrundaktivität und tatsächlicher Interaktion unterscheiden. Der Interaktionsnachweis mit dem RUra3-Reporterprotein hat sich im Rahmen dieser Arbeit als nicht sensitiv genug herausgestellt und bot auch nicht die Möglichkeit, zwischen Interaktionen verschiedener Proteine zu vergleichen.

Insgesamt ist das Split-Ubiquitin-System nur begrenzt einsetzbar, da die N- und C-terminalen Bereiche der zu untersuchenden Proteine sich im Zytoplasma befinden müssen, um eine Interaktion zwischen den Ubiquitinhälften zu ermöglichen. Außerdem dürfen die N- und C-terminalen Fusionen sich nicht negativ auf die Proteinfaltung auswirken, da es sonst zur Protein-degradation kommen kann oder zur Proteinretention, was sich in der reduzierten Funktionalität der Proteine widerspiegelt.

#### 4.4 Entwicklung einer cDNA-Genbank aus humaner Skelettmuskel-RNA

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein auf dem SUS-System basierender Genbankscreenn entwickelt, mit dem nach Säugerproteinen gesucht werden sollte, die mit GLUT4 interagieren. In früheren Versuchen konnten bereits in Two-Hybrid-Analysen und mit Co-Immunopräzipitationstests Proteine identifiziert werden, die mit dem N- oder C-Terminus von GLUT4 interagieren, deren Funktion im Zusammenhang mit der GLUT4-Translokation aber noch weitgehend unerforscht ist (Lee *et al.*, 1997; Kao *et al.*, 1999; Giorgino *et al.*, 2000; Lalioti *et al.*, 2002). Es sollte möglich sein, weitere Proteine aus Säugierzellen zu identifizieren, die eine Verbindung zwischen den Insulinsignalkaskaden und den GLUT4-Speichervesikeln herstellen, um den genauen Prozeß der GLUT4-Translokation in Säugierzellen nach einem Insulinsignal zu verstehen. Hierzu wurde menschliche Skelettmuskel Poly(A)-mRNA in einer reversen Transkriptionsreaktion in entsprechende cDNA umgeschrieben und durch *in vivo* Rekombination in Hefe an den N-terminalen Bereich des Ubiquitins (Nub) fusioniert. In einem Kontrollexperiment wurde zuerst die bereits in der Literatur beschriebene Interaktion zwischen GLUT4 und UBC9 untersucht, um die Funktionalität des Systems zu testen. Es konnte durch SUS-Tests bestätigt werden, daß das menschliche UBC9 (Sentrin-konjugierendes

Enzym) mit GLUT4 interagiert, was gleichzeitig die Funktionalität des Systems bestätigte. Nach der Ko-Expression des GLUT4-Cub-PLV-Konstruktes mit der Nub-cDNA-Genbank in Hefe sollte mit Hilfe von qualitativen X-Gal-Overlays bereits anhand der Transformanten gezeigt werden, ob es zu einer Interaktion zwischen GLUT4 und Säugerproteinen kommt. Durch die starke Hintergrundaktivität des GLUT4-Cub-PLV-Konstruktes färbten sich jedoch bereits nach 20 Minuten alle Kolonien, die mit X-Gal überschichtet wurden, blau, was die Identifizierung der Kolonien erschwerte, die sich aufgrund von Interaktion zwischen GLUT4 und einem Säugerprotein blau färbten. Ein weiteres Problem, daß bei der Konstruktion der cDNA-Genbank auftrat, war die Tatsache, daß bei der reversen Transkription der RNA zu cDNA nur sehr kleine cDNA-Fragmente entstanden sind, die eine maximale Größe von 1 kb aufwiesen. Ein Grund hierfür könnten RNA-Sekundärstrukturen gewesen sein, die dazu geführt haben, daß die reverse Transkriptase die Transkription vorzeitig beendet hat. Nach der Sequenzierung einiger Plasmide aus Klonen, die ein positives Signal hervorriefen und einem Vergleich der Sequenzen mit der Datenbank hat sich gezeigt, daß die inserierte cDNA für die C-terminalen Bereiche einiger Säugerproteine kodierte. Da die cDNA-Fragmente in keinem der untersuchten Plasmide in den Leserahmen der Nub-Sequenz eingefügt waren, waren nicht die Polypeptide translatiert worden, für die die nach der Sequenzierung identifizierten cDNA's eigentlich kodieren. Da die isolierten und sequenzierten Plasmide aber im X-Gal-Overlay zu einem positiven Ergebnis geführt hatten, waren scheinbar Zufallspeptide entstanden, die mit GLUT4 interagiert haben. Es ist auch nicht auszuschließen, daß die entstandenen Säugerpeptide evtl. eine toxische Wirkung auf die Hefe hatten, weshalb sich einige Kolonien aufgrund der eher freigesetzten  $\beta$ -Galaktosidase im X-Gal-Overlay schneller blau färbten und nicht aufgrund von Interaktion mit GLUT4. Die Zahl der in dieser Arbeit überprüften Transformantenkolonien reicht jedoch noch nicht aus, um eine Aussage über die Effizienz dieses cDNA-Genbankscreens machen zu können. Hierzu müssen noch weitere GLUT4-Transformanten mit der Genbank transformiert werden, und diese auf eine Interaktion zwischen GLUT4 und einem Säugerprotein hin untersucht werden. Literaturdaten belegen, daß man mindestens  $10^6$  oder mehr unabhängige cDNA-Klone untersuchen muß, um eine Aussage über die Effizienz der Genbank machen zu können und um auch relativ seltene Proteine in dem Screen zu berücksichtigen (Sambrock und Russell, 2001).

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 besitzen zentrale Funktionen im Glukosemetabolismus des Menschen. GLUT4 wird in insulin-sensitiven Geweben wie Muskel- und Fettzellen exprimiert, in intrazellulären Vesikeln gespeichert und nach einem Insulinsignal vermehrt zur Zelloberfläche transloziert. Defekte im Glukosemetabolismus in insulin-sensitiven Geweben sind u.a. die Ursache für den Typ II Diabetes mellitus.

Um GLUT4 genauer charakterisieren sowie in zellbasierten „High-throughput Screening-assays“ nach Wirkstoffen zur Beeinflussung der GLUT4-Transportfunktion suchen zu können, sollte der Glukosetransporter in einem hexosetransport-defizienten Hefestamm exprimiert werden. Dabei stellte sich heraus, daß GLUT4 in *Saccharomyces cerevisiae* im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten und nicht zur Plasmamembran transportiert wird. Transposon-Mutageneseexperimente offenbarten, daß erst durch eine Zerstörung des *ERG4*-Gens, welches für das letzte Enzym der Ergosterolbiosynthese im ER kodiert, die Retention von GLUT4 im ER aufgehoben wird. Im Gegensatz zum Cholesterin in humanen Zellmembranen ist in der Hefe Ergosterol das hauptsächliche Membransterol. Weitere Modifikationen im Sterolmetabolismus der Hefe deuteten darauf hin, daß eine spezifische Struktur der Seitenkette des Sterolgrundgerüsts notwendig ist, um GLUT4 den Transport zur Plasmamembran zu ermöglichen. Andererseits interagiert das GLUT4-Protein im Split-Ubiquitin-Interaktionssystem direkt mit dem Erg4-Protein der Hefe. Da Erg4 aber auch mit den hefeeigenen Hexosetransportern Hxt1 und Hxt9 interagiert, jedoch keinen negativen Einfluß auf deren Translokation hat, scheint eine direkte Retention von GLUT4 durch Erg4 auszuschließen zu sein.

Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit etablierten und optimierten Split-Ubiquitin-Systems sollte eine mögliche Oligomerisierung der GLUT-Proteine gezeigt werden, wie sie für GLUT1 in Säugerzellen bereits beschrieben ist. Es konnte eine Interaktion zwischen GLUT4-Proteinen, zwischen GLUT1-Proteinen und auch zwischen GLUT4 und GLUT1 nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß das auf die GLUT4-Funktionalität inhibitorisch wirkende hefeeigene Fgy1-Protein nicht direkt mit GLUT4 interagiert.

Es wurde eine auf dem Split-Ubiquitin-System basierende cDNA-Fusionsgenbank aus menschlichen Muskelzellen konstruiert und damit nach mit GLUT4 interagierenden humanen Proteinen gesucht. Es konnten jedoch bislang keine spezifisch interagierenden Proteine gefunden werden. Die Funktionalität des Systems konnte durch eine Verifizierung der bereits bekannten Interaktion zwischen GLUT4 und UBC9, einem Sentrin-konjugierenden Enzym aus Skelettmuskelzellen, bestätigt werden.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmed, Z., Smith, B.J. und Pillay, T.S.** (2000) The APS adapter protein couples the insulin receptor to the phosphorylation of c-Cbl and facilitates ligand-stimulated ubiquitination of the insulin receptor. *FEBS Lett.* **475**: 31-34.
- Aiken, C., Konner, J., Landau, N.R., Lenburg, M.E. und Trono, D.** (1994) Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* **76**: 853-864.
- Aledo, J.C., Lavoie, L., Volchuk, A., Keller, S.R., Klip, A. und Hundal, H.S.** (1997) Identification and characterization of two distinct intracellular GLUT4 pools in rat skeletal muscle: evidence for an endosomal and an insulin-sensitive GLUT4 compartment. *Biochem. J.* **325**: 727-732.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B. und Cohen, P.** (1997) Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase  $\beta$ alpha. *Curr. Biol.* **7**: 261-269.
- Anderson, R.G.** (1998) The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 199-225.
- Asano, T., Shibasaki, Y., Kasuga, M., Kanazawa, Y., Takaku, F., Akanuma, Y. und Oka, Y.** (1988) Cloning of a rabbit brain glucose transporter cDNA and alteration of glucose transporter mRNA during tissue development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **154**: 1204-1211.
- Bagnat, M., Keranen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A. und Simons, K.** (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 3254-3259.
- Baldwin, S.A.** (1993) Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1154**: 17-49.
- Bard, M., Lees, N.D., Burrows, L.S. und Kleinhans, F.W.** (1978) Differences in crystal violet uptake and cation-induced death among yeast sterol mutants. *J. Bacteriol.* **135**: 1146-1148.
- Bartel, P.L. und Fields, S.** (1995) Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol.* **254**: 241-263.
- Baudry, K., Swain, E., Rahier, A., Germann, M., Batta, A., Rondet, S., Mandala, S., Henry, K., Tint, G.S., Edlind, T., Kurtz, M. und Nickels Jr., J.T.** (2001) The effect of the *erg26-1* mutation on the regulation of lipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**: 12702-12711.
- Baumann, C.A., Ribon, V., Kanzaki, M., Thurmond, D.C., Mora, S., Shigematsu, S., Bickel, P.E., Pessin, J.E. und Saltiel, A.R.** (2000) CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature* **407**: 202-207.
- Baumann, C.A., Brady, M.J. und Saltiel, A.R.** (2001) Activation of glycogen synthase by insulin in 3T3-L1 adipocytes involves c-Cbl-associating protein (CAP)-dependent and CAP-independent signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **276**: 6065-6068.
- Biely, P., Kratky, Z. und Bauer, S.** (1972) Metabolism of 2-deoxy-D-glucose by baker's yeast. Incorporation of 2-deoxy-D-glucose into the cell wall mannan. *Biochim. Biophys. Acta* **255**: 631-639.
- Birnbaum, M.J., Haspel, H.C. und Rosen, O.M.** (1986) Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5784-5788.
- Birnboim, H.C. und Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Bisson, L.F. und Fraenkel, D.G.** (1983) Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1730-1734.
- Bisson, L.F. und Fraenkel, D.G.** (1984) Expression of kinase-dependent glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **159**: 1013-1017.

- Bjorbaek, C., Echwald, S.M., Hubricht, P., Vestergaard, H., Hansen, T., Zierath, J. und Pedersen, O.** (1994) Genetic variants in promoters and coding regions of the muscle glycogen synthase and the insulin-responsive GLUT4 genes in NIDDM. *Diabetes* **43**: 976-983.
- Boeke, J.D., Lacroute, F. und Fink, G.R.** (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphat decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 345-346.
- Boles, E. und Hollenberg, C.** (1997) The molecular genetics of hexose transport in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 85-111.
- Botstein, D., Falco, S.C., Stewart, S.E., Brennan, M., Scherer, S., Stinchcomb, D.T., Struhl, K. und Davis, R.W.** (1997) Sterile host yeasts (SHY): A eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* **8**: 17-24.
- Brown, D.A. und London, E.** (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**: 111-136.
- Brown, G.K.** (2000) Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **23**: 237-246.
- Burns, N., Grimwade, B., Ross-Macdonald, P.B., Choi, E., Finberg, K., Roeder, G.S. und Snyder, M.** (1994) Large-scale analysis of gene expression protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **8**: 1087-1105.
- Cain, C.C., Trimble, W.S. und Lienhard, G.E.** (1992) Members of the VAMP family of synaptic vesicle proteins are components of glucose transporter-containing vesicles from rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* **267**: 11681-11684.
- Calera, M.R., Martinez, C., Liu, H., Jack, A.K., Birnbaum, M.J. und Pilch, P.F.** (1998) Insulin increases the association of Akt-2 with Glut4-containing vesicles. *J. Biol. Chem.* **273**: 7201-7204.
- Carayannopoulos, M.O., Chi, M.M., Cui, Y., Pingsterhaus, J.M., McKnight, R.A., Mueckler, M., Devaskar, S.U. und Moley, K.H.** (2000) GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 7313-7318.
- Carlson, M.** (1998) Regulation of glucose utilization in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**: 560-564.
- Carlson, M.** (1999) Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 202-207.
- Chamberlain, L.H. und Gould, G.W.** (2002) The v- and t-SNARE proteins that mediate Glut4 vesicle fusion are localised in detergent-insoluble lipid rafts present on distinct intracellular membranes. *J. Biol. Chem.* [epub ahead of print].
- Cheatham, B., Volchuk, A., Kahn, C.R., Wang, L., Rhodes, C.J. und Klip, A.** (1996) Insulin-stimulated translocation of GLUT4 glucose transporters requires SNARE-complex proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 15169-15173.
- Chen, W.J., Goldstein, J.L. und Brown, M.S.** (1990) NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* **265**: 3116-3123.
- Chen, W.N., Capieaux, E., Balzi, E. und Goffeau, A.** (1991) The YGL022 gene encodes a putative transport protein. *Yeast* **7**: 305-308.
- Chen, W., Feng, Y., Chen, D. und Wandinger-Ness, A.** (1998) Rab11 is required for trans-golgi network-to-plasma membrane transport and a preferential target for GDP dissociation inhibitor. *Mol. Biol. Cell.* **9**: 3241-3257.
- Cobon, G.S. und Haslam, J.M.** (1973) The effect of altered membrane sterol composition on the temperature dependence of yeast mitochondrial ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**: 320-326.

- Collawn, J.F., Stangel, M., Kuhn, L.A., Esekogwu, V., Jing, S.Q., Trowbridge, I.S. und Tainer, J.A.** (1990) Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell* **63**: 1061-1072.
- Coons, D.M., Boulton, R.B. und Bisson, L.F.** (1995) Computer-assisted nonlinear regression analysis of the multicomponent glucose uptake kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**: 3251-3258.
- Currie, R.A., Walker, K.S., Gray, A., Deak, M., Casamayor, A., Downes, C.P., Cohen, P., Alessi, D.R. und Lucocq, J.** (1999) Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem. J.* **337**: 575-583.
- Czech, M.P.** (1995) Molecular actions of insulin on glucose transport. *Annu. Rev. Nutr.* **15**: 441-471.
- Darnet, S., Bard, M. und Rahier, A.** (2001) Functional identification of sterol-4 $\alpha$ -methyl oxidase cDNAs from *Arabidopsis thaliana* by complementation of a yeast *erg25* mutant lacking sterol-4 $\alpha$ -methyl oxidation. *FEBS Letters* **508**: 39-43.
- Doege, H., Bocianski, A., Joost, H.G. und Schürmann, A.** (2000) Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leucocytes. *Biochem. J.* **350**: 771-776.
- 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.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F.C., Schedl, A., Haller, H. und Kurzchalia, T.V.** (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* **293**: 2449-2452.
- Dünnwald, M., Varshavsky, A. und Johnsson, N.** (1999) Detection of transient *in vivo* interactions between substrate and transporter during protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **10**: 329-344.
- Entian, K.D., Schuster, T., Hegemann, J.H., Becher, D., Feldmann, H., Güldener, U., Gotz, R., Hansen, M., Hollenberg, C.P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kötter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R.K., Ramezani Rad, M., Rohmer, A., Romer, A., Hinnen, A., et al.** (1999) Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol. Gen. Genet.* **262**: 683-702.
- Eriksson, J., Koranyi, L., Bourey, R., Schalin-Jantti, C., Widen, E., Mueckler, M., Permutt, A.M. und Groop, L.C.** (1992) Insulin resistance in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients and their relatives is not associated with a defect in the expression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT-4) gene in human skeletal muscle. *Diabetologia* **35**: 143-147.
- Fernandez-Ballester, G., Castresana, J., Fernandez, A.M., Arrondo, J.L. und Gonzale-Ros, J.M.** (1994) A role for cholesterol as a structural effector of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* **33**: 4065-4071.
- Foran, P.G., Fletcher, L.M., Oatey, P.B., Mohammed, N., Dolly, J.O. und Tavare, J.M.** (1999) Protein kinase B stimulates the translocation of GLUT4 but not GLUT1 or transferrin receptors in 3T3-L1 adipocytes by a pathway involving SNAP-23, synaptobrevin-2, and/or cellubrevin. *J. Biol. Chem.* **274**: 28087-28095.
- Fletcher, L.M., Welsh, G.I., Oatey, P.B. und Tavare, J.M.** (2000) Role for the microtubule cytoskeleton in GLUT4 vesicle trafficking and in the regulation of insulin-stimulated glucose uptake. *Biochem. J.* **352**: 267-276.

- Fukumoto, H., Seino, S., Imura, H., Seino, Y., Eddy, R.L., Fukushima, Y., Byers, M.G., Shows, T.B. und Bell, G.I.** (1988) Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5434-5438.
- Fukumoto, H., Kayano, T., Buse, J.B., Edwards, Y., Pilch, P.F., Bell, G.I. und Seino, S.** (1989) Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J. Biol. Chem.* **264**: 7776-7769.
- Gaber, R.F., Copple, D.M., Kennedy, B.K., Vidal, M. und Bard, M.** (1989) The yeast gene *ERG6* is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3447-3456.
- Gachotte, D., Eckstein, J., Barbuch, R., Hughes, T., Roberts, C. und Bard, M.** (2001) A novel gene conserved from yeast to humans is involved in sterol biosynthesis. *J. Lipid Res.* **42**:150-154.
- Gancedo, J.M.** (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 334-361.
- Garvey, W.T., Huecksteadt, T.P. und Birnbaum, M.J.** (1989) Pretranslational suppression of an insulin-responsive glucose transporter in rats with diabetes mellitus. *Science* **245**: 60-63.
- Garvey, W.T., Maianu, L., Huecksteadt, T.P., Birnbaum, M.J., Molina, J.M. und Ciaraldi, T.P.** (1991) Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J. Clin. Invest.* **87**: 1072-1081.
- Gietz, R.D. und Sugino, A.** (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527-534.
- Gietz, R.D. und Woods, R.A.** (1994) High Efficiency transformation in Yeast. (Invited Book Chapter) In: Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches, ed. J.A. Johnston, Oxford University Press pp. 121-134.
- Giorgino, F., de Robertis, O., Laviola, L., Montrone, C., Perrini, S., McCowen, K. und Smith, R.J.** (2000) The sentrin-conjugating enzyme mUbc9 interacts with GLUT4 and GLUT1 glucose transporters and regulates transporter levels in skeletal muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 1125-1130.
- Gilstring, C.F., Melin-Larsson, M., Moliner, A.L. und Ljungdahl, P.O.** (1996) *SHR3* function is linked to COPII mediated ER vesicle formation. *Folia Microbiol.* **41**: 93.
- Gilstring, C.F., Melin-Larsson, M. und Ljungdahl, P.O.** (1999) Shr3p mediates specific COPII coatomer-cargo interactions required for the packaging of amino acid permeases into ER-derived transport vesicles. *Mol. Biol. Cell* **10**: 3549-3565.
- Gould, G.W., Thomas, H.M., Jess, T.J. und Bell, G.I.** (1991) Expression of human glucose transporters in *Xenopus oocytes*: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocyte, liver, and brain isoforms. *Biochemistry* **30**: 5139-5145.
- Guarnieri, F.G., Arterburn, L.M., Penno, M.B., Cha, Y. und August, J.T.** (1993) The motif Tyr-X-X-hydrophobic residue mediates lysosomal membrane targeting of lysosome-associated membrane protein 1. *J. Biol. Chem.* **268**: 1941-1946.
- 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., Koehler, G.J., Voss, D., und Hegemann, J.H.** (2002) A second set of *loxP* marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucl. Acids Res.* **30**: e23.
- Hamacher, T.** (2001) Expression un Charakterisierung von Xylosetransportern in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Hamill, S., Cloherty, E.K. und Carruthers, A.** (1999) The human erythrocyte sugar transporter presents two sugar import sites. *Biochemistry* **38**: 16974-16983.

- Harder, T. und Simons, K.** (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**: 534-542.
- Hardwick, K.G. und Pelham, H.R.** (1994) *SED6* is identical to *ERG6*, and encodes a putative methyltransferase required for ergosterol synthesis. *Yeast* **10**: 265-269.
- Hebert, D.N. und Carruthers, A.** (1991) Cholate-solubilized erythrocyte glucose transporters exist as a mixture of homodimers and homotetramers. *Biochemistry* **30**: 4654-4658.
- Hebert, D.N. und Carruthers, A.** (1992) Glucose transporter oligomeric structure determines transporter function. *J. Biol. Chem.* **267**: 23829-23838.
- Heredia, C.F., Sols, A. und Dela Fuente, G.** (1968) Specificity of the constitutive hexose transport in yeast. *Eur. J. Biochem.* **5**: 321-329.
- Heuberger, E.H., Veenhoff, L.M., Duurkens, R.H., Friesen, R.H. und Poolman, B.** (2002) Oligomeric state of membrane transport proteins analyzed with blue native electrophoresis and analytical ultracentrifugation. *J. Mol. Biol.* **317**: 591-600.
- Hill, M.M., Clark, S.F., Tucker, C., Birnbaum, M.J., James, D.E. und McCaulay, S.L.** (1999) A role for protein kinase B/Akt2 in insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 7771-7781.
- Holman, G.D., Lo Leggio, L. und Cushman, S.W.** (1994) Insulin-stimulated GLUT4 glucose transporter recycling. A problem in membrane protein subcellular trafficking through multiple pools. *J. Biol. Chem.* **269**: 17516-17524.
- Ibberson, M., Uldry, M. und Thorens, B.** (2000) GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J. Biol. Chem.* **275**: 4607-4612.
- Ikonen, E.** (2001) Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 470-477.
- Ito, T., Tashiro, K., Muta, S., Ozawa, R., Chiba, T., Nishizawa, M., Yamamoto, K., Kuhara, S. und Sakaki, Y.** (2000) Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between yeast proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 1143-1147.
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. und Sakaki, Y.** (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 4569-4574.
- James, D.E., Brown, R., Navarro, J. und Pilch, P.F.** (1988) Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature* **333**: 183-185.
- James, D.E., Strube, M. und Mueckler, M.** (1989) Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* **338**: 83-87.
- Jhun, B.H., Rampal, A.L., Liu, H., Lachaal, M. und Jung, C.Y.** (1992) Effects of insulin on steady state kinetics of GLUT4 subcellular distribution in rat adipocytes. Evidence of constitutive GLUT4 recycling. *J. Biol. Chem.* **267**: 17710-17715.
- Johnsson, N. und Varshavsky, A.** (1994a) Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 10340-10344.
- Johnsson, N. und Varshavsky, A.** (1994b) Ubiquitin-assisted dissection of protein transport across membranes. *EMBO J.* **13**: 2686-2698.
- Joost, H.G. und Thorens, B.** (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol. Membr. Biol.* **18**: 247-256.
- Joost, H.G., Bell, G.I., Best, J.D., Birnbaum, M.J., Charron, M.J., Chen, Y.T., Doege, H., James, D.E., Lodish, H.F., Moley, K.H., Moley, J.F., Mueckler, M., Rogers, S., Schurmann, A., Seino, S. und Thorens, B.** (2002) Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**: E974-976.

- Kaestner, K.H., Christy, R.J., McLenithan, J.C., Braiterman, L.T., Cornelius, P., Pekala, P.H. und Lane, M.D.** (1989) Sequence, tissue distribution, and differential expression of mRNA for a putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3150-3154.
- Kahn, C.R.** (1994) Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* **43**: 1066-1084.
- Kandror, K.V. und Pilch, P.F.** (1996) Compartmentalization of protein traffic in insulin-sensitive cells. *Am. J. Physiol.* **271**: E1-14.
- Kao, A.W., Noda, Y., Johnson, J.H., Pessin, J.E. und Saltiel, A.R.** (1999) Aldolase mediates the association of F-actin with the insulin-responsive glucose transporter GLUT4. *J. Biol. Chem.* **274**: 17742-17747.
- Kasahara, T und Kasahara, M** (1996) Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **315**: 177-182.
- Kasahara, T und Kasahara, M** (1997) Characterization of rat Glut4 glucose transporter expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Glut1 glucose transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1324**: 111-119.
- Katz, E.B., Stenbit, A.E., Hatton, K., DePinho, R. und Charron, M.J.** (1995) Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature* **377**: 151-155.
- Katz, E.B., Burcelin, R., Tsao, T.S., Stenbit, A.E. und Charron, M.J.** (1996) The metabolic consequences of altered glucose transporter expression in transgenic mice. *J. Mol. Med.* **74**: 639-652.
- Kaur, R. und Bachhawat, A.K.** (1999) The yeast multidrug resistance pump, Pdr5p, confers reduced drug resistance in *erg* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **145**: 809-818.
- Kawanishi, M., Tamori, Y., Okazawa, H., Araki, S., Shinoda, H. und Kasuga, M.** (2000) Role of SNAP23 in insulin-induced translocation of GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. Mediation of complex formation between syntaxin4 and VAMP2. *J. Biol. Chem.* **275**: 8240-8247.
- Kayano, T., Burant, C.F., Fukumoto, H., Gould, G.W., Fan, Y.S., Eddy, R.L., Byers, M.G., Shows, T.B., Seino, S. und Bell, G.I.** (1990) Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J. Biol. Chem.* **265**: 13276-13282.
- Kayano, T., Fukumoto, H., Eddy, R.L., Fan, Y.S., Byers, M.G., Shows, T.B. und Bell, G.I.** (1988) Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J. Biol. Chem.* **263**: 15245-15248.
- Kessler, A., Tomas, E., Immler, D., Meyer, H.E., Zorzano, A. und Eckel, J.** (2000) Rab11 is associated with GLUT4-containing vesicles and redistributes in response to insulin. *Diabetologia* **43**: 1518-1527.
- Kirk, P., Wilson, M.C., Heddle, C., Brown, M.H., Barclay, A.N. und Halestrap, A.P.** (2000) CD147 is tightly associated with lactate transporters MCT1 and MCT4 and facilitates their cell surface expression. *EMBO J.* **19**: 3896-3904.
- Klebe, R.J., Harries, J.V., Sharp, Z.D. und Douglas, M.G.** (1983): A general method for polyethylen-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* **25**: 333-341.
- Kleinhans, F.W., Lees, N.D., Bard, M., Haak, R.A. und Woods, R.A.** (1979) ESR determinations of membrane permeability in a yeast sterol mutant. *Chem. Phys. Lipids* **23**: 143-154.
- Klepper, J., Wang, D., Fischbarg, J., Vera, J.C., Jarjour, I.T., O'Driscoll, K.R. und De Vivo, D.C.** (1999) Defective glucose transport across brain tissue barriers: a newly recognized neurological syndrome. *Neurochem. Res.* **24**: 587-594.

- Klepper, J., Monden, I., Guertsen, E., Voit, T., Willemsen, M. und Keller, K.** (2001) Functional consequences of the autosomal dominant G272A mutation in the human GLUT1 gene. *FEBS Lett.* **498**: 104-109.
- Klepper, J., Willemsen, M., Verrips, A., Guertsen, E., Herrmann, R., Kutzick, C., Florcken, A. und Voit, T.** (2001) Autosomal dominant transmission of GLUT1 deficiency. *Hum. Mol. Genet.* **10**: 63-68.
- Klip, A., Tsakiridis, T., Marette, A. und Ortiz, P.A.** (1994) Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures. *FASEB J.* **8**: 43-53.
- Kölling, R. und Hollenberg, C.P.** (1994) The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* **13**: 3261-3271.
- Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaum, M.J. und Roth, R.A.** (1996) Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* **271**: 31372-31378.
- Krampe, S., Stamm, O., Hollenberg, C.P. und Boles, E.** (1998) Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS Letters* **441**: 343-347.
- Krishnamurthy, S.S. und Prasad, R.** (1999) Membrane fluidity affects functions of Cdr1p, a multidrug ABC transporter of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**: 475-481.
- Kruckeberg, A.L.** (1996) The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **166**: 283-292.
- Kuehn, M.J., Schekman, R. und Ljungdahl, P.O.** (1996) Amino acid permeases require COPII components and the ER resident membrane protein Shr3p for packaging into transport vesicles *in vitro*. *J. Cell Biol.* **135**: 585-595.
- Kupriyanova, T.A. und Kandrор, K.V.** (1999) Akt-2 binds to Glut4-containing vesicles and phosphorylates their component proteins in response to insulin. *J. Biol. Chem.* **274**: 1458-1464.
- Kurzchalia, T.V. und Parton, R.G.** (1999) Membrane microdomains and caveolae. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**: 424-431.
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lai, M.H., Bard, M., Pierson, C.A., Alexander, J.F., Goebel, M., Carter, G.T. und Kirsch, D.R.** (1994) The identification of a gene family in the *Saccharomyces cerevisiae* ergosterol biosynthesis pathway. *Gene* **140**: 41-49.
- Lalioti, V., Vergarajauregui, S. und Sandoval, I.V.** (2001) Targeting motifs in GLUT4 (review). *Mol. Membr. Biol.* **18**: 257-264.
- Lalioti, V.S., Vergarajauregui, S., Pulido, D. und Sandoval, I.V.** (2002) The insulin-sensitive glucose transporter, GLUT4, interacts physically with Daxx. *J. Biol. Chem.* **277**: 19783-19791.
- Laser, H., Bongards, C., Schuller, J., Heck, S., Johnsson, N. und Lehming, N.** (2000) A new screen for protein interactions reveals that the *Saccharomyces cerevisiae* high mobility group proteins Nhp6A/B are involved in the regulation of the *GAL1* promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 13732-13737.
- Le Fur, Y., Maume, G., Feuillat, M. und Maume, B.F.** (1999) Characterization by gas chromatography/mass spectrometry of sterols in *Saccharomyces cerevisiae* during autolysis. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 2860-2864.
- Leber, A., Hrastnik, C. und Daum, G.** (1995) Phospholipid-synthesizing enzymes in Golgi membranes of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **377**: 271-274.
- Leber, R., Zinser, E., Hrastnik, C., Paltauf, F. und Daum, G.** (1995) Export of steryl esters from lipid particles and release of free sterols in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1234**: 119-126.

- Lee, W., Samuel, J., Zhang, W., Rampal, A.L., Lachaal, M. und Jung C.Y.** (1997) A myosin-derived peptide C109 binds to GLUT4-vesicles and inhibits the insulin-induced glucose transport stimulation and GLUT4 recruitment in rat adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**: 409-414.
- Lees, N.D., Bard, M., Kemple, M.D., Haak, R.A. und Kleinhans, F.W.** (1979) ESR determination of membrane order parameter in yeast sterol mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **553**: 469-475.
- Lees, N.D., Kleinhans, F.W., Broughton, M.C., Pennington, D.E., Ricker, V.A. und Bard, M.** (1989) Membrane fluidity alterations in a cytochrome P-450-deficient mutant of *Candida albicans*. *Steroids* **53**: 567-578.
- Lees, N.D., Skaggs, B., Kirsch, D.R. und Bard, M.** (1995) Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* (Review). *Lipids* **30**: 221-226.
- Lesage, S., Zouali, H., Vionnet, N., Philippi, A., Velho, G., Serradas, P., Passa, P., Demenais, F. und Froguel, P.** (1997) Genetic analyses of glucose transporter genes in French non-insulin-dependent diabetic families. *Diabetes Metab.* **23**: 137-142.
- Letourneur, F. und Klausner, R.D.** (1992) A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* **69**: 1143-1157.
- Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T.H. und Hirschberg, K.** (2000) Secretory protein trafficking and organelle dynamics in living cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 557-589.
- Ljungdahl, P.O., Gimeno, C.J., Styles, C.A. und Fink, G.R.** (1992) *SHR3*: a novel component of the secretory pathway specifically required for localization of amino acid permeases in yeast. *Cell* **30**: 463-478.
- Lobo, Z. und Maitra, P.K.** (1982) Pentose phosphate pathway mutants of yeast. *Mol. Gen. Genet.* **185**: 367-368.
- Lowe, A.G. und Walmsley, A.R.** (1986) The kinetics of glucose transport in human red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **857**: 146-154.
- Ludewig, U., Pusch, M. und Jentsch, T.** (1996) Two physically distinct proteins in the dimeric CIC-0 chloride channel. *Nature* **383**: 340-343.
- Makuc, J.** (2002) Molekulargenetische und physiologische Charakterisierung von endogenen und heterologen Monocarboxylattransportern in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J.** (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Marchand, S., Devillers-Thiéry, A., Pons, S., Changeux, J.P. und Cartaud, J.** (2002) Rapsyn escorts the nicotinic acetylcholine receptor along the exocytic pathway via association with lipid rafts. *J. Neurosci.* **22**: 8891-8901.
- Marger, M.D. und Saier, M.H. Jr.** (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 13-20.
- Martin, L.B., Shewan, A., Millar, C.A., Gould, G.W. und James, D.E.** (1998) Vesicle-associated membrane protein 2 plays a specific role in the insulin-dependent trafficking of the facilitative glucose transporter GLUT4 in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **273**: 1444-1452.
- Mastick, C.C. und Saltiel, A.R.** (1997) Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of caveolin is specific for the differentiated adipocyte phenotype in 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* **272**: 20706-20714.
- Matter, K., Yamamoto, E.M. und Mellman, I.** (1994) Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J. Cell. Biol.* **126**: 991-1004.
- Martinez-Arca, S., Lalioti, V.S. und Sandoval, I.V.** (2000) Intracellular targeting and retention of the glucose transporter GLUT4 by the perinuclear storage compartment involves distinct carboxyl-tail motifs. *J. Cell. Sci.* **113**: 1705-1715.

- McVie-Wylie, A.J., Lamson, D.R. und Chen, Y.T.** (2001) Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics* **72**: 113-117.
- Medina, R.A. und Owen, G.I.** (2002) Glucose transporters: expression, regulation and cancer. *Biol. Res.* **35**: 9-26.
- Melvin, D.R., Marsh, B.J., Walmsley, A.R., James, D.E. und Gould, G.W.** (1999) Analysis of amino and carboxy terminal GLUT-4 targeting motifs in 3T3-L1 adipocytes using an endosomal ablation technique. *Biochemistry* **38**: 1456-1462.
- Millar, C.A., Shewan, A., Hickson, G.R., James, D.E. und Gould, G.W.** (1999) Differential regulation of secretory compartments containing the insulin-responsive glucose transporter 4 in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Biol. Cell* **10**: 3675-3688.
- Miller, J.H.** (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, Ed.3<sup>rd</sup>.
- Mobasheri, A., Vannucci, S.J., Bondy, C.A., Carter, S.D., Innes, J.F., Arteaga, M.F., Trujillo, E., Ferraz, I., Shakibaei, M. und Martin-Vasallo, P.** (2002) Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis. *Histol. Histopathol.* **17**: 1239-1267.
- Mueckler, M.** (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* **219**: 713-725.
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E. und Lodish, H.F.** (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* **229**: 941-945.
- Mumberg, D., Müller, R. und Funk, M.** (1994) Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucl. Acids Res.* **22**: 5767-5768.
- Munn, A.L., Heese-Peck, A., Stevenson, B.J., Pichler, H. und Riezman, H.** (1999) Specific sterols required for the internalization step of endocytosis in yeast. *Mol. Biol. Cell* **10**: 3943-3957.
- Narayanaswami, V. und McNamee, M.G.** (1993) Protein-lipid interactions and Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor function. 2. Membrane fluidity and ligand-mediated alteration in the accessibility of gamma subunit cysteine residues to cholesterol. *Biochemistry* **32**: 12420-12427.
- Newsholme, E.A. und Leech, A.R.** (1985) *Biochemistry of the medical sciences*, John Wiley and Sons, Chichester.
- Nielsen, M.S., Madsen, P., Christensen, E.L., Nykjaer, A., Gliemann, J., Kasper, D., Pohlmann, R. und Petersen, C.M.** (2001) The sortilin cytoplasmic tail conveys Golgi-endosome transport and binds the VHS domain of the GGA2 sorting protein. *EMBO J.* **20**: 2180-2190.
- Nunez, M.T. und Glass, J.** (1982) Reconstitution of the transferrin receptor in lipid vesicles. Effect of cholesterol on the binding of transferrin. *Biochemistry* **21**: 4139-4143.
- Oatey, P.B., Venkateswarlu, K., Williams, A.G., Fletcher, L.M., Foulstone, E.J., Cullen, P.J. und Tavare, J.M.** (1999) Confocal imaging of the subcellular distribution of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in insulin- and PDGF-stimulated 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.* **344**: 511-518.
- Olson, A.L. und Pessin, J.E.** (1996) Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu. Rev. Nutr.* **16**: 235-256.
- Olson, A.L., Knight, J.B. und Pessin, J.E.** (1997) Syntaxin 4, VAMP2, and/or VAMP3/ cellubrevin are functional target membrane and vesicle SNAP receptors for insulin-stimulated GLUT4 translocation in adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 2425-2435.
- Opekarova, M., Robl, I. und Tanner, W.** (2002) Phosphatidyl ethanolamine is essential for targeting the arginine transporter Can1p to the plasma membrane of yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **1564**: 9-13.

- Ostling, J., Carlberg, M. und Ronne, H.** (1996) Functional domains in the Mig1 repressor. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 753-761.
- Özcan, S. und Johnston, M.** (1999) Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 554-569.
- Palacios, S., Lalioti, V., Martinez-Arca, S., Chattopadhyay, S. und Sandoval, I.V.** (2001) Recycling of the insulin-sensitive glucose transporter GLUT4. Access of surface internalized GLUT4 molecules to the perinuclear storage compartment is mediated by the Phe5-Gln6-Gln7-Ile8 motif. *J. Biol. Chem.* **276**: 3371-3383.
- Paltauf, F., Kohlwein, S.D. und Henry, S.A.** (1992) Regulation and compartmentalization of lipid synthesis in yeast. In: Jones, E.W., Pringle, J.R. and Broach, J.R. (Eds), *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Vol 2, Gene expression*, pp. 415-500, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T. und Saier, M.H. Jr.** (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 1-34.
- Parks, L.W. und Casey, W.M.** (1995) Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 95-116.
- Pessin, J.E., Thurmond, D.C., Elmendorf, J.S., Coker, K.J. und Okada, S.** (1999) Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location! *J. Biol. Chem.* **274**: 2593-2596.
- Phay, J.E., Hussain, H.B. und Moley, J.F.** (2000) Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* **66**: 217-220.
- Pieters, J., Bakke, O. und Dobberstein, B.** (1993) The MHC class II-associated invariant chain contains two endosomal targeting signals within its cytoplasmic tail. *J. Cell. Sci.* **106**: 831-846.
- Ploug, T., van Deurs, B., Ai, H., Cushman, S.W. und Ralston, E.** (1998) Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibres: identification of distinct storage compartments that are recruited by insulin and muscle contractions. *J. Cell Biol.* **142**: 1429-1446.
- Polishchuk, R.S., Polishchuk, E.V., Marra, P., Alberti, S., Buccione, R., Luini, A. und Mironov, A.A.** (2000) Correlative light-electron microscopy reveals the tubular-saccular ultrastructure of carriers operating between Golgi apparatus and plasma membrane. *J. Cell Biol.* **148**: 45-48.
- Raquet, X., Eckert, J.H., Muller, S. und Johnsson, N.** (2001) Detection of altered protein conformations in living cells. *J. Biol. Chem.* **305**: 927-938.
- Rea, S. und James, D.E.** (1997) Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* **46**: 1667-1677.
- Rea, S., Martin, L.B., McIntosh, S., Macaulay, S.L., Ramsdale, T., Baldini, G. und James, D.E.** (1998) Syndet, an adipocyte target SNARE involved in the insulin-induced translocation of GLUT4 to the cell surface. *J. Biol. Chem.* **273**: 18784-18792.
- Reaven, G.M.** (1995) Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol. Rev.* **75**: 473-486.
- Reifenberger, E., Freidel, K. und Ciriacy, M.** (1995) Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol. Microbiol.* **16**: 157-167.
- Reifenberger, E., Boles, E. und Ciriacy, M.** (1997) Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* **245**: 324-333.
- Reinders, A., Schulze, W., Kühn, C., Barker, L., Schulz, A., Ward, J.M. und Frommer, W.B.** (2002) Protein-protein interactions between sucrose transporters of different affinities colocalized in the same enucleate sieve element. *Plant Cell* **14**: 1567-1577.

- Ren, M., Xu, G., Zeng, J., De Lemos-Chiarandini, C., Adesnik, M. und Sabatini, D.D.** (1988) Hydrolysis of GTP on rab11 is required for the direct delivery of transferrin from the pericentriolar recycling compartment to the cell surface but not from sorting endosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6187-6192.
- Ribon, V. und Saltiel, A.R.** (1997) Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. J.* **324**: 839-845.
- Ribon, V., Printen, J.A., Hoffman, N.G., Kay, B.K. und Saltiel, A.R.** (1998) A novel, multifunctional c-Cbl binding protein in insulin receptor signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 872-879.
- Rogers, S., James, D.E. und Best, J.D.** (1998) Identification of novel facilitative transporter like protein-GLUT8. *Diabetes* **47**, Suppl 1: A45.
- Rojo-Niersbach, E., Morley, D., Heck, S. und Lehming, N.** (2000) A new method for the selection of protein interactions in mammalian cells. *Biochem. J.* **348**: 585-590.
- Rosenbaum, C.** (1993) Ty-vermittelte Genexpression. Diplomarbeit: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Saeki, T., Shimabuku, A.M., Azuma, Y., Shibano, Y., Komano, T. und Ueda, K.** (1991) Expression of human P-glycoprotein in yeast cells--effects of membrane component sterols on the activity of P-glycoprotein. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 1859-1865.
- Saier, M.H. Jr.** (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 354-411.
- Saier, M.H. Jr.** (2000) Families of proteins forming transmembrane channels. *J. Membr. Biol.* **175**: 165-180.
- Saier, M.H. Jr.** (2000) Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol. Microbiol.* **35**: 699-710.
- Saltiel, A.R.** (2001) New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell* **104**: 517-529.
- Sambrook und Russell** (2001) "Molecular cloning"- A laboratory manual, Vol. 2 (3. edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sandoval, I.V., Arredondo, J.J., Alcalde, J., Gonzalez Noriega, A., Vandekerckhove, J., Jimenez, M.A. und Rico, M.** (1994) The residues Leu(Ile)475-Ile(Leu, Val, Ala)476, contained in the extended carboxyl cytoplasmic tail, are critical for targeting of the resident lysosomal membrane protein LIMP II to lysosomes. *J. Biol. Chem.* **269**: 6622-6631.
- Santer, R., Schneppenheim, R., Dombrowski, A., Gotze, H., Steinmann, B. und Schaub, J.** (1997) Mutations in GLUT2, the gene for the liver-type glucose transporter, in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Nat. Genet.* **17**: 324-326.
- Santer, R., Groth, S., Kinner, M., Dombrowski, A., Berry, G.T., Brodehl, J., Leonard, J.V., Moses, S., Norgren, S., Skovby, F., Schneppenheim, R., Steinmann, B. und Schaub, J.** (2002) The mutation spectrum of the facilitative glucose transporter gene SLC2A2 (GLUT2) in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Hum. Genet.* **110**: 21-29.
- Scanlon, S.M., Williams, D.C. und Schloss, P.** (2001) Membrane cholesterol modulates serotonin transporter activity. *Biochemistry* **40**: 10507-10513.
- Schwikowski, B., Uetz, P. und Fields, S.** (2000) A network of protein-protein interactions in yeast. *Nat. Biotechnol.* **18**: 1257-1261.
- Seidner, G., Alvarez, M.G., Yeh, J.I., O'Driscoll, K.R., Klepper, J., Stump, T.S., Wang, D., Spinner, N.B., Birnbaum, M.J. und De Vivo, D.C.** (1998) GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nat. Genet.* **18**: 188-191.
- Seifert, H.S., Chen, E.Y., So, M. und Heffron, F.** (1986) Shuttle mutagenesis: A method for transposon mutagenesis for *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 735-739.

- Shouffani, A. und Kanner, B.I.** (1990) Cholesterol is required for the reconstruction of the sodium- and chloride-coupled, gamma-aminobutyric acid transporter from rat brain. *J. Biol. Chem.* **265**: 6002-6008.
- Simons, K. und van Meer, G.** (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* **27**: 6197-6202.
- Simons, K. und Ikonen, E.** (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572.
- Simons, K. und Toomre, D.** (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**: 31-39.
- Simons, K. und Ehehalt, R.** (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* **110**: 597-603.
- Smith, S.J., Crowley, J.H. und Parks, L.W.** (1996) Transcriptional regulation by ergosterol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 5427-5432.
- Sogaard, M., Tani, K., Ye, R.R., Geromanos, S., Tempst, P., Kirchhausen, T., Rothman, J.E. und Sollner, T.** (1994) A rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles. *Cell* **78**: 937-948.
- Stagljar, I., Korostensky, C., Johnsson, N. und te Heesen, S.** (1998) A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5187-5192.
- Stokoe, D., Stephens, L.R., Copeland, T., Gaffney, P.R., Reese, C.B., Painter, G.F., Holmes, A.B., McCormick, F. und Hawkins, P.T.** (1997) Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science* **277**: 567-570.
- Takata, K., Kasahara, T., Kasahara, M., Ezaki, O. und Hirano, H.** (1990) Erythrocyte/ HepG2-type glucose transporter is concentrated in cells of blood-tissue barriers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**: 67-73.
- Tanner, L.I. und Lienhard, G.E.** (1987) Insulin elicits a redistribution of transferrin receptors in 3T3-L1 adipocytes through an increase in the rate constant for receptor externalization. *J. Biol. Chem.* **262**: 8975-8980.
- Thoidis, G. und Kandror KV.** (2001) A Glut4-vesicle marker protein, insulin-responsive aminopeptidase, is localized in a novel vesicular compartment in PC12 cells. *Traffic* **2**: 577-587.
- Thurmond, D.C. und Pessin, J.E.** (2001) Molecular machinery involved in the insulin-regulated fusion of GLUT4-containing vesicles with the plasma membrane (review). *Mol. Membr. Biol.* **18**: 237-245.
- Tikkanen, R., Obermuller, S., Denzer, K., Pungitore, R., Geuze, H.J., von Figura, K. und Honing, S.** (2000) The dileucine motif within the tail of MPR46 is required for sorting of the receptor in endosomes. *Traffic* **1**:631-640.
- Treitel, M.A. und Carlson, M.** (1995) Repression by *SSN6-TUP1* is directed by *MIG1*, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3132-3136.
- Trumbly, R.J.** (1992) Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **6**: 15-21.
- Uldry, M., Ibberson, M., Horisberger, J.D., Chatton, J.Y., Riederer, B.M. und Thorens, B.** (2001) Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J* **20**: 4467-4477.
- Ullrich, O., Reinsch, S., Urbe, S., Zerial, M. und Parton, R.G.** (1996) Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. *J. Cell. Biol.* **135**: 913-924.
- Varshavsky, A.** (1997a) The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* **2**: 13-28.
- Varshavsky, A.** (1997b) The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 383-387.
- Veenhoff, L.M., Heuberger, E.H. und Poolman, B.** (2002) Quarternary structure and function of transport proteins. *Trends Biochem. Sci.* **27**: 242-249.

- Vojtek, A.B., Hollenberg, J.A. und Cooper, J.A.** (1993) Mammalian RAS interacts directly with the sentrin/threonine kinase RAF. *Cell* **74**: 205-214.
- Volchuk, A., Wang, Q., Ewart, H.S., Liu, Z., He, L., Bennett, M.K. und Klip, A.** (1996) Syntaxin 4 in 3T3-L1 adipocytes: regulation by insulin and participation in insulin-dependent glucose transport. *Mol. Biol. Cell.* **7**: 1075-1082.
- Voss, D.** (2001) Molekulargenetische Untersuchungen zur Funktion des *FGY1*-Gens bei der Expression heterologer Glukosetransporter in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. und Philippsen, P.** (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-1808.
- Walmsley, A.R., Barrett, M.P., Bringaud, F. und Gould, G.W.** (1998) Sugar transporters from bacteria, parasites and mammals: structure-activity relationships. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 476-481.
- Wang, D., Kranz-Eble, P. und De Vivo, D.C.** (2000) Mutational analysis of GLUT1 (SLC2A1) in Glut-1 deficiency syndrome. *Hum. Mutat.* **16**: 224-231.
- Weiler-Guttler, H., Zinke, H., Mockel, B., Frey, A. und Gassen, H.G.** (1989) cDNA cloning and sequence analysis of the glucose transporter from porcine blood-brain barrier. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **370**: 467-473.
- Wes, P., Xu, X., Li, H., Chien, F., Doberstein, S. und Montell, C.** (1999) Termination of phototransduction requires binding of the NINAC myosin III and the PDZ protein INAD. *Nat. Neurosci.* **2**: 447-453.
- White, M.F.** (1998) The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Mol. Chem. Biochem.* **182**: 3-11.
- Wieczorke, R., Krampe, S. Weierstall, T. Freidel, K., Hollenberg, C.P. und Boles, E.** (1999) Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexose in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **464**: 123-128.
- Wieczorke, R.** (2001) Molekulargenetische und physiologische Untersuchungen zur Funktion von *FGY1* bei der heterologen Expression von Glukosetransportern in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Wieczorke, R., Dlugai, S., Krampe, S. und Boles, E.** (2002) Characterisation of mammalian GLUT glucose transporters in a heterologous yeast expression system. (in press).
- 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.
- Wittke, S., Dünwald, M. und Johnsson, N.** (2000) Sec62p, a component of the endoplasmic reticulum protein translocation machinery, contains multiple binding sites for the Sec-complex. *Mol. Biol. Cell* **11**: 3859-3871.
- Xiang, Y., Molloy, S.S., Thomas, L. und Thomas, G.** (2000) The PC6B cytoplasmic domain contains two acidic clusters that direct sorting to distinct trans-Golgi network/endosomal compartments. *Mol. Biol. Cell* **11**: 1257-1273.
- Yang, J. und Holman, G.D.** (1993) Comparison of GLUT4 and GLUT1 subcellular trafficking in basal and insulin-stimulated 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 4600-4603.
- Yeh, J.I., Verhey, K.J. und Birnbaum, M.J.** (1995) Kinetic analysis of glucose transporter trafficking in fibroblasts and adipocytes. *Biochemistry* **34**: 15523-15531.
- Zamenhoff, S.** (1957) Preparation and assay of desoxyribonucleic acids from animals tissue. *Methods Enzymol.* **3**: 696-704.

- Zimmermann, F.K.** (1975) Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* **31**: 71-81.
- Zinser, E. und Daum, G.** (1995) Isolation and biochemical characterization of organelles from the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**: 493-536.
- Zinser, E., Paltauf, F. und Daum, G.** (1993) Sterol composition of yeast organelle membranes and subcellular distribution of enzymes involved in sterol metabolism. *J. Bacteriol.* **175**: 2853-2858.
- Zottola, R.J., Cloherty, E.K., Coderre, P.E., Hansen, A., Hebert, D.N. und Carruthers, A.** (1995) Glucose transporter function is controlled by transporter oligomeric structure. A single, intramolecular disulfide promotes GLUT1 tetramerization. *Biochemistry* **34**: 9734-9747.
- Zweytick, D., Hrastnik, C., Kohlwein, S.D., Daum, G.** (2000) Biochemical characterization and subcellular localisation of the sterol C-24(28) reductase, Erg4p, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **470**: 83-87.

## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ARS	Autonom replizierende Sequenz
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CEN	Centromersequenz
Cub	Ubiquitin-C-Terminus (Aminosäuren 1-37)
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DOG	Desoxyglukose
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FGY	functional expression of GLUT in yeast
FOA	5-Fluor-Orotsäure
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GLUT	Glukosetransporter
h	Stunde
HXT	Hexosetransporter
IgG	ImmunglobulinG
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
LB	Luria-Bertoni, Vollmedium für Bakterien
LiAc	Lithiumacetat
M	Molar
mA	Milliampère
min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar

---

ng	Nanogramm
NIDDM	Nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus
nm	Nanometer
Nub	Ubiquitin-N-Terminus (Aminosäuren 35-76)
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
PLV	ProteinA-LexA-VP16
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
<i>S. c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUS	Split-Ubiquitin-System
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
mU	Einheit der Enzymaktivität (milli Unit)
UBP	Ubiquitin-spezifische Protease
V	Volt
WT	Wildtyp
YEP	Yeast Extrakt plus Pepton
YNB	Yeast nitrogen base
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
z. B.	zum Beispiel

## **Danksagungen**

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

Herrn Prof. Dr. C. Hollenberg danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Mikrobiologie durchzuführen und für die freundliche Übernahme des Referats.

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

Ein besonderer Dank gilt den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, die vielen hilfreichen Diskussionen und ein angenehmes Arbeitsklima.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund für die unermüdliche Unterstützung während meiner Promotion.

**Eidesstattliche Erklärung**

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

Silke Dlugai

Düsseldorf, 28.01.2003