

Untersuchung der Protein-Familie der „Ubiquitin Specific
Processing Proteases“ in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von Andrea Kinner
aus Borken

Düsseldorf 2003

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

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

Koreferentin: Prof. Dr. E. Knust

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Stämme und Medien	16
2.1.1	Bakterienstämme.....	16
2.1.2	Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	16
2.1.3	Hefestämme	16
2.1.4	Medien und Anzucht von Hefestämmen.....	18
2.2	Plasmide.....	19
2.3	Genbanken	21
2.4	Synthetische Oligonukleotide	21
2.5	Chemikalien und Enzyme.....	23
2.6	Antikörper	24
2.7	Transformation	25
2.7.1	Transformation von <i>E. coli</i>	25
2.7.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	26
2.8	Präparation von DNA.....	26
2.8.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	26
2.8.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	27
2.8.3	Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	27
2.9	Enzymatische Modifikation von DNA.....	27
2.9.1	DNA-Restriktion	27
2.9.2	Auffüllen von überstehenden 5' Enden.....	28
2.9.3	Entfernen von überstehenden 3' Enden	28
2.9.4	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	28
2.9.5	Ligation	28
2.10	PCR-Amplifikation von DNA.....	29
2.10.1	Spezifische Amplifikation von Plasmid-DNA.....	29
2.10.2	Spezifische Amplifikation chromosomaler DNA.....	29
2.11	Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten	30
2.12	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30

2.13	Bestimmung der DNA-Konzentration	30
2.14	Sequenzierung von DNA	31
2.15	Herstellung von Proteinextrakten für die Western-Analyse	31
2.16	Bestimmung der Proteinkonzentration	31
2.17	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	32
2.18	Coumassie Färbung von Protein-Banden im SDS-Gel	32
2.19	Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse	32
2.20	Zellfraktionierung	33
2.20.1	Differenzielle Zentrifugation.....	33
2.20.2	Membran-Floatation.....	34
2.20.3	Sucrose-Dichte-Gradienten	34
2.21	Präparation von Mitochondrien.....	35
2.22	Deglykosylierung von Proteinen	35
2.23	Pulse-Chase-Experimente.....	36
2.24	Immunpräzipitation	36
2.25	Mikroskopische Untersuchungen	37
2.25.1	GFP	37
2.25.2	Aufnahme von FM4-64	37
2.25.3	Anfärben von Mitochondrien.....	38
2.25.4	Immunfluoreszenz	38
2.26	Protease-Schutz-Experiment.....	38
2.27	FACS Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting).....	39
2.28	Tropftests.....	39
2.29	Stickstoffhunger Test.....	40
2.30	Bestimmung der Paarungsaktivität.....	40
2.31	Präparation von Fusionsproteinen.....	40
2.32	Herstellung von Azetonpuder	41
2.33	Kreuzung von Hefestämmen und Tetradenanalyse	43
2.34	Gen-Deletion und Gen-Modifikation in <i>S. cerevisiae</i>	43
3	Ergebnisse	44

3.1	Charakterisierung der <i>UBP</i> Disruptionsstämme	44
3.1.1	Untersuchung der <i>UBP</i> Mutanten auf Wachstumsdefekte	44
3.1.2	Ubiquitinierungsmuster in den <i>UBP</i> Disruptionsmutanten	47
3.1.3	Untersuchung der <i>UBP</i> Mutanten auf Defekte im endozytischen Weg	50
3.2	Identifizierung membrangebundener Ubps	50
3.3	Charakterisierung der Membran-Assoziation von Ubp16	56
3.4	Untersuchung der Glykosylierung einer Ubp16 Invertase Fusion	57
3.5	Intrazelluläre Lokalisation von Ubp16	59
3.5.1	Zellfraktionierung durch Differentielle Zentrifugation	59
3.5.2	Fraktionierung von Ubp16 im Sucrose-Dichte-Gradienten	61
3.6	Lokalisation von Ubp16 13-myc in der Zelle	63
3.6.1	Ubp16 ist in der äußeren Mitochondrien-Membran lokalisiert.	66
3.7	Suche nach der Funktion von Ubp16	68
3.7.1	Identifizierung von Ubp16 Interaktionspartnern	68
3.7.2	Untersuchung der Hap4 und Hap5 Ubiquitinierung	73
3.7.3	Bestimmung der Hap4 und Hap5 Halbwertszeit in Abhängigkeit von Ubp16	75
3.8	Untersuchungen zur Funktion von Ubp16	76
3.8.1	Einfluss von Ubp16 auf die Mitochondrien-Morphologie	76
3.8.2	FACS-Analyse der Mitochondrienmenge	77
3.8.3	Einfluss von Ubp16 auf das Wachstum	79
3.8.4	Untersuchung der Mitochondrien-Vererbung	80
3.8.5	Transport von Phosphatidylserin zu den Mitochondrien	81
3.9	Nachweis spezifischer Substrate für Ubp16	83
4	Diskussion	87
4.1	Charakterisierung der <i>UBP</i> Disruptionsmutanten	87
4.2	Identifizierung membranassoziierter Ubp's	89
4.3	Lokalisation von Ubp16	91
4.4	Suche nach einer Funktion von Ubp16	93
5	Zusammenfassung	98
6	Literatur	99
7	Abkürzungen	105

1 EINLEITUNG

Eine essentielle Funktion aller eukaryontischen Zellen ist die Fähigkeit, Proteine gesteuert abzubauen zu können. Durch die gezielte Proteolyse ist die Zelle in der Lage, die Aktivität und die Quantität verschiedener Proteine, wie die von Rezeptoren an der Plasmamembran oder von Transkriptionsfaktoren, zu regulieren. Dabei spielt die posttranslationale Modifikation durch Ubiquitin eine zentrale Rolle, sie ist ein Signal für den Proteinabbau (Hershko und Ciechanover, 1998).

Ubiquitin

Ubiquitin ist ein, zwischen den eukaryontischen Spezies, hoch konserviertes Protein mit einer Größe von 76 Aminosäuren. Das Ubiquitin der Hefe unterscheidet sich in nur drei Aminosäuren von dem des Menschen (Wilkinson, 2000). Ubiquitin wird durch eine kovalente Isopeptidbindung mit den Ziel-Proteinen verknüpft. Für die Konjugation sind die beiden Glycin-Reste am C-Terminus des Proteins essentiell. Über das äußere der beiden Glycine wird Ubiquitin aktiviert und schließlich durch eine Kaskade aus verschiedenen Enzymen auf ein Substrat-Protein übertragen. Bei der Entstehung von Polyubiquitinketten werden einzelne Ubiquitinmoleküle miteinander verbunden, wobei die Verknüpfung über verschiedene Lysine im Ubiquitin erfolgen kann (Hochstrasser, 1996). Die häufigste Verknüpfung erfolgt über Lysin-48 und ist das Signal für den Abbau durch das Proteasom, wobei die Ubiquitinkette für die Erkennung aus mindestens vier Ubiquitinmolekülen bestehen muss (Thrower, *et al.*, 2000). Ubiquitin kann aber ebenfalls über die Lysine Lys-29 und Lys-63 verkettet werden. Auch die über Lysin-29 verknüpfte Polyubiquitinketten scheinen durch das Proteasom erkannt zu werden (You und Pickart, 2001). Die Verknüpfung mit Lysin-63 sowie die Modifikation mit nur einem Ubiquitinmolekül scheint dagegen für die Internalisierung von Oberflächenrezeptoren und die Endozytose von Bedeutung zu sein (Hicke, 1999). Erst seit kurzem gibt es Hinweise auf eine Funktion der Verknüpfung über Lysin-63 bei der DNA-Reparatur (Hoegge, *et al.*, 2002).

Das Ubiquitin-System

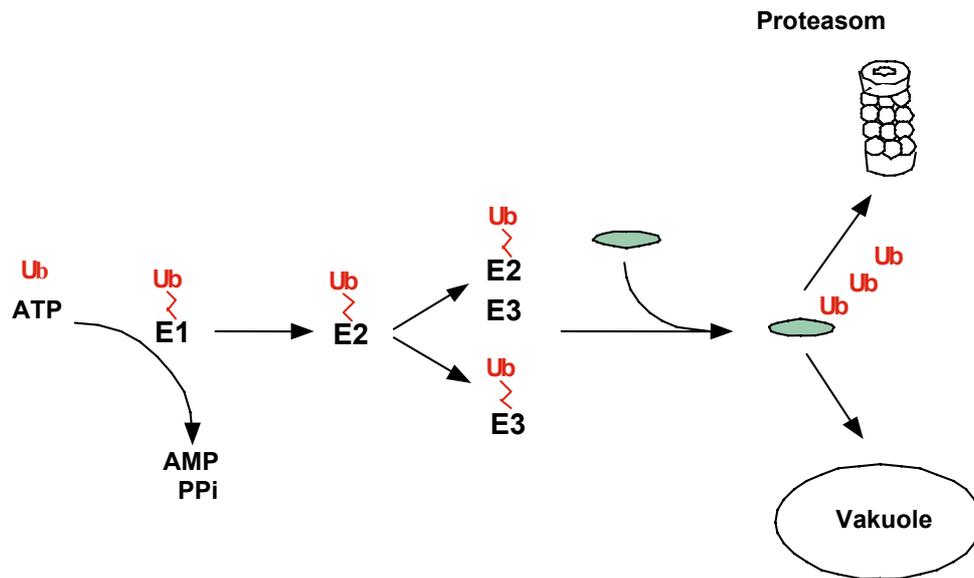


Abb. 1: Das Ubiquitin-System. Ubiquitin wird durch E1-Enzyme aktiviert, auf konjugierende E2-Enzyme übertragen und kann durch E3-Ligasen oder durch E2-Enzyme mit Hilfe von Ubiquitinligasen (E3) auf die Substrate (grün) übertragen werden. An die Enzyme des Ubiquitin-Systems wird Ubiquitin durch eine Thioesterbindung, rot gezackt dargestellt, gebunden, an die Substrate über eine Isopeptidbindung. Ubiquitinierte Substrate werden über das Proteasom oder in der Vakuole (den Lysosomen, bei höheren Eukaryonten) abgebaut.

Zum Ubiquitin System gehören drei Klassen von Enzymen, die Ubiquitin-aktivierenden Enzyme (E1), die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (UBCs oder E2) und die Ubiquitin-Ligasen (E3) (Abbildung 1). Im ersten Schritt wird das Ubiquitin durch ein E1-Enzym aktiviert. Unter ATP Verbrauch wird ein Ubiquitin-Adenylat gebildet und durch Freisetzen von AMP wird das Ubiquitin dann auf den konservierten Cystein-Rest im aktiven Zentrum des E1-Enzyms übertragen. Dabei entsteht eine energiereiche Thioesterbindung. In der Hefe *Sacharomyces cerevisiae* gibt es nur ein E1-Enzym, das Uba1. Das *UBA1* Gen ist essentiell, was zeigt, welche Bedeutung die Ubiquitinierung für die Zelle hat (Ciechanover, 1994). Das aktivierte Ubiquitin wird dann durch eine Transesterifizierung auf ein E2-Enzym übertragen, welches ebenfalls ein konserviertes Cystein im aktiven Zentrum besitzt (Hershko, et al., 1983). In der Hefe sind 13 UBCs bekannt. Bei vielen dieser Enzyme führen Mutationen zu distinkten Phänotypen, was darauf hinweist, dass die E2-Proteine offensichtlich unterschiedliche Funktionen ausüben und unterschiedliche

Substratspezifitäten haben (Hochstrasser, 1996). Schließlich wird das Ubiquitin entweder durch eine Ubiquitin-Ligase (E3) oder durch ein E2-Enzym mit Hilfe einer Ubiquitin-Ligase auf die Substrate übertragen (Bonifacino und Weissman, 1998). Bei den Ubiquitin-Ligasen unterscheidet man verschiedene Arten von Enzymen. Die RING Ligasen enthalten ein zinkkomplexierendes RING Motiv, welches dem, aus Transkriptionsfaktoren bekannten, Zink-Finger Motiv ähnelt. Die RING Proteine übertragen Ubiquitin zusammen mit E2-Enzymen auf die Ziel-Proteine und können Teil großer Ligasekomplexe sein, wie dem SCF (Skip1, Cullin/Cdc53, E-box Protein) Komplex, oder dem APC (Anaphase Promoting Complex) (Glickman und Ciechanover, 2002). Eine weitere Enzymklasse sind die HECT (Homologie zum E6-AP Carboxy-Terminus) Ligasen. Im Gegensatz zu den RING Ligasen können sie über einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum eine Thiolesterbindung mit Ubiquitin eingehen und es auf Ziel-Proteine übertragen (Scheffner, *et al.*, 1995). Erst kürzlich wurde eine mögliche weitere Klasse der Ubiquitin Ligasen beschrieben, die U-box Proteine, zu der in der Hefe das Protein Ufd2 gehört (Hatakeyama und Nakayama, 2003). Bei der Übertragung des Ubiquitins auf ein Zielprotein wird das Ubiquitinmolekül über seinen C-Terminus kovalent an die ϵ -Aminogruppe eines Lysin-Restes im Ziel-Protein gebunden.

Die Funktion der Ubiquitinierung

Die klassische Funktion der Ubiquitinierung ist der gezielte Abbau von Proteinen durch das 26S Proteasom. Das 26S Proteasom ist ein multimerer Proteasekomplex, der sich im Zytoplasma und im Zellkern befindet. Der Komplex setzt sich aus einem 20S Zylinder und zwei 19S Kappen zusammen. Die 19S Untereinheiten enthalten ATPasen, die vermutlich nötig sind, um die Proteine vor der Proteolyse zu entfalten. Die 20S Untereinheit beinhaltet die proteolytische Aktivität des Komplexes, der die Substrate zu kurzen Peptidfragmenten abbaut (Hochstrasser, 1995, Jentsch und Schlenker, 1995). Die ersten identifizierten Substrate, die durch das Proteasom abgebaut werden, waren beschädigte oder nicht richtig gefaltete Proteine (Wilkinson, 2000). Mittlerweile stellt sich die Funktion der Ubiquitinierung wesentlich komplexer dar. Durch den gezielten Abbau von Proteinen werden zelluläre Prozesse gesteuert. Im Zellzyklus zum Beispiel wird der Übergang von der Metaphase in die Anaphase und der Austritt aus der Mitose durch Ubiquitinierung reguliert. Zellzyklus-spezifische

Proteine, wie mitotische Zykline, werden durch den Anaphase Promoting Complex (APC) einem Ubiquitin Ligase Komplex erkannt und ubiquitiniert, worauf der Abbau durch das Proteasom folgt (Yeong, *et al.*, 2000). Auch einige membrangebundene Transkriptionsfaktoren können durch kontrollierte Ubiquitinierung, „regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing (RUB)“, aktiviert werden (Hoppe, *et al.*, 2001). Sogar die Expression der Gene der Proteasom-Untereinheiten unterliegt einer Kontrolle durch Ubiquitin. Der Transkriptionsfaktor Rpn4 aktiviert die Expression der Proteasomen Gene und wird selbst ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut. Hierbei handelt es sich um eine negative Rückkopplung, da das Protein, welches die Produktion der Proteasom Gene hoch reguliert, durch das Genprodukt, das Proteasom, zerstört wird (Xie und Varshavsky, 2001, Kapranov, *et al.*, 2001).

Seit einigen Jahren sind auch proteasom-unabhängige Funktionen der Ubiquitinierung bekannt, wie die Internalisierung von Oberflächenproteinen und deren Transport in die Vakuole über den endozytischen Weg. Das erste Membranprotein der Hefe, für das eine Modifikation durch Ubiquitin nachgewiesen wurde, war der ABC-Transporter Ste6 (Kölling und Losko, 1997, Kölling und Hollenberg, 1994). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass Ste6 unabhängig vom Proteasom in der Vakuole abgebaut wird. Neben Ste6 wurden eine Reihe weiterer Membranproteine identifiziert, die ubiquitiniert und anschließend endozytiert werden. Dazu gehören in der Hefe Transporter, wie die Uracil-Permease (Fur4) oder Oberflächenrezeptoren, wie der α -Faktor Transporter Ste2 (Glickman und Ciechanover, 2002). Bei der Rezeptor-vermittelten Endozytose von Ste2 zeigte sich weiter, dass die Phosphorylierung von Oberflächenrezeptoren, als Antwort auf die Liganden-Bindung, die Ubiquitinierung positiv reguliert (Hicke und Riezman, 1996, Hicke, *et al.*, 1998). Auch in Säugern werden eine Reihe von Oberflächenrezeptoren, unter anderen die Wachstumshormon-Rezeptoren PDGF-R (Platelet Derived Growth Factor Receptor) und EGR-F (Epidermal Growth Factor Receptor), in Folge der Ligandenbindung ubiquitiniert. Dabei scheint die Ubiquitinierung die Internalisierung der Proteine und die endozytische Maschinerie zu aktivieren (Glickman und Ciechanover, 2002). Die Ubiquitinierung von Oberflächenrezeptoren und Transportern in Säugern kann ebenfalls durch Phosphorylierung beeinflusst werden (Wilkinson, 2000). Bis heute ist aber noch unklar, über welchen Mechanismus die Internalisierung in Folge der Ubiquitinierung gesteuert wird. In Basophilem Zellen

aus Ratten konnte gezeigt werden, dass die Ubiquitin-Ligasen Nedd4 und Cbl nach Aktivierung des IgE Signals mit Rafts assoziiert sind (Lafont und Simons, 2001). Rafts sind detergent-resistente Membransubdomänen. Durch die Lokalisation in solchen Rafts werden E3-Ligasen und Rezeptoren möglicherweise in räumliche Nähe gebracht.

Vor kurzem wurde entdeckt, dass eine Reihe von Proteinen, die für die Endozytose wichtig sind, eine gemeinsame UIM (Ubiquitin Interacting Motiv) Domäne aufweisen. Dazu gehören Eps15 und Eps15R, die eine Schlüsselrolle bei der Endozytose von Transmembranrezeptoren in Säugern spielen (Klapisz, *et al.*, 2002). Die genaue Funktion der UIM-Proteine für die Endozytose ist noch nicht bekannt, aber Proteine mit einer UIM Domäne sind einerseits in der Lage Ubiquitin zu erkennen und werden andererseits selber monoubiquitiniert. Für das endocytische Adapter Protein Epsin konnte gezeigt werden, dass die UIM Domäne nötig für die Ubiquitinierung von Epsin, aber nicht die Akzeptor-Stelle für das Ubiquitin ist. Daraus wurde geschlossen, dass die UIM Domäne möglicherweise als Signal für Ubiquitinierung dienen könnte (Oldham, *et al.*, 2002). Aufgrund der weiten Verbreitung der UIM Domäne in Endozytose Adapter-Proteinen, wird weiter vermutet, dass ubiquitinierte Membranrezeptoren durch ein Netzwerk aus UIM Proteinen, zur Degradation in die Lysosomen weitergeleitet werden könnten (Katz, *et al.*, 2002). In der Hefe sind zwei Proteine bekannt, die zu Esp15 homologe Domänen aufweisen. Das sind End3 und Pan1, die beide eine Funktion bei der Internalisierung des α -Faktor Transporters Ste2 haben. Für Ste2 konnte gezeigt werden, dass eine Modifikation mit nur einem Ubiquitinmolekül ausreichend für die Internalisierung ist (Terrell, *et al.*, 1998). Die UIM Domäne erkennt Ubiquitin und bindet es im Bereich von Lysin-48. Dadurch könnte die Konjugation weiterer Ubiquitinmoleküle und somit die Entstehung von Polyubiquitinketten verhindert werden (Shekhtman und Cowburn, 2002). Es gibt einige Hinweise, dass Monoubiquitinierung als Endozytose-Signal ausreichend ist (Shih, *et al.*, 2000). Daher wird vermutet, dass die UIM Domäne für eine Monoubiquitinierung und damit für die Endozytose notwendig ist.

Neuere Untersuchungen sprechen für eine weitere Funktion der Ubiquitinierung im endozytischen Weg. Der Hefe-ABC-Transporter Ste6 wird ubiquitiniert und in der Vakuole abgebaut. In einer *doa4* Mutante, in der die Ubiquitinierung gestört ist, wird

Ste6 nicht in die Vakuole transportiert, sondern befindet sich in der Vakuolen-Membran (Losko, *et al.*, 2001). Der Transport von Membranproteinen in die Vakuole erfolgt wahrscheinlich über den MVB (Multi Vesicular Body) Weg. Bei defekter Ubiquitinierung scheint auch der Transport über MVBs gestört zu sein (Abbildung 2), so dass Ste6 an die Vakuolen-Membran fehlgeleitet wird. Neben Ste6 wurden weitere Proteine in der Hefe gefunden, wie die Polyphosphatase Phm5 oder die Carboxypeptidase S (CPS), die über den MVB Weg in das Vakuolen-Lumen transportiert werden (Reggiori und Pelham, 2001, Katzmann, *et al.*, 2001). Phm5 und CPS werden, wie Ste6, in der *doa4* Mutante an die Vakuolen-Membran fehlgeleitet. Die Aufnahme von Phm5 in die Vakuole ist ebenfalls blockiert, wenn der für die Ubiquitinierung essentielle Lysin-Rest (Lys-6) mutiert ist. Durch die Fusion eines Ubiquitinmoleküls an den N-Terminus von Phm5 (Lys-6 zu Arg) konnte der Defekt wieder aufgehoben werden, das chimäre Ubiquitin-Phm5 Protein wird korrekt in die Vakuole transportiert (Reggiori und Pelham, 2001). Daraus wurde geschlossen, dass die Monoubiquitinierung das Signal für die Aufnahme in die MVBs sein muss. Bisher konnte aber noch nicht ausreichend geklärt werden, ob die Ubiquitinierung „nur“ das Signal für die Aufnahme in die MVBs ist, oder ob sie auch für die Bildung der MVB-Vesikel notwendig ist (Abbildung 2).

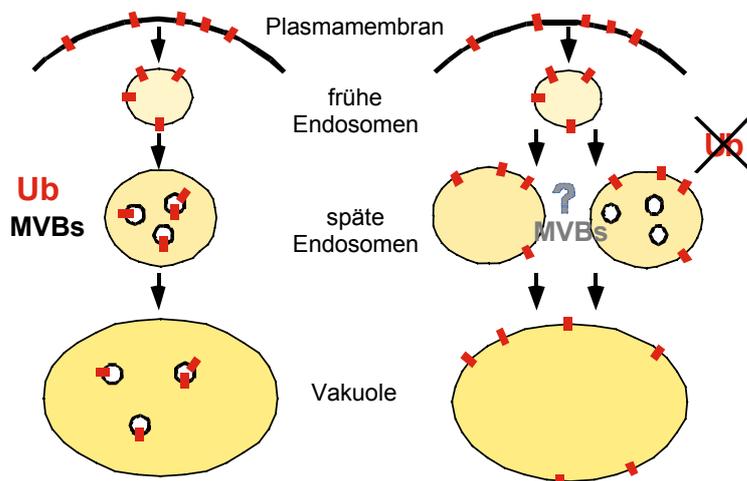


Abb. 2: Der Transport von Membranproteinen in die Vakuole in Abhängigkeit von Ubiquitin. Oberflächenproteine (rote Kästchen) werden internalisiert und vermutlich an späten Endosomen in MVBs aufgenommen, wobei die Monoubiquitinierung das Signal für die Aufnahme ist.

Nach der Fusion vom Endosom mit der Vakuole werden die Vesikel in das Vakuolen Lumen entlassen, linker Teil der Abbildung. Fehlt die Ubiquitinierung, sind die Membranproteine vermutlich an der Endosomen-Membran lokalisiert und werden bei Fusion mit der Vakuole an die Vakuolen-Membran fehlgeleitet (rechter Teil), wobei noch unklar ist, ob auch die Bildung der MVB-Vesikel gestört ist.

Die deubiquitinierenden Enzyme

Die deubiquitinierenden Enzyme (Dubs) können spezifisch die Isopeptidbindung zwischen zwei Ubiquitinmolekülen oder zwischen Ubiquitin und seinem Substrat hydrolysieren. Eine große Anzahl deubiquitinierender Enzyme wurde, verteilt über die eukaryontischen Spezies, identifiziert.

Die deubiquitinierenden Enzyme wurden bisher in zwei Klassen eingeteilt. Erst vor kurzem wurden Hinweise auf eine mögliche dritte Klasse von Dubs gefunden, bei denen es sich um Metalloproteasen handelt (Verma, *et al.*, 2002, Yao und Cohen, 2002). Die klassischen Dubs sind Cystein Proteasen und lassen sich in die Klasse der Uchs (Ubiquitin C-terminal Hydrolases) und in die Klasse der Ubp (Ubiquitin Specific Processing Proteases) unterteilen. Die Uchs hydrolysieren Ubiquitin bevorzugt von kleinen Peptiden oder kleinen Amidin und Estern. In der Bäckerhefe ist nur ein Uch, das Yuh1, bekannt. Aus der Ubp Familie dagegen sind in der Hefe 16 Proteine bekannt. Die Ubps hydrolysieren Ubiquitin von größeren Proteinen und sind notwendig für das Trennen von Polyubiquitinketten (Chung und Baek, 1999, Wilkinson, 2000). Die Proteine der Ubp Familie haben eine katalytische Domäne von etwa 300 bis 500 Aminosäuren, die aus sechs konservierten Regionen, DHI bis DHVI (Deubiquitinating Enzyme Homologie Domain), besteht (D'Andrea und Pellman, 1998). Die DHI am C-terminalen Ende enthält das katalytisch aktive Cystein und wird auch als Cys-Box bezeichnet. Am N-Terminus wird die katalytische Domäne durch die His-Box, die das katalytisch aktive Histidin enthält, begrenzt. Die meisten Proteine der Ubp Familie weisen Erweiterungen am N-Terminus, nur wenige am C-Terminus der katalytischen Domäne auf. Zusätzlich findet man bei vielen der Isoformen Insertionen in der katalytischen Domäne. Es wird vermutet, dass die Insertionen und Erweiterungen die Substratspezifität oder die Lokalisation der Enzyme bewirken (Wilkinson, 1997).

BOX I		BOX II		BOX III			
UBP1	102	GLVNDGNTCFMNSVLQ	(348)	466	PPLLLSIHINRS (203)	681	YSLRSVIVHYGTHNYGHY
UBP2	737	GINNIGNTCYLNSSLQ	(290)	1043	FPTILQVQIQRV (138)	1193	YSLFSVFIHRGEASYGHY
UBP3	461	GLINRANICFMSSVLQ	(297)	774	LPQVLLIQFKRF (58)	844	YKLTGVIYHHGVSSDGGH
UBP4	563	GLENLGNSCYMNCCIQ	(223)	802	LPRNLIVHLKRF (50)	864	YELYGVACHFGTLYGGHY
UBP5	447	GLENIGNCCYMNCCIQ	(223)	686	LPKKLIINLKRF (47)	745	YRLYGVACHSGSLYGGHY
UBP6	110	GFKNMGNTCYLNATLQ	(180)	306	LPKFLTQYVRF (112)	430	YNLIGVITHQGANSSESGH
UBP7	610	GLRNLCNTCYINSMIQ	(331)	957	LPKILVIHLSRF (29)	998	YKLFQVNVHTGTLISGHY
UBP8	138	GLINMGSTCFMSSILQ	(200)	354	LPSVLVLQLKRF (45)	411	YELIGIVSHKGTVNEGHI
UBP9	135	GYENFGNTCYCNSVLQ	(403)	554	LPHILSLHLKRF (35)	601	YELSGVVIHMGGPQGH
UBP10	363	GLLNHGVTCTYNAAVQ	(249)	628	APETLLVHLKRF (34)	674	YQLLSVVVHEGRSLSSGH
UBP11	299	GLQNPCNTCYINSIIQ	(277)	592	LPPIILVIHLSRF (29)	633	YKLYGTVNHSGNLINGHY
UBP12	365	GLVNLGNTCYMNSALQ	(622)	1003	TPDILLIHLKRF (37)	1052	YDLYAVDNHYGGGLGGGHY
UBP13	141	GYENFGNTCYCNSVLQ	(398)	555	LPDTLLHLKRF (35)	602	YELAGIVVHMGGPQGH
UBP14	346	GLINLGNSCYLNNSVIQ	(179)	541	LPQTLILNPIRI (189)	742	YALTAVICHKGNVHSGH
UBP15	206	GFRNQGATCYLNSSLQ	(167)	389	FPPVLHLQLKRF (48)	449	YNLHGVLVHSGDLSGHY
UBP16	54	GLINRGNDCFITSSLQ	(269)	339	LPDILIVHLSRS (40)	391	YNLKSVVKHTGSHSSGHY
Konsensus		<u>GL-N-GNTCY-N---QCL</u>		<u>C-C-----K-----LP--L---LKRF--</u>		<u>Y-L--V--H-G-----</u>	
		DHI		DHIV		DHV	
		<u>QQD-EFL---L-L-E--</u>		<u>S-I---F-G-----C-C-</u>		<u>-AYVLFY---</u>	
		DHII		DHIII		DHVI	

Abb. 3: Homologe Bereiche der Hefe Ubp Familie. Die am stärksten konservierten Bereiche der 16 Hefe Ubps wurden durch den Blockmaker Server (URL <http://www.blocks.fhcr.org>) berechnet und wurden in den Boxen I bis III aufgeführt. Die Konsensussequenzen der 6 Homologie Domänen (Deubiquitinating Enzyme Homologie Domain), die von D'Andrea und Pellman für Ubps verschiedener Spezies bestimmt wurden, sind unter den drei Boxen unterstrichen aufgeführt worden. Die Box I entspricht der DHI mit dem katalytisch aktiven Cystein (rot), die Box II entspricht einem Teil der DHIV und die Box III entspricht der DHV mit dem katalytisch aktivem Histidin (rot).

Die Funktion der Deubiquitinierung

Die klassische Funktion der Ubps ist das Abtrennen der Ubiquitinketten von den Substrat-Proteinen, bevor diese abgebaut werden, so dass das Ubiquitin nicht mit degradiert wird und der Zelle für erneute Konjugation zur Verfügung steht. Ubp4/Doa4 scheint diese Aufgabe in der Hefe auszuüben. Zellen denen Doa4 fehlt, zeigen Defekte beim Abbau des MAT α 2 Proteins und bei der DNA Replikation. In diesen Zellen häufen sich Polyubiquitinketten an, der Spiegel an freiem Ubiquitin scheint reduziert zu sein und die Proteolyse als Gesamtes ist ebenfalls beeinträchtigt (Swaminathan, *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte für Ubp4 die Assoziation mit dem Proteasom nachgewiesen werden (Papa, *et al.*, 1999). Die freien Polyubiquitinketten werden dann von Ubp14, dem Hefe-Homologen der humanen Isopeptidase T,

hydrolysiert. Diese Funktion verleiht dem Ubp einen Sonderstatus, es ist das einzige Hefe-Ubp, welches freie Ubiquitinketten spalten kann (Amerik, *et al.*, 1997).

Es gibt Hinweise, dass die deubiquitinierenden Enzyme neben den klassischen Funktionen, auch regulatorische Funktionen haben können, obwohl eine Untersuchung aller *ubp* Mutanten der Hefe keine spezifischen Phänotypen identifizieren konnte und gezeigt hat, dass keines der *UBP* Gene unter normalen Wachstumsbedingungen essentiell ist (Amerik, *et al.*, 2000a).

So konnte gezeigt werden, dass Ubp3 möglicherweise eine Rolle bei der Signaltransduktion während der Pheromon-Antwort spielt. Es wird vermutet, dass Ubp3 mit der Protein-Kinase Ste7 interagiert (Wang und Dohlman, 2002). Eine weitere regulatorische Funktion scheint Ubp3 durch eine Interaktion mit Sir4 beim Silencing an den Telomeren und dem stillen Paarungstyp Locus zu haben. Sir4 gehört zum SIR Protein Komplex, der für das Silencing notwendig ist. Da in einer Ubp3 Deletionsmutante das Silencing verstärkt ist, scheint es sich bei Ubp3 um einen Inhibitor des Silencings zu handeln (Moazed und Johnson, 1996). Das Silencing scheint ebenfalls durch Interaktion zwischen Sir4 und Ubp10/Dot4 reguliert zu werden, wobei die Disruption von *UBP10* den gegenteiligen Effekt wie die Disruption von *UBP3* zu haben scheint, nämlich ein reduziertes Silencing (Kahana und Gottschling, 1999).

Wie diese Befunde miteinander vereinbar sind, ist unklar. Ob beide Ubps eine echte Wechselwirkung mit Sir4 eingehen oder ob es sich um eine indirekte Regulation handelt, was den gegenteiligen Effekt erklären könnte, wurde bisher nicht weiter untersucht.

Ubp10 scheint weiterhin an der posttranskriptionalen Regulation der Aminosäuren Permease Gap1 beteiligt zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Gap1 in *ubp10* Mutanten reduziert ist, was einhergeht mit der Reduktion der Proteinmenge, während das Niveau der mRNA unverändert bleibt (Kahana, 2001).

Auch in anderen Organismen wurden regulatorische Funktionen für die Deubiquitinierung beschrieben. Das deubiquitinierende Enzym Fat facets (Faf) ist an der Entwicklung der Augen in *Drosophila* beteiligt. Es scheint der Ubiquitinierung des Epsin homologen Liquid facets (Lqf) entgegen zu wirken und das Protein so vor Degradation zu schützen (Chen, *et al.*, 2002). In Mäusen wurde ein weiteres deubiquitinierendes Enzym gefunden, welches spezifisch die Ubiquitinierung des Ras Nukleotid Austauschfaktors CDC25^{Mm} zu kontrollieren scheint. Es konnte

gezeigt werden, dass der Ubiquitinierungsgrad reduziert und die Halbwertszeit von CDC^{Mm} erhöht ist, wenn sowohl CDC25^{Mm} als auch Maus-UBPy in HEK293 Zellen exprimiert wird (Gnesutta, *et al.*, 2001).

Viele Prozesse in der Zelle werden durch die Ubiquitinierung kontrolliert. Dabei ist die Funktion der Ubiquitinierung für einen Teil der Prozesse aber noch nicht vollständig verstanden. Der Ubiquitinierungsgrad eines Proteins kann durch Ubiquitinierung und Deubiquitinierung reguliert werden. Der größere Einfluss scheint bei der Ubiquitinierungs-Reaktion zu liegen. Aber es deutet immer mehr darauf hin, dass auch die Deubiquitinierung eine wichtige Funktion bei der Kontrolle des Ubiquitinierungsgrades und damit bei der Regulation ubiquitinabhängiger Prozesse spielt. In dieser Arbeit sollten daher weitere spezifische Funktion der „Ubiquitin Specific Processing Proteases“ (Ubps) in der Bäckerhefe *Sacharomyces cerevisiae* identifiziert werden. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Rolle der Ubiquitinierung für den Transport von Membranproteinen. Viele ubiquitinabhängige Prozesse laufen an Zellmembranen ab. Dazu gehört der Abbau von falsch gefalteten oder sehr kurzlebigen Proteinen aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) über die sogenannte ERAD (ER-associated Protein Degradation) (Hiller, *et al.*, 1996, Wiertz, *et al.*, 1996), oder das „Budding“ von Retroviren (Patnaik, *et al.*, 2000, Schubert, *et al.*, 2000, Strack, *et al.*, 2000). Aber auch die bereits beschriebene Internalisierung von Oberflächenproteinen und die Aufnahme in MVBs gehören dazu. Bei der Bildung der MVBs wurde eine Funktion für das deubiquitinierende Enzym Ubp4 beschrieben. Vermutlich ist Ubp4 notwendig, um das konjugierte Ubiquitin von den Membranproteinen abzuspalten (Amerik, *et al.*, 2000b). Möglicherweise haben neben Ubp4 weitere Ubps eine deubiquitinierende Funktion an Endosomen oder eine regulatorische Funktion bei anderen Membrantransport-Schritten in der Zelle, die durch Ubiquitin kontrolliert werden. Daher wurde in dieser Arbeit insbesondere nach membrangebundenen Ubps gesucht, die durch ihre Assoziation mit Membranen regulatorischen Einfluss auf die ubiquitinabhängigen Prozesse an Membranen ausüben könnten.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Stämme und Medien

2.1.1 Bakterienstämme

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

Stamm	Genotyp	Referenz
DH5 F'	F'(Φ 80 (Δ <i>lacZ</i>) M15) Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17 r_k⁻ m_k⁺ supE44 thi-1 gyrA relA1</i>	Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA (Woodcock, <i>et al.</i> , 1989)
XL1-Blue	F':Tn10 <i>proA⁺B⁺ lacIq</i> Δ(<i>lacZ</i>)M15/ <i>recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) supE44 relA1 lac</i>	(Bullock, <i>et al.</i> , 1987)

2.1.2 Medien zur Anzucht von *E. coli*

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

Zur Selektion auf Zellen, die Plasmide enthalten, wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 50 µg/ml Ampicillin zugesetzt (LB-Amp).

Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 2% Agar.

Die Anzucht der Bakterien erfolgte bei 37°C.

2.1.3 Hefestämme

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

Stamm	Genotyp	Referenz/Quelle
#28	<i>MATa his1</i>	R. Kölling, Düsseldorf
#29	<i>MATα his1</i>	R. Kölling, Düsseldorf
JD52	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801</i>	Jürgen Dohmen, Köln
JD53	<i>MATα ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801</i>	Jürgen Dohmen, Köln
PJ69-4A	<i>MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	(James, <i>et al.</i> , 1996)

BY4741	<i>MATa his3-Δ1 leu2Δ met15Δ ura3Δ</i>	EUROSCARF
Y00000		
Y03819	BY4741 <i>ubp1::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y02380	BY4741 <i>ubp2::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y06148	BY4741 <i>ubp3::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y04004	BY4741 <i>ubp4::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y05842	BY4741 <i>ubp5::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y05689	BY4741 <i>ubp6::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y02315	BY4741 <i>ubp7::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y00809	BY4741 <i>ubp8::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y06404	BY4741 <i>ubp9::kanMX4</i>	EUROSCARF
B0315A	BY4741 <i>ubp10::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y06014	BY4741 <i>ubp11::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y01228	BY4741 <i>ubp12::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y03093	BY4741 <i>ubp13::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y03195	BY4741 <i>ubp14::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y00892	BY4741 <i>ubp15::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y02755	BY4741 <i>ubp16::kanMX4</i>	EUROSCARF
Y04800	BY4741 <i>psd2::kanMX4</i>	EUROSCARF
RKY1734	<i>MATa his- (his3-Δ200 and/or his4-912ΔR5) leu2-3,112 lys2 trp1-Δ63 ura3-52 rsp5-1</i>	R. Kölling, Düsseldorf

Tab. 3: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Hefestämme

Stamm	Genotyp
RKY1892	<i>MATa ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δubp16 :: HIS3</i>
RKY1893	<i>MATα ura3-52 his3 Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δubp16 :: HIS3</i>
RKY1894	JD52 <i>UBP1 c-myc::HIS3</i>
RKY1895	JD52 <i>UBP2 c-myc::HIS3</i>
RKY1896	JD52 <i>UBP3 c-myc::HIS3</i>
RKY1897	JD52 <i>UBP4 c-myc::HIS3</i>
RKY1898	JD52 <i>UBP5 c-myc::HIS3</i>
RKY1899	JD52 <i>UBP6 c-myc::HIS3</i>
RKY1900	JD52 <i>UBP7 c-myc::HIS3</i>
RKY1901	JD52 <i>UBP8 c-myc::HIS3</i>
RKY1902	JD52 <i>UBP9 c-myc::HIS3</i>
RKY1903	JD52 <i>UBP10 c-myc::HIS3</i>
RKY1904	JD52 <i>UBP11 c-myc::HIS3</i>
RKY1905	JD52 <i>UBP12 c-myc::HIS3</i>

RKY1906	JD52 <i>UBP14 c-myc::HIS3</i>
RKY1907	JD52 <i>UBP15 c-myc::HIS3</i>
RKY1908	JD52 <i>UBP16 c-myc::HIS3</i>
RKY1909	<i>MATa his- (his3-Δ200 und/oder his4-912ΔR5) leu2-3,112 lys2 trp1-Δ63 ura3-52 rsp5-1 Δubp16 :: His3</i> (Kreuzung RKY1734 x 1893)
RKY1931	JD52 <i>PFK1 c-myc::HIS3</i>

2.1.4 Medien und Anzucht von Hefestämmen

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

Als Kohlenstoffquelle wurden 2% Glukose, 2% Galaktose, 2% Raffinose oder 2% Glycerin zusammen mit 2% Ethanol verwendet.

Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 2% Agar.

Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen, wurden die entsprechenden Aminosäuren oder Basen dem Medium nicht zugegeben.

Folgende Chemikalien wurden in den angegebenen Konzentrationen festen Nährmedien zugesetzt.

1 M NaCl	0,16 mg/ml Calcofluor White
0,4 mg/ml Kongorot	10 µg/ml Thiabendazol (TBZ)
5 mM Koffein	1 M Sorbitol

Die Anzucht der Hefestämme erfolgte bei 30°C. Eine Ausnahme bildeten temperatursensitive Stämme, die bei 25°C angezogen wurden und nur 1 bis 2 Stunden bei ihrer nichtpermissiven Temperatur von 37°C inkubiert wurden.

2.2 Plasmide

Tab. 4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Quelle/Referenz	Beschreibung
pFA6a-HisMX6	(Longtine, <i>et al.</i> , 1998)	Template für die PCR-Amplifikation von Fragmenten zur Gendeletion mit <i>S. pombe</i> <i>HIS5</i> -Selektionsmarker
pFA6a-13myc-His3MX6	(Longtine, <i>et al.</i> , 1998)	Template für die PCR-Amplifikation von Fragmenten zur C-terminalen Markierung von Proteinen mit <i>HIS3</i> -Selektionsmarker
pRK296	R. Kölling, Düsseldorf	2 μ -Two Hybrid-Plasmid, trägt die mit einem Haemagglutinin-Epitop markierte <i>GAL4</i> -Aktivierungsdomäne (<i>GAL4-AD-HA</i>)
pRK329	R. Kölling, Düsseldorf	2 μ Two Hybrid-Plasmid, trägt <i>GAL4</i> -Bindedomäne (<i>GAL4-BD</i>)
pSE1111	(Fields und Song, 1989)	<i>GAL4-AD-SNF4</i> -Fusion im Two Hybrid-Vektor pACT1
pSE1112	(Fields und Song, 1989)	<i>GAL4-BD-SNF1</i> -Fusion im Two Hybrid-Vektor pAS1
pTD1	(Iwabuchi, <i>et al.</i> , 1993)	<i>GAL4-AD-T</i> -Antigen-Fusion im Two Hybrid-Vektor pGAD424
pVA3	(Iwabuchi, <i>et al.</i> , 1993)	<i>GAL4-BD-p53</i> -Fusion im Two Hybrid-Vektor pGBT9
YCplac22	(Gietz und Sugino, 1988)	CEN/ARS Vektor mit <i>TRP1</i> Selektionsmarker
YCplac33	(Gietz und Sugino, 1988)	CEN/ARS Vektor mit <i>URA3</i> Selektionsmarker
YEplac112	(Gietz und Sugino, 1988)	2 μ Vektor mit <i>TRP1</i> Selektionsmarker
YEplac195	(Gietz und Sugino, 1988)	2 μ Vektor mit <i>URA3</i> Selektionsmarker
pFM2-1	(Müller, <i>et al.</i> , 1987)	2 μ -Vektor mit <i>URA3</i> Selektionsmarker und <i>LEU2^d</i> Element zur Gewährleistung einer starken Überproduktion
pRK717	R. Kölling, Düsseldorf	CEN/ARS-Vektor mit 13myc-Epitop und <i>URA3</i> Selektionsmarker
pRK722	R. Kölling, Düsseldorf	2 μ -Vektor mit 13myc-Epitop und <i>URA3</i> Selektionsmarker
pRK724	R. Kölling, Düsseldorf	2 μ -Vektor mit GFP-Epitop und <i>URA3</i> Selektionsmarker
pRK588	R. Kölling, Düsseldorf	YEplac33 mit 350bp <i>CYC1</i> -Terminator Fragment
pGEX3X	Amersham	Plasmid zur Herstellung von GST Fusionsproteinen

Tab. 5: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pRK702	<i>UBP16-GST</i> Fusion, 446bp <i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> PCR Fragment (Primer #509+510 / Aminosäuren 349-497) in pGEX3X
pRK747	<i>S. cerevisiae</i> 2,1kb PCR Fragment amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer #473+474), blunt in die <i>SmaI</i> Schnittstelle von pRK588 inseriert.
pRK730	<i>EcoRI/HindIII</i> <i>UBP16-CYC1T</i> Fragment aus pRK747 in YEplac195
pRK731	<i>EcoRI/HindIII</i> <i>UBP16-CYC1T</i> Fragment aus pRK747 in YEplac112
pRK732	<i>EcoRI/HindIII</i> <i>UBP16-SUC2</i> Fragment aus pRK 748 in YEplac195
pRK748	Insertion zweier Fragmente in das <i>Sall/HindIII</i> geöffnete Plasmid pRK747. a) PCR amplifizierter (Primer 473+537) C-Terminus von <i>UBP16</i> von 1171bp geschnitten mit <i>Sall</i> und <i>NotI</i> . b) <i>NotI/HindIII</i> PCR amplifiziertes Invertase Fragment ohne Signalsequenz von 2084bp (Primer #538+539)
pRK807	<i>S. cerevisiae</i> 2,3kb <i>UBP16-c-MYC</i> PCR Fragment, amplifiziert vom Plasmid pRK802 (Primer #669+725) in pFM2-1
pRK808	<i>S. cerevisiae</i> 1,6kb <i>UBP16</i> PCR Fragment, amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer #669+474) in pFM2-1
pRK801	<i>S. cerevisiae</i> 1,4kb <i>UBP16</i> PCR Fragment (Primer #673+653) mit <i>SmaI</i> und <i>BamHI</i> Schnittstellen in pRK329 (2 Hybrid Vector)
pRK802	<i>S. cerevisiae</i> <i>UBP16</i> PCR Fragment in pRK722 (2 μ Vector mit 13myc Epitop). Zwei Schritt Konstruktion a) 1,5kb <i>BamHI/Asp718</i> <i>UBP16</i> PCR Fragment (Primer #669+670) ohne Promotor in pRK722. b) 840bp <i>Asp718/Sall</i> <i>UBP16</i> Promotorfragment aus pRK730 in Konstrukt aus Schritt a.
pRK803	<i>S. cerevisiae</i> 3kb <i>UBP16-c-MYC</i> Fragment, <i>Asp718/PstI</i> aus pRK802 in pRK717 (CEN/ARS Vektor mit 13myc Epitop)
pRK804	<i>S. cerevisiae</i> 2kb <i>UBP16</i> Fragment, <i>Asp718/SmaI</i> aus pRK803 in pRK724 (2 μ Vektor mit GFP Epitop)
pRK800	<i>S. cerevisiae</i> 2,45kb <i>UBP1</i> PCR Fragment (Primer #667+651) mit <i>SmaI</i> und <i>BamHI</i> Schnittstellen in pRK329 (2 Hybrid Vector)
pRK805	<i>S. cerevisiae</i> 2,9kb <i>UBP1</i> PCR Fragment amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer # 723+679) mit angefügten <i>SmaI</i> Schnittstellen in pRK722
pRK806	<i>S. cerevisiae</i> 2,9kb <i>UBP1</i> PCR Fragment amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer # 723+679) mit angefügten <i>SmaI</i> Schnittstellen in pRK717
pRK811	<i>S. cerevisiae</i> 1,3kb <i>HAP5</i> PCR Fragment, amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer #795+796) mit angefügten <i>SmaI</i> Schnittstellen in pRK717
pRK812	<i>S. cerevisiae</i> 1,3kb <i>HAP5</i> PCR Fragment, amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer #795+796) mit angefügten <i>SmaI</i> Schnittstellen in pRK722
pRK846	<i>S. cerevisiae</i> 2,25kb <i>HAP4</i> PCR Fragment, amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer #795+796) mit angefügten <i>SmaI</i> Schnittstellen in pRK717
pRK847	<i>S. cerevisiae</i> 2,25kb <i>HAP4</i> PCR Fragment, amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer #795+796) mit angefügten <i>SmaI</i> Schnittstellen in pRK722

2.3 Genbanken

Für die Suche nach Proteininteraktionen mit Hilfe des Two Hybrid-Systems wurde eine cDNA Bank der Firma Clontech (Matchmaker Two Hybrid System) sowie eine Genbank mit chromosomalen Fragmenten (James, *et al.*, 1996) eingesetzt.

2.4 Synthetische Oligonukleotide

Tab. 6: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligo	Sequenz (5'→ 3')	Beschreibung
#110	TCGATGATGAAGATACCC	Sequenzierung von <i>GAL4-AD</i> Fusionen
#373	GGAATTTATTAATTTTATCTATCATATAAACTCATGT CAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 Primer zur Amplifikation der Epitop tagging Kassetten sowie der Disruptionskassette nach Longtine <i>et al.</i> für <i>UBP12</i>
#375	TTGCAAGTTCTTAGCCAATCATCGTACTTGATTAGATT GTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 Primer für <i>UBP13</i>
#386	AGAAACACTAAATAATATTCTTCAACGTCCTGGTGCAT ACGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 Primer für <i>UBP7</i>
#466	CGAAAGAATGGATGAAGAGAAGCTATGAAGAAGAATTCT GTCGGATCCCCGGGTTAATTAA	F2 Primer zur Amplifikation der Epitop tagging Kassetten nach Longtine <i>et al.</i> für <i>UBP11</i>
#467	ATAACTGAAACTGGATCAACAAGCACATGTTTTTCTAA TTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 Primer für <i>UBP11</i>
#470	AACAGTATATGCAAGGTACAGCAGTTACTACAAGCACA ATCGGATCCCCGGGTTAATTAA	F1 Primer zur Amplifikation der <i>UBP16</i> Disruptionskassette nach Longtine <i>et al.</i>
#471	GAAATATGCTTATATGCTATACTACGAACGTGTAAATA AACGGATCCCCGGGTTAATTAA	F2 Primer für <i>UBP16</i>
#472	AATGATGGCAGTGGATACTGATGTGGATATGGATGCGT AAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 Primer für <i>UBP16</i>
#473	TAGTAATGGTTCCTGAAC	Upstream Primer zur Verifikation der Modifikation des <i>UBP16</i> ORFs
#474	GGAGAGGCTGATACCGAT	Downstream Primer zur Verifikation der Modifikation des <i>UBP16</i> ORFs
#475	TAGCGATGTCTACGTATTGTTTTATGAAAGGGTTTATG ACCGGATCCCCGGGTTAATTAA	F2 für <i>UBP7</i>
#485	TTTGACCTTAGATGGAAATAATGATATGCCATGTTGAA CGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 für <i>UBP4</i>
#509	CCCGGATCCAGAGATCCACATTC AATGGT	Upstream Primer zur Amplifikation von <i>UBP16</i> Fragmenten mit <i>BamHI</i> Schnittstelle

#510	CCCGAATTCCCTACACGTTTCGTAGTATAG	Downstream Primer zur Amplifikation von <i>UBP16</i> Fragmenten mit <i>EcoRI</i> Schnittstelle
#537	CCCCGCGGCCGCTTTATTTACACGTTTCGTA	Downstream Primer zur Amplifikation von <i>UBP16</i> ohne Stop-Codon mit <i>NotI</i> Schnittstelle
#538	CCCCGCGGCCGCATCAATGACAAACGAAACT	Upstream Primer zur Amplifikation des <i>SUC2</i> ORFs ohne Signalsequenz mit <i>NotI</i> Schnittstelle
#539	CCCAAGCTTCTTCGTTTCCCAAACCCAG	Downstream Primer zur Amplifikation des <i>SUC2</i> ORFs mit <i>HindIII</i> Schnittstelle
#540	AACAGAAGACCATAGAGATATTTCTGGTAAAGATGTAA ACCGGATCCCCGGGTTAATTAA	F2 Primer für <i>UBP1</i>
#541	TTATTGTTATTTACACAATTACGGATATCGTATTTATA ACGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 Primer für <i>UBP1</i>
#542	AGTGCCTCTTCCGCTTCC	Downstream Primer zur Verifikation der Modifikation des <i>UBP1</i> ORFs
#543	ACAAGAAGGTGATATTGAGCCATTGAAAAGAATTCTAA AGCGGATCCCCGGGTTAATTAA	F2 Primer für <i>UBP2</i>
#544	GCAATAGTGACATTTTACATAAACTCTTCATTGACTAA GAgaattcgaagctcgtttaaac	R1 Primer für <i>UBP2</i>
#546	TTCGAGGACTGCCTATATTTTAAATGTATCAAAAGAGAA ATcggatccccgggtaattaa	F2 Primer für <i>UBP3</i>
#547	TTATTTTTTATGTATTTTGTCTATAATACCACCCCCCG TCgaattcgaagctcgtttaaac	R1 Primer für <i>UBP3</i>
#549	TAATGCATACGTTTTGTTTTATCACCGCTCTACGGTG TTcggatccccgggtaattaa	F2 Primer für <i>UBP4</i>
#550	CACACCCAGTGCATATGTTTTATTTACGAAAGAATTT TTCGGATCCCCGGGTTAATTAA	F2 Primer für <i>UBP5</i>
#551	CAATGTGCGCCATTCATGTGTGCAAACCGGTAATTTG ATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 Primer für <i>UBP5</i>
#553	TGATAGTGCACATGATCTTAATGTATAAAGGATTTGGTC TGCGGATCCCCGGGTTAATTAA	F2 Primer für <i>UBP6</i>
#554	TCCGAAAAAACTATTAATTTGAAAAAATGAAAAATGG ACGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 Primer für <i>UBP6</i>
#555	ACAGGCATATTTATTTATTCTACACCATTCGTCAAGTAA ATCGGATCCCCGGGTTAATTAA	F2 Primer für <i>UBP8</i>
#556	TTTTTTGTTTTATTTATTGTTGAATGCTATTTGCTG AAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 Primer für <i>UBP8</i>
#558	TAAGCAAAAAAGAAAATCGAGAATATTGAGCTTCATCA AACGGATCCCCGGGTTAATTAA	F2 Primer für <i>UBP9</i>
#559	GATGGGTCTCAACTATATGATGTATCGAAACAATCCCG ATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 Primer für <i>UBP9</i>
#561	AAAAAATGAAAAAATAAAAAAGGAAGTTCACCA AACGGATCCCCGGGTTAATTAA	F2 Primer für <i>UBP10</i>
#562	TGCCTATGAAAAGAGGAAAATCCAGGAATATCGAGTTT TTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 Primer für <i>UBP10</i>
#564	TTTGAATTTAAAAATGGTGTGACACTAGAATCGCCAG AACGGATCCCCGGGTTAATTAA	F2 Primer für <i>UBP12</i>
#565	AATGATCGTGAAAATATGGCAAAAGAACAAGATGATAA TACGGATCCCCGGGTTAATTAA	F2 Primer für <i>UBP13</i>
#567	TATGAAAAAATGTTTATATTTTCTATACAAGAT GCCGGATCCCCGGGTTAATTAA	F2 Primer für <i>UBP14</i>

#568	ATATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAAACGTTCTTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 Primer für <i>UBP14</i>
#570	ATCGCATTCTTCCATGATAGACCAATGATCATTAAAAACCGGATCCCCGGTTAATTAA	F2 Primer für <i>UBP15</i>
#571	ATGGAGAAAACATCAAAGCTAAACATAGTCGTAAGACGTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	R1 Primer für <i>UBP15</i>
#651	CCCGGATCCGTTAGTTTACATCTTTACC	Subklonierung von <i>UBP1</i> mit <i>BamHI</i> Schnittstelle
#653	CCCGGATCCGTTATTTATTTACACGTTCT	Subklonierung von <i>UBP16</i> mit <i>BamHI</i> Schnittstelle
#667	CCCCCGGGAATGGATTTGTTTATTGAA	Subklonierung von <i>UBP1</i> mit <i>SmaI</i> Schnittstelle
#669	CCCGGTACCCAATGTCTTGGATAAAAAAT	Subklonierung von <i>UBP16</i> mit <i>KpnI</i> Schnittstelle
#670	CCCGGATCCCTTTATTTACACGTTTCGTA	Subklonierung von <i>UBP16</i> mit <i>BamHI</i> Schnittstelle
#673	CCCCCGGGAGATTCTAAGCAGAGTATT	Subklonierung von <i>UBP16</i> ohne Transmembrandomäne mit <i>BamHI</i> Schnittstelle
#678	GGGCCCCGGGATGGATTTGTTTATTGAA	Subklonierung von <i>UBP1</i> mit <i>SmaI</i> Schnittstelle, Downstream Primer
#724	GGGCCCCGGGAGTGCCTCTTCCGCTTCC	Subklonierung von <i>UBP1</i> mit <i>SmaI</i> Schnittstelle, Upstream Primer
#725	GGACGAGGCAAGCTAAAC	Downstream Primer zur Amplifikation des 13myc Epitops und Modifizierter ORFs aus pRK 72
#793	GGGCCCCGGGTTTTCTTATGTTACGGAT	Subklonierung von <i>HAP4</i> mit <i>SmaI</i> Schnittstelle, Upstream Primer
#794	GGGCCCCGGGAAATACTTGTACCTTTAA	Subklonierung von <i>HAP4</i> mit <i>SmaI</i> Schnittstelle, Downstream Primer
#795	GGGCCCCGGTTGGTATATGAGTTTTAG	Subklonierung von <i>HAP5</i> mit <i>SmaI</i> Schnittstelle, Upstream Primer
#796	GGGCCCCGGTTGTGGAAGAGGTCTTCT	Subklonierung von <i>HAP5</i> mit <i>SmaI</i> Schnittstelle, Downstream Primer

2.5 Chemikalien und Enzyme

Acros	Lysin, Natriumthiosulfat, Natriumcarbonat, Glycin
Amersham	Amplify
Axis-Shield	Optiprep
Bio-Rad	Low Range SDS-Page Molekulargewichtsstandard
Braun-Melsungen	Glasperlen 0,45 mm
Caesar & Loretz	Glukose

Difco	Bacto Agar, Casaminoacids, Pepton, Trypton, Yeast Extract, Yeast Nitrogen Base
Fluka	Formaldehyd
GibcoBRL	Agarose, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, Optiprep™
ICN	Tran ³⁵ S-Label™, NBT
J.T. Baker	CaCl ₂ , Kaliumacetat, NaCl, NaOH, PEG4000
Kodak	Röntgenfilme
Life Technologies	G418/Geneticin
Merck	APS, EDTA, Leucin, TEMED, Adenin, Uracil, DMF
Molecular Probes	FM4-64
New England Biolabs	Restriktionsendonucleasen, BSA, EndoH _f
PCR Inc. Florida	5-FOA
Pharmacia	ProteinA-Sepharose
Qiagen	QIAprep® Spin Miniprep Kit (250), QIAquick® Gel Extraction Kit (250), QIAquick® PCR Purification Kit (250)
Riedel-de Haen	Essigsäure, Harnstoff, Natriumazid
Roche	High Pure Plasmid Isolation Kit, PCR Purification Kit, Alkalische Phosphatase, BCIP, Klenow DNA-Polymerase, Restriktionsendonucleasen, Expand Long PCR System, Lumi Light Western Blotting Substrate
Roth	DTT, Gel30 Acrylamid, Glycin, DMSO
Schleicher & Schuell	Nitrocellulose-Membran, Membran Filter 45µm HA
Seikagaku Kogyo Co.	Ltd Zymolyase
Serva	Glycerin, SDS, Ethidiumbromid, Tween20
Sigma	Ampicillin, Lithiumacetat, BCIP, NBT, PonceauS, „Prestained“ Molekulargewichtsstandard, N-acetyl-dl-phenylalanin-naphthylester, Sucrose, Triton X-100, BSA (IgG-frei), UBS Tris, n-Dodecyl-β-D-Maltosid, Brilliant blue, Sorbitol
Thermo Hybaid	Synthetische Oligonukleotide
Whatman	3 MM Papier

2.6 Antikörper

monoklonale Antikörper

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

polyklonale Antikörper

anti-CPY	D. Wolff, Stuttgart
----------	---------------------

anti-Pep12	Hugh Pelham
anti-Pma1	R. Kölling, Düsseldorf
anti-Ste6	R. Kölling, Düsseldorf
anti-F1-ATPase	Gottfried Schatz
anti-Porin	T. Lisowsky, Düsseldorf
anti-Emp47	Stephan Schröder-Köhne
anti-PFK	J. Heinisch, Stuttgart
anti Kar2	Mark Rose
anti-Ubp16	diese Arbeit
anti-Aconitase	T. Lisowsky, Düsseldorf
anti-Mgc1	T. Langer, Köln

sekundär Antikörper

anti-Maus Phosphatase gekoppelt	dianova
anti-Hase Phosphatase gekoppelt	dianova
anti-Maus Peroxidase gekoppelt	dianova
anti-Hase Peroxidase gekoppelt	dianova
anti-Maus DTAF gekoppelt	dianova
anti-Hase Rhodamin gekoppelt	dianova

2.7 Transformation

2.7.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation Rubidiumchlorid-kompetenter Zellen erfolgte nach dem Protokoll 3 von (Hanahan, 1985).

Elektrokompetente Zellen wurden wie im Folgenden beschrieben transformiert.

Ein Aliquot von 40 µl kompetenter Zellen wurde mit 2 µl zu transformierender DNA vermischt, etwa 2 min auf Eis inkubiert und in eine sterile Elektroporationsküvette überführt. Der Stromstoß („Pulse“) erfolgte bei 1,5 kV, 25 µF und 200 Ohm, dabei sollte die Zeitkonstante des Pulse zwischen 4 und 5 msec. liegen. Anschließend wurden die Zellen direkt mit 1 ml LB-Medium versetzt, für ein bis zwei Stunden bei 37°C inkubiert und auf Selektiv-Medium ausplattiert.

2.7.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von Hefezellen wurde nach der Lithiumacetat-Methode durchgeführt (Ito, *et al.*, 1983). Es wurden 5-10 ml einer Kultur mit OD₆₀₀ von 0,5-1,0 abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit H₂O gewaschen und in 200 µl 0,1 M LiOAc in TE resuspendiert und für 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde 1 µg Plasmid-DNA oder 45 µl eines PCR-Ansatzes zusammen mit 10 µl denaturierter Heringssperma-DNA (10 mg/ml) zugegeben. Nach Zugabe von 1,5 ml 40% PEG4000 in 0,1 M LiOAc in TE und erneuter Inkubation bei 30°C für 45 min erfolgte der Hitzeschock, für Plasmidtransformationen 5 min bei 42°C und für die Transformation von PCR-Fragmenten 30 min. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in 200 µl H₂O aufgenommen und auf Selektivmedium ausplattiert. Zur Transformation von Genbanken wurde jeweils die zehnfache Menge an Zellen und Lösungen eingesetzt sowie bis zu 50 µg DNA. Die Transformation von Genbank DNA erfolgte alternativ nach dem „High efficiency transformation protocol“ von (Gietz und Woods, 2002).

2.8 Präparation von DNA

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

Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde aus 1,5 ml stationärer Kultur nach dem Verfahren der alkalischen Lyse (modifiziert) isoliert (Maniatis, *et al.*, 1982). Zur Restriktionsanalyse wurden 200 ng der isolierten Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl geschnitten.

Hochreine Plasmid-DNA für Sequenzierungen und Klonierungen wurde mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (250) der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert.

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

1,5 ml einer über Nacht gewachsenen 5 ml Hefekultur wurden in einem Einmal-Reaktionsgefäß abzentrifugiert und in 100 µl STET (8% w/v Sucrose, 50 mM Tris pH 8,0, 50 mM EDTA, 5% (v/v) Triton X-100) resuspendiert. Nach Zugabe von etwa 0,2 g Glasperlen wurden die Zellen für 5 min auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgebrochen. Der Zellaufschluß wurde mit 100 µl STET versetzt, kurz geschüttelt und für 3 min bei 95°C gekocht. Anschließend wurde der Aufschluss auf Eis abgekühlt und für 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. 100 µl des Zentrifugationsüberstandes wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl 7,5 M Ammonium Acetat versetzt. Nach einer Stunde bei -20°C wurden die Proben erneut für 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden mit 200 µl eiskaltem Ethanol (absolut) versetzt, um die DNA auszufällen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 15 min bei 13.000 rpm wurden die DNA Pellets getrocknet und in 20 µl Wasser resuspendiert. 2-10 µl Plasmid DNA wurden für die Retransformation in *E. coli* Zellen eingesetzt.

2.8.3 Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae*

Um Template für PCR Reaktionen zu gewinnen, wurde wenig Zellmaterial einer frisch gewachsenen Kolonie in 40 µl 20 mM NaOH resuspendiert, 90 sec in der Mikrowelle erhitzt und anschließend kräftig geschüttelt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht und erneutem Schütteln wurden 1-2 µl der DNA für die PCR Reaktion eingesetzt.

2.9 Enzymatische Modifikation von DNA

2.9.1 DNA-Restriktion

Das Schneiden der DNA erfolgte mit 1 U Enzym pro µg DNA. Die Inkubation erfolgte für 2-3 h oder über Nacht, bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Es wurde ausschließlich mit dem Puffersystem der Firma New England Biolabs gearbeitet.

2.9.2 Auffüllen von überstehenden 5' Enden

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

2.9.3 Entfernen von überstehenden 3' Enden

3'-überstehende Enden wurden nach der in (Maniatis, *et al.*, 1982) beschriebenen Methode mit T4-DNA Polymerase (2-5 U pro µg DNA) entfernt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 16°C in T4 Polymerase-Puffer der Firma Gibco BRL mit 0,1 mM dNTP's inkubiert.

2.9.4 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP). Hierzu wurde nach erfolgter Restriktion 1 U CIP in den Restriktionsansatz zugegeben und 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch einfrieren gestoppt. Die weitere Aufreinigung erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel (2.11).

2.9.5 Ligation

Die Ligation von DNA erfolgte mit 60 ng dephosphorylierter Vektor-DNA und dem zweifachen molaren Überschuss an Insert-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Für die Ligation wurde 1 U T4 DNA-Ligase der Firma Geibco BRL in dem mitgelieferten Puffer eingesetzt. Die Reaktion erfolgte bei 16°C über Nacht.

2.10 PCR-Amplifikation von DNA

Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde das „Expand High Fidelity“ System der Firma Roche sowie der „Primus 25/96 Thermocycler“ der Firma MWG Biotech verwendet. Die Reaktionen wurden in einem Endvolumen von 25-100 μ l durchgeführt.

2.10.1 Spezifische Amplifikation von Plasmid-DNA

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurde Puffer 2 (1,5 mM $MgCl_2$) verwendet, je 2 μ M der entsprechenden Primer, 200 μ M dNTP-Mix, 1 ng Plasmid-DNA und 1 U Enzym.

Es wurde folgendes Programm für die Amplifikation verwendet:

- | | | | |
|----|-----|--------------------------------|-------------|
| 1. | | Denaturieren der DNA | 4 min 94°C |
| 2. | 25X | Denaturieren der DNA | 30 sec 94°C |
| | | Bindung der Primer (Annealing) | 30 sec 55°C |
| | | DNA-Synthese (Elongation) | 2 min 68°C |
| 3. | | DNA-Synthese (Elongation) | 15 min 68°C |

Die Annealing Temperatur, die Elongationszeit sowie die Anzahl der Syntheseschritte wurde an die spezifischen Schmelztemperaturen der Primer und an die Größe des erwarteten PCR Produktes angepasst.

2.10.2 Spezifische Amplifikation chromosomaler DNA

Die PCR Reaktionen zur Amplifikation chromosomaler DNA wurden mit Puffer 3 (ohne $MgCl_2$) unter Zugabe von 4 mM $MgCl_2$, je 2 μ M der entsprechenden Primer, 200 μ M dNTP-Mix, 2 μ l DNA und 1 U Enzym durchgeführt.

Für die Amplifikation wurde folgendes Programm verwendet:

1.		Denaturieren der DNA	4 min 94°C
2.	35X	Denaturieren der DNA	1 min 94°C
		Bindung der Primer (Annealing)	1 min 55°C
		DNA-Synthese (Elongation)	3 min 68°C
3.		DNA-Synthese (Elongation)	15 min 68°C

Auch bei diesem Protokoll wurden die Bedingungen reaktionsspezifisch angepasst.

2.11 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente von 0,2 bis 10 kb wurden in 1-1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt. Als Gel- und Laufpuffer diente 0,5 X TAE (20 mM Tris; 10 mM NaOAc; 1 mM EDTA pH 8,0). Ethidiumbromid wurde dem Gel sowie dem Laufpuffer mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen Blaumarker (0,2% Bromphenolblau in 25% Glycerin) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei maximal 250 V. Als Größen- und Konzentrationsstandard diente 1 µg Lambda DNA, die mit *EcoRI* und *HindIII* geschnitten war.

2.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Isolierung wurde mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit (250) der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.13 Bestimmung der DNA-Konzentration

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

2.14 Sequenzierung von DNA

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

2.15 Herstellung von Proteinextrakten für die Western-Analyse

Zur Herstellung von Proteinextrakten für die Western-Analyse wurden 2 OD₆₀₀ Einheiten einer logarithmisch wachsenden Hefekultur bei 4000 rpm abzentrifugiert (OD₆₀₀=0,4-0,7; 2-4X10⁷ Zellen/ml). Die Zellen wurden in Wasser gewaschen und in 100 µl Lysispuffer (0,3 M Sorbitol; 50 mM HEPES; 10 mM NaN₃; pH 7,5) mit Proteinaseinhibitoren (0,5 µg/ml von Aprotinin, Antipain, Chymostain, Leupeptin, Pepstatin A und 1,6 µg/ml Benzamidin, 1 µg/ml Phenanthroline, sowie 170 µg/ml Phenylmethylsulfonylfluoride) aufgenommen. Nach Zugabe von Glasperlen (∅ 0,45 mm) bis zur Flüssigkeitsgrenze wurden die Zellen 4 min auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen. Danach wurden 200 µl Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren zugegeben und gut gemischt. 250 µl des Zellaufschlusses wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 250 µl Probenpuffer (4% SDS; 20% Glycerin; 125 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,2% Bromphenolblau; 20 mM DTT) versetzt. Der Extrakt wurde anschließend bei 50°C für 30 min zum Nachweis von Membranproteinen erhitzt, oder zum Nachweis von löslichen Proteinen für 5 min bei 95°C gekocht. Unlösliche Zellbestandteilen wurden im Anschluß für 2 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert und vor dem Auftrag auf ein SDS-Polyacrylamidgel (2.17) erneut solubilisiert. Aufgetragen wurden jeweils 50 µl der frisch denaturierten Extrakte, was einer Menge von 0,2 OD₆₀₀- Einheiten Zellen entspricht.

2.16 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von (Bradford, 1976) mit dem „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent“ (Bio-Rad). Hierzu wurde 1 µl der Zellextrakte auf ein Gesamtvolumen von 0,8 ml mit Wasser verdünnt und mit 0,2 ml Reagenz versetzt. Nach 10 min bei Raumtemperatur wurde die

Extinktionsänderung bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen. Eine BSA-Stammlösung bekannter Konzentration diente der Erstellung einer Standardkurve.

2.17 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach der Methode von (Laemmli, 1970) in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen. Es wurde ein 5%iges Sammelgel (125 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,025% APS; 0,1% TEMED; 5% Acrylamid) und eine 7,5-10%iges Trenngel (375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,025% APS; 0,1% TEMED; 7,5-10% Acrylamid) verwendet. Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris; 0,192 M Glycin; 0,1% SDS bei pH 8,3. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei maximal 250 V und einer maximalen Stromstärke von 35 mA.

2.18 Coumassie Färbung von Protein-Banden im SDS-Gel

Die Gele wurden für mindestens vier Stunden in 0,5% Brilliant Blue in 20% Methanol, 7% Essigsäure gefärbt und anschließend mit Entfärber (20% Methanol, 7% Essigsäure) so lange behandelt, bis die Gele wieder transparent und Proteinbanden gut sichtbar waren. Danach wurden die Gele so lange in Wasser gewaschen, bis sie nicht mehr nach Essigsäure rochen und über Nacht zwischen Cellophan getrocknet.

2.19 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Analyse

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

Unspezifische Bindestellen wurden durch Inkubation der Membran für 30 min in PBS/TWEEN (10 mM Natriumphosphat pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,05% TWEEN20) mit 1% Magermilchpulver blockiert. Die Reaktion mit dem Primärantikörper erfolgte bei einer für den Antikörper spezifischen Verdünnung in PBS/TWEEN mit 1% Magermilchpulver für 90 min bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran drei mal mit PBS/TWEEN gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-Maus-IgG bzw anti-Kaninchen-IgG, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase oder Peroxidase) erfolgte über 60 min bei Raumtemperatur in PBS/TWEEN. Anschließend wurde die Membran zwei mal in PBS/TWEEN gewaschen. Der Nachweis der gebunden Antikörper erfolgte entweder über die alkalische Phosphatase oder die Peroxidase.

Nachweis über alkalische Phosphatase: hierzu wurde die Membran ein weiteres Mal in Substratpuffer (0,1 M Tris/Hcl pH 8,8; 0,1 M NaCl; 2 mM $MgCl_2$) gewaschen. Der Antikörpernachweis erfolgte durch die Farbreaktion des Enzyms in Substratpuffer, dem 0,1 mg/ml BCIP und 1 mg/ml NBT zugegeben wurden. Die Farbreaktion wurde in Wasser gestoppt.

Nachweis über Peroxidase: der Antikörpernachweis erfolgte über die Peroxidasereaktion mit Hilfe des „Lumi Light Kits“ der Firma Roche, nach Herstellerangabe. Die Lumineszenz wurde mit dem „LAS-System“ der Firma Fuji aufgenommen.

Eine Quantifizierung der Banden erfolgte densitometrisch (DUOSCAN f40, AGFA) mit dem Programm „NIH Image“.

2.20 Zellfraktionierung

2.20.1 Differentielle Zentrifugation

4 OD_{600} Einheiten einer logarithmischen Hefekultur wurden abzentrifugiert, in Wasser gewaschen, in Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren (2.15) resuspendiert und mit Glasperlen für 3 min auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen. Intakte Zellen und grobe Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation über 5 min bei 500 g abgetrennt. Um die Löslichkeit mit Detergentien zu testen, wurden die Proben mit 1% Triton X-100 für 30 min vor der anschließenden

Zentrifugation auf Eis inkubiert. Zum Pelletieren der P13-Fraktion wurden die Zellextrakte für 10 min bei 13.000 g zentrifugiert. Die Überstände wurden erneut bei 100.000 g zentrifugiert, wodurch die P100-Fraktion (Pellet) und die S100-Fraktion (Überstand) erhalten wurden. Die Fraktionen wurden in Probenpuffer aufgenommen, und äquivalente Mengen wurden mittels SDS-PAGE und Western-Analyse (2.19) auf die Gegenwart von Proteinen hin analysiert.

2.20.2 Membran-Floatation

Das Experiment wurde mit einigen Modifikationen, wie von (Bagnat, *et al.*, 2000), beschrieben durchgeführt. 20 OD₆₀₀ Einheiten einer logarithmisch wachsenden Hefekultur wurden abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und in TNE (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) aufgenommen. Die Lyse erfolgte, wie bereits beschrieben, mit Glasperlen (2.20.1). Nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 500 g abgetrennt. Um die Löslichkeit mit Detergenzien zu testen, wurde eine Hälfte der Extrakte (etwa 125 µl) mit 1% Triton X-100 behandelt. Die andere Hälfte wurde auf Eis gelagert. Anschließend wurden beide Extrakte mit 250 µl 60% Optiprep gemischt. Diese nun 40% Optiprep-Lösung mit den Zellextrakten wurde in ein Zentrifugengefäß überführt und vorsichtig mit 600 µl 30% Optiprep in TNE (im Falle der Triton behandelten Probe mit TXNE, TNE Puffer mit 0,1% Triton X-100) und 100 µl TNE (bzw. TXNE) Puffer überschichtet. Die Gradienten wurden für zwei Stunden bei 77.000 rpm und 4°C in einem Beckmann TLA100.2 Rotor zentrifugiert. Sechs gleiche Fraktionen wurden abgenommen, mit Probenpuffer versetzt und mittels Western-Analyse (2.19) auf die Gegenwart von Proteinen untersucht.

2.20.3 Sucrose-Dichte-Gradienten

Die Zellen von 150 ml Kultur (OD₆₀₀ von 0,4-0,7) wurden durch Vakuumfiltration auf einer Nitrocellulosemembran gesammelt und in 250 µl eiskaltem STED10 (10% Sucrose; 10 mM Tris/HCl, pH 7,6; 10 mM EDTA; 1 mM DTT) mit Proteaseinhibitoren (2.15) resuspendiert. Dann wurden Glasperlen (∅ 0,45 mm) bis zur Flüssigkeitsoberkante zugegeben und die Suspension wurde für 3 min auf einem

Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) geschüttelt. Nach Zugabe von 1 ml STED10 wurde der Ansatz gemischt, von den Glasperlen abgenommen und der Überstand über 5 min bei 500 g zentrifugiert, um nicht aufgeschlossene Zellen zu pelletieren. 1 ml des Überstands wurde auf einen Sucrose-Gradienten gegeben. Dieser wurde hergestellt, indem in einem SW40-Zentrifugationsgefäß (Beckmann) 4 ml STED50 (wie STED10 mit 53% Sucrose), 4 ml STED34 (wie STED10 mit 35% Sucrose) und 4 ml STED20 (wie STED10 mit 20% Sucrose) sorgfältig übereinandergeschichtet wurden. Das Gefäß wurde nun mit Parafilm verschlossen und vorsichtig in eine horizontale Lage gebracht. Nach dreistündiger Diffusion bei 4°C wurde der nun kontinuierliche Gradient aufgerichtet und mit dem Zellextrakt überschichtet. Nach Zentrifugation für exakt 14 h in einem Beckmann SW40-Rotor bei 30.000 rpm (114.000 g), wurden Fraktionen zu 700 µl vom Gradienten abgenommen. Aliquots wurden mit dem gleichen Volumen 2x Probenpuffer (2.15) versetzt und 30 min bei 50°C inkubiert. Hiervon wurden jeweils 50 µl elektrophoretisch aufgetrennt (2.17). Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte durch Western-Analyse (2.19).

2.21 Präparation von Mitochondrien

Die Präparation von reinen Mitochondrien wurde wie von (Meisinger, *et al.*, 2000) beschrieben durchgeführt.

2.22 Deglykosylierung von Proteinen

Hefezellen wurden, wie bereits beschrieben angezogen, abzentrifugiert und mit Glasperlen lysiert (2.15). Der Zellextrakt (0,1 OD₆₀₀ Einheit Zellen/µl) wurde mit einem Volumen SDS-Gel Probenpuffer verdünnt und für 20 min bei 50°C solubilisiert. Für die Deglykosylierungsreaktion wurden 2,5 OD₆₀₀ Einheiten Zellextrakt in 25 µl mit 200 µl Wasser, 25 µl G5 Puffer (Mitgeliefert mit dem Enzym) verdünnt. 5 µl EndoH_f (1.000.000 U/ml) wurde zugegeben und die Proben inkubierten über 1 h bei 37°C. Danach wurden sie mit 150 µl SDS-Gel Probenpuffer (2.15) versetzt und für 15 min auf 50°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben durch Western-Analyse (2.19) auf die Gegenwart von Proteinen analysiert. Als Kontrolle wurde eine Probe bei 37°C ohne EndoH_f inkubiert.

2.23 Pulse-Chase-Experimente

Zur Bestimmung der Halbwertszeit von Hap4 und Hap5 wurden Hefezellen über Nacht in Minimalmedium (YNB und Aminosäuren) angezogen. Es wurden 6 OD₆₀₀ Einheiten logarithmisch wachsender Zellen abzentrifugiert und in 3 ml frischem Medium aufgenommen (2 OD₆₀₀/ml). Die Zellen wurden 15 min bei 30°C inkubiert. Die radioaktive Markierung neu synthetisierter Proteine erfolgte durch Zugabe von 50 µCi [³⁵S]-Methionin („Pulse“). Nach 15 min wurde 1/50 Volumen konzentrierte Chase-Lösung (0,3% Cystein; 0,4% Methionin) beigemischt („Chase“). Nach 0, 20, 40, 60 und 120 min wurden Aliquots zu je 500 µl abgenommen. Die Zellen wurden 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und mit 10 mM NaN₃ gewaschen. Die Pellets wurden in 110 µl Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren (2.15) resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 400 mg (±5 mg) Glasperlen (Ø 0,45 mm) überführt. Der Aufschluß erfolgte durch dreiminütiges Schütteln auf einem Vibrax. Nach Zugabe von 100 µl 2x Probenpuffer (2.15) wurden die Zellextrakte über 30 min bei 50°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben zur Immunpräzipitation (2.24) eingesetzt.

2.24 Immunpräzipitation

Zu den Proben wurde 800 µl IP-Dilutionspuffer (1,25% Triton X-100; 6 mM EDTA; 60 mM Tris/HCl, pH 7,6) gegeben. Unlösliches Zellmaterial wurde durch eine fünfminütige Zentrifugation abgetrennt. Nach Inkubation mit 5 µl 9E10-Antiserum (anti-c-myc) über Nacht bei 4°C erfolgte die Zugabe von 50 µl einer 20%igen ProteinA-Sepharose-Lösung. Die Proben wurden weitere 3 h bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal mit IP-Puffer (1% Triton X-100; 0,2% SDS; 150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl, pH 7,6; 5 mM EDTA) gewaschen. Das Pellet wurde in 50 µl IP-Puffer aufgenommen und mit 50 µl Probenpuffer (2.15) und 100 mM DTT versetzt. Die Denaturierung erfolgte für 30 min bei 50°C. Jeweils 50 µl des immunpräzipitierten Materials wurde auf ein SDS-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.17). Anschließend wurden die Gele 30 min in Entfärberlösung (20% Methanol, 7% Essigsäure) fixiert, für weitere 30 min mit Amplify behandelt und 2 h bei 80°C

getrocknet. Die Proteine wurden durch Autoradiografie mit einem Kodak Röntgenfilm nachgewiesen.

Eine Quantifizierung der Banden erfolgte densitometrisch (DUOSCAN f40, AGFA) mit dem Programm „NIH Image“.

2.25 Mikroskopische Untersuchungen

Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Zeiss Axioskop durchgeführt. Die Bilder wurden mit der AxioCam der Firma Zeiss und der Kamera Software „AxioVision“ aufgenommen und mit dem Programm „Adobe Photoshop 5.0“ nachbearbeitet.

2.25.1 GFP

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

2.25.2 Aufnahme von FM4-64

FM4-64 ist ein Farbstoff, der in der lebenden Zelle spezifisch Membranen des endozytischen Weges anfärbt. Die Anwendung erfolgte nach (Vida und Emr, 1995). Die Zellen wurden exponentiell in Vollmedium (YEPD) herangezogen, 0,2 OD₆₀₀ Einheiten wurden abzentrifugiert und in 90 µl frischem Medium aufgenommen. Nach Zugabe von 10 µl 16 mM FM4-64 (in Wasser) wurden die Ansätze bei 30°C und guter Belüftung inkubiert. Nach 15 min wurden die Zellen pelletiert und in der gleichen Menge frischem Medium aufgenommen. Nach weiteren 30-60 min wurden die Zellen mit „low-melting“-Agarose vermischt und so auf einem Objektträger fixiert. Die Beobachtung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Rhodamin-Filtersatz.

2.25.3 Anfärben von Mitochondrien

Zum Anfärben der Mitochondrien wurde jeweils 1 ml einer logarithmisch über Nacht angewachsenen Kultur (0,2 – 0,5 OD₆₀₀ Einheiten) abzentrifugiert und in 1 ml frischem SD Medium pH 7,2 mit 400 nM MitoTracker Red™ aufgenommen. Temperatursensitive Stämme wurden vor dem Färben eine Stunde auf 37°C überführt und alle folgenden Inkubationsschritte wurden ebenfalls bei 37°C durchgeführt. Die Zellen wurden für 30-60 min im Dunkeln bei Raumtemperatur gefärbt und anschließend in 1 ml frischem SD Medium pH 7,2 oder PBS aufgenommen. Nach 30 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit wurden die Zellen mit „low-melting“-Agarose vermischt, um sie auf dem Objektträger zu fixieren. Die Beobachtung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Rhodamin-Filtersatz.

2.25.4 Immunfluoreszenz

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

2.26 Protease-Schutz-Experiment

20 OD₆₀₀ Einheiten Zellen einer logarithmisch wachsenden Kultur wurden abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und in 3 ml Softening Puffer (100 mM Tris pH 9,4, 10 mM DTT) aufgenommen. Nach 30 minütiger Inkubation bei 30°C wurden die Zellen mit Spheroplasten Puffer (1 M Sorbitol, 20 mM Pipes pH 6,8) gewaschen und anschließend in 5 ml Spheroplasten Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 240 µg Zymolyase-T100 wurden die Zellen für 45 min bei 30°C spheroplastiert. Die Spheroplastierung wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Erfolgreich spheroplastierte Zellen wurden einmal in Spheroplasten Puffer gewaschen und

anschließend in 10 ml PS100 (100 mM Sorbitol, 50 mM Kaliumacetat, 5 mM Magnesiumacetat, 100 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 20 mM Pipes pH 6,8) aufgenommen. Die Lyse erfolgte durch 20 Stöße im Dounce Homogenisator mit enggängigem Pestel. Drei Aliquots von ungefähr 2 OD₆₀₀ Einheiten wurden wie folgt behandelt. A) 800 µl Zellextrakt (2 OD₆₀₀ Einheiten) wurde mit 100 µl PS100 versetzt und auf Eis gelagert. B) 800 µl Zellextrakt wurden mit 80 µl PS100 versetzt C) 800 µl Zellextrakt wurden mit 0,25% Triton X-100 und 2,5% n-Dodecyl-β-D-Maltosid versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde zu Ansatz B und C 50 µg Proteinase K zugegeben. Der Verdau erfolgte für 20 min auf Eis. Die Reaktion wurde mit 5 mM PMSF 30 min auf Eis gestoppt. Anschließend wurden zu allen drei Proben 100 µg/ml BSA und 5% TCA zugegeben. Zur Ausfällung der Proteine wurden die Proben weitere 30 min auf Eis inkubiert und danach 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Proteinpellets wurden mit 1 M Tris pH 8,0 gewaschen und erneut für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in 1 M Tris pH 8,0 und 2x SDS Probenpuffer (2.15) resuspendiert und 30 min auf 50°C erhitzt. Der Nachweis von Proteinen erfolgte durch Western-Analyse (2.19).

2.27 FACS Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting)

0,6 OD₆₀₀-Einheiten logarithmisch wachsender Zellen wurden abzentrifugiert und in 1 ml frischem Medium aufgenommen. Für die Messung der Mitochondrien-Menge wurden diese mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker RedTM (2.25.3) angefärbt. Für die Messung im FACS Gerät wurden die Zellen in 1 ml 10 mM Tris pH 5,0 auf 0,06 OD₆₀₀-Einheiten/ml eingestellt und mit einem Rhodamin Filtersatz analysiert.

2.28 Tropftests

Um das Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen, in Anwesenheit verschiedener Chemikalien sowie nach Stickstoffhunger zu testen, wurden die Hefezellen auf die entsprechenden Platten getropft und bei 30°C. Für die Kontrolle auf Temperatursensitivität wurden die Zellen bei 37°C angezogen. Von jedem zu testenden Stamm wurden jeweils 15 µl aus 4 Verdünnungen (0,1; 0,01; 0,001; und

0,0001 OD₆₀₀ Einheiten) einer logarithmisch wachsenden Kultur auf eine Platte getropft.

2.29 Stickstoffhunger Test

Hefezellen einer frühlogarithmischen wachsenden Kultur wurden abzentrifugiert, in Wasser gewaschen und in Stickstoffmangelmedium (SD-Medium ohne Amonium Acatat) aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend über mehrere Tage bei 30°C inkubiert. Zellen, die nicht in der Lage sind die Autophagozytose zu starten, sterben in Medium ohne Stickstoff. Zur Bestimmung der Überlebensfähigkeit der Zellen wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (direkt nach Aufnahme in Stickstoffmangelmedium, t_0 sowie nach 3 bis 5 Tagen bei 30°C t_1) auf YPED platten getropft (2.28) und bei 30°C angezogen.

2.30 Bestimmung der Paarungsaktivität

Ein Zellrasen des Hefestammes #29, der für 3 Tage auf einer YPED Platte bei 30°C gewachsen war, wurde auf eine SD-Medium Platte ohne zusätzliche Aminosäuren Replika plattiert. Auf die Replika Platte wurden dann die zu testenden MATa Stämme aufgetropft (2.28) und bei 30°C inkubiert. Nur diploide Zellen (die Paarungsprodukte) waren in der Lage auf den SD-Medium Platten zu wachsen.

2.31 Präparation von Fusionsproteinen

E. coli Zellen wurden mit dem *UBP16-GST* Fusionsplasmid pRK702 transformiert und in LB Medium mit Ampicillin bis zur frühlogarithmischen Phase bei 37°C angezogen. Die Expression des Fusionsplasmids wurde durch Zugabe von 1,5 mM IPTG induziert. Nach weiteren 2-3 h bei 37°C wurden die Zellen bei 8.000 rpm in einem Beckmann JA10 Rotor abzentrifugiert. Die Zellen wurden in Lysepuffer (50 mM Tris pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,3 M NaCl, 5 mM MgCl₂ + 100 µg DNaseI und Protease Inhibitoren (2.15) aufgenommen, wobei das Puffervolumen ungefähr das 2-2,5 fache des Zellpellet-Volumens betragen sollte. Die Zellen wurden in der „French

Press“ bei 10.000 psi lysiert. Um die „inclusion bodies“, welche das Fusionsprotein enthielten auf zu reinigen, wurde ein „insoluble prep“ durchgeführt. Dafür wurde der Zellextrakt bei 10.000 rpm und 4°C für 10 min in einem Beckmann JA20 Rotor abzentrifugiert, in 20 ml Waschpuffer 1 (1 M NaCl, 10 mM Tris pH 7,5) gewaschen, erneut zentrifugiert und ein zweites mal in 20 ml Waschpuffer 2 (10 mM Tris pH 7,5) gewaschen. Nach wiederholter Zentrifugation bei 10.000 rpm bei 4°C für 10 min wurde das Pellet schließlich in 1 ml TE (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA) aufgenommen. Das Fusionsprotein wurde anschließend zwei mal über ein präparatives SDS PAGE Gel aufgereinigt und für die Immunisierung von Kaninchen an Seq-Lab geschickt. Für Western-Analysen wurden affinitätsgereinigte Antikörper eingesetzt.

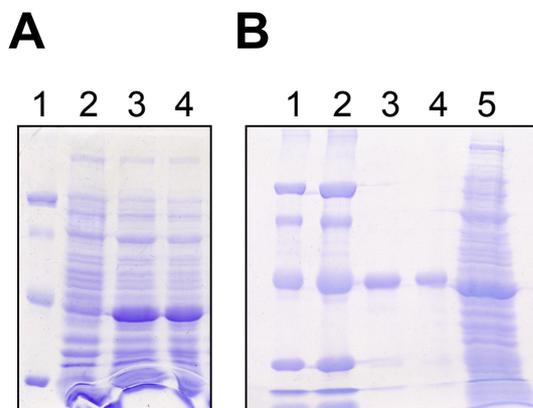


Abb. 4: Präparation des Ubp16-GST Fusionsproteins. Die Proteine im SDS-Gel wurden durch Coumassie Blau gefärbt

(A) Induktion des Fusionsproteins durch IPTG, Spur 1: 1µg Proteinstandard; Spur 2: Zellextrakt vor der Induktion; Spur 3: Zellextrakt 2 h nach der Induktion; Spur 4: Kontrolle des Zellaufschlusses durch die French Press. Aufgetragen wurden jeweils 0,2 OD₆₀₀ Einheiten..

(B) Aufreinigung des Fusionsproteins, Spur 1: 2 µg Proteinstandard; Spur 2: 5 µg Proteinstandard; Spur 3: 1 µl der Aufreinigung; Spur 4: 0,5 µl der Protein-Aufreinigung; Spur 5: 0,2 OD₆₀₀ Einheiten des Extraktes nach der Induktion durch IPTG.

2.32 Herstellung von Azetonpuder

Azetonpuder wurden eingesetzt um den Hintergrund polyklonaler Antiseren zu reduzieren. Die Zellen, die zur Herstellung des Puders eingesetzt wurden, trugen eine Disruption für das Gen, dessen Protein Epitop für das zu reinigende Antiserum war. Die Herstellung erfolgte mit wenigen Änderungen wie von Harlow und Lane in „Antibodies a laboratory manual“ beschrieben.

800 ml einer logarithmisch wachsenden Hefezellkultur wurden bei 5.000 rpm in einem Beckmann JA10 Rotor für 15 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 0,9% NaCl pro Gramm Pellet Nassgewicht aufgenommen und für 5 min auf Eis

inkubiert. Die Zellsuspension wurde zwei mal bei 1.300 psi in der French Press aufgeschlossen. Der Extrakt wurde für weitere 5 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 80 ml kaltem Azeton kräftig verrührt. Die Lösung wurde für 30 min auf Eis gelagert. Nach 10 min Zentrifugation bei 4°C und 10.000 g (9.500 rpm in einem Beckmann JA20 Rotor) wurde das Pellet in Azeton resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut 10 min bei 4°C und 10.000 g abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde auf Whatman Papier ausgestrichen, getrocknet und schließlich fein zerrieben. Aus 800 ml Kultur wurde etwa 1 g Puder gewonnen. Das Puder wurde abgeschlossen von Licht und Luft bei Raumtemperatur gelagert werden.

Zum Abtrennen unspezifischer Antikörper wurde das Azetonpuder in einer Konzentration von etwa 1% zum Serum zugegeben. Nach 30 min bei 4°C wurde das Puder bei 4°C und 10.000g für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand enthielt die gereinigten Antikörper.

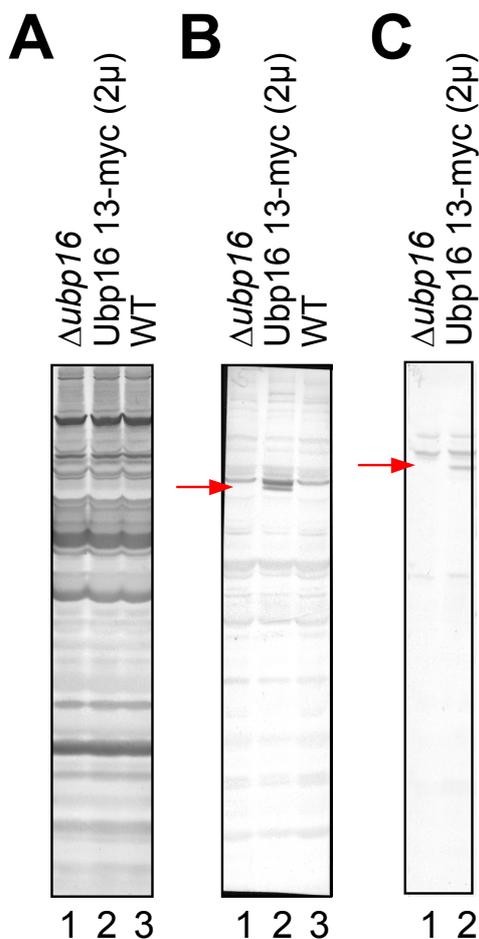


Abb. 5: Aufreinigung des α Ubp16-Serums.

Spur 1: $\Delta ubp16$ Zellextrakt; Spur 2: Zellextrakt von JD52 transformiert mit pRK802 (Ubp16 13-myc überproduziert); Spur 3: Zellextrakt des Wildtypstammes. Pfeil: Ubp16-Signal.

(A) zeigt die Reaktivität des Präimmunserums

(B) zeigt die Reaktivität des Serums nach 12 wöchiger Immunisierung mit dem Ubp16-GST Fusionsprotein

(C) zeigt die Reaktivität des Serums nach der Affinitätsreinigung

2.33 Kreuzung von Hefestämmen und Tetradenanalyse

Die haploiden Kreuzungspartner wurden auf einer YPED-Platte miteinander gemischt und 5 h bei 25°C inkubiert. Danach wurden Zygoten mit einem Mikromanipulator auf einer YPED-Platte vereinzelt und für 3 Tage bei 25°C inkubiert. Zur Sporulation wurden die Zellen in YPED-Flüssigmedium über Nacht herangezogen, dreimal mit sterilem Wasser gewaschen und in 3 ml Sporulationsmedium (1% KOAc mit essentiellen Aminosäuren) aufgenommen. Nach dreitägiger Inkubation bei 25°C wurde 1 ml des Ansatzes abzentrifugiert und die Zellen in 1 ml sterilem Wasser aufgenommen. Zur Entfernung der Ascuswand wurden 20 µl der Suspension mit 20 µl Zymolyaselösung (0,2 mg/ml) gemischt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Sporen mit einem Mikromanipulator auf einer YPED-Platte zum Auskeimen abgelegt.

2.34 Gen-Deletion und Gen-Modifikation in *S. cerevisiae*

Gen-Deletionen von *S. cerevisiae* wurden durch homologe Rekombination von Markern in die chromosomale DNA bei gleichzeitiger Deletion des gewünschten Gens erzielt. Hierzu wurde die von (Longtine, *et al.*, 1998) beschriebene, auf PCR basierende Methode der Gendeletion benutzt. Es wurden 60mere Oligonukleotide verwendet, deren 20 3'-ständigen Basen die Amplifikation eines Selektionsmarkers erlauben, der auf einem Plasmid vorliegt. Die 40 5'-ständigen Basen sind genspezifisch und erlauben die homologe Rekombination. Diese Methode wurde ebenfalls verwendet, um Proteine C-terminal mit einem Epitop zu markieren. Der Erfolg der Genmanipulationen wurde mit mindestens zwei unabhängigen PCR-Reaktionen verifiziert, indem sowohl die Disruptionskassette flankierende Primer als auch interne Primer verwendet wurden. Dadurch konnten nur bei gelungener Manipulation spezifische PCR-Produkte der erwarteten Größe entstehen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Charakterisierung der *UBP* Disruptionsstämme

3.1.1 Untersuchung der *UBP* Mutanten auf Wachstumsdefekte

Über die Familie der Ubps ist noch wenig bekannt. Die 16 *UBP* Gene sind nicht essentiell. Alle Disruptionsstämme zeigen ein normales Wachstum bei 30°C. Des Weiteren wurden bisher erst für wenige Ubps spezifische Substrate und Funktionen in der Zelle gefunden. Um die Proteinfamilie näher zu charakterisieren und möglicherweise spezifische Funktionen zu finden, wurde das Wachstum aller 16 Disruptionsstämme auf verschiedenen Medien getestet. Auftretende Wachstumsdefekte sollten Rückschlüsse auf Funktion oder Lokalisation in der Zelle ermöglichen.

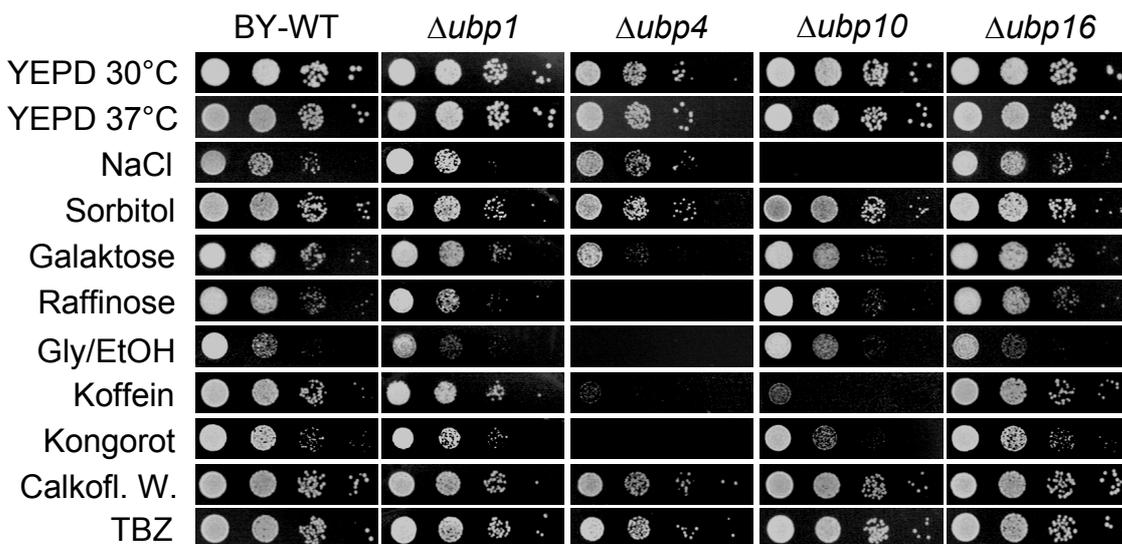


Abb. 6: Untersuchung der *UBP* Disruptionsstämme auf Wachstumsdefekte.

Die Zellen wurden in Vollmediumkulturen angezogen und in 4 Verdünnungen, jeweils 1:10 von links nach rechts, auf die verschiedenen Mediumplatten getropft. Gezeigt ist das Wachstum des Wildtypstammes im Vergleich zu dem des *UBP1*, *UBP4*, *UBP10* und des *UBP16* Disruptionsstammes. Die Zellen wurden zum einen auf Vollmedium-Platten (YEPD) für 3 Tage bei 30 bzw. 37°C angezogen und zum anderen wurden sie auf Platten mit alternativen Kohlenstoffquellen (Galaktose, Raffinose, Glycerin/Ethanol) und verschiedenen Zusätzen (1 M NaCl, 1 M Sorbitol, 5 mM Koffein, 0,4 mg/ml Kongorot, 0,16 mg/ml Calcofluor white, 10 µg/ml Thiabendazol (TBZ)) für 3 bis 5 Tage bei 30°C angezogen.

Auf Vollmedium zeigten alle Disruptionsstämme bei 30°C ein mit dem Wildtypstamm (BY-WT) vergleichbares Wachstum. Als einzige der Disruptanten zeigte der $\Delta ubp4$ Stamm bei 37°C ein leicht reduziertes Wachstum, was dem bisher bekannten Wachstumsverhalten der Disruptionsstämme auf Vollmedium entspricht (Amerik, *et al.*, 2000a). Erstaunlicherweise wuchsen die meisten der Disruptionsstämme unter den verschiedenen getesteten Bedingungen genau wie der Wildtypstamm (gezeigt für $\Delta ubp1$ und $\Delta ubp16$ in Abbildung 6), nur zwei Disruptionsstämme zeigten eindeutige Wachstumsdefekte. Die auffälligsten Defekte zeigte dabei der $\Delta ubp4/\Delta doa4$ Stamm. Dieser Stamm wuchs nur sehr schlecht auf Platten mit Galaktose als Kohlenstoffquelle und wuchs gar nicht auf Platten mit Raffinose oder Glycerin/Ethanol als Kohlenstoffquelle. Hefen nutzen bevorzugt Glukose für die Energiegewinnung. In Anwesenheit von Glukose, werden die Gene, die zur Verwertung anderer Kohlenstoffquellen nötig sind, reprimiert, man spricht dabei von Glukoserepression (Trumbly, 1992). Für das Wachstum auf alternativen Kohlenstoffquellen muß die Glukoserepression aufgehoben werden, damit eine Synthese der benötigten Enzyme möglich wird. Dies scheint in dem *UBP4* Disruptionsstamm nicht mehr unbeeinträchtigt ablaufen zu können. Bei der Verwertung von Glukose (oder anderer fermentierbarer Kohlenstoffquellen) gewinnen die Hefen die benötigte Energie aus der Gärung. Glycerin/Ethanol ist eine Kohlenstoffquelle, die nicht vergoren werden kann. Daher sind die Hefezellen gezwungen, bei der Verwertung von Glycerin/Ethanol, ihre Energie, über die Atmung zu gewinnen, was intakte und aktive Mitochondrien voraussetzt. Da der *UBP4* Disruptionsstamm überhaupt nicht in der Lage war auf den Glycerin/Ethanol Platten zu wachsen, ist vermutlich die Funktion der Mitochondrien in dieser Mutante gestört. Außer auf den oben aufgeführten Kohlenstoffquellen, zeigte der *UBP4* Disruptionsstamm ebenfalls kaum bis gar kein Wachstum auf Platten, denen Koffein oder Kongorot zugegeben worden war. Die Wirkung dieser Chemikalien ist nicht genau bekannt, aber Hefezellen, die Defekte im Aufbau der Zellwand haben, scheinen auf Medien, denen diese Chemikalien zugegeben wurden, nicht oder nur schlecht wachsen zu können. Daher ist möglicherweise der Zellwandaufbau in $\Delta ubp4$ Mutante ebenfalls beeinträchtigt. Auch der $\Delta ubp10$ Stamm zeigte ein deutlich reduziertes Wachstum auf den koffein-haltigen Platten. Zusätzlich konnte bei diesem Stamm kein Wachstum auf Platten, denen 1M NaCl zugegeben wurde, beobachtet werden. Diese hohe Salzkonzentration verursacht in Hefezellen osmotischen Stress

(Marquez und Serrano, 1996). Die Disruption von *UBP10* scheint daher deutliche Defekte in der osmotischen Stressantwort auszulösen. Einen wesentlich schwächer ausgeprägten Wachstumsdefekt auf den Platten mit NaCl zeigten $\Delta ubp1$ und $\Delta ubp4$, deren Wachstum im Vergleich zum Wildtyp nur ein leicht reduzierte war. Neben der Canavinin-Sensitivität der $\Delta ubp4$ Mutante (Amerik, *et al.*, 2000a), konnten in dieser Arbeit weitere Bedingungen gefunden werden, unter denen die Mutante nicht lebensfähig war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Ubp10 unter Hochsalz-Bedingungen essentiell wird.

Alle anderen getesteten Disruptionsmutanten zeigten kein verändertes Wachstum unter den untersuchten Bedingungen. Dies könnte darauf hindeuten, dass diese Ubps redundante Funktionen haben und sich gegenseitig ersetzen können. Es konnten allerdings Bedingungen gefunden werden, unter denen einzelne Ubps essentiell zu sein scheinen, was dafür spricht, dass die deubiquitinierenden Enzyme spezialisiert sind und möglicherweise nur ein sehr enges Substratspektrum haben.

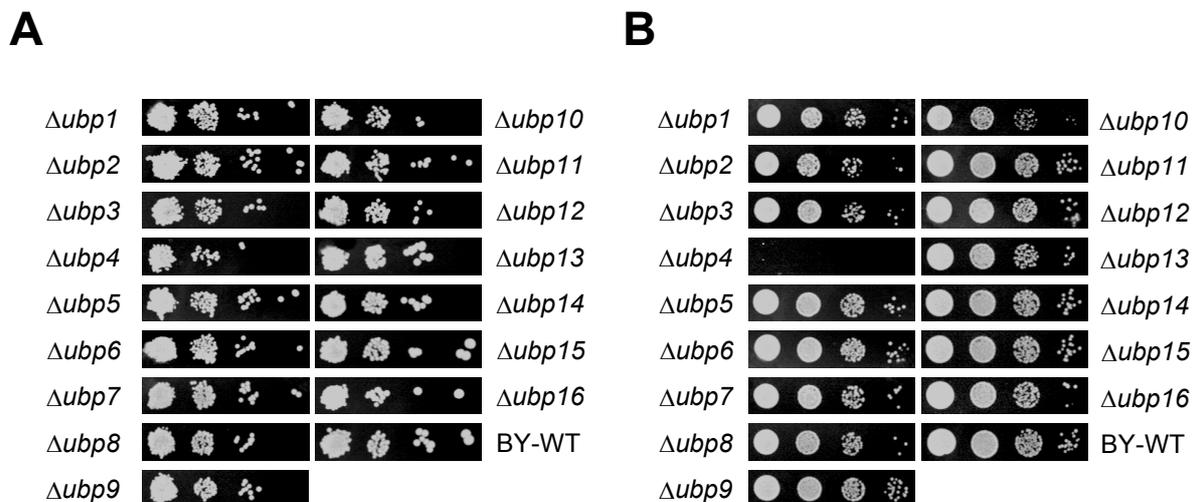


Abb. 7: Untersuchung der *UBP* Disruptanten auf Defekte bei der Paarung und der Autophagozytose. (A) Bestimmung der Paarungsaktivität: Alle Disruptionsstämme sowie der Wildtypstamm wurden in Vollmedium angezogen und in 4 Verdünnungen (jeweils 1:10) auf Minimalmediumplatten getropft, auf denen zuvor ein Rasen aus $Mat\alpha$ Zellen replika-plattiert worden war. Auf diesen Platten konnten nur die Paarungsprodukte, die diploiden Zellen anwachsen. Die Inkubation erfolgte für 3 Tage bei 30°C. (B) Stickstoffmangel Test: Die Hefezellen wurden aus einer früh-logarithmischen Vollmediumskultur in Stickstoffmangelmedium überführt, nach 4 Tagen Stickstoffhunger auf Vollmediumplatten getropft und für 3 d bei 30°C inkubiert.

Neben dem Wachstum wurde die Paarungsaktivität sowie die Fähigkeit Hungerbedingungen zu überleben, bestimmt. Die Paarungsaktivität der Mutanten (Abbildung 7 A) unterschied sich nicht von der des Wildtypstammes (BY4741). Keines der 16 Ubps scheint direkten Einfluss auf den Paarungsprozess zu haben. Unter Hungerbedingungen können Hefezellen den benötigten Stickstoff, durch Autophagozytose bereit stellen indem sie zelleigene Proteine in der Vakuole verdauen (Thumm, 2000, Abeliovich und Klionsky, 2001). Zellen mit Autophagozytose-Defekt sind dagegen nicht in der Lage, Stickstoffhunger zu überleben. Defekte bei der Autophagozytose traten nur im $\Delta ubp4/doa4$ Stamm auf (Abbildung 7 B). Dies ist ein weiterer Phänotyp der *UBP4* Disruption, der bisher noch nicht beschrieben wurde.

3.1.2 Ubiquitinierungsmuster in den *UBP* Disruptionsmutanten

Die durchgeführten Tests haben gezeigt, dass die meisten Deletionen der Ubps keinen Einfluss auf das Zellwachstum, die Paarungsaktivität oder die Autophagozytose haben. Dennoch wurden für *UBP4* und *UBP10* Bedingungen gefunden, unter denen diese Gene für die Zelle essentiell werden. Dies lässt vermuten, dass die einzelnen Ubps unterschiedliche Funktionen in der Zelle ausüben und daher auch unterschiedliche Substrat-Spezifitäten aufweisen. Potentielle Substrate eines Ubps sollte in dessen Disruptionsstamm nicht mehr deubiquitiniert werden und aus diesem Grund hyperubiquitiniert vorliegen. Um spezifische Substrate der Ubps zu identifizieren wurde deshalb die Verteilung ubiquitiniertes Proteine in Zellextrakten der 16 Disruptionsstämme sowie des Wildtypstammes untersucht. Dazu wurden die Zellen zum einen in Medium mit Glukose und zum anderen in Medium mit Glycerin/Ethanol also Kohlenstoffquelle angezogen. Die Extrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die ubiquitinierten Proteine wurden im Western-Blot durch Antikörper gegen Ubiquitin nachgewiesen.

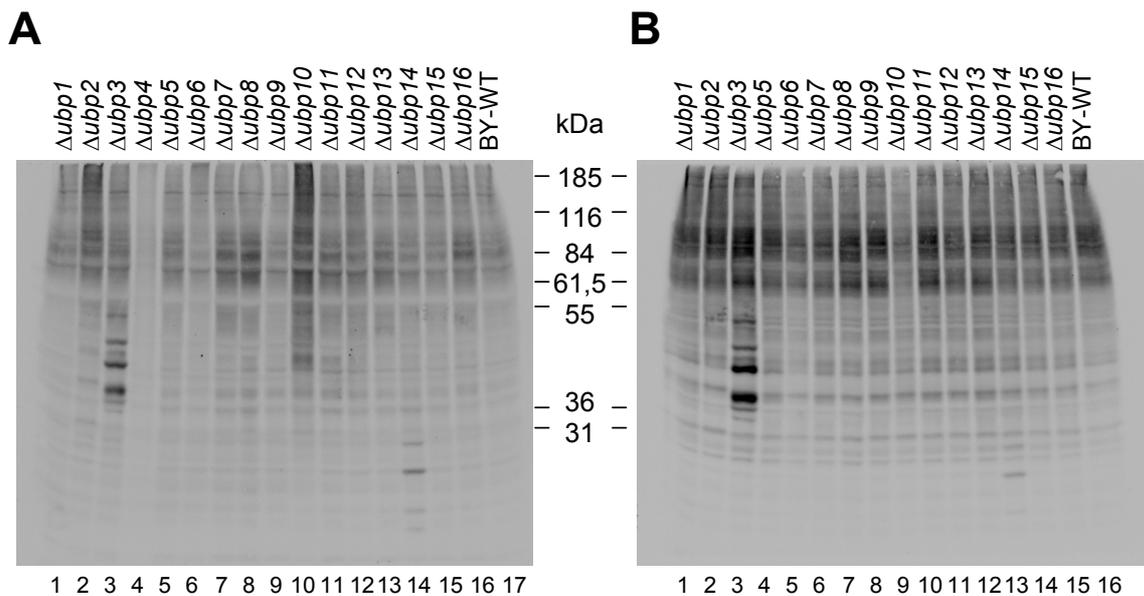


Abb. 8: Ubiquitinierungsmuster in den *UBP* Disruptionsstämmen. Zellextrakte der Disruptionsstämmen und des Wildtypstammes wurden im SDS-PAGE Gel aufgetrennt. Der Nachweis ubiquitiniertes Proteine erfolgte im Western-Blot über Antikörper gegen Ubiquitin. (A) Zellextrakte der in glukosehaltigem Medium angezogenen Zellen. Spur 1: $\Delta ubp1$; Spur 2: $\Delta ubp2$;... Spur 16: $\Delta ubp16$; Spur 17: BY-WT (B) Zellextrakte der in Glycerin/Ethanol-haltigem Medium angezogenen Zellen. Spur 1: $\Delta ubp1$; Spur 2: $\Delta ubp2$; Spur 3: $\Delta ubp3$; Spur 4: $\Delta ubp5$; Spur 5: $\Delta ubp6$;... Spur 15: $\Delta ubp16$; Spur 16: BY-WT

Für zwei Ubps konnten zusätzliche Banden identifiziert werden. Im Zellextrakt des *UBP3* Disruptionsstammes traten 4 Extrabanden von etwa 35, 41, 46 und 50 kDa auf (Abb. 8 A Spur 3, B Spur 3). Von Ubp3 sind bereits Interaktionspartner beschrieben worden. Es konnte gezeigt werden, dass Ubp3 die Proteinkinase Ste7 deubiquitiniert (Wang und Dohlman, 2002). Ste7 hat eine Größe von 57,5 kDa und ist damit größer als die identifizierten Banden. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Ubp3 wichtig für das Silencing von Chromatin ist (Moazed und Johnson, 1996). Möglicherweise handelt es sich daher bei den gefundenen Banden um Proteine, die für das Silencing nötig sind. Im Extrakt des *UBP14* Disruptionsstammes trat eine starke Extrabande von etwa 17 kDa auf sowie drei schwächere Banden, eine Bande davon im Bereich um etwa 24 kDa und zwei um 8-10 kDa (Abb. 8 A Spur 14, B Spur 13). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Ubp14 freie Ubiquitinketten schneidet und dass sich diese Ketten in der Disruptionsmutante anhäufen (Amerik, *et al.*, 1997). Ein Ubiquitinmonomer ist 8 kDa groß. Die Größen der detektierten Banden entsprechen in etwa der Größe von Di- und Triubiquitin. Daher handelt es sich bei den identifizierten Banden vermutlich um freie Ubiquitinketten. Ein generell schwächeres

Signal im Western-Blot zeigten $\Delta ubp4$, $\Delta ubp6$ und $\Delta ubp9$. Durch Anfärben der Nitrozellulose-Membran mit PonceauS, direkt nach dem Proteintransfer, wurde die aufgetragene Proteinmenge kontrolliert. Auf beiden Membranen aus Abbildung 8 befanden sich vergleichbare Proteinmengen der Zellextrakte. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Ubiquitinierung in den drei Disruptionsstämmen tatsächlich insgesamt reduziert war. In $\Delta ubp6$ und $\Delta ubp9$ konnte nur eine schwache Reduktion der Ubiquitinierung beobachtet werden, während die Reduktion im $UBP4$ Disruptionsstamm sehr stark war. Ubp4 gehört zu den bisher am besten untersuchten Ubps. Es wurde gezeigt, dass der Spiegel an freiem Ubiquitin in der $UBP4/DOA4$ Disruption reduziert ist (Swaminathan, *et al.*, 1999). Das erklärt, warum im Zellextrakt so gut wie keine Ubiquitin-Konjugate nachgewiesen werden konnten. Möglicherweise ist das Fehlen freien Ubiquitins auch ein Grund für die beobachteten Wachstumsdefekte der $\Delta ubp4$ Mutante. Der Zellextrakt des $UBP10$ Disruptionsstammes dagegen zeigt scheinbar eine insgesamt stärkere Ubiquitinierung (Abb. 8 A Spur 10). Möglicherweise handelt es sich dabei um ubiquitinierte Membranproteine. Es gibt Untersuchungen, die zeigen, dass Ubp10/Dot4 an der posttranskriptionalen Regulation von Gap1 einer Aminosäurenpermease beteiligt ist. Gap1, ein 65 kDa großes Membranprotein, scheint durch Ubp10 deubiquitiniert zu werden (Kahana, 2001). Erstaunlicherweise zeigt der Extrakt, der $UBP10$ Disruption der in Glycerin/Ethanol haltigem Medium angezogenen Zellen, eine Reduktion der Ubiquitinierung (Abb. 8 B Spur 9). Das könnte bedeuten, dass die Aktivität dieses Enzyms in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle, auf der die Zellen wachsen, reguliert wird. Im Bandenmuster der Extrakte, von den in Glycerin Ethanol angezogenen Zellen, waren insgesamt im Bereich zwischen 20 und 50 kDa leichte Veränderungen zu erkennen (Abb. 8 B), im Vergleich zu den Extrakten, der in Glukose angezogenen Zellen (Abb. 8 A). Dies ist wahrscheinlich auf die veränderten Stoffwechselbedingungen und die dadurch benötigten Proteine zurückzuführen. Neben $\Delta ubp10$ zeigte ansonsten kein weiterer Disruptionsstamm eine veränderte Ubiquitin-Verteilung in den Glycerin/Ethanol Extrakten. Für einige Ubp's konnten spezifische Substrate nachgewiesen werden. Während andere, wie Ubp4 eher den gesamten Ubiquitin-Haushalt zu regulieren scheinen. Die meisten Disruptionsstämme zeigten jedoch kein verändertes Muster ubiquitiniertes Proteine im Zellextrakt. Dies könnte bedeuten, dass die Ubps redundante Funktion in der Zelle haben, oder dass die Substrate der Ubps

möglicherweise nur sehr schwach exprimiert sind und daher im Gesamt-Zellextrakt nicht nachgewiesen werden können.

3.1.3 Untersuchung der *UBP* Mutanten auf Defekte im endozytischen Weg

Die klassische Funktion der Ubps ist das Recycling von Ubiquitin. Dies bedeutet, Ubiquitin wird vor dem Abbau der markierten Proteine abgespalten und der Zelle erneut zur Verfügung gestellt. Neben der Recycling-Funktion, scheinen einige Ubps auch spezifische Aufgaben in der Zelle zu haben. Für Ubp4 gibt es Hinweise auf eine Funktion an späten Endosomen im endozytischen Weg. Um nun alle *UBP* Mutanten auf Defekte im endozytischen Weg zu testen, wurde die Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffes FM4-64 untersucht. Der Farbstoff wird durch die Membranen des endozytischen Weges in die Zelle aufgenommen und schließlich in der Vakuolen-Membran angehäuft. Bei einer Blockade des endozytischen Weges, sollte der Farbstoff nicht mehr bis an die Vakuolen-Membran gelangen. In allen 16 Disruptionsmutanten, wie auch im Wildtyp, war die Vakuolen-Membran deutlich gefärbt (Daten nicht gezeigt). Daraus lässt sich schließen, dass der Membran-Transport zur Vakuole in keiner der *UBP* Mutanten blockiert ist.

3.2 Identifizierung membrangebundener Ubps

Die Ubiquitinierung von Membranproteinen ist wichtig für den Transport dieser Proteine über den endozytischen Weg in die Vakuole, wo sie abgebaut werden. Zum einen scheint die Ubiquitinierung das Endozytose Signal für die Internalisierung von Oberflächenproteinen zu sein (Hicke, 1999), und zum anderen das Signal für die Aufnahme in sogenannten MVBs (Multi Vesicular Bodies), über die das Cargo ins Vakuolen-Lumen transportiert wird (Katzmann, *et al.*, 2001, Urbanowski und Piper, 2001). Die Regulation des Ubiquitinierungsgrades eines Proteins könnte prinzipiell durch Ubiquitinierung, wie auch durch Deubiquitinierung erfolgen. So wird beispielsweise für Ubp4 eine regulatorische Funktion an späten Endosomen vorgeschlagen (Amerik, *et al.*, 2000b). Daher sollte nach Ubps gesucht werden, die möglicherweise regulatorischen Einfluss auf den Transport von Membranproteinen

haben. Ausgangspunkt war die Vermutung, dass solche Ubps durch eine Assoziation mit den entsprechenden Membranen an ihren Wirkungsort gebunden sind.

Durch Floatations-Experimenten sollte eine mögliche Bindung der Ubps an Membranen gezeigt werden. Um die Proteine im Western-Blot nachweisen zu können, war es nötig, sie mit einem 13-myc Epitop zu markieren. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde eine „Tagging Kasette“ amplifiziert, die für das 13-myc Epitop und einen Selektionsmarker kodiert, flankiert von homologen Bereichen des zu markierenden Gens (Longtine, *et al.*, 1998). Über homologe Rekombination wurde die Kasette im Austausch gegen das Stopcodon, an das 3' Ende des offenen Leserasters, in das Chromosom integriert (Abb. 9 A). Die Markierung der Ubps wurde im Western-Blot überprüft. Es wurden jeweils 5 Transformanten für jedes zu markierende Protein untersucht. Scheinbar ist es auch innerhalb des 13-myc Epitops zu Rekombinationsereignissen gekommen, so dass für einige der markierten Ubps Varianten unterschiedlicher Größe auftraten (Abb. 9 B).

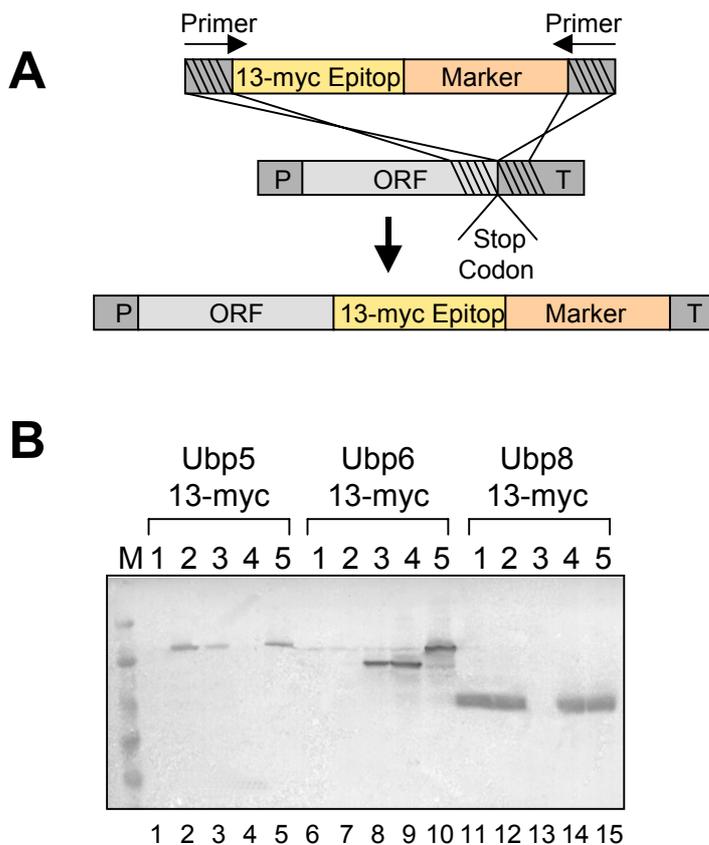


Abb 9: Markierung der Ubp-Proteine mit einem 13-myc „Epitop-Tag“. (A) Schematische Darstellung der Epitop-Markierung durch homologe Rekombination. P: Promotor; T: Terminator; ORF: offenes Leseraster; Epitop-Tag in Rot; Selektionsmarker in Gelb (B) Kontrolle der Markierung mit dem 13-myc Epitop. Zellextrakte von jeweils 5 *HIS*-positiven Transformanten wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Im Western-Blot wurde die Epitop-Markierung mit Antikörpern gegen das 13-myc-Epitop (9E10) nachgewiesen.

Ubp13 konnte auch nach mehreren Versuchen nicht erfolgreich markiert werden und wurde in den folgenden Untersuchungen nicht berücksichtigt. Um nun die Membran-

Assoziation der markierten Ubps zu untersuchen, wurden Zellextrakte in einer osmotisch inaktiven Lösung hoher Dichte aufgenommen und mit Lösungen geringerer Dichte überschichtet. Während der Zentrifugation wandern membranassoziierte Proteine aufgrund der geringeren Dichte im Gradienten nach oben. Proteinkomplexe und lösliche Proteine hingegen bleiben in den Fraktionen höherer Dichte. Nach der Zentrifugation wurden sechs gleiche Fraktionen von oben abgenommen und auf die Gegenwart von Proteinen untersucht. Die meisten Ubps zeigten dabei eine Verteilung über den gesamten Gradienten (Abb. 10).

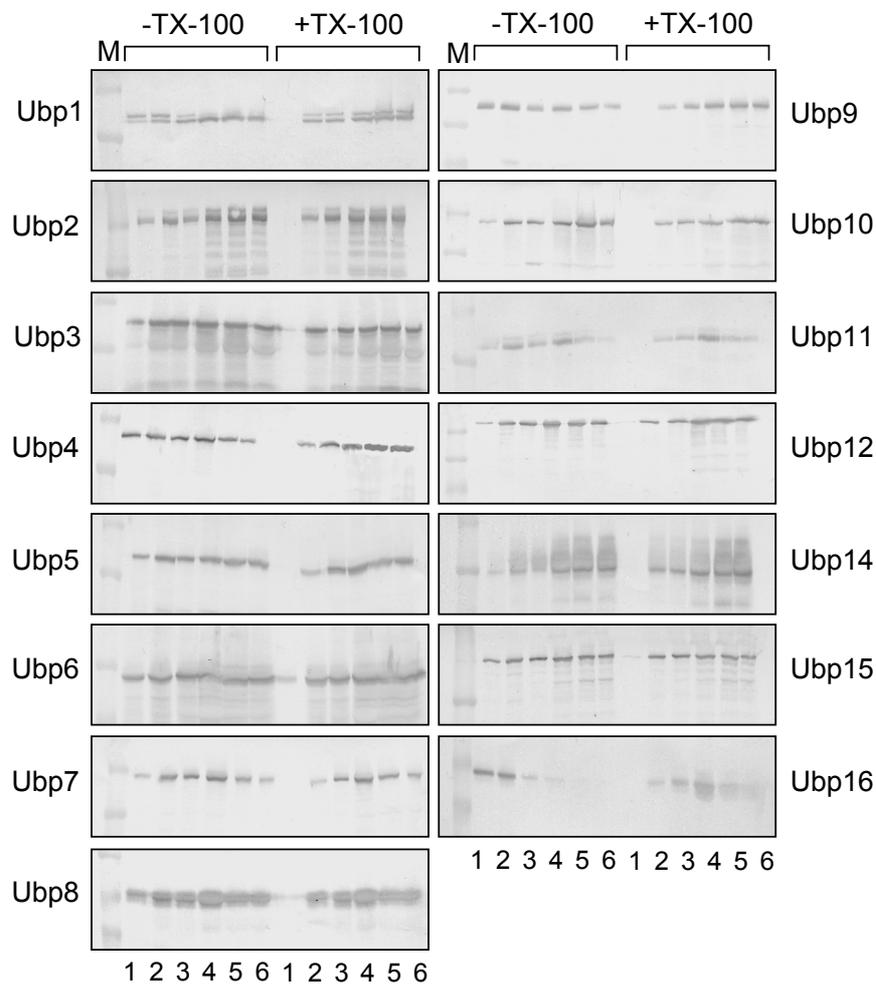


Abb 10: Untersuchung aller Epitop markierten Ubps auf Membran-Assoziation. Zellextrakte der Hefestämme mit den C-terminal markierten Ubp Proteinen wurden mit einem Optiprärp™ Gradienten überschichtet und zentrifugiert. Es wurden 6 gleiche Fraktionen abgenommen (Spur 1-6) und mittels Western-Analyse auf die Gegenwart von Proteinen untersucht. Die Fraktionen 1 und 2 (Spur 1 und 2) repräsentieren die Membran-Fraktion, 4-6 (Spur 4-6) die lösliche Fraktion. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die mit Triton X-100 behandelte Hälfte der Zellextrakte.

Membranproteine steigen in dem Gradienten zu den Fraktionen geringerer Dichte auf. Die untersuchten Membranproteine Pep12, ein endosomales SNARE Protein und Pma1, die Plasmamembran ATPase wurden ausschließlich in den Fraktionen 1 und 2 nachgewiesen (Abb. 11 E und F), während das lösliche Marker-Protein, die Phosphofruktokinase (Pfk) in den Fraktionen 3-6 nachgewiesen wurde (Abb. 11 G). Die Fraktionen 1 und 2 enthalten also die Membranproteine und können daher als Membran-Fraktion bezeichnet werden. Die lösliche Fraktion mit den zytoplasmatischen Proteinen umfaßt die Fraktion 3-6. Nach der Extraktion mit dem Detergenz Triton X-100, welches Membran-Strukturen auflöst, verhält sich Pep12 wie ein lösliches Protein und befindet sich ausschließlich in der löslichen Fraktion. Von Pma1 hingegen befindet sich auch nach der Extraktion ein signifikanter Anteil in der Membran-Fraktion. Pma1 ist zum Teil in sogenannten "Rafts" lokalisiert (Bagnat, *et al.*, 2001). Das sind Membrandomänen, die resistent gegen die Wirkung von Triton X-100 sind. Das Fraktionierungsverhalten des löslichen Proteins Pfk wurde durch Triton X-100 nicht beeinflusst. Pfk befand sich immer in der löslichen Fraktion.

Tab. 7: Membran-Assoziation der 13-myc Epitop markierten Ubp Varianten

Protein	Membran-Fraktion	lösliche Fraktion
	Anteil in %	Anteil in %
UBP1	32	68
UBP2	21	79
UBP3	21	79
UBP4	37	63
UBP5	27	73
UBP6	23	77
UBP7	27	73
UBP8	31	69
UBP9	41	59
UBP10	19	81
UBP11	36	64
UBP12	22	78
UBP14	16	84
UBP15	27	73
UBP16	88	12
Pep12	94	6
PFK	7	93
PFK-c-myc	12	88

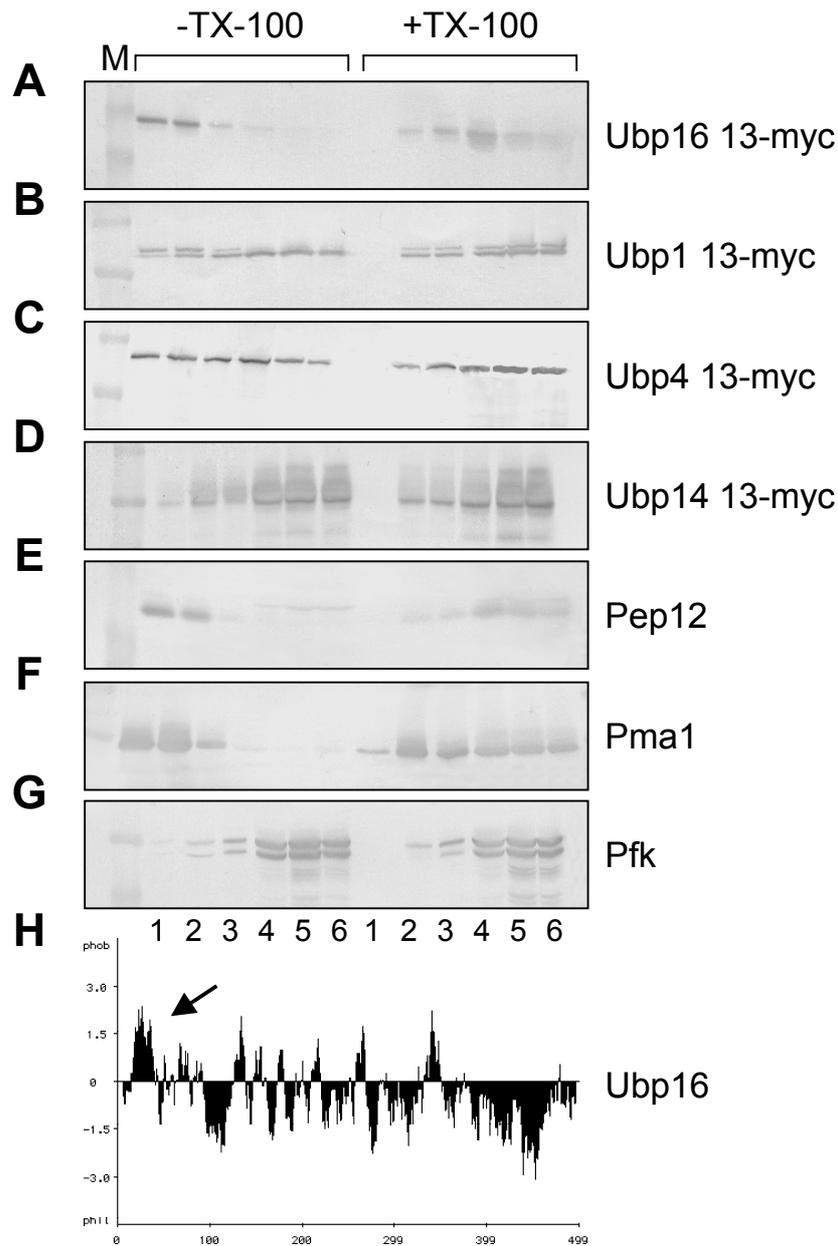


Abb. 11: Bestimmung der Membran-Assoziation durch Floatations-Experimente. Zellextrakte der Hefestämme mit den C-terminal markierten Ubp Proteinen wurden mit einem OptiprappTM Gradienten überschichtet und zentrifugiert. Es wurden 6 gleiche Fraktionen abgenommen (Spur 1-6) und mittels Western-Analyse auf die Gegenwart von Proteinen untersucht. Die Fraktionen 1 und 2 (Spur 1 und 2) repräsentieren die Membran-Fraktion, 4-6 (Spur 4-6) die lösliche Fraktion. Der rechte Teil der Abbildung zeigt die mit Triton X-100 behandelte Hälfte der Zellextrakte. (A) Ubp16 13-myc (RKY1908), (B) Ubp1 13-myc (RKY1894), (C) Ubp4 13-myc (RKY1897), (D) Ubp14 13-myc (RKY1906), (E) Pep12, (F) Pma1, (G) Pfk, (H) Hydropathie-Profil von Ubp16.

Die meisten der Ubp Proteine ließen sich nicht eindeutig einer Fraktion zuordnen. Zu einem gewissen Anteil scheinen fast alle mit Membranen assoziiert zu sein. Um auszuschließen, dass die Assoziation mit den Membranen durch das 13-myc Epitop bedingt ist, wurde das Fraktionierungs-Verhalten einer 13-myc Epitop markierten Pfk Variante untersucht. Die markierte Pfk Variante zeigte die gleiche Verteilung, wie das nicht markierte Protein, wodurch ein Einfluss des „Epitop-Tags“ auf die Membran-Assoziation ausgeschlossen werden konnte. Die Ubps ließen sich im Western-Blot in allen 6 Fraktionen nachweisen, wobei der Protein-Anteil in der Membran-Fraktion unterschiedlich stark war. Der Anteil der einzelnen Ubps in der Membran-Fraktion ist in Tabelle 7 wiedergegeben. Ubp14 (Abb. 11 D) war das Protein mit dem geringsten Anteil (16%) in der Membran-Fraktion. Dieser Wert entspricht in etwa dem der löslichen Pfk mit 10%. Aufgrund seiner Funktion, dem spalten freier Ubiquitinketten, würde man für Ubp14 auch keine Membran-Assoziation erwarten. Andere Ubps hingegen zeigten deutlich größere Anteile in der Membran-Fraktion. Dazu gehörten Ubp1, und Ubp4/Doa4, Ubp9 und Ubp11. Ubp4 (Abb. 11 C) zeigte mit 37% signifikante Anteile in der Membran-Fraktion. Von Ubp4 wird vermutet, dass es eine Funktion bei der Bildung von „Multi vesicular bodies“ (MVB) am späten Endosom hat. Hier deubiquitiniert Doa4 möglicherweise Proteine, die in MVBs verpackt werden (Amerik, *et al.*, 2000b). Der Membran-Anteil von Ubp1 war mit 32% geringer als bei Ubp4. Aber Abbildung 11 B zeigt eine modifizierte Form von Ubp1, die bei etwas höherem Molekulargewicht im SDS Gel läuft. Diese modifizierte Form findet sich ausschließlich in der Membran-Fraktion und ist Triton X-100 löslich. Die im Gel schneller laufende Bande befindet sich hauptsächlich in den Fraktionen 3-6. Nach der Triton X-100 Extraktion zeigen beide Banden das gleiche Fraktionierungs-Muster. Dies könnte bedeuten, dass Ubp1 durch eine Modifikation an Membranen rekrutiert werden kann.

Das einzige Ubp, welches vollständig in der Membran-Fraktion nachgewiesen wurde, war Ubp16 (Abb. 11 A). Damit ist Ubp16 als einziges Ubp der Hefe permanent an Membranen gebunden. Das Hydropathie-Profil von Ubp16 zeigt am N-Terminus einen Bereich hydrophober Aminosäuren, der als Membrananker fungieren könnte (Abb. 11 H). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei Ubp16 um ein integrales Membranprotein handelt.

3.3 Charakterisierung der Membran-Assoziation von Ubp16

Ubp16 kann integral oder peripher mit der Membran assoziiert sein. Der hydrophobe N-Terminus des Proteins lässt aber vermuten, dass es sich um ein integrales Membranprotein handelt. Bei einer Zentrifugation mit 100.000 g werden Membranen und damit die mit Membranen assoziierten Proteine pelletiert, lösliche Proteine bleiben im Überstand. Um zu testen, auf welche Weise Ubp16 mit Membranen assoziiert ist, wurden Zellextrakte des Ubp16 13-myc Stammes mit dem Detergenz Triton X-100 und 0,1 M Na_2CO_3 pH11 behandelt. Triton X-100 löst die Membranstruktur auf, integrale und periphere Membranproteine werden solubilisiert und sollten nicht mehr pelletierbar sein. 0,1 M Na_2CO_3 pH11 löst periphere Proteine von Membranen ab, integrale Membranproteine sollten dagegen weitgehend unbeeinflusst bleiben.

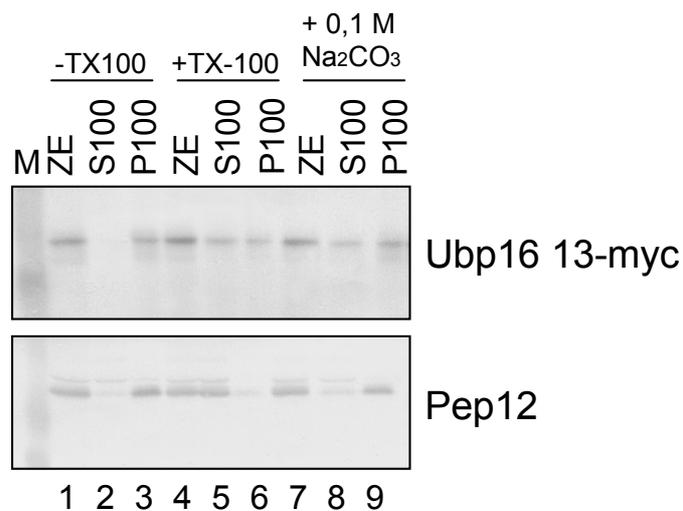


Abb. 12: Charakterisierung der Membran-Assoziation von Ubp16. Unbehandelte (Spur 1-3) sowie mit Triton X-100 (Spur 4-6) oder Na_2CO_3 (Spur 7-9) behandelte Zellextrakte des Ubp16 13-myc Stammes, wurden für eine Stunde bei 100.000 g zentrifugiert. Mittels SDS-PAGE und Western-Analysen wurden die erhaltenen Fraktionen auf die Anwesenheit von Proteinen untersucht. Der Nachweis von Ubp16 13-myc (oben) erfolgte über Antikörper gegen das Epitop (9E10). Das endosomale Protein Pep12 (unten) wurde über spezifische Antikörper gegen das Protein selbst nachgewiesen. Spur 1, 4, 7: Zellextrakt; Spur 2, 5, 8: S100 Fraktion (lösliche Proteine); Spur 3, 6, 9: P100 Fraktion (Membranproteine).

Pep12, ein endosomales SNARE Protein, ist ein integrales Membranprotein, das über eine Transmembrandomäne am C-Terminus in der Membran verankert ist. Wie für Membranproteine erwartet, ließen sich Pep12 und Ubp16 13-myc durch eine Zentrifugation bei 100.000 g pelletieren (P100 Fraktion). Nach der Extraktion mit Triton X-100 befand sich Pep12 ausschließlich in der S100 Fraktion, dem Überstand nach der Zentrifugation. Ubp16 13-myc hingegen ließ sich auch nach der Behandlung mit dem Detergenz noch pelletieren (Abb. 12). Das könnte bedeuten, dass sich Ubp16 in detergenten-resistenten Membrandomänen befindet. Im Floatations-Gradienten allerdings verteilte sich Ubp16 13-myc nach der Detergenz-Extraktion hauptsächlich in der löslichen Fraktion, im Gegensatz zu Pma1, einem Protein, welches sich in detergenten-resistenten Membrandomänen befindet. Daher kann eine Lokalisation in sogenannten "Rafts" ausgeschlossen werden. Nach der Behandlung mit 0,1 M Na₂CO₃ pH11 war die Verteilung von Pep12 und Ubp16 13-myc identisch. Der größte Teil der Proteine war weiterhin mit Membranen assoziiert und somit pelletierbar. Lediglich ein geringer Anteil beider Proteine befand sich in der S100 Fraktion. Daher kann man davon ausgehen, dass Ubp16 ein integrales Membranprotein ist und aufgrund des Hydrophathie-Profiles vermutlich über eine Transmembrandomäne am N-Terminus in der Membran verankert ist.

3.4 Untersuchung der Glykosylierung einer Ubp16 Invertase Fusion

Ubp16 ist das einzige integrale Membranprotein unter den Ubps, daher wurde dieses Protein im weiteren genauer untersucht. Als nächstes stellte sich die Frage, ob der hydrophobe N-terminale Bereich von Ubp16 als Signalsequenz fungieren könnte. Diese Sequenz ermöglicht Proteinen den Eintritt in das endoplasmatische Retikulum (ER) über das Translokon (Wilkinson, *et al.*, 1997). Mit Hilfe des CBS Signal IP Servers (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>) wurde für den N-Terminus von Ubp16 eine Wahrscheinlichkeit von 0,679 für die Funktion als Signalsequenz berechnet. Für Invertase, ein sekretorisches Protein mit Signalsequenz, welches in das ER aufgenommen wird, durch den Golgi Apparat wandert und schließlich durch sekretorische Vesikel aus der Zelle ausgeschleust wird, lag der Wert bei 0,999. Die Voraussage des Computerprogramms für eine Signalsequenz am N-Terminus von

Ubp16, ist mit 0,679 relativ groß. Daher sollte mit Hilfe eines Ubp16 Invertase Fusionsproteins überprüft werden, ob Ubp16 tatsächlich über eine N-terminale Signalsequenz verfügt. Dazu wurde die Invertase ohne eigene Signalsequenz an den C-Terminus von Ubp16 fusioniert. Invertase wird im ER und Golgi-Apparat glykosyliert. Wenn Ubp16 über eine N-terminale Signalsequenz verfügt, sollte das Fusionsprotein ins ER eintreten können und ebenfalls glykosyliert werden. Glykosylierte Proteine laufen in SDS-PAGE Gelen aufgrund ihres höheren Molekulargewichtes langsamer. Mit der Endoglykosidase H (EndoH) können diese Zuckerketten von den Proteinen wieder entfernt werden.

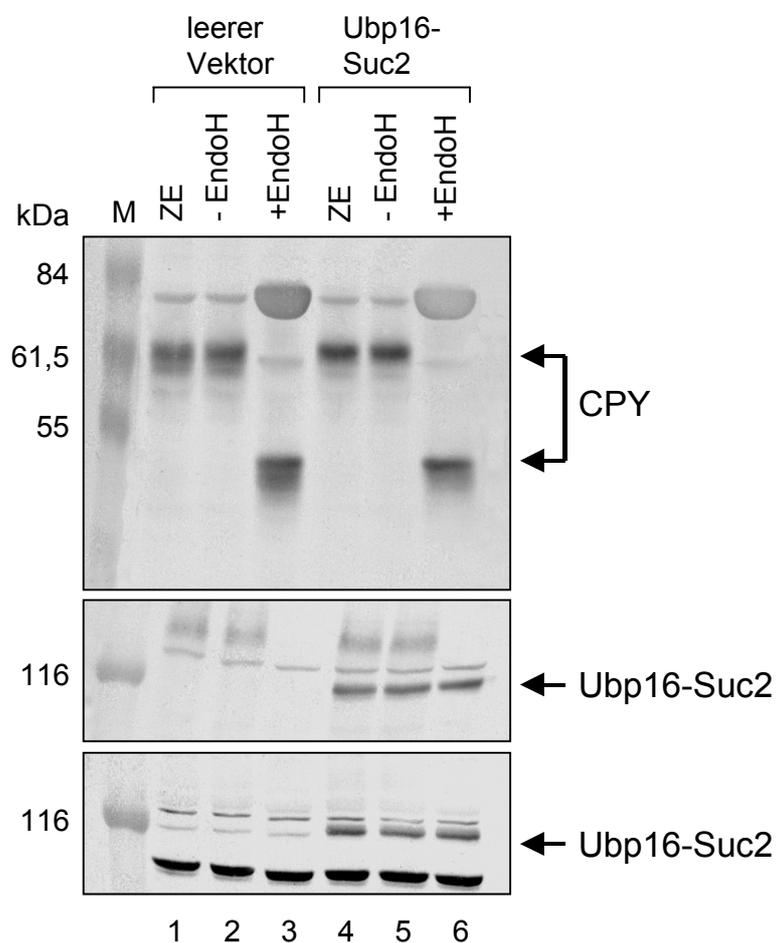


Abb. 13: Test der Ubp16-Invertase Fusion auf Glykosylierung. Der Invertase Disruptionstamm SEY6211 wurde mit dem leeren Vektor als Kontrolle (Spuren 1-3) und mit dem *UBP16-SUC2* Plasmid pRK732 (Spur 4-6) transformiert. Zur Deglykosylierung wurden Zellextrakte mit der Endoglykosidase H (EndoH) behandelt (Spur 3 und 6). Unbehandelte Kontrollen sind Spuren 1, 2, 4 und 5. Der Nachweis der Proteine im Western-Blot erfolgte über (A) Antikörper gegen CPY, (B) Antikörper gegen Invertase und (C) Antikörper gegen ein Ubp16-GST Fusionsprotein.

Zellextrakte von Invertase Deletionsstämmen, die mit dem *UBP16-SUC2* Plasmid transformiert waren, wurden mit und ohne EndoH für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung im SDS Gel. Das Fusionsprotein hat (ohne Glykosylierung) ein erwartetes Molekulargewicht von 125 kDa. Der Nachweis im Western-Blot erfolgte über Antikörper gegen Invertase und Antikörper, die gegen ein Ubp16-GST Fusionsprotein gerichtet waren. Mit beiden Antikörpern konnte das Fusionsprotein nachgewiesen werden (Abb. 13 B C). Das Laufverhalten nach der Behandlung mit EndoH blieb unverändert. Das Fusionsprotein scheint daher nicht glykosyliert zu sein. Als Kontrolle wurden Western-Blots derselben Extrakte mit Antikörpern gegen ein glykolyisiertes Protein, der Carboxypeptidase Y (CPY) entwickelt (Winther, *et al.*, 1991). Hier war nach der EndoH Behandlung eine deutliche Verschiebung zu geringerem Molekulargewicht zu beobachten (Abb. 13 A , Spur 3 und 6). Die Deglykosylierungsreaktion war also erfolgreich. Ubp16-Invertase ist offensichtlich nicht glykosyliert. Der N-Terminus von Ubp16 wird nicht als Signalsequenz erkannt, das Fusionsprotein scheint nicht in das ER Innere zu gelangen.

3.5 Intrazelluläre Lokalisation von Ubp16

3.5.1 Zellfraktionierung durch Differentielle Zentrifugation

Die Fraktionierung durch Differentielle Zentrifugation erlaubt Rückschlüsse auf die Lokalisation von Proteinen. Daher wurden Zellextrakte des Ubp16 13-myc Stammes für 10 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert und in die Pellet Fraktion (P13) und den Überstand (S13) getrennt. Anschließend wurde die S13 Fraktion bei 100.000 g für 1 h erneut in Pellet Fraktion (P100) und Überstand (S100) aufgetrennt. Die Membranen der verschiedenen Zellkompartimente verteilen sich unterschiedlich auf die beiden Pellet-Fraktionen. So finden sich die Membranen von Vakuole, endoplasmatischem Retikulum, Zellkern, Mitochondrien und Plasmamembran hauptsächlich in der P13 Fraktion. In der P100 Fraktion befinden sich Transportvesikel und Golgi-Membranen, während sich die Membranen des Endosoms sich gleichmäßig auf beide Pellet-Fraktionen, P13 und P100, verteilen.

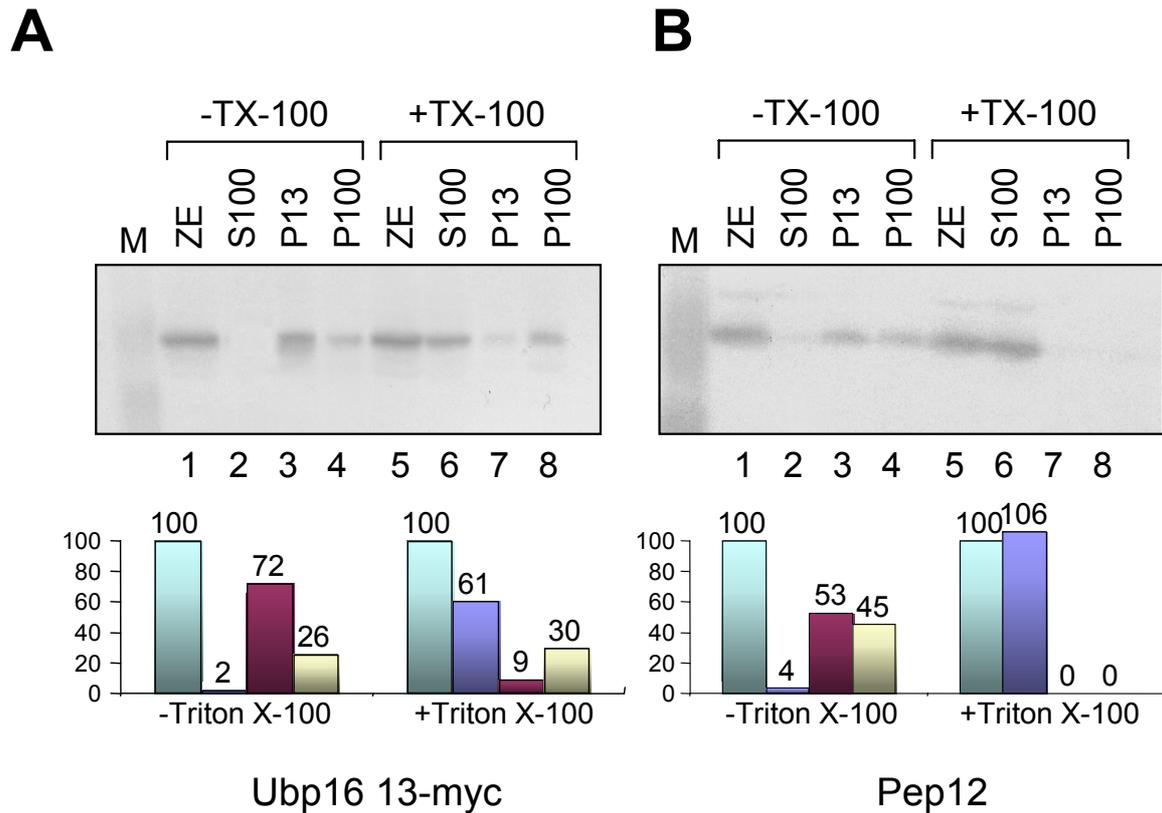


Abb. 14: Fraktionierung durch Differentielle Zentrifugation. Zellextrakte des Ubp16 13-myc Stammes wurden in zwei Zentrifugationsschritten in die Pellet Fraktionen P13 (Spur 3 und 7) und P100 (Spur 4 und 8) sowie in die lösliche Fraktion S100 (Spur 2 und 6) aufgetrennt. In Spur 1 und 5 wurde der Gesamtextrakt aufgetragen. Eine Hälfte der Extrakte wurde mit Triton X-100 behandelt (Spuren 5-8), die andere blieb unbehandelt (Spuren 1-4). Im Western-Blot wurden die Proteine mit Antikörpern gegen (A) das 13-myc Epitop (Ubp16 13-myc) und (B) Pep12 nachgewiesen. Im oberen Teil sind die Western-Blots abgebildet, im unteren Teil ist die Quantifizierung der Western-Blot Signale gezeigt.

In der differentiellen Zentrifugation zeigten Pep12 und Ubp16 13-myc ein unterschiedliches Fraktionierungsverhalten (Abb. 14). Pep12 ist an Endosomen lokalisiert und verteilte sich erwartungsgemäß auf die P13 und die P100 Fraktion (Abb. 14 A Spur 3, 4). Ubp16 13-myc war dagegen hauptsächlich in der P13 Fraktion zu finden. Ubp16 13-myc scheint daher nicht an Endosomen lokalisiert zu sein. Nach Extraktion der Membranen mit Triton X-100 ließ sich Pep12 vollständig lösen. Der Ubp16 13-myc Anteil in der P100 Fraktion blieb aber unverändert pelletierbar. Dieser P100 Anteil von Ubp16 13-myc scheint resistent gegenüber der Solubilisierung durch Triton X-100 zu sein. Die Ursache für diese Resistenz ist unklar, es unterstreicht aber, dass Pep12 und Ubp16 an unterschiedlichen Membranen lokalisiert sind.

3.5.2 Fraktionierung von Ubp16 im Sucrose-Dichte-Gradienten

Genaueren Aufschluss über die Lokalisation von Ubp16 in der Zelle sollten Sucrose-Dichte-Gradienten liefern. In einem Zentrifugenröhrchen wurde ein gleichmäßiger Sucrose-Gradient aufgebaut von 53% Sucrose am Röhrchenboden bis hinauf zu 20% Sucrose. Der Zellextrakt wurde auf den Gradienten geschichtet. Während der Zentrifugation verteilten sich die Membranen entsprechend ihrer Dichte im Gradienten. 18 gleiche Fraktionen wurden abgenommen und auf die Verteilung von verschiedenen Marker-Proteinen untersucht. Die Verteilung von Ubp16 13-myc wurde dann mit der Verteilung der Marker-Proteine verglichen (Abbildung 15).

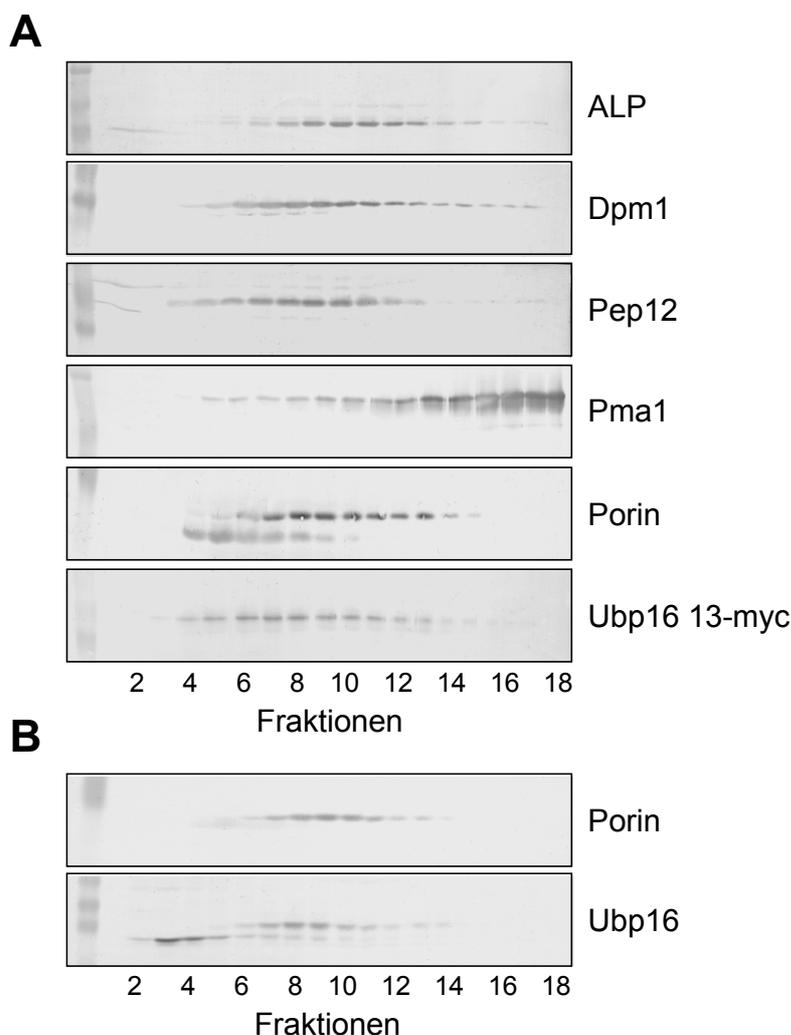


Abb. 15: Fraktionierung von Ubp16 13-myc im Sucrose-Dichte-Gradienten. (A) Western-Blots der Fraktionierung des Extraktes von RKY1649 (Endogenes Ubp16 C-terminal mit dem 13-myc Epitop markiert). Von oben nach unten ist die Verteilung von Alkalischer Phosphatase (ALP, Vakuole), Dolicholphosphat Transferase (Dpm1, ER), Pep12 (Endosom), der Plasmamembran ATPase (Pma1), Porin (Mitochondrien) und Ubp16 13-myc gezeigt. (B) Western-Blots der Fraktionierung des Extraktes von JD52 transformiert mit dem Ubp16 Überproduktionsplasmid pRK730. Oben die Verteilung von Porin unten die von 2μ *UBP16*. Eine densitometrische Analyse der Signalintensitäten ist in Abb. 16 gezeigt.

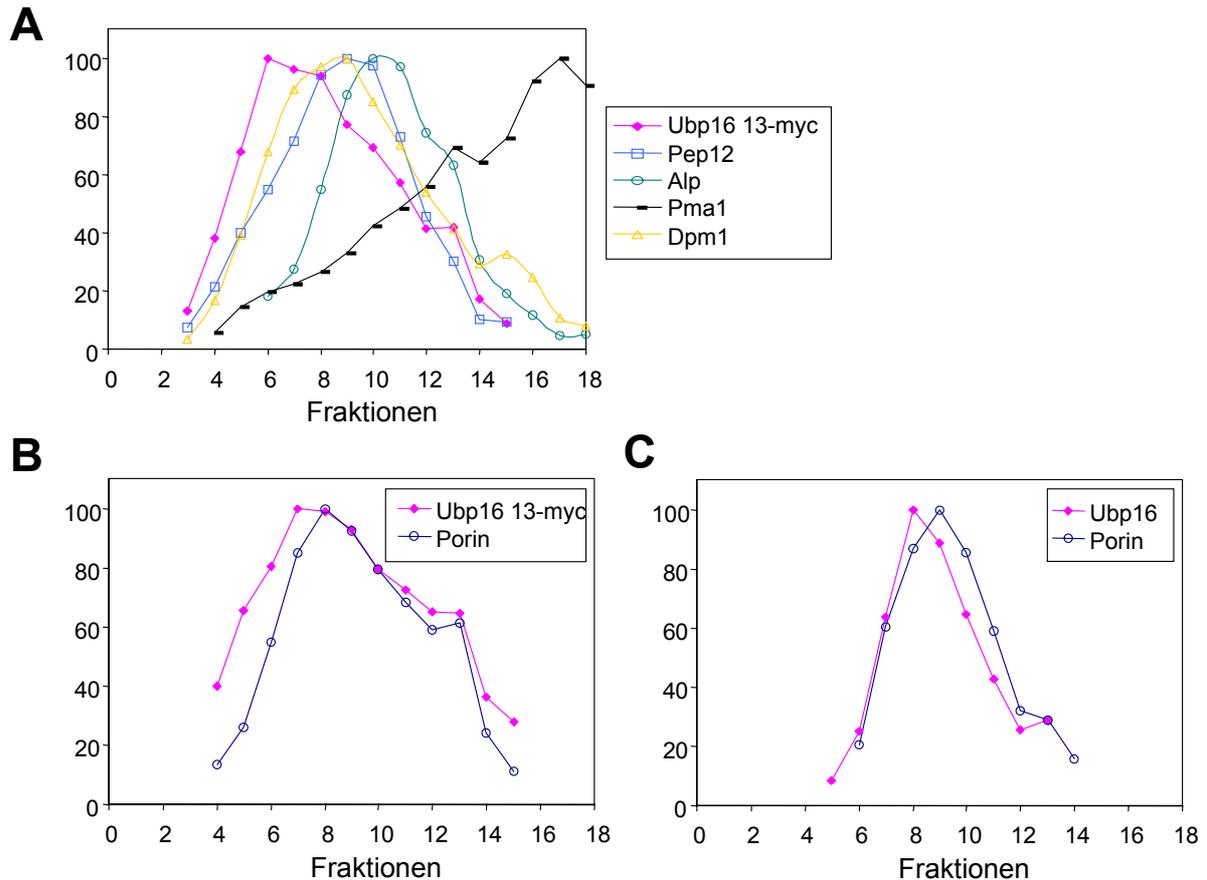


Abb. 16: Quantifizierung der Western-Blot Signale der Sucrose-Dichte-Gradienten. Die Blots wurden eingescannt und mit dem Programm „NIH-Image“ quantifiziert. Das stärkste Signal wurde jeweils auf 100% gesetzt. (A) Ubp16 13-myc Verteilung (gefülltes Quadrat) im Vergleich zu den Kurven von ALP (offener Kreis), Dpm1 (gefülltes Dreieck) Pep12 (offenes Quadrat) und Pma1 (Balken). (B) Verteilung von Ubp16 13-myc (gefülltes Quadrat) und Porin (offener Kreis) (C) Verteilung von 2µ *UBP16* (gefülltes Quadrat) und Porin (offener Kreis).

Nach der Quantifizierung der Western-Blot Signale (Abb. 16) ist deutlich zu erkennen, dass Ubp16 13-myc nicht mit ALP der Alkalischen Phosphatase (Vakuole), mit Dpm1 (ER-Membran), mit dem endosomalen Pep12 und nicht mit der Plasmamembran ATPase (Pma1) kolokalisiert (Abb. 16 A). Die beste Übereinstimmung mit der Ubp16 Verteilung zeigte das Protein der äußeren Mitochondrien-Membran, Porin (Abb. 16 B). Im hinteren Bereich der Kurven mit den Fraktionen größerer Dichte, stimmen die Kurven von Porin und Ubp16 gut überein, im vorderen Bereich ist die Ubp16 Kurve um eine Fraktion zu geringerer Dichte verschoben. Diese Verschiebung der Kurven kann möglicherweise auf das Vorhandensein zweier Mitochondrien-Populationen unterschiedlicher Dichte

zurückgeführt werden. Dabei scheint Ubp16 bevorzugt in der Population leichter Mitochondrien vorzukommen. Tatsächlich gibt es Hinweise, dass Mitochondrien unterschiedlicher Dichte in der Zelle vorkommen (Schumacher, *et al.*, 2002). Um ausschließen zu können, dass das 13myc Epitop die Lokalisation beeinflusst, wurde eine weitere Fraktionierung mit einer nicht markierten Variante von Ubp16 durchgeführt (Abb. 15 B , Abb. 16 C). Auch die Verteilung von nicht markiertem Ubp16 zeigt einen fast identischen Verlauf zur Porin-Kurve und ebenfalls eine Verschiebung um eine Fraktion zu geringerer Dichte, im Vergleich zur Porin-Verteilung. Leider war es mit dem Antiserum, das gegen ein Ubp16-GST Fusionsprotein hergestellt worden war, nur möglich, überproduziertes Ubp16 nachzuweisen.

Sowohl die 13-myc markierte Variante von Ubp16 wie auch überproduziertes Ubp16 zeigten in der Fraktionierung die beste Übereinstimmung mit der Porinverteilung. Porin ist ein Protein der äußeren Mitochondrien-Membran. Die gute Übereinstimmung der Verteilung im Gradienten deutet darauf hin, dass Ubp16 ebenfalls an Mitochondrien lokalisiert ist.

3.6 Lokalisation von Ubp16 13-myc in der Zelle

Um die Lokalisation von Ubp16 an Mitochondrien zu bestätigen, wurden Immunofluoreszenz Experimente durchgeführt. Dazu wurde der Wildtypstamm JD52 mit einem Überexpressionsplasmid transformiert, das für eine 13myc modifizierte Variante von Ubp16 kodiert. Über Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, wurde Ubp16 13-myc in fixierten Hefezellen nachgewiesen. Das Fluoreszenzsignal zeigte wurmförmige Strukturen, die sich durch die gesamte Zelle zogen (Abb. 17).

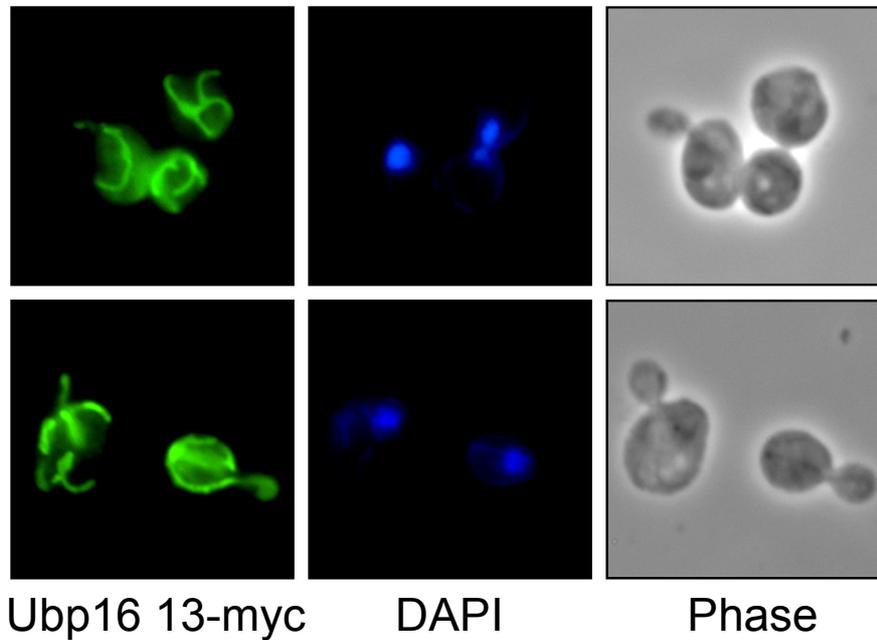


Abb. 17: Immunfluoreszenz zur Lokalisation von Ubp16. Der Wildtypstamm JD52 wurde mit dem Plasmid pRK802 (2μ *Ubp16 13-MYC*) transformiert. Als Primärantikörper wurde ein Antikörper gegen das c-myc Epitop (9E10) verwendet, Sekundärantikörper war ein FITC-gekoppelter Anti-Maus Antikörper. Links ist die FITC Fluoreszenz (Ubp16) gezeigt, in der Mitte die Fluoreszenz der DAPI-gefärbten DNA und rechts das Phasenkontrastbild.

Ubp16 13-myc zeigte ein netzartiges Färbungsmuster, wie es für Mitochondrien typisch ist. Das bekräftigt die Vermutung, dass Ubp16 an Mitochondrien lokalisiert ist. Aber auch das endoplasmatische Retikulum (ER) bildet zum Teil eine netzartige Struktur um den Zellkern mit Fortsätzen, die in das Zytoplasma reichen. Um daher eine Lokalisation von Ubp16 am ER auszuschließen, wurden Ubp16 13-myc und das ER Protein Kar2 in den selben Hefezellen nachgewiesen. Ubp16 13-myc über die 9E10 Antikörper aus der Maus gegen das c-myc Epitop und Kar2 mit Antikörpern aus Kaninchen gegen das Protein selbst. In Abbildung 18 A ist deutlich zu erkennen, dass die Fluoreszenzmuster von Ubp16 13-myc (grün) und Kar2 (rot) nicht übereinstimmen. Damit konnte eine ER Lokalisation von Ubp16 13-myc ausgeschlossen werden.

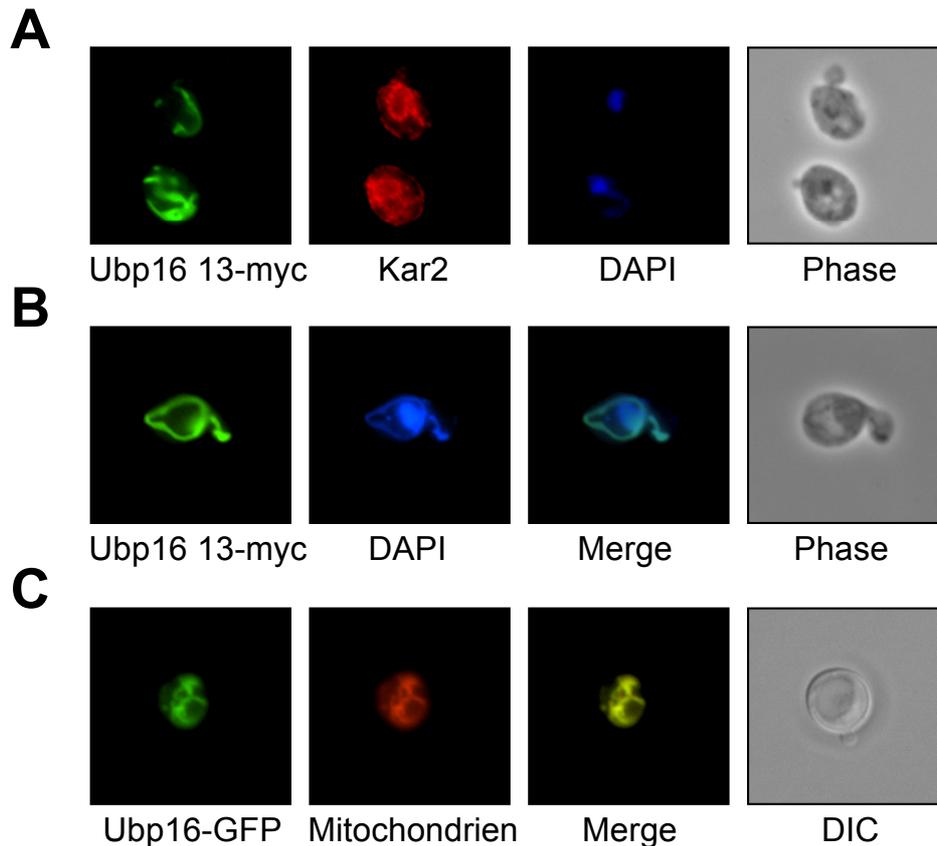


Abb. 18: Lokalisation von Ubp16. (A) Immunofluoreszenz, von links nach rechts: Ubp16 13-myc (grün) Erstantikörper gegen 13-myc Epitop, Zweitantikörper, anti Maus, FITC gekoppelt; Kar2 (rot) Erstantikörper gegen Kar2, Zweitantikörper, anti Kaninchen, Rhodamin gekoppelt; DAPI Färbung der DNA (blau); Phasenkontrast. (B) Kolokalisation von Ubp16 13-myc und mitochondrialer DNA. Von links nach rechts: Ubp16 13-myc (grün); DAPI Färbung der DNA (blau); „Merge“ (türkis); Phasenkontrast. (C) Fluoreszenz der GFP markierten Ubp16 Variante. Dazu wurde der Hefestamm JD52 mit dem 2 μ *UBP16-GFP* Plasmid pRK804 transformiert. Von Links nach rechts: Ubp16-GFP Fluoreszenz (grün), beobachtet mit dem FITC Filtersatz, Mitochondrien (rot), gefärbt mit MitoTracker RedTM und mit Rhodamin Filter beobachtet; Kolokalisation von Ubp16-GFP und Mitochondrien („Merge“, gelb), Phasenkontrastbild mit DIC Optik.

Mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI lässt sich DNA in der Zelle spezifisch anfärben. Neben der DNA des Zellkerns, die als stark leuchtender Punkt sichtbar wird, lässt sich auch die DNA der Mitochondrien färben. Die Mitochondrien DNA fluoresziert schwächer als die DNA im Zellkern, aber die wurmförmige Mitochondrienstruktur ist in der DAPI Fluoreszenz trotzdem deutlich erkennbar. In der Abbildung 18 B konnte gezeigt werden, dass das Ubp16 13-myc Signal mit dem der mitochondrialen DNA kolokalisierte. Dies ist eine weitere Bestätigung für die Annahme, dass Ubp16 an Mitochondrien lokalisiert ist. Auch in lebenden Zellen konnte eine Kolokalisation zwischen Mitochondrien und einer GFP-markierten Variante von Ubp16 gezeigt

werden (Abb. 18 C). In Zellen, in denen die Ubp16-GFP Variante exprimiert wurde, wurden gleichzeitig Mitochondrien durch den Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker RedTM gefärbt. Das Fluoreszenzsignal der Ubp16-GFP Variante und das der Mitochondrien wurden mit verschiedenen Filtersätzen aufgenommen. Eine Überlagerung der Bilder zeigte eine perfekte Kollokalisierung beider Signale.

Alle Lokalisierungsexperimente zeigten eine Kollokalisierung von Ubp16 mit Mitochondrien. Eine Lokalisation des Proteins am ER konnte eindeutig ausgeschlossen werden.

3.6.1 Ubp16 ist in der äußeren Mitochondrien-Membran lokalisiert

Ubp16 ist an Mitochondrien lokalisiert. Ein Mitochondrium besteht aus verschiedenen Kompartimenten. Das sind zum einen die beiden Mitochondrien-Membranen und zum anderen die Mitochondrien-Matrix, die von der inneren Mitochondrien-Membran umgeben ist und der Intermembranraum zwischen innerer und äußerer Mitochondrien-Membran. Vermutlich ist Ubp16 ein Protein der äußeren Mitochondrien-Membran. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden Protease Schutzexperimente durchgeführt. Wenn die hydrophoben Aminosäuren am N-Terminus als Transmembrandomäne fungieren, über die Ubp16 in der Membran verankert ist, gibt es zwei mögliche Orientierungen für das Protein, schematisch dargestellt in Abbildung 19. Der größere, nicht in die Membran inserierte Teil kann entweder zum Zytoplasma oder zum Intermembranraum hin orientiert sein.

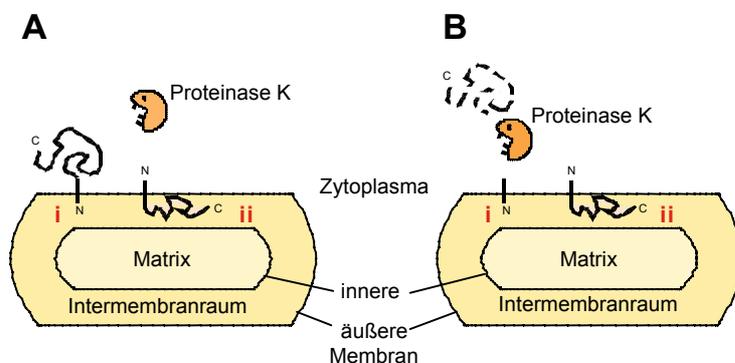


Abb. 19: Schematische Darstellung des Protease Schutz Experimentes. Gezeigt sind die mitochondrialen Subkompartimente und die möglichen Orientierungen des Ubp16 Proteins in der äußeren Membran. i zytoplasmatische Orientierung, ii Orientierung zum Intermembranraum hin. (A) vor dem Verdau durch Protease K, (B) nach dem Verdau durch Protease K.

Bei einer Orientierung von Ubp16 zum Zytoplasma ist das Protein zugänglich für Proteasen und kann verdaut werden. Ragt es dagegen in den Intermembranraum hinein, wird es durch die äußere Mitochondrien-Membran vor dem Verdau durch Proteasen geschützt. Daher wurden Zellextrakte des Ubp16 13-myc Stammes pRK1649, in denen die Mitochondrien nicht beschädigt waren, mit Proteinase K behandelt, um die Zugänglichkeit des Proteins für Proteinase K zu testen.

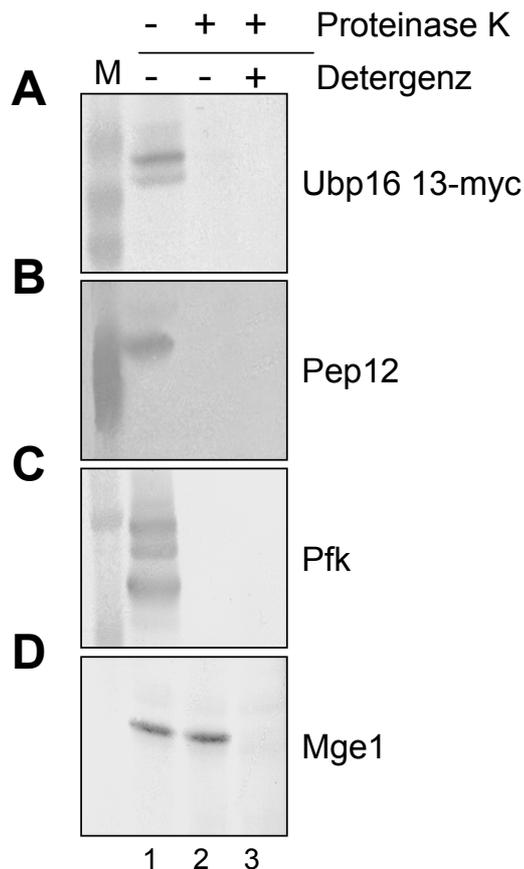


Abb. 20: Aufklärung der submitochondrialen Lokalisation von Ubp16 durch das Protease Schutz-Experiment. Zellextrakte des Ubp16 13-myc Stammes wurden mit Proteinase K (Spur 2) sowie mit Proteinase K und Detergenzien (1% Triton X-100, 2,5% n-Dodecyl- β -D-Maltosid) (Spur3) behandelt. Die Reaktion wurde gestoppt, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot durch Antikörper gegen (A) das 13-myc Epitop, (B) gegen Pep12, (C) gegen Phosphofruktokinase, (D) gegen Mge1 nach-gewiesen. Eine Probe ohne Proteinase und Detergenzien diente als Kontrolle (Spur 1).

Das Protein Phosphofruktokinase (Pfk) ist im Zytoplasma lokalisiert. Es war daher zugänglich für die Protease und wurde, wie erwartet, vollständig verdaut (Abb. 20 C Spur 2). Auch Pep12 wurde durch die Protease vollständig verdaut (Abb. 20 B). Pep12, ein SNARE Protein, ist über seine Transmembrandomäne am C-terminalen Ende in die Endosomen-Membran inseriert. Das gesamte Protein ist zum Zytoplasma hin orientiert und daher zugänglich für die Protease. Ubp16 13-myc verhielt sich wie Pep12. Es wurde auch ohne Zugabe von Detergenzien vollständig verdaut (Abb. 20 A). Das Protein der Mitochondrien-Matrix, Mge1, diente als Kontrolle für intakte Mitochondrien. Mge1 war ohne Zugabe von Detergenzien nicht zugänglich für die

Proteinase K und wurde nicht verdaut (Abb. 20 D Spur 2). Erst nachdem die Membranen durch Detergenzien aufgelöst worden waren, wurde auch Mge1 verdaut (Abb. 20 D Spur 3). Die Mitochondrien wurden daher bei der Herstellung des Zellextraktes nicht beschädigt. Ohne die Zugabe von Proteinase K konnten alle Proteine im Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 20 Spur 1). Daraus lässt sich schließen, dass Ubp16 tatsächlich ein Protein der äußeren Mitochondrien-Membran ist. Wahrscheinlich ist es über eine Transmembrandomäne am N-Terminus in der Membran verankert, wobei das Protein selbst zum Zytoplasma hin orientiert ist.

3.7 Suche nach der Funktion von Ubp16

3.7.1 Identifizierung von Ubp16 Interaktionspartnern

Um Hinweise auf die Funktion von Ubp16 zu bekommen, wurde mit Hilfe des Two-Hybrid Systems nach möglichen Interaktionspartnern von Ubp16 gesucht. Das Two-Hybrid System ist ein genetisches System, welches Wechselwirkungen zwischen Proteinen nachweist (Fields und Song, 1989). Dabei nutzt das System die Eigenschaft eukaryontischer Transkriptionsfaktoren aus, zwei Funktionen in einem Protein zu vereinen, die DNA Bindung an spezifische Erkennungssequenzen, durch die DNA Binde-Domäne (BD) und die Aktivierung der Transkription durch Wechselwirkung mit anderen Proteinen, über die Aktivierungs-Domäne (AD). Der Transkriptionsfaktor Gal4 wird in seine funktionalen Domänen geteilt. Ein Protein A wird an die Binde-Domäne, ein anderes Protein B wird an die Aktivierungs-Domäne fusioniert. Wenn die Proteine A und B miteinander interagieren, werden Gal4-AD und Gal4-BD in räumliche Nähe gebracht. Der Transkriptionsfaktor wird rekonstituiert und kann die Transkription, von Gal4 kontrollierten Genen, aktivieren. Wenn es nicht zu einer Wechselwirkung zwischen A und B kommt, bleibt die Aktivierung der Transkription dieser Gene aus.

Die Gal4-Hybridproteine wurden von 2 μ Vektoren exprimiert. pRK329 kodiert für die Gal4-BD, pRK296 für die Gal4-AD. Beide stehen unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors und tragen am 3' Ende der Gene eine "Multi cloning site", die eine Fusion mit den zu untersuchenden Proteinen im Leseraster erlaubt. Zum Test auf Interaktion wurden die Plasmide in den Testerstamm PJ69-4A transformiert. In diesem Stamm stehen drei Gene, *HIS3*, *ADE2* und *lacZ* unter der Kontrolle von Gal4. Die

Promotoren dieser Reportergene tragen Gal4 Bindestellen. Dies ermöglicht die Selektion auf Interaktionspartner. Die transformierten Testerstämme werden auf Selektionsmedien ohne Histidin oder Adenin angezogen. Bei Interaktion zweier Proteine im Two-Hybrid Screen, wird Gal4 rekonstituiert und die Transkription der Reportergene kann aktiviert werden. Die *HIS3* oder *ADE2* Aktivität ermöglicht dann das Wachstum auf dem Selektionsmedium. Für den Screen im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aktivität des *HIS3* und das *ADE2* Reportergen genutzt. Die Kontrolle über die *ADE2* Aktivität ist sehr stringent und zeigt daher nur starke Wechselwirkungen an, die *HIS3* Kontrolle dagegen ist weniger stringent und zeigt auch weniger starke Interaktionen an (Kranz, 2000).

Zur Suche nach Ubp16 Interaktionspartnern wurde nun eine Ubp16 Variante ohne Transmembrandomäne hinter die Gal4-BD in pRK329 fusioniert. Mit diesem Hybridprotein wurden zwei Genbanken in Gal4-AD Vektoren, eine Genbank der Firma Clontech (Matchmaker Two Hybrid System) und eine Genbank mit chromosomalen DNA Fragmenten (James, *et al.*, 1996) nach Interaktionspartnern durchsucht. Dazu wurde die Gal4-BD Fusion zusammen mit einer Genbank in den Hefestamm PJ69-4A transformiert und unter selektiven Bedingungen angezogen. Transformanten, die ohne Histidin wachsen konnten (Tab. 8), wurden anschließend, zur Bestätigung der Interaktion, auf Mediumplatten ohne Histidin und auf Platten ohne Histidin und Adenin getropft. Dabei dienten Transformanten mit den Vektoren pRK296 und pRK329 als Negativkontrolle. Als Positivkontrollen wurden Transformanten mit den Plasmiden pSE1111 und pSE1112 (Fields und Song, 1989) sowie mit pVA3 und pTD1 (Iwabuchi, *et al.*, 1993) verwendet.

Tab. 8: Two-Hybrid Genbank Screen

Genbank	Zahl der Transformanten	Zahl der auf –His wachsenden Transformanten
Clontech	3×10^4	3
James	5×10^5	5 ¹⁾

¹⁾ Es wurden zwei Screens mit der James Bank durchgeführt. Der Erste lieferte 4 positive Transformanten, der Zweite nur 1.

Aus 3 Screens mit zwei Genbanken wurden insgesamt 8 positive Transformanten erhalten. Diese wurden zusammen mit den Kontrollen erneut auf Selektionsplatten getropft, um die Stärke der Interaktion zu testen (Abb. 21). Auf Platten mit Histidin im Medium wuchsen alle Transformanten. (Die Plasmide der positiven Transformanten wurden nummeriert und mit einem Kürzel für die jeweilige Genbank versehen; J für die James Bank, C für die Clontechbank.) Ohne Histidin wuchsen die Transformanten mit den Genbankplasmiden pJ2 und pJ4 nur schlecht und die Transformante mit dem Plasmid pC3 wuchs gar nicht mehr. Die weiteren Transformanten zeigten ein normales Wachstum auf Platten ohne Histidin, einschließlich der Transformante mit dem Plasmid pJ5 aus dem zweiten Screen der James Bank (in der Abbildung nicht gezeigt). Auf Mediumplatten ohne Histidin und Adenin wuchs keine der Transformanten. Lediglich die Transformante mit dem Plasmid pJ2 zeigte im Vergleich zu den Positivkontrollen ein minimales Wachstum. Bei den möglichen Interaktionen scheint es sich daher eher um schwache Wechselwirkungen zu handeln.

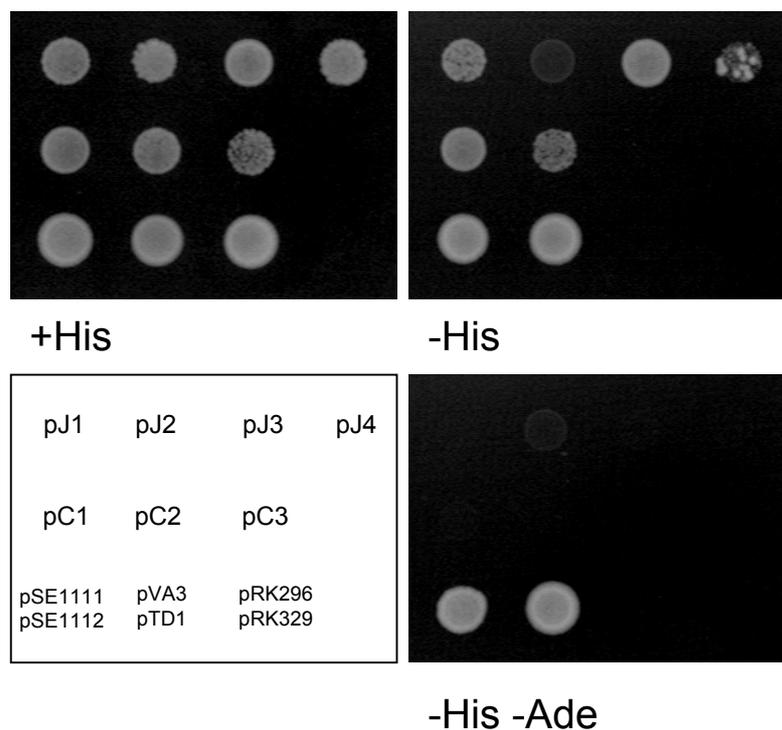


Abb. 21: Suche nach Ubp16-Interaktionspartnern mit dem „Two-Hybrid-System“. Der Testerstamm PJ69-4A mit dem *Gal-BD-UBP16* Plasmid pRK 801 wurde mit zwei Two-Hybrid Genbanken transformiert. Obere Reihe, die 4 positiven Transformanten aus dem ersten Screen mit James Bank. Mittlere Reihe, positive Transformanten der Clontech Bank. Untere Reihe: positiv Kontrollen, links mit den Plasmiden pSE1111 und pSE1112; Mitte mit den Plasmiden pVA3 und pTD1 und negativ Kontrolle, rechts mit den Plasmiden pRK296 und pRK329.

Um die potentiellen Interaktionspartner zu indentifizieren, sollten die Genbankplasmide aus den Transformanten isoliert und sequenziert werden. Die Transformanten mit den Plasmiden pJ2 und pJ4, die bereits in der Kontrolle ohne Histidin schlecht gewachsen waren, wuchsen auch im Flüssigmedium ohne Histidin nur sehr schlecht, so dass die Plasmide nicht isoliert werden konnten. Die weiteren Plasmide konnten erfolgreich isoliert werden und wurden durch die Firma SeqLab sequenziert (Tab. 9). Die isolierten Plasmide wurden erneut in den Testerstamm transformiert, einmal zusammen mit dem *Gal4-BD-UBP16* Plasmid und einmal ohne. Mit dem *Gal4-BD-UBP16* Plasmid sollte die Interaktion durch Wachstum auf Mediumplatten ohne Histidin bestätigt werden. Ohne das *Gal4-BD-UBP16* Plasmid sollte kontrolliert werden, ob das Genbankplasmid alleine die *HIS3* Aktivität induzieren kann, ohne dass Gal4 rekonstituiert wird. In einem solchen Fall würde es sich nicht um eine echte Two-Hybrid Interaktion handeln.

Tab. 9: Analyse der potentiellen Interaktionspartner von Ubp16 aus dem Two-Hybrid Screen.

Genbank plasmid	Screen	Interaktion nach Retransfor- mation ¹⁾	Wachstum ohne Ubp16- GalBD ¹⁾	ORF	Beschreibung
pJ1	#1	+	+	Hap4	Untereinheit des Hap Komplexes
pJ3	#1	-	-	RRP40	3'-5' Exonuclease; mRNA Prozessierung
pJ5	#2	-	+	SDC25	GDP/GTP Austausch Faktor homolog zu CDC 25
pC1	#1	-	-	Gal4	Transkriptionsfaktor
pC2	#1	-	-	Gal4	Transkriptionsfaktor
pC3	#1	-	-	Gal4	Transkriptionsfaktor

¹⁾ Selektion auf die *HIS3* Aktivität

Die Retransformanten mit den Plasmiden der Clontechbank sowie dem Plasmid pJ3 wuchsen gar nicht mehr auf Platten ohne Histidin. In diesen Fällen scheint es sich nicht um Interaktionspartner von Ubp16 zu handeln, was auch durch das Ergebnis der Sequenzierung bestätigt wird. Die Plasmide der Clontechbank kodieren alle für ein Fragment des Transkriptionsfaktors Gal4, und pJ3 kodiert für ein Fragment eines mRNA prozessierenden Enzyms. Ubp16 ist an Mitochondrien lokalisiert. Eine Interaktion von Ubp16 mit Proteinen im Zellkern ist unwahrscheinlich. Die Retransformante mit dem Plasmid pJ5 war auch ohne *UBP16-GalBD* in der Lage *HIS3* Aktivität zu vermitteln, was gegen eine echte Wechselwirkung spricht. Erstaunlicherweise wuchs der Testerstamm hingegen mit beiden Plasmiden (pJ5 und *Gal4-BD-UBP16*) auf Platten ohne Histidin nicht (Tab. 9). Eine echte Two-Hybrid Interaktion kann damit ausgeschlossen werden.

pJ5 kodiert für ein Fragment von SDC25 einem GDP/GTP Austauschfaktor, der homolog zu CDC25 ist. Die Expression von SDC25 wird bei Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen induziert und das Protein hat eine „cyclin destruction box“ (Boy-Marcotte, *et al.*, 1996). Zycline werden in dieser Box ubiquitiniert. Es gibt Hinweise, dass das SDC25 homologe der Maus mit Maus-UBPy, einem deubiquitinierendem Enzym, interagiert (Gnesutta, *et al.*, 2001). Die Funktion von SDC25 ist noch unbekannt. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass es überproduziert, die Funktion von CDC25 ersetzen kann. Da die Interaktion von Ubp16 und SDC25 nicht reproduziert werden konnte, wurde das Protein nicht weiter untersucht.

Die einzige Wechselwirkung, die reproduziert werden konnte, (durch Wachstum ohne Histidin im Medium) war die zwischen den Proteinen, die von pJ1 und *Gal4-BD-UBP16* codiert werden. Allerdings wuchs der Testerstamm auch mit dem Plasmid pJ1 alleine, ohne *Gal4-BD-UBP16*, auf Histidin-freien Platten. Daher ist es unklar, ob es sich um eine echte Two-Hybrid Wechselwirkung handelt. Das Genbankplasmid pJ1 kodiert für ein Fragment des Hap4 Proteins. Hap4 ist Teil des Hap Komplexes. Dieser Komplex wird für die Expression der respiratorischen Gene benötigt (Bourgarel, *et al.*, 1999). Die Respiration findet in Mitochondrien statt, Ubp16 ist an Mitochondrien lokalisiert und Hap4 kann sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert sein. Eine Interaktion zwischen beiden Proteinen ist daher durchaus möglich. Zudem war diese Wechselwirkung die einzige, die auch nach der Retransformation der Plasmide noch nachgewiesen werden konnte. Ob es sich aber

um eine echte Two-Hybrid Interaktion handelt, konnte nicht eindeutig gezeigt werden. Dennoch sollte Hap4 als möglicher Interaktionspartner von Ubp16 weiter untersucht werden. Hap4 gehört zu einem Proteinkomplex aus vier Proteinen. Hap5 ist das einzige weitere Protein des Komplexes, welches neben der Lokalisation im Kern, ebenfalls im Zytoplasma vorkommt. Daher sollte auch eine mögliche Interaktion zwischen Ubp16 und Hap5 untersucht werden.

3.7.2 Untersuchung der Hap4 und Hap5 Ubiquitinierung

Hap4 und Hap5 sind potentielle Interaktionspartner von Ubp16. Daher stellt sich als erstes die Frage, ob die Proteine ubiquitiniert werden und ob eine Ubiquitinierung durch Ubp16 reguliert wird. Wenn Ubp16 diese Proteine deubiquitiniert, sollten sie in einem *UBP16* Disruptionsstamm hyperubiquitiniert vorliegen. Darum sollte der Ubiquitinierungsgrad dieser Proteine im $\Delta ubp16$ Stamm untersucht werden. Um Hap4 und Hap5 im Western-Blot nachweisen zu können, wurden für beide eine Fusion mit dem 13myc Epitop unter Eigenpromotorkontrolle in einem multi copy Plasmid konstruiert. Für den Nachweis einer möglichen Ubiquitinierung wurden die Plasmide jeweils in den Wildtypstamm und den *UBP16* Disruptionsstamm transformiert. Durch Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen das 13-myc Epitop, wurden Hap4 und Hap5 aus Zellextrakten der transformierten Stämme aufgereinigt. Mit Antikörpern gegen Ubiquitin sollte im Western-Blot eine potentielle Ubiquitinierung von Hap4 und Hap5 gezeigt werden (Abb. 22).

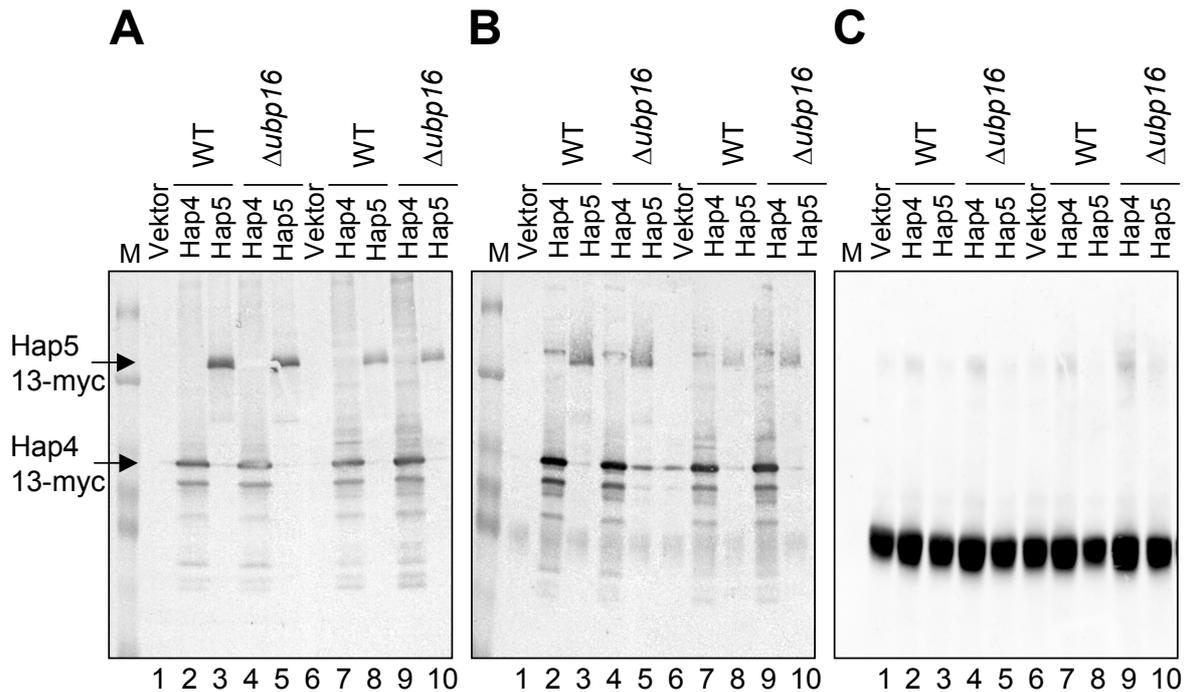


Abb. 22: Test auf Ubiquitinierung von Hap4 13-myc und Hap5 13-myc. Aus Zellextrakte der Hefestämme JD52 und RKY1892 transformiert mit den Plasmiden pRK847 (2μ *HAP4 13-MYC*) und pRK812 (2μ *HAP5 13-MYC*) wurden die 13-myc markierten Proteine mit anti-myc Antikörpern (9E10) präzipitiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. (A) Western-Blot der Zellextrakte. Nachweis der markierten Proteine über den 9E10 Antikörper, als Kontrolle vor der Immunpräzipitation. (B) Nachweis der präzipitierten Proteine mit dem 9E10 Antikörper. (C) Untersuchung der präzipitierten Proteine auf ubiquitinierte Formen mit Antikörpern gegen Ubiquitin.

Die Hefezellen wurden in glukosehaltigem Medium (Spuren 1-5) und in Medium mit Glycerin/Ethanol als Kohlenstoffquelle (Spuren 6-10) angezogen. Spur 1 und 2: Kontrolle mit leeren Vektor Spur 2 und 7: Hap4 13-myc im Wildtyp; Spur 3 und 8: Hap5 13-myc im Wildtyp; Spur 4 und 9: Hap4 13-myc in $\Delta ubp16$; Spur 5 und 10: Hap5 13-myc in $\Delta ubp16$.

Beide Proteine, Hap4 13-myc und Hap5 13-myc, wurden in Medium mit Glukose und in Medium mit Glycerin/Ethanol als Kohlenstoffquelle exprimiert und konnten mit den Antikörpern gegen das 13-myc Epitop im Zellextrakt nachgewiesen werden (Abb. 22 A). Als Kontrolle für die erfolgreich Immunpräzipitation wurden die aufgereinigten Proteine im Western-Blot mit den Antikörpern gegen das Epitop nachgewiesen. Beide Proteine ließen sich unter den getesteten Bedingungen präzipitieren (Abb. 22 B). Wenn die Proteine nun in ubiquitinierte Form vorliegen, sollten sie ebenfalls durch Antikörper gegen Ubiquitin nachgewiesen werden können. Im Western-Blot, der mit Antikörpern gegen Ubiquitin entwickelt wurde, konnte aber kein spezifisches Signal für Hap4 13-myc und Hap5 13-myc detektiert werden (Abb. 22 C). Eine

mögliche Ubiquitinierung der Proteine konnte also nicht gezeigt werden. Das könnte einerseits bedeuten, dass die Proteine nicht ubiquitiniert sind, aber andererseits ist die Nachweismethode über Western-Blots möglicherweise nicht sensitiv genug, so dass eine Ubiquitinierung der Proteine nicht eindeutig ausgeschlossen werden kann.

3.7.3 Bestimmung der Hap4 und Hap5 Halbwertszeit in Abhängigkeit von Ubp16

Da nicht eindeutig gezeigt werden konnte, ob Hap4 und Hap5 ubiquitiniert sind, sollte der Einfluss von Ubp16 auf die Halbwertszeit der Proteine untersucht werden. Die meisten ubiquitinierten Proteine werden in der Regel relativ schnell abgebaut. Sofern Hap4 oder Hap5 im $\Delta ubp16$ Stamm tatsächlich hyperubiquitiniert sind, werden sie möglicherweise sehr schnell abgebaut, so dass ein Nachweis der ubiquitinierten Form nicht möglich ist. Wenn diese Annahme stimmt, sollte die Halbwertszeit der Proteine in einem $\Delta ubp16$ Stamm deutlich verkürzt sein. Daher wurden zur Bestimmung der Halbwertszeit der Proteine „Pulse Chase“ Experimente durchgeführt. Während des „Pulses“ bauen die Hefezellen radioaktiv markiertes Methionin in neusynthetisierte Proteine ein. Mit dem „Chase“ wird den Zellen nicht-radioaktives Methionin im Überschuss zugegeben, es werden keine markierten Proteine mehr synthetisiert. Somit kann der Turnover der markierten Proteine mit Beginn des „Chase“ verfolgt werden (Abb. 23).

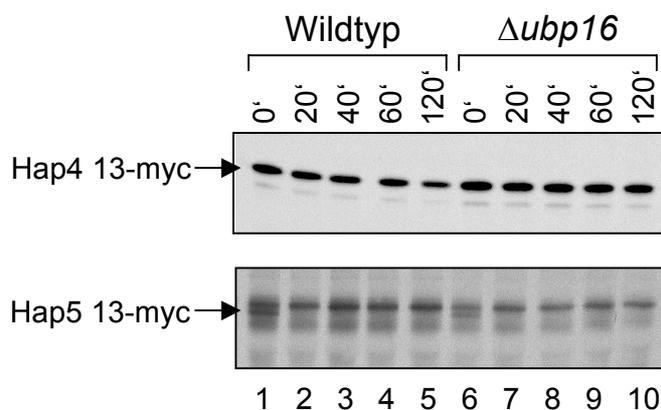


Abb. 23: Untersuchung des Turnovers von Hap4 13-myc, Hap5 13-myc. Die Hefestämme JD52 und $\Delta ubp16$ wurden mit den Plasmiden pRK847 (2 μ HAP4 13-MYC) und pRK812 (2 μ HAP5 13-MYC) transformiert. Die Zellen

wurden 15 min mit [³⁵S]Trans Label markiert (Pulse). Nach Zugabe nichtradioaktiven Methionins (Chase) wurden alle 20 min Proben entnommen. Die 13-myc markierten Proteine wurden mit Antikörpern gegen das Epitop immunopräzipitiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Autoradiogramm sichtbar gemacht. Spuren 1-5 zeigt die Abnahme der Hap4- und Hap5 13-myc Signale im Wildtypstamm JD52, Spuren 5-10 im *UBP16* Disruptionsstamm, RKY1892.

Hap4 13-myc scheint ein sehr stabiles Protein (Abb. 23) zu sein. Nach 120 min nahm die Signalintensität nicht messbar ab. Die Halbwertszeit von Hap4 13-myc war daher deutlich höher als zwei Stunden. Hap5 13-myc hingegen scheint einen hohen Turnover zu haben, da bereits nach 20 min Chase kein Signal mehr zu detektieren war (Abb. 23), was sich auch in der deutlich schwächeren Signalstärke von Hap5 13-myc gegenüber der von Hap4 13-myc zeigte. Die Halbwertszeit von Hap5 13-myc lag deutlich unter 20 Minuten. Die Disruption von *UBP16* hatte jedoch keinen Einfluss auf die Halbwertszeiten von Hap4 13-myc und Hap5 13-myc (Abb. 23 Spuren 5-10). Die Proteine Hap4 und Hap5 scheinen nicht ubiquitiniert zu sein und ihr Turnover wird durch die Disruption von *UBP16* nicht beeinflusst. Daraus kann geschlossen werden, dass es zwischen Ubp16 und den Proteinen des Hap Komplexes weder direkte noch indirekte Wechselwirkungen gibt.

3.8 Untersuchungen zur Funktion von Ubp16

3.8.1 Einfluss von Ubp16 auf die Mitochondrien-Morphologie

Mit Hilfe des Two-Hybrid Screens konnten keine Interaktionspartner von Ubp16, die Hinweise zur Funktion des Proteins geben könnten, gefunden werden. Aber da Ubp16 an Mitochondrien lokalisiert ist, liegt es nahe, nach Funktionen oder Eigenschaften von Mitochondrien zu suchen, die potentiell durch Ubp16 reguliert werden könnten.

Mitochondrien bilden ein verzweigtes, dreidimensionales Netzwerk in der Zelle. Dieses Netzwerk unterliegt einem ständigen Kreislauf von Teilung und Fusion (Shaw und Nunnari, 2002). Ubiquitinierung könnte eine regulatorische Funktion in diesem Kreislauf ausüben. Daher wurde der Einfluss der *UBP16* Disruption, sowie der Ubp16 Überproduktion auf die Mitochondrien-Morphologie untersucht. Die Mitochondrien lassen sich in der lebenden Hefezelle mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker RedTM anfärben und im Mikroskop beobachten.

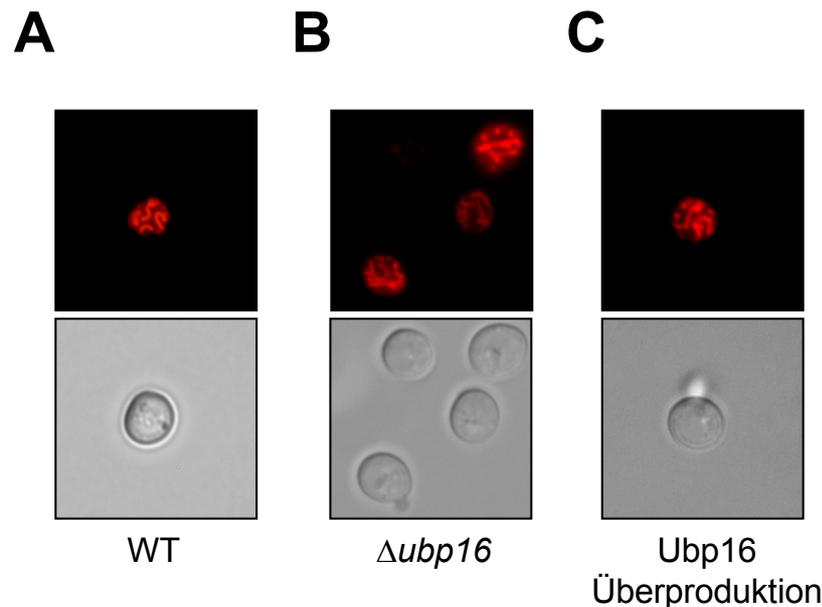


Abb. 24: Untersuchung der Mitochondrien-Morphologie. Die Hefezellen wurden in Medium mit Glycerin/Ethanol als Kohlenstoffquelle angezogen, kurz gewaschen und für 45 min mit 400 nM MitoTracker RedTM gefärbt. Anschließend wurden sie in PBS aufgenommen und mit einem Rhodamin Filtersatz beobachtet. Oben: Fluoreszenzbilder; unten: Phasenkontrastbilder, aufgenommen mit DIC Optic. (A) Wildtyp, JD52, (B) $\Delta ubp16$, RKY1892, (C) 2μ *UBP16*, JD52 transformiert mit pRK808

Weder die Disruption von *UBP16* (Abb. 24 B), noch die Überproduktion des Proteins (Abb. 24 C) hatte Auswirkungen auf die Mitochondrien-Morphologie. Wie im Wildtyp (Abb. 24 A) konnte ein dreidimensionales Netzwerk der Mitochondrien beobachtet werden.

3.8.2 FACS-Analyse der Mitochondrienmenge

Ubp16 scheint auf das Erscheinungsbild der Mitochondrien keinen Einfluss zu haben, aber die Menge der Mitochondrien in einer Zelle lässt sich unter dem Mikroskop kaum bestimmen, da immer nur eine Ebene der Zelle und nicht der dreidimensionale Körper als Ganzes betrachtet werden kann. Die Menge der Mitochondrien in einer Zelle wird an die Wachstumsbedingungen angepasst. Es konnte gezeigt werden, dass Hefezellen, die in Medien mit nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen (wie Glycerin/Ethanol) angezogen werden, mehr und stärker verzweigte Mitochondrien haben, als solche, die in Medien mit fermentierbaren Kohlenstoffquellen (wie Glukose) angezogen werden (Egner, *et al.*, 2002). Daher

sollte untersucht werden, ob Ubp16 an der Regulation der Mitochondrien-Menge in einer Hefezelle beteiligt ist. Die Quantitative Bestimmung der Mitochondrien-Menge in einer einzelnen Zelle erfolgte über das „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS). Die Mitochondrien des Wildtypstammes, des *UBP16* Disruptionsstammes und eines Stammes, der Ubp16 überproduziert, wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker Red™ gefärbt. Im FACS Gerät wurde dann die Fluoreszenzintensität einzelner Zellen gemessen, und die Ergebnisse der Messungen graphisch dargestellt. In den Diagrammen ist die Fluoreszenzsignalstärke gegen die Anzahl der Zellen, die diese Signalstärke gezeigt haben, aufgetragen. Dabei repräsentiert die Stärke des Fluoreszenzsignals die Menge der Mitochondrien in einer Zelle.

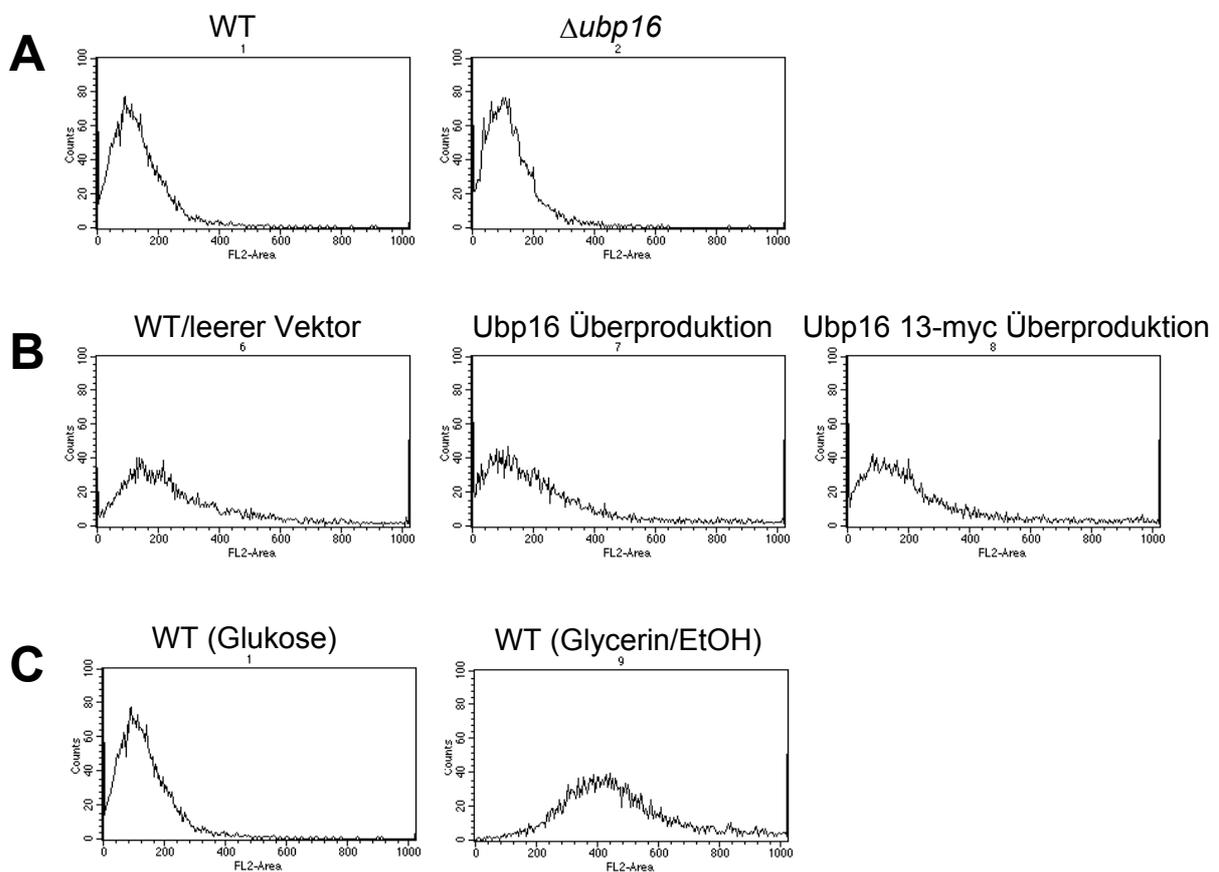


Abb. 25: FACS-Analyse der Mitochondrien-Menge. Die Mitochondrien der Hefestämme wurden mit MitoTracker Red™ gefärbt und das Fluoreszenzsignal im FACS Gerät gemessen. In den Diagrammen ist Fluoreszenzsignalstärke (X-Achse; FL2-Area) gegen die Anzahl der Zellen (Y-Achse, Counts), die diese Signalstärke gezeigt haben, aufgetragen. (A) Die Zellen wurden in Vollmedium mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. Wildtyp (JD52), *Δubp16* (RKY1892). (B) Die Zellen wurden in Selektivmedium mit Glukose als Kohlenstoffquelle angezogen. Der Wildtypstamm JD52 wurde mit dem leeren Vektor pFM2-1, mit pRK808 (2 μ -Ubp16) und mit pRK807 (2 μ -Ubp16 13-myc) transformiert, (C) Der Wildtypstamm JD52 wurde in Vollmedium mit Glukose (links) und Glycerin/Ethanol (rechts) als Kohlenstoffquelle angezogen.

Für die auf Glukose gewachsenen Zellen lag das am häufigsten gemessene Fluoreszenzsignal etwa bei 100 (relative Einheiten) unabhängig davon, ob *UBP16* disruptiert war oder das Protein überproduziert wurde (Abb. 25 A und B). Die in Glukosemedium angezogenen Stämme enthielten alle die gleiche Menge an Mitochondrien. Das zeigt, dass weder Deletion noch Überproduktion von *Ubp16* einen Einfluss auf die Menge der Mitochondrien haben. Als Kontrolle wurden Wildtypzellen in Glucose und in Glycerin/Ethanol haltigem Medium angezogen und per FACS gemessen. Tatsächlich war die am häufigsten gemessene Fluoreszenzstärke der im Glycerin/Ethanol Medium angezogenen Zellen, wie erwartet, mit etwa 400 deutlich höher, als die der in Glukose Medium gewachsenen Zellen, mit einem Signal von etwa 100 (Abb. 25 C). Das zeigt, dass die Sensitivität dieser Methode ausreichend ist, um Veränderungen der Mitochondrien-Menge nachzuweisen. Auch für die in Medien mit Glycerin/Ethanol als Kohlenstoffquelle angezogenen *Ubp16* Deletions und Überproduktionsstämme lag das Fluoreszenzsignal bei etwa 400 (Daten nicht gezeigt). Damit kann ein Einfluss von *Ubp16* auf die Menge der Mitochondrien sowohl bei Wachstum auf fermentierbaren, als auch bei Wachstum auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen, ausgeschlossen werden.

3.8.3 Einfluss von *Ubp16* auf das Wachstum

Werden Zellen auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen angezogen, sind sie gezwungen, die benötigte Energie durch Atmung zu gewinnen. Unter diesen Bedingungen sind aktive Mitochondrien lebenswichtig. Um zu testen, ob entweder die Disruption von *UBP16* oder die Überproduktion des Proteins die Funktion der Mitochondrien beeinflusst, wurden die Hefestämme in Medium mit Glycerin/Ethanol als nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle angezogen. Eine Beeinträchtigung der Atmung sollte sich im Wachstum der Hefezellen auf diesem Medium widerspiegeln. Aber weder Zellen, in denen *Ubp16* überproduziert wurde, noch Zellen, denen das Protein fehlte zeigten Wachstumsdefekte in diesem Medium. Beide Stämme wuchsen mit der gleiche Verdopplungszeit wie der Wildtypstamm. *Ubp16* scheint daher für den Prozess der Atmung selbst nicht von Bedeutung zu sein.

Wenn Ubiquitinierung und Deubiquitinierung regulatorische Funktionen haben, sind sie möglicherweise weniger wichtig für dauerhaft ablaufende Prozesse, sondern eher

dann, wenn die Zelle auf Einflüsse von außen reagieren und sich auf neue Prozesse und Abläufe umstellen muss. Daher sollte getestet werden ob Ubp16 wichtig für das Umschalten von der Verwertung einer fermentierbaren zur Verwertung einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle ist. Die Hefezellen wurden erst in glukose-haltigem Medium angezogen und dann in Medium mit nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle (Glycerin/Ethanol) umgesetzt. Aber auch bei der Überführung aus glukose-haltigem Medium in Glycerin/Ethanol Medium zeigten der *UBP16* Disruptionsstamm, wie auch der Ubp16 Überproduktionsstamm ein dem Wildtypstamm vergleichbares Wachstum. Ubp16 wird daher ebenfalls nicht beim Übergang vom fermentativen Wachstum zum Wachstum durch Atmung benötigt.

3.8.4 Untersuchung der Mitochondrien-Vererbung

Mitochondrien werden von der Mutterzelle an die Tochterzelle weitergegeben. Es gibt Hinweise, dass Ubiquitinierung für die Vererbung von Mitochondrien wichtig ist. Eine Mutation in der Ubiquitin Ligase *Rsp5* führt zu Defekten in der Mitochondrien-Vererbung. Dieser Defekt beruht vermutlich auf einer mangelnden Ubiquitinierung von Proteinen, die an der Vererbung der Mitochondrien beteiligt sind (Fisk und Yaffe, 1999). Wenn Ubp16 nun seinerseits diese Proteine deubiquitiniert, kann die mangelnde Ubiquitinierung vielleicht durch Ausschalten der deubiquitiniierenden Aktivität von Ubp16 ausgeglichen werden. Das würde bedeuten, dass die Disruption von *UBP16* in dem Stamm mit der *rsp5* Mutation, den Vererbungsdefekt supprimieren könnte. Diese Annahme sollte mit Hilfe einer *rsp5-1 Δubp16* Doppelmutante überprüft werden.

Um sicherzustellen, dass die *rsp5-1* Stämme tatsächlich die gewünschte Mutation trugen, wurde eine *RSP5* Wildtypkopie auf einem Plasmid in diese Stämme transformiert. Hefestämme, die das *rsp5-1* Allel tragen sind temperatursensitiv. Das heißt, diese Zellen können bei Temperaturen ab 37°C nicht mehr wachsen. Wenn die Hefestämme die gewünschte Mutation in *RSP5* tragen, sollte die Wildtypkopie auf dem Plasmid die Temperatursensitivität supprimieren und das Wachstum bei 37°C ermöglichen. Tatsächlich konnte sowohl die transformierte *rsp5-1* Einzelmutante, wie auch die transformierte Doppelmutante (*rsp5-1 Δubp16*) bei 37°C wachsen, während die untransformierten Mutanten kein Wachstum bei 37°C zeigten (Daten nicht

gezeigt). Die Stämme, mit denen gearbeitet wurde, tragen die gewünschte Mutation in *RSP5*.

In der Einzel- und Doppelmutante wurde dann die Morphologie und die Vererbung der Mitochondrien untersucht. Die Zellen wurden bei 25°C angezogen und dann für 2h auf die nicht permissive Temperatur für *rsp5-1*, auf 37°C überführt. Es wurden aber auch Experimente mit 4 h Inkubationszeit bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurden die Mitochondrien mit dem Fluoreszenzfarbstoff MitoTracker RedTM gefärbt und mit einem Rhodamin Filter unter dem Mikroskop beobachtet (Daten nicht gezeigt). Alle Zellen zeigten eine normale Mitochondrien-Morphologie. Lediglich die Färbung der Mitochondrien in den Zellen mit der *rsp5-1* Einzelmutation erschien schwächer, als die der Mitochondrien des Wildtypstammes und der Doppelmutante. Vererbungsdefekte konnten in keinem der untersuchten Stämme gefunden werden, auch nicht in der *rsp5-1* Einzelmutante. Die Mitochondrien zeigten das normale Netzwerk in der Zelle und nur sehr selten konnten Knospen ohne Mitochondrien gefunden werden. Im Gegensatz zu den publizierten Daten konnte kein Vererbungsdefekt beobachtet werden. Das könnte daran liegen, dass der Vererbungsdefekt von *rsp5* möglicherweise allelspezifisch oder abhängig vom Stammhintergrund ist. Daher konnte die Frage nach der Suppression des Vererbungsdefektes der *rsp5* Mutation durch die Disruption von *UBP16* nicht geklärt werden.

3.8.5 Transport von Phosphatidylserin zu den Mitochondrien

Erst vor kurzem wurde herausgefunden, dass der Transport von Phosphatidylserin (PtdSer) zu den Mitochondrien durch Ubiquitinierung reguliert wird (Schumacher, *et al.*, 2002). Der Transport von PtdSer an die Mitochondrien wird vermutlich durch das F-box Protein Met30 reguliert (Schumacher, *et al.*, 2002). Met30 ist Teil eines SCF Komplexes und ausschlaggebend für die Substratspezifität (Patton, *et al.*, 1998b). Fehlt das Protein, kommt es vermutlich zu einer zu geringen Ubiquitinierung eines Transportproteins, so dass PtdSer nicht mehr korrekt an die Mitochondrien transportiert wird und somit nicht mehr in die Mitochondrien aufgenommen werden kann. In den Mitochondrien wird PtdSer durch das Enzym Phosphatidylserin Decarboxylase 1 (Psd1) in der inneren Mitochondrien-Membran zu Phosphatidylethanolamin (PtdEtn) umgesetzt. Zusätzlich kann PtdSer auch in der

Vakuole durch die Phosphatidylserin Decarboxylase 2 (Psd2) zu PtdEtn umgesetzt werden. PtdEtn ist essentiell für das Wachstum von Hefezellen. In $\Delta psd2$ Stämmen wird die PtdEtn Synthese in Mitochondrien, bei Wachstum auf Medium ohne zusätzliche PtdEtn Quelle, lebenswichtig. Fehlt den $\Delta psd2$ Stämmen zusätzlich die Met30 Funktion, ist der Transport von PtdSer zu den Mitochondrien blockiert und die Zellen können ohne PtdEtn aus dem Medium nicht mehr wachsen. Wenn Ubp16 nun spezifisch das Substrat von Met30 deubiquitiniert, sollten sowohl die Deletion von Met30, wie auch die Überproduktion von Ubp16, denselben Phänotyp haben. In beiden Fällen sollte das Substratprotein, welches für den PtdSer Transport nötig ist, nicht ausreichend ubiquitiniert sein.

Ist das der Fall, sollte die Überproduktion von Ubp16 im *PSD2* Disruptionsstamm das gleiche Wachstumsdefekte auf PtdEtn-freiem Medium zeigen, wie die Doppelmutante $\Delta psd2$, $\Delta met30$. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde der *PSD2* Disruptionsstamm mit einem *UBP16* Überproduktionsplasmid transformiert und auf PtdEtn freiem Medium angezogen. Als Kontrollen dienten der Wildtypstamm, transformiert mit dem Überexpressionsplasmid und dem leeren Vektor sowie der *PSD2* Disruptionsstamm, transformiert mit dem leeren Vektor.

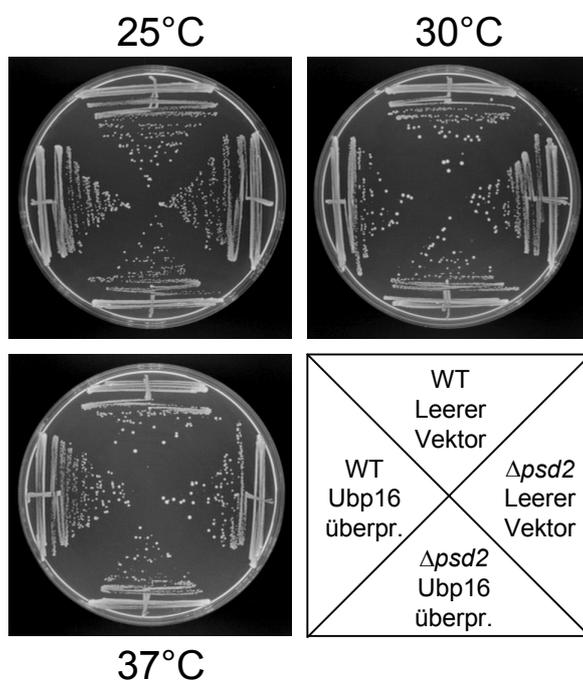


Abb. 26: Wachstum auf PtdEtn freiem Medium. Der $\Delta psd2$ Stamm wurde mit dem Ubp16 Überexpressionsplasmid pRK808 transformiert. Als Kontrolle wurden der BY-Wildtypstamm, der $\Delta psd2$ Stamm mit dem leeren Plasmid und der Wildtyp ebenfalls mit pRK808 transformiert. Die Stämme wurden auf Agarplatten ohne PtdEtn im Medium ausgestrichen und bei 25°C, 30°C und 37°C für 3 Tage inkubiert.

Alle Stämme (Abbildung 26) zeigten bei drei verschiedenen Temperaturen ein vergleichbares Wachstum. Ubp16 scheint demnach keinen Einfluss auf den Transport von PtdSer in die Mitochondrien zu haben.

3.9 Nachweis spezifischer Substrate für Ubp16

Proteine, die spezifisch durch Ubp16 deubiquitiniert werden, sollten im *UBP16* Disruptionsstamm hyperubiquitiniert vorliegen. Im Gesamt-Zellextrakt des $\Delta ubp16$ Stammes konnten allerdings keine spezifischen Substrate für Ubp16 nachgewiesen werden (Abbildung 8). Möglicherweise befinden sich in der Zelle nur wenige Kopien der Substrat-Proteine von Ubp16, so dass sie durch den zellulären Hintergrund der ubiquitinierten Proteine überdeckt werden. Potentielle Substrate von Ubp16 sind möglicherweise, wie das Protein selbst, an Mitochondrien lokalisiert. Daher wurden Mitochondrien aus dem Wildtypstamm und dem $\Delta ubp16$ Stamm aufgereinigt, um so ohne den zellulären Hintergrund Substrate von Ubp16 identifizieren zu können.

Die Mitochondrien wurden erst grob durch differentielle Zentrifugation von anderen Zellorganellen und dem Zytoplasma abgetrennt und anschließend in einem Sucrose-Gradienten weiter aufgereinigt.

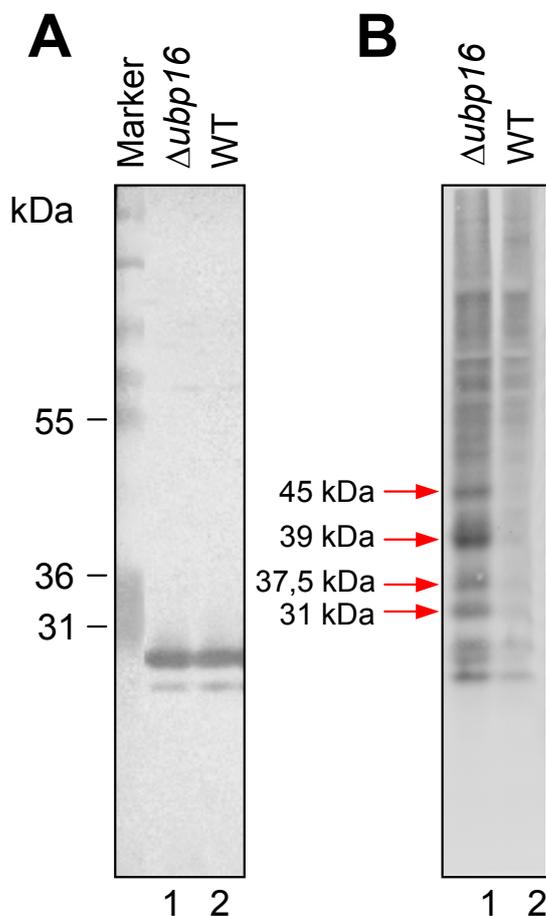


Abb. 27: Nachweis ubiquitinierten Proteine in einer Mitochondrien-Präparation. Die Proteinkonzentration der aufgereinigten Mitochondrien-Fractionen wurde bestimmt und es wurden jeweils vergleichbare Mengen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. (Spur2) Mitochondrien Fraktion des Wildtypstammes (JD52), (Spur1) Mitochondrien Fraktion des $\Delta ubp16$ Stammes (RKY1892). (A) Nachweis der Mitochondrien im Western-Blot durch Antikörper gegen Porin (B) Nachweis der ubiquitinierten Proteine im Western-Blot durch Antikörper gegen Ubiquitin.

In der Fraktion der aufgereinigten Mitochondrien, aus dem *UBP16* Disruptionsstamm, konnten in der Tat ubiquitinierte Proteine detektiert werden, die in der Präparation der Mitochondrien aus dem Wildtypstamm nicht vorhanden waren (Abb. 27 B). Die Porin-Kontrolle zeigt, dass in etwa gleiche Mengen an aufgereinigten Mitochondrien untersucht wurden (Abb. 27 A). Damit ist es zum ersten Mal gelungen, mögliche Substrate von Ubp16 nachzuweisen. Die vier stärksten Banden (45; 39; 37,5; 31 kDa), die sich in der Präparation aus dem Wildtypstamm kaum nachweisen ließen, wurden mit einem Pfeil markiert. Zwischen den Banden bei etwa 45 und 37,5 kDa sowie zwischen 39 und 31 kDa liegt ein Größenabstand von etwa 8 kDa, was der Größe von Ubiquitin entspricht. Daher handelt es sich vermutlich um zwei Proteine, die verschieden stark ubiquitiniert sind. In dem Bereich um etwa 25 kDa ließen sich in beiden Präparationen Banden nachweisen, die aber in der Präparation der Mitochondrien aus dem Disruptionsstamm deutlich stärker waren. Möglicherweise handelt es sich bei diesen Banden, mit etwa 23 und 29 kDa, um die monoubiquitinierten Formen der potentiellen Substrate von Ubp16. Es ist vorstellbar, dass die monoubiquitinierten Formen durchaus auch im Wildtyp auftreten, während die stärker ubiquitinierten Formen nur dann sichtbar werden, wenn die deubiquitinierende Aktivität von Ubp16 ausfällt. In dem Fall hätten die beiden potentiellen Substrate von Ubp16 in etwa eine Größe von 16 und 21,5 kDa.

Die Fraktion der aufgereinigten Mitochondrien enthielt deutliche Kontaminationen von Plasmamembran, Endosomen, Vakuole und Endoplasmatischem Retikulum (ER) (Abb. 28). Daher wurde versucht, die Qualität der Aufreinigung durch Modifikationen des Protokolls zu erhöhen. Die kontaminationsfreie Aufreinigung der Mitochondrien erwies sich jedoch als schwierig. In einer Reihe von Präparationen gelang es nicht, die Mitochondrien sauber von weiteren membranumschlossenen Zellorganellen zu trennen.

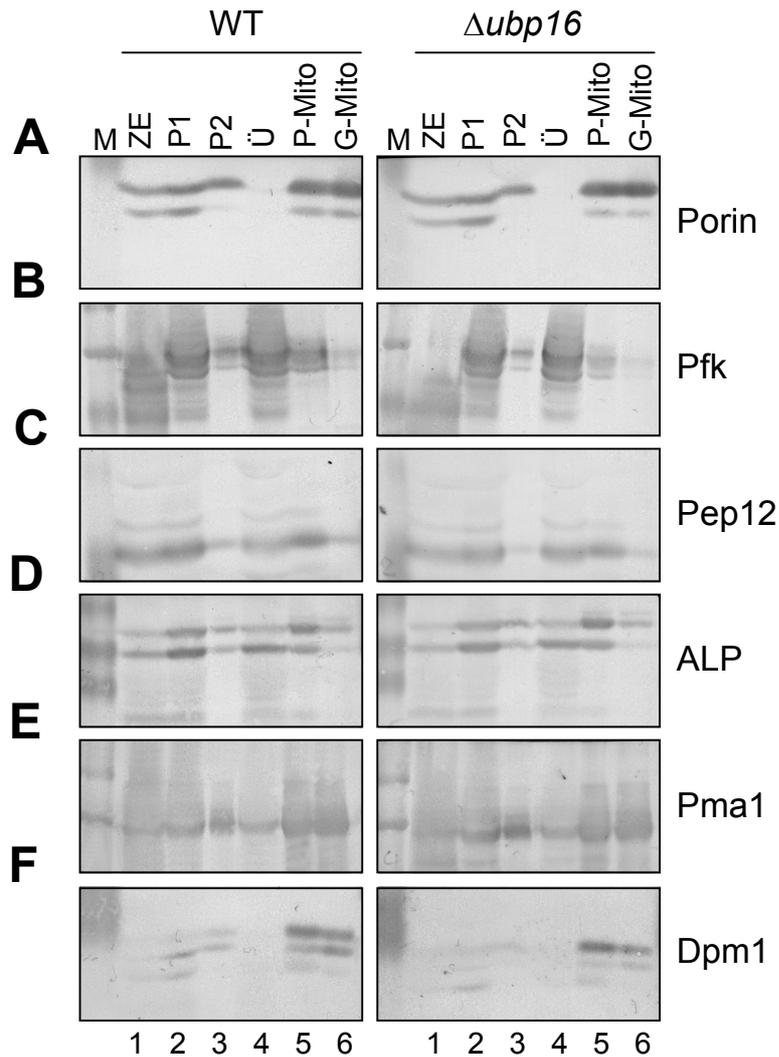


Abb. 28: Qualität der Mitochondrien Präparation. Mitochondrien aus Zellextrakte des Wildtypstammes (JD52, linke Reihe) und des $\Delta ubp16$ Stammes (RKY1892, rechte Reihe) wurden zunächst durch differentielle Zentrifugation (Spuren 1-5) und anschließend im Sucrose-Gradienten aufgereinigt (Spur 6). Von den einzelnen Aufreinigungs-Schritten wurden Proben entnommen, um die Präparation zu dokumentieren. Spur 1: Zellextrakt (ZE); Spur 2: Pellet nach erster Zentrifugation (P1); Spur 3: Pellet nach zweiten Zentrifugations-Schritt (P2); Spur 4: Überstand nach Abzentrifugation der Mitochondrien (Ü); Spur 5: Mitochondrien-Pellet (P-Mito); Spur 6: Mitochondrien-Fraktion nach der Reinigung im Gradienten (G-Mito). Mittels SDS-PAGE und Western-Analysen wurden die Fraktionen auf die Anwesenheit von Marker-Proteinen hin untersucht. Eingesetzt wurden spezifische Antikörper gegen (A) Porin (Mitochondrien), (B) die Phosphofruktokinase, Pfk (lösliche Proteine), (C) Pep12 (Endosomen), (D) die Alkalische Phosphatase, Alp (Vakuole), (E) die Plasmamembran ATPase Pma1 und (F) gegen die Dolicholphosphat Transferase, Dpm1 (ER).

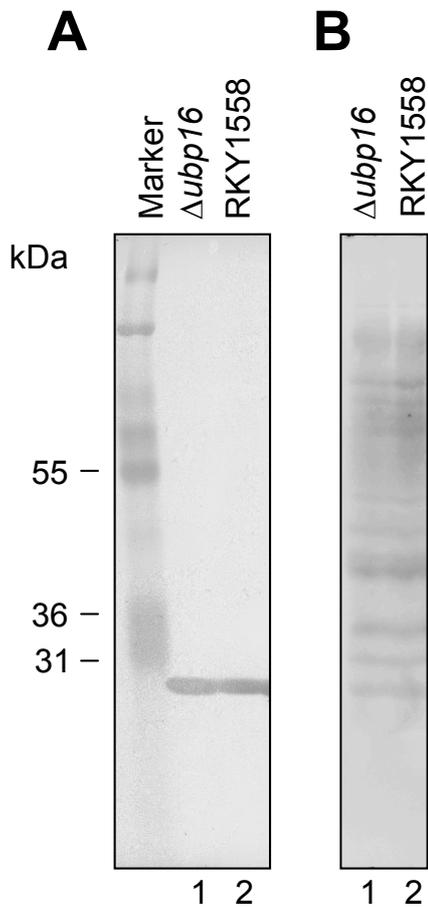


Abb. 29: Nachweis ubiquitiniertes Proteine in einer weiteren Mitochondrien-Präparation. Die Proteinkonzentration der aufgereinigten Mitochondrien-Fractionen wurde bestimmt und es wurden jeweils vergleichbare Mengen mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Mitochondrien des Wildtystammes (Spur 2), Mitochondrien des $\Delta ubp16$ Stammes (Spur 1). (A) Nachweis der Mitochondrien im Western-Blot durch Antikörper gegen Porin (B) Nachweis der ubiquitinierten Proteine im Western-Blot durch Antikörper gegen Ubiquitin.

Zudem konnten die potentiellen Ubp16-Substrate nicht in allen Präparationen nachgewiesen werden (Abbildung 29), was darauf hindeutet, dass sie nicht direkt an Mitochondrien lokalisiert sind. Möglicherweise sind die potentiellen Substrate an Strukturen lokalisiert, die nur unter bestimmten Bedingungen mit Mitochondrien assoziiert sind, so dass sie nicht in allen Mitochondrien-Präparationen mit aufgereinigt wurden.

4 DISKUSSION

4.1 Charakterisierung der *UBP* Disruptionsmutanten

Als Ausgangspunkt dieser Arbeit wurde das Wachstum der 16 *UBP* Disruptionsmutanten auf Medien mit verschiedenen Zusätzen untersucht, um spezifische Phänotypen für die einzelnen Disruptionen zu identifizieren. Dabei zeigten fast alle Mutanten ein normales Wachstum unter den getesteten Bedingungen. Der *UBP4* Disruptionsstamm war der einzige, der mehrere eindeutige Wachstumsdefekte zeigte. Der Disruptionsstamm wuchs nur schlecht auf Medien mit alternativen Kohlenstoffquellen, wie Raffinose und Saccharose und wuchs gar nicht auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen oder bei Stress durch hohe Salzkonzentrationen oder Hungerbedingungen. Die Zellen, denen Ubp4/Doa4 fehlt, können ihren Stoffwechsel scheinbar nur schwer auf alternative Kohlenstoffquellen umstellen und haben offensichtlich generelle Defekte bei der Stressantwort. Für die *UBP4* Disruption wurden bereits pleiotrophe Defekte auch bei der Antwort auf Stress beschrieben (Papa und Hochstrasser, 1993), die durch die erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden. Diese unterschiedlichen Phänotypen der *UBP4* Disruption können zwei Ursachen haben, entweder ist Ubp4 an den verschiedenen Prozessen direkt beteiligt, oder es handelt sich um eine indirekte Wirkung, die durch den eigentlichen Defekt der *UBP4* Disruption ausgelöst wird.

Es konnte gezeigt werden, dass der Spiegel an freiem Ubiquitin in der *UBP4* Mutante reduziert und die Proteolyse insgesamt beeinträchtigt ist (Swaminathan, *et al.*, 1999). Das lässt vermuten, dass die $\Delta ubp4$ Phänotypen indirekt durch das Fehlen freien Ubiquitins verursacht werden. In der $\Delta ubp4$ Mutante können offenbar ubiquitinabhängige Prozesse, wie die Stressantwort, aufgrund unzureichender Ubiquitinierung nicht normal ablaufen.

Diese Annahme wurde durch die Verteilung der ubiquitinierten Proteine in den Zellextrakten der Disruptionsmutanten bestätigt. Es konnten keine Ubiquitinkonjugate im Extrakt des *UBP4* Disruptionsstammes nachgewiesen werden. Die Abnahme der Ubiquitinkonjugate war im *UBP4* Disruptionsstamm am deutlichsten, aber auch im *UBP6* und *UBP9* Disruptionsstamm wurde im Western-Blot ein insgesamt schwächeres Signal als im Wildtypstamm beobachtet. In $\Delta ubp6$ und $\Delta ubp9$ scheint daher die Menge der Ubiquitinkonjugate ebenfalls reduziert zu sein, wenn auch nicht

so deutlich wie in $\Delta ubp4$, was möglicherweise auch auf eine Reduktion des Spiegels an freiem Ubiquitin zurückgeführt werden könnte. Diese Reduktion der Ubiquitinkonjugate konnte für $\Delta ubp6$ in den Glukose-Extrakten und den Glycerin/Ethanol-Extrakten beobachtet werden, während das Signal des $\Delta ubp9$ Stammes in den Glycerin/Ethanol-Extrakten die gleiche Intensität wie das Wildtyp-Signal zeigte. Ubp9 wird daher möglicherweise hauptsächlich dann gebraucht, wenn die Hefezellen auf glukose-haltigem Medium wachsen, während Ubp6 eine generellere Funktion zu haben scheint. Der stärkste Einfluss auf die Ubiquitinkonjugation und damit die wichtigste Funktion für den Ubiquitin-Haushalt scheint aber bei Ubp4 zu liegen.

Von Ubp4 wurde eine Interaktion mit dem Proteasom nachgewiesen (Papa, *et al.*, 1999). Damit scheint eine wichtige Funktion des deubiquitinierenden Enzyms das Abtrennen der Ubiquitinketten von den Substraten des Proteasoms vor der Degradation zu sein. In der Disruptionsmutante werden die Ubiquitinketten vermutlich mit abgebaut, was die Ursache für den reduzierten Spiegel an freiem Ubiquitin sein könnte. Auch für Ubp6 wurde eine Interaktion mit dem Proteasom nachgewiesen (Verma, *et al.*, 2000). Ubp6 scheint ebenfalls Ubiquitinketten vor dem Abbau der Proteine durch das Proteasom abzutrennen, wobei Ubp4 vermutlich das wichtigere der beiden Enzyme ist.

Eine Reduktion der gesamten Ubiquitinkonjugate in der Zelle wurde bei keiner weiteren *UBP* Disruptionsmutante beobachtet. Daher kann ein genereller Einfluss dieser Ubps auf den Ubiquitin-Haushalt ausgeschlossen werden. In den Zellextrakten von $\Delta ubp3$ und $\Delta ubp14$ konnten im Western-Blot mit Ubiquitin-Antikörpern spezifische Signale nachgewiesen werden, die vermutlich hyperubiquitinierte Proteine repräsentieren. Bei den gefundenen Proteinen könnte es sich daher um spezifische Substrate der Ubps handeln. In den Extrakten des *UBP14* Disruptionsstammes wurden ubiquitinierte Banden von etwa 8, 17 und 24 kDa durch den Ubiquitinantikörper nachgewiesen. Von der Arbeitsgruppe um Hochstrasser konnte gezeigt werden, dass Ubp14 freie Ubiquitinketten schneidet (Amerik, *et al.*, 1997). Die Größe der gefundenen Banden entspricht in etwa der von Mono-, Di- und Triubiquitin, so dass es sich bei den gefundenen Banden wahrscheinlich um freie Ubiquitinketten handelt. In dem $\Delta ubp3$ Extrakt wurden Banden von 35, 41, 46 und 50 kDa gefunden. Es gibt Hinweise, dass Ubp3 wichtig für das „Silencing“ von

Chromatin ist (Moazed und Johnson, 1996). Möglicherweise sind die detektierten Proteine an der Silencing-Reaktion beteiligt und werden durch Ubp3 deubiquitiniert. Auch Untersuchungen von Ubp10 zeigen, dass das Ubp möglicherweise eine Funktion beim „Silencing“ hat (Kahana und Gottschling, 1999). Die Verteilung der ubiquitinierten Proteine im Zellextrakt unterschied sich aber deutlich von der in den $\Delta ubp3$ Extrakten. In den Glukose-Extrakten von $\Delta ubp10$ wurden verstärkt Ubiquitinkonjugate nachgewiesen, während in den Glycerin/Ethanol-Extrakten deutlich weniger Konjugate zu finden waren. Neben der Funktion beim Silencing wurde für Ubp10 auch eine regulatorische Funktion bei der Aufnahme von Nährstoffen postuliert (Kahana, 2001). Möglicherweise kann die Aktivität von Ubp10 an die jeweiligen Nährstoffbedingungen der Zelle angepasst werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es neben einer generellen Funktion von Ubps bei der Aufrechterhaltung des Ubiquitin-Haushaltes auch spezifische Funktionen zu geben scheint.

Die Disruptionen von *UBP1*, -2, -5, -7, -8, -11, -12, -13, -15 und *UBP16* zeigten keine Wachstumsdefekte oder Veränderungen der ubiquitinierten Proteine im Zellextrakt. Diese Ubps haben scheinbar keine essentielle Funktion für die Aufrechterhaltung des Ubiquitinspiegels in der Zelle. Entweder ist die Funktion dieser Ubps redundant, so dass sie sich gegenseitig ersetzen können, oder sie haben eine sehr spezifische Funktion in der Zelle, die über die Standard-Untersuchungen nicht nachgewiesen werden können.

4.2 Identifizierung membranassoziierter Ubp's

In dieser Arbeit wurde nach Ubps gesucht, die spezifisch an ubiquitinabhängigen Prozessen beim Membran-Transport beteiligt sind. Von solchen Ubps würde man erwarten, dass diese Proteine zumindest zum Teil an Membranen gebunden vorliegen. Daher wurde mit Hilfe von Membran-Floatations-Experimenten nach potentiellen membranassozierten Ubps gesucht.

Um die Proteine im Western-Blot nachweisen zu können, wurden alle Ubps mit einem 13myc Epitop markiert. Bis auf Ubp13 konnten alle Ubps erfolgreich markiert werden. Ubp13 wurde daher nicht weiter berücksichtigt. Die meisten Ubps zeigten in

den Experimenten nur einen geringen Anteil in der Float-Fraktion, die hauptsächlich die membranassoziierten Proteine enthält. Aber auch das lösliche Protein, Phosphofruktokinase, zeigte einen geringen Proteinanteil (etwa 10%) in der Membran-Fraktion. Daher ist es fraglich, ob es sich bei Anteilen um 10% in der Membran-Fraktion um echte Membran-Assoziation handelt. Andere Ubps hingegen zeigten einen signifikanten Anteil in der Membran-Fraktion. Dazu gehört Ubp4/Doa4 mit 37% des Proteins in der Membran-Fraktion. Es gibt Hinweise, dass Ubp4 eine Funktion an späten Endosomen im Zusammenhang mit der Bildung von sogenannten „Multi Vesicular Bodies“ (MVBs) hat (Amerik, *et al.*, 2000b). Welche Rolle Ubp4 dabei genau spielt ist aber noch unklar. Bisher konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die Ubiquitinierung vermutlich das Signal für die Aufnahme von Membran-Proteinen in die MVBs ist (Losko, *et al.*, 2001, Reggiori und Pelham, 2001, Katzmann, *et al.*, 2001). Bei fehlender Ubiquitinierung werden die Proteine nicht in die MVBs verpackt und werden anstatt in das Vakuolen-Lumen, an die Vakuolen-Membran transportiert. Auch in der *ubp4* Mutante wurden Membranproteine, die über den MVB-Weg transportiert werden, an die Vakuolen-Membran fehlgeleitet, wo sie nicht abgebaut werden können (Losko, *et al.*, 2001, Reggiori und Pelham, 2001). Ob das Fehlleiten der Proteine in der *ubp4* Mutante indirekt ist und auf den reduzierten Ubiquitinspiegel und die damit verbundene reduzierte Ubiquitinierung in der Mutante zurückgeführt werden kann, ist noch nicht eindeutig geklärt. Untersuchungen weisen auf eine Funktion von Ubp4 an späten Endosomen hin. Vermutlich deubiquitiniert das Enzym Proteine des MVB Weges, bevor diese in die Vesikel verpackt werden (Amerik, *et al.*, 2000a). Eine direkte Assoziation von Ubp4 mit Endosomen konnte bisher nur in einer *vps4* Mutante, in der die Fusion des Endosoms mit der Vakuole blockiert ist, nachgewiesen werden (Raymond, *et al.*, 1992). In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass auch unter normalen Bedingungen ein Großteil von Ubp4 mit Membranen assoziiert ist. Die Identität dieser Membranen konnte zwar nicht aufgeklärt werden, aber es spricht einiges dafür, dass es sich um endosomale Membranen handelt.

Neben Ubp4/Doa4 wurden auch von Ubp9 und Ubp11 deutliche Proteinanteile in der Membran-Fraktion gefunden. Über die Funktion dieser Ubps ist aber bisher noch nichts bekannt. Die Identifizierung der Membranen, an denen diese Ubps lokalisiert sind, könnte daher Hinweise auf eine mögliche Funktion liefern.

Des Weiteren ist Ubp1 in den Membran-Floatations-Experimenten aufgefallen. Das Western-Blot Signal von Ubp1 zeigte zwei Banden. Dies lässt vermuten, dass Ubp1 modifiziert wird. Die modifizierte Bande, mit höherem Molekulargewicht, wurde ausschließlich in der Membran-Fraktion nachgewiesen, während die nicht modifizierte Bande, mit geringerem Molekulargewicht, die gleiche Verteilung wie ein lösliches Protein zeigte. Nach Auflösen der Membranen durch Triton X-100 waren beide Formen von Ubp1 gleichmäßig, hauptsächlich in der löslichen Fraktion verteilt. Das bedeutet, dass eine modifizierte Form von Ubp1 mit Membranen assoziiert ist. Bei dieser Modifikation könnte es sich um Phosphorylierung handeln. Eine Arbeitsgruppe die phosphorylierte Peptide aus Hefezellen im Massenspektrometer untersucht hat, konnte phosphorylierte Fragmente von Ubp1 identifizieren (Ficarro, *et al.*, 2002). Ein Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung und der Ubiquitinierung konnte bereits für eine große Zahl von Proteinen nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung von Oberflächen-Rezeptoren ist mit der Ubiquitinierung und dem Abbau dieser Proteine korreliert und die Ubiquitinierung z. B. von Zyklinen und Zyklin-Kinase-Inhibitoren wird durch Phosphorylierung reguliert (Wilkinson, 2000). Im Fall von Ubp1 scheint eine Modifikation die Membran-Assoziation des Enzyms und damit möglicherweise die Lokalisation der deubiquitinierenden Aktivität regulieren zu können.

4.3 Lokalisation von Ubp16

Von allen untersuchten Ubps war Ubp16 das einzige, welches vollständig an Membranen gebunden war. Daher sollte Ubp16 in dieser Arbeit weiter charakterisiert werden. Zunächst stellte sich die Frage nach der Lokalisation des Proteins. Durch mehrere, voneinander unabhängigen Experimenten, konnte gezeigt werden, dass Ubp16 an Mitochondrien lokalisiert ist. So zeigte Ubp16 bei der Fraktionierung im Sucrose-Dichtegradienten die gleiche Verteilung wie das Marker-Protein der äußeren Mitochondrien-Membran, Porin. Des Weiteren konnte die Lokalisation an Mitochondrien durch Immunfluoreszenz Experimente, in denen das Signal für Ubp16 13-myc mit dem der mitochondrialen DNA kolokalisierte und durch eine GFP-markierte Variante von Ubp16, die eine gleiche Verteilung wie die angefärbten Mitochondrien in der Zelle zeigte, bestätigt werden. Mitochondrien haben eine innere

und eine äußere Membran, die verschiedene Subkompartimente des Organells voneinander abgrenzen. Die submitochondriale Lokalisation von Ubp16 sollte daher durch Protease-Schutzexperimente aufgeklärt werden. Proteinase K, die zu intakten Mitochondrien in Zellextrakten gegeben wurde, war in der Lage Ubp16 abzuverdauen. Da das Protein zugänglich für die Protease war, lässt sich schließen, dass Ubp16 an der äußeren Mitochondrien-Membran lokalisiert ist. Offenbar ist Ubp16 durch seinen hydrophobe Sequenz am N-terminus in der Membran verankert, wobei der größte Teil des Proteins ins Zytoplasma ragt. Um diese Annahme zu prüfen, wurde in der YPD Datenbank (Costanzo, *et al.*, 2001) nach mitochondrialen Proteinen gesucht, die eine ähnliche N-terminale Sequenz wie Ubp16 haben und ebenfalls in der Membran verankert sind.

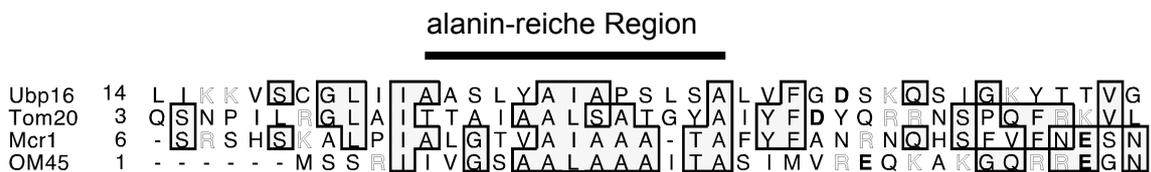


Abb. 30: Sequenzvergleich der N-terminalen Region, in der äußeren Mitochondrien-Membran inserierter Proteine. Aminosäuren, die in mindestens zwei Sequenzen vorkommen, sind in Kästchen gefasst. Basische Aminosäuren sind grahm dargestellt, saure Aminosäuren sind fett gedruckt. Die alanin-reiche Region wurde durch einen Balken gekennzeichnet.

Es wurden drei Proteine (Tom20, Mcr1, OM45) mit einer N-terminalen Region, ähnlich der von Ubp16, gefunden (Abbildung 30). Der potentielle Membrananker am N-terminus besteht aus einem alanin-reichen-Bereich von 18-20 Aminosäuren. Dieser Bereich wird von Aminosäuren, mit einer in der Summe positiven Ladung, flankiert. Es gibt aber auch Proteine in der äußeren Mitochondrien-Membran, wie Tom70, Ptc7, und Slc1, die keinen solchen alanin-reichen-Bereich haben. Das legt die Vermutung nahe, dass die gefundenen Proteine zu einer eigenen Klasse von Proteinen in der äußeren Mitochondrien-Membran gehören und über den gleichen Mechanismus in die Membran inseriert werden.

Die Insertion von Tom 20 in die äußere Mitochondrien-Membran wurde bereits detailliert untersucht (Kanaji, *et al.*, 2000). Das N-terminale Signal von Tom 20 besteht aus einer relativ schwach hydrophoben Transmembrandomäne, an die sich eine Region aus fünf geladenen Resten mit positiver Nettoladung anschließt. Beide Bereiche sind wichtig für das Targeting an Mitochondrien. Fehlen die positiv

geladenen Reste, wird das Protein in das Endoplasmatische Retikulum (ER)/Golgi Kompartiment fehlgeleitet. Die positive Ladung scheint eine SRP- (Signal recognition particle) abhängige ER Lokalisation zu verhindern. Kanaji et al. definieren das Lokalisationssignal für die äußere Mitochondrien-Membran über die positive Ladung und eine schwach hydrophobe Transmembrandomäne. Bei der alanin-reichen-Region in den vier Sequenzen des Sequenzvergleiches handelt es sich um einen schwach hydrophoben Bereich. Alanin ist unter den hydrophoben Aminosäuren, die mit der geringsten Hydrophobizität. Der N-terminus von Ubp16 scheint daher tatsächlich Lokalisationssignal und Transmembrananker zu sein.

Auch für Mcr1, die NADH-Cytochrom b_5 Reduktase der Hefe gibt es genauere Informationen über die Insertion in die äußere Mitochondrienmembran (Haucke, et al., 1997). Mcr1 wird von einem Gen im Zellkern kodiert und zu zwei verschiedenen Kompartimenten im Mitochondrium transportiert, zum einen in den Intermembran-Raum und zum anderen an die äußere Membran. Der größtenteils hydrophobe N-Terminus ist das Lokalisationssignal, sowohl für die äußere Membran als auch für den Intermembran-Raum. Vergleicht man nun die Signalsequenzen der in Abbildung 30 gezeigten Proteine fällt auf, dass Ubp16, Tom20 und OM45 einen sauren Rest direkt C-terminal der alanin-reichen-Region aufweisen. Dieser saure Rest fehlt bei Mcr1. Möglicherweise schützt genau dieser Rest die Proteine vor einer vollständigen Translokation in den Intermembranraum der Mitochondrien.

4.4 Suche nach einer Funktion von Ubp16

Die Disruption von *UBP16* zeigte keinerlei Wachstumsdefekte und ebenso kein verändertes Muster ubiquitiniertes Proteine im Zellextrakt. Wenn zelluläre Prozesse durch die deubiquitinierende Wirkung von Ubp16 reguliert werden, so scheint es sich um sehr spezifische Funktionen zu handeln. Ubp16 ist an Mitochondrien lokalisiert. Daher betrifft eine mögliche regulatorische Funktion wahrscheinlich Prozesse, die in Verbindung mit Mitochondrien stehen. Aus diesem Grund wurden verschiedene Aspekte der Mitochondrien-Funktion auf eine Beteiligung von Ubp16 untersucht.

Eine zentrale Funktion der Mitochondrien ist die Respiration, der aerobe Abbau von Kohlenstoffquellen. Dieser Prozess scheint jedoch unabhängig von Ubp16 abzulaufen, da sowohl der Ubp16 Deletionsstamm als auch der

Überproduktionsstamm auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wachsen konnten. Die Funktion der Ubiquitinierung ist vielleicht für permanent ablaufende Prozesse in der Zelle, wie die Verwertung einer vorhandenen Kohlenstoffquelle, nicht von Bedeutung. Wichtiger scheint die Ubiquitinierung zu sein, wenn die Zelle laufende Prozesse umstellen muss, um auf veränderte Einflüsse von außen, wie Stress oder den Wechsel der Kohlenstoffquellen, zu reagieren.

Daher wurde auch eine mögliche Funktion von Ubp16 bei der Umstellung des Stoffwechsels von der Energiegewinnung durch Gärung zur Energiegewinnung durch die Respiration untersucht. Aber auch hier konnte ein Einfluss durch Deletion oder Überproduktion des Proteins ausgeschlossen werden.

Die Mitochondrien sind dynamische Strukturen in der Zelle, die einem ständigen Kreislauf von Teilung und Fusion unterliegen (Shaw und Nunnari, 2002). Ubp16 hat aber ebenfalls keinen Einfluss auf die Morphologie der Mitochondrien.

Aus den durchgeführten Experimenten kann geschlossen werden, dass Ubp16 für die generellen Funktionen der Mitochondrien nicht von Bedeutung ist.

Es gibt Hinweise, dass die Ubiquitinierung eine Funktion bei der Vererbung von Mitochondrien auf die Tochterzellen hat (Fisk und Yaffe, 1999). Genetische Studien zeigten, dass Defekte der Mitochondrien-Vererbung, die durch eine Mutation im *MDM1* Gen hervorgerufen wird, durch eine weitere Mutation im *RSP5* Gen wieder aufgehoben werden können. Untersuchungen der Mutation in *RSP5* ergaben, dass auch die Mutation alleine die Mitochondrien-Vererbung stört. Rsp5 ist eine Ubiquitin Ligase (E3) und es konnte gezeigt werden, dass der Defekt der Mutation in *RSP5* durch Überproduktion von Ubiquitin supprimiert werden kann. Dies lässt vermuten, dass die Ubiquitinierung eines oder mehrerer Proteine durch Rsp5 für die Mitochondrien-Vererbung von Bedeutung ist. Ubp16 könnte, als Gegenspieler der Ubiquitinierung durch Rsp5, regulatorischen Einfluss auf die Vererbung der Mitochondrien haben. In der *rsp5* Mutante scheinen Proteine der Mitochondrien-Vererbung zu gering ubiquitiniert zu sein. Wenn diese Proteine direkte Substrate von Ubp16 sind, sollte der Ausfall der deubiquitinerenden Aktivität des Enzyms den Ubiquitinierungsgrad der Proteine erhöhen und damit den Vererbungsdefekt möglicherweise supprimieren können. Eine Kontrolle dieser Annahme war leider nicht möglich, da der von uns verwendete *rsp5-1* Stamm keine Defekte in der Mitochondrien Vererbung zeigte. Das von Yaffe gefundene *rsp5* Allel unterscheidet

sich in seinen Eigenschaften von den bisher beschriebenen *rsp5* Mutationen (Fisk und Yaffe, 1999). Möglicherweise ist die defekte Mitochondrienvererbung von *rsp5* allelspezifisch oder abhängig vom Stammhintergrund.

Eine mögliche Suppression des *rsp5* Defektes durch die Disruption von *UBP16* konnte nicht untersucht werden, es konnte aber gezeigt werden, dass die Disruption von *UBP16* alleine, oder die Überproduktion des Ubps keinen Einfluss auf die Vererbung der Mitochondrien hat.

Neben der Vererbung gibt es weitere Funktionen an Mitochondrien, die ubiquitinabhängig sind. So ist beispielsweise die Insertion der humanen Monoaminoxidase A in die äußere Mitochondrienmembran ubiquitinabhängig (Zhuang, *et al.*, 1992). In vitro konnte gezeigt werden, dass die Monoaminoxidase nur dann in die äußere Membran von Ratten-Mitochondrien inseriert wird, wenn das Protein zuvor ubiquitiniert wurde. Wurden Ubiquitin oder ATP zuvor aus dem Versuchsansatz entfernt, konnte die Monoaminoxidase zwar noch an die Mitochondrienmembran binden, aber nicht mehr inseriert werden. Möglicherweise spielt Ubp16 eine regulatorische Funktion bei der Insertion von Proteinen in die äußere Mitochondrienmembran. Da es aber in der Hefe kein homologes Protein zu der Monoaminoxidase A gibt, konnte diese Hypothese nicht getestet werden.

Eine weitere Verbindung zwischen Ubiquitin und Mitochondrien wurde erst vor kurzem entdeckt. Phosphatidylserin (PtdSer) wird vom endoplasmatischen Retikulum über sogenannte MAM's (mitochondria associated membranes) zu den Mitochondrien transportiert. In den Mitochondrien wird PtdSer in Phosphatidylethanolamin (PtdEtn) umgesetzt. PtdEtn wird anschließend aus Mitochondrien exportiert und an andere Membranen weitergeleitet. Der Transfer von PtdSer aus MAM's an die Mitochondrien scheint ubiquitinabhängig zu sein (Schumacher, *et al.*, 2002, Voelker, 2003). Wenn der Zelle das F-box Protein Met30 fehlt, welches die Substrat-erkennende Untereinheit des SCF-Ubiquitinligase Komplexes ist (Patton, *et al.*, 1998a), gelangt PtdSer nicht mehr in die Mitochondrien. Damit kann PtdSer in den Mitochondrien nicht mehr durch die PtdSer Decarboxylase 1 (Psd1) in PtdEtn umgesetzt werden. Die Zelle kann PtdSer alternativ in der Vakuole durch die PtdSer Decarboxylase 2 (Psd2) in PtdEtn umsetzen. Zellen, in denen Psd2 deletiert wurde, können PtdEtn nur noch in den Mitochondrien

synthetisieren. Wird zusätzlich Met30 inaktiviert, kann kein PtdEtn mehr hergestellt werden, weil PtdSer nicht mehr in die Mitochondrien transportiert werden kann. Diese Zellen können ohne PtdEtn aus dem Medium nicht wachsen. Wenn Ubp16 den Transport von PtdSer an Mitochondrien kontrolliert, sollte die Überproduktion von Ubp16 den gleichen Phänotyp wie die Deletion von Met30 haben. Dies war nicht der Fall. Zellen ohne PtdSer Decarboxylase 2 in denen Ubp16 überproduziert wurde, wuchsen auf Medien ohne zusätzliche PtdEtn Quelle, wie der Wildtypstamm. Daher kann eine regulatorische Funktion durch die Deubiquitinierung von Ubp16 auf den PtdSer Transport an Mitochondrien weitgehend ausgeschlossen werden.

In den Mitochondrien der Hefe gibt es zwei Formen des Cytochrom C. Beide Proteine werden im Kern kodiert und in die Mitochondrien transportiert, wo sie mit der Häm-Gruppe modifiziert werden. In den Mitochondrien findet man aber hauptsächlich Apo-Iso-2-Cytochrom C. Die zweite Isoform, das Apo-Iso-1-Cytochrom C ist nur sehr kurzlebig. Es wird ubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut (Pearce und Sherman, 1997). Ob Ubp16 eine regulatorische bzw. stabilisierende Funktion durch Deubiquitinierung einer der Cytochrome hat, wurde im Verlauf dieser Arbeit nicht untersucht und stellt damit eine weitere potentielle Funktion für Ubp16 dar.

Bei den bisher untersuchten ubiquitinabhängigen Prozessen an Mitochondrien konnte keine Funktion für Ubp16 nachgewiesen werden. Daher stellte sich die Frage, ob es spezifische Substrate für Ubp16 gibt. Solche Proteine sollten in einem *UBP16* Disruptionsstamm in hyperubiquitinierte Form vorliegen. Im Zellextrakt des $\Delta ubp16$ Stammes wurden jedoch keine hyperubiquitinierten Proteine nachgewiesen. Möglicherweise sind die Substrate von Ubp16 sehr spezifisch und nur in geringen Mengen vorhanden, so dass sie im Gesamt-Zellextrakt nicht nachweisbar sind. Ubp16 ist an Mitochondrien lokalisiert, das legt die Vermutung nahe, dass auch potentielle Substrate mit Mitochondrien assoziiert sein könnten. Daher wurden Mitochondrien aus dem *UBP16* Disruptionsstamm aufgereinigt, um ohne den starken Hintergrund des Zellextraktes nach ubiquitinierten Proteinen zu suchen. Tatsächlich konnten in Mitochondrien-Präparationen des $\Delta ubp16$ Stammes ubiquitinierte Proteine nachgewiesen werden, die in der Wildtyp-Präparation nicht vorhanden waren. Es wurden Banden von 45 und 37,5 kDa gefunden. Der Größenunterschied dieser beiden Banden entspricht in etwa der Größe eines Ubiquitinrestes. Es könnte

sich daher bei den Banden um ein Protein in unterschiedlich stark ubiquitinierte Form handeln. Möglicherweise repräsentieren die Banden die tri- und diubiquitinierte Form des Proteins. Damit hätte ein potentielles Substrat von Ubp16 eine Größe von etwa 21,5 kDa. Die weiteren gefundenen Banden repräsentieren vermutlich ebenfalls unterschiedlich stark ubiquitinierte Formen eines zweiten Proteins, dessen nicht ubiquitinierte Form etwa 16 kDa groß zu sein scheint. Somit konnten zwei potentielle Substrate von Ubp16 nachgewiesen werden. Die Aufreinigung der Mitochondrien erwies sich als schwierig, andere membran-umschlossene Organellen der Zelle, wie ER, Plasmamembran, Vakuole und Endosomen ließen sich kaum von den Mitochondrien trennen. Bei der Präparation der Mitochondrien, in der die potentiellen Substrate nachgewiesen worden sind, enthielt die Mitochondrien-Fraktion aus dem $\Delta ubp16$ Stamm weniger Verunreinigungen als die Mitochondrien-Fraktion aus dem Wildtypstamm. Dennoch konnten mit Antikörpern gegen Ubiquitin zusätzliche Banden in der Mitochondrien-Fraktion des Disruptionsstammes identifiziert werden. Daher könnte es sich bei den gefundenen Proteinen tatsächlich um potentielle Substrate von Ubp16 handeln. Da die möglichen Substrate nicht in allen Präparationen nachgewiesen werden konnten, aber in allen Präparationen Mitochondrien angereichert worden sind, kann eine Lokalisation der potentiellen Substrate an den Mitochondrien selbst ausgeschlossen werden, ebenso wie eine Lokalisation an ER, Endosomen, Vakuole und Plasmamembran, da auch diese Membranen in der Mitochondrien-Fraktion angereichert waren. Bei den potentiellen Substraten von Ubp16 scheint es sich vielmehr um Proteine zu handeln, die nur unter bestimmten Bedingungen oder nur transient mit Mitochondrien assoziiert sind. Daher ist zum Beispiel eine Lokalisation in MAM's (Mitochondria Associated Membranes) vorstellbar, da diese Membranen Cargo vom ER an die Mitochondrien liefern (Voelker, 2003). Eine Funktion für Ubp16 beim Transport von Phosphatidylserin aus MAMs an Mitochondrien konnte zwar nicht bestätigt werden, aber möglicherweise werden noch weitere Membran-Transportprozesse durch Ubiquitinierung und Deubiquitinierung reguliert.

Die Mitochondrien-Präparationen lieferten Hinweise auf zwei mögliche Substrate von Ubp16. Das Enzym ist das einzige in der Membranen verankerte Ubp. Die Lokalisation von Ubp16 an Mitochondrien hat sicherlich funktionale Gründe, die noch aufzuklären sind. Eine Identifizierung der potentiellen Substrate könnte vermutlich interessante Hinweise auf die Funktion von Ubp16 liefern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit sollte nach membranassoziierten Ubps (Ubiquitin Specific Processing Proteases) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gesucht werden, die an der Regulation von ubiquitinabhängigen Membran-Transport Schritten beteiligt sein könnten. Um die Ubps im Western-Blot nachweisen zu können, wurden die Proteine mit einem 13-myc Epitop markiert. Durch Membran-Floatations-Experimente wurde der Grad der Membran-Assoziation für die einzelnen Ubps bestimmt. Eine signifikante Assoziation mit Membranen zeigten dabei Ubp1, Ubp4/Doa4, Ubp9 und Ubp11. Die Funktion von Ubp9 und Ubp11 ist noch unbekannt. Möglicherweise kann die Identifikation der Membranen, mit denen sie assoziiert sind, Hinweise auf ihre Funktion liefern. Von Ubp4 ist bekannt, dass es in einer $\Delta vps4$ Mutante, in der die Fusion von Endosomen mit der Vakuole gestört ist, an Endosomen gebunden ist. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass Ubp4 auch unter normalen Bedingungen zu großen Teilen mit Membranen assoziiert vorliegt. Von Ubp1 wurden zwei Formen nachgewiesen, eine modifizierte Form mit langsamerer Mobilität auf Protein-Gelen, die vollständig an Membranen gebunden ist und eine nicht modifizierte, lösliche Form. Ubp1 scheint daher durch die Modifikation, an Membranen rekrutiert zu werden.

Ubp16 war das einzige Hefe-Ubp, welches vollständig mit Membranen assoziiert ist. Durch Zellfraktionierungs-Experimente und mikroskopische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Ubp16 an Mitochondrien lokalisiert ist. Ubp16 ist wahrscheinlich über seinen hydrophoben N-Terminus in der Mitochondrien-Membran verankert. Protease-Schutzexperimente zeigten, dass Ubp16 an die äußere Mitochondrien-Membran gebunden und der Großteil des Proteins zum Zytoplasma hin orientiert ist. Die Funktion des Ubps konnte nicht abschließend geklärt werden, aber einen Einfluss von Ubp16 auf die generellen Funktionen der Mitochondrien, wie Atmung, Morphologie und Vererbung konnte weitestgehend ausgeschlossen werden. Aus Mitochondrien-Präparationen ergaben sich Hinweise auf mögliche Ubp16-Substrate. Diese potentiellen Substrate waren jedoch nicht in allen Mitochondrien-Präparationen detektierbar, was darauf hindeutet, dass sie mit Strukturen assoziiert sind, die nur transient an Mitochondrien gebunden sind.

6 LITERATUR

- Abeliovich, H. und Klionsky, D. J. (2001) Autophagy in yeast: mechanistic insights and physiological function. *Microbiol Mol Biol Rev*, **65**, 463-79, table of contents
- Amerik, A., Swaminathan, S., Krantz, B. A., Wilkinson, K. D. und Hochstrasser, M. (1997) In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *EMBO J.*, **16**, 4826-4838
- Amerik, A. Y., Li, S. J. und Hochstrasser, M. (2000a) Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem*, **381**, 981-92
- Amerik, A. Y., Nowak, J., Swaminathan, S. und Hochstrasser, M. (2000b) The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol. Biol. Cell.*, **11**, 3365-3380
- Bagnat, M., Chang, A. und Simons, K. (2001) Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast. *Mol Biol Cell*, **12**, 4129-38
- Bagnat, M., Keranen, S., 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
- Bonifacino, J. S. und Weissman, A. M. (1998) Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **14**, 19-57
- Bourgarel, D., Nguyen, C. C. und Bolotin-Fukuhara, M. (1999) HAP4, the glucose-repressed regulated subunit of the HAP transcriptional complex involved in the fermentation-respiration shift, has a functional homologue in the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol Microbiol*, **31**, 1205-15
- Boy-Marcotte, E., Ikonomi, P. und Jacquet, M. (1996) SDC25, a dispensable Ras guanine nucleotide exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae* differs from CDC25 by its regulation. *Mol Biol Cell*, **7**, 529-39
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54
- Bullock, W. O., Fernandez, J. M. und Short, J. M. (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Bio Techniques*, **5**, 376-378
- Chen, X., Zhang, B. und Fischer, J. A. (2002) A specific protein substrate for a deubiquitinating enzyme: Liquid facets is the substrate of Fat facets. *Genes Dev.*, **16**, 289-294
- Chung, C. H. und Baek, S. H. (1999) Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochem Biophys Res Commun*, **266**, 633-40
- Ciechanover, A. (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell*, **79**, 13-21
- Costanzo, M. C., Crawford, M. E., Hirschman, J. E., Kranz, J. E., Olsen, P., Robertson, L. S., Skrzypek, M. S., Braun, B. R., Hopkins, K. L., Kondu, P., Lengieza, C., Lew-Smith, J. E., Tillberg, M. und Garrels, J. I. (2001) YPD, PombePD and WormPD: model organism volumes of the BioKnowledge library, an integrated resource for protein information. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 75-79
- D'Andrea, A. und Pellman, D. (1998) Deubiquitinating enzymes: a new class of biological regulators. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **33**, 337-52

- Egner, A., Jakobs, S. und Hell, S. W. (2002) Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 3370-5
- Ficarro, S. B., McClelland, M. L., Stukenberg, P. T., Burke, D. J., Ross, M. M., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. und White, F. M. (2002) Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol*, **20**, 301-5
- Fields, S. und Song, O.-k. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246
- Fisk, H. A. und Yaffe, M. P. (1999) A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **145**, 1199-1208
- 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. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*, **350**, 87-96
- Glickman, M. H. und Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, **82**, 373-428
- Gnesutta, N., Ceriani, M., Innocenti, M., Mauri, I., Zippel, R., Sturani, E., Borgonovo, B., Berruti, G. und Martegani, E. (2001) Cloning and characterization of mouse UBP_y, a deubiquitinating enzyme that interacts with the Ras guanine nucleotide exchange factor CDC25(Mm)/Ras-GRF1. *J. Biol. Chem.*, **276**, 39448-39454
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In Glover, P. M. (ed.). *DNA Cloning Col. I IRL Press Oxford.*,
- Hatakeyama, S. und Nakayama, K. I. (2003) U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem Biophys Res Commun*, **302**, 635-45
- Haucke, V., Ocana, C. S., Honlinger, A., Tokatlidis, K., Pfanner, N. und Schatz, G. (1997) Analysis of the sorting signals directing NADH-cytochrome b₅ reductase to two locations within yeast mitochondria. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 4024-4032
- Hershko, A. und Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425-479
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S. und Ciechanover, A. (1983) Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*, **258**, 8206-14
- Hicke, L. (1999) Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell. Biol.*, **9**, 107-112
- Hicke, L. und Riezman, H. (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand- stimulated endocytosis. *Cell*, **84**, 277-287
- Hicke, L., Zanolari, B. und Riezman, H. (1998) Cytoplasmic tail phosphorylation of the α -factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J. Cell Biol.*, **141**, 349-358
- Hiller, M. M., Finger, A., Schweiger, M. und Wolf, D. H. (1996) ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science*, **273**, 1725-1728
- Hochstrasser, M. (1995) Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **7**, 215-223

- Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.*, **30**, 405-439
- Hoegel, C., Pfander, B., Moldovan, G. L., Pyrowolakis, G. und Jentsch, S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, **419**, 135-41
- Hoppe, T., Rape, M. und Jentsch, S. (2001) Membrane-bound transcription factors: regulated release by RIP or RUP. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 344-8
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. und Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, **153**, 163-8
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. und Fields, S. (1993) Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene*, **8**, 1693-6
- James, P., Halladay, J. und Craig, E. A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-36
- Jentsch, S. und Schlenker, S. (1995) Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell*, **82**, 881-884
- Kahana, A. (2001) The deubiquitinating enzyme Dot4p is involved in regulating nutrient uptake. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 916-20
- Kahana, A. und Gottschling, D. E. (1999) DOT4 links silencing and cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 6608-20
- Kanaji, S., Iwahashi, J., Kida, Y., Sakaguchi, M. und Mihara, K. (2000) Characterization of the signal that directs Tom20 to the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.*, **151**, 277-288
- Kapranov, A. B., Kuriatova, M. V., Preobrazhenskaia, O. V., Tiutiaeva, V. V., Shtuka, R., Feldmann, H. und Karpov, V. L. (2001) [Isolation and identification of PACE-binding protein rpn4--a new transcription activator, participating in regulation of 26S proteasome and other genes]. *Mol Biol (Mosk)*, **35**, 420-31
- Katz, M., Shtiegman, K., Tal-Or, P., Yakir, L., Mosesson, Y., Harari, D., Machluf, Y., Asao, H., Jovin, T., Sugamura, K. und Yarden, Y. (2002) Ligand-independent degradation of epidermal growth factor receptor involves receptor ubiquitylation and Hgs, an adaptor whose ubiquitin-interacting motif targets ubiquitylation by Nedd4. *Traffic*, **3**, 740-51
- Katzmann, D. J., Babst, M. und Emr, S. D. (2001) Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, **106**, 145-155
- Klapisz, E., Sorokina, I., Lemeer, S., Pijnenburg, M., Verkleij, A. J. und van Bergen en Henegouwen, P. M. (2002) A ubiquitin-interacting motif (UIM) is essential for Eps15 and Eps15R ubiquitination. *J Biol Chem*, **277**, 30746-53
- 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
- Kölling, R. und Losko, S. (1997) The linker region of the ABC-transporter Ste6 mediates ubiquitination and fast turnover of the protein. *EMBO J.*, **16**, 2251-2261
- Kranz, A. (2000) Identifizierung von Protein-Transport-Faktoren in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. *Dissertation*,

- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5
- Lafont, F. und Simons, K. (2001) Raft-partitioning of the ubiquitin ligases Cbl and Nedd4 upon IgE-triggered cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3180-4
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. und Pringle, J. R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 953-961
- Losko, S., Kopp, F., Kranz, A. und Kölling, R. (2001) Uptake of the ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Ste6 into the Yeast Vacuole Is Blocked in the *doa4* Mutant. *Mol. Biol. Cell*, **12**, 1047-1059
- Marquez, J. A. und Serrano, R. (1996) Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene PMR2/ENA1 during salt stress in yeast. *FEBS Lett*, **382**, 89-92
- Meisinger, C., Sommer, T. und Pfanner, N. (2000) Purification of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria devoid of microsomal and cytosolic contaminations. *Anal Biochem*, **287**, 339-42
- Moazed, D. und Johnson, D. (1996) A deubiquitinating enzyme interacts with *SIR4* and regulates silencing in *S. cerevisiae*. *Cell*, **86**, 667-677
- Müller, F., Brühl, K. H., Freidel, K., Kowallik, K. V. und Ciriacy, M. (1987) Processing of TY1 proteins and formation of Ty1 virus-like particles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **207**, 421-429
- Oldham, C. E., Mohny, R. P., Miller, S. L., Hanes, R. N. und O'Bryan, J. P. (2002) The ubiquitin-interacting motifs target the endocytic adaptor protein epsin for ubiquitination. *Curr Biol*, **12**, 1112-6
- Papa, F. R., Amerik, A. Y. und Hochstrasser, M. (1999) Interaction of the Doa4 deubiquitinating enzyme with the yeast 26S proteasome. *Mol Biol Cell*, **10**, 741-56
- Papa, F. R. und Hochstrasser, M. (1993) The yeast *DOA4* gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human *trc-2* oncogene. *Nature*, **366**, 313-319
- Patnaik, A., Chau, V. und Wills, J. W. (2000) Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13069-13074
- Patton, E. E., Willems, A. R., Sa, D., Kuras, L., Thomas, D., Craig, K. L. und Tyers, M. (1998a) Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes Dev*, **12**, 692-705
- Patton, E. E., Willems, A. R., Sa, D., Kuras, L., Thomas, D., Craig, K. L. und Tyers, M. (1998b) Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes Dev.*, **12**, 692-705
- Pearce, D. A. und Sherman, F. (1997) Differential ubiquitin-dependent degradation of the yeast apocytochrome c isozymes. *J Biol Chem*, **272**, 31829-36
- Pringle, J. R., Preston, R. A., Adams, A. E. M., Stearns, T., Drubin, D. G., Haarer, B. K. und Jones, E. W. (1989) Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol.*, **31**, 357-434
- Raymond, C. K., Howald, S. I., Vater, C. A. und Stevens, T. H. (1992) Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E *vps* mutants. *Mol. Biol. Cell.*, **3**, 1389-1402

- Reggiori, F. und Pelham, H. R. (2001) Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *EMBO J.*, **20**, 5176-5186
- Scheffner, M., Nuber, U. und Huibregtse, J. M. (1995) Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*, **373**, 81-3
- Schubert, U., Ott, D. E., Chertova, E. N., Welker, R., Tessmer, U., Princiotta, M. F., Bennink, J. R., Krausslich, H. G. und Yewdell, J. W. (2000) Proteasome inhibition interferes with gag polyprotein processing, release, and maturation of HIV-1 and HIV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13057-13062
- Schumacher, M. M., Choi, J. Y. und Voelker, D. R. (2002) Phosphatidylserine transport to the mitochondria is regulated by ubiquitination. *J. Biol. Chem.*, **277**, 51033-51042
- Shaw, J. M. und Nunnari, J. (2002) Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol*, **12**, 178-84
- Shekhtman, A. und Cowburn, D. (2002) A ubiquitin-interacting motif from Hrs binds to and occludes the ubiquitin surface necessary for polyubiquitination in monoubiquitinated proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **296**, 1222-7
- Shih, S. C., Sloper-Mould, K. E. und Hicke, L. (2000) Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *Embo J*, **19**, 187-98
- Strack, B., Calistri, A., Accola, M. A., Palu, G. und Gottlinger, H. G. (2000) A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13063-13068
- Swaminathan, S., Amerik, A. Y. und Hochstrasser, M. (1999) The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 2583-2594
- Terrell, J., Shih, S., Dunn, R. und Hicke, L. (1998) A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein- coupled receptor. *Mol. Cell*, **1**, 193-202
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. und Pickart, C. M. (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J*, **19**, 94-102
- Thumm, M. (2000) Structure and function of the yeast vacuole and its role in autophagy. *Microsc Res Tech*, **51**, 563-72
- Trumbly, R. J. (1992) Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **6**, 15-21
- Urbanowski, J. L. und Piper, R. C. (2001) Ubiquitin sorts proteins into the intraluminal degradative compartment of the late-endosome/vacuole. *Traffic*, **2**, 622-630
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd, Koonin, E. V. und Deshaies, R. J. (2002) Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*, **298**, 611-615
- Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J. und Deshaies, R. J. (2000) Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol Biol Cell*, **11**, 3425-39
- Vida, T. A. und Emr, S. D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell Biol.*, **128**, 779-792
- Voelker, D. R. (2003) New perspectives on the regulation of intermembrane glycerophospholipid traffic. *J Lipid Res*, **44**, 441-9

- Wang, Y. und Dohlman, H. G. (2002) Pheromone-dependent ubiquitination of the mitogen-activated protein kinase kinase Ste7. *J. Biol. Chem.*, **277**, 15766-15772
- Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A. und Ploegh, H. L. (1996) Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*, **384**, 432-438
- Wilkinson, B. M., Regnacq, M. und Stirling, C. J. (1997) Protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J Membr Biol*, **155**, 189-97
- Wilkinson, K. D. (1997) Regulation of ubiquitin-dependent processes by deubiquitinating enzymes. *Faseb J*, **11**, 1245-56
- Wilkinson, K. D. (2000) Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome. *Semin Cell Dev Biol*, **11**, 141-8
- Winther, J. R., Stevens, T. H. und Kielland-Brandt, M. C. (1991) Yeast carboxypeptidase Y requires glycosylation for efficient intracellular transport, but not for vacuolar sorting, in vivo stability, or activity. *Eur J Biochem*, **197**, 681-9
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z. und Graham, M. W. (1989) Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res*, **17**, 3469-78
- Xie, Y. und Varshavsky, A. (2001) RPN4 is a ligand, substrate, and transcriptional regulator of the 26S proteasome: a negative feedback circuit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 3056-61
- Yao, T. und Cohen, R. E. (2002) A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature*, **419**, 403-407
- Yeong, F. M., Lim, H. H., Padmashree, C. G. und Surana, U. (2000) Exit from mitosis in budding yeast: biphasic inactivation of the Cdc28-Clb2 mitotic kinase and the role of Cdc20. *Mol Cell*, **5**, 501-11
- You, J. und Pickart, C. M. (2001) A HECT domain E3 enzyme assembles novel polyubiquitin chains. *J Biol Chem*, **276**, 19871-8
- Zhuang, Z. P., Marks, B. und McCauley, R. B. (1992) The insertion of monoamine oxidase A into the outer membrane of rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **267**, 591-596

7 ABKÜRZUNGEN

³⁵ S	radioaktives Schwefelisotop
Ade	Adenin
AK	Antikörper
ALP	„alkaline phosphatase“
APC	Anaphase Promoting Complex
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
Bp	Basenpaare
CEN	Centromersequenz
Ci	Curie
CPS	Carboxypeptidase S
Cys	Cystein
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTAF	Dichlorotriazinylamino-Fluorescein
DTT	Dithiothreitol
Dub	Deubiquitinating Enzyme
E1	Ubiquitin aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligase
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERAD	ER Associated Protein Degradation
EtBr	Ethidiumbromid
GFP	„green fluorescent protein“
GST	Glutathion-S-Transferase
H	Stunde
His	Histidin
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
Leu	Leucin
LiOAc	Lithiumacetat
Lys	Lysin
MAM	Mitochondria Associated Membrane
Met	Methionin

min	Minuten
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
msec	Millisekunden
MVB	Multi Vesicular Body
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PtdEtn	Phosphatidylethanolamin
PtdSer	Phosphatidylserin
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
S. c.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SRP	Signal Recognition Particle
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
ts	temperatursensitiv
U	Einheit der Enzymaktivität
Ubp	Ubiquitin Specific Processing Protease
Uch	Ubiquitin C-terminal Hydrolase
Ura	Uracil
WT	Wildtyp
YNB	„yeast nitrogen base“

Danksagungen

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Ralf Kölling für die Bereitstellung des Themas und die gute Betreuung dieser Arbeit. Neben den Arbeitstechniken hat er wissenschaftliches Verständnis und Spaß an der wissenschaftlichen Arbeit vermittelt.

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

Den derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Kölling, Andreas Kranz, Tobias Sydor, Karin Krapka, Tamara Krsmanovic, Stefanie Huppert, Carolin Schmitz und Agnes Pawelec danke ich für die gute Zusammenarbeit und die hilfreichen Diskussionen und die interessanten, nicht immer fachbezogenen, Gespräche.

Den Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich Frau Anna Nagy danken, die dafür gesorgt hat, dass es nie an sterilen Kolben und anderen Gerätschaften gemangelt hat, und Ulrich Kleinhans, der immer ein offenes Ohr hatte, wenn technische Probleme gelöst werden mussten.

Meinem Freund Dirk Burkamp danke ich für die moralische Unterstützung und das Lösen der vielen kleinen und großen Probleme mit dem Computer.

Meiner Familie möchte ich danken, dass sie besonders in der letzten Zeit viele Probleme von mir fernhielt. Ein besonderer Dank gilt meiner Mutter sowie Britta und Ansgar Schlüter, die zahlreiche Stunden auf die Korrektur dieser Arbeit verwandt haben.

Eidesstattliche Erklärung

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

Dortmund, den 18.04.2003