

**Molekulargenetische und physiologische
Charakterisierung des intrazellulären
Transportes von Hexosetransportern in *gsf*-
Mutanten der Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

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

vorgelegt durch Tanja Hamacher

aus Duisburg

Düsseldorf 2004

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

Referent: Prof. Dr. C. P. Hollenberg

1. Korreferentin: Prof. Dr. E. Knust

2. Korreferent: Prof. Dr. E. Boles

Tag der mündlichen Prüfung: 20.12.2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Hexosetransport	1
1.1.1	Die Hexosetransporter-Familie	1
1.1.2	Regulation der Expression	3
1.1.3	Glukoserepression.....	5
1.2	Sekretionsweg der Transporter zur Plasmamembran.....	7
1.2.1	Die Translokation und die Insertion in die Membran.....	8
1.2.2	Das UPR-System	9
1.2.3	Das ERAD-System	10
1.2.4	Transport vom ER zum Golgi-Apparat in COPII-Vesikeln	12
1.2.5	COPI- und Clathrin-Vesikel	13
1.3	Suche nach <i>gsf</i> -Mutanten im Glukoserepressionssignalweg.....	14
1.4	Gsf2-ähnliche Proteine	15
1.5	Zielsetzung	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Stämme und Medien.....	19
2.1.1	Bakterienstämme.....	19
2.1.2	Medien und Anzucht von <i>E. coli</i>	19
2.1.3	Hefestämme	19
2.1.4	Medien und Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>	27
2.2	Plasmide.....	28
2.3	Synthetische Oligonukleotide.....	31
2.4	Antikörper	38
2.5	Enzyme, Chemikalien und Materialien.....	38
2.6	Transformation.....	40
2.6.1	Transformation von <i>E. coli</i>	40
2.6.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	40
2.7	Präparation von DNA.....	40

2.7.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	40
2.7.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	41
2.7.3	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	41
2.8	Enzymatische Modifikation von DNA	42
2.8.1	DNA-Restriktion.....	42
2.8.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	42
2.8.3	Ligation.....	42
2.9	DNA-Amplifizierung mittels PCR.....	42
2.10	PCR-Bedingungen.....	43
2.11	DNA-Aufreinigung von PCR-Produkten	44
2.12	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	45
2.13	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	45
2.14	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	45
2.15	Sequenzierung von DNA	45
2.16	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	45
2.17	Klonierung von Plasmiden durch <i>in vivo</i> -Rekombination	46
2.17.1	Integration einer <i>SUC2</i> -Topologie-Reporterkassette.....	46
2.18	Fusion von DNA-Fragmenten	47
2.18.1	Herstellung eines <i>HXT1/4</i> -Chimärs	47
2.18.2	Herstellung von <i>HXT1/7</i> - und <i>HXT7/1</i> -Chimären.....	48
2.19	Gen-Deletionen in <i>S. cerevisiae</i>	50
2.19.1	Gen-Deletionen mittels der <i>loxP::kanMX::loxP</i> -Deletionskassette.....	50
2.19.2	Gen-Deletionen mittels der <i>HIS3MX</i> -Deletionskassette	50
2.20	Bestimmung der Wachstumsrate von <i>S. cerevisiae</i>	51
2.21	Herstellung von Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	51
2.22	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	52
2.23	EndoglykosidaseH-Behandlung von Proteinextrakten	52
2.24	Zellfraktionierung durch Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation	52
2.25	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	53

2.26	Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot-Analyse	53
2.27	Nachweis von Proteinen über PonceauS-Färbung	54
2.28	Nachweis von Proteinen über colloidale Coomassie-Färbung	54
2.29	Nachweis von Proteinen über Silber-Färbung	54
2.30	Split-Ubiquitin System (SUS)	54
2.30.1	Konstruktion neuer Stämme	54
2.30.1.1	Konstruktion des Stammes THY.AP4	54
2.30.1.2	Konstruktion des Stammes THY.AP5	56
2.30.2	Konstruktion neuer Vektoren für das Split-Ubiquitin System	56
2.30.3	Klonierung der Plasmide für das Split-Ubiquitin System	57
2.31	Tandem-Affinitäts-Aufreinigung	58
2.31.1	Herstellung des Proteinextrakts	58
2.31.2	TAP-Aufreinigung	59
2.31.3	Proteinkonzentrierung mittels TCA-Fällung	59
2.31.4	Elektrophoretische Auftrennung	60
2.31.5	Entfärbung, Trypsin-Behandlung und Massenspektrometrie	60
2.32	Paarungstyp-Analyse und Kreuzung von Stämmen	61
2.33	Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität	62
2.33.1	Qualitative Enzymtests („X-Gal Overlay-Assay“)	62
2.33.2	Quantitative Enzymtests	62
2.34	Messung der Glukoseaufnahme in <i>S. cerevisiae</i>	63
3	Ergebnisse	64
3.1	Hxt1/4-Chimär	64
3.1.1	Konstruktion und Funktionalitätsuntersuchung des Hxt1/4-Chimärs	64
3.1.2	Einfluss des Hxt1/4-Chimärs auf das Wachstum	65
3.1.2.1	Glukose als Kohlenstoffquelle	65
3.1.2.2	Maltose und Ethanol als Kohlenstoffquelle	66
3.1.3	Einfluss des Hxt1/4-Chimärs auf die Glukoseaufnahme	68
3.1.4	Zelluläre Lokalisation des Hxt1/4-Chimärs	69

3.1.5	Faltungsuntersuchung des Hxt1/4-Chimärs	70
3.2	Gsf2	72
3.2.1	Wachstumsstudien verschiedener Δ gsf2-Deletionsstämme	72
3.2.2	Zelluläre Lokalisation von Gsf2.....	76
3.2.3	Zelluläre Lokalisation der Hexosetransporter	78
3.3	Charakterisierung von Hxt1	80
3.3.1	Elektrophoretische Mobilität von Hxt1	80
3.3.2	Einfluss chemischer Chaperone auf Hxt1	81
3.3.3	Faltungsuntersuchungen zu Hxt1	82
3.3.4	Funktionalitätstest von Hxt1	84
3.4	Interaktionsstudien von Gsf2	86
3.4.1	Einfluss der Glutathion-S-Transferase Gtt1 auf Gsf2	87
3.4.2	Einfluss auf die <i>RSE1</i> -Expression	89
3.4.3	Überexpression des GTP-Bindeproteins Sar1	91
3.4.4	Überexpression von <i>SEC12</i> , <i>SEC16</i> , <i>SEC23</i> , <i>SEC24</i>	92
3.4.5	Genetische Interaktion mit Temperatur-sensitiven <i>sec</i> -Mutanten.....	93
3.4.6	Split-Ubiquitin System (SUS).....	96
3.4.7	Suche nach weiteren Interaktionspartnern (TAP-Tag).....	103
3.5	Einfluss von Gsf2 und Sar1 auf andere Transportproteine	105
3.5.1	Einfluss auf den Säuger-Glukosetransporter GLUT4	105
3.5.2	Einfluss auf die generelle Aminosäurepermease Gap1.....	107
3.6	Topologie von Gsf2.....	108
3.7	Hxt1/7-Chimäre.....	110
3.7.1	Spontane, ungerichtete Chimäre.....	110
3.7.2	Genomisch-integrierte Chimäre.....	114
3.7.3	Plasmid-kodierte Chimär-Sequenzen	116
4	Diskussion	119
4.1	Hxt1/4-Chimär.....	119
4.2	Gsf2	122

4.2.1	Gsf2 hilft bei der Translokation verschiedener Hexosetransporter	122
4.2.2	Gsf2 hat keinen Einfluss auf die Konformation von Hxt1	123
4.2.3	Topologie von Gsf2	124
4.2.4	Gsf2 interagiert nicht mit einer bestimmten Proteindomäne	124
4.2.5	Interaktionspartner von Gsf2	125
4.2.5.1	Multicopy-Suppressoren.....	125
4.2.5.2	Genetische Interaktionspartner	128
4.2.5.3	Proteininteraktionen	130
4.2.5.4	Funktion von Gsf2	132
5	Zusammenfassung.....	135
6	Literaturverzeichnis	136
7	Abkürzungsverzeichnis	146

1 EINLEITUNG

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde hauswirtschaftlich unbewusst bereits vor mindestens 5000 Jahren als Gärhefe für alkoholische Getränke und als Treibmittel für Weizenmehlteige verwendet. Die ersten wissenschaftlichen Arbeiten entstanden zur Zeit der Erfindung des Mikroskops durch Antonie van Leeuwenhoek: 1680 beobachtete der Niederländer erstmals sphärische und ovale Körper im Biersediment. Erst 180 Jahre später (1860) konnte Louis Pasteur nachweisen, dass die alkoholische Gärung durch Hefe verursacht wird. Wissenschaftlich interessant wurde die Hefe dadurch, dass ihr Genom als erster eukaryotischer Organismus im Jahre 1996 sequenziert wurde.

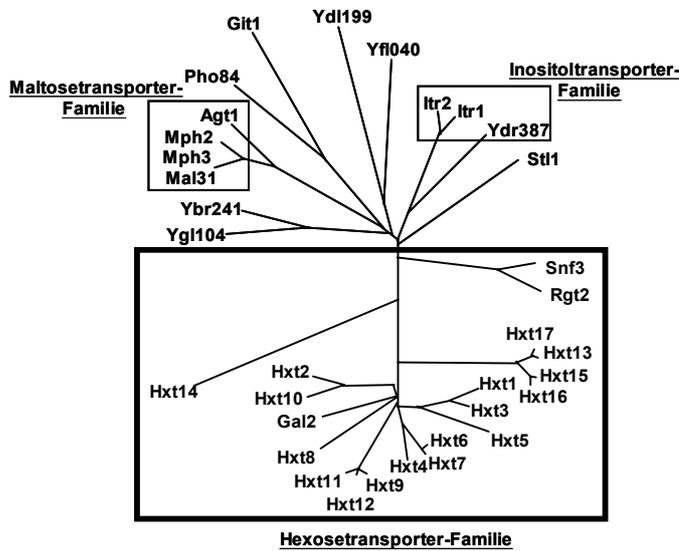
1.1 Hexosetransport

Die Hefe *S. cerevisiae* ist in der Lage verschiedenste Zucker zu Ethanol und Kohlendioxid zu fermentieren. Die Aufnahme der Monosaccharide erfolgt über erleichterte Diffusion (Kruckeberg, 1996). Der Transport der bevorzugten Hexosen Glukose, Fruktose und Mannose erfolgt über Hexosetransporter. Die Hexose Galaktose wird über die Galaktosepermease in die Zelle transportiert. Das Dissaccharid Maltose wird über aktiven Transport mit Hilfe der Maltosepermeasen aufgenommen und intrazellulär durch die α -Glukosidase in zwei Glukosemoleküle hydrolysiert. Das Disaccharid Saccharose und das Trisaccharid Raffinose werden hingegen extrazellulär durch die sekretierte Invertase und die α -Galaktosidase hydrolysiert und anschließend in Form von Monosacchariden in die Zelle transportiert (Barnett, 1976; Lagunas, 1993).

1.1.1 Die Hexosetransporter-Familie

Der Transport der Hexosen Glukose, Fruktose und Mannose erfolgt in *S. cerevisiae* über mehrere Transportproteine mit unterschiedlichen Affinitäten zu ihrem Substrat. 20 Hexosetransporter und Hexosetransporter-verwandte Proteine sind bekannt, die der Zuckerpermease-Familie mit insgesamt 34 homologen Proteinen aufgrund ihrer Sequenzhomologien und ihrer ähnlichen Funktionen zugeordnet werden (Abb. 1) (Kruckeberg, 1996). Alle 20 Proteine Hxt1-17, Gal2, Snf3 und Rgt2 weisen eine Struktur aus 12 putativen Transmembrandomänen und cytoplasmatisch orientierten N- und C-Termini auf, die in ihren Längen differieren. (Kruckeberg, 1996; Boles und Hollenberg, 1997). Die wachstumsrelevante Aufnahme der Hexosen Glukose, Fruktose und Mannose erfolgt jedoch nur über die Transporter Hxt1-Hxt4, Hxt6 und Hxt7. Eine Deletion der Gene *HXT1-HXT7* hat zur Folge, dass die Hefe nicht mehr in der Lage ist, diese Hexosen zum

Wachstum zu nutzen (Reifenberger *et al.*, 1995). Die wachstumsrelevanten Transportergene *HXT1* und *HXT4* liegen zusammen mit *HXT5* in einem Cluster auf dem rechten Arm von Chromosom VIII. Und auch die Gene *HXT3*, *HXT6* und *HXT7* sind zusammen in einem Cluster auf dem rechten Arm des Chromosoms IV lokalisiert (Kruckeberg, 1996). Die nicht-wachstumsrelevanten Transporter Hxt5,



Hxt8-11 und Hxt13-17 sind bei Überexpression in der Lage Hexosen zu transportieren. Bei *HXT12* handelt es sich um ein Pseudogen. Gal2 dient der Zelle als Galaktosepermease zum Transport der Hexose Galaktose. Snf3 und Rgt2 sind nicht in der Lage Hexosen zu transportieren und fungieren als Glukosesensoren (Wieczorke *et al.*, 1999).

Abb. 1: Dendrogramm der Zuckerpermease-Familie der Hefe *S. cerevisiae*. (Abbildung verändert nach Wieczorke *et al.*, 1999).

Die Charakterisierung der Hexosetransporter erfolgte mit Hilfe von Hefestämmen, die jeweils nur einen einzelnen Transporter exprimierten (Reifenberger *et al.*, 1995; 1997). Bei Hxt1 und Hxt3 handelt es sich um niederaffine Transporter, die zu 86,4% identisch sind. Hxt1 ist in der Lage Glukose, Fruktose und Mannose mit extrem geringen Affinitäten ($K_m(\text{Glukose})=100\text{mM}$; $K_m(\text{Fruktose})>300\text{mM}$) zu transportieren (Reifenberger *et al.*, 1997). Die Expression von *HXT1* wird bei hohen Glukosekonzentrationen und in der exponentiellen Wachstumsphase induziert (Özcan und Johnston, 1995; Kruckeberg, 1996). Die Affinität von Hxt3 zu Glukose liegt mit einem $K_m(\text{Glukose})=60\text{mM}$ etwas höher als die von Hxt1 (Reifenberger *et al.*, 1997). Die Induktion der Expression von *HXT3* erfolgt unabhängig von der Konzentration durch Glukose, wird jedoch bei Eintritt der Zellen in die stationäre Wachstumsphase verstärkt (Özcan und Johnston, 1995; Ko *et al.*, 1993). Bei Hxt2 handelt es sich um einen hochaffinen Transporter für Glukose, Fruktose und Mannose, dessen Kinetik von der extrazellulären Zuckerkonzentration abhängt (Reifenberger *et al.*, 1997). Hxt4 ist ein moderat niederaffiner Transporter, der bei geringen Glukosekonzentrationen im Medium exprimiert wird und dessen Expression in der stationären Wachstumsphase induziert wird (Theodoris *et al.*, 1994). Die hochaffinen Transporter Hxt6 und Hxt7 ($K_m(\text{Glukose})=1-2\text{mM}$) sind bis auf

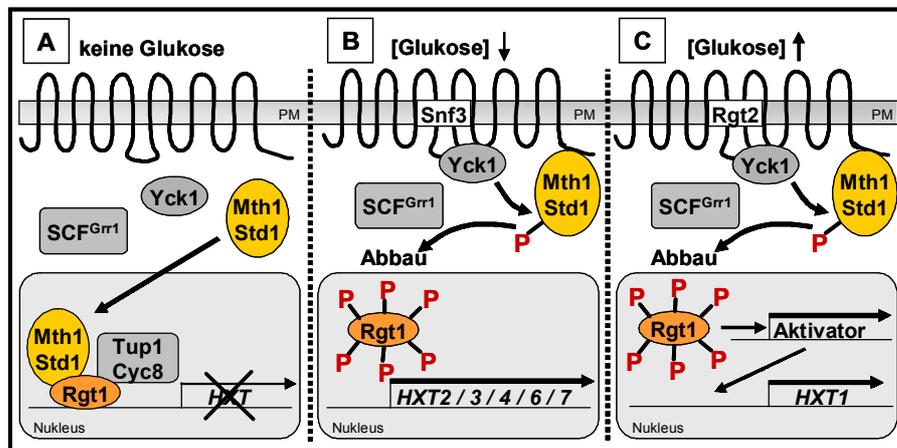
zwei konservierte Aminosäureaustausche identisch und werden bei geringen Glukosekonzentrationen als auch bei Anwesenheit nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquellen im Medium stark exprimiert. Die Galaktosepermease Gal2 zeigt die größten Homologien zu den hochaffinen Transportern Hxt6 und Hxt7 (71,8% identisch). Neben Galaktose kann Gal2 auch Glukose mit hoher Affinität ($K_{m(\text{Glukose})} = 2\text{mM}$) transportieren (Reifenberger *et al.*, 1997; Liang und Gaber, 1996).

1.1.2 Regulation der Expression

Die Hefe kann Glukose über einen weiten Konzentrationsbereich über nieder- ($K_{m(\text{Glukose})} = 20\text{mM}$) und hochaffine Komponenten ($K_{m(\text{Glukose})} = 1\text{mM}$) aufnehmen (Kruckeberg, 1996). Dies erfordert eine Regulation der Expression der verschiedenen Hexosetransporter gene entsprechend der vorhandenen Zuckerkonzentration, so dass bei Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen niederaffine Transporter und bei Anwesenheit geringer Glukosekonzentrationen hochaffine Transporter exprimiert werden. Die Regulation der Expression der Hexosetransporter gene beruht auf der Repression, der Derepression und der Induktion der Transkription (Özcan und Johnston, 1995). Die extrazelluläre Glukosekonzentration wird über die beiden Glukosesensoren Snf3 und Rgt2 registriert, die nicht selbständig Zucker transportieren können (Özcan *et al.*, 1998; Wiczorke *et al.*, 1999). Beide Proteine weisen große Homologien zu den Hexosetransportern Hxt1-17 und Gal2 auf, besitzen jedoch im Gegensatz zu den Transportern einen um 200-300 Aminosäuren verlängerten C-Terminus. Diese cytoplasmatischen Regionen besitzen einen hoch-konservierten Sequenzbereich von 17 Aminosäuren, der in Rgt2 einmal und in Snf3 zweimal vorkommt, und der der Signalweiterleitung dient (Kruckeberg, 1996; Boles, 2002). Snf3 dient als Sensor für geringe Glukosekonzentrationen und vermittelt die Expression der Transporter gene *HXT2*, *HXT3*, *HXT4*, *HXT6* und *HXT7*. Rgt2 dient als Sensor für hohe Glukosekonzentrationen und induziert die Expression der niederaffinen Glukosetransporter gene *HXT1* und *HXT3* (Boles und Hollenberg, 1997).

Die extrazelluläre Glukose induziert die Expression der Hexosetransporter über den Transkriptionsfaktor Rgt1 (Abb. 2). Rgt1 kann in Abhängigkeit von dem Glukosesignal als Repressor oder als indirekter Aktivator wirken: Bei Abwesenheit von Glukose wirkt Rgt1 als Repressor und rekrutiert den Tup1-Cyc8-Korepressor-Komplex zu den *HXT*-Promotoren. Bei Anwesenheit niedriger Glukosekonzentrationen gelangt ein Signal über Snf3 in die Hefezelle und Rgt1 nimmt eine neutrale Rolle bei der Transkription der Hexosetransporter ein. Bei Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen leitet Rgt2 das Signal in die Zelle und Rgt1 dient als indirekter Aktivator von *HXT1* (Özcan *et al.*, 1996; Mosley *et al.*,

2003). Das Glukosesignal verläuft von den Glukosesensoren zu dem DNA-Bindeprotein Rgt1 über zwei Proteine Mth1 und Std1, die mit den C-Termini der Sensoren interagieren (Schmidt *et al.*, 1999; Lafuente *et al.*, 2000; Schulte *et al.*, 2000), und über den Ubiquitin-konjugierenden Enzymkomplex SCF^{Grr1}, der aus



dem F-Box-Protein Grr1 und den Proteinen Skp1 und Cdc53 besteht (Özcan und Johnston, 1995; Li und Johnston, 1997; Boles und André, 2004).

Abb. 2: Der Glukose-Signalweg der Hefe. (Erläuterungen im Text).

Bei Abwesenheit von Glukose interagieren Mth1 und Std1 mit Rgt1 im Nukleus und verhindern eine Hyperphosphorylierung des Repressors (Flick *et al.*, 2003). Dadurch ist Rgt1 in der Lage den Tup1-Cyc8-Korepressor-Komplex zu rekrutieren und die Expression der Hexosetransportergene *HXT1*, *HXT2*, *HXT3* und *HXT4* zu reprimieren (Abb. 2A) (Flick *et al.*, 2003; Mosley *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003). Bei Anwesenheit geringer extrazellulärer Glukosekonzentrationen wird über den Sensor Snf3 ein Signal in die Zelle geleitet, das die Casein-Kinase I (Yck1) aktiviert, die Mth1 und Std1 phosphoryliert. Die Phosphorylierungen markieren beide Proteine für den SCF^{Grr1}-Komplex, Mth1 wird ubiquitiniert und beide Proteine werden über das 26S-Proteasom abgebaut (Moriya und Johnston, 2004). Mth1 und Std1 stehen somit im Nukleus nicht zur Verfügung und können die Hyperphosphorylierung von Rgt1 (durch eine noch unbekannte Kinase) nicht verhindern. Rgt1 verlässt den Promotor der Hexosetransporter und es kommt zu einer Derepression der Gene (Abb. 2B). Bei Anwesenheit hoher extrazellulärer Glukosekonzentrationen wird das Signal über Rgt2 in die Zelle geleitet. Wie auch bei geringen Glukosekonzentrationen führt der Signalweg zu einer Hyperphosphorylierung von Rgt1 und damit dazu, dass Rgt1 die Promotoren verlässt. Mosley *et al.* (2003) konnten zeigen, dass Rgt1 nicht direkt an den *HXT1*-Promotor zur Induktion der Transkription bindet. Daher wird vermutet, dass die Induktion indirekt über einen noch unbekanntem Aktivator verläuft, der seinerseits durch die hyperphosphorylierte Form von Rgt1 aktiviert wird (Abb. 2C) (Mosley *et al.* 2003).

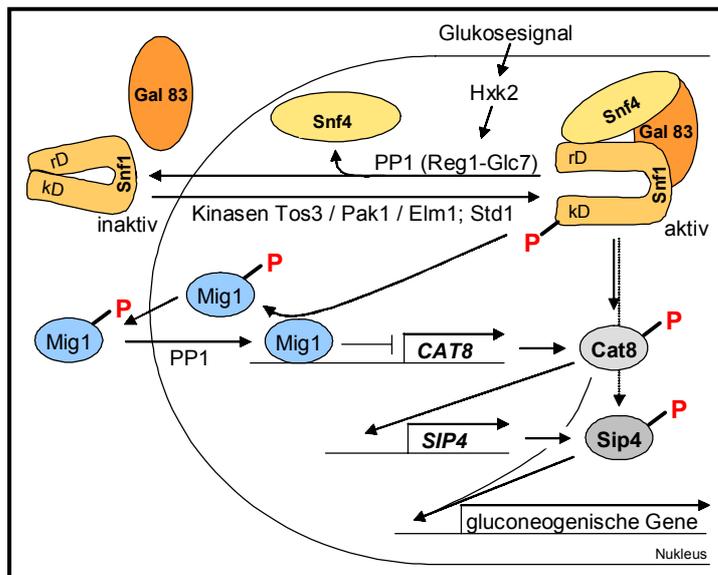
Neben der Regulation über die Glukosesensoren, Mth1 und Std1, den SCF^{Grr1}-Komplex und Rgt1 werden die Hexosetransportergene auch über die Signalwege der Glukoserepression reguliert. Daher kommt es z.B. bei extrazellulär hohen Glukosekonzentrationen zur Repression der Gene *HXT2*, *HXT4*, *HXT6* und *HXT7*.

1.1.3 Glukoserepression

Neben Glukose kann die Hefe ein weites Spektrum anderer Zucker als Kohlenstoffquelle nutzen. Die Hexosen Glukose und Fruktose werden jedoch bevorzugt verwertet, so dass Zucker wie Galaktose und Saccharose in Anwesenheit von Glukose nicht metabolisiert werden (Carlson, 1987). Die bei Wachstum auf Glukose nicht benötigten Gene, wie Enzymgene für die Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen, für die Glukoneogenese oder für die Atmungskette werden reprimiert (Bisson, 1988; Entian und Schüller, 1997). Die Regulation der Expression dieser Gene wird als Kohlenstoffkatabolitrepression oder als Glukoserepression bezeichnet und erfolgt in erster Linie auf transkriptioneller Ebene. Die wichtigsten Regulatoren des Glukoserepressionsweges sind der Snf1-Serin/Threonin-Proteinkinasekomplex und der DNA-bindende Transkriptionsrepressor Mig1 (Celenza und Carlson, 1986; Carlson, 1987).

Der Snf1-Serin/Threonin-Proteinkinasekomplex ist notwendig für die Derepression von Genen, die durch Glukose reprimiert wurden. Der Komplex besteht aus drei Untereinheiten: Der α -Untereinheit Snf1, der β -Untereinheit Sip1, Sip2 oder Gal83 und der γ -Untereinheit Snf4 (Abb. 3). Eine der drei β -Untereinheiten Sip1, Sip2 oder Gal83 interagiert mit Snf1 und Snf4 und sorgt für die Assoziation des Komplexes (Jiang und Carlson, 1996). Sip1, Sip2 und Gal83 sind an unterschiedlichen Orten in der Zelle lokalisiert. Gal83 zeigt einen Glukose-regulierten Lokalisationswechsel zwischen Cytoplasma und Nukleus. Bei Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wird Snf1 Gal83-abhängig aus dem Cytoplasma in den Nukleus transloziert (Vincent *et al.*, 2001). Die katalytische Domäne (kD) der Kinase Snf1 wird durch eine der drei Kinasen Tos3, Pak1 oder Elm1 phosphoryliert (Hong *et al.*, 2003). Std1 bindet kurzzeitig an die katalytische Domäne von Snf1 und fördert dadurch, dass die γ -Untereinheit Snf4, die ständig im Nukleus vorliegt, an die regulatorische Domäne (rD) von Snf1 binden kann. Eine Bindung der regulatorischen an die katalytische Domäne wird somit verhindert (Kuchin *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2001; Jiang und Carlson, 1996). Bei Anwesenheit von Glukose erfolgt, vermittelt durch Hxk2, eine Dephosphorylierung von Snf1 durch die Protein-Phosphatase PPI. Dabei wird zunächst die regulatorische Untereinheit der PP1, Reg1, aktiviert, die wiederum die katalytische Untereinheit Glc7 aktiviert (Tu und Carlson, 1994; Ludin *et al.*, 1998; Sanz *et*

al., 2000). Diese Dephosphorylierung schwächt die Interaktion von Snf4 mit der



regulatorischen Domäne von Snf1, so dass diese an die katalytische Domäne bindet und die Kinaseaktivität inhibiert wird (Jiang und Carlson, 1996). Es erfolgt eine Translokation der α -Untereinheit Snf1 und der β -Untereinheit Gal83 ins Cytoplasma, während Snf4 den Kern nicht verläßt (Vincent *et al.*, 2001).

Abb. 3: **Glukoserepression in der Hefe.** (Erläuterungen im Text).

Neben der eigenen Lokalisation induziert der Snf1-Kinasekomplex auch die Translokation des Repressorproteins Mig1 (Yang *et al.*, 1994; Treitel *et al.*, 1998). Mig1 ist im dephosphorylierten Zustand Kern-lokalisiert, bindet an die Promotoren Glukose-reprimierter Gene und rekrutiert den globalen Korepressor-Komplex Tup1-Cyc8 (Treitel und Carlson, 1995; Tzamarias und Struhl, 1994). Als Antwort auf eine Glukoselimitierung phosphoryliert der aktive, Kern-lokalisierte Snf1-Kinasekomplex Mig1, induziert somit den Kern-Export von Mig1 und inhibiert die Repressor-Funktion (DeVit *et al.*, 1997). Die Dephosphorylierung von Mig1 erfolgt wie auch die Dephosphorylierung von Snf1 durch die Proteinphosphatase PPI (DeVit *et al.*, 1997).

Neben der Inhibierung des Repressors Mig1 ist der Snf1-Kinasekomplex auch für die Aktivierung der Expression Glukose-reprimierter Gene mit CSRE-Promotorelemente („carbon source-responsive element“) verantwortlich (Vincent und Carlson, 1998). Bei Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen erfolgt eine Genaktivierung über die Transkriptionsaktivatoren Sip4 und Cat8. Cat8 wird von dem Snf1-Kinasekomplex phosphoryliert und induziert daraufhin die Expression von SIP4. Die β -Untereinheit Gal83 des Snf1-Kinasekomplexes bindet an Sip4 und vermittelt die Phosphorylierung von Sip4 durch Snf1 (Vincent und Carlson, 1999). Cat8 und Sip4 binden in phosphorylierter Form an CRSE-Bindestellen in Promotorregionen und vermittelt zum einen die Expression weiterer CRSE-bindender Aktivatoren und zum anderen die transkriptionelle Aktivierung glukoneogener Gene. Die Transkriptionsaktivierung von CRSE-

abhängigen Genen durch Cat8 und Sip4 erfolgt ungleichmäßig verteilt (85% über Cat8, 15% über Sip4) (Vincent und Carlson, 1998; Hiesinger *et al.*, 2001).

Das die Glukoserepression auslösende Signal ist noch nicht identifiziert. Eine der ersten Mutanten mit Defekten in der Glukoserepression war die Hexokinase Hxk2 (Zimmermann und Scheel, 1977). Aktuelle Untersuchungen zeigen zum einen einen Zusammenhang zwischen Hxk2 und der Phosphorylierung von Reg1 (Bisson und Kunathigan, 2003) und zum anderen, dass Hxk2 Mig1-abhängig in den Nukleus transportiert wird (Ahuatzi *et al.*, 2004). Als zweites mögliches Signal wird das cAMP/ATP-Verhältnis der Zelle postuliert (Wilson *et al.*, 1996). Möglicherweise sorgt auch der Anstieg des cAMP-Spiegels in der Zelle für ein schnelles, erstes Signal zur Aktivierung des Snf1-Kinasekomplexes bei Abwesenheit von Glukose, während Hxk2 für ein späteres Signal verantwortlich ist (Sanz *et al.*, 1996). Eine wichtige Rolle bei der Glukoserepression könnte auch Std1 spielen, das neben der Aufgabe bei der Expression der Hexosetransporter (vgl. 1.1.2) auch bei der Konformationsänderung des Snf1-Kinasekomplexes eine Rolle spielt (Kuchin *et al.*, 2003).

1.2 Sekretionsweg der Transporter zur Plasmamembran

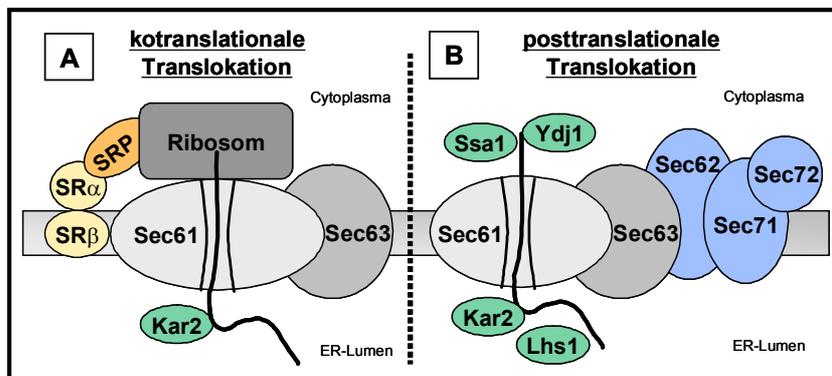
Die eukaryotische Zelle ist in mehrere Reaktionsräume, die Organellen, unterteilt. Diese Membran-umschlossenen Kompartimente ermöglichen der Zelle verschiedenste Reaktionen auf engem Raum ohne gegenseitige Beeinflussung durchzuführen. Der Austausch von Proteinen aus einem Kompartiment in ein anderes erfolgt über Transportvesikel, die sich von der Ausgangsmembran durch Knospung abschnüren und mit der Zielmembran fusionieren. Drei Arten von Vesikeln wurden identifiziert, die sich in ihren Proteinhüllen und ihren Transportwegen unterscheiden: Clathrin, COPI und COPII (COP = „coat protein“) (Cosson und Letourneur, 1994; Pishvae und Payne, 1998; Schmid, 1997).

Neu-synthetisierte Proteine, wie Membranproteine und sekretorische Proteine, gelangen vom endoplasmatischen Retikulum (ER) über COPII-Vesikel zum Golgi-Apparat. Dieser zeigt einen polaren Aufbau, so dass zwischen cis-Golgi-Netzwerk (CGN), cis-, medial- und trans-Golgi, und trans-Golgi-Netzwerk (TGN) unterschieden wird. Vom CGN und cis-Golgi aus findet zum einen ein anterograder (vorwärts gerichteter) und ein retrograder (rückwärts gerichteter) Transport von Proteinen statt. Hier entscheidet sich, ob ein Protein aufgrund eines ER-Rückhaltesignales über COPI-Vesikel zum ER zurück oder aber vorwärts zum Golgi-Apparat transportiert wird. Im TGN entscheidet sich, ob das Protein zur

Vakuole oder zur Plasmamembran transportiert wird (Jackson *et al.*, 1990; Nilsson *et al.*, 1989; Griffiths und Simon, 1986; Lemmon und Traub, 2000).

1.2.1 Die Translokation und die Insertion in die Membran

Proteine, die in die ER-Membran oder in das ER-Lumen gelangen sollen, werden in der Regel mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert. Diese Proteine können auf zwei unterschiedlichen Wegen in das ER transloziert werden: Der kotranslationale Weg erfolgt über ein Ribonukleoproteinkomplex SRP („signal recognition particle“) und der posttranslationale Weg wird durch den Sec-Komplex vermittelt (Ng *et al.*, 1996). Beide Translokationswege existieren parallel. Postuliert wird, dass die Hydrophobizität der Signalsequenz entscheidend dafür ist, ob ein Protein ko- oder posttranslational transloziert wird. Stark hydrophobe Signalsequenzen werden durch das SRP bevorzugt erkannt und dann kotranslational transportiert (Ng *et al.*, 1996). Auf beiden Translokationswegen wird das Protein dem ER-Membran-Translokon Sec61, bestehend aus einem Heterotrimer aus Sec61 (=α-Untereinheit), Sbh1 (=β-Untereinheit) und Sss1 (=γ-Untereinheit), zum Transport übergeben (Esnault *et al.*, 1993; 1994; Panzner *et al.*, 1995). Neben dem Sec61-Translokon wurde in der Hefe noch ein zweites Translokon aus Ssh1 (=α-Untereinheit), Sbh2 (=β-Untereinheit) und Sss1 (=γ-Untereinheit) identifiziert (Finke *et al.*, 1996). Finke *et al.* (1996) postulierten, dass dieser Ssh1-Komplex nur eine kotranslational Translokation ermöglicht.



Damit wäre die essentielle Natur des Sec61-Translokons auf seine Funktion in der posttranslationalen Translokation zurückzuführen.

Abb. 4: Ko- und posttranslationale Translokation von Proteinen. (Erläuterungen im Text).

Bei der kotranslationalen Translokation (Abb. 4A) bindet das SRP an die Signalsequenz der naszierenden Polypeptidkette und gleichzeitig an das synthetisierende Ribosom, wodurch die Translation verlangsamt wird (Walter *et al.*, 2000; Lauring *et al.*, 1995). Das SRP rekrutiert das Polypeptid samt Ribosom zur ER-Membran, indem es selbst an die α-Untereinheit des SRP-Rezeptors (SR) bindet. Die Interaktion mit SRα führt zur Hydrolyse von GTP wodurch das SRP wieder ins

Cytoplasma freigesetzt wird, während das Ribosom an den Sec61-Komplex gebunden bleibt und das naszierende Polypeptid in die Translokationspore entläßt (Johnson und van Waes, 1999; Connolly und Gilmore, 1993; Rapiejko und Gilmore, 1994). Das Innere der Pore ist ein wäßriger Kanal, durch den Transmembrandomänen während ihrer Translokation lateral in die ER-Membran geschleust werden (Martoglio *et al.*, 1995).

Bei der SRP-unabhängigen, posttranslationalen Translokation wird das unreife Vorläuferprotein samt Signalsequenz im Cytosol fertig synthetisiert und vom Ribosom abgelöst, bevor es in Interaktion mit dem Translokon tritt. Der posttranslationalen Translokationskomplex ist ein heptamerer Sec-Komplex, bestehend aus dem Sec61- und dem Sec62-Sec63-Komplex (Abb. 4B). Der Sec62-Sec63-Komplex besteht seinerseits aus den integralen Membranproteinen Sec62, Sec63 und Sec71 und dem peripheren Membranprotein Sec72. Diese bilden einen Tetramerkomplex, der mit dem Sec61-Translokon in Interaktion tritt (Agarraberes und Dice, 2001). Die posttranslationalen Translokation erfordert zusätzlich noch die cytosolischen Chaperone Ssa1 und Ydj1, die das Protein für die Translokation in einer ungefalteten Konformation halten (Wilkinson *et al.*, 1997).

Beide Translokationswege benötigen für eine vollständige Translokation das ER-luminale Chaperon Kar2 (das BiP-Homologe der Hefe). Zwei Modelle beschreiben die Funktion von Kar2 bei der Translokation. Das erste Modell, die so genannte „Brown'sche Ratsche“ („brownian ratchet“), spricht Kar2 eine passive Rolle im ER-Lumen zu. Hierbei bindet Kar2 an bereits translozierte Proteinabschnitte und verhindert einen Retrotransport der Proteine in das Cytoplasma (Simon *et al.*, 1992). Das zweite Modell versteht Kar2 zusammen mit Sec63 als einen Motor, der sukzessive durch die Bindung und Hydrolyse von ATP das Protein in das ER-Lumen zieht (Glick, 1995). Plath *et al.* (1998) konnten zeigen, dass im Falle der posttranslationalen Translokation der Sec62-Sec71-Sec72-Komplex durch Kar2 mittels einer ATP-abhängigen Interaktion mit Sec63 aktiviert wird. Neben Kar2 wurde bei der posttranslationalen Translokation noch ein weiteres ER-Chaperon Lhs1 identifiziert. Dieses zur Hsp70-Familie gehörende Chaperon hat vermutlich ähnliche Aufgaben wie Kar2 und wird bei der Protein-Translokation und bei der Protein-Faltung benötigt (Craven *et al.*, 1996).

1.2.2 Das UPR-System

Proteine, die über das ER zu den verschiedenen Kompartimenten transportiert werden sollen, müssen korrekt gefaltet vorliegen. Ein Mechanismus der Zelle, die Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen im ER-Lumen zu verhindern, ist die „unfolded protein response“ (UPR). Dabei handelt es sich um einen Signalweg

zwischen ER und Nukleus, so dass die Zelle als Antwort auf falsch gefaltete Proteine mit der Expression von UPR-Zielgenen reagieren kann (Abb. 5).

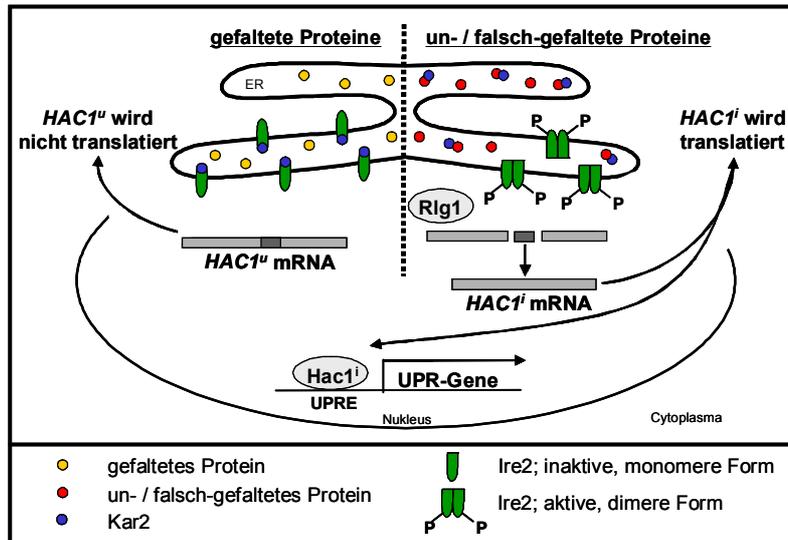


Abb. 5: **Modell des UPR-Signalweges in *S. cerevisiae*.** (Erläuterungen im Text).

Die ER-ständige Transmembran-Serin/Threonin-Kinase Ire2 liegt in ihrer inaktiven Form als Monomer vor und bindet in diesem Zustand das ER-luminale Chaperon Kar2. Bei Anwesenheit von falsch gefalteten Proteinen dissoziiert Kar2 von Ire2 und bindet an die falsch gefalteten Proteine. Ire2 liegt daraufhin ungebunden im ER vor und bildet Dimere aus. Diese Dimerisierung führt zu einer trans-Autophosphorylierung, die eine Aktivierung der Endonukleaseaktivität der cytoplasmatischen Domäne von Ire2 zur Folge hat. Diese Nukleaseaktivität von Ire2 in Kombination mit der tRNA-Ligase Rlg1 führt zur Entfernung des Introns der konstitutiv exprimierten *HAC1^u* mRNA und dies wiederum zur Synthese des UPR-spezifischen Transkriptionsfaktors *Hac1ⁱ*. Dieser kann nach Translokation in den Nukleus an die UPR-Elemente („UPRE“) in den Promotorbereichen binden, so dass die UPR-spezifischen Gene exprimiert werden (Hohenblum *et al.*, 2003; Griffith *et al.*, 2003). Die Induktion der Expression UPR-spezifischer Gene führt zu einer erhöhten Konzentration an Chaperonen, die versuchen das Faltungsproblem zu beheben. Genom-weite Expressionsstudien zeigten, dass durch die Aktivierung des UPR-Systems die Expression von über 350 Genen hochreguliert wird, die neben einer Rolle als Chaperon auch bei der Translokation, der Glykosylierung, dem Vesikel-Transport oder der ER-assoziierten Degradation über das ERAD-System eine Rolle spielen (Travers *et al.*, 2000).

1.2.3 Das ERAD-System

Nicht alle falsch gefalteten oder ungefalteten Proteine können mit Hilfe des UPR-Systems ihre native Konformation im ER erzielen. Daher hat die Zelle ein System

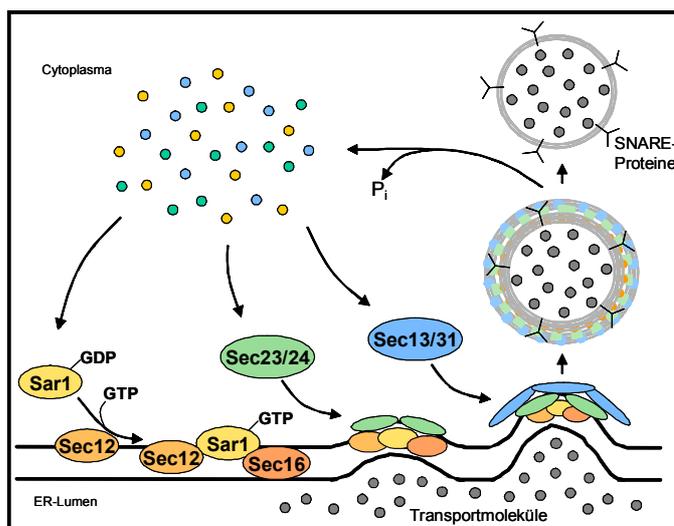
der ER-Qualitätskontrolle entwickelt, wodurch solche Proteine identifiziert und abgebaut werden. Dieses ER-assoziierte Protein-Degradationssystem (ERAD; „ER-associated protein degradation“;) besteht aus 4 Schritten: Zu Beginn wird die Falschfaltung des Proteins registriert. Im zweiten Schritt findet der Export des Proteins über die Translokationspore in das Cytoplasma statt (Retrotranslokation), wo das Protein polyubiquitiniert und ins Cytosol freigesetzt wird. Schließlich wird das Protein über das Proteasom abgebaut (Tsai *et al.*, 2002).

Der exakte Mechanismus des ERAD-Systems ist noch weitgehend unbekannt. Es wird postuliert, dass viele der molekularen Chaperone, die in die Proteinfaltung im ER involviert sind, auch bei der Retrotranslokation der Proteine aus dem ER ins Cytosol eine Rolle spielen. Eventuell exponieren die falsch oder nicht gefalteten Proteine strukturelle Motive oder hydrophobe Bereiche, mit denen Chaperone in Interaktion treten können. So werden die Chaperone Kar2, Calnexin und die Protein-Disulfidisomerase PDI für die Degradation von manchen ERAD-Substraten benötigt. Zwei lumenale Hsp40-Homologe der Hefe Scj1 und Jem1 interagieren mit Kar2 und helfen, dass die falsch gefalteten Proteine nicht vor ihrer Retrotranslokation aggregieren. Eine Aggregation der Substrate vor dem Export aus dem ER würde einen Transport durch die Translokationspore verhindern (Fewell *et al.*, 2001). Die Retrotranslokation der Proteine verläuft über das Sec61-Translokon (Plempner *et al.*, 1997; Pilon *et al.*, 1997). Die Polyubiquitinierung der Proteine erfolgt direkt an der cytosolischen Seite der ER-Membran, noch bevor die Translokation abgeschlossen ist und das Protein in das Cytosol zum Abbau über das Proteasom entlassen wird (Hiller *et al.*, 1996; Shamu *et al.*, 1999; 2001). Misgefaltete Proteine können durch das E2 Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc7, das über Cue1 und Ubc1 in der ER-Membran verankert ist, und über das ER-Membranprotein Ubc6 ubiquitiniert und abgebaut werden. Mutationen in den beiden Enzymen Ubc6 und Ubc7 führen zu einer Stabilisierung verschiedener ERAD-Substrate (Hiller *et al.*, 1996; Biederer *et al.*, 1996; 1997; Friedlander *et al.*, 2000). Die Ubiquitinierung kann auch über die E3 Ubiquitin-Ligase Hrd1, die zusammen mit dem stabilisierenden Partnerprotein Hrd3 einen ER-Membran durchspannenden Komplex bildet, oder durch die Ubiquitin-Ligase Doa10, erfolgen (Gardner *et al.*, 2000; Bays *et al.*, 2001; Hitchcock *et al.*, 2003). Die Ubiquitin-spezifische Protease Doa4 ist notwendig, um die Polyubiquitin-Kette von den ERAD-Substraten vor deren Abbau über das Proteasom zu entfernen und somit den Ubiquitin-Pool der Zelle wieder aufzufüllen (Papa und Hochstrasser, 1993; Brew und Huffaker, 2002).

1.2.4 Transport vom ER zum Golgi-Apparat in COPII-Vesikeln

Der Transport von Proteinen vom ER zum Golgi-Apparat verläuft über COPII-Vesikel, deren Coatomer sich aus 5 verschiedenen Proteinen zusammensetzt: der GTPase Sar1, einem Heterodimer aus Sec23 und Sec24 und einem Heterotetramer aus Sec13 und Sec31 (Barlowe *et al.*, 1994; Lederkremer *et al.*, 2001).

Die Bildung der COPII-Vesikel verläuft in mehreren Schritten (Abb. 6): Der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Sec12 (GEF; „guanine nucleotide exchange factor“) tauscht GTP gegen das gebundene GDP von Sar1 aus (Nakano *et al.*, 1988; Oka *et al.*, 1991; Barlowe und Schekman, 1993). Sar1 ist ein kleines G-Protein, das im GDP-gebundenen Zustand frei im Cytosol und bei dem Austausch gegen GTP an die Membran gebunden vorliegt (Goldberg, 1998; Bi *et al.*, 2002). Die GTP-gebundene Form von Sar1 setzt N-terminal eine Membran-Ankersequenz frei, wodurch es an die Membran bindet. Die Konformationsänderung erhöht die Affinität des heterodimeren Komplexes aus Sec23 und Sec24, der an Sar1 bindet und die innere Hülle bildet (Bi *et al.*, 2002). Es bildet



sich ein so genannter Prä-Knospenkomplex aus, in den die Transportmoleküle und die Rezeptorproteine (SNARE's) aufgenommen werden. Anschließend wird die äußere Hülle um die Knospe durch ein Heterotetramer aus Sec13 und Sec31 gebildet und die COPII-Vesikel werden abgeschnürt (Matsuoka *et al.*, 2001).

Abb. 6: **Bildung der COPII-Vesikel.** (Erläuterungen im Text)

Neben den in die COPII-Vesikel verpackten Proteinen Sar1, Sec23/24 und Sec13/31 spielt das periphere ER-Membranprotein Sec16 eine essentielle Rolle bei der Bildung der COPII-Vesikel. Sec16 kann an Sec23, Sec24 und Sec31 binden und es wird postuliert, dass Sec16 bei der Bildung der COPII-Vesikel als Gerüstprotein hilft. Zusätzlich wird vermutet, dass Sec16 ebenso wie das Sec12-Homologe Sed4 die GTPase-Aktivität von Sar1 entweder direkt oder indirekt über

Sec23 negativ beeinflusst (Espenshade *et al.*, 1995; Gimeno *et al.*, 1995; 1996; Shaywitz *et al.*, 1997; Saito-Nakano und Nakano, 2000).

Die Sar1-eigene GTPase-Aktivität hydrolysiert nach der Knospung das GTP, wodurch es zu einer Destabilisierung der Vesikelhülle kommt (Barlowe *et al.*, 1994). Die GTPase-Aktivität von Sar1 alleine ist allerdings sehr gering und wird erst durch Sec23, ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP), erhöht (Yoshihisa *et al.*, 1993). Weiterhin führt die Anwesenheit der Komponenten Sec13 und Sec31 der äußeren Hülle zu einer Verstärkung der GAP-Aktivität von Sec23 (Antonny *et al.*, 2001). Die Entfernung der Vesikel-Hülle aufgrund der Hydrolyse von GTP ist notwendig um die Rezeptorproteine der COPII-Vesikel freizulegen. Diese SNARE-Proteine sind zum einen auf der Vesikeloberfläche („vesicle membrane“; v-SNARE) und zum anderen auf der Empfängermembran („target membrane“; t-SNARE) lokalisiert. Bet1, Bos1, Sec22 und Sed5 dienen als SNARE-Proteine und ermöglichen ein Andocken der Vesikel an die Membran des Golgi-Apparates (Barlowe *et al.*, 1994; Lian und Ferro-Novick, 1993; Rexach *et al.*, 1994; Rothman, 1994).

1.2.5 COPI- und Clathrin-Vesikel

Im Gegensatz zu COPII-Vesikeln sind COPI-Vesikel an mehreren Schritten des Proteintransportes beteiligt: an dem bidirektionalen Transport innerhalb des Golgi-Apparates und an dem retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum ER (Orci *et al.*, 1986; Wieland und Harter, 1999; Lowe und Kreis, 1998; Harter und Reinhard, 2000; Nickel und Wieland, 1998). COPI-Vesikel bestehen aus einer kleinen GTPase Arf1 und einem Coatomer aus 7 Untereinheiten (α -, β -, β' -, γ -, δ -, ε -, ζ -COP) (Serafini *et al.*, 1991; Waters *et al.*, 1991). Der retrograde Transport vom Golgi-Apparat zum ER bewirkt, dass ER-Proteine, die in COPII-Vesikeln mit verpackt werden, an ihren Wirkort zurückkehren können. Als Erkennungssequenz für den retrograden Transport kann eine HDEL-Sequenz (KDEL in Säugern) oder ein Dilysin-Motiv (KKXX-Sequenz) dienen. Die HDEL-Sequenz wird durch das Golgi-Protein Erd2 erkannt und dieses rekrutiert die ER-Proteine in die COPI-Vesikel (Semenza *et al.*, 1990). Das C-terminale Dilysin-Motiv bindet direkt an die COPI-Coatomer-Komponenten α -, β' - und ε -COP und wird dabei in die COPI-Vesikel verpackt (Jackson *et al.*, 1993; Letourneur *et al.*, 1994; Harter *et al.*, 1996). Zusätzlich existiert in der Hefe ein Rer1-abhängiger retrograder Transport. Hierbei besitzen die Transmembrandomänen der Proteine eine Rücktransport-Sequenz, an die das Golgi-Protein Rer1 bindet, um die Proteine in COPI-Vesikel zu verpacken (Sato *et al.*, 2003).

Clathrin-Vesikel findet man bei der Endozytose und bei dem Transport vom trans-Golgi-Netzwerk zur Vakuole. Das Protein Clathrin ist ein Heterohexamer aus drei schweren und drei leichten Untereinheiten, die aneinander gebunden die Form eines Triskelions bilden. Innerhalb des Komplexes ist jeweils eine schwere mit einer leichten Untereinheit assoziiert und drei schwere Untereinheiten sind C-terminal miteinander verbunden (Smith und Pearse, 1999; Liu *et al.*, 1995).

1.3 Suche nach *gsf*-Mutanten im Glukoserepressionssignalweg

Sherwood und Carlson (1997) publizierten eine Methode, mit der sie Gene identifizieren wollten, die an der Regulation der Snf1-Proteinkinaseaktivität beteiligt sind. Sie suchten nach Mutanten, die trotz Wachstum auf Glukose eine normalerweise Glukose-reprimierte *SUC2*_{Promotor}::*HIS3*-Genfusion (Suc2 = Invertase) exprimierten (vgl. 1.1.3). Ziel war es, Gene zu finden, die die extrazelluläre Glukose registrieren, ein Glukosesignal generieren oder das noch unbekannte Glukoserepressionssignal auf die Aktivität der Snf1-Kinase übertragen. Neben vielen bekannten Mutanten, die abwärts der Snf1-Kinase in der Glukoserepression beteiligt sind, wurden 3 neue Faktoren identifiziert und mit „Gsf“ („glucose signaling factor“) bezeichnet: die rezessiven Mutationen *gsf1* und *gsf2* und die dominante Mutation *GSF4-1* (Sherwood und Carlson, 1997; Sherwood *et al.*, 2000).

Bei der dominanten Mutation *GSF4-1* handelte es sich um ein nicht-funktionelles chimäres Protein der Hexosetransporter Hxt1 und Hxt4 (Sherwood *et al.*, 2000). Die Transportergene *HXT1* und *HXT4* liegen zusammen mit *HXT5* in einem Cluster auf dem rechten Arm von Chromosom VIII. Bei der Suche nach Glukoserepressionsmutanten führte eine genomische homologe Rekombination der Gene *HXT1* und *HXT4* zu einem chimären Transportergen. Der Übergang der Transporter Hxt1 und Hxt4 liegt am Anfang der 10ten Transmembrandomäne. Die *GSF4-1*-Mutante zeigte in dem Screen eine 20fach erhöhte Expression von *SUC2* im Vergleich zu dem korrespondierenden Wildtyp bei Wachstum auf Glukose. Die Autoren postulierten, dass das Hxt1/4-Chimär mit den nativen Hexosetransportern interagieren und nicht-funktionelle Komplexe bilden kann. Die Anzahl an funktionellen Glukosetransporter-Komplexen sei daraufhin so stark vermindert, dass der Glukosetransport inhibiert und der Glukoserepressionsphänotyp aufgehoben sei (Sherwood *et al.*, 2000).

Bei den Mutationen *gsf1* und *gsf2* zeigte sich, dass Gsf1 neben der Glukoserepression auch auf die Glukoseinduktion der Hexosetransporter einen Einfluss hatte, während Gsf2 nur auf die Glukoserepression wirkte. Beide

Mutanten zeigten entgegen dem Wildtyp eine konstitutive Expression von *SUC2* und eine erhöhte Expression von *GAL10* bei Anwesenheit von Glukose. Die *gsf1*-Mutante zeigte eine verminderte *HXT1*-Expression, während *gsf2* darauf keinen Einfluss hatte. Die *gsf2*-Mutation zeigte hingegen einen synthetisch lethalen Phänotyp in Kombination mit einer *snf1*-Deletion (Sherwood und Carlson, 1997). Während das *GSF1*-Gen noch nicht identifiziert ist, wurde *GSF2* bereits kloniert und charakterisiert. *GSF2* kodiert für ein 46kDa ER-Protein mit einer mutmaßlichen Transmembrandomäne und einem C-terminalen Dilysin-Motiv. Mutationen in *gsf2* führten zu einer Akkumulation des niederaffinen Hexosetransporters Hxt1 und des Galaktosetransporters Gal2 im ER, während Hxt2 weiterhin an der Plasmamembran lokalisiert war. Sherwood und Carlson (1999) postulierten, dass Gsf2 entweder bei der Reifung von Hxt1 und Gal2 zu einer Konformation, die durch den Sekretionsweg transportiert werden kann, notwendig ist, oder dass Gsf2 für den Eintritt der Permeasen in die Transportvesikel benötigt wird.

1.4 Gsf2-ähnliche Proteine

Die Anzahl an identifizierten Transportproteinen, die für ihren Transport vom ER zum Golgi-Apparat Hilfsproteine benötigen, steigt stetig an. Die Mehrzahl der Proteine, die den Sekretionsweg durchlaufen, wird aktiv in die COPII-Vesikel eingeschleust und dort aufkonzentriert. Die meisten Membranproteine verlassen das ER dadurch, dass sie direkt an die Coatmerproteine der COPII-Vesikel binden (Kuehn *et al.*, 1998; Aridor *et al.*, 1998; Votsmeier und Gallwitz, 2001). Manche Membranproteine und ein Großteil der löslichen Proteine binden allerdings nur indirekt mit Hilfe von Exportrezeptoren an die Vesikel (Appenzeller *et al.*, 1999; Muniz *et al.* 2000; Powers und Barlowe, 2002). Diese Exportrezeptoren verlassen das ER meist gemeinsam mit dem zu transportierenden Protein, lassen das Protein im Golgi-Apparat frei und werden selbst zurück zum ER recycelt.

Sec24 bildet zusammen mit Sec23 die innere Hülle der COPII-Vesikel aus. Zusätzlich wird Sec24 benötigt, damit die SNARE-Proteine Bet1, Sed5 und Sec22 daran binden können und somit in die COPII-Vesikel verpackt werden (Peng *et al.*, 1999; Springer und Scheckman, 1998). In *S. cerevisiae* existieren mindestens zwei Sec24-ähnliche Proteine: Iss1 und Lst1. Eine *iss1*-Deletion zeigt keinen Phänotyp, führt allerdings in Kombination mit Mutationen in den Genen der SNARE-Proteine *SEC22* und *BET1* zu einer synthetischen Lethalität (Kurihara *et al.*, 2000). Eine Überexpression von *ISS1* ist in der Lage eine *sec24*-Mutation zu

supprimieren (Peng *et al.*, 2000). Lst1 ist ebenso wie Sec24 ein peripheres ER-Membranprotein, das an die COPII-Untereinheit Sec23 binden kann. Ebenso wie Iss1 ist auch Lst1 nicht essentiell. Im Gegensatz zu *ISS1* zeigt die Deletion von *LST1* jedoch einen Phänotyp: Die Plasmamembran-ATPase Pma1 wird in dieser Mutante nicht mehr zur Plasmamembran transportiert (Roberg *et al.*, 1999). Heterodimere aus Sec23/Lst1 sind folglich notwendig, damit Pma1 die Plasmamembran erreicht. Miller *et al.* (2002, 2003) zeigten, dass bei COPII-Vesikeln, deren innere Hülle ausschließlich aus Sec23/Lst1 besteht, die SNARE-Proteine Bos1, Bet1 und Sec22 nicht verpackt werden. Diese Vesikel sind folglich nicht in der Lage mit der Membran des Golgi-Apparates zu fusionieren. Eine Kombination von Sec23/Sec24- und Sec23/Lst1-Heterodimeren führt zu einer Vergrößerung der COPII-Vesikel, was eine Verpackung von größeren Proteinen, wie Pma1, ermöglichen kann (Shimoni *et al.*, 2000).

Neben Lst1 existieren weitere Hilfsproteine, die gezielt Transportproteinen bei der Verpackung in COPII-Vesikel helfen: Shr3, Pho86, Chs7, Vma21, Pbn1, Erv14, und die p24-Familie. Diese Hilfsproteine werden teilweise auch als Verpackungs-Chaperone bezeichnet. Sie unterscheiden sich darin, dass manche von ihnen (Lst1, Vma21, Erv14, p24-Familie) mit dem zu transportierenden Protein gemeinsam in COPII-Vesikel verpackt werden und nach der Fusion mit der Membran des Golgi-Apparates über COPI-Vesikel wieder recycelt werden, während andere ER-ständig sind und nicht in die COPII-Vesikel gelangen (Shr3, Pho86).

Shr3 ist ein integrales ER-Membranprotein mit vier Transmembrandomänen und einem hydrophilen, cytoplasmatisch orientierten C-Terminus. Mutationen in *SHR3* führen dazu, dass Proteine der Aminosäurepermease-Familie nicht mehr aus dem ER zum Golgi-Apparat transportiert werden (Ljungdahl *et al.*, 1992; Horak und Kotyk, 1993; Kuehn *et al.*, 1996; Gilstring *et al.*, 1999). Studien an der generellen Aminosäurepermease Gap1 zeigten, dass das Protein unabhängig von Shr3 mit allen 12 Transmembrandomänen korrekt in der ER-Membran orientiert vorliegt (Gilstring *et al.*, 1999; Gilstring und Ljungdahl, 2000). Die Permeasen, die aufgrund von *shr3*-Mutationen im ER zurückgehalten werden, zeigten auch keine Induktion des UPR-Systems (Gilstring *et al.*, 1999). Kuehn *et al.* (1996) zeigten, dass bei Abwesenheit von Shr3 nur sehr geringe Mengen Gap1 und Hip1 (Histidin-Permease) in COPII-Vesikel verpackt werden, während bei anderen Proteinen, wie der Invertase oder Pma1, kein Unterschied in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit von Shr3 zu beobachten war. In Abhängigkeit von Shr3 waren Gap1 und Hip1 in den aus Sar1, Sec23 und Sec24 bestehenden Prä-Knospenkomplexen nachweisbar (Kuehn *et al.*, 1998). Eine Interaktion von Shr3 mit den COPII-Komponenten Sec23, Sec24, Sec31 und Sec13 über seinen

cytoplasmatischen C-Terminus konnte gezeigt werden, während eine Interaktion mit Sar1 nicht nachweisbar war.

Der hochaffine Phosphattransporter Pho84 besitzt ebenso wie die Aminosäurepermeasen ein Hilfsprotein: Pho86. Mutationen in *PHO86* führen dazu, dass der Transporter Pho84 im ER zurückgehalten wird, während andere Transportproteine, wie Gal2 und Pma1, weiterhin zur Plasmamembran transportiert werden (Lau *et al.*, 2000). Pho86 hat zwei Transmembrandomänen und einen cytoplasmatisch orientierten C-Terminus. Ebenso wie Shr3 wird auch Pho86 nicht in die COPII-Vesikel verpackt, sondern verbleibt im ER (Lau *et al.*, 2000).

Bei Chs3 handelt es sich um die katalytische Untereinheit der Chitin-Synthase III (CSIII). Der Komplex ist an der Plasmamembran lokalisiert und synthetisiert einen Großteil des zellulären Chitins für die Paarung und Sporulation. Bei Abwesenheit des ER-Proteins Chs7, das vermutlich sieben Transmembrandomänen besitzt, akkumuliert Chs3 im ER, was zu einer reduzierten Chitin-Synthese führt (Trilla *et al.*, 1999).

Die vakuoläre H⁺-ATPase (v-ATPase) ist ein Multi-Untereinheiten-Enzymkomplex, dessen Untereinheiten im ER assemblieren. Die ER-Proteine Vma12, Vma21 und Vma22 sind für die Bildung des Enzymkomplexes im ER notwendig (Hill und Stevens, 1995; Graham *et al.*, 1998). Eine Deletion von *VMA21* führt zu einer Akkumulation von Vph1, der 100kDa-Membran-Untereinheit der v-ATPase, im ER (Graham *et al.*, 1998; Hill und Cooper, 2000). Im Gegensatz zu Shr3 und Pho86, aber vergleichbar mit Gsf2, besitzt Vma21 ein C-terminales Dilysin-Motiv, welches darauf schließen lässt, dass Vma21 zusammen mit der v-ATPase in COPII-Vesikel verpackt wird und vom Golgi-Apparat aus über COPI-Vesikel recycelt wird (Lau *et al.*, 2000).

Die vakuoläre Proteinase B (Prb1) benötigt das ER-lokalisierte integrale Membranprotein Pbn1 für einen Weitertransport zum Golgi und anschließend zur Vakuole. Pbn1 interagiert mit dem Prb1-Propeptid und scheint für die Prozessierung notwendig zu sein (Naik und Jones, 1998).

Das Membran-gebundene Erv14 (ER-Vesikel-Protein) besitzt drei Transmembrandomänen und einen cytoplasmatisch orientierten N-Terminus (Powers und Barlowe, 2002). Das Protein ist in COPII-Vesikeln lokalisiert und wandert zwischen ER und Golgi-Apparat. Eine Deletion von *ERV14* zeigt einen Knospendefekt, da Axl2 im ER akkumuliert und nicht zur Zelloberfläche transportiert wird (Powers und Barlowe, 1998). Axl2 ist ein integrales Plasmamembranprotein, das für das axiale Knospen der Hefe benötigt wird und bei der beginnenden Knospung an dem

Knospenhals der Mutterzelle lokalisiert ist (Halme *et al.*, 1996; Roemer *et al.*, 1996).

Die p24-Familie der Hefe besteht aus 8 verwandten Transmembranproteinen, die sich in die 4 Subfamilien α (Erp1, Erp5, Erp6), β (Emp24), γ (Erp2, Erp3, Erp4) und δ (Erv25) unterteilen lassen. Den p24-Proteinen wird ebenfalls eine Rolle als Hilfsproteine oder Rezeptoren im frühen Sekretionsweg zugeschrieben. Es konnten heterooligomere Komplexe zwischen Mitgliedern der p24-Familie nachgewiesen werden, die teilweise mit Sar1 und Arf1 interagieren und in COPII- und COPI-Vesikeln lokalisiert sind (Belden und Barlowe, 1996; 2001; Schimmoller *et al.*, 1995; Sohn *et al.*, 1996). Die Deletion von p24-Genen führt zu einem verzögerten Transport von Proteinen wie der Glukanosyltransferase Gas1 und der Invertase aus dem ER (Belden und Barlowe, 1996; Elrod-Erickson und Kaiser, 1996).

1.5 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollten die Rollen der *gsf*-Mutanten *GSF4-1* und *gsf2* in Bezug auf die verschiedenen Hexosetransporter untersucht werden (vgl. 1.3). Ziel war zum einen die Überprüfung, ob das Hxt1/4-Chimär (=GSF4-1 Mutante) direkt mit den Hexosetransportern interagiert. Dies würde ein erster Hinweis dafür sein, dass die Hexosetransporter nicht als Monomere, sondern als Heterodimere oder Heterotetramere vorliegen. Als zweites sollte das Hefe-eigene ER-Protein Gsf2 charakterisiert werden. Die von Sherwood und Carlson (1999) publizierten Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Gsf2 gezielt für die Translokation mancher Hexosetransporter vom ER zur Plasmamembran verantwortlich ist (vgl. 1.3). Welche Aufgabe Gsf2 bei der Translokation übernimmt, ob es bei der Faltung oder bei der Verpackung in COPII-Vesikel eine Rolle spielt, sollte innerhalb dieser Arbeit aufgeklärt werden. Zusätzlich sollten die Proteindomänen der Hexosetransporter identifiziert werden, die als Erkennungssequenz für Gsf2 entscheidend sind.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Stämme und Medien

2.1.1 Bakterienstämme

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

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
DH5 α F'	<i>F'</i> , $\Phi(80dlacZ\Delta M15)\Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>) <i>supE44</i> Δ <i>gyrA96 thi-1 relA1</i>	Gibco BRL
DH10B	<i>F'</i> , <i>mcrA</i> Δ -(<i>mrr hsdRMS-mcrBC</i>) $\Phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta lacX74$ <i>deoR recA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ <i>rpsL endA1 nupG</i>	Gibco BRL
SURE	<i>e14</i> (<i>McrA</i>) Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>) 171 <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5</i> (<i>Kan</i> ^r) <i>uvrC</i> [<i>F'</i> <i>proAB lac</i> ^r $Z\Delta M15$ <i>Tn10</i> (<i>Tet</i> ^r)]	Stratagene

2.1.2 Medien und Anzucht von *E. coli*

Vollmedium LB 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, pH 7,5 (Maniatis *et al.*, 1982)

Für die Selektion auf eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 40 μ g/ml Ampicillin zugesetzt. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 1,8% Agar. Die Anzucht erfolgte bei 37°C.

2.1.3 Hefestämme

Tab. 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
JBY01	<i>MATα ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his 3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 Δphxt3:pHXT7-HXT1</i>	Buziol <i>et al.</i> , 2002
JBY02	<i>MATα ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his 3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 Δphxt3:pHXT7-HXT7</i>	Buziol <i>et al.</i> , 2002
JBY19	<i>MATα ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his 3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 Δphxt3:pHXT7-HXT5:HA</i>	Buziol <i>et al.</i> , 2002
RE601A	<i>MATα MAL2 SUC2 GAL MEL hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::Δhxt6 hxt7::HIS3 ura3-52::Ylp5-HXT1</i>	Reifenberger <i>et al.</i> , 1995

RE602B	<i>MATα ura3-52 MAL2 SUC2 GAL MEL hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt3Δ::LEU2::Δhxt6 hxt7::HIS3</i>	Reifenberger <i>et al.</i> , 1995
RE603A	<i>MATα MAL2 SUC2 GAL MEL hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::Δhxt6 hxt7::HIS3 ura3-52::Ylp5-HXT3</i>	Reifenberger <i>et al.</i> , 1995
RE604A	<i>MATα ura3-52 MAL2 SUC2 GAL MEL hxt1::HIS3 hxt5::LEU2 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::Δhxt6 hxt7::HIS3</i>	Reifenberger <i>et al.</i> , 1995
RE605A	<i>MATα ura3-52 MAL2 SUC2 GAL MEL hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::Δhxt6 hxt7::HIS3</i>	Reifenberger <i>et al.</i> , 1995
RE606A	<i>MATα ura3-52 MAL2 SUC2 GAL MEL hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt2Δ::HIS3 hxt3::LEU2 hxt7::HIS3</i>	Reifenberger <i>et al.</i> , 1995
RE607A	<i>MATα ura3-52 MAL2 SUC2 GAL MEL hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::Δhxt6</i>	Reifenberger <i>et al.</i> , 1995
RE700A	<i>MATα ura3-52 MAL2 SUC2 GAL MEL hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::Δhxt6 hxt7::HIS3</i>	Reifenberger <i>et al.</i> , 1995
CEN.PK2-1C (VW1A)	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2</i>	K.-D. Entian, Frankfurt
EBY.VW4000	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δhxt1-17 Δgal2 stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP</i>	Wieczorke <i>et al.</i> , 1999
SDY.015	<i>MATα Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 fgy1-1 fgy47 lexA::lacZ::URA3</i>	S. Dlugai, 2003
CEN.PK113-6B (K22)	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 HIS3 ADE2 MAL2-8^c SUC2 MEL</i>	M. Ramezani Rad, Düsseldorf
CEN.PK113-17D	<i>MATα leu2-3,112 URA3 trp1-289 his3-Δ1 ADE2 MAL2-8^c SUC2 MEL</i>	M. Ramezani Rad, Düsseldorf
EBY.109A	<i>MATα leu1</i>	E. Boles, Frankfurt
EBY.109B	<i>MATα leu1</i>	E. Boles, Frankfurt
FY1679	<i>MATα/α ura3-52/ura3-52 leu2Δ1/LEU2 trp1Δ63/TRP1 his3Δ200/HIS3</i>	Winston <i>et al.</i> , 1995
YSYA320	<i>MATα Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δfbp1</i>	Sympore, Tübingen
CAY28	<i>MATα ura3-52</i>	P.O. Ljungdahl, Stockholm
IKY1	<i>MATα ura3-52 shr3Δ6</i>	P.O. Ljungdahl, Stockholm
PLY519	<i>MATα ura3-52</i>	P.O. Ljungdahl, Stockholm
MAS26-1A	<i>MATα ura3-52 sec12-1</i>	Gilstring <i>et al.</i> , 1999
PLY527	<i>MATα ura3-52 sec13-1</i>	P.O. Ljungdahl, Stockholm
MAS242-7B	<i>MATα ura3-52 sec13-4</i>	Gilstring <i>et al.</i> , 1999
MAS296-1A	<i>MATα ura3-52 sec16-2</i>	Gilstring <i>et al.</i> , 1999
MAS21-1C	<i>MATα ura3-52 sec18-1</i>	Gilstring <i>et al.</i> , 1999
MAS226-3C	<i>MATα ura3-52 sec23-1</i>	Gilstring <i>et al.</i> , 1999
MAS297-2B	<i>MATα ura3-52 sec62-1</i>	Gilstring <i>et al.</i> , 1999

KOY.PK2-1C.83	MATa MAL2-8 ^c SUC2	K.-D. Entian, Frankfurt
KOY.VW100	MATa <i>ura3-52</i> MAL2-8 ^c SUC2 <i>hxt17Δ</i> <i>stl1Δ::loxP</i> <i>agt1Δ::loxP</i> <i>mph2Δ::loxP</i> <i>mph3Δ::loxP</i> <i>hxt13Δ::loxP</i> <i>hxt15Δ::loxP</i> <i>hxt16Δ::loxP</i> <i>hxt14Δ::loxP</i> <i>hxt12Δ::loxP</i> <i>hxt9Δ::loxP</i> <i>hxt11Δ::loxP</i> <i>hxt10Δ::loxP</i> <i>hxt8Δ::loxP</i> <i>hxt514Δ::loxP</i> <i>hxt2Δ::loxP</i> <i>hxt367Δ::loxP</i>	Otterstedt et al., 2004
KOY.HXT1P	MATa MAL2-8 ^c SUC2 <i>hxt17Δ</i> <i>stl1Δ::loxP</i> <i>agt1Δ::loxP</i> <i>mph2Δ::loxP</i> <i>mph3Δ::loxP</i> <i>hxt13Δ::loxP</i> <i>hxt15Δ::loxP</i> <i>hxt16Δ::loxP</i> <i>hxt14Δ::loxP</i> <i>hxt12Δ::loxP</i> <i>hxt9Δ::loxP</i> <i>hxt11Δ::loxP</i> <i>hxt10Δ::loxP</i> <i>hxt8Δ::loxP</i> <i>hxt514Δ::loxP</i> <i>hxt2Δ::loxP</i> <i>hxt367Δ::loxP</i> URA3::HXT7prom-HXT1-HXT7term	Elbing et al., 2004
KOY.HXT7P	MATa MAL2-8 ^c SUC2 <i>hxt17Δ</i> <i>stl1Δ::loxP</i> <i>agt1Δ::loxP</i> <i>mph2Δ::loxP</i> <i>mph3Δ::loxP</i> <i>hxt13Δ::loxP</i> <i>hxt15Δ::loxP</i> <i>hxt16Δ::loxP</i> <i>hxt14Δ::loxP</i> <i>hxt12Δ::loxP</i> <i>hxt9Δ::loxP</i> <i>hxt11Δ::loxP</i> <i>hxt10Δ::loxP</i> <i>hxt8Δ::loxP</i> <i>hxt514Δ::loxP</i> <i>hxt2Δ::loxP</i> <i>hxt367Δ::loxP</i> URA3::HXT7prom-HXT7-HXT7term	Elbing et al., 2004
KOY.TM1P	MATa MAL2-8 ^c SUC2 <i>hxt17Δ</i> <i>stl1Δ::loxP</i> <i>agt1Δ::loxP</i> <i>mph2Δ::loxP</i> <i>mph3Δ::loxP</i> <i>hxt13Δ::loxP</i> <i>hxt15Δ::loxP</i> <i>hxt16Δ::loxP</i> <i>hxt14Δ::loxP</i> <i>hxt12Δ::loxP</i> <i>hxt9Δ::loxP</i> <i>hxt11Δ::loxP</i> <i>hxt10Δ::loxP</i> <i>hxt8Δ::loxP</i> <i>hxt514Δ::loxP</i> <i>hxt2Δ::loxP</i> <i>hxt367Δ::loxP</i> URA3::HXT7prom-HXT1 ¹⁻²³¹ -HXT7 ²³²⁻¹⁷¹³ -HXT7term	Elbing et al., 2004
KOY.TM2P	MATa MAL2-8 ^c SUC2 <i>hxt17Δ</i> <i>stl1Δ::loxP</i> <i>agt1Δ::loxP</i> <i>mph2Δ::loxP</i> <i>mph3Δ::loxP</i> <i>hxt13Δ::loxP</i> <i>hxt15Δ::loxP</i> <i>hxt16Δ::loxP</i> <i>hxt14Δ::loxP</i> <i>hxt12Δ::loxP</i> <i>hxt9Δ::loxP</i> <i>hxt11Δ::loxP</i> <i>hxt10Δ::loxP</i> <i>hxt8Δ::loxP</i> <i>hxt514Δ::loxP</i> <i>hxt2Δ::loxP</i> <i>hxt367Δ::loxP</i> URA3::HXT7prom-HXT1 ¹⁻³⁹¹ -HXT7 ³⁹²⁻¹⁷¹³ -HXT7term	Elbing et al., 2004
KOY.TM3P	MATa MAL2-8 ^c SUC2 <i>hxt17Δ</i> <i>stl1Δ::loxP</i> <i>agt1Δ::loxP</i> <i>mph2Δ::loxP</i> <i>mph3Δ::loxP</i> <i>hxt13Δ::loxP</i> <i>hxt15Δ::loxP</i> <i>hxt16Δ::loxP</i> <i>hxt14Δ::loxP</i> <i>hxt12Δ::loxP</i> <i>hxt9Δ::loxP</i> <i>hxt11Δ::loxP</i> <i>hxt10Δ::loxP</i> <i>hxt8Δ::loxP</i> <i>hxt514Δ::loxP</i> <i>hxt2Δ::loxP</i> <i>hxt367Δ::loxP</i> URA3::HXT7prom-HXT1 ¹⁻⁴⁴⁹ -HXT7 ⁴⁵⁰⁻¹⁷¹³ -HXT7term	Elbing et al., 2004
KOY.TM4P	MATa MAL2-8 ^c SUC2 <i>hxt17Δ</i> <i>stl1Δ::loxP</i> <i>agt1Δ::loxP</i> <i>mph2Δ::loxP</i> <i>mph3Δ::loxP</i> <i>hxt13Δ::loxP</i> <i>hxt15Δ::loxP</i> <i>hxt16Δ::loxP</i> <i>hxt14Δ::loxP</i> <i>hxt12Δ::loxP</i> <i>hxt9Δ::loxP</i> <i>hxt11Δ::loxP</i> <i>hxt10Δ::loxP</i> <i>hxt8Δ::loxP</i> <i>hxt514Δ::loxP</i> <i>hxt2Δ::loxP</i> <i>hxt367Δ::loxP</i> URA3::HXT7prom-HXT1 ¹⁻⁵⁵¹ -HXT7 ⁵⁵²⁻¹⁷¹³ -HXT7term	Elbing et al., 2004

KOY.TM5P	<i>MATa MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP URA3::HXT7prom-HXT1¹⁻⁶²⁷-HXT7⁶²⁸⁻¹⁷¹³-HXT7term</i>	Elbing et al., 2004
KOY.TM6P*	<i>MATa MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP URA3::HXT7prom-HXT1¹⁻⁷⁴¹, Ser279Tyr-HXT7⁷⁴²⁻¹⁷¹³-HXT7term</i>	Otterstedt et al., 2004
KOY.TM11P	<i>MATa MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP URA3::HXT7prom-HXT1¹⁻¹⁴³⁷-HXT7¹⁴³⁸⁻¹⁷¹³-HXT7term</i>	Elbing et al., 2004
KOY.TM12P	<i>MATa MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP URA3::HXT7prom-HXT1¹⁻¹⁵⁰³-HXT7¹⁵⁰⁴⁻¹⁷¹³-HXT7term</i>	Elbing et al., 2004
TM4(7-1)	<i>MATa MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP URA3::HXT7prom-HXT7¹⁻⁵⁵¹-HXT1⁵⁵²⁻¹⁷¹³-HXT7term</i>	Elbing et al., 2004
3GS1-D-11, 6847	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Open Biosystems

Tab. 3: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) Stämme

Stamm	Genotyp	Beschreibung	Quelle/Referenz
THY.AP1	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 ADE2 MAL2-8^c SUC2 MEL HIS3::lexA-HIS3</i>	CEN.PK113-6B <i>HIS3::lexA-HIS3</i>	diese Arbeit
THY.AP3	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 MAL2-8^c SUC2 MEL HIS3::lexA-HIS3 ADE2::lexA-ADE2</i>	THY.AP1 <i>ADE2::lexA-ADE2</i>	diese Arbeit
THY.AP4	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 MAL2-8^c SUC2 MEL HIS3::lexA-HIS3 ADE2::lexA-ADE2 trp1Δ::lexA-lacZ</i>	THY.AP3 <i>trp1Δ::lexA-lacZ</i>	Obrdlik et al., 2004

THY.AP5	<i>MATα</i> <i>leu2-3,112 URA3 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 MEL ade2Δ::loxP</i>	CEN.PK113-17D <i>ade2Δ::loxP</i>	Obrdlik <i>et al.</i> , 2004
THY.03	<i>MATa MAL2 SUC2 GAL MEL hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::Δhxt6 hxt7::HIS3 ura3-52::Ylp5-HXT1 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	RE601A <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit
THY.04	<i>MATα ura3-52 MAL2 SUC2 GAL MEL hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt3Δ::LEU2::Δhxt6 hxt7::HIS3 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	RE602B <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit
THY.05	<i>MATa MAL2 SUC2 GAL MEL hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::Δhxt6 hxt7::HIS3 ura3-52::Ylp5-HXT3 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	RE603A <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit
THY.06	<i>MATa ura3-52 MAL2 SUC2 GAL MEL hxt1::HIS3 hxt5::LEU2 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::Δhxt6 hxt7::HIS3 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	RE604A <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit
THY.07	<i>MATa ura3-52 MAL2 SUC2 GAL MEL hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::Δhxt6 hxt7::HIS3 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	RE605A <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit
THY.08	<i>MATa ura3-52 MAL2 SUC2 GAL MEL hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt2Δ::HIS3 hxt3::LEU2 hxt7::HIS3 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	RE606A <i>gsf2Δ::loxP-kanMXv</i>	diese Arbeit
THY.09	<i>MATa ura3-52 MAL2 SUC2 GAL MEL hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::Δhxt6 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	RE607A <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit
THY.10	<i>MATa ura3-52 MAL2 SUC2 GAL MEL hxt1Δ::HIS3::Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::Δhxt6 hxt7::HIS3 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	RE700A <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit
THY.11	<i>MATα ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his 3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 Δphxt3:pHXT7-HXT1 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	JBY01 <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit
THY.12	<i>MATα ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his 3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 Δphxt3:pHXT7-HXT7 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	JBY02 <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit
THY.13	<i>MATα ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his 3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 Δphxt3:pHXT7-HXT5:HA gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	JBY19 <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit

THY.14	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δhxt1-17 Δgal2 stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	EBY.VW4000 <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit
THY.15	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	CEN.PK2-1C <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit
THY.19	<i>MATα ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his 3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 Δphxt3:pHXT7-HXT1 gsf2Δ::loxP</i>	JBY01 <i>gsf2Δ::loxP</i>	diese Arbeit
THY.20	<i>MATα ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his 3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 Δphxt3:pHXT7-HXT1 gtt1Δ::loxP</i>	JBY01 <i>gtt1Δ::loxP</i>	diese Arbeit
THY.21	<i>MATα ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his 3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 Δphxt3:pHXT7-HXT1 gsf2Δ::loxP gtt1Δ::loxP</i>	JBY01 <i>gsf2Δ::loxP gtt1Δ::loxP</i>	diese Arbeit
THY.25	<i>MATa MAL2-8^c SUC2 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	KOY.PK2-1C.83 <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit
THY.26	<i>MATa ura3-52 MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	KOY.VW100 <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit
THY.27	<i>MATa MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP URA3::HXT7prom-HXT1-HXT7term gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	KOY.HXT1P <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit
THY.28	<i>MATa MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP URA3::HXT7prom-HXT7-HXT7term gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	KOY.HXT7P <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit

THY.29	<p><i>MATa MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP</i> <i>agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP</i> <i>hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP</i> <i>hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP</i> <i>hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP</i> <i>hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP</i> <i>URA3::HXT7prom-HXT1¹⁻²³¹-HXT7²³²⁻¹⁷¹³_</i> <i>HXT7term gsf2Δ::loxP-kanMX</i></p>	KOY.TM1P gsf2Δ::loxP-kanMX	diese Arbeit
THY.30	<p><i>MATa MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP</i> <i>agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP</i> <i>hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP</i> <i>hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP</i> <i>hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP</i> <i>hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP</i> <i>URA3::HXT7prom-HXT1¹⁻²³¹-HXT7²³²⁻¹⁷¹³_</i> <i>HXT7term gsf2Δ::loxP-kanMX</i></p>	KOY.TM2P gsf2Δ::loxP-kanMX	diese Arbeit
THY.31	<p><i>MATa MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP</i> <i>agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP</i> <i>hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP</i> <i>hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP</i> <i>hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP</i> <i>hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP</i> <i>URA3::HXT7prom-HXT1¹⁻⁴⁴⁹-HXT7⁴⁵⁰⁻¹⁷¹³_</i> <i>HXT7term gsf2Δ::loxP-kanMX</i></p>	KOY.TM3P gsf2Δ::loxP-kanMX	diese Arbeit
THY.32	<p><i>MATa MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP</i> <i>agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP</i> <i>hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP</i> <i>hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP</i> <i>hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP</i> <i>hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP</i> <i>URA3::HXT7prom-HXT1¹⁻⁵⁵¹-HXT7⁵⁵²⁻¹⁷¹³_</i> <i>HXT7term gsf2Δ::loxP-kanMX</i></p>	KOY.TM4P gsf2Δ::loxP-kanMX	diese Arbeit
THY.33	<p><i>MATa MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP</i> <i>agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP</i> <i>hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP</i> <i>hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP</i> <i>hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP</i> <i>hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP</i> <i>URA3::HXT7prom-HXT1¹⁻⁶²⁷-HXT7⁶²⁸⁻¹⁷¹³_</i> <i>HXT7term gsf2Δ::loxP-kanMX</i></p>	KOY.TM5P gsf2Δ::loxP-kanMX	diese Arbeit

THY.34	<i>MATa MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP URA3::HXT7prom-HXT1^{1-741, Ser279Tyr}-HXT7⁷⁴²⁻¹⁷¹³-HXT7term gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	KOY.TM6P* gsf2Δ::loxP-kanMX	diese Arbeit
THY.35	<i>MATa MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP URA3::HXT7prom-HXT1¹⁻¹⁴³⁷-HXT7¹⁴³⁸⁻¹⁷¹³- HXT7term gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	KOY.TM11P gsf2Δ::loxP-kanMX	diese Arbeit
THY.36	<i>MATa MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP URA3::HXT7prom-HXT1¹⁻¹⁵⁰³-HXT7¹⁵⁰⁴⁻¹⁷¹³- HXT7term gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	KOY.TM12P gsf2Δ::loxP-kanMX	diese Arbeit
THY.37	<i>MATa MAL2-8^c SUC2 hxt17Δ stl1Δ::loxP agt1Δ::loxP mph2Δ::loxP mph3Δ::loxP hxt13Δ::loxP hxt15Δ::loxP hxt16Δ::loxP hxt14Δ::loxP hxt12Δ::loxP hxt9Δ::loxP hxt11Δ::loxP hxt10Δ::loxP hxt8Δ::loxP hxt514Δ::loxP hxt2Δ::loxP hxt367Δ::loxP URA3::HXT7prom-HXT7¹⁻⁵⁵¹-HXT7⁵⁵²⁻¹⁷¹³- HXT7term gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	TM4 (7-1) gsf2Δ::loxP-kanMX	diese Arbeit
THY.39	<i>MATα ura3-52 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	PLY519 gsf2Δ::loxP-kanMX	diese Arbeit
THY.40	<i>MATa ura3-52 sec12-1 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	MAS26-1A gsf2Δ::loxP-kanMX	diese Arbeit
THY.43	<i>MATα ura3-52 sec13-1 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	PLY527 gsf2Δ::loxP-kanMX	diese Arbeit
THY.44	<i>MATα ura3-52 sec13-4 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	MAS242-7B gsf2Δ::loxP-kanMX	diese Arbeit
THY.45	<i>MATα ura3-52 sec16-2 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	MAS296-1A gsf2Δ::loxP-kanMX	diese Arbeit
THY.46	<i>MATa ura3-52 sec18-1 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	MAS21-1C gsf2Δ::loxP-kanMX	diese Arbeit
THY.47	<i>MATα ura3-52 sec23-1 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	MAS226-3C gsf2Δ::loxP-kanMX	diese Arbeit

THY.48	MAT α <i>ura3-52 sec62-1 gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	MAS297-2B <i>gsf2Δ::loxP-kanMX</i>	diese Arbeit
THY.50	MAT α <i>ura3-52 trp1-289 leu2-3,112 his 3-Δ1 MAL2-8^c SUC2 Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 Δphxt3:pHXT7-HXT1 gsf2Δ::loxP-kanMX doa4Δ::HIS3MX</i>	THY.11 <i>doa4Δ::HIS3MX</i>	diese Arbeit

2.1.4 Medien und Anzucht von *S. cerevisiae*

Vollmedium	YEP	1% Hefeextrakt, 2% bakteriologisches Pepton, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegebenen Konzentration
synthetisches Kompletmedium (Selektivmedium)	SC	0,67% Yeast nitrogen base w/o amino acids, pH6,3, Aminosäure/Nukleobase-Lösung, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegeben Konzentration
Minimal-Citrullin-Medium	MC	0,16% Yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulphate, 1% Succinat, 0,6% NaOH, 0,04% L-Citrullin, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegeben Konzentration (Regenberger und Hansen, 2000)

Konzentration der Aminosäuren und Nukleobasen im synthetischen Kompletmedium (nach Zimmermann, 1975): Adenin (0,08mM), Arginin (0,22mM), Histidin (0,25mM), Isoleucin (0,44mM), Leucin (0,44mM), Lysin (0,35mM), Methionin (0,26mM), Phenylalanin (0,29mM), Tryptophan (0,19mM), Threonin (0,48mM), Tyrosin (0,34mM), Uracil (0,44mM), Valin (0,49mM).

Innerhalb dieser Arbeit wurden die Kohlenstoffquellen Glukose, Galaktose, Maltose, Raffinose und Ethanol verwendet. Glukose, Galaktose und Maltose wurden zusammen mit dem Medium autoklaviert. Die Raffinose-Stammlösung wurde sterilfiltriert und ebenso wie Ethanol dem autoklavierten Medium zugesetzt. Für das MC-Medium wurde eine Citrullin-Stammlösung sterilfiltriert. Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen bzw. auf Zellen mit genomisch integriertem *Schizosaccharomyces pombe* HIS3MX-Markergen wurde die jeweilige Aminosäure oder Nukleobase nicht zugefügt. Zur Selektion auf eine Phleomycin-Resistenz wurde dem Medium 7,5 μ g/ml Phleomycin zugesetzt (Güldener *et al.*, 2002). Die Selektion auf eine Geneticin-Resistenz erfolgte auf Vollmediumsplatten mit 200 μ g/ml G418 (Longtine *et al.*, 1998). Zur Selektion auf Verlust eines Plasmids mit URA3-Selektionsmarkergen wurden synthetische Kompletmediumsplatten verwendet, die neben Uracil 1mg/ml 5-FOA enthielten (Boeke *et al.*, 1984). Feste Voll- und Selektivmedien enthielten zusätzlich 1,8% Agar, während festen Minimal-Citrullin-Medien 2% Agarose zugesetzt wurde. Die Anzucht der Hefezellen erfolgte bei 30°C. Eine Ausnahme bildeten Stämme mit temperatursensitiven Allelen, die bei einer permissiven Temperatur von 20-25°C und einer restriktiven Temperatur von 34-42°C angezogen wurden.

2.2 Plasmide

Tab. 4: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Quelle/Referenz	Beschreibung
YCplac33	Gietz und Sugino, 1988	CEN/ARS-Klonierungsvektor mit <i>URA3</i> -Selektionsmarkergen
YEplac112	Gietz und Sugino, 1988	2 μ -Klonierungsvektor mit <i>TRP1</i> -Selektionsmarkergen
YEplac181	Gietz und Sugino, 1988	2 μ -Klonierungsvektor mit <i>LEU2</i> -Selektionsmarkergen
p423HXT7-6HIS (=p423H7)	Becker und Boles, 2003	2 μ -Expressionsplasmid zur Herstellung von Fusionsproteinen mit His ₆ -Epitop; <i>HIS3</i> -Selektionsmarkergen, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
p424HXT7-6HIS (=p424H7)	Becker und Boles, 2003	2 μ -Expressionsplasmid zur Herstellung von Fusionsproteinen mit His ₆ -Epitop; <i>TRP1</i> -Selektionsmarkergen, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
p425HXT7-6HIS (=p425H7)	Becker und Boles, 2003	2 μ -Expressionsplasmid zur Herstellung von Fusionsproteinen mit His ₆ -Epitop; <i>LEU2</i> -Selektionsmarkergen, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
p426HXT7-6HIS (=p426H7)	Becker und Boles, 2003	2 μ -Expressionsplasmid zur Herstellung von Fusionsproteinen mit His ₆ -Epitop; <i>URA3</i> -Selektionsmarkergen, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
pTHXT1-2	E. Reifenberger, 1995	DNA-Vorlage zur Amplifizierung von <i>HXT1</i>
pTHXT2	E. Reifenberger, 1995	DNA-Vorlage zur Amplifizierung von <i>HXT2</i>
pTHXT3-1	E. Reifenberger, 1995	DNA-Vorlage zur Amplifizierung von <i>HXT3</i>
YIPHXT4	E. Reifenberger, 1995	DNA-Vorlage zur Amplifizierung von <i>HXT4</i>
YCpHXT7a	R. Wieczorke, 1998	DNA-Vorlage zur Amplifizierung von <i>HXT7</i>
pUG6	Güldener <i>et al.</i> , 1996	DNA-Vorlage zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Kassette zur Deletion von Genen
pFA6a-HIS3MX6	Wach <i>et al.</i> , 1994	DNA-Vorlage zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Kassette zur Deletion von Genen
pSH47	Güldener <i>et al.</i> , 1996	Cre-Rekombinase hinter dem <i>GAL1</i> -Promotor der Hefe; <i>URA3</i> -Selektionsmarkergen
pSH65	Güldener <i>et al.</i> , 2002	Cre-Rekombinase hinter dem <i>GAL1</i> -Promotor der Hefe; Phleomycin-Selektionsmarker
pCPLV	S. te Heesen, Zürich	2 μ -Expressionsplasmid zur konstitutiven Expression des Fusionsproteins Cub-PLV, <i>ADH1</i> -Promotor und -Terminator, <i>LEU2</i> -Selektionsmarkergen
YCpFGY1- CubPLV	D. Voss, 2001	CEN/ARS-Expressionsplasmid mit dem <i>FGY1</i> -Gen mit <i>FGY1</i> -Promotor und C-terminaler Fusion von CubPLV, <i>LEU2</i> -Selektionsmarkergen
pNubWt (=pNubWt-2)	Obdrlik <i>et al.</i> , 2004	2 μ -Expressionsplasmid zur konstitutiven Expression des NubWt-Proteins, <i>ADH1</i> -Promotor und -Terminator, <i>TRP1</i> - Selektionsmarkergen

pNubX	Obrdlik <i>et al.</i> , 2004	2 μ -Klonierungsvektor für die N-terminale Fusion von Proteinen mit Nub, <i>ADH1</i> -Promotor und -Terminator, <i>TRP1</i> - Selektionsmarkergen
pXNub	Obrdlik <i>et al.</i> , 2004	2 μ -Klonierungsvektor für die C-terminale Fusion von Proteinen mit Nub, <i>ADH1</i> -Promotor und -Terminator, <i>TRP1</i> - Selektionsmarkergen
pLexA(ox5)	Rosenbaum, 1993	<i>GAL1::lacZ</i> Fusionsplasmid zur genomischen Integration in das <i>URA3</i> -Gen, mit 5 <i>lexA</i> Operatorregionen -167 bp vor dem Transkriptionsstart
YEph2-rGLUT4	Wieczorke <i>et al.</i> 2003	2 μ -Expressionsplasmid mit dem <i>GLUT4</i> -Gen hinter dem <i>HXT2</i> -Promotor mit <i>GAL2</i> -Terminator; <i>TRP1</i> -Selektionsmarkergen
pJS-U- <i>URA3</i>	Griffith <i>et al.</i> , 2003	2 μ -Expressionsplasmid mit einem <i>lacZ</i> -Gen hinter einem transkriptionell stillen <i>ICL1</i> -Promotor mit integriertem UPR-Element (UPRE) aus dem <i>KAR2</i> -Promotor; <i>URA3</i> -Selektionsmarkergen
pJS-U- <i>TRP1</i>	Griffith <i>et al.</i> , 2003	2 μ -Expressionsplasmid mit einem <i>lacZ</i> -Gen hinter einem transkriptionell stillen <i>ICL1</i> -Promotor mit integriertem UPR-Element (UPRE) aus dem <i>KAR2</i> -Promotor; <i>TRP1</i> -Selektionsmarkergen
pFG112	Gilstring und Ljungdahl, 2000	DNA-Vorlage für die Klonierung eines 165bp DNA-Fragmentes des <i>SUC2</i> -Gens

Tab. 5: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
p426HXT1/4	Klonierung eines Chimärs aus <i>HXT1</i> ¹⁻¹²⁶⁷ und <i>HXT4</i> ¹²⁶⁸⁻¹⁶⁶⁵ in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
YCpHA-GSF2	Klonierung von <i>GSF2</i> mit <i>GSF2</i> -Promotor und -Terminator und N-terminaler Fusion eines einzelnen HA-Tags in YCplac33
p426GTT1	Klonierung von <i>GTT1</i> in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
p425RSE1	Klonierung von <i>RSE1</i> in p425HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
p425 Δ gsf2::loxP-kanMX	Klonierung der genomischen Sequenz Δ gsf2::loxP-kanMX des Stammes THY.11 in p425HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
p425 Δ gsf2::loxP	Klonierung der genomischen Sequenz Δ gsf2::loxP des Stammes THY.19 in p425HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
p426GSF2	Klonierung von <i>GSF2</i> in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
p425GSF2	Klonierung von <i>GSF2</i> in p425HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
p426SAR1	Klonierung von <i>SAR1</i> inklusive des Introns ²⁹⁻¹⁶⁷ in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
p426SAR1 ^{Δi}	Klonierung von <i>SAR1</i> exklusive des Introns ²⁹⁻¹⁶⁷ in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops

p423SEC12	Klonierung von <i>SEC12</i> in p423HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
p424SEC16	Klonierung von <i>SEC16</i> in p424HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
p425SEC24	Klonierung von <i>SEC24</i> in p425HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
p426SEC23	Klonierung von <i>SEC23</i> in p426HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
YCpHA-GSF2 ^{BamHI-43}	Integration der Sequenz 5'GGATCC3' als <i>Bam</i> HI-Restriktions-erkennungssequenz an Position 43bp von HA-GSF2 in YCpHA-GSF2
YCpHA-GSF2 ^{BamHI-511}	Integration der Sequenz 5'GGATCC3' als <i>Bam</i> HI-Restriktions-erkennungssequenz an Position 511bp von HA-GSF2 in YCpHA-GSF2
YCpHA-GSF2 ^{BamHI-1186}	Integration der Sequenz 5'GGATCC3' als <i>Bam</i> HI-Restriktions-erkennungssequenz an Position 1186bp von HA-GSF2 in YCpHA-GSF2
YCpHA-GSF2 ^{SUC2-43}	Klonierung des 165bp <i>Bam</i> HI-Fragmentes von <i>SUC2</i> aus dem Vektor pFG112 in das mit <i>Bam</i> HI linearisierte Plasmid YCpHA-GSF2 ^{BamHI-43}
YCpHA-GSF2 ^{SUC2-511}	Klonierung des 165bp <i>Bam</i> HI-Fragmentes von <i>SUC2</i> aus dem Vektor pFG112 in das mit <i>Bam</i> HI linearisierte Plasmid YCpHA-GSF2 ^{BamHI-511}
YCpHA-GSF2 ^{SUC2-1186}	Klonierung des 165bp <i>Bam</i> HI-Fragmentes von <i>SUC2</i> aus dem Vektor pFG112 in das mit <i>Bam</i> HI linearisierte Plasmid YCpHA-GSF2 ^{BamHI-1186}
p425HXT1	Klonierung von <i>HXT1</i> in p425HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
p425HXT7	Klonierung von <i>HXT7</i> in p425HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
pHXT1/7 ⁸⁴	Klonierung eines Chimärs aus <i>HXT1</i> ¹⁻²⁵² und <i>HXT7</i> ²⁵³⁻¹⁷¹³ in p425HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
pHXT7/1 ⁸¹	Klonierung eines Chimärs aus <i>HXT7</i> ¹⁻²⁴³ und <i>HXT1</i> ²⁴⁴⁻¹⁷¹³ in p425HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
pHXT7/1 ³³⁹	Klonierung eines Chimärs aus <i>HXT7</i> ¹⁻¹⁰¹⁷ und <i>HXT1</i> ¹⁰¹⁸⁻¹⁷¹³ in p425HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
pHXT7/1 ³⁶⁹	Klonierung eines Chimärs aus <i>HXT7</i> ¹⁻¹¹⁰⁷ und <i>HXT1</i> ¹¹⁰⁸⁻¹⁷¹³ in p425HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
pHXT7/1 ⁴⁸⁴	Klonierung eines Chimärs aus <i>HXT7</i> ¹⁻¹⁴⁵² und <i>HXT1</i> ¹⁴⁵³⁻¹⁷¹³ in p425HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops
p425TM1	Klonierung der <i>HXT1/7</i> -Sequenz des Stammes KOY.TM1P in p425-HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops (<i>HXT1</i> ¹⁻²³¹ - <i>HXT7</i> ²³²⁻¹⁷¹³)
p425TM2	Klonierung der <i>HXT1/7</i> -Sequenz des Stammes KOY.TM2P in p425-HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops (<i>HXT1</i> ¹⁻³⁹¹ - <i>HXT7</i> ³⁹²⁻¹⁷¹³)
p425TM3	Klonierung der <i>HXT1/7</i> -Sequenz des Stammes KOY.TM3P in p425-HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops (<i>HXT1</i> ¹⁻⁴⁴⁹ - <i>HXT7</i> ⁴⁵⁰⁻¹⁷¹³)
p425TM4	Klonierung der <i>HXT1/7</i> -Sequenz des Stammes KOY.TM4P in p425-HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops (<i>HXT1</i> ¹⁻⁵⁵¹ - <i>HXT7</i> ⁵⁵²⁻¹⁷¹³)
p425TM5	Klonierung der <i>HXT1/7</i> -Sequenz des Stammes KOY.TM5P in p425-HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops (<i>HXT1</i> ¹⁻⁶²⁷ - <i>HXT7</i> ⁶²⁸⁻¹⁷¹³)
p425TM6	Klonierung der <i>HXT1/7</i> -Sequenz des Stammes KOY.TM6P* in p425-HXT7-6HIS unter Aussparung des His ₆ -Epitops (<i>HXT1</i> ^{1-741, Ser279Tyr} - <i>HXT7</i> ⁷⁴²⁻¹⁷¹³)

pFGY1p-kanMX-CubPLV	Austausch des <i>kanMX</i> mit <i>kanMX</i> -Promotor und -Terminator gegen das <i>FGY1</i> der Hefe im YCpFGY1CubPLV
pADH1p-NubG-kanMX	Klonierung des <i>kanMX</i> mit <i>kanMX</i> -Promotor und -Terminator in pNubX
pADH1p-kanMX-NubG	Klonierung des <i>kanMX</i> mit <i>kanMX</i> -Promotor und -Terminator in pXNub
pHXT1-CubPLV	Austausch des <i>HXT1</i> gegen das <i>kanMX</i> im pFGY1p-kanMX-CubPLV
pHXT2-CubPLV	Austausch des <i>HXT2</i> gegen das <i>kanMX</i> im pFGY1p-kanMX-CubPLV
pHXT3-CubPLV	Austausch des <i>HXT3</i> gegen das <i>kanMX</i> im pFGY1p-kanMX-CubPLV
pHXT7-CubPLV	Austausch des <i>HXT7</i> gegen das <i>kanMX</i> im pFGY1p-kanMX-CubPLV
pGSF2-CubPLV	Austausch des <i>GSF2</i> gegen das <i>kanMX</i> im pFGY1p-kanMX-CubPLV
pGTT1-CubPLV	Austausch des <i>GTT1</i> gegen das <i>kanMX</i> im pFGY1p-kanMX-CubPLV
pNubG-HXT1	Austausch des <i>HXT1</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubG-kanMX
pNubG-HXT2	Austausch des <i>HXT2</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubG-kanMX
pNubG-HXT3	Austausch des <i>HXT3</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubG-kanMX
pNubG-HXT7	Austausch des <i>HXT7</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubG-kanMX
pNubG-GSF2	Austausch des <i>GSF2</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubG-kanMX
pNubG-GSF2 ^{STOP}	Austausch des <i>GSF2</i> samt STOP-Codon gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubG-kanMX
pNubG-GTT1	Austausch des <i>GTT1</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-NubG-kanMX
pHXT1-NubG	Austausch des <i>HXT1</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-kanMX-NubG
pHXT2-NubG	Austausch des <i>HXT2</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-kanMX-NubG
pHXT3-NubG	Austausch des <i>HXT3</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-kanMX-NubG
pHXT7-NubG	Austausch des <i>HXT7</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-kanMX-NubG
pGSF2-NubG	Austausch des <i>GSF2</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-kanMX-NubG
pGTT1-NubG	Austausch des <i>GTT1</i> gegen das <i>kanMX</i> im pADH1p-kanMX-NubG

2.3 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Sigma ARK (Darmstadt), Thermo Hybaid Interactiva Division (Thermo BioSciences, Ulm) und biomers.net (Ulm) synthetisiert. Das Lösungsvolumen der Oligonukleotide in Wasser wurde so gewählt, dass eine Endkonzentration von 100pmol/µl erreicht wurde. Die Oligonukleotide der Firma Research Genetics (USA) hatten eine Endkonzentration von 20pmol/µl.

Tab. 6: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung/Verwendung
YHR094c-F (F-HXT1)	forward-Primer (Yeast GENEPAIRS) von Research Genetics (USA)	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>HXT1</i> ¹⁻¹²⁶⁷ zur Klonierung von p426HXT1/4

T3-ORF	GAATAACACAAAAACAAAAGTTTTTTTA ATTTAAGGAATTCCAGCTGACCACC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>HXT1</i> ¹⁻¹²⁶⁷ zur Klonierung von p426HXT1/4 (Homologie zum <i>HXT7</i> -Promotor)
cha2HXT1	TGTGAAGACAATCATAACAGTTACCAGCAC CCTTTGA	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>HXT1</i> ¹⁻¹²⁶⁷ zur Klonierung von p426HXT1/4 (Homologie zu Oligonukleotid cha3HXT4)
cha3HXT4	TCAAAGGGTGCTGGTAACTGTATGATTGT CTTCACA	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>HXT4</i> ¹²⁶⁸⁻¹⁶⁶⁵ zur Klonierung von p426HXT1/4 (Homologie zu Oligonukleotid cha2HXT1)
YHR092c-R (R-HXT4)	reverse-Primer (Yeast GENEPAIRS) von Research Genetics (USA)	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>HXT4</i> ¹²⁶⁸⁻¹⁶⁶⁵ zur Klonierung von p426HXT1/4
T2-ORF	GGGGGAGGGCGTGAATGTAAGCGTGACA TAACTAATTACATGACTCGAGGATCCCCG GGAATTGCCATG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>HXT4</i> ¹²⁶⁸⁻¹⁶⁶⁵ zur Klonierung von p426HXT1/4 (Homologie zum <i>CYC1</i> -Terminator)
S1-GSF2	ATGGAGATTTACATTAGACTTAACGCAGAT GTCGAGCAGACTATGCGCTTCGTACGCT GCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>GSF2</i>
S2-GSF2	TTAATTAGATTTTTCAAATCATTCTTTTTT ATACCAAAGTAGCATCCATAGGCCACTA GTGGATCTG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>GSF2</i>
A1-GSF2	GGACCCTGCTTCCAGATCGAC	Aufwärtsprimer zur Überprüfung einer <i>gsf2</i> -Deletion
A4-GSF2	CCATAAAGGCATATTTCCCCC	Abwärtsprimer zur Überprüfung einer <i>gsf2</i> -Deletion
B1-GSF2	GCGACAAGCTTACTACTGCCA	Aufwärtsprimer zur Überprüfung einer <i>gsf2</i> -Deletion
B4-GSF2	GCCCTCTAGTAGTAGTAATAG	Abwärtsprimer zur Überprüfung einer <i>gsf2</i> -Deletion
fHAGSF2	TTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGA AACAGCT <u>GCGGCCGC</u> ATCGAGGTTATCGT CGCAAAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung des <i>GSF2</i> -Promotors samt der <i>NotI</i> -Restriktionserkennungssequenz (unterstrichen) zur Klonierung von YCpHA-GSF2 (Homologie zu YCplac33)
rinHAGSF2	AGCACCGGCACC <u>AGCGTAGTCTGGAACG</u> <u>TCGTATGGGTACATGCTT</u> GCAATCGCCCT CTATCA	Abwärtsprimer zur Amplifizierung des <i>GSF2</i> -Promotors samt der Sequenz eines einfachen HA-Tags (unterstrichen) zur Klonierung von YCpHA-GSF2 (Homologie zu <i>GSF2</i>)
rHAGSF2	TAAACGACGGCCAGTGAATTCGAGCTCG GTACCCG <u>GCGGCCGC</u> ATTGTATGAAATAT TTATAAT	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>GSF2</i> und <i>GSF2</i> -Terminator samt der <i>NotI</i> -Restriktionserkennungssequenz (unterstrichen) zur Klonierung von YCpHA-GSF2 (Homologie zu YCplac33)
finHAGSF2	ATG <u>TACCCATACGACGTTCCAGACTACGC</u> <u>IGGTGCCGGTGCTGAGATTTACATTAGAC</u> TTAAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>GSF2</i> und <i>GSF2</i> -Terminator samt der Sequenz eines einfachen HA-Tags (unterstrichen) zur Klonierung von YCpHA-GSF2
S1-GTT1	ATGTCGTTGCCAATTATCAAAGTCCATTGG TTGGACCATTCCAGAGCGTTCGTACGCTG CAGGTCGAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>GTT1</i>
S2-GTT1	TTAGAAATTGCTACCTAAAGCACGCGCCT TTTCCTTAGAAGCAGCATAGCATAGGCCA CTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>GTT1</i>
A1-GTT1	GGCTTAGCCCAGCCCCTCTTG	Aufwärtsprimer zur Überprüfung einer <i>gtt1</i> -Deletion
A4-GTT1	CGGTATGTTGGGCTTGAGAGG	Abwärtsprimer zur Überprüfung einer <i>gtt1</i> -Deletion
fp4GTT1	AACACAAAAACAAAAGTTTTTTTAATTTTA ATCAAAAATGTCGTTGCCAATTATCAA	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>GTT1</i> zur Klonierung von p426GTT1 (Homologie zum <i>HXT7</i> -Promotor)

rp4GTT1	GAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACAT GACTCGAGTTAGAAATTGCTACCTAAAG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>GTT1</i> zur Klonierung von p426GTT1 (Homologie zum <i>CYC1</i> -Terminator)
fp4RSE1	AACACAAAAACAAAAAGTTTTTTAATTTTA ATCAAAAAATGTGGGGAGGTGGCAAATG	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>RSE1</i> zur Klonierung von p425RSE1 (Homologie zum <i>HXT7</i> -Promotor)
rp4RSE1	GAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACAT GACTCGAGTTACATGTAATTTGTTCTGAC	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>RSE1</i> zur Klonierung von p425RSE1 (Homologie zum <i>CYC1</i> -Terminator)
fp4GSF2	AACACAAAAACAAAAAGTTTTTTAATTTTA ATCAAAAAATGGAGATTTACATTAGACTT	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>GSF2</i> zur Klonierung von p425GSF2 und p426GSF2 (Homologie zum <i>HXT7</i> -Promotor)
rp4GSF2	GAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACAT GACTCGAGTTAATTAGATTTTTTCAAATC	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>GSF2</i> zur Klonierung von p425GSF2 und p426GSF2 (Homologie zum <i>CYC1</i> -Terminator)
fp4SAR1	AACACAAAAACAAAAAGTTTTTTAATTTTA ATCAAAAAATGGCTGGTTGGGATATTTTT	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>SAR1</i> und <i>SAR1</i> ¹⁻²⁸ zur Klonierung von p426SAR1 und p426SAR1 ^{Δi} (Homologie zum <i>HXT7</i> -Promotor)
rinSAR1	GTTGGGATATTTTTGGTTGGTTCAGAGAT GTGTTGGCTTCCC	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>SAR1</i> ¹⁻²⁸ zur Klonierung von p426SAR1 ^{Δi} (Homologie zu <i>SAR1</i> ¹⁶⁸⁻⁷¹²)
finSAR1	GGGAAGCCAACACATCTCTGAACCAACCA AAAATATCCCAAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>SAR1</i> ¹⁶⁸⁻⁷¹² zur Klonierung von p426SAR1 ^{Δi} (Homologie zu <i>SAR1</i> ¹⁻²⁸)
rp4SAR1	GAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACAT GACTCGAGTTAAATATATTGAGATAACCA	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>SAR1</i> und <i>SAR1</i> ¹⁶⁸⁻⁷¹² zur Klonierung von p426SAR1 und p426SAR1 ^{Δi} (Homologie zum <i>CYC1</i> -Terminator)
fp4SEC12	AACACAAAAACAAAAAGTTTTTTAATTTTA ATCAAAAAATGAAGTTCGTGACAGCTAG	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>SEC12</i> zur Klonierung von p423SEC12 (Homologie zum <i>HXT7</i> -Promotor)
rp4SEC12	GAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACAT GACTCGAGTCAAGCATCATCTATTTCTC	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>SEC12</i> zur Klonierung von p423SEC12 (Homologie zum <i>CYC1</i> -Terminator)
fp4SEC16	AACACAAAAACAAAAAGTTTTTTAATTTTA ATCAAAAAATGACACCTGAAGCCAAGAA	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>SEC16</i> zur Klonierung von p424SEC16 (Homologie zum <i>HXT7</i> -Promotor)
rp4SEC16	GAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACAT GACTCGAGTTATTGTATGTTATCCATTA	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>SEC16</i> zur Klonierung von p424SEC16 (Homologie zum <i>CYC1</i> -Terminator)
fp4SEC23	AACACAAAAACAAAAAGTTTTTTAATTTTA ATCAAAAAATGGACTTCGAGACTAATGA	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>SEC23</i> zur Klonierung von p426SEC23 (Homologie zum <i>HXT7</i> -Promotor)
rp4SEC23	GAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACAT GACTCGAGCTATGCCTGACCAGAGACGG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>SEC23</i> zur Klonierung von p426SEC23 (Homologie zum <i>CYC1</i> -Terminator)
fp4SEC24	AACACAAAAACAAAAAGTTTTTTAATTTTA ATCAAAAAATGTCTCATCACAAGAAACG	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>SEC24</i> zur Klonierung von p425SEC24 (Homologie zum <i>HXT7</i> -Promotor)
rp4SEC24	GAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACAT GACTCGAGTTATTTGCTAATTCTGGCTT	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>SEC24</i> zur Klonierung von p425SEC24 (Homologie zum <i>CYC1</i> -Terminator)
S1-DOA4	ATGGAGCAGAATATTATTAGTACCATAAG GGATGAGTGTATTTCGTCACCTTCGTACGCT CGAGGTCGAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>DOA4</i>

S2-DOA4	TCAAACACCGTAGACGCGGTGATAAAACA AAACGTATGCATTAGAGTTGCATAGGCCA CTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> - Deletionskassette zur Deletion von <i>DOA4</i>
A1-DOA4	GGTTGGACACTTTGGAACACG	Aufwärtsprimer zur Überprüfung einer <i>doa4</i> -Deletion
A4-DOA4	CAAAGTAGAAGCAGTAGCTGAC	Abwärtsprimer zur Überprüfung einer <i>doa4</i> -Deletion
unfSUC	GGCTCGTATGTTGTGTGGAAT	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>GSF2</i> zur Klonierung von YCpHA-GSF2 ^{BamHI-43} , YCpHA-GSF2 ^{BamHI-511} und YCpHA-GSF2 ^{BamHI-1186} (Homologie zu YCpHA-GSF2)
unrSUC	CACGACGTTGTAAAACGACGG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>GSF2</i> zur Klonierung von YCpHA-GSF2 ^{BamHI-43} , YCpHA-GSF2 ^{BamHI-511} und YCpHA-GSF2 ^{BamHI-1186} (Homologie zu YCpHA-GSF2)
fHA-SUC	GACTACGCTGGTGCCGGTGCTGGATCCG AGATTTACATTAGACTTAAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von HA-GSF2 ⁴³⁻¹²⁵¹ samt der <i>Bam</i> HI-Restriktionserkennungssequenz (unterstrichen) zur Klonierung von YCpHA-GSF2 ^{BamHI-43}
rHA-SUC	GTTAAGTCTAATGTAAATCTCGGATCCAG CACCGGCACCAGCGTAGTC	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von HA-GSF2 ¹⁻⁴² samt der <i>Bam</i> HI-Restriktionserkennungssequenz (unterstrichen) zur Klonierung von YCpHA-GSF2 ^{BamHI-43}
fSUCmitte	ATTCCTGTAGCCAAGCACATGGGATCCGA TTTACCTGAAATTGCCGCT	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von HA-GSF2 ⁵¹¹⁻¹²⁵¹ samt der <i>Bam</i> HI-Restriktionserkennungssequenz (unterstrichen) zur Klonierung von YCpHA-GSF2 ^{BamHI-511}
rSUCmitte	AGCGGCAATTTTCAGGTAAATCGGATCCCA TGTGCTTGGCTACAGGAAT	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von HA-GSF2 ¹⁻⁵¹⁰ samt der <i>Bam</i> HI-Restriktionserkennungssequenz (unterstrichen) zur Klonierung von YCpHA-GSF2 ^{BamHI-511}
fSUChinten	AGAGAAATTGCTGATGAGAAAGGATCCGA GAAAGCATCAACAATGAT	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von HA-GSF2 ¹¹⁸⁶⁻¹²⁵¹ samt der <i>Bam</i> HI-Restriktionserkennungssequenz (unterstrichen) zur Klonierung von YCpHA-GSF2 ^{BamHI-1186}
rSUChinten	ATCATTGTTTGTATGCTTTCTCGGATCCTTT CTCATCAGCAATTTCTCT	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von HA-GSF2 ¹⁻¹¹⁸⁵ samt der <i>Bam</i> HI-Restriktionserkennungssequenz (unterstrichen) zur Klonierung von YCpHA-GSF2 ^{BamHI-1186}
fSUC	CAGGTGCTTTCTCTGGCTCCA	Aufwärtsprimer zur Überprüfung der Integration und Orientierung einer <i>SUC2</i> -Kassette
fp4HXT1	AACACAAAAACAAAAGTTTTTTTAAATTTTA ATCAAAAATGAATTCAACTCCCGATCTA	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>HXT1</i> zur Klonierung von p425HXT1 und p425HXT1/7-Chimären (Homologie zum <i>HXT7</i> -Promotor)
rp4HXT1	GAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACAT GACTCGAGTTATTTCTGCTAAACAAACT	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>HXT1</i> zur Klonierung von p425HXT1 und p425HXT7/1-Chimären (Homologie zum <i>CYC1</i> -Terminator)
fHXT1	ATGAATTCAACTCCCGATCTA	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>HXT1</i> zur Klonierung von p425HXT7/1-Chimären
rHXT1	TTATTTCTGCTAAACAAACT	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>HXT1</i> zur Klonierung von p425HXT1/7-Chimären
fp4HXT7	AACACAAAAACAAAAGTTTTTTTAAATTTTA ATCAAAAATGTCACAAGACGCTGCTATT	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>HXT7</i> zur Klonierung von p425HXT7 und p425HXT7/1-Chimären (Homologie zum <i>HXT7</i> -Promotor)

rp4HXT7	GAATGTAAGCGTGACATAACTAATTACAT GACTCGAGTTATTTGGTGCTGAACATTCT	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>HXT7</i> zur Klonierung von p425HXT7 und p425HXT1/7-Chimären (Homologie zum <i>CYC1</i> -Terminator)
fHXT7	ATGTCACAAGACGCTGCTATT	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>HXT7</i> zur Klonierung von p425HXT1/7-Chimären
rHXT7	TTATTTGGTGCTGAACATTCT	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>HXT7</i> zur Klonierung von p425HXT7/1-Chimären
fFGY1Cub	TTCGTTCAATTTCAATTGTTCTGAAAGTGG TTTGCGATGGCCGCTCCAGCACCTGCCTT GGCTGCTCCAGCCACCACCCTGCAGGGG TCACCCGGCCAGCGACAT	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>kanMX</i> mit <i>kanMX</i> -Promotor und -Terminator zur Konstruktion von pFGY1p- <i>kanMX</i> -CubPLV
revCub	ACCGGCAAAGATCAATCTTTGTTGATCTG GAGGGATACCAGCTGCGGTTGGAACAGC CAATGGGGCAGCTGGAGCAGGCTCGAGT CGACACTGGATGGCGGCGTT	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>kanMX</i> mit <i>kanMX</i> -Promotor und -Terminator zur Konstruktion von pFGY1p- <i>kanMX</i> -CubPLV
fNubG-X	GTTAAGTCGAAAATTCAAGACAAGGAAGG AATCCCTGCCGCTCCAGCACCTGCCTTGG CTGCTCCAGCCACCACCGAATTCGGGTCA CCCGGCCAGCGACAT	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>kanMX</i> mit <i>kanMX</i> -Promotor und -Terminator zur Konstruktion von pADH1p-NubG- <i>kanMX</i>
rNubG-X	CCCGGGGCTCCATGGCCACTCATGGTC GACCCACCTTAAGCTGCGGTTGGAACAGC CAATGGGGCAGCTGGAGCAGGGAATTCT CGACACTGGATGGCGGCGTT	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>kanMX</i> mit <i>kanMX</i> -Promotor und -Terminator zur Konstruktion von pADH1p-NubG- <i>kanMX</i>
fX-NubG	GCACAATATTTCAAGCTATACCAAGCATAC AATCAAAAATGGCCGCTCCAGCACCTGC CTTGGCTGCTCCAGCCACCACCGAATTCG GGTCACCCGGCCAGCGACAT	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>kanMX</i> mit <i>kanMX</i> -Promotor und -Terminator zur Konstruktion von pADH1p- <i>kanMX</i> -NubG
rX-NubG	GGTTTTACCGTCAAAGTCTTGACGAAAA TCTGCATAGCTGCGGTTGGAACAGCCAAT GGGGCAGCTGGAGCAGGGAATTCTCGAC ACTGGATGGCGGCGTT	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>kanMX</i> mit <i>kanMX</i> -Promotor und -Terminator zur Konstruktion von pADH1p- <i>kanMX</i> -NubG
plexFUS2	AACTTCTTTGCGTCCATCCAAGCATAGGC CACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>kanMX</i> zur Integration einer <i>lexA(ox5)</i> -Bindestelle in den <i>HIS3</i> -Promotor und in den <i>ADE2</i> -Promotor (Homologie zu <i>plexFUS3</i>)
plexFUS3	CAGATCCACTAGTGGCCTATGCTTGGATG GACGCAAAGAAGTT	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>lexA</i> zur Integration einer <i>lexA(ox5)</i> -Bindestelle in den <i>HIS3</i> -Promotor und in den <i>ADE2</i> -Promotor (Homologie zu <i>plexFUS2</i>)
plexHIS1	TAATGAATTATACATTATATAAAGTAATGT GATTTCTTGAAGAATTCGTACGCTGCAG GTCGAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>kanMX</i> zur Integration einer <i>lexA(ox5)</i> -Bindestelle in den <i>HIS3</i> -Promotor (Homologie zum <i>HIS3</i> -Promotor)
plexHIS4	GGTTTCATTTGTAATACGCTTTACTAGGGC TTTCTGCTCTGTCTATTATAGTTTTTCTCCT TGACGT	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>lexA</i> zur Integration einer <i>lexA(ox5)</i> -Bindestelle in den <i>HIS3</i> -Promotor (Homologie zu <i>HIS3</i>)

plexADE1/ S1-ADE2	ATCATCTCATTTCGGTAAATACCAAATGTA TTATATATTGAAAGCTTCGTACGCTGCAG GTCGAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>kanMX</i> zur Integration einer <i>lexA(ox5)</i> -Bindestelle in den <i>ADE2</i> -Promotor (Homologie zum <i>ADE2</i> -Promotor) und Aufwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>ADE2</i>
plexADE4	TCCCAATTGTCCCCTCCTAATATACCAAC TGTTCTAGAATCCATTATAGTTTTTCTCCT TGACGT	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>lexA</i> zur Integration einer <i>lexA(ox5)</i> -Bindestelle in den <i>ADE2</i> -Promotor (Homologie zu <i>ADE2</i>)
S2-ADE2	CTTGTTTTCTAGATAAGCTTCGTAACCGAC AGTTTCTAACTTTTGGCATAGGCCACTAGT GGATCTG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>ADE2</i>
A1-ADE2	GACTAGTAACGCCGTATCGTG	Aufwärtsprimer zur Überprüfung einer <i>ade2</i> -Deletion
A4-ADE1	GTATGAAGTCCACATTTGATG	Abwärtsprimer zur Überprüfung einer <i>ade2</i> -Deletion
pTRP1lac1	GTTATTGCAAGGAAAATTTCAAGTCTTGTA AAAGCATATAAAAATAGTTAATTCGTACGC TGCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>kanMX</i> zum Austausch eines <i>lexA(ox5)-lacZ</i> -Konstruktes gegen <i>TRP1</i> (Homologie zu <i>TRP1</i>)
pTRP1lac2	TTAGTTTTGCTGGCCGCATCTTCTGCATA GGCCACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>kanMX</i> zum Austausch eines <i>lexA(ox5)-lacZ</i> -Konstruktes gegen <i>TRP1</i> (Homologie zu pTRP1lac3)
pTRP1lac3	CAGATCCACTAGTGGCCTATGCAGAAGAT GCGGCCAGCAAACTAA	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>lexA-lacZ</i> zum Austausch eines <i>lexA(ox5)-lacZ</i> -Konstruktes gegen <i>TRP1</i> (Homologie zu pTRP1lac2)
pTRP1lac4	CAGGCAAGTGCACAAACAATACTTAAATA AATACTACTCAGTAATAACCTATTATTTTT GACACCAGACCAACT	Abwärtsprimer zur Amplifizierung von <i>lexA-lacZ</i> zum Austausch eines <i>lexA(ox5)-lacZ</i> -Konstruktes gegen <i>TRP1</i> (Homologie zu <i>TRP1</i>)
TRPlacU1	GTTGAAGTGGCGAGCGATACA	Aufwärtsprimer zur Überprüfung des Austausches eines <i>lexA(ox5)-lacZ</i> -Konstruktes gegen <i>TRP1</i>
TRPlacU2	TATTACTGTCAGCGTAGAAGA	Abwärtsprimer zur Überprüfung des Austausches eines <i>lexA(ox5)-lacZ</i> -Konstruktes gegen <i>TRP1</i>
LA1HXT1	GCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTC CAGCCACCACCAATTCAACTCCCGATCTA ATA	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung von <i>HXT1</i> zur Klonierung von pHXT1-CubPLV, pNubG-HXT1 und pHXT1-NubG (Homologie zum Linker A1)
LA2HXT1	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCA GCTGGAGCAGGTTTCTGCTAAACAACT CTT	Abwärtsprimer für die Amplifizierung von <i>HXT1</i> zur Klonierung von pHXT1-CubPLV, pNubG-HXT1 und pHXT1-NubG (Homologie zum Linker A2)
LA1HXT2	GCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTC CAGCCACCACCATGTCTGAATTCGCTACT AGC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung von <i>HXT2</i> zur Klonierung von pHXT2-CubPLV, pNubG-HXT2 und pHXT2-NubG (Homologie zum Linker A1)
LA2HXT2	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCA GCTGGAGCAGGTTTCTGCGAACTCTTTT TTC	Abwärtsprimer für die Amplifizierung von <i>HXT2</i> zur Klonierung von pHXT2-CubPLV, pNubG-HXT2 und pHXT2-NubG (Homologie zum Linker A2)
LA1HXT3	GCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTC CAGCCACCACCATGAATTCAGAT TTAATATC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung von <i>HXT3</i> zur Klonierung von pHXT3-CubPLV, pNubG-HXT3 und pHXT3-NubG (Homologie zum Linker A1)

LA2HXT3	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCA GCTGGAGCAGGTTTCTTGCCGAACATTTT CTT	Abwärtsprimer für die Amplifizierung von <i>HXT3</i> zur Klonierung von pHXT3-CubPLV, pNubG-HXT3 und pHXT3-NubG (Homologie zum Linker A2)
LA1HXT7	GCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTC CAGCCACCACCATGTCACAAGACGCTGCT ATT	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung von <i>HXT7</i> zur Klonierung von pHXT7-CubPLV, pNubG-HXT7 und pHXT7-NubG (Homologie zum Linker A1)
LA2HXT7	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCA GCTGGAGCAGGTTTGGTCTGAACATTCA CTT	Abwärtsprimer für die Amplifizierung von <i>HXT7</i> zur Klonierung von pHXT7-CubPLV, pNubG-HXT7 und pHXT7-NubG (Homologie zum Linker A2)
LA1GSF2	GCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTC CAGCCACCACCGAGATTTACATTAGACTT AAC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung von <i>GSF2</i> zur Klonierung von pGSF2-CubPLV, pNubG-GSF2 und pGSF2-NubG (Homologie zum Linker A1)
LA2GSF2	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCA GCTGGAGCAGGTTAATTAGATTTTTTCAA A TC	Abwärtsprimer für die Amplifizierung von <i>GSF2</i> zur Klonierung von pGSF2-CubPLV, pNubG-GSF2 und pGSF2-NubG (Homologie zum Linker A2)
LA2GSF2 STOP	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCA GCTGGAGCAGGATTAGATTTTTTCAAATC	Abwärtsprimer für die Amplifizierung von <i>GSF2</i> samt STOP-Codon zur Klonierung von pNubG-GSF2 ^{STOP} (Homologie zum LinkerA2)
LA1GTT1	GCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTC CAGCCACCACCATGTCGTTGCCAATTATC AAAGTC	Aufwärtsprimer für die Amplifizierung von <i>GTT1</i> zur Klonierung von pGTT1-CubPLV, pNubG-GTT1 und pGTT1-NubG (Homologie zum Linker A1)
LA2GTT1	AGCTGCGGTTGGAACAGCCAATGGGGCA GCTGGAGCAGGGAAATTGCTACCTAAAGC ACG	Abwärtsprimer für die Amplifizierung von <i>GTT1</i> zur Klonierung von pGTT1-CubPLV, pNubG-GTT1 und pGTT1-NubG (Homologie zum Linker A2)
a3chimär pHXT7SEQ	TTGTTCTCTGTACACCGTTG CTTTTCTAAGAACAAAGA	Aufwärtsprimer zur Sequenzierung von p426HXT1/4 Aufwärtsprimer zur Sequenzierung von Plasmiden mit <i>HXT7</i> -Promotor (Homologie zum <i>HXT7</i> -Promotor)
pSEQCYC1	GGCGTGAATGTAAGCGTGAC	Abwärtsprimer zur Sequenzierung von Plasmiden mit <i>CYC1</i> -Terminator (Homologie zum <i>CYC1</i> -Terminator)
pFGY1SEQ	GCAGACTGTATATTGAACCCA	Aufwärtsprimer zur Sequenzierung von pFGY1p-kanMX-CubPLV (Homologie zum <i>FGY1</i> -Promotor)
pADHSEQ 1	TTGTTTCTCGTCATTGTTCTCG	Aufwärtsprimer zur Sequenzierung von pADH1p-NubG-kanMX (Homologie zum <i>ADH1</i> -Promotor)
pADHSEQ 2	AGTTTGCCGCTTTGCTATCAA	Aufwärtsprimer zur Sequenzierung von pADH1p-kanMX-NubG (Homologie zum <i>ADH1</i> -Promotor)
tADHSEQ	ATTTTCGTTTTAAACCTAAGAG	Abwärtsprimer zur Sequenzierung von pADH1p-NubG-kanMX und pADH1p-kanMX-NubG (Homologie zum <i>ADH1</i> -Terminator)
A3pkanMX	ATCTGCCAGATGCGAAGTTA	Aufwärtsprimer zur Sequenzierung von pFGY1p-kanMX-CubPLV, pADH1p-NubG-kanMX und pADH1p-kanMX-NubG (Homologie zum <i>kanMX</i>)

2.4 Antikörper

Tab. 7: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Quelle/Referenz
anti-Hxt1	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die Aminosäuren 17-49 des Hexosetransporters Hxt1	Krampe <i>et al.</i> , 1998
anti-Hxt7	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die Aminosäuren 17-47 des Hexosetransporters Hxt7	Krampe <i>et al.</i> , 1998
anti-HA	Monoklonaler Antikörper aus Ratte gegen ein Epitop des Hämagglutinins des humanen Influenzavirus	Roche
anti-Dpm1	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen die Dolicholphosphat-Mannose-Synthase	Molecular Probes
anti-Vps10	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen Pep1	Molecular Probes
anti-Pma1	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die Plasmamembran H ⁺ -ATPase	R. Kölling, Düsseldorf
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase Komplex aus Ratte gekoppelt mit Peroxidase	Sigma
anti-Maus IgG POD-Konjugat	Sekundär-Antikörper gegen Maus-Antikörper gekoppelt mit Peroxidase	Roche
anti-Kaninchen IgG (H+L) POD-Konjugat	Sekundär-Antikörper gegen Kaninchen-Antikörper gekoppelt mit Peroxidase	Dianova
anti-Ratte IgG POD-Konjugat	Sekundär-Antikörper gegen Ratten-Antikörper gekoppelt mit Peroxidase	Roche

2.5 Enzyme, Chemikalien und Materialien

Quelle/Referenz	Enzyme, Chemikalien, Material
Acros Organics	Arginin, Galaktose, Harnstoff, Imidazol, Kaliumacetat, Lysin, Maltose, Natriumacetat, Phenylalanin
Amersham	D-[¹⁴ C(U)]-Glukose
Beckman	Ultra-Clear Zentrifugen-Röhrchen (14x95mm)
biomers	synthetische Oligonukleotide
BioRad	Poly-Prep Chromatographie-Säulen, Precision Plus Protein Dual Color Standards, Laemmli Buffer, 10xTGS (Tris/Glycine/SDS), 4-15% Tris-HCl Ready Gel
Braun-Melsungen	Glasperlen (Ø 0,45mm)
Caesar & Loretz	Glukose
Calbiochem	G418 Sulfat/Geneticin
Cayla	Phleomycin
Dianova	Sekundär-Antikörper
Difco	bakteriologischer Hefeextrakt, bakteriologisches Trypton, Dextrose, Maltose, Yeast nitrogen base w/o amino acids, Yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulphate

Fuji	Fujifilm medizinische Röntgenfilme SuperRX
ICN Biomedicals Inc.	Dithiothreitol (DTT)
Interactiva	synthetische Oligonukleotide
Gibco BRL / Invitrogen	UltraPure Agarose, <i>E.coli</i> Stämme, SilverQuest (Silver staining Kit), T4-DNA-Ligase, rekombinante TEV-Protease
J.T.Baker	Chloroform, Harnstoff, Kaliumacetat, Kaliumdihydrogenphosphat, di-Kaliumhydrogenphosphat, Kaliumhydroxid, Magnesiumchlorid, Natriumchlorid, Natriumhydroxid
Janssen Chimica	Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO)
Kodak	Röntgenfilm-Entwickler, Röntgenfilm-Fixierer
New England Biolabs (NEB)	Endoglycosidase H, Restriktionsenzyme, Rinderserumalbumin (BSA)
MBI	Lambda-Phagen-DNA, dNTP Set
Merck	Adenin, Alanin, Ammoniumperoxidsulfat (APS), Chloroform, EDTA, N,N-Dimethylformamid (DMF), Dimethylsulfoxid (DMSO), di-Kaliumhydrogenphosphat, Leucin, β -Mercaptoethanol, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Methanol, di-Natriumhydrogenphosphat, Natriumdihydrogenphosphat, 2-Propanol, Salzsäure, TEMED, Tween20, Uracil
Millipore	Immobilon-N PVDF Transfer-Membran
Molecular Probes	Antikörper
Open Biosystems	<i>S.cerevisiae</i> Stamm
Oxoid	bakteriologischer Agar, Hefeextrakt, bakteriologisches Pepton
Pierce	SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate
Qiagen	QIAprep Spin Miniprep Kit, Plasmid Mini Kit, QIAquick PCR Purification Kit, QIAex II Gel Extraction Kit
Research Genetics	synthetische Oligonukleotide (Yeast GENEPAIRS)
Riedel-de Haen	Essigsäure, Ethanol, Methanol
Roche	Antikörper, alkalische Phosphatase, Expand™ High Fidelity PCR System, Hering-Sperma DNA, Nonidet P40, Protease Inhibitor Cocktail Tabletten „Complete“
Roth	Rotiphorese Gel 30 Acrylamid, Adenin, Ammoniumsulfat, Ampicillin, Brillant Blau G250, Calciumchlorid, Dextrose, N,N-Dimethylformamid (DMF), Dithiothreitol (DTT), EDTA, EGTA, Essigsäure, Ethanol, Ethidiumbromid, Galaktose, Glasperlen, Glycin, Glycerin, Hepes, Histidin, Isoleucin, Isopropyl-Thio- β -D-Galactopyranosid (IPTG), Kaliumchlorid, Lithiumacetat, Lysin, Magnesiumacetat, Magnesiumsulfat, 2-Methanol, Methionin, β -Mercaptoethanol, Milchpulver, Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), Natriumhydrogencarbonat, Natriumcitrat, Natriumhydroxid, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Phenylalanin, Phenol, ortho-Phosphorsäure, 2-Propanol, Prolin, Raffinose, Saccharose, Salzsäure, SDS, Sorbit, TEMED, Threonin, Trichloressigsäure (TCA), Tris, TritonX100, Tween 20, Tyrosin, Valin

Seikagaku Kogyo Co. Ltd.	Zymolyase 100T
Serva	Ammoniumpersulfat (APS), Bromphenolblau, 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid (X-Gal), Calciumchlorid, Glycerin, Morpholinopropanesulfonsäure (MOPS), PonceauS, Rinderserumalbumin (BSA), SERVAPOR Dialyse-Schlauch (21mm), SDS, Tween20
Sigma / Fluka	Ampicillin, Antikörper, Aprotinin, Benzamidine, Choline, L-Citrullin, Chymostatin, Ethidiumbromid, Glycin, Prestained High molecular weight standard (HMW), mikrobielles Leupeptin, Lithiumacetat, o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (ONPG), mikrobielles Pepstatin A, PMSF, Polyethylenglycol 3350, Rabbit IgG Agarose saline suspension, Succinat, Sorbit, synthetische Oligonukleotide, Trichloressigsäure (TCA), Tris
Stratagene	<i>E. coli</i> Stamm, Calmodulin Affinity Resin
Thermo Hybaid Interactiva	synthetische Oligonukleotide
TRC Toronto Research Chemicals Inc.	5-Fluoroorotsäure (5-FOA)
Whatman	GF/C Glas-Fiber-Filter
Zinnsser Analytik	Szintillationslösung „Quicksafe A“

2.6 Transformation

2.6.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation der *E. coli* Zellen erfolgte durch die Elektroporationsmethode nach Dower *et al.* (1988) und Wirth (1993) mittels eines GENE-PULSER Geräts der Firma BioRad oder alternativ mittels eines Easyject prima Geräts (EQUIBO).

2.6.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* Stämmen mit Plasmid-DNA bzw. DNA-Fragmenten erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode von Gietz und Woods (1994). Zur Selektion auf eine Geneticin-Resistenz wurden die Zellen nach der Transformation für 4h bei 30°C in Vollmedium inkubiert und im Anschluss auf G418-haltigen Mediumsplatten ausplattiert.

2.7 Präparation von DNA

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979), modifiziert nach Maniatis *et al.* (1982) oder alternativ mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen.

Hochreine Plasmid-DNA für Sequenzierungen wurde mit dem „Plasmid Mini Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers präpariert.

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

Die Zellen einer stationären Hefekultur (5ml) wurden durch Zentrifugation geerntet, gewaschen und in 400µl Puffer P1 (Plasmid Mini Kit, Firma Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von 400µl Puffer P2 und $\frac{2}{3}$ Volumen Glasperlen ($\varnothing 0,45\text{mm}$) erfolgte der Zellaufschluss durch 5-minütiges Schütteln auf einem Vibrax (Vibrax-VXR von Janke & Kunkel oder IKA). Der Überstand wurde mit $\frac{1}{2}$ Volumen Puffer P3 versetzt, gemischt und für 10min auf Eis inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 13000rpm wurde durch Zugabe von 0,75ml Isopropanol zum Überstand die Plasmid-DNA bei Raumtemperatur gefällt. Die durch Zentrifugation für 30min bei 13000rpm pelletierte DNA wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20µl Wasser resuspendiert. 1µl der DNA wurde für die Transformation in *E. coli* (2.6.1) eingesetzt.

2.7.3 Isolierung chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae*

Die Zellen aus einer stationären Hefekultur (50ml) des Stammes FY1679 (Tab. 2) wurden durch Zentrifugation geerntet, zweimal gewaschen, in 4ml SCE-Lösung (1M Sorbit, 100mM Na-Citrat, 60mM Na₂-EDTA, pH7,0) mit 1µl/ml β-Mercaptoethanol und 250µg Zymolyase resuspendiert und für 1h bei 37°C vorsichtig invertiert. Im Anschluss wurden 200µg RNaseA zu dem Ansatz zugefügt und dieser erneut für 1h bei 37°C vorsichtig invertiert. Nach Zugabe von 8ml SDS-Lösung (2% SDS, 50mM Tris, 10mM EDTA, pH8,0) wurde der Ansatz für 10min bei RT inkubiert, anschließend mit 4ml 5M NaCl versetzt, für mindestens 2h bei 4°C inkubiert, 15min bei 10000rpm zentrifugiert und das Pellet in 8ml TE-Puffer (10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA) resuspendiert. Der Ansatz wurde über eine Phenol-Chloroform-Extraktion (2.12) aufgereinigt, die chromosomale DNA mit dem $\frac{2}{2}$ -fachen Volumen eiskaltem 96%igem Ethanol gefällt, für 30min bei 13000rpm zentrifugiert, mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt (2.16). Die chromosomale DNA wurde als DNA-Vorlage in einer PCR (2.9) eingesetzt.

2.8 Enzymatische Modifikation von DNA

2.8.1 DNA-Restriktion

Sequenzspezifische Spaltungen der DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Inkubationsbedingungen für 2-3 Stunden mit 2-5U Enzym pro µg DNA durchgeführt.

2.8.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Die Dephosphorylierung von DNA-Enden erfolgte durch Zugabe von 1U alkalischer Phosphatase zum Restriktionsansatz und einstündiger Inkubation bei 37°C. Im Anschluss wurden die dephosphorylierten DNA-Fragmente durch elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel aufgereinigt (2.14).

2.8.3 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem 20µl Ansatz bestehend aus Vektor-DNA, einem 3-5fachem molarem Überschuß an Fragment-DNA und 1U T4-Ligase für 16h bei 4°C.

2.9 DNA-Amplifizierung mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50µl mit dem „Expand™ High Fidelity PCR System“ der Firma Roche nach Angaben des Herstellers. Jeder Ansatz bestand aus 1-10ng DNA oder 1-2 Hefekolonien als Synthesevorlage, 0,2mM dNTP-Mix, 1xPuffer 2 (enthält 1,5mM MgCl₂), 1U Polymerase und je 100pmol der entsprechenden Oligonukleotidprimer. Im Falle des Einsatzes ganzer Hefezellen wurden diese mit einem sterilen Zahnstocher von einer Agarplatte abgenommen und in einem Reaktionsgefäß für 2min in der Mikrowelle erhitzt bevor die übrigen Komponenten zugefügt wurden. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler der Firma Techne durchgeführt und die PCR-Bedingungen nach Bedarf wie folgt gewählt:

- | | | | |
|----|--------|--|---|
| 1. | 1x | 4min, 95°C | Denaturierung der DNA |
| 2. | 18-35x | 30-60sec, 95°C | Denaturierung der DNA |
| | | 30-45sec, 50-56°C | Annealing/Bindung der Primer an die DNA |
| | | 1-8 ¹ / ₂ min, 68°C/72°C | DNA-Synthese/Elongation |
| 3. | 1x | 2-17min, 68°C/72°C | DNA-Synthese/Elongation |

Nach dem ersten Denaturierungsschritt wurde die Polymerase zugegeben („hot start PCR“). Die Anzahl der Syntheseschritte, die Annealing-Temperatur und die Elongationszeit sind detailliert unter 2.10 beschrieben.

Die PCR-Produkte wurden durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft und bei Bedarf wie unter 2.11 oder 2.14 beschrieben aufgereinigt.

2.10 PCR-Bedingungen

PCR		Temperatur	Zeit	Zyklen
<i>HXT1</i> -Amplifizierung für p426 <i>HXT1/4</i> ; <i>kanMX</i> -Amplifizierung für pFGY1p- <i>kanMX</i> -CubPLV, pADH1p- NubG- <i>kanMX</i> und pADH1- <i>kanMX</i> -NubG; <i>kanMX</i> -Amplifizierung für <i>gsf2</i> -Deletion; HA- <i>GSF2</i> -Promotor-Amplifizierung für YCpHA- <i>GSF2</i>	1	95°C	4min	25
	2	95°C 54°C 72°C	30sec 30sec 2min	
	3	72°C	5min	
<i>HXT4</i> -Amplifizierung für p426 <i>HXT1/4</i> ; <i>GSF2</i> -Promotor-Amplifizierung für YCpHA- <i>GSF2</i>	1	95°C	4min	25
	2	95°C 54°C 72°C	30sec 30sec 1min	
	3	72°C	2½min	
<i>kanMX</i> - und <i>lexA</i> -Amplifizierung für THY.AP1 und THY.AP3; <i>kanMX</i> -Amplifizierung für <i>ade2</i> -Deletion im THY.AP4; <i>lexA-lacZ</i> -Amplifizierung für THY.AP4	1	95°C	4min	20
	2	95°C 54°C 68°C	30sec 30sec 3min	
	3	68°C	6min	
Verifikation der <i>trp1</i> -Deletion im THY.AP4 mit TRPlacU1 und TRPlacU2	1	95°C	4min	30
	2	95°C 52°C 72°C	45sec 45sec 1min	
	3	72°C	2min	
Verifikation der <i>ade2</i> -Deletion im THY.AP5 mit A1-ADE2 und A4- ADE2; Verifikation der <i>gsf2</i> -Deletion mit A1- <i>GSF2</i> und A4- <i>GSF2</i> bzw. B1- <i>GSF2</i> und B4- <i>GSF2</i>	1	95°C	4min	35
	2	95°C 54°C 72°C	45sec 45sec 3min	
	3	72°C	7min	
<i>HXT1</i> -Amplifizierung für pHXT1-CubPLV, pNubG- <i>HXT1</i> und pHXT1-NubG; <i>HXT2</i> -Amplifizierung für pHXT2-CubPLV, pNubG- <i>HXT2</i> und pHXT2-NubG; <i>HXT3</i> -Amplifizierung für pHXT3- CubPLV, pNubG- <i>HXT3</i> und pHXT3-NubG; <i>HXT7</i> -Amplifizierung für pHXT7-CubPLV, pNubG- <i>HXT7</i> und pHXT7-NubG	1	95°C	4min	18
	2	95°C 52°C 72°C	30sec 30sec 2min	
	3	72°C	5min	
<i>GSF2</i> -Amplifizierung für p <i>GSF2</i> -CubPLV, pNubG- <i>GSF2</i> und p <i>GSF2</i> -NubG	1	95°C	4min	25
	2	95°C 50°C 72°C	60sec 45sec 1½min	
	3	72°C	3min	
<i>GTT1</i> -Amplifizierung für p <i>GTT1</i> -CubPLV, pNubG- <i>GTT1</i> und p <i>GTT1</i> -NubG	1	95°C	4min	20
	2	95°C 52°C 72°C	45sec 45sec 1min	
	3	72°C	3min	
<i>kanMX</i> -Amplifizierung für <i>gtt1</i> -Deletion; <i>HXT1</i> - und <i>HXT7</i> -Amplifizierung für p425 <i>HXT1</i> , p425 <i>HXT7</i> , p425 <i>HXT1/7</i> und p425 <i>HXT7/1</i>	1	95°C	4min	18
	2	95°C 54°C 72°C	30sec 30sec 2min	
	3	72°C	5min	
Verifikation der <i>gtt1</i> -Deletion mit A1- <i>GTT1</i> und A4- <i>GTT1</i>	1	95°C	4min	35
	2	95°C 50°C 72°C	45sec 45sec 2½min	
	3	72°C	5min	
<i>GTT1</i> -Amplifizierung für p426 <i>GTT1</i>	1	95°C	4min	18
	2	95°C 54°C 72°C	60sec 60sec 1min	
	3	72°C	2½min	
<i>RSE1</i> -Amplifizierung für p425 <i>RSE1</i>	1	95°C	4min	25
	2	95°C 52°C 72°C	45sec 45sec 5min	
	3	72°C	10min	

$\Delta gsf2::loxP$ -Amplifizierung für p425 $\Delta gsf2::loxP$; $\Delta gsf2::loxP$ -kanMX-Amplifizierung für p425 $\Delta gsf2::loxP$ -kanMX	1	95°C	4min	35
	2	95°C 50°C 72°C	60sec 60sec 2/3min	
	3	72°C	5/6min	
GSF2-Amplifizierung für p425GSF2 und p426GSF2	1	95°C	4min	20
	2	95°C 52°C 72°C	45sec 45sec 2 ¹ / ₂ min	
	3	72°C	5min	
SAR1 ¹⁻²⁸ -Amplifizierung für p426SAR1 ^{ΔI}	1	95°C	4min	25
	2	95°C 60°C 72°C	30sec 30sec 30sec	
	3	72°C	1min	
SAR1 ¹⁶⁸⁻⁷¹² -Amplifizierung für p426SAR1 ^{ΔI} ; SAR1-Amplifizierung für p426SAR1	1	95°C	4min	25
	2	95°C 50°C 72°C	45sec 45sec 1min	
	3	72°C	3min	
SEC12-Amplifizierung für p423SEC12; SEC23-Amplifizierung für p426SEC23; SEC24-Amplifizierung für p425SEC24	1	95°C	4min	25
	2	95°C 54°C 72°C	45sec 45sec 3min	
	3	72°C	6min	
SEC16-Amplifizierung für p424SEC16	1	95°C	4min	25
	2	95°C 54°C 68°C	45sec 45sec 8 ¹ / ₂ min	
	3	68°C	17min	
HIS3MX-Amplifizierung zur <i>doa4</i> -Deletion	1	95°C	4min	20
	2	95°C 52°C 72°C	30sec 30sec 2min	
	3	72°C	5min	
Verifikation der <i>doa4</i> -Deletion mit A1-DOA4 und A4-DOA4	1	95°C	4min	30
	2	95°C 56°C 72°C	45sec 45sec 4min	
	3	72°C	8min	
GSF2-Amplifikation für YCpHA-GSF2 ^{BamHI-43} , YCpHA-GSF2 ^{BamHI-511} und YCpHA-GSF2 ^{BamHI-1186}	1	95°C	4min	18
	2	95°C 52°C 72°C	30sec 30sec 1/2min	
	3	72°C	3/5min	
Verifikation der <i>SUC2</i> -Orientierung in YCpHA-GSF2 ^{SUC2-43} , YCpHA-GSF2 ^{SUC2-511} und YCpHA-GSF2 ^{SUC2-1186}	1	95°C	4min	30
	2	95°C 52°C 72°C	30sec 30sec 2min	
	3	72°C	5min	
Verifikation der Insert-Größe von p425HXT1/7 und p425HXT7/1	1	95°C	4min	35
	2	95°C 54°C 72°C	30sec 30sec 2min	
	3	72°C	5min	
HXT1/7- und HXT7/1-Amplifizierung der genomisch-integrierten Chimären-Sequenzen für p425TM1, p425TM2, p425TM3, p425TM4, p425TM5, p425TM6*, p425TM11, p425TM12	1	95°C	4min	30
	2	95°C 54°C 72°C	45sec 45sec 3min	
	3	72°C	7min	

2.11 DNA-Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Produkten erfolgte mit dem „Qiaquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.12 Phenol-Chloroform-Extraktion

Der Ansatz wurde zunächst mit 5ml Phenol versetzt, vorsichtig mehrmals invertiert und für 10min mit 13000rpm zentrifugiert. Die oberste, wässrige Phase wurde abgenommen und erneut mit Phenol gewaschen. Der Vorgang wurde insgesamt 3x wiederholt. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 5ml Chloroform versetzt, ebenfalls vorsichtig mehrmals invertiert und für 10min bei 13000rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt 3x durchgeführt. Im Anschluss an die Extraktion wurde die DNA mit Ethanol gefällt.

2.13 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 0,15-20kb erfolgte in 0,5-2%igen Agarosegelen mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1xTAE-Puffer (40mM Tris, 40mM Essigsäure, 2mM EDTA) verwendet (Maniatis *et al.*, 1982). Als Größenstandard diente eine mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* geschnittene Lambda-Phagen-DNA. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit $\frac{1}{10}$ Volumen Blaumarker (1xTAE-Puffer, 10% Glycerin, 0,004% Bromphenolblau) versetzt und nach der Auftrennung durch Bestrahlung mit UV-Licht (254nm) sichtbar gemacht.

2.14 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem TAE-Agarosegel unter langwelligem UV-Licht (366nm) ausgeschnitten und mit dem „Qiaex II Gel Extraction Kit“ oder dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.15 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen von Plasmid-DNA wurden von der Firma SEQLAB (Sequence Laboratories, Göttingen) oder von der Firma SRD (Scientific Research and Development GmbH, Oberursel) durchgeführt.

2.16 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch in einem Wellenlängenbereich von 240-300nm gemessen. Liegt die Reinheit der DNA, bestimmt durch

den Quotient $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$, bei 1,8, so entspricht die Extinktion $E_{260\text{nm}}=1,0$ einer DNA-Konzentration von $50\mu\text{g dsDNA/ml}$ (Maniatis *et al.*, 1982).

2.17 Klonierung von Plasmiden durch *in vivo*-Rekombination

Für eine *in vivo*-Klonierung von DNA-Fragmenten in *S. cerevisiae* wurde zunächst die zu klonierende DNA-Sequenz in einer PCR (2.9) amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide enthielten im 3'-Bereich 21bp, die homolog zum 5'- bzw. 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz waren und besaßen zusätzlich spezifische 5'-terminale Anhänge von 39bp, die homolog zu dem gewählten Integrationsbereich der Zielvektoren (YCplac33, p423HXT7-6HIS, p424HXT7-6HIS, p425-HXT7-6HIS, p426HXT7-6HIS) waren. Der Vektor wurde durch Restriktion im Integrationsbereich linearisiert (2.8.1), gereinigt (2.14) und zusammen mit dem PCR-Produkt in die Hefe transformiert (2.6.2). Die Zellen wurden im Anschluss auf Selektivmedium ausplattiert, dem für die Selektion auf den Auxotrophiemarker des Vektors die entsprechende Aminosäure bzw. Nukleobase fehlte. Somit konnten nur solche Transformanten wachsen, die aufgrund homologer Rekombination des DNA-Fragmentes bzw. der DNA-Fragmente mit dem linearisierten Vektor ein stabiles, zirkularisiertes Plasmid besaßen. Die Plasmide wurden isoliert (2.7.2), in *E. coli* amplifiziert (2.6.1) und durch eine anschließende Restriktionsanalyse (2.8.1) und teilweise durch Sequenzierung (2.15) überprüft.

2.17.1 Integration einer *SUC2*-Topologie-Reporterkassette

Für die klassische Klonierung der *SUC2*-Reporterkassette (Gilstring und Ljungdahl, 2000) über Ligation in das *GSF2*-Gen mußten zuvor Restriktionserkennungssequenzen für die Endonukleasen *Bam*HI über *in vivo*-Rekombination in den *GSF2*-ORF integriert werden. Mittels der Oligonukleotidpaare unfSUC/rHA-SUC, unfSUC/rSUCmitte und unfSUC/rSUCHinten wurden die *HAGSF2*-Sequenzen 5'-terminal der zu integrierenden *Bam*HI-Restriktionserkennungssequenz von dem Plasmid YCpHA-*GSF2* in einer PCR (2.9) amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide rHA-SUC, rSUCmitte und rSUCHinten enthielten die *Bam*HI-Restriktionserkennungssequenz 'GGATCC' und zusätzlich eine 21bp Nukleotidabfolge homolog zu den Oligonukleotiden fHA-SUC, fSUCmitte und fSUCHinten der zweiten PCR. In dieser zweiten PCR wurde mittels der Oligonukleotidpaare fHA-SUC/unrSUC, fSUCmitte/unrSUC und fSUCHinten/unrSUC die *HAGSF2*-Sequenzen 3'-terminal der zu integrierenden *Bam*HI-Restriktionserkennungssequenz von dem Plasmid YCpHA-*GSF2* (2.9) amplifiziert. Die Oligonukleotide fHA-SUC, fSUCmitte und fSUCHinten enthielten ebenfalls die *Bam*HI-Restriktionserkennungssequenz 'GGATCC' und zusätzliche 21bp

homolog zu den Oligonukleotiden rHA-SUC, rSUCmitte und rSUChinten der ersten PCR. Das Oligonukleotid unfSUC war homolog zu einem Sequenzbereich 5'-terminal der *GSF2*-Promotorregion auf dem Plasmid YCpHA-GSF2, und das Oligonukleotid unrSUC war homolog zu einem Sequenzbereich 3'-terminal der *GSF2*-Terminatorregion auf demselben Plasmid. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt (2.11) und jeweils zwei zusammen mit dem durch Restriktion linearisierten (2.8.1) und aufgereinigten (2.14) Vektor YCpHA-GSF2^{NotI} in die Hefe transformiert (2.6.2). Die Zellen wurden im Anschluss auf Selektivmedium ausplattiert, dem zur Selektion auf den Auxotrophiemarker des Vektors kein Uracil zugesetzt wurde. Somit wurden nur solche Transformanten erhalten, die aufgrund von drei *in vivo*-Rekombinationen der beiden PCR-Produkte und dem linearisierten Vektor ein stabiles, zirkuläres Plasmid besaßen. Die Plasmide mit integrierter *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle YCpHA-GSF2^{BamHI-43}, YCpHA-GSF2^{BamHI-511} und YCpHA-GSF2^{BamHI-1186} wurden aus Hefe isoliert (2.7.2), in *E. coli* amplifiziert (2.6.1) und durch eine anschließende Restriktionsanalyse (2.8.1) überprüft.

Die Plasmide wurden durch Restriktion über die neu eingefügte *Bam*HI-Schnittstelle linearisiert (2.8.1), dephosphoryliert (2.8.2) und mit der durch Restriktion (2.8.1) und Aufreinigung (2.14) des Vektors pFG112^{BamHI} erhaltenen *SUC2*-Reporter-kassette ligiert (2.8.3). Die ligierten Plasmide YCpHA-GSF2^{SUC2-43}, YCpHA-GSF2^{SUC2-511} und YCpHA-GSF2^{SUC2-1186} wurden in *E. coli* amplifiziert (2.6.1) und durch eine anschließende Restriktionsanalyse (2.8.1) überprüft. Die Orientierung der *SUC2*-Reporter-kassette wurde anschließend mittels PCR mit den Oligonukleotidpaaren unfSUC/fSUC und fSUC/unrSUC überprüft (2.9). Das Oligonukleotid fSUC bindet bei einer korrekt integrierten *SUC2*-Reporter-kassette in abwärts-Richtung und erzeugt somit in Kombination mit dem Oligonukleotid unrSUC ein PCR-Produkt. Ein positives PCR-Produkt bei Gebrauch der Oligonukleotide fSUC/unfSUC zeigte hingegen, dass die *SUC2*-Reporter-kassette falsch orientiert integriert wurde.

2.18 Fusion von DNA-Fragmenten

2.18.1 Herstellung eines *HXT1/4*-Chimärs

Für die Herstellung eines chimären Hxt1/4-Proteins wurden zunächst zwei getrennte PCR-Reaktionen (2.9) durchgeführt.

Mit den Oligonukleotiden F-HXT1 (Yeast GENEPAIR) und cha2HXT1 wurde die *HXT1*¹⁻¹²⁹²-Sequenz von dem Plasmid pTHXT1-2 amplifiziert. Durch die Zugabe des Oligonukleotids T3-ORF, das mit seiner 3'-Sequenz an das F-HXT1-

Oligonukleotid binden kann, wurde das PCR-Produkt im 5'-Bereich mit einem homologen Anhang zum linearisierten Vektor p426HXT7-6HIS versehen. Das Oligonukleotid cha2HXT1 bindet im *HXT1*-ORF im Bereich von 1264-1292bp und enthält 5'-terminal zusätzlich 7 Nukleotide, die homolog zum *HXT4*-ORFs sind.

Die *HXT4*¹²⁸⁵⁻¹⁶⁸³-Sequenz wurde mit den Oligonukleotiden cha3HXT4 und R-HXT4 (Yeast GENEPAIR) von dem Plasmid YlpHXT4 amplifiziert. Bei dieser PCR-Reaktion führte die Zugabe des Oligonukleotides T2-ORF durch die Bindung an das R-HXT4 Oligonukleotid dazu, dass das PCR-Produkt am 3'-Ende ebenfalls einen homologen Anhang zum linearisierten Vektor p426HXT7-6HIS erhielt. Das Oligonukleotid cha3HXT4 bindet im *HXT4*-ORF im Bereich von 1285-1317bp und enthält 5'-terminal zusätzlich 3 Nukleotide, die homolog zum *HXT1*-ORFs sind.

Da die DNA-Sequenz des *HXT1*-ORFs im Bereich von 1267-1292bp und des *HXT4*-ORFs im Bereich von 1285-1310bp identisch sind und diese homologen Bereiche bei den PCR-Produkten zusätzlich durch die Oligonukleotide cha2HXT1 und cha3HXT4 verlängert wurden, besaßen die PCR-Produkte schließlich 36bp lange homologe Sequenzen. Die beiden PCR-Produkte wurden aufgereinigt (2.11) und zusammen mit dem durch Restriktion linearisierten (2.8.1) und aufgereinigten (2.14) Vektor p426HXT7-6HIS^{BamHI/HindIII} in die Hefe transformiert (2.6.2). Die Zellen wurden im Anschluss auf Selektivmedium ausplattiert, dem zur Selektion auf den Auxotrophiemarker des Vektors kein Uracil zugesetzt wurde. Somit wurden nur solche Transformanten erhalten, die aufgrund von drei *in vivo*-Rekombinationen der beiden PCR-Produkte und dem linearisierten Vektor ein stabiles, zirkuläres Plasmid besaßen. Das Plasmid p426HXT1/4 wurde aus Hefe isoliert (2.7.2), in *E. coli* amplifiziert (2.6.1) und durch eine Restriktionsanalyse (2.8.1) und durch Sequenzierung (2.15) mit dem Oligonukleotid a3chimär überprüft.

2.18.2 Herstellung von *HXT1/7*- und *HXT7/1*-Chimären

Für die Herstellung von chimären Hxt1/7- und Hxt7/1-Proteinen mußten wie schon zuvor bei den Hxt1/4-Chimären (2.18.1) zunächst zwei getrennte PCR-Reaktionen (2.9) durchgeführt werden.

Für die Konstruktion chimärer **Hxt1/7-Proteine** wurde der *HXT1*-ORF mit den Oligonukleotiden fp4HXT1 und rHXT1 mittels PCR von dem Plasmid pTHXT1-2 amplifiziert. Das Oligonukleotid fp4HXT1 bindet mit 21bp im 5'-Bereich des *HXT1*-ORFs und enthält einen 39bp langen homologen Anhang zum linearisierten Vektor p425HXT7-6HIS, während das Oligonukleotid rHXT1 mit 21bp im 3'-Bereich des *HXT1*-ORFs bindet. Der *HXT7*-ORF wurde mit den Oligonukleotiden fHXT7 und rp4HXT7 mittels PCR von dem Plasmid YCpHXT7a amplifiziert. Das

Oligonukleotid fHXT7 bindet mit 21bp im 5'-Bereich des *HXT7*-ORFs und das Oligonukleotid rp4HXT7 bindet mit 21bp im 3'-Bereich des *HXT7*-ORFs und besitzt zusätzlich einen 39bp langen homologen Anhang zum linearisierten Vektor p425HXT7-6HIS.

Die beiden PCR-Produkte wurden aufgereinigt (2.11) und zusammen mit dem durch Restriktion linearisierten (2.8.1) und aufgereinigten (2.14) Vektor p425-HXT7-6HIS^{BamHI/HindIII} in die Hefe transformiert. Die Zellen wurden im Anschluss auf Selektivmedium ausplattiert, dem zur Selektion auf den Auxotrophiemarker des Vektors Leucin fehlte. Da beide PCR-Produkte jeweils nur einen homologen Anhang zu dem linearisierten Vektor besaßen, konnten nur solche Transformanten wachsen, die aufgrund von drei *in vivo*-Rekombination der zwei PCR-Produkte und dem linearisierten Vektor ein stabiles, zirkuläres Plasmid enthielten. Die homologe Rekombination des *HXT1*-PCR-Produktes mit dem linearisierten Vektor, sowie die homologe Rekombination des *HXT7*-PCR-Produktes mit dem linearisierten Vektor fanden gezielt an definierten DNA-Sequenzen statt, während die homologen Rekombinationen zwischen dem *HXT1*-PCR-Produkt und dem *HXT7*-PCR-Produkt willkürlich in Bereichen der ORFs stattfinden konnten, die eine genügend hohe Homologie aufwiesen. Die verschiedenen p425HXT1/7-Plasmide wurden aus Hefe isoliert (2.7.2), in *E. coli* amplifiziert (2.6.1) und durch Restriktionsanalyse (2.8.1) und durch Sequenzierung (2.15) mit den Oligonukleotiden pHXT7SEQ und pSEQCYC1 charakterisiert.

Die Konstruktion von chimären **Hxt7/1-Proteinen** erfolgte entsprechend der Herstellung der chimären HXT1/7-Proteine. Zur Amplifizierung des *HXT7*-ORFs wurden in diesem Fall die Oligonukleotide fp4HXT7 und rHXT7 und zur Amplifizierung des *HXT1*-ORFs die Oligonukleotide fHXT1 und rp4HXT1 eingesetzt. Somit erhielt das *HXT7*-PCR-Produkt einen 5'-terminalen 39bp langen homologen Anhang und das *HXT1*-PCR-Produkt einen 3'-terminalen 39bp langen homologen Anhang zu dem linearisierten Vektor. Die beiden PCR-Produkte wurden aufgereinigt (2.11) und zusammen mit dem durch Restriktion linearisierten (2.8.1) und aufgereinigten (2.14) Vektor p425HXT7-6HIS^{BamHI/HindIII} in die Hefe transformiert. Die Zellen wurden zur Selektion auf synthetischem Komplettmedium ohne Leucin ausplattiert. Die verschiedenen p425HXT7/1-Plasmide wurden aus Hefe isoliert (2.7.2), in *E. coli* amplifiziert (2.6.1) und durch Restriktionsanalyse (2.8.1) und durch Sequenzierung (2.15) mit den Oligonukleotiden pHXT7SEQ und pSEQCYC1 charakterisiert.

2.19 Gen-Deletionen in *S. cerevisiae*

Die Deletion von Genen wurde mit dem *loxP-kanMX-loxP*/Cre-Rekombinase-System nach Güldener *et al.* (1996) oder mit der *Schizosaccharomyces pombe HIS3MX*-Deletionskassette (Walch *et al.*, 1994) durchgeführt. Die Deletion wurde dabei durch homologe Integration der jeweiligen Deletionskassette in die chromosomale DNA bei gleichzeitiger Entfernung des gewünschten Gens erzielt.

2.19.1 Gen-Deletionen mittels der *loxP::kanMX::loxP*-Deletionskassette

In einer PCR-Reaktion (2.9) wurde zunächst die *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit entsprechenden Oligonukleotiden (S1-GSF2/S2-GSF2, S1-GTT1/S2-GTT1, S1-ADE2/S2-ADE2) amplifiziert. Diese 65-70mere weisen einerseits 44-48bp lange homologe Bereiche zu den 5'- bzw. 3'-flankierenden Sequenzen des zu deletierenden Gens auf und andererseits 21bp lange homologe Bereiche zu den *loxP-kanMX-loxP*-flankierenden Sequenzen. Die amplifizierte Deletionskassette enthielt folglich neben dem Geneticin-Resistenzgen auch die homologen Bereiche zu dem zu deletierenden Gen. Nach Transformation der Deletionskassette in die Hefe (2.6.2) erfolgte die Selektion auf Geneticin-resistente Klone auf G418-haltigen Vollmediumsplatten. Die ersten 48bp des zu deletierenden Gens blieben aufgrund der Wahl der Oligonukleotide bei der homologen Rekombination erhalten. Die Deletion wurde im Anschluss mittels PCR mit ganzen Zellen (2.9) unter Verwendung der Oligonukleotidpaare A1/A4 bzw. B1/B4 verifiziert.

Das integrierte *kanMX*-Gen kann mit Hilfe der Cre-Rekombinase mittels Rekombination der *loxP*-Sequenzen wieder effizient entfernt und das *loxP-kanMX-loxP*/Cre-Rekombinase-System somit wieder verwendet werden. Die Zellen wurden dafür mit dem Plasmid pSH47 oder pSH65 transformiert, welche das Gen für das Enzym Cre-Rekombinase unter Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotor tragen. Nach einer mindestens 2-tägigen Inkubation der Transformanten auf Galaktose- oder Maltose-haltigem Medium wurden die Kolonien auf G418-haltiges Medium replikaplattiert und G418-sensitive Kolonien isoliert. Die Entfernung des *kanMX*-Gens wurde unter Verwendung der Oligonukleotidpaare A1/A4 bzw. B1/B4 in einer PCR (2.9) überprüft.

2.19.2 Gen-Deletionen mittels der *HIS3MX*-Deletionskassette

Die Konstruktion der *doa4Δ::HIS3MX*-Deletionsstämme beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Gendeletion mittels des *loxP::kanMX::loxP*/Cre-Rekombinase-Systems (2.19.1). Die *HIS3MX*-Deletionskassette besteht allerdings nur aus dem *HIS3*-Markergen, dem die flankierenden *loxP*-Sequenzen fehlen. Die Deletions-

kassette wurde von dem Plasmid pFA6a-HIS3MX mit den Oligonukleotiden S1-DOA4/S2-DOA4 in einer PCR-Reaktion (2.9) amplifiziert. Diese 68-70mere weisen einerseits 48bp lange homologe Bereiche zu den 5'- bzw. 3'-flankierenden Sequenzen des zu deletierenden *DOA4*-Gens auf und andererseits 20-22bp lange homologe Bereiche zu den *HIS3MX*-flankierenden Sequenzen. Nach Transformation der Deletionskassette in die Hefe (2.6.2) erfolgte die Selektion auf synthetischem Kompletmedium ohne Histidin. Die ersten 48bp des zu deletierenden Gens blieben aufgrund der Wahl der Oligonukleotide bei der homologen Rekombination erhalten. Die Deletion wurde mittels PCR mit ganzen Zellen (2.9) unter Verwendung der Oligonukleotidpaare A1-DOA4/A4-DOA4 verifiziert.

2.20 Bestimmung der Wachstumsrate von *S. cerevisiae*

Zur Bestimmung der Wachstumsraten wurden die Stämme in Vollmedium oder Selektivmedium mit 1% Maltose herangezogen, durch Zentrifugation geerntet, zweimal mit Selektivmedium ohne Kohlenstoffquelle gewaschen und anschließend mit einer Anfangs- $OD_{600nm}=0,05-0,2$ ($0,5-2 \times 10^6$ Zellen/ml) in Selektivmedium mit der jeweils angegebenen Kohlenstoffquelle angeimpft. Im Zeitraum von 2-50 Stunden wurden 1ml-Proben entnommen und diese nach einer entsprechenden Verdünnung gegen eine Leerprobe des gleichen Mediums als Referenz bei 600nm spektralphotometrisch gemessen.

2.21 Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae*

Die Zellen einer logarithmisch wachsenden Hefekultur (100ml) mit einer $OD_{600nm}=0,5-0,8$ ($5-8 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden durch Zentrifugation geerntet, mit STED10-Lösung (10% Saccharose, 10mM Tris/HCl pH7,6, 1mM EDTA) gewaschen und das Zellpellet in 250µl eiskalter STED10-Lösung, versetzt mit 1mM DTT, 0,2mM PMSF und 1xProtease-Inhibitor-Mix (Protease-Inhibitor „Complete“, Firma Roche), resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von Glasperlen ($\varnothing 0,45mm$) bis zum Meniskus der Flüssigkeit und 3-minütigem Schütteln auf einem Vibrax (Vibrax-VXR von Janke & Kunkel oder IKA). Nach Zugabe von 1ml STED10-Lösung (+ DTT, + PMSF, + Protease-Inhibitor-Mix) wurde der Überstand abgenommen und für 5min bei 3000rpm zentrifugiert. 1ml des Überstandes wurde bei $-20^\circ C$ weggefroren. Der spezifische Nachweis der Proteine erfolgte durch eine anschließende Western-Blot-Analyse (2.25,2.26).

2.22 Bestimmung der Proteinkonzentration

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

2.23 EndoglykosidaseH-Behandlung von Proteinextrakten

Für die EndoglykosidaseH-Behandlung (EndoH) wurden die Proteinextrakte (2.21) nach Angaben des Herstellers wie folgt behandelt: 10-20µl Rohextrakt wurden mit $\frac{1}{10}$ Volumen Denaturierungs-Puffer (NEB) versetzt und 10min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde $\frac{1}{10}$ Volumen G5-Puffer (NEB) und 1µl EndoH (NEB) zugegeben. Die Ansätze inkubierten für 1h bei 37°C und wurden anschließend bei -20°C weggefroren. Der spezifische Nachweis der Proteine erfolgte durch eine anschließende Western-Blot-Analyse (2.25,2.26).

2.24 Zellfraktionierung durch Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation

Die Herstellung des Saccharosedichtegradienten erfolgte nach Kölling und Hollenberg (1994) in einem SW40-Zentrifugationsgefäß, in dem 4ml STED53-Lösung (53% Saccharose, 10mM Tris/HCl pH7,6, 1mM EDTA, 1mM DTT, 0,2mM PMSF und 1xProtease-Inhibitor-Mix), 4ml STED36-Lösung (wie STED53-Lösung, nur mit 36% Saccharose) und 5ml STED20 (wie STED53-Lösung, nur mit 20% Saccharose) übereinander geschichtet wurden. Das Gefäß wurde mit Parafilm verschlossen und vorsichtig in eine horizontale Lage gebracht. Nach 3-stündiger Diffusion bei 4°C wurde der kontinuierliche Saccharosedichtegradient aufgerichtet und mit 1ml Proteinextrakt (2.21) überschichtet. Nach Zentrifugation für 14h in einem Beckmann SW40-Rotor mit 30000rpm wurden 700µl-Aliquots von dem Gradienten abgenommen, mit dem gleichen Volumen 2xProbenpuffer (100mM Tris/HCl pH6,8, 4mM EDTA, 4% SDS, 20% Glycerin, 20mM DTT, 0,02% Bromphenolblau) versetzt und bei -20°C weggefroren. Jeweils 50µl der Gradienten-Fractionen wurde elektrophoretisch aufgetrennt (2.25) und der spezifische Nachweis der Proteine erfolgte durch eine anschließende Western-Blot-Analyse (2.26).

2.25 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970) in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen. Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 5%iges Sammelgel (125mM Tris/HCl pH6,8, 0,1% SDS, 0,15% TEMED, 0,15% APS, 5% Acrylamid) und ein 10%iges Trenngel (375mM Tris/HCl pH8,8, 0,1% SDS, 0,0625% TEMED, 0,1% APS; 10% Acrylamid) verwendet (Maniatis *et al.*, 1982). Der Laufpuffer enthielt 25mM Tris, 0,192M Glycin und 0,1% SDS. Die Proben wurden mit 2xProbenpuffer (100mM Tris/HCl pH6,8, 4mM EDTA, 4% SDS, 20% Glycerin, 20mM DTT, 0,02% Bromphenolblau) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 40-50V über Nacht. Als Molekulargewichtsstandard diente der „Prestained High Molecular Weight Standard“ von Sigma oder alternativ der „Precision Plus Protein Standards Dual Color“ von BioRad.

2.26 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot-Analyse

Im Anschluss an die elektrophoretische Auftrennung in SDS-Polyacrylamidgelen wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Millipore) transferiert. Die Übertragung erfolgte in Blotting-Puffer (25mM Tris, 0,192M Glycin, 20% Methanol) für 2¹/₂-3h bei 55V (250mA). Der Proteintransfer wurde durch reversible Färbung des Filters mit PonceauS überprüft (2.28). Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Membran für 1-2h in PBSTB (10mM Na-P-Puffer pH7,2, 150mM NaCl, 0,1% Tween20, 3% BSA) oder in TBSTM (50mM Tris/HCl pH7,5, 150mM NaCl, 0,1% TritonX100, 1% Milchpulver) blockiert. Die Reaktion mit dem Primärantikörper (entsprechende Verdünnung in 10ml PBSTB bzw. TBSTM) erfolgte für 1-14h bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran 3x mit PBST (10mM Na-P-Puffer pH7,2, 150mM NaCl, 0,3% Tween20) bzw. TBST (50mM Tris/HCl pH7,5, 150mM NaCl, 0,1% TritonX100) gewaschen und anschließend für 1-2h mit dem sekundären Antikörper (in PBSTB bzw. TBSTM verdünnt) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde anschließend erneut 3x mit PBST bzw. TBST gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch eine Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenz-Reaktion nach Zugabe eines Chemilumineszenz-Substrates (SuperSignal ULTRA Chemiluminescent Substrate, Firma Pierce) und anschließende Detektion durch Auflegen eines Röntgenfilms.

2.27 Nachweis von Proteinen über PonceauS-Färbung

Die Anfärbung der Proteine auf der PVDF-Membran erfolgte mit einer PonceauS-Färbelösung (0,05% PonceauS, 0,1% Essigsäure) für 5-20min bei Raumtemperatur. Für die Entfärbung wurde die Membran in Wasser inkubiert.

2.28 Nachweis von Proteinen über colloidale Coomassie-Färbung

Das SDS-Gel wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung (2.25) über Nacht bei Raumtemperatur in der Färbelösung (0,08% Coomassie Brilliant Blue G250, 1,6% ortho-Phosphorsäure, 8% Ammoniumsulfat, 20% Methanol) geschüttelt. Um unspezifische Färbungen zu minimieren, wurde das Gel anschließend in destilliertem Wasser mit 1% Essigsäure inkubiert.

2.29 Nachweis von Proteinen über Silber-Färbung

Die Silber-Färbung von Proteinen erfolgte mit dem „SilverQuest Silver Staining Kit“ von Invitrogen nach Angaben des Herstellers.

2.30 Split-Ubiquitin System (SUS)

2.30.1 Konstruktion neuer Stämme

2.30.1.1 Konstruktion des Stammes *THY.AP4*

In dem Stamm CEN.PK113-6B (2.1.3, Tab. 2) wurde als erstes der *HIS3*-Promotor von -40bp bis -1bp durch einen *lexA*-kontrollierten Promotor ersetzt. Dazu wurde mit Hilfe der Oligonukleotide *plexHIS1* und *plexFUS2* die *loxP-kanMX-loxP*-Kassette mittels PCR von dem Plasmid pUG6 amplifiziert. Das Oligonukleotid *plexHIS1* bindet an den 5'-flankierenden Bereich der *loxP-kanMX-loxP*-Kassette und besitzt 5'-terminal einen homologen Anhang zu dem *HIS3*-Promotor. Das Oligonukleotid *plexFUS2* bindet an den 3'-flankierenden Bereich der *loxP-kanMX-loxP*-Kassette und besitzt 5'-terminal einen homologen Anhang zu einem weiteren Oligonukleotid *plexFUS3*. Dieses Oligonukleotid *plexFUS3* wurde zusammen mit *plexHIS4* in eine PCR eingesetzt, um 5 *lexA*-Operatorregionen des Plasmides pLexA(ox5) zu amplifizieren. Das Oligonukleotid bindet im 5'-flankierenden Bereich der 5 *lexA*-Sequenzen und das Oligonukleotid *plexHIS4* bindet an den 3'-flankierenden Bereich der 5 *lexA*-Sequenzen und besitzt 5'-terminal einen homologen Anhang zu dem Beginn des *HIS3*-ORFs. Die beiden PCR-Produkte wurden aufgereinigt (2.11) und zusammen in den Stamm

CEN.PK113-6B transformiert (2.6.2). Die Selektion auf Kanamycin-resistente Klone erfolgte auf G418-haltigen Vollmediumsplatten. Da beide eingesetzten PCR-Produkte nur jeweils einen homologen Anhang zu dem *HIS3*-Gen besaßen, wurden nur solche Transformanten erhalten, die aufgrund von drei *in vivo*-Rekombination der zwei PCR-Produkte mit der genomischen DNA beide PCR-Produkte integriert hatten. Zur Verifikation der korrekten Integration wurden die Transformanten auf synthetischem Komplettmedium ohne Histidin inkubiert und zeigten dabei einen Histidin-auxotrophen Wachstumsphänotyp. Das integrierte *kanMX*-Gen wurde wie unter 2.19.1 beschrieben wieder entfernt und zum Verlust des Plasmids pSH47 wurden die Zellen auf 5-FOA-haltigem Medium inkubiert. Die Zellen wurden auf synthetischem Komplettmedium ohne Uracil replikaplattiert und Uracil-auxotrophe Kolonien isoliert. Die Konstruktion dieses Stammes **THY.AP1** resultierte in einem *lexA*-kontrollierten *HIS3*-auxotrophen Stamm.

Bei der Integration eines *lexA*-kontrollierten *ADE2*-Promotors wurde ähnlich verfahren: Der *ADE2*-Promotor des neu konstruierten Stammes THY.AP1 wurde von -498bp bis -1bp durch einen *lexA*-kontrollierten Promotor ersetzt. Die Oligonukleotide plexADE1 und plexFUS2 amplifizierten in der ersten PCR die *loxP-kanMX-loxP*-Kassette von dem Plasmid pUG6 und die Oligonukleotide plexFUS3 und plexADE1 amplifizierten in einer zweiten PCR die 5 *lexA*-Operatorregionen des Plasmides pLexA(ox5). Entsprechend den Eigenschaften der Oligonukleotide plexHIS1 und plexHIS4 besitzen die Oligonukleotide plexADE1 und plexADE4 homologe Anhänge zu dem *ADE2*-Promotor bzw. zu dem Beginn des *ADE2*-ORFs. Wie für *HIS3* beschrieben wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und transformiert. Die Verifikation der korrekten Integration erfolgte auf synthetischem Komplettmedium ohne Adenin und zeigte einen Adenin-auxotrophen Wachstumsphänotyp. Mit Hilfe des Plasmids pSH47 wurde das integrierte *kanMX*-Gen wieder entfernt und das Plasmid selbst konnte auf 5-FOA-haltigem Medium entfernt werden. Die Konstruktion des Stammes **THY.AP3** resultierte in einem *lexA*-kontrollierten *HIS3*-und *ADE2*-auxotrophen Stamm.

Im dritten Schritt wurde der instabile *trp1-289*-ORF von +201 bis zum Stop-Codon durch ein *lexA*-kontrolliertes *lacZ*-Gen ersetzt. Dazu wurde mit den Oligonukleotiden pTRP1lac1 und pTRP1lac2 die *loxP-kanMX-loxP*-Kassette mittels PCR von dem Plasmid pUG6 amplifiziert. Das Oligonukleotid pTRP1lac1 bindet an den 5'-flankierenden Bereich der *loxP-kanMX-loxP*-Kassette und besitzt einen homologen Anhang zum *trp1*-ORF. Das Oligonukleotid pTRP1lac2 bindet an den 3'-flankierenden Bereich der *loxP-kanMX-loxP*-Kassette und besitzt einen homologen Anhang zu dem Oligonukleotid pTRP1lac3. Dieses Oligonukleotid wurde in einer zweiten PCR zusammen mit pTRP1lac4 eingesetzt um die 5 *lexA*-

Operatorregionen mit dem fusionierten *lacZ*-Gen von dem Plasmid pLexA(ox5) zu amplifizieren. Das pTRP1lac3 bindet an den 5'-flankierenden Bereich der 5 *lexA*-Operatorregionen und pTRP1lac4 bindet an den 3'-flankierenden Bereich des *lacZ*-Gens und besitzt einen homologen Anhang zum *TRP1*-Terminator. Die beiden PCR-Produkte wurden aufgereinigt (2.11) und zusammen in den Stamm THY.AP3 transformiert (2.6.2). Die Selektion auf Geneticin-resistente Klone erfolgte auf G418-haltigen Vollmediumsplatten. Die Verifikation der korrekten Integration erfolgte durch Transformation des Plasmids pCPLV, replikaplattieren der Transformanten und anschließenden X-Gal Overlay-Assay (2.33.1). Die blau gefärbten Kolonien wurden mittels PCR ganzer Zellen (2.9) mit den Oligonukleotiden TRPlacU1 und TRPlacU2 nochmals verifiziert. Korrekte Klone wurden mehrere Tage in Vollmedium inkubiert und der Verlust des Plasmids pCPLV wurde anschließend auf synthetischem Komplettmedium ohne Leucin überprüft. Das integrierte *kanMX*-Gen wurde wie unter 2.19.1 beschrieben wieder entfernt und zur Entfernung des Plasmids pSH47 wurden die Zellen auf 5-FOA-haltigem Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf synthetischem Komplettmedium ohne Uracil replikaplattiert und Uracil-auxotrophe Kolonien isoliert. Die Konstruktion des Stammes **THY.AP4** resultierte schließlich in einem *lexA*-kontrollierten *lacZ*-Gen und in *lexA*-kontrollierten *HIS3*- und *ADE2*-Auxotrophien.

2.30.1.2 Konstruktion des Stammes THY.AP5

Die Deletion des *ADE2*-Gens in dem Stamm CEN.PK113-17D wurde mit der *loxP-kanMX-loxP*-Kassette wie unter 2.19.1 beschrieben mit den Oligonukleotiden S1-ADE2 und S2-ADE2 durchgeführt. Die Verifikation der *ade2*-Deletion erfolgte mit den Oligonukleotiden A1-ADE2 und A4-ADE2. Das integrierte *kanMX*-Gen wurde wie unter 2.19.1 beschrieben mit dem Plasmid pSH65 wieder entfernt und mit den Oligonukleotiden A1-ADE2 und A4-ADE2 überprüft. Zur Entfernung des Plasmids pSH47 wurde der neu konstruierte Stamm **THY.AP5** auf Vollmedium inkubiert bis sich auf Phleomycin-haltigem Medium ein Phleomycin-sensitiver Wachstumsphänotyp zeigte.

2.30.2 Konstruktion neuer Vektoren für das Split-Ubiquitin System

Mit den Oligonukleotidpaaren fFGY1Cub/revCub, fNubX/rNubX und fXNub/rXNub wurde das *kanMX*-Gen in einer PCR von dem Plasmid pUG6 amplifiziert. Die mit „f“ bezeichneten Oligonukleotide konnten an den 5'-flankierenden Bereich des *kanMX*-Promotors binden, enthielten die Nukleotidabfolge für den 5'-Linker A1 und besaßen homologe Anhänge zu dem Vektor YCpFGY1CubPLV, pNubX bzw. pXNub. Die mit „r“ bezeichneten Oligonukleotide konnten an den 3'-flankierenden Bereich des *kanMX*-Terminators binden, enthielten die Nukleotidabfolge für den

3'-Linker A2 und besaßen ebenfalls homologe Anhänge zu dem Vektor YCpFGY1CubPLV, pNubX bzw. pXNub.

Linker	Nukleotidabfolge
Linker A1	GCCGCTCCAGCACCTGCCTTGGCTGCTCCAGCCACCACC
Linker A2	CCTGCTCCAGCTGCCCCATTGGCTGTTCCAACCGCAGCT

Die Vektoren YCpFGY1CubPLV^{XhoI/XbaI}, pXNub^{SmaI/BamHI} und pNubX^{SmaI/BamHI} wurden durch Restriktion im Integrationsbereich linearisiert (2.8.1), gereinigt (2.14) und zusammen mit dem entsprechenden PCR-Produkt in den Hefestamm SDY.015 transformiert (2.6.2). Die Zellen wurden im Anschluss auf synthetischem Komplettmedium ausplattiert, das für die Selektion auf den Auxotrophiemarker des Vektors die entsprechende Aminosäure (Leucin oder Tryptophan) nicht enthielt. Somit wurden nur solche Transformanten erhalten, die aufgrund homologer Rekombination des PCR-Produktes mit dem linearisierten Vektor ein stabiles, zirkularisiertes Plasmid besaßen. Die Transformanten wurden auf G418-haltigem Medium replikaplattiert, wo nur diejenigen Klone wachsen konnten, die das *kanMX*-Gen korrekt integriert hatten. Die Plasmide wurden isoliert (2.7.2), in *E. coli* amplifiziert (2.6.1) und durch Restriktionsanalyse (2.8.1) und Sequenzierung (2.15) überprüft. Für die Sequenzierungen der konstruierten Vektoren wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

Vektor	Sequenzierprimer für die Linkers A1-Sequenz	Sequenzierprimer für die Linkers A2-Sequenz
pFGY1p-kanMX-CubPLV	pFGY1SEQ	A3pkanMX
pADH1p-NubG-kanMX	pADHSEQ1	A3pkanMX
pADH1p-kanMX-NubG	pADHSEQ2	tADHSEQ

2.30.3 Klonierung der Plasmide für das Split-Ubiquitin System

Für die Interaktionsstudien verschiedener Hexosetransporter und von Gtt1 mit Gsf2 wurden die Gene über *in vivo*-Rekombination in die neu konstruierten Vektoren (2.30.2) kloniert. Die Gene wurden mit den im Folgenden aufgelisteten Oligonukleotiden von den beschriebenen DNA-Vorlagen mittels PCR amplifiziert:

Genname	Oligonukleotide	DNA-Vorlage
<i>HXT1</i>	LA1HXT1/LA2HXT1	Plasmid pTHXT1-2
<i>HXT2</i>	LA1HXT2/LA2HXT2	Plasmid pTHXT2
<i>HXT3</i>	LA1HXT3/LA2HXT3	Plasmid pTHXT3
<i>HXT7</i>	LA1HXT7/LA2HXT7	Plasmid YCpHXT7a
<i>GTT1</i>	LA1GTT1/LA2GTT1	genomische DNA aus dem Stamm FY1679
<i>GSF2</i>	LA1GSF2/LA2GSF2 oder LA1GSF2/LA2GSF2 ^{STOP}	genomische DNA aus dem Stamm FY1679

Die mit „LA1“ bezeichneten Oligonukleotide enthalten 39bp, die zu den in den Vektoren vorhandenen Linker-Sequenzen A1 homolog sind, und binden mit 21bp an das 5'-Ende des jeweils zu amplifizierenden ORFs. Die mit „LA2“ bezeichneten Oligonukleotide besitzen 39bp, die zu der Linker-Sequenzen A2 der Vektoren homolog sind und binden mit 21bp an die 3'-Enden der zu amplifizierenden ORFs, wobei die Stop-Codons mit Ausnahme von LA2GSF2^{STOP} ausgespart wurden. Durch *in vivo*-Rekombination wurden die PCR-Produkte in die durch Restriktion linearisierten Vektoren pFGY1p-kanMX-CubPLV^{PstI/XhoI}, pADH1p-NubG-kanMX^{EcoRI} und pADH1p-kanMX-NubG^{EcoRI} in den Stamm EBY.VW4000 bzw. THY.11 kloniert. Die Transformanten wurden im Anschluss auf Selektivmedium ausplattiert, das für die Selektion auf den Auxotrophiemarker der Vektoren die entsprechende Aminosäure (Leucin oder Tryptophan) nicht enthielt. Die Plasmide wurden isoliert (2.7.2), in *E. coli* amplifiziert (2.6.1) und durch eine anschließende Restriktionsanalyse (2.8.1) überprüft. Die Plasmide wurden mit pHXT1-CubPLV, pHXT2-CubPLV, pHXT3-CubPLV, pHXT7-CubPLV, pGTT1-CubPLV, pGSF2-CubPLV, pNubG-HXT1, pNubG-HXT2, pNubG-HXT3, pNubG-HXT7, pNubG-GTT1, pNubG-GSF2, pNubG-GSF2^{STOP}, pHXT1-NubG, pHXT2-NubG, pHXT3-NubG, pHXT7-NubG, pGTT1-NubG und pGSF2-NubG bezeichnet.

Die CubPLV-Plasmide wurden in den Stamm THY.AP4 (2.30.1.1) und die NubG-Plasmide in den Stamm THY.AP5 (2.30.1.2) transformiert und die Transformanten auf Leucin- bzw. Tryptophan-freiem Selektivmedium ausplattiert. Die Interaktionsstudien erfolgten nach Paarung der Transformanten (2.32) mittels Wachstumstests oder anhand der unter 2.33.1 und 2.33.2 beschriebenen Methoden.

2.31 Tandem-Affinitäts-Aufreinigung

Die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung („tandem affinity purification“, TAP) wurde nach Puig *et al.* (2001) durchgeführt. Der TAP-Tag besteht aus einem Calmodulin-bindenden Peptid (calmodulin binding peptide, CBP), einer TEV-Protease Schnittstelle (TEV protease cleavage site) und einem Protein A (Rigaut *et al.*, 1999).

2.31.1 Herstellung des Proteinextrakts

Der Hefestamm 3GS1-D-11 (2.1.3) wurde in 2 Liter YEP mit 2% Glukose bei einer $OD_{600nm}=1,0-2,0$ ($1-2 \times 10^7$ Zellen/ml) durch Zentrifugation bei 2g geerntet, zweimal gewaschen und anschließend in Trockeneis eingefroren. Die Zellen wurden in einfachem Volumen Puffer A (10mM K-Hepes pH7,9, 10mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 0,5mM DTT, 0,5mM PMSF, 2mM Benzamidine, 1µM Leupeptin, 2µM Pepstatin A,

4 μ M Chymostatin, 2,6 μ M Aprotinin) zügig aufgetaut und mittels French Press (SIM AMINCO, SIM Instruments, Inc.) mit einem Druck von 8,27MPa (1200psi) aufgebrochen. KCl wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,2M zugefügt und der Extrakt wurde für 30min bei 25000g und der Überstand anschließend für 1h bei 100000g zentrifugiert. Die mittlere der 3 Phasen wurde abgenommen und gegen 2 Liter Puffer D (20mM K-Hepes pH7,9, 50mM KCl, 0,2mM EDTA pH8,0, 0,5mM DTT, 20% Glycerin, 0,5mM PMSF, 2mM Benzamidin) für 3h bei 4°C dialysiert. Der Proteinextrakt wurde anschließend bei –80°C weggefroren.

2.31.2 TAP-Aufreinigung

Alle Aufreinigungsschritte wurden in 0,8x4cm Poly-Prep Säulen der Firma BioRad durchgeführt. 200 μ l IgG Sepharose wurde in eine Säule überführt und mit 10ml IPP150-Puffer (10mM Tris-HCl pH8,0, 150mM NaCl, 0,1% Nonidet) gewaschen. Der Proteinextrakt wurde mit 10mM Tris-HCl pH8,0, 10mM NaCl und 0,1% Nonidet versetzt, zu den Sepharose-Kugeln auf die Säule gegeben und für 2h bei 4°C inkubiert. Durch Gravitationsfluss wurde der ungebundene Extrakt entfernt und die gebundenen Proteine dreimal mit 10ml IPP150-Puffer gewaschen. 10ml TEV-Spaltungspuffer (10mM Tris-HCl pH8,0, 150mM NaCl, 0,1% Nonidet, 0,5mM EDTA, 1mM DTT) lief über die Säule bevor 1ml TEV-Spaltungspuffer und 100 U TEV-Protease für 2h bei 16°C in der Säule inkubierten. Das anschließend durch Gravitationsfluss gewonnene Eluat wurde aufbewahrt. 200 μ l Calmodulin wurde auf eine frische Säule überführt und mit 10ml IPP150 Calmodulin-Bindungspuffer (10mM Tris-HCl pH8,0, 10mM β -Mercaptoethanol, 150mM NaCl, 1mM Magnesiumacetat, 1mM Imidazol, 2mM CaCl₂, 0,1% Nonidet) gewaschen. Das Eluat wurde mit 3ml IPP150 Calmodulin-Bindungspuffer pro 1ml Extrakt und mit 3 μ l 1M CaCl₂ pro 1ml Extrakt versetzt bevor es auf die Säule überführt und für 1h bei 4°C inkubiert wurde. Die Calmodulin-Kugeln wurden mit 30ml IPP150 Calmodulin-Bindungspuffer gewaschen und die gebundenen Proteine anschließend mit 1ml IPP150 Calmodulin-Elutionspuffer (10mM Tris-HCl pH8,0, 10mM β -Mercaptoethanol, 150mM NaCl, 1mM Magnesiumacetat, 1mM Imidazol, 0,1% Nonidet, 2mM EGTA) eluiert.

2.31.3 Proteinkonzentrierung mittels TCA-Fällung

Das Eluat wurde mit ¼ Volumen 100%iger TCA versetzt und für mindestens 12h bei –20°C inkubiert. Die Proteine wurden für 30min mit 13000rpm bei 4°C abzentrifugiert, einmal mit kaltem (-20°C) Aceton (versetzt mit 0,05N HCl) gewaschen, anschließend mit reinem kaltem (-20°C) Aceton gewaschen und in einer Speed-Vac (Concentrator 5301, Eppendorf) getrocknet. Die Proteine wurden in einem Volumen von 10-20 μ l Wasser resuspendiert.

2.31.4 Elektrophoretische Auftrennung

Die Proteine wurden auf ein 4-15%iges diskontinuierliches Polyacrylamidgel der Firma BioRad aufgetragen, bei 25mA aufgetrennt und im Anschluss nach der unter 2.28 oder 2.29 beschriebenen Methode sichtbar gemacht. Die Proteine wurden in Form von Gel-Blöckchen (1cm x 1mm) ausgeschnitten, mit 120µl Wasser versetzt und bei -20°C weggefroren.

2.31.5 Entfärbung, Trypsin-Behandlung und Massenspektrometrie

Die weiteren Arbeiten mit den Protein-Blöckchen wurden freundlicher Weise von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Michael Karas, Institut für Pharmazeutische Chemie, Universität Frankfurt durchgeführt. Im Falle einer Silberfärbung wurden die Proteine mit den Entfärber-Lösungen des Herstellers (Invitrogen) entfärbt und anschließend die Trypsin-Behandlung durchgeführt. Sowohl die Entfärbung als auch die Trypsin-Behandlung der Proteine erfolgte in Mikrotiter-Platten in dem Microlab STAR Robotor der Firma Hamilton. Die massenspektrometrische Analyse der Proteine erfolgte in einem Voyager STR Gerät der Firma Applied Biosystems (Darmstadt).

Tab. 8: Protokoll des Roboters zur Entfärbung und Trypsin-Behandlung der Proteinproben. Die Silber-Entfärbelösung war in dem Silber-Färbe-Kit der Firma Invitrogen enthalten. Gewaschen wurden die Proben mit MilliQ-Wasser. (Abkürzungen: ACN = Acetonitril; IAA = Indolylessigsäure; TFA = Trifluoressigsäure)

Schritt	Beschreibung	Volumen (in μl)	Zeit (in min)	Temperatur (in $^{\circ}\text{C}$)	Zyklen
0.1	Flüssigkeit entfernen	120		21	1
0.2	Silber-Entfärbung	130	20	21	1
0.3	Waschen mit Wasser	200	15	21	3
1	Waschen mit 50% ACN	200	15	21	3
2	Dehydrieren mit 100% ACN	180	10	21	2
3	Trocknen der Gel-Blöckchen		20	56	
4.1	Reduktion mit DTT	100	60	58	1
4.2	Dehydrieren mit 100% ACN	200	10	21	1
5	Alkylierung mit IAA	100	45	21	1
6	Waschen mit NH_4HCO_3	200	5	21	4
7.1	Dehydrieren mit 100% ACN	200	5	21	1
7.2	Aufquellen mit NH_4HCO_3	200	5	21	1
7.3	Dehydrieren mit 100% ACN	200	10	21	2
8	Trocknen der Gel-Blöckchen		25	56	
9.1	Zugabe von Trypsin	28	45	4	1
9.2	Entfernung des Trypsin	60			
10.1	Zugabe des Inkubationspuffers	80	0,1	4	1
10.2	Inkubation		720	38	1
11.1	Zugabe von TFA	30			1
11.2	Überstand abnehmen	80		21	
12.1	Extraktion des Gelblöckchens 1	70	20	21	1
12.2	Extraktion des Gelblöckchens 2	70	20	21	2

2.32 Paarungstyp-Analyse und Kreuzung von Stämmen

Als Voraussetzung für die **Paarungstyp-Bestimmung** eines Stammes mußte dieser Stamm einen Defekt in der Leucin-Biosynthese im *leu2*-Gen aufweisen. Der zu testende Stamm wurde auf einer Vollmediumsplatte mit den Paarungstyp-Tester-Stämmen EBY.109A (*MATa*) und EBY.109B (*MAT α*) vermischt. Nach 4h Inkubation bei 30°C wurden die Ausstriche auf Selektivmediumsplatten ohne Leucin replikaplattiert und für 1-2 Tage bei 30°C inkubiert. Da die haploiden Stämme alle Leucin-auxotroph waren, konnten sie auf Leucin-freiem Medium nicht wachsen. Erst die Paarung zweier Stämme führte dazu, dass der Defekt im *leu1*-Gen des Tester-Stammes von dem zu testenden Stamm und der Defekt im *leu2*-Gen des zu testenden Stammes durch den Tester-Stamm komplementiert wurde. Wenn der zu testende Stamm nach Kombination mit dem Stamm EBY.109A auf Medium ohne Leucin wachsen konnte, so handelte es sich um einen Stamm mit dem Paarungstyp α , während der Stamm den Paarungstyp a besaß, wenn er

nach Kombination mit dem Stamm EBY.109B auf Selektivmedium ohne Leucin wachsen konnte.

Für die **Kreuzung** der transformierten THY.AP4- und THY.AP5-Stämme (2.30.3) wurden diese bis zur stationären Wachstumsphase in 5ml Selektivmedium ohne Leucin bzw. Tryptophan angezogen. Die Kreuzung erfolgte durch aufeinanderfolgendes Auftropfen von 10-25µl Flüssigkultur auf Vollmediumsplatten. Nach einer Inkubationszeit von 10-14h bei Raumtemperatur wurden die Platten auf Selektivmedium ohne Leucin und Tryptophan replikaplatziert. Nach 1-3 Tagen Inkubation bei 30°C zeigten die diploiden Zellen Wachstum, da sie beide transformierten Plasmide und somit auch beide Selektionsmarkergene besaßen. Durch die Paarung wurden das CubPLV- und das NubG-Plasmid zusammen gebracht und die Protein-Interaktionen konnten mittels Wachstumstests oder mit Hilfe der unter 2.33.1 und 2.33.2 beschriebenen Methoden bestimmt werden.

2.33 Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität

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

Die qualitative Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität wurde mit auf Agarplatten gewachsenen Zellen durch Überschichtung mit warmem Aufschlusspuffer (0,5M Na-P-Puffer pH7,2, 2% DMF, 0,2% SDS, 0,8mg/ml X-Gal, 0,5% Agarose) durchgeführt. Die β -Galaktosidase der lysierten Zellen setzt X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid) zu einem blauen Farbstoff um (5-Brom-4-chlorindigo). Die überschichteten Platten wurden bei 37°C inkubiert und die entstehende Blaufärbung dokumentiert.

2.33.2 Quantitative Enzymtests

Die quantitative Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität erfolgte nach Miller (1972). Eine Hefekultur (5ml) wurde bei einer $OD_{600nm}=1-2$ ($1-2 \times 10^7$ Zellen/ml) durch Zentrifugation geerntet und zweimal mit kaltem Kaliumphosphat-Puffer (50mM K-P-Puffer pH7,0) gewaschen. Nach Zugabe von Glasperlen ($\varnothing 0,45mm$) bis zum Meniskus der Flüssigkeit erfolgte der Zellaufschluss durch 5-minütiges Schütteln auf einem Vibrax-VXR (von Janke & Kunkel oder IKA) bei 4°C. Im Anschluss wurden je nach Zelldichte 0,2-0,5ml kalter Phosphatpuffer zugegeben, gemischt und der Überstand abgenommen. Dieser wurde für 10min mit 10000rpm bei 4°C zentrifugiert, um die Zelltrümmer abzutrennen. Der Proteinextrakt wurde zur Proteinbestimmung (2.22) und für die Messung der Enzymaktivität eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 37°C in einem Gesamtvolumen von 1ml lacZ-Puffer (100mM Na-P-Puffer, 10mM KCl, 1mM MgSO₄, 1mg/ml ONPG, pH7,0) durchge-

führt und durch Zugabe des Rohextraktes gestartet. Nach eintretender Gelbfärbung, spätestens aber nach 30min Inkubation, wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5ml einer 1M Na₂CO₃-Lösung gestoppt. Die Extinktion der Proben wurde spektralphotometrisch bei 420nm gemessen. Der molare Extinktionskoeffizient von 2-Nitrophenol beträgt unter diesen Bedingungen $4,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.34 Messung der Glukoseaufnahme in *S. cerevisiae*

Die Glukoseaufnahmemessung erfolgte nach Bisson und Fraenkel (1983) mit Modifikationen nach Walsh *et al.* (1994). Dazu wurden die Zellen bis zu einer $OD_{600\text{nm}}=1-2$ ($1-2 \times 10^7$ Zellen/ml) in synthetischem Komplettmedium angezogen. Nach zweimaligem Waschen mit Phosphat-Puffer (0,1M K-P-Puffer pH6,5) wurde das Naßgewicht der Zellen bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von 60mg/ml in Phosphat-Puffer resuspendiert. Die Aufnahme wurde bei Glukosekonzentrationen von 0,1-50mM bestimmt (0,1mM; 0,5mM; 1mM; 5mM; 10mM; 50mM). Die eingesetzte spezifische Radioaktivität betrug dabei $0,37-111 \text{ kBq } \mu\text{mol}^{-1}$. Vor der Aufnahmemessung wurden sowohl die Zellen als auch die Glukoselösungen 5 min bei 30°C vorinkubiert. Die Aufnahme wurde durch Zugabe von 100µl Zellen zu 50µl 3-fach-konzentrierter Glukoselösung gestartet. Der Reaktionsansatz wurde gut gemischt. Nach 5sec wurden 100µl entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 10ml Quenclösung (0,1M K-P-Puffer pH6,5, 500mM Glukose, -3-0°C) abgestoppt. Mit einer speziellen Pipette (Eigenbau der Elektronikwerkstatt der HHU Düsseldorf) wurde das 5sec-Zeitintervall der Glukoseinkubation auf 1/100 sec genau bestimmt. Die Zellen wurden sofort unter Vakuum auf Whatman GF/C Glas-Fiber-Filter abfiltriert und viermal mit 10ml eiskalter Quenclösung gewaschen. Die Filter wurden in Szintillationsgefäßen aus Polyethylenglycol mit 5ml Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A, Zinsser Analytik) gegeben und die Radioaktivität in einem Beckmann Szintillationszähler gemessen. Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität wurden 10µl des Reaktionsansatzes in 5ml Szintillationsflüssigkeit gemessen (cpm_0). Da radioaktive Glukose unspezifisch an die Glas-Fiber-Filter binden kann, wurden Kontrollen durchgeführt, bei denen die Glukoselösung und die Zellen gleichzeitig zur vorgelegten Quenclösung gegeben wurden ($\text{cpm}_{\text{Kontrolle}}$). Diese Kontrollen wurden für eine bestimmte eingesetzte Gesamtradioaktivität mehrfach bestimmt. Der Mittelwert der Kontrollen wurde von den entsprechenden Meßwerten abgezogen. Die Aufnahmegeschwindigkeiten V in $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ TG}$ wurden nach folgender Formel berechnet:

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

3 ERGEBNISSE

3.1 Hxt1/4-Chimär

Sherwood und Carlson (1997) isolierten Mutanten mit Defekten in der Glukose-repression von *SUC2*. Bei einer dieser Mutanten, *GSF4-1*, waren die Glukose-transportergene *HXT1* und *HXT4* zu einem chimären Transportergen fusioniert (vgl. 1.3) (Sherwood *et al.*, 2000). Der Übergang der Transporter Hxt1 und Hxt4 in dem nicht-funktionellen Chimär liegt am Anfang der 10ten Transmembrandomäne. Die Autoren postulierten, dass das Hxt1/4-Chimär die Synthese oder Funktion der Hefe-eigenen Glukosetransporter beeinträchtigt. Allerdings bestimmten sie weder die intrazelluläre Lokalisation des Chimärs, noch die Glukoseaufnahmeaktivität der Stämme, noch einen Einfluss auf andere Transportprozesse.

3.1.1 Konstruktion und Funktionalitätsuntersuchung des Hxt1/4-Chimärs

Um den Effekt des Hxt1/4-Chimärs auf die Hefezelle zu untersuchen, wurde ein Überexpressionsplasmid mit der Chimärsequenz (wie unter 2.18.1 beschrieben) konstruiert. Der offene Leserahmen enthielt die Sequenzen der Hexose-transportergene *HXT1*¹⁻¹²⁹² und *HXT4*¹²⁸⁵⁻¹⁶⁸³, wie bei Sherwood *et al.* (2000) beschrieben. Das Plasmid p426HXT1/4 wurde im Bereich des Sequenzübergangs von *HXT1* zu *HXT4* sequenziert, um sicherzustellen, dass der korrekte Leserahmen erhalten blieb.

Um zu untersuchen, ob das Chimär eine Glukoseaufnahmeaktivität besitzt, wurde das Plasmid p426HXT1/4 in den Stamm EBY.VW4000 transformiert. Dieser *hxt*-Nullstamm ist aufgrund der Deletion aller endogenen Hexosetransportergene *HXT1-HXT17* und *GAL2*, sowie der Zuckerpermeasen *AGT1*, *MPH2*, *MPH3* und *STL1*, nicht in der Lage mit Glukose als Kohlenstoffquelle zu wachsen (vgl. Abb.1; Wiczorke *et al.*, 1999). Die Wachstumsuntersuchungen der Transformanten in Selektivmedium mit 1% Glukose zeigten auch nach 70 Stunden kein Wachstum (nicht dargestellt). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass das Hxt1/4-Chimär eine Glukoseaufnahmeaktivität besitzt. Für alle weiteren Untersuchungen war dadurch sicher gestellt, dass das Chimär keinen direkten Transporteinfluss bei Wachstum auf Glukose-haltigen Medien hatte.

3.1.2 Einfluss des Hxt1/4-Chimärs auf das Wachstum

3.1.2.1 Glukose als Kohlenstoffquelle

Sherwood *et al.* (2000) konnten zeigen, dass das Hxt1/4-Chimär das Wachstum der Hefe auf hohen Glukosekonzentrationen negativ beeinflusst. Um den Einfluss des Chimärs auf unterschiedliche Hexosetransporter zu untersuchen, wurden verschiedene *S. cerevisiae* Stämme verwendet, die jeweils nur einen einzelnen Hexosetransporter exprimieren (Reifenberger *et al.*, 1995; Buziol *et al.*, 2002). Ein Vergleich der Wachstumseigenschaften der mit p426HXT1/4 und der mit dem Leervektor p426HXT7-6His transformierten Stämme ist in Tab. 9 zusammengefasst. Die verwendeten Glukose- bzw. Galaktose-Konzentrationen wurden entsprechend der Affinitäten der Hexosetransporter zu der jeweiligen Kohlenstoffquelle gewählt.

Tab. 9: **Wachstumsvergleich verschiedener HXT-Einzelexpressionstämmen.** Die Stämme wurden jeweils mit dem Leervektor p426HXT7-6HIS und mit dem Plasmid p426HXT1/4 transformiert und die Wachstumsstudien auf uracilfreien Selektivmediumsplatten (*URA3* als Plasmidmarker) mit der jeweils angegebenen Kohlenstoffquelle durchgeführt. In Klammern hinter den Stammbezeichnungen ist das jeweils exprimierte Hexosetransportergen aufgeführt. Bezeichnungen: < = negativer Wachstumseffekt durch Hxt1/4-Chimär, n.d. = nicht getestet.

Stamm	0,1% Glukose	1% Glukose	5% Glukose	2% Galaktose
JBY01 (<i>HXT1</i>)	n.d.	<	<	n.d.
RE602B (<i>HXT2</i>)	<	<	<	n.d.
RE604A (<i>HXT4</i>)	n.d.	<	<	n.d.
JBY19 (<i>HXT5</i>)	<	<	<	n.d.
RE605A (<i>HXT5</i>)	<	<	n.d.	n.d.
JBY02 (<i>HXT7</i>)	<	<	n.d.	n.d.
RE607A (<i>HXT7</i>)	<	<	n.d.	n.d.
RE700A (<i>GAL2</i>)	n.d.	n.d.	n.d.	<

Alle *HXT*-Einzelexpressionsstämmen (*HXT1*, *HXT2*, *HXT4*, *HXT5*, *HXT7*, *GAL2*), zeigten ein verlangsamtes Wachstum in Anwesenheit des Hxt1/4-Chimärs. Neben den Wachstumsuntersuchungen auf Minimalmediumsplatten wurde das Wachstumsverhalten einzelner *HXT*-Einzelexpressionsstämmen auch in Flüssigmedium nach der in Kapitel 2.20 beschriebenen Methode untersucht (Abb. 7). Wie schon die Wachstumsuntersuchungen auf Selektivmediumsplatten zeigten auch die Wachstumskurven einen negativen Wachstumseffekt durch das Hxt1/4-Chimär.

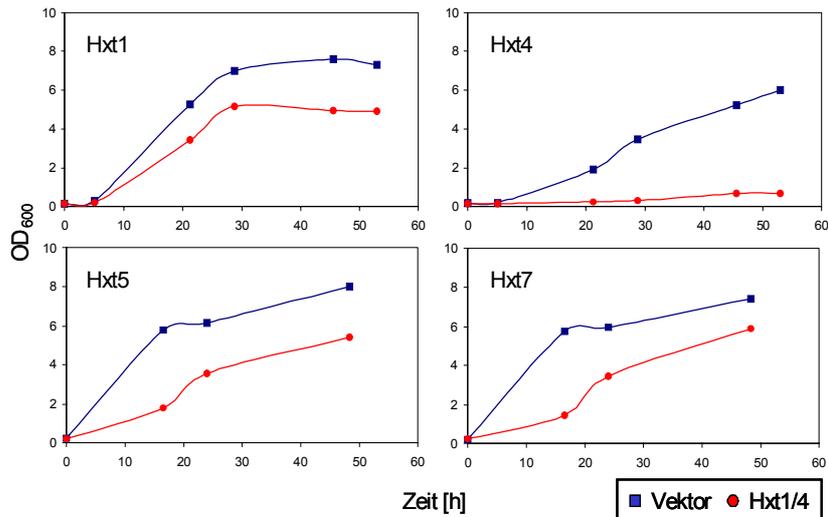


Abb. 7: **Wachstumsverhalten der HXT1-, HXT4-, HXT5- und HXT7-Einzelexpressionsstämme (JBY01, RE604B, JBY19, JBY02).** Die Stämme wurden jeweils mit dem Leervektor p426HXT7-6HIS als Negativkontrolle (**Vektor**) und mit dem Plasmid p426HXT1/4 (**Hxt1/4**) transformiert und die Wachstumskurven in SC-Medium ohne Uracil mit 1% Glukose durchgeführt.

3.1.2.2 Maltose und Ethanol als Kohlenstoffquelle

Um zu untersuchen, ob der negative Wachstumseffekt des Hxt1/4-Chimärs sich nur auf die Aufnahme von und auf das Wachstum mit Hexosen als Kohlenstoffquelle auswirkt, wurde das Wachstumsverhalten mit anderen Kohlenstoffquellen getestet. Der Zucker Maltose wird von der Hefe nicht über das Hexosetransportersystem aufgenommen, sondern gelangt als Disaccharid über Maltosepermeasen in die Zelle und wird dort durch die Maltase (α -Glukosidase) zu 2 Glukosemolekülen hydrolysiert (Lagunas, 1993; Jansen *et al.*, 2002).

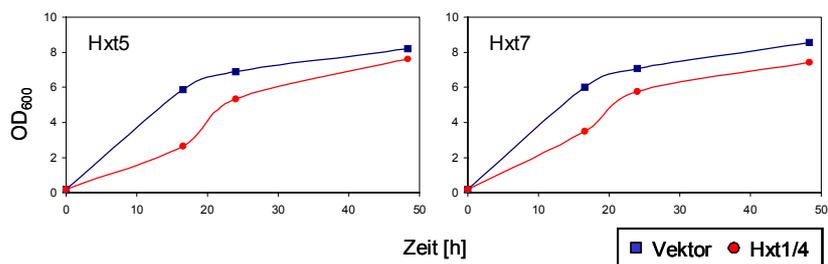


Abb. 8: **Wachstumsverhalten der HXT5- und HXT7-Einzelexpressionsstämme (JBY19, JBY02).** Die Stämme wurden jeweils mit dem Leervektor p426HXT7-6HIS als Negativkontrolle (**Vektor**) und mit dem Plasmid p426HXT1/4 (**Hxt1/4**) transformiert und die Wachstumskurven in SC-Medium ohne Uracil mit 1% Maltose durchgeführt.

Wachstumsuntersuchungen in Maltose-haltigem Medium zeigten (Abb. 8), dass sich der durch das Hxt1/4-Chimär verursachte negative Wachstumseffekt nicht nur

auf Glukose- und Galaktose-haltige Medien beschränkt, sondern auch bei Wachstum auf Maltose zu beobachten war.

Der beobachtete negative Wachstumseffekt durch das Hxt1/4-Chimär konnte seine Ursache darin haben, dass das Chimär nicht nur die Hexosetransporter sondern auch andere Transportproteine, wie die Maltosepermeasen, negativ beeinflusst. Aus diesem Grund sollte das Wachstumsverhalten auf der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle Ethanol untersucht werden. Ethanol gelangt durch Diffusion in die Hefezelle und daher wird bei Wachstum auf Ethanol kein Transportprotein benötigt (Guijarro und Lagunas, 1984; Kotyk und Alonso, 1985). Abb. 9 zeigt, dass auch bei Wachstum mit Ethanol als Kohlenstoffquelle ein Wachstumsdefekt bei Anwesenheit des Hxt1/4-Chimärs auftritt.

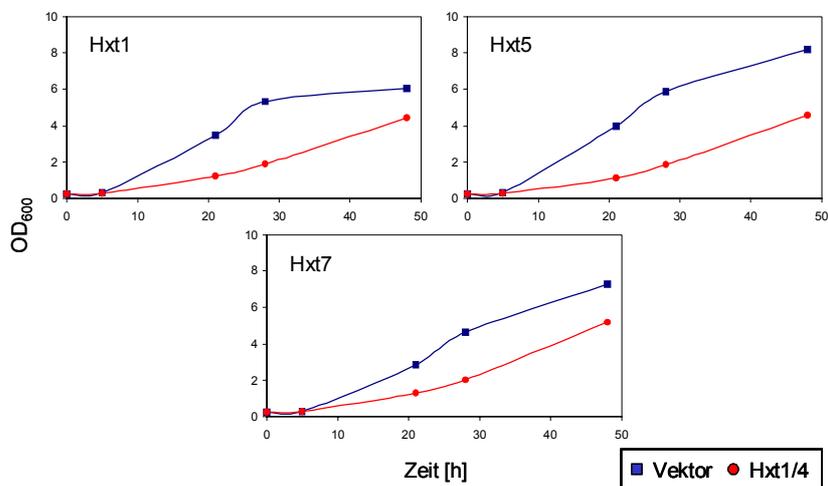


Abb. 9: **Wachstumsverhalten der HXT1-, HXT5- und HXT7-Einzelexpressionstämmen (JBY01, JBY19, JBY02).** Die Stämme wurden jeweils mit dem Leervektor p426HXT7-6HIS als Negativkontrolle (**Vektor**) und mit dem Plasmid p426HXT1/4 (**Hxt1/4**) transformiert und die Wachstumskurven in SC-Medium ohne Uracil mit 2% Ethanol durchgeführt.

Alle bisher verwendeten Stämme exprimierten konstitutiv einen Hexosetransporter. Um einen Einfluss dieser Hexosetransporter aufgrund ihrer ständigen Expression in der Hefezelle auszuschließen, wurden Wachstumsstudien mit dem *hxt*-Nullstamm EBY.VW4000 und im Vergleich mit dem isogenen Wildtypstamm CEN.PK2-1C durchgeführt. Der *hxt*-Nullstamm zeigte auf Maltose- und der Wildtypstamm auf Glukose-, Maltose- und Galaktose-haltigen Mediumsplatten ein verschlechtertes Wachstum bei Anwesenheit des Hxt1/4-Chimärs (nicht dargestellt). Auch mit Ethanol als Kohlenstoffquelle zeigten die Stämme EBY.VW4000 und CEN.PK2-1C ein verlangsamtes Wachstum bei Anwesenheit des Hxt1/4-Chimärs (Abb. 10).

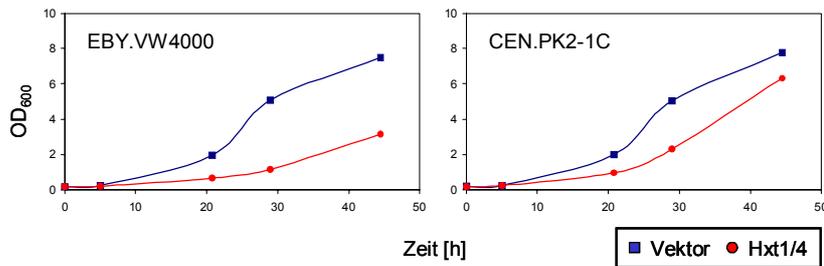


Abb. 10: **Wachstumsverhalten des *hxt*-Nullstammes EB.Y.VW4000 und des korrespondierenden Wildtypstammes CEN.PK2-1C.** Die Stämme wurden jeweils mit dem Leervektor p426HXT7-6HIS als Negativkontrolle (**Vektor**) und mit dem Plasmid p426HXT1/4 (**Hxt1/4**) transformiert und die Wachstumskurven in SC-Medium ohne Uracil mit 2% Ethanol durchgeführt.

Da in dem *hxt*-Nullstamm EB.Y.VW4000 kein Hexosetransporter vorhanden ist, konnte das verlangsamte Wachstum bei Anwesenheit des Chimärs nicht in Zusammenhang mit der Expression der Hexosetransporter in den *HXT*-Einzel-expressionsstämmen stehen. Der bei Anwesenheit des Chimärs zu beobachtende Wachstumsphänotyp hatte somit seine Ursache nicht in der An- oder Abwesenheit der Hexosetransporter.

3.1.3 Einfluss des Hxt1/4-Chimärs auf die Glukoseaufnahme

Die verschiedenen Wachstumsexperimente legten nahe, dass das Hxt1/4-Chimär entgegen der Annahme von Sherwood *et al.* (2000) keinen Einfluss auf die Glukoseaufnahmeaktivität hatte. Um dies direkt zu bestätigen, wurden Glukoseaufnahme-Messungen durchgeführt (2.34). Dazu wurde die Glukoseaufnahme des *HXT7*-Einzel-expressionsstammes JBY02 und des Wildtypstammes CEN.PK2-1C, beide transformiert mit dem Chimär p426HXT1/4 oder mit dem Leervektor p426HXT7-6His, gemessen.

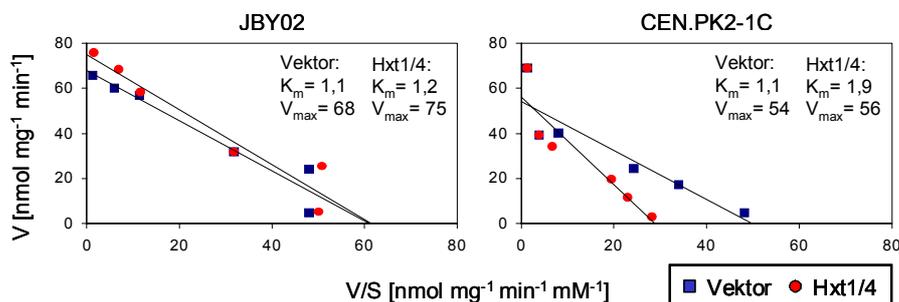


Abb. 11: **Glukoseaufnahme-Messungen des *HXT7*-Einzel-expressionsstammes JBY02 und des Wildtypstammes CEN.PK2-1C.** Die Stämme wurden jeweils mit dem Leervektor p426HXT7-6HIS als Negativkontrolle (**Vektor**) und mit dem Plasmid p426HXT1/4 (**Hxt1/4**) transformiert. Die Stämme wurden in uracilfreiem Selektivmedium mit 0,2% Glukose herangezogen und die Glukoseaufnahme von 0,1mM, 0,5mM, 1mM, 5mM, 10mM und 50mM Glukose bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Messungen als Eadie-Hofstee-Darstellung. Mit aufgeführt sind die V_{max} -Werte in $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{TG}$ und die K_m -Werte in mM.

In beiden Stämmen war kein Unterschied in der Glukoseaufnahme in Abhängigkeit von der An- und Abwesenheit des Hxt1/4-Chimärs zu beobachten (Abb. 11): Sowohl die V_{\max} -Werte mit 68 und 75 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ im Falle des *HXT7*-Einzelexpressionsstammes JBY02 und mit 54 und 56 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ im Falle des Wildtyp-Stammes CEN.PK2-1C, als auch die K_m -Werte mit 1,1 und 1,2 mM bzw. mit 1,1 und 1,9 mM zeigten keinen signifikanten Unterschied. Im Gegensatz zu der von Sherwood *et al.* (2000) postulierten Behauptung, konnte nachgewiesen werden, dass das Hxt1/4-Chimär die Glukoseaufnahme durch die Hexosetransporter nicht beeinflusst. Somit muß es für das verlangsamte Wachstum durch das Hxt1/4-Chimär andere Erklärungen geben: Entweder beeinflusst das Hxt1/4-Chimär nicht die Hexosetransporter sondern andere unter den gewählten Bedingungen benötigte Transportproteine wie z.B. die Aminosäure- oder Phosphattransporter. Oder durch das Hxt1/4-Chimär wird ein zentraler zellulärer Prozess beeinträchtigt, so dass die Zelle langsamer wächst.

3.1.4 Zelluläre Lokalisation des Hxt1/4-Chimärs

Um die Lokalisation des Hxt1/4-Chimärs in der Hefezelle zu bestimmen, wurde ein Proteinextrakt (2.21) des mit p426HXT1/4 transformierten *hxt*-Nullstammes EBY.VW4000 erstellt und die subzelluläre Lokalisation des Chimärs mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation (2.24) und Western-Blot-Analyse (2.25, 2.26) bestimmt.

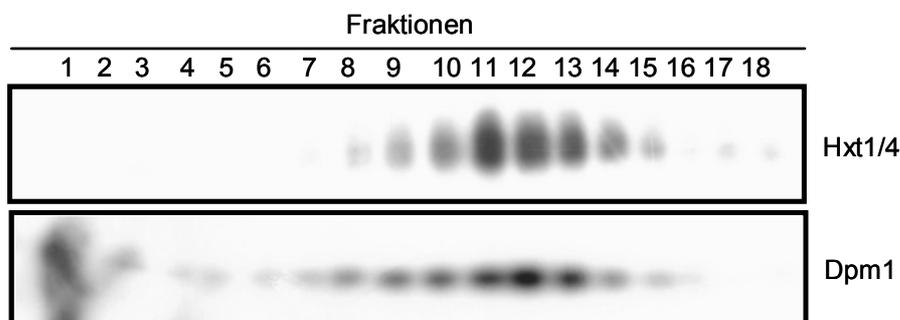


Abb. 12: **Fraktionierung des Hxt1/4-Chimärs durch Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation.** Der *hxt*-Nullstamm EBY.VW4000 wurde mit dem Plasmid p426HXT1/4 transformiert, auf uracilfreiem Selektivmedium mit 1% Maltose herangezogen und der Proteinextrakt mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation fraktioniert (20-50% Saccharose, Fraktion 1 : geringste Dichte). In Aliquots der 18 Fraktionen wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse die Verteilung des **Hxt1/4**-Chimärs mit einem gegen Hxt1 gerichteten Antikörper und zum Vergleich die Verteilung von **Dpm1** mit einem Dpm1-spezifischen Antikörper untersucht.

Abb. 12 zeigt die Verteilung von Hxt1/4 im Saccharosedichtegradienten, die mit der Verteilung des ER-Markerproteins Dpm1 übereinstimmt. Das Chimär zeigt somit im Gegensatz zu den Hexosetransportern der Hefe keine Lokalisation an

der Plasmamembran (Fraktionen 16-18: höchste Dichte; vgl. Abb. 19), sondern ist in intrazellulären Strukturen, wahrscheinlich im endoplasmatischen Retikulum, lokalisiert. Aufgrund dieser intrazellulären Lokalisation des Hxt1/4-Chimärs kann es nicht zur Glukoseaufnahme der Zelle beitragen. Das Ergebnis des in Kapitel 3.1.1 untersuchten Wachstumsverhaltens des *hxt*-Nullstammes EB.Y.VW4000 mit Hxt1/4-Chimär auf Glukose kann somit im nachhinein keine Aussage mehr darüber treffen, ob das Hxt1/4-Chimär theoretisch in der Lage ist, Glukose zu transportieren.

3.1.5 Faltungsuntersuchung des Hxt1/4-Chimärs

Um zu überprüfen, ob das Hxt1/4-Chimär eventuell als falsch gefaltetes Protein im ER akkumuliert, wurde die Induktion des UPR-Systems untersucht (vgl. 1.2.2; Abb. 5). Ein von Griffith *et al.* (2003) konstruiertes Plasmid pJS-U-*URA3/TRP1* besitzt ein *lacZ*-Gen hinter einem transkriptionell stillen *ICL1*-Promotor mit integriertem UPR-Element („UPRE“) aus dem *KAR2*-Promotor. Das BiP-homologe der Hefe Kar2 bindet an nicht oder falsch gefaltete Proteine. Die daraufhin erfolgende Aktivierung der Endonuklease-Aktivität von Ire2 führt zur Synthese des UPR-spezifischen Transkriptionsfaktors Hac1ⁱ. Dieser bindet nach Translokation in den Nukleus an die UPR-Elemente in den Promotorbereichen, so dass die UPR-spezifischen Gene exprimiert werden.

Das Plasmid pJS-U-*TRP1* wurde zusammen mit dem Plasmid p426HXT1/4 oder zusammen mit dem Leervektor p426HXT7-6HIS in die Hefestämme CEN.PK2-1C und EB.Y.VW4000 transformiert. Die Transformanten wurden in Selektivmedium ohne Uracil und Tryptophan herangezogen und die quantitative Bestimmung der spezifischen β -Galaktosidaseaktivität nach der unter 2.33.2 beschriebenen Methode durchgeführt. Abb. 13 zeigt die gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten. Als Kontrolle für das UPR-Reportersystem wurden der Stamm JBY01 mit dem Plasmid pJS-U-*URA3* transformiert, die Transformanten für 6h in Selektivmedium ohne Uracil mit 2mM DTT angezogen und die Enzymaktivität bestimmt. Die Zugabe von DTT führt zur Falschfaltung von Proteinen, was in diesem Reportersystem durch eine erhöhte spezifische β -Galaktosidaseaktivitäten von fast $250\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ deutlich wurde. Weder im Wildtypstamm CEN.PK2-1C noch im *hxt*-Nullstamm EB.Y.VW4000 war eine erhöhte β -Galaktosidaseaktivität aufgrund des Hxt1/4-Chimärs zu beobachten. Die sehr geringen Messwerte von unter $1\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ deuteten darauf hin, dass das Hxt1/4-Chimär nicht falsch gefaltet in der Zelle vorliegt.

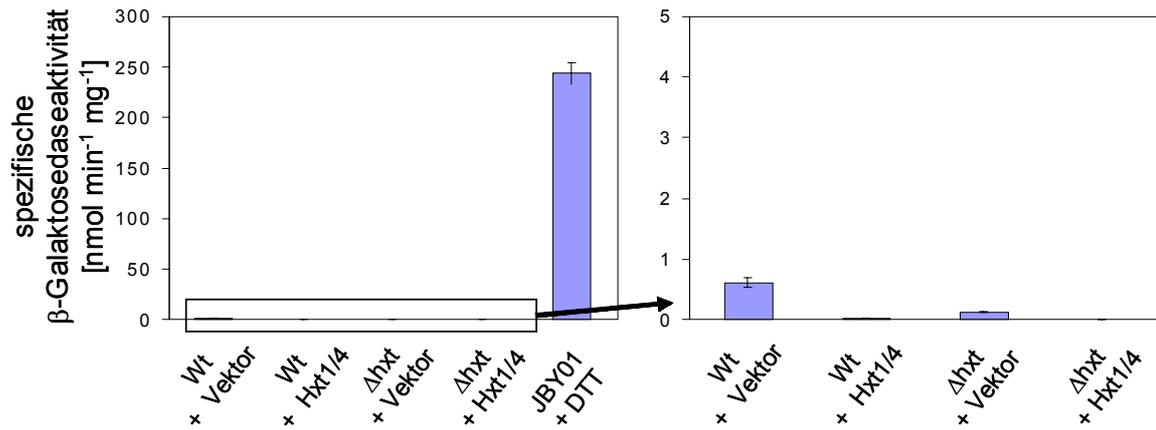


Abb. 13: **Quantitative Bestimmung der spezifischen β -Galaktosidaseaktivität (nmol min⁻¹ mg⁻¹ Protein) der Hxt1/4-Chimäre.** Die Stämme CEN.PK2-1C (**Wt**) und EBY.VW4000 (Δ **hxt**) wurden mit dem Plasmid pJS-U-*TRP1* zusammen mit dem Plasmid p426HXT1/4 (**Hxt1/4**) oder als Negativkontrolle zusammen mit dem Leervektor p426HXT7-6HIS (**Vektor**) transformiert und in Selektivmedium ohne Uracil und Tryptophan mit 2% Glukose (CEN.PK2-1C) bzw. 1% Maltose (EBY.VW4000) herangezogen. Als Kontrolle wurden der Stamm JBY01 mit dem Plasmid pJS-U-*URA3* transformiert und die Transformanten für 6h in Selektivmedium ohne Uracil mit 2mM DTT angezogen. (Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 Messungen bzw. im Falle von JBY01 aus 2 Messungen mit den Fehlerindikatoren der Einzelmessungen.)

Die Untersuchung des UPR-Signalweges deutet darauf hin, dass das Hxt1/4-Chimär, das in der Hefezelle in intrazellulären Strukturen zurückgehalten wird, richtig gefaltet vorliegt. Somit ist nicht eine Falschfaltung für das verlangsamte Wachstum der Zelle verantwortlich. Im Gegensatz zu den Spekulationen von Sherwood *et al.* (2000) deuten die hier dargestellten, weiterführenden Experimente nicht darauf hin, dass das Hxt1/4-Chimär Komplexe mit den Hexosetransportern bildet und auf diesem Wege die Glukoseaufnahmeaktivität der Hexosetransporter beeinflusst. Vielmehr gelangt das Hxt1/4-Chimär nicht wie die Hexosetransporter zur Plasmamembran, sondern wird intrazellulär zurückgehalten. Dort scheint das Protein zentrale zelluläre Prozesse der Hefe so stark zu beeinträchtigen, dass die Anwesenheit des Hxt1/4-Chimärs zu einem generell verlangsamten Wachstum der Zellen führt.

3.2 Gsf2

Sherwood und Carlson (1999) zeigten, dass das ER-Protein Gsf2 notwendig ist, um einzelne Hexosetransporter zur Plasmamembran zu translozieren. Sie konnten nachweisen, dass in *gsf2*-Mutanten der niederaffine Hexosetransporter Hxt1 und der Galaktosetransporter Gal2 im ER akkumulierten, während Hxt2 weiterhin an der Plasmamembran lokalisiert war.

3.2.1 Wachstumsstudien verschiedener Δ *gsf2*-Deletionsstämme

Um den Effekt einer *gsf2*-Deletion auf die wichtigsten Hexosetransporter Hxt1-Hxt7 und Gal2 zu untersuchen, wurde das *GSF2*-Gen in den verschiedenen *HXT*-Einzelexpressionsstämmen, dem *hxt*-Nullstamm EBY.VW4000 und dem korrespondierenden Wildtypstamm CEN.PK2-1C nach der unter 2.19.1 beschriebenen Methode deletiert (siehe Tab. 10). Für die Amplifikation der *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette wurde das Oligonukleotidpaar S1-GSF2/S2-GSF2 und für die Verifikation der Deletion die Oligonukleotide A1-GSF2/A4-GSF2 bzw. B1-GSF2/B4-GSF2 verwendet.

Tab. 10: **Liste der konstruierten *gsf2*-Deletionsstämme.** Aufgeführt sind die Bezeichnungen der Ausgangsstämme, der isogenen *gsf2*-Deletionsmutanten und des jeweils exprimierten Hexosetransporters.

Bezeichnung der Ausgangsstämme	Bezeichnung der <i>gsf2</i> -Deletionsstämme	exprimierter Hexosetransporter
RE601A	THY.03	Hxt1
RE602B	THY.04	Hxt2
RE603A	THY.05	Hxt3
RE604A	THY.06	Hxt4
RE605A	THY.07	Hxt5
RE606A	THY.08	Hxt6
RE607A	THY.09	Hxt7
RE700A	THY.10	Gal2
JBY01	THY.11	Hxt1
JBY02	THY.12	Hxt7
JBY19	THY.13	Hxt5
EBY.VW4000	THY.14	<i>hxt</i> -Nullstamm
CEN.PK2-1C	THY.15	Wildtypstamm

Ein erster Hinweis darauf, welche Hexosetransporter von Gsf2 beeinflusst werden, wurde erhalten, indem das Wachstumsverhalten der *gsf2*-Deletionsstämmen im Vergleich zu den isogenen *GSF2*-Wildtypstämmen auf verschiedenen Mediumsplatten untersucht wurde (Tab. 11). Die verwendeten Glukose- bzw. Galaktose-Konzentrationen wurden entsprechend der Affinitäten der Hexosetransporter zu der jeweiligen Kohlenstoffquelle gewählt.

Tab. 11: **Wachstumsvergleich der *gsf2*-Deletionsstämmen und der isogenen *GSF2*-Wildtypstämmen.** Aufgelistet sind die Stämme und der beobachtete Wachstumsvergleich. In Klammern ist das jeweils exprimierte Hexosetransporter gen aufgeführt. Bezeichnungen: ○ = kein Wachstumsunterschied zwischen Wildtyp und *gsf2*-Deletion, < = negativer Wachstumseffekt durch *gsf2*-Deletion, << = starker negativer Wachstumseffekt durch *gsf2*-Deletion, n.d. = nicht getestet. SCD, SCG, SCM und SCE bezeichnen synthetische Komplettmediumsplatten (inklusive aller Aminosäuren und Nucleobasen) mit der jeweils angegebenen Konzentration an Glukose, Galaktose, Maltose und Ethanol.

Stämme	0,1%SCD	1%SCD	5%SCD	2%SCG	1%SCM	2%SCE
RE601A/ THY.03 (<i>HXT1</i>)	n.d.	<<	<<	n.d.	○	○
RE602B/ THY.04 (<i>HXT2</i>)	○	○	<	n.d.	○	○
RE603A/ THY.05 (<i>HXT3</i>)	n.d.	<<	<<	n.d.	○	○
RE604A/ THY.06 (<i>HXT4</i>)	<	○	<	n.d.	○	○
RE605A/ THY.07 (<i>HXT5</i>)	<	<<	<	n.d.	○	○
RE606A/ THY.08 (<i>HXT6</i>)	○	○	n.d.	n.d.	○	○
RE607A/ THY.09 (<i>HXT7</i>)	<	<	n.d.	n.d.	○	○
RE700A/ THY.10 (<i>GAL2</i>)	n.d.	n.d.	n.d.	<	○	○
JBY01/ THY.11 (<i>HXT1</i>)	n.d.	<<	<	n.d.	○	○
JBY02/ THY.12 (<i>HXT7</i>)	<	<	n.d.	n.d.	○	○
JBY19/ THY.13 (<i>HXT5</i>)	<	<	<	n.d.	○	○

Die *gsf2*-Deletion zeigte keinen Einfluss auf das Wachstum auf Maltose. Auf Glukose-haltigen Medien war allerdings ein verlangsamtes Wachstum bei Abwesenheit von Gsf2 zu beobachten. Der Einfluss der *gsf2*-Deletion auf das Wachstumsverhalten auf Glukose war in Abhängigkeit der getesteten *HXT*-Einzelexpressionsstämmen unterschiedlich stark ausgeprägt: So zeigten *HXT1*- und *HXT3*-Einzelexpressionsstämmen (RE601A/THY.03, JBY01/THY.11, RE603A/THY.05) ein stark verlangsamtes Wachstum in Abwesenheit von Gsf2, während bei den übrigen Einzelexpressionsstämmen nur ein geringer oder gar kein Wachstumsunterschied zu beobachten war. Zusätzlich zeigte sich, dass auch die verschiedenen Stammhintergründe zu einem unterschiedlichen Wachstumsverhalten führen konnten: Ein Vergleich der *HXT1*-Einzelexpressionsstämmen

RE601A/THY.03 und JBY01/THY.11 zeigte, dass der RE601A-Stamm bei einer *gsf2*-Deletion auf 5% SCD-Medium einen stärkeren Wachstumsdefekt hatte als der JBY01-Stamm. Und auch die *HXT5*-Einzelexpressionsstämme RE605/THY.07 und JBY19/THY.13 zeigten auf 1% SCD-Medium einen Wachstumsunterschied. Zurückzuführen waren diese Wachstumsunterschiede auf ein generell langsames Wachstum der RE-Stämme im Vergleich zu den JBY-Stämmen. In den RE-Stämmen liegen die Hexosetransportergene hinter ihren eigenen Promotoren und werden daher Glukose-reguliert exprimiert. Im Gegensatz dazu wurden in den JBY-Stämmen die Hexosetransportergene hinter den verkürzten *HXT7*-Promotor kloniert. Die Verkürzung des *HXT7*-Promotors führt zu einer konstitutiven, starken Expression der Gene, die unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Glukose ist (Reifenberger *et al.*, 1995; Buziol *et al.*, 2002). Aufgrund des langsameren Wachstums der RE-Stämme kam der Wachstumsunterschiede bei An- und Abwesenheit von *Gsf2* deutlicher zur Geltung.

Die Beobachtung, dass die Deletion von *GSF2* keinen Einfluss bei Wachstum auf Maltose hatte, konnte in Flüssigkulturen bestätigt werden: Das Wachstumsverhalten der *HXT*-Einzelexpressionstämme RE602B/THY.04, RE604A/THY.06 und JBY02/THY.12 zeigte keinen Unterschied in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit von *Gsf2* (nicht dargestellt). Ebenso war bei dem Wachstumsverhalten aller in Tab. 11 aufgeführten Stämme auf 2% SCE-Platten (synthetisches Komplettmedium mit 2% Ethanol) kein Unterschied zu beobachten. Aufgrund des identischen Wachstumsverhaltens bei An- und Abwesenheit von *Gsf2* auf Maltose- und Ethanol-haltigen Medien, konnte geschlossen werden, dass *Gsf2* direkt auf einzelne Hexosetransporter wirkt. Somit zeigte sich der Wachstumsunterschied nur auf solchen Kohlenstoffquellen, für deren Aufnahme diese Hexosetransporter benötigt wurden.

Um den Einfluss der *gsf2*-Deletion auf die einzelnen Transporter genauer bestimmen zu können, wurde das Wachstumsverhalten der *HXT*-Einzelexpressionsstämme in An- und Abwesenheit von *Gsf2* in Flüssigmedien nach der unter 2.20 beschriebenen Methode auf Glukose-haltigem Medium untersucht (Abb. 14).

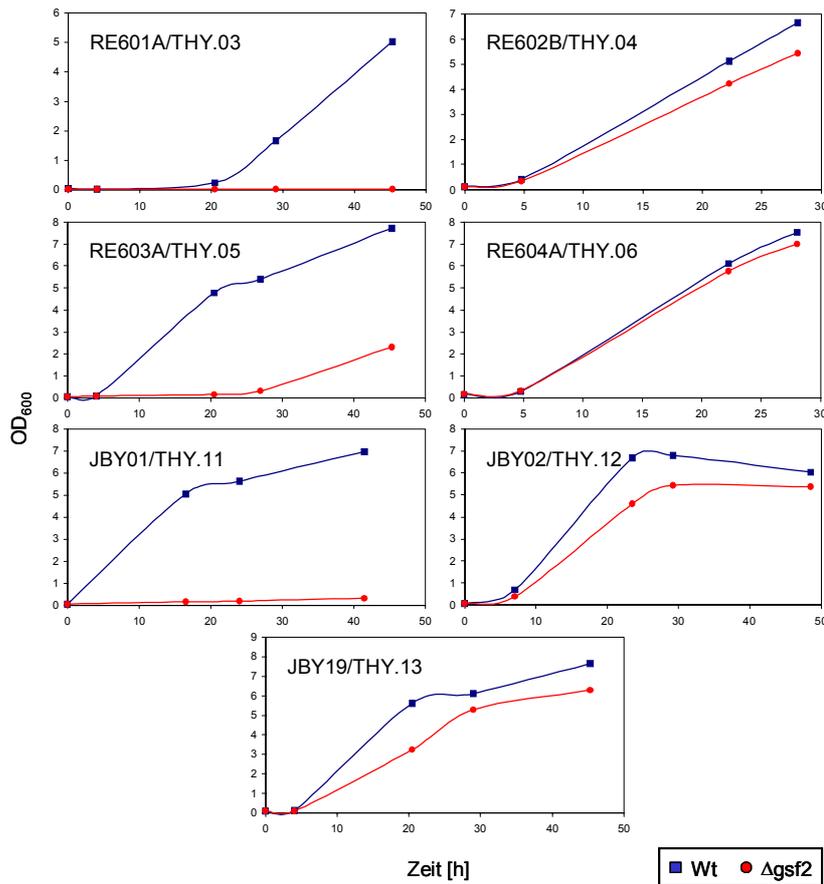


Abb. 14: **Wachstumsvergleich der *gsf2*-Deletionsstämmen (Δ gsf2) und der korrespondierenden Wildtypstämmen (Wt).** Dargestellt sind die Wachstumskurven für die Einzelexpressionsstämme RE601A/THY.03 (*HXT1*), RE602B/THY.04 (*HXT2*), RE603A/THY.05 (*HXT3*), RE604A/THY.06 (*HXT4*), JBY01/THY.11 (*HXT1*), JBY02/THY.12 (*HXT7*) und JBY19/THY.13 (*HXT5*) in synthetischem Komplettmedium (inklusive aller Aminosäuren und Nucleobasen) mit 1% Glukose (1% SCD).

Die Wachstumskurven veranschaulichen, dass der Einfluss einer *gsf2*-Deletion in Abhängigkeit von dem exprimierten Hexosetransporter unterschiedlich ausgeprägt ist: Die *HXT1*-Einzelexpressionsstämme zeigten in Abwesenheit von Gsf2 kein Wachstum mehr auf Medium mit 1% Glukose und der *HXT3*-Einzelexpressionsstamm zeigte ein stark verlangsamtes Wachstum. Im Vergleich dazu waren die Wachstumsunterschiede zwischen dem parental und dem Δ gsf2-Stamm bei den *HXT2*-, *HXT4*-, *HXT5*- und *HXT7*-Einzelexpressionsstämmen nur gering bis gar nicht vorhanden. Aufgrund der Beobachtungen konnte geschlossen werden, dass der Einfluss von Gsf2 auf die verschiedenen Hexosetransporter unterschiedlich ist: Die Hexosetransporter Hxt1 und Hxt3 zeigten eine starke Beeinflussung durch Gsf2, Hxt2 und Hxt4 schienen durch die Deletion von *GSF2* nicht beeinflusst zu werden und Hxt5 und Hxt7 wurden nur leicht beeinflusst.

3.2.2 Zelluläre Lokalisation von Gsf2

Um das Gsf2-Protein detektieren zu können, wurde das *GSF2*-Gen mit einem Tag versehen, gegen den kommerziell erwerbbarer Antikörper für die Detektion zur Verfügung standen. Ein einzelner HA-Tag wurde an den N-Terminus von Gsf2 fusioniert, so dass das am C-Terminus vorhandene Dilysin-Motiv weiterhin frei bleiben konnte und nicht verdeckt wurde.

Tab. 12: **Sequenz des HA-Tags.** Dargestellt ist die Nukleotidabfolge und die Aminosäuresequenz des verwendeten einzelnen HA-Tags.

Nukleotidabfolge	TAC	CCA	TAC	GAC	GTT	CCA	GAC	TAC	GCT
Aminosäuresequenz	Y	P	Y	D	V	P	D	Y	A

Die Klonierung erfolgte nach der unter 2.17 beschriebenen Methode: Mittels der Oligonukleotide S1-HAGSF2 und A2-HAGSF2 wurde die *GSF2*-Promotorsequenz bis 500bp aufwärts des *GSF2*-Start-Codons und mittels der Oligonukleotide A3-HAGSF2 und S2-HAGSF2 der *GSF2*-ORF samt der *GSF2*-Terminatorsequenz bis 300bp abwärts des *GSF2*-Stop-Codons aus chromosomaler DNA (2.7.3) amplifiziert. Die Oligonukleotide A2-HAGSF2 und A3-HAGSF2 enthielten die Nukleotidsequenz eines einzelnen HA-Tags (vgl. Tab. 12) und die Oligonukleotide S1-HAGSF2 und S2-HAGSF2 enthielten zusätzlich eine *NotI*-Restriktionserkennungssequenz 'GCGGCCGC'. Die PCR-Produkte wurden über homologe Rekombination in den durch Restriktion geöffneten Vektor YCplac33^{*Bam*HI,*Hind*III} kloniert und das Plasmid **YCpHA-GSF2** mittels Restriktionskartierung verifiziert.

Um die Funktionalität des getaggen Gsf2-Proteins zu überprüfen, wurde das Plasmid YCpHA-GSF2 in den Stamm THY.11 transformiert: Der *HXT1*-Einzelexpressionsstamm THY.11 (=JBY01 Δ *gsf2*) wächst aufgrund der *gsf2*-Deletion nicht auf synthetischem Medium mit 1% Glukose (Abb. 14), so dass die Funktionalität des getaggen Gsf2-Proteins in einem Wachstumstest überprüft werden konnte (Abb. 15A). Das Wachstumsverhalten des transformierten Stammes THY.11 war identisch mit dem des *GSF2*-Wildtypstammes JBY01. Somit war sichergestellt, dass die Fusion des HA-Tags mit Gsf2 die Funktionalität des Gsf2-Proteins nicht beeinträchtigte.

Um den HA-Tag zu detektieren, wurden Proteinextrakte des mit YCpHA-GSF2 und YCplac33 transformierten Stammes THY.11 hergestellt (2.21). Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (2.25) und das HA-getaggte Gsf2-Protein

mittels Western-Blot-Analyse (2.26) nachgewiesen (Abb. 15B). Das 46 kDa große Gsf2-Protein war in dem mit YCpHA-GSF2 transformierten Stamm detektierbar wohingegen der Kontrollstamm kein Signal zeigte.

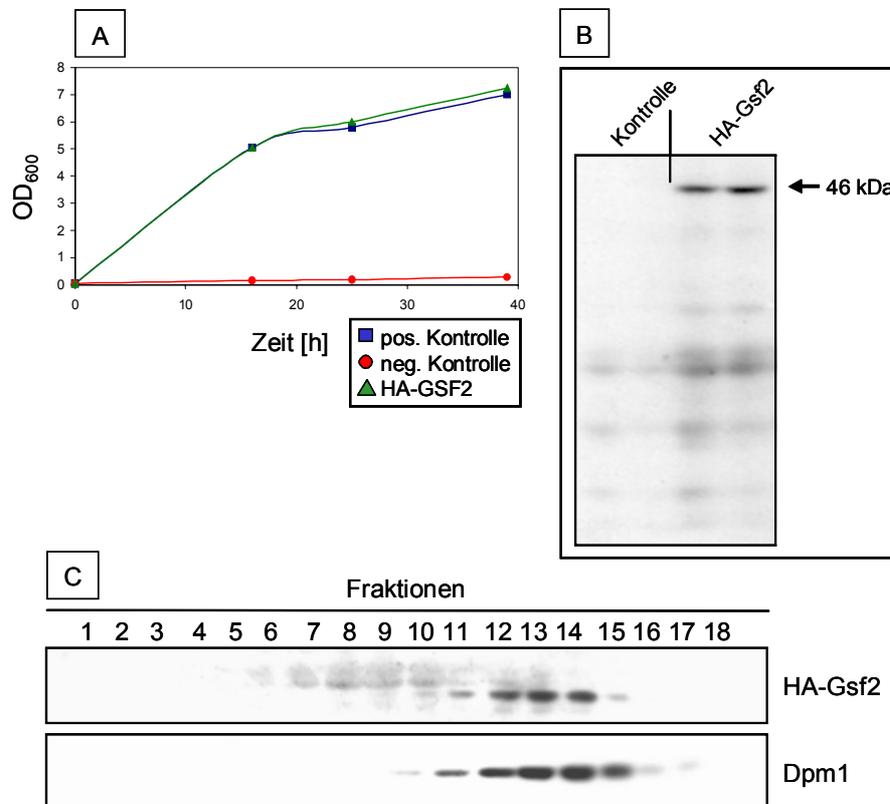


Abb. 15: Untersuchungen zum HA-Gsf2-Protein.

(A) Dargestellt sind die Wachstumskurven des *gsf2*-Deletionsstammes THY.11 transformiert mit dem zu testenden Plasmid YCpHA-GSF2 (**HA-GSF2**) und mit dem Vektor YCplac33 (**neg. Kontrolle**). Als Positivkontrolle diente der *GSF2*-Wildtypstamm JBY01 transformiert mit dem Vektor YCplac33 (**pos. Kontrolle**). Die Wachstumskurven wurden in synthetischem Komplettmedium ohne Uracil mit 1% Glukose durchgeführt.

(B) Der mit YCpHA-GSF2 (**HA-Gsf2**) und mit YCplac33 (**Kontrolle**) transformierte Stamm THY.15 wurde in Selektivmedium mit 1% Maltose herangezogen, die Proteinextrakte gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot-Analyse mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper nachgewiesen.

(C) Der mit dem Plasmid YCpHA-GSF2 transformierte Stamm THY.15 wurde auf uracilfreiem Selektivmedium mit 2% Glukose herangezogen und der Proteinextrakt mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation fraktioniert (20-50% Saccharose, Fraktion 1 : geringste Dichte). In Aliquots der 18 Fraktionen wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse die Verteilung von **HA-Gsf2** mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper und zum Vergleich die Verteilung von **Dpm1** mit einem Dpm1-spezifischen Antikörper untersucht.

Da das HA-getaggte Gsf2-Protein funktionell und der HA-Tag im Western-Blot nachweisbar war, konnte im Anschluss die Lokalisation von HA-Gsf2 in der Hefezelle bestimmt werden. Dazu wurde ein Proteinextrakt (2.21) des mit

YCpHA-GSF2 transformierten Stammes THY.15 hergestellt und die subzelluläre Lokalisation mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation (2.24) und Western-Blot-Analyse (2.25, 2.26) bestimmt (Abb. 15C). Die Verteilung von HA-Gsf2 im Saccharosedichtegradienten stimmte mit der Verteilung des ER-Markerproteins Dpm1 überein, so dass auf eine Lokalisierung von Gsf2 im ER geschlossen werden konnte. Frühere fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen von GFP-Gsf2-Konstrukten (Sherwood und Carlson, 1999) und die Lokalisationsvorhersage aufgrund des Dilysin-Motivs, konnten durch den Saccharosedichtegradienten bestätigt werden.

3.2.3 Zelluläre Lokalisation der Hexosetransporter

Sherwood und Carlson (1999) konnten mit Hilfe von GFP-Studien zeigen, dass die Hexosetransporter Hxt1 und Gal2 in Abwesenheit von Gsf2 teilweise im ER lokalisiert sind, während der Hexosetransporter Hxt2 unabhängig von der An- und Abwesenheit von Gsf2 an der Plasmamembran vorliegt. Mit Hilfe von Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation sollte die Lokalisierung von nativem Hxt1 und Hxt7 ohne Tag und von Hxt5-HA in der Zelle nachgewiesen werden. Für die Lokalisationsuntersuchungen von Hxt1 und Hxt7 wurden Proteinextrakte (2.21) des mit YCpHA-GSF2 und mit YCplac33 transformierten Stammes THY.15 erstellt. Der mit YCpHA-GSF2 transformierte Δ gsf2-Stamm THY.15 stellt aufgrund der Funktionalität des HA-Gsf2-Proteins die Wildtypsituation in der Zelle dar, während der mit dem Vektor YCplac33 transformierte Stamm die Situation bei Abwesenheit von Gsf2 repräsentiert. Die Verwendung des Stammes THY.15 hatte den Vorteil, die Hexosetransporter Hxt1 und Hxt7 sowie HA-Gsf2 in einem einzigen Saccharosedichtegradienten nachweisen zu können. Für die Detektion von Hxt5-HA wurden Proteinextrakte der Stämme JBY19 und THY.13 erstellt. Die subzelluläre Lokalisation wurde mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation (2.24) und Western-Blot-Analyse (2.25, 2.26) bestimmt.

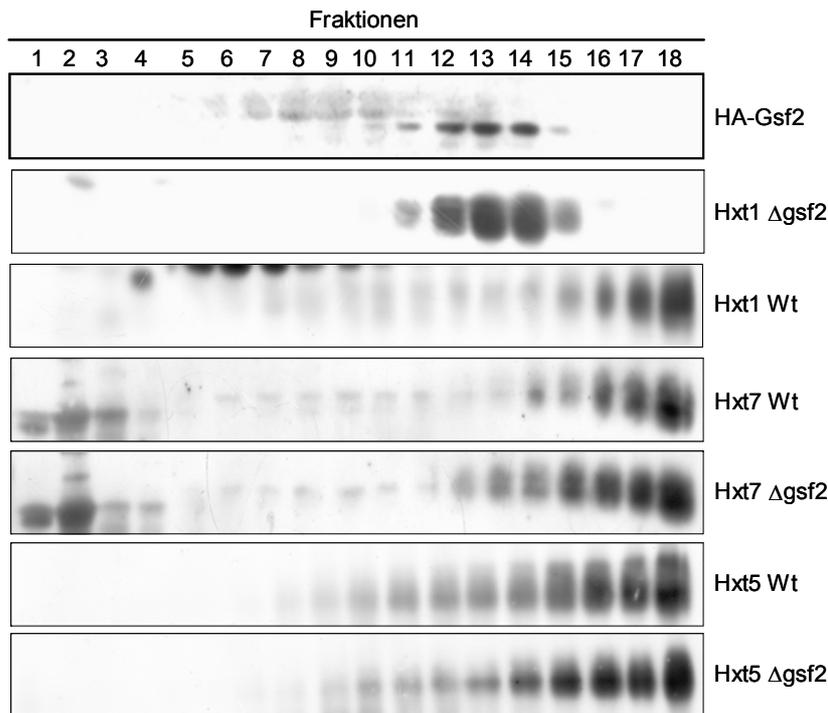


Abb. 16: **Fraktionierung der Hexosetransporter Hxt1, Hxt5 und Hxt7 durch Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation.** Der Δ gsf2-Stamm THY.15 wurde mit dem Plasmid YCpHA-GSF2 (**Wt**) und mit dem Leervektor YCplac33 (Δ gsf2) transformiert und auf uracilfreiem Selektivmedium mit 2% Glukose für die Detektion von Hxt1 und Hxt7 herangezogen. Die Stämme JBY19 (**Wt**) und THY.13 (Δ gsf2) wurden in 1% SCM (synthetisches Komplettmedium mit 1% Maltose) zur Detektion von Hxt5-HA herangezogen. Die Proteinextrakte wurden mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation fraktioniert (20-50% Saccharose, Fraktion 1 : geringste Dichte). In Aliquots der jeweils 18 Fraktionen wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse die Verteilung von Hxt1 mit einem Hxt1-spezifischen Antikörper, von Hxt7 mit einem Hxt7-spezifischen Antikörper und von Hxt5-HA mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper untersucht.

Abb. 16 zeigt die Verteilung von Hxt1, Hxt7 und Hxt5-HA in Abhängigkeit von der An- und Abwesenheit von Gsf2: Hxt1 zeigt bei Abwesenheit von Gsf2 eine intrazelluläre Lokalisation, die mit der Lokalisierung von HA-Gsf2 übereinstimmt. Im Gegensatz zu den GFP-Analysen von Sherwood und Carlson (1999) ist im Saccharosegradienten kein Hxt1-Protein an der Plasmamembran lokalisiert (Fraktionen 16-18: höchste Dichte; vgl. Abb. 19). Bei Anwesenheit von Gsf2 wird Hxt1 in den Fraktionen höchster Dichte, die die Plasmamembran repräsentieren, detektiert. Hxt7 und Hxt5-HA sind unabhängig von der An- und Abwesenheit von Gsf2 an der Plasmamembran lokalisiert.

Die Ergebnisse der Wachstumsstudien (3.2.1) konnten durch die Saccharosedichtegradienten-Zentrifugationen bestätigt werden: Die *HXT5*- und *HXT7*-Einzelexpressionsstämme zeigten nach Deletion von *GSF2* ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die isogenen *GSF2*-Wildtypstämme, während die *HXT1*-Einzelexpressionsstämme nach Deletion von *GSF2* nicht mehr auf Glukose-haltigem

Medium wachsen konnten. Dementsprechend zeigten die Saccharosedichtegradienten-Zentrifugationen, dass Hxt5 und Hxt7 auch bei Abwesenheit von Gsf2 an der Plasmamembran lokalisiert sind und somit Glukose in die Zelle transportieren können, während Hxt1 im ER zurückgehalten wird. Gsf2 ist somit für die Zelle notwendig, damit Hxt1 zur Plasmamembran transloziert wird und Glukose über diesen Transporter aufgenommen werden kann.

3.3 Charakterisierung von Hxt1

3.3.1 Elektrophoretische Mobilität von Hxt1

Sherwood und Carlson (1999) zeigten, dass Hxt1-GFP in Abhängigkeit von der An- und Abwesenheit von Gsf2 ein unterschiedliches Laufverhalten in der Western-Blot-Analyse besitzt. In Abwesenheit von Gsf2 zeigte Hxt1-GFP eine größere elektrophoretische Mobilität als in Anwesenheit von Gsf2 (Abb. 17A). Sie begründeten diesen Unterschied im Laufverhalten mit der Akkumulation von Hxt1-GFP im ER.

Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurden Aliquots der Fraktionen 9, 12, 15 und 18 der Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation des $\Delta gsf2$ -Stammes THY.15 transformiert mit YCpHA-GSF2 und YCplac33 (vgl. 3.2.3, Abb. 16) auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mittels Western-Blot-Analyse das Laufverhalten von Hxt1 analysiert (2.25, 2.26). Es konnte allerdings kein Unterschied im Laufverhalten von Hxt1 beobachtet werden (nicht dargestellt). Um auszuschließen, dass die Ursache des unterschiedlichen Laufverhaltens von Hxt1 bei der hier verwendeten Präparationsmethode für Saccharosedichtegradienten zerstört wurde, wurden neue Proteinextrakte erstellt. Die Proteinextrakte der Stämme JBY01 und THY.11 (=JBY01 $\Delta gsf2$) wurden in Anlehnung an die unter 2.21 beschriebene Methode erstellt: Im 1. Ansatz wurde die beschriebene Methode befolgt, im 2. Ansatz wurde auf die Zugabe von DTT zu den Lösungen verzichtet und im 3. Ansatz wurde neben DTT auch auf PMSF, auf alle Protease-Inhibitoren und auf SDS in den Lösungen verzichtet. Die Proben wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mittels Western-Blot-Analyse das Laufverhalten von Hxt1 analysiert (2.25, 2.26).

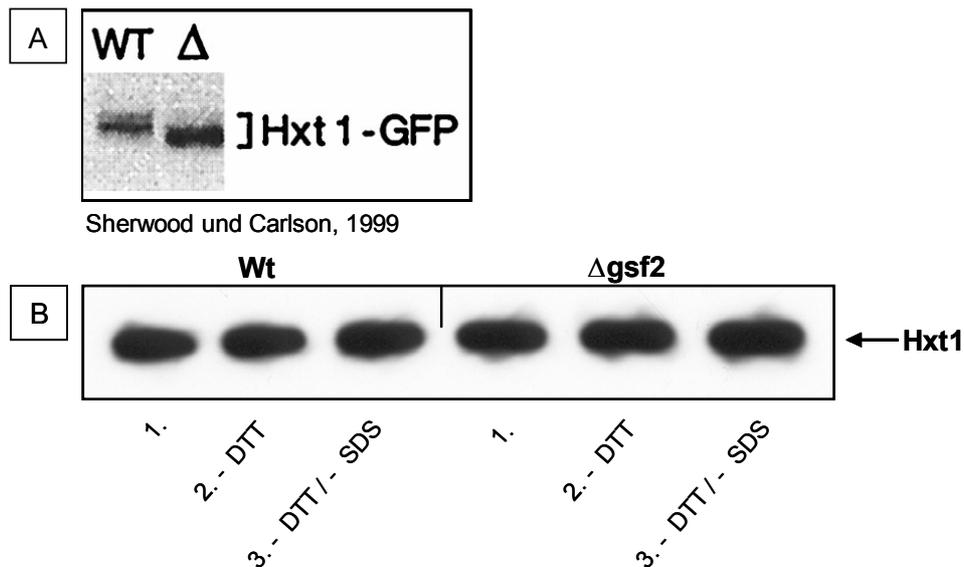


Abb. 17: **Elektrophoretische Mobilität von Hxt1.** (A) Dargestellt ist das von Sherwood und Carlson (1999) publizierte elektrophoretische Laufverhalten von Hxt1-GFP. (B) Dargestellt ist das elektrophoretische Laufverhalten von Hxt1 im *GSF2*-Wildtypstamm JBY01 (**Wt**) und im *gsf2*-Deletionsstamm (**Δgsf2**). Die Stämme wurden in synthetischem Komplettmedium (inklusive aller Aminosäuren und Nucleobasen) mit 1% Maltose (1% SCM) herangezogen. Die Proteinextrakte für den 1. Ansatz wurden nach Vorschrift erstellt, für den 2. Ansatz wurde auf die Zugabe von DTT verzichtet und im 3. Ansatz wurde neben DTT, auf PMSF, Protease-Inhibitoren und SDS in den Präparationslösungen verzichtet. In Aliquots der Proteinextrakte wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse die elektrophoretische Mobilität von Hxt1 mit einem Hxt1-spezifischen Antikörper untersucht.

Wie in Abb. 17B zu erkennen, war kein Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität von Hxt1 in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit von Gsf2 zu beobachten. Auch der Verzicht auf Denaturierungshilfen führte zu keiner veränderten elektrophoretischen Mobilität von Hxt1. Diese Beobachtungen waren ein erstes Indiz dafür, dass Hxt1 bei einer ER-Retention im Vergleich zu der Plasmamembran-ständigen Version weder modifiziert noch falsch gefaltet vorlag.

3.3.2 Einfluss chemischer Chaperone auf Hxt1

Brown *et al.* (1997) publizierten, dass Temperatur-sensitive Mutanten bei Inkubation mit chemischen Chaperonen bei der restriktiven Temperatur wieder den Wildtypphänotyp zeigten. An den Beispielen des Tumor-Suppressor-Proteins p53, des Genproduktes des Rous-Sarcoma-Virus pp60^{scf} und des Proteins E1, das bei der Ubiquitin-abhängigen Protein-Degradation eine wichtige Rolle spielt, zeigten sie, dass verschiedene niedermolekulare Stoffe als Protein-stabilisierende Agenzien dienen können. Durch Zugabe von Glycerin, Trimethylamin-N-Oxide (TMAO) oder Deuterium konnte die Denaturierung der Proteine bei nicht-permissiver Temperatur verhindert werden. Zusätzlich dienen auch

Dimethylsulfoxid (DMSO) und Dithiothreitol (DTT) als chemische Chaperone (Brown *et al.*, 1996; Ghumman *et al.*, 1998).

Obwohl ein Einfluss der chemischen Chaperone nur auf Temperatur-abhängig falsch gefaltete Protein publiziert war, sollte der Einfluss auch auf Hxt1 überprüft werden. Um zu testen ob Hxt1 bei Abwesenheit von Gsf2 falsch gefaltet in der Zelle vorliegt, wurden die *HXT1*-Einzelexpressionsstämme JBY01 und THY.11 mit verschiedenen Chemikalien inkubiert. Auf den 1% SCD-Mediumsplatten wurden jeweils 1×10^5 Zellen der Stämme JBY01 und THY.11 ausgestrichen und anschließend wurden Filterplättchen, getränkt in DTT (0,75mM/2mM/10mM), DMSO (5%/10%/15%/20%) oder Glycin (0,6M/1,2M) aufgesetzt. Die Platten wurden bei verschiedenen Temperaturen von 20°C, 25°C und 30°C inkubiert, da Hawthorne und Friis (1964) publiziert hatten, dass die Reduktion der Inkubationstemperatur einen Proteinfaltungsdefekt korrigieren kann.

Das Wachstumsverhalten der Stämme JBY01 und THY.11 zeigte keine Veränderung, weder durch die Zugabe chemischer Chaperone noch durch die veränderten Inkubationstemperaturen (nicht dargestellt): Der *GSF2*-Wildtypstamm JBY01 zeigte unter allen gewählten Bedingungen Wachstum, so dass eine toxische Konzentration der Chemikalien ausgeschlossen werden konnte. Der *gsf2*-Deletionsstamm zeigte unter allen Bedingungen kein Wachstum. Auch in einem zweiten Versuch, in dem die chemischen Chaperone direkt in das Medium zugefügt wurden, konnte kein Effekt auf das Wachstum beobachtet werden (nicht dargestellt). Die chemischen Chaperone hatten entweder keinen Einfluss, weil sie nur auf Temperatur-sensitive Mutanten stabilisierend wirken, oder Hxt1 liegt in Abwesenheit von Gsf2 in dem Stamm THY.11 nicht falsch gefaltet vor, so dass Faltungshilfen gar keinen Einfluss haben konnten.

3.3.3 Faltungsuntersuchungen zu Hxt1

Da alle bisherigen Experimente zur Charakterisierung von Hxt1 (3.3.1, 3.3.2) nur indirekte Hinweise ergaben, dass Hxt1 bei Abwesenheit von Gsf2 im ER nicht modifiziert oder falsch gefaltet vorliegt, sollte im folgenden die Induktion des UPR-Systems studiert werden (vgl. 1.2.2, 3.1.5). Das dazu verwendete Plasmid pJS-U-*URA3* besitzt ein *lacZ*-Gen hinter einem transkriptionell stillen *ICL1*-Promotor mit integriertem UPR-Element („UPRE“) aus dem *KAR2*-Promotor (Griffith *et al.*, 2003). Das Plasmid wurde in die Hefestämme CEN.PK2-1C, THY.15 (=CEN.PK2-1C Δ *gsf2*), EBY.VW4000, THY.14 (=EBY.VW4000 Δ *gsf2*), JBY01 und THY.11 (=JBY01 Δ *gsf2*) transformiert. Die Transformanten wurden in Selektivmedium ohne Uracil mit der jeweils angegebenen Kohlenstoffquelle herangezogen und die

quantitative Bestimmung der spezifischen β -Galaktosidaseaktivität nach der unter 2.33.2 beschriebenen Methode durchgeführt.

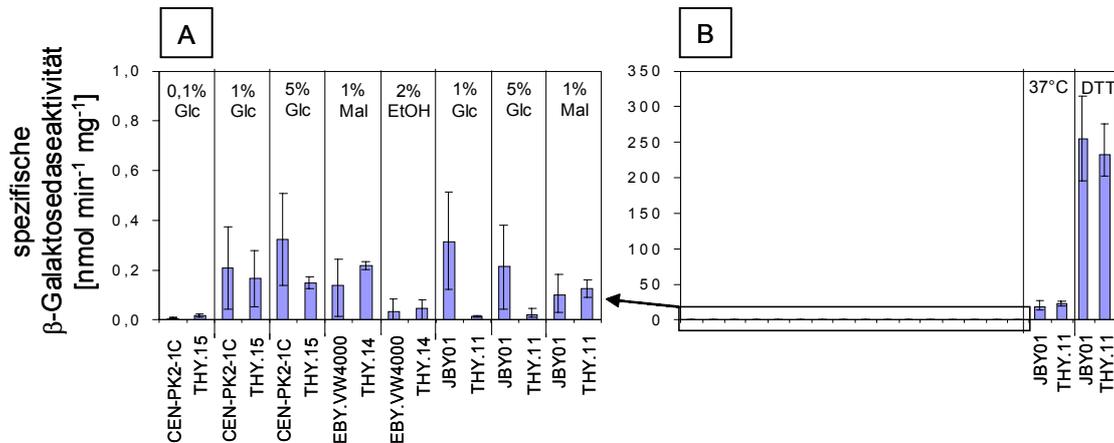


Abb. 18: **Quantitative Bestimmung der spezifischen β -Galaktosidaseaktivität (nmol min⁻¹ mg⁻¹ Protein) bei An- und Abwesenheit von Gsf2.** (A) Die Stämme CEN.PK2-1C, THY.15, EBY.VW4000, THY.14, JBY01 und THY.11 wurden mit dem Plasmid pJS-U-URA3 transformiert und in Selektivmedium ohne Uracil mit der jeweils angegebenen Kohlenstoffquelle herangezogen bzw. für mindestens 6h in Selektivmedium mit der Kohlenstoffquelle inkubiert. (B) Zur Kontrolle des Systems wurden die Stämme JBY01 und THY.11 mit dem Plasmid pJS-U-URA3 transformiert, in Selektivmedium ohne Uracil mit 1% Maltose herangezogen und zur Induktion der UPR die Transformanten für 6h bei 37°C inkubiert oder für 6h mit 2mM DTT versetzt inkubiert. (Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 Messungen mit den Fehlerindikatoren der Einzelmessungen)

Abb. 18 zeigt die gemessenen β -Galaktosidaseaktivitäten: Zur Kontrolle des UPR-Systems wurden Transformanten für 6h bei 37°C inkubiert oder das Medium mit 2mM DTT versetzt. Die Erhöhung der Inkubationstemperatur sowie die Zugabe von DTT führte zur Falschfaltung von Proteinen, was im Falle der DTT-Zugabe durch eine extrem erhöhte spezifische β -Galaktosidaseaktivität auf über 200 nmol min⁻¹ mg⁻¹ erkennbar wurde (Abb. 18B). Die verschiedenen getesteten *gsf2*-Deletionsstämme (THY.11, THY.14, THY.15) zeigten im Vergleich zu den isogenen *GSF2*-Wildtypen keine erhöhte β -Galaktosidaseaktivität. Die spezifischen β -Galaktosidaseaktivitäten lagen bei Deletions- als auch Wildtypstämmen mit unter 1 nmol min⁻¹ mg⁻¹ unterhalb der Meßwerte, die eine Induktion der UPR repräsentieren.

Die Untersuchung des UPR-Signalweges bei An- und Abwesenheit von Gsf2 ergab ein weiteres Indiz dafür, dass Hxt1 in Δ *gsf2*-Stämmen im ER nicht falsch gefaltet vorliegt und dass Gsf2 somit keine Aufgabe bei der Faltung von Hxt1 im ER ausübt.

3.3.4 Funktionalitätstest von Hxt1

Um die Frage zu beantworten, ob Hxt1 im ER in einer Konformation vorliegt, die einen Transport von Glukose über die Plasmamembran ermöglichen würde, sollte die Translokation von Hxt1 vom ER zur Plasmamembran im $\Delta gsf2$ -Stamm THY.11 erzwungen werden. Proteine, die im ER zurück gehalten werden, werden über das ERAD-System abgebaut (vgl. 1.2.3). Zahlreiche Publikationen weisen darauf hin, dass bei einer Störung des ERAD-Systems oder bei Störungen im Proteinabbau über das 26S-Proteasom die Zelle den Rücktransport der Proteine aus dem ER gar nicht erst beginnt, sondern die Proteine im ER akkumulieren. Bordallo *et al.* (1998) konnten zeigen, dass die Deletion der Ubiquitin-Protein-Ligase *hrd1* zu einer Akkumulation der mutierten Carboxypeptidase *yscY* (CPY*) im ER führte und der Abbau des Proteins blockiert war. Mutationen in den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen *ubc6* und *ubc7*, in den Proteasom-Proteinen *pre1* und *pre2* oder in der Ubiquitin-spezifischen Protease *doa4* führten bei Gilon *et al.* (1998) zu einer Stabilisierung eines *lacZ*-Fusionsproteins, das im Wildtyp zügig abgebaut wurde. Aufgrund zahlreicher Studien zum Abbauweg von Proteinen aus dem ER stellte sich heraus, dass viele lösliche Proteine, die im ER-Lumen zurück gehalten werden, Hrd1 für den Abbau benötigen, während Doa4 für den Abbau von Membranproteinen aus dem ER notwendig ist.

DOA4 wurde in dem $\Delta gsf2$ -Stamm THY.11 deletiert. Wachstumsstudien auf Glukose-haltigem Medium und Lokalisationsuntersuchungen von Hxt1 sollten im Folgenden zeigen, ob Hxt1 aufgrund des fehlenden Abbaus und daraus resultierendem verstärktem Vorkommen im ER ungerichtet die Plasmamembran erreichen kann und dort funktionell vorliegt. Aufgrund der Beobachtung, dass der Stamm THY.11 ein verändertes Wachstumsverhalten zeigt, wenn das *kanMX*-Gen entfernt wird (vgl. 3.4.1), wurde bei der *doa4*-Deletion nicht das *kanMX*-Markergen sondern die *HIS3MX*-Deletionskassette verwendet (2.19.2). Das Wachstumsverhalten der *doa4*-Deletionsmutante THY.50 (=THY.11 $\Delta doa4$) wurde im Vergleich zu den Stämmen JBY01 und THY.11 (= JBY01 $\Delta gsf2$) in 1% SCD-Medium nach der unter 2.20 beschriebenen Methode studiert (Abb. 19A). Die Wachstumsstudien zeigten, dass der *HXT1*-Einzelexpressionsstamm mit *gsf2*-Deletion nach der *doa4*-Deletion wieder auf 1% Glukose-haltigem Medium wachsen kann. Um die vermeintliche Lokalisation von Hxt1 an der Plasmamembran zu verifizieren, sollte im Anschluss Hxt1 in dem *doa4*-Deletionsstamm THY.50 nach einer Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation detektiert werden (Abb. 19B). Dazu wurden von den Stämmen JBY01, THY.11 und THY.50 Proteinextrakte (2.21) erstellt und die subzelluläre Lokalisation in einer Western-Blot-Analyse (2.24, 2.25, 2.26) bestimmt.

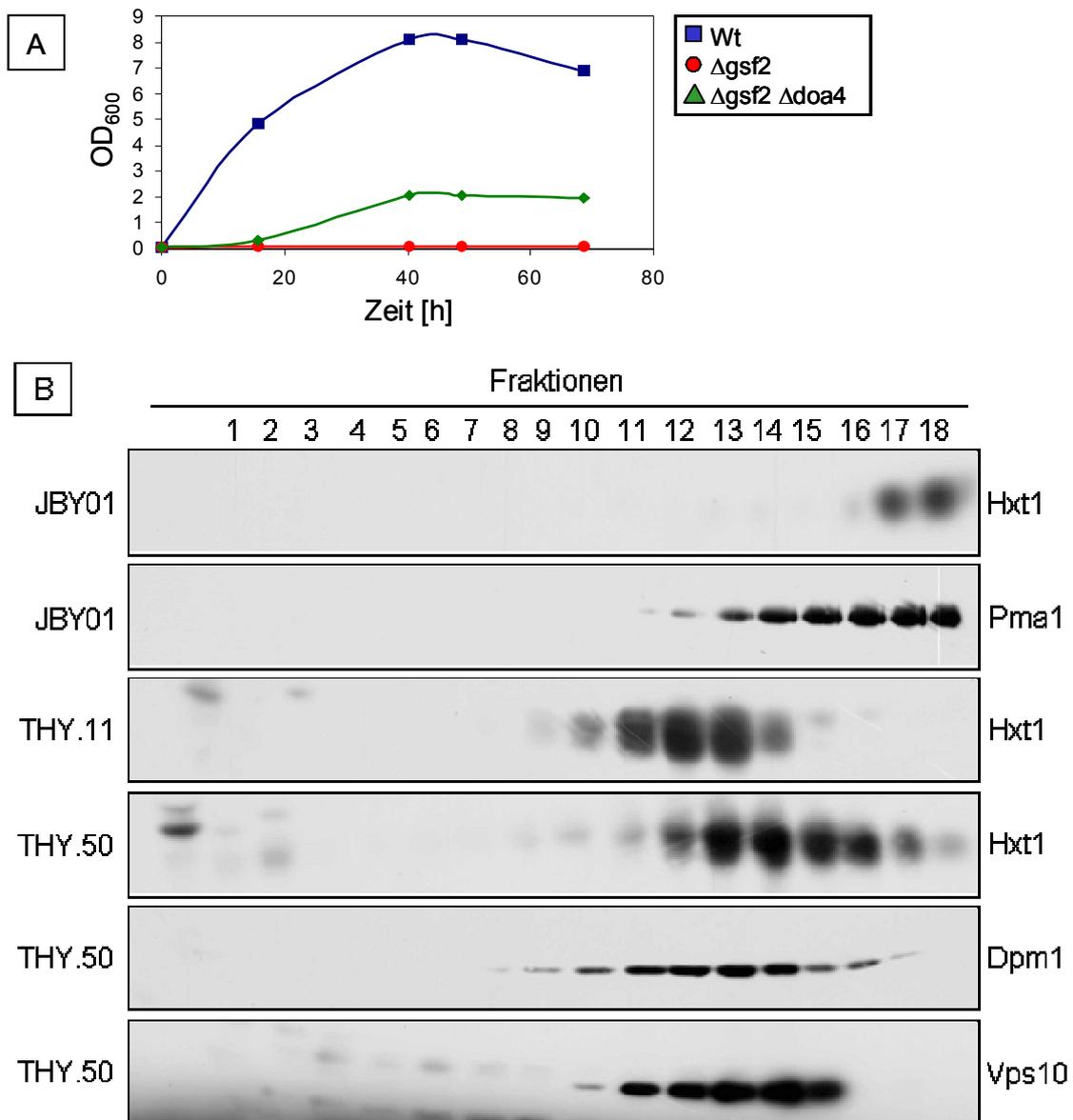


Abb. 19: **Einfluss einer *doa4*-Deletion auf Hxt1.** (A) Die Stämme JBY01 (Wt), THY.11 (Δ gsf2) und THY.50 (Δ gsf2 Δ doa4) wurden in synthetischem Komplettmedium (inklusive aller Aminosäuren und Nucleobasen) mit 1% Glukose (1% SCD) inkubiert und das Wachstumsverhalten studiert. (B) Die Stämme JBY01 (Wt), THY.11 (Δ gsf2) und THY.50 (Δ gsf2 Δ doa4) wurden in synthetischem Komplettmedium (inklusive aller Aminosäuren und Nucleobasen) mit 1% Maltose (1% SCM) herangezogen, die Proteinextrakte mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation fraktioniert (20-50% Saccharose, Fraktion 1 : geringste Dichte) und in Aliquots der jeweils 18 Fraktionen durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse die Verteilung von Hxt1 mit einem Hxt1-spezifischen Antikörper untersucht. Zusätzlich wurden verschiedene Zellkompartimente anhand der Detektion der Markerproteine Dpm1 (ER), Vps10 (Vakuole) und Pma1 (Plasmamembran) mit jeweils spezifischen Antikörpern detektiert.

Die *doa4*-Deletion hatte in dem *gsf2*-Deletionsstamm dazu geführt, dass Hxt1 nicht weiterhin komplett im ER zurückgehalten wird, sondern aufgrund des fehlenden Abbauweges zum Teil bis zur Plasmamembran transloziert wird. Diese erzwungene Translokation ermöglichte die Untersuchung der Funktionalität von Hxt1 in Abwesenheit von Gsf2: Hxt1 ist auch in Abwesenheit von Gsf2 funktionell. Ein Einfluss von Gsf2 auf die Modifikation oder Konformation von Hxt1 konnte somit ausgeschlossen werden.

3.4 Interaktionsstudien von Gsf2

Um die Funktion eines Proteins näher zu charakterisieren, können schon publizierte Proteininteraktionen häufig einen Ansatzpunkt für weitere Forschungen geben. Die Blueprint Initiative ist ein Forschungsprogramm des Samuel Lunenfeld Forschungsinstitutes des Mount Sinai Krankenhauses in Toronto, USA [<http://www.blueprint.org/bind/bind.php>]. Blueprint entwickelt und veröffentlicht biologische Datenbestände und Bioinformatik-Software-Tools. Bei BIND (Biomolecular Interaction Network Database) handelt es sich um eine Datenbank dieser Initiative, die molekulare Interaktionen, Komplexe und Signalwege beschreibt. Die in Tab. 13 aufgeführten Proteine wurden in dieser Datenbank als mögliche Interaktionspartner für Gsf2 gefunden.

Tab. 13: **Auflistung der bei BIND bekannten Interaktionspartner von Gsf2.** Dargestellt sind die Ergebnisse einer Internetrecherche bei der Datenbank BIND der Blueprint Initiative [<http://www.blueprint.org/bind/bind.php>]. Bei den ermittelten Interaktionen ist weiterhin aufgeführt, welche Methode zur Detektion der Interaktion verwendet wurde.

	identifizierte Proteine	Methode
Interaktion 4754	Gsf2 , Gtt1	Two-Hybrid
Interaktion 48285	Gim5, Gsf2	synthetische Lethalität
Interaktion 135032	Cse1, Gsf2	Cross-Linking
Interaktion 135933	Mlp1, Gsf2	Cross-Linking
Interaktion 135933	Nup116, Gsf2	Cross-Linking

Im Folgenden wurde die Funktion und die Lokalisierung der Interaktionspartner von Gsf2 studiert, um die Wahrscheinlichkeit einer *in vivo* Interaktion mit Gsf2 abschätzen zu können (Tab. 14).

Tab. 14: **Auflistung der Proteinfunktionen und der Lokalisierung in der Zelle.** Dargestellt sind die Ergebnisse einer Internetrecherche bei der „*Saccharomyces genome database*“ (SGD) [<http://www.yeastgenome.org/>].

Protein	Funktion	Lokalisierung in der Zelle
Gtt1	Glutathion-S-Transferase	ER
Gim5	Prefoldin Untereinheit 5	Cytoplasma
Cse1	Importin α Export-Rezeptor	Kernmembran
Mlp1	Protein-Kern-Import	Kernmembran, Kernplasma
Nup116	Untereinheit des Kern-Pore-Komplexes (NPC)	Kernpore

3.4.1 Einfluss der Glutathion-S-Transferase Gtt1 auf Gsf2

Bei der Suche nach publizierten Interaktionspartnern von Gsf2 fiel die Interaktion mit einem weiteren ER-Protein, der Glutathion-S-Transferase Gtt1, auf. Glutathion-S-Transferasen gehören zu der Gruppe der detoxifizierenden Enzyme und spielen bei der Drogenresistenz eine entscheidende Rolle. Die zelluläre Detoxifikation von Xenobiotika verläuft in 3 Schritten: Zunächst wird das Toxin durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse aktiviert, um so eine funktionelle Gruppe zu generieren. Die Glutathiontransferase belädt im Anschluss diese funktionelle Gruppe mit Glutathion, und im dritten Schritt wird das Glutathion-Konjugat über einen ABC-Transporter in die Vakuole geschleust (Choi *et al.*, 1998). In *S. cerevisiae* wurden durch Choi *et al.* (1998) zwei Glutathion-S-Transferasen identifiziert: Gtt1 und Gtt2

Das Glutathion-S-Transferase-Gen *GTT1* wurde in den Vektor p426HXT7-6HIS kloniert, um den Einfluss einer Überexpression auf Gsf2 zu untersuchen. Die Klonierung erfolgte nach der unter 2.17 beschriebenen Methode. Der *GTT1*-ORF wurde mittels der Oligonukleotide fp4GTT1 und rp4GTT1 aus chromosomaler DNA (2.7.3) amplifiziert und über homologe Rekombination in den durch Restriktion geöffneten Vektor p426HXT7-6HIS^{EcoRI, BamHI} kloniert. Das durch Restriktionsanalyse überprüfte Plasmid **p426GTT1** und der Vektor p426HXT7-6HIS wurden in die *HXT1*-Einzelexpressionsstämme JBY01 und THY.11 transformiert und das Wachstumsverhalten in Flüssigmedium nach der unter 2.20 beschriebenen Methode untersucht. Abb. 20A zeigt, dass die Überexpression von *GTT1* keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten hatte. Der Stamm THY.11 zeigte aufgrund der Deletion von *GSF2* in beiden Fällen ein stark verlangsamtes Wachstum mit 2% Glukose.

Ebenso wie die Überexpression kann auch die Deletion von Genen Aufschluss darüber geben, ob die zu untersuchenden Gene genetisch miteinander interagieren. Aus diesem Grund wurde das *GTT1*-Gen in den *HXT1*-Einzelexpressionsstämmen deletiert. Der Stamm **THY.11** besaß allerdings noch das *kanMX*-Gen aus der vorherigen Deletion (des *GSF2*-Gens), so dass das *kanMX*-Gen zuvor mittels der Cre-Rekombinase entfernt werden und dies mittels PCR mit den Oligonukleotiden A1-GSF2 und A4-GSF2 verifiziert werden musste (2.19.1). Der *kanMX*-freie Stamm erhielt die Bezeichnung **THY.19**. Die Deletion des *GTT1*-Gens in den Stämmen **JBY01** und **THY.19** erfolgte unter Verwendung der Oligonukleotide S1-GTT1 und S2-GTT1 nach der unter 2.19.1 beschriebenen Methode und die Verifikationen wurden mittels der Oligonukleotide A1-GTT1 und A4-GTT1 durchgeführt. Das Wachstumsverhalten der $\Delta gtt1$ -Mutationsstämmen **THY.20** (=JBY01 $\Delta gtt1$) und **THY.21** (=THY.19 $\Delta gtt1$) wurde im Vergleich zu den isogenen Wildtypstämmen in Flüssigkultur nach der unter 2.20 beschriebenen Methode untersucht.

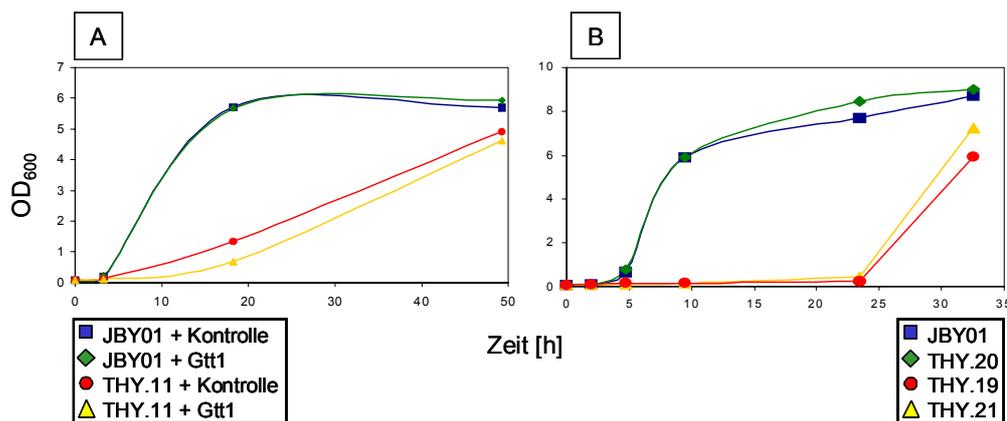


Abb. 20: Einfluss der *GTT1*-Überexpression und der *gtt1*-Deletion auf das Wachstum.

(A) Die Stämme **JBY01** und **THY.11** (=JBY01 $\Delta gsf2$) wurden mit dem Plasmid p426GTT1 (**Gtt1**) und dem Leervektor p426HXT7-6HIS (**Kontrolle**) transformiert und die Wachstumsuntersuchungen in Selektivmedium ohne Uracil mit 2% Glukose durchgeführt. (B) Die Wachstumsuntersuchungen der *HXT1*-Einzelexpressionsstämmen **JBY01**, **THY.20** (=JBY01 $\Delta gtt1$), **THY.19** (=JBY01 $\Delta gsf2$) und **THY.21** (=THY.19 $\Delta gtt1$) wurden in synthetischem Komplettmedium (inklusive aller Aminosäuren und Nukleobasen) mit 1% Glukose (1% SCD) durchgeführt.

Abb. 20B zeigt, dass durch die Deletion von *GTT1* das Wachstumsverhalten der Stämme nicht verändert wurde: Die Stämme **THY.20** und **JBY01** zeigen ein identisches Wachstumsverhalten, und auch der Stamm **THY.21** wächst wie der Stamm **THY.19**. Unerwartet war allerdings, dass die Stämme **THY.19** und **THY.21** auf Medium mit 1% Glukose nach 20-25h Wachstum zeigten (vgl. Abb. 14). Die Stämme **THY.11** und **THY.19** unterscheiden sich nur darin, dass die Deletionsmarke *kanMX* in dem Stamm **THY.19** entfernt wurde, während sie in dem Stamm

THY.11 als Deletionskassette von $\Delta gsf2$ noch vorhanden ist. Und der Stamm THY.11 zeigte bei vorherigen Wachstumstests auch nach über 30h kein Wachstum auf 1% Glukose.

Es lag die Vermutung nahe, dass die An- bzw. Abwesenheit des *kanMX*-Gens auf genomischer Ebene zu einer Veränderung führte, die einen Einfluss auf die Lokalisierung von Hxt1 und somit auf das Wachstumsverhalten der *HXT1*-Einzel-expressionsstämme auf Glukose-haltigem Medium hatte. Aus diesem Grund wurde zunächst die genomische Nachbarschaft von *GSF2* untersucht.

3.4.2 Einfluss auf die *RSE1*-Expression

Mit Hilfe der „*Saccharomyces genome database*“ (SGD) [<http://www.yeastgenome.org/>] konnten die Gene in der Nähe von *GSF2* identifiziert werden (Abb. 21A). In direkter Nachbarschaft von *GSF2* auf Chromosom VIII liegt das Gen *RSE1*: *GSF2* ist auf dem Watson-Strang kodiert, während das *RSE1*-Gen auf dem Crick-Strang lokalisiert ist. Die Distanz zwischen den beiden Start-Codons beträgt nur 120 Nukleotide.

Um zu überprüfen, ob das unterschiedliche Wachstumsverhalten der Stämme THY.11 und THY.19 von einer veränderten Transkriptionsaktivität des *RSE1*-Gens bei An- und Abwesenheit des *kanMX*-Gens herrührt, sollte der Wachstumsphänotyp bei Überexpression von *RSE1* untersucht werden. Die Klonierung des Überexpressionsplasmids erfolgte nach der unter 2.17 beschriebenen Methode. Der *RSE1*-ORF wurde mittels der Oligonukleotide fp4RSE1 und rp4RSE1 aus chromosomaler DNA (2.7.3) amplifiziert und über homologe Rekombination in den durch Restriktion geöffneten Vektor p425HXT7-6HIS^{HindIII, BamHI} kloniert. Das durch Restriktionsanalyse und durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden HXT7SEQ und CYC1SEQ überprüfte Plasmid wurde mit **p425RSE1** bezeichnet. Zusätzlich wurden noch weitere Plasmide kloniert: Die DNA-Sequenzen, die anstelle des *GSF2*-ORFs im Genom der Stämme THY.11 ($\Delta gsf2::loxP$ -*kanMX*) und THY.19 ($\Delta gsf2::loxP$) enthalten sind, sowie die *GSF2*-Gensequenz, wurden mittels der Oligonukleotide fp4GSF2 und rp4GSF2 aus ganzen Zellen bzw. aus chromosomaler DNA (2.7.3) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden über homologe Rekombination in den durch Restriktion geöffneten Vektor p425HXT7-6HIS^{HindIII, BamHI} und im Falle der Wildtyp-*GSF2*-Sequenz auch in den Vektor p426HXT7-6HIS^{EcoRI, BamHI} kloniert. Die Plasmide **p425 $\Delta gsf2::loxP$ -*kanMX*** und **p425 $\Delta gsf2::loxP$** wurden mittels Restriktionsanalyse überprüft. Die Plasmide **p425GSF2** und **p426GSF2** wurden zusätzlich zur Restriktionsanalyse auf Funktionalität durch Wachstumstests im Stamm THY.11 (nicht dargestellt) und durch Sequenzierung (mit den Oligonukleotiden HXT7SEQ und CYC1SEQ) überprüft.

Die Plasmide p425GSF2, p425RSE1, p425 Δ gsf2::loxP-kanMX und p425 Δ gsf2::loxP und der Kontrollvektor p425HXT7-6HIS wurden in den *HXT1*-Einzelexpressionstamm THY.11 transformiert und das Wachstumsverhalten in Flüssigmedium nach der unter 2.20 beschriebenen Methode untersucht.

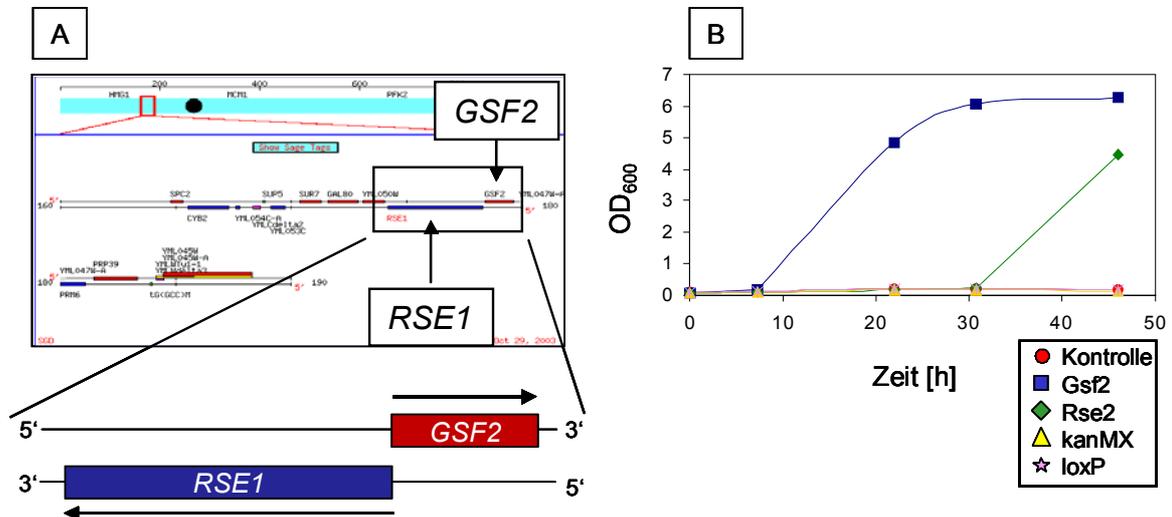


Abb. 21: **Einfluss von RSE1.** (A) Die Identifikation der genomischen Nachbarschaft von *GSF2* erfolgte mit Hilfe der „*Saccharomyces genome database*“ (SGD) [<http://www.yeastgenome.org/>]. (B) Der *HXT1*-Einzelexpressionsstamm THY.11 (=JBY01 Δ gsf2) wurde mit den Plasmiden p425GSF2 (**Gsf2**), p425RSE1 (**Rse1**), p425 Δ gsf2::loxP-kanMX (**kanMX**), p425 Δ gsf2::loxP (**loxP**) und dem Leervektor p425HXT7-6HIS (**Kontrolle**) transformiert und die Wachstumsuntersuchungen in Selektivmedium ohne Leucin mit 1% Glukose durchgeführt.

Die Überexpression von *RSE1* führte nach ca. 30h zu Wachstum (Abb. 21B). Das verzögerte Wachstum mit einer extrem verlängerten lag-Phase (Anlaufphase) war vergleichbar mit dem beobachteten Wachstumsphänotyp nach Entfernung des *kanMX*-Gens in den Stämmen THY.19 und THY.21 (vgl. Abb. 20). Es bestand somit ein Zusammenhang zwischen dem verzögerten Wachstum der Stämme THY.19 und THY.21, der Entfernung des *kanMX*-Gens und der Überexpression von *RSE1*.

Rse1 spielt eine Rolle beim Splicing der prä-mRNA in der Hefezelle. Es ist ein Protein, das mit dem kleinen nukleären RNA-Proteinkomplex (snRNP) U2 assoziiert ist (Caspary *et al.*, 1999; Gottschalk *et al.*, 1999). Chen *et al.* (1998) identifizierten Rse1 bei einem Screen von Temperatur-sensitiven Mutanten, die einen Defekt im ER-Golgi-Transport zeigten. Es stellte sich heraus, dass der Sekretionsdefekt nur indirekt auf die Temperatur-sensitive *rse1*-Mutante zurückzuführen war: Rse1 wird in der Hefezelle benötigt, um das GTP-Bindeprotein Sar1 korrekt zu splicen. Die Mutation in *rse1* führte dazu, dass Sar1 nicht gesplacet wurde und somit nicht seine Aufgabe bei der COPII-Vesikel-Formation im ER er-

füllen konnte. Chen *et al.* (1998) konnten zeigen, dass bei Überexpression von *SAR1* oder durch die Entfernung des Introns in der genomischen Version von *SAR1* der Sekretionsdefekt auch bei Anwesenheit einer mutierten Form von *rse1* aufgehoben werden konnte.

3.4.3 Überexpression des GTP-Bindeproteins Sar1

Aufgrund der Beobachtungen von Chen *et al.* (1998), dass Rse1 für das Splicing der *SAR1* prä-mRNA notwendig ist, lag die Vermutung nahe, dass eine Überexpression von *SAR1* den gleichen Wachstumseffekt wie die Überexpression von *RSE1* zeigen könnte. *SAR1* kodiert für ein GTP-Bindeprotein und ist in den Proteintransport vom ER zum Golgi-Apparat involviert (Nakano und Muramatsu, 1989; vgl. 1.2.4). Durch die Überexpression von *RSE1* könnte es in der Zelle zu einem erhöhten Level an Sar1 kommen, was wiederum zu einer vermehrten Bildung von COPII-Vesikeln führen könnte. Die aufgrund der *gsf2*-Deletion im ER zurückgehaltenen Hxt1-Moleküle könnten unbeabsichtigt in die COPII-Vesikel verpackt werden und zur Plasmamembran transportiert werden.

Zur Überprüfung dieser Vermutung sollte das *SAR1*-Gen inklusive und exklusive Intron in den Überexpressionsvektor p426HXT7-6HIS nach der unter 2.17 beschriebenen Methode kloniert werden. Für das Plasmid inklusive Intron (p426SAR1) wurde mittels der Oligonukleotide fp4SAR1 und rp4SAR1 die Sequenz von *SAR1* aus chromosomaler DNA (2.7.3) amplifiziert. Bei dem Intron-freien Plasmid (p426SAR1^{Δi}) wurden die Oligonukleotide fp4SAR1 und rinSAR1 zur Amplifikation der Sequenz aufwärts des Introns (*SAR1*^{1-28bp}) und die Oligonukleotide finSAR1 und rp4SAR1 zur Amplifikation der Sequenz abwärts des Introns (*SAR1*^{168-712bp}) verwendet. Die Oligonukleotide rinSAR1 und finSAR1 enthielten homologe Sequenzbereiche, so dass neben den homologen Rekombinationen mit dem Vektor auch eine homologe Rekombination zwischen den beiden PCR-Produkten stattfinden konnte. Bei beiden Klonierungen wurde das PCR-Produkt bzw. die PCR-Produkte in den durch Restriktion geöffneten Vektor p426HXT7-6HIS^{EcoRI, BamHI} kloniert. Beide Plasmide **p426SAR1** und **p426SAR1^{Δi}** wurden durch Restriktionsanalyse und mittels Sequenzierung mit den Oligonukleotiden HXT7SEQ und CYC1SEQ überprüft. Die Plasmide p426SAR1 und p426SAR1^{Δi} sowie die Kontrollplasmide p426GSF2 und p426HXT7-6HIS wurden in den *HXT1*-Einzelexpressionstamm THY.11 transformiert und das Wachstumsverhalten in Flüssigmedium nach der unter 2.20 beschriebenen Methode untersucht.

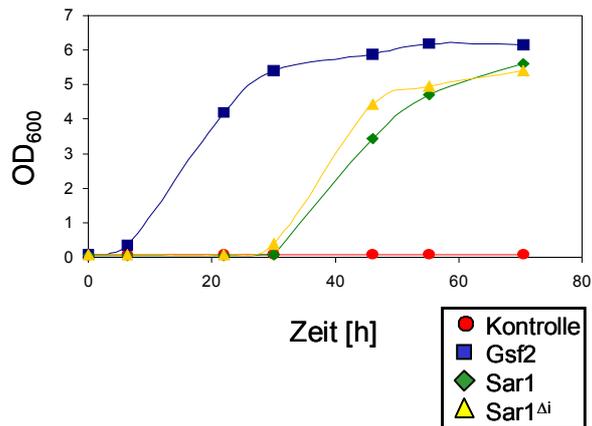


Abb. 22: **Einfluss der SAR1-Überexpression auf das Wachstum.** Der *HXT1*-Einzelexpressionsstamm THY.11 (=JBY01 $\Delta gsf2$) wurde mit den Plasmiden p426GSF2 (**Gsf2**), p426SAR1 (**Sar1**), p426SAR1^{Δi} (**Sar1^{Δi}**) und dem Leervektor p426HXT7-6HIS (**Kontrolle**) transformiert und die Wachstumsuntersuchungen in Selektivmedium ohne Uracil mit 1% Glukose durchgeführt.

Abb. 22 zeigt, dass der *HXT1*-Einzelexpressionsstamm THY.11 durch Überexpression von *SAR1* nach einer verlängerten lag-Phase von ca. 30h auf 1% Glukose-haltigem Medium wachsen konnte. Das zu beobachtende Wachstum war vergleichbar mit dem Wachstumsverhalten des Stammes bei Überexpression von *RSE1*. Auffallend war allerdings, dass kein Wachstumsunterschied bei An- oder Abwesenheit des Introns von *SAR1* beobachtet werden konnte. Erwartet wurde, dass bei Überexpression der Intron-freien *SAR1*-Sequenz im Vergleich zur Intronhaltigen Version mehr COPII-Vesikel gebildet würden und somit Hxt1 eher zur Plasmamembran gelangen könnte. Eventuell führt allerdings alleine die Überexpression von *SAR1* inklusive Intron schon dazu, dasss mehr *SAR1* prä-mRNA gesplitt wird, somit mehr Sar1 in der Zelle vorliegt und vermehrt COPII-Vesikel gebildet werden.

3.4.4 Überexpression von *SEC12*, *SEC16*, *SEC23*, *SEC24*

Nakano und Muramatsu (1989) identifizierten *SAR1* als Multicopy-Suppressor einer Temperatur-sensitiven *sec12*-Mutante. Neben dem GTP-Bindeprotein Sar1 und dem Guanine-Nukleotid-Austauschfaktor Sec12 (Barlowe und Shekman, 1993) spielen noch weitere Proteine bei der Formation der COPII-Vesikel eine wichtige Rolle: der Sec23/24-Komplex, der Sec13/31-Komplex sowie Sec16 (Matsuoka *et al.*, 2001; Espenshade *et al.*, 1995; vgl. 1.2.4). Um zu überprüfen, ob es sich bei den Genen *SEC12*, *SEC16*, *SEC23* und *SEC24* ebenfalls um Multicopy-Suppressoren von *GSF2* handelt, wurden die Gene mittels der Oligonukleotidpaare fp4SEC12/rp4SEC12, fp4SEC16/rp4SEC16, fp4SEC23/rp4SEC23 und fp4SEC24/rp4SEC24 aus chromosomaler DNA (2.7.3) amplifiziert und nach der unter 2.17 beschriebenen Methode in die durch Restriktion geöffneten Über-

expressionsplasmide p423HXT7-6HIS^{EcoRI,EcoRV}, p424HXT7-6HIS^{EcoRI,BamHI}, p426HXT7-6HIS^{EcoRI,BamHI} und p425HXT7-6HIS^{HindIII,BamHI} kloniert. Die Plasmide **p423SEC12**, **p424SEC16**, **p425SEC24** und **p426SEC23** wurden durch Restriktionsanalyse und mittels Sequenzierung mit den Oligonukleotiden HXT7SEQ und CYC1SEQ überprüft. Die vier Plasmide wurden in den *HXT1*-Einzelexpressionstamm THY.11 (Δ *gsf2*) transformiert und das Wachstumsverhalten in Flüssigmedium nach der unter 2.20 beschriebenen Methode untersucht: Keine der Transformanten zeigte in Selektivmedium mit 1% Glukose Wachstum (Daten nicht gezeigt).

Somit führte die Überexpression der verschiedenen COPII-Komponenten *SEC12*, *SEC16*, *SEC23* und *SEC24* nicht zu einer Translokation von Hxt1 zur Plasmamembran. Auch eine Ko-Transformation der beiden Plasmide p425SEC24 und p426SEC23 oder aller vier Plasmide p423SEC12, p424SEC16, p425SEC24 und p426SEC23 führte nicht dazu, dass der *HXT1*-Einzelexpressionsstamm THY.11 (Δ *gsf2*) auf 1%igem Glukose-haltigem Medium wachsen konnte.

3.4.5 Genetische Interaktion mit Temperatur-sensitiven *sec*-Mutanten

Obwohl nach Überexpression der *SEC*-Gene kein Wachstumseffekt auf den *gsf2*-Deletionsstamm zu beobachten war (vgl. 3.4.4), sollte eine mögliche genetische Interaktion von *GSF2* mit verschiedenen Temperatur-sensitiven *sec*-Mutanten überprüft werden (freundlicherweise von P. Ljungdahl zur Verfügung gestellt).

Tab. 15: **Verwendete Temperatur-sensitive *sec*-Stämme.** Aufgelistet sind die jeweils mutierten *sec*-Gene (Wt=Wildtyp), die Stammbezeichnungen der *GSF2*-Wildtypstämme und die Bezeichnungen der isogenen *gsf2*-Deletionsstämme.

Temperatur-sensitives Gen	<i>GSF2</i> -Wildtypstamm	isogener Δ <i>gsf2</i> -Stamm
Wt	PLY519	THY.39
<i>sec12-1</i>	MAS26-1A	THY.40
<i>sec13-1</i>	PLY527	THY.43
<i>sec13-4</i>	MAS242-7B	THY.44
<i>sec16-2</i>	MAS296-1A	THY.45
<i>sec18-1</i>	MAS21-1C	THY.46
<i>sec23-1</i>	MAS226-3C	THY.47
<i>sec62-1</i>	MAS297-2B	THY.48

Dazu wurde das Wachstumsverhalten nach Deletion und Überexpression von *GSF2* studiert. Bei den in Tab. 15 aufgeführten *sec*-Stämmen wurde das *GSF2*-Gen nach der unter 2.19.1 aufgeführten Methode deletiert. Die *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette wurde mittels der Oligonukleotide S1-*GSF2* und S2-*GSF2* amplifiziert, und die Verifikation der Deletion erfolgte mit den Oligonukleotiden A1-*GSF2* und A4-*GSF2*.

Zur Überexpression wurden die parentalen Stämme mit dem Plasmid p426*GSF2* transformiert. Zusätzlich wurden die parentalen und die *gsf2*-Deletionsstämme mit dem Vektor p426HXT7-6HIS transformiert. Somit konnten alle Wachstumsuntersuchungen auf Selektivmedium ohne Uracil mit 1% Glukose durchgeführt werden. Die Transformanten wurden in $1/10$ -Verdünnungen von einer $OD_{600nm}=1,0$ bis $OD_{600nm}=0,1 \cdot 10^{-3}$ auf Mediumsplatten getropft und bei den jeweils angegebenen Temperaturen inkubiert.

Tab. 16: **Genetische Interaktion von *GSF2* mit verschiedenen Temperatur-sensitiven *sec*-Mutanten.** Aufgelistet sind die betroffenen *sec*-Gene (Wt=Wildtyp), das Wachstumsverhalten der *gsf2*-Deletion, des Wildtyps und der *GSF2*-Überexpression sowie die Inkubationstemperaturen. Bezeichnungen: +++ = schnelles Wachstum, ++ = leicht verlangsamtes Wachstum, + = deutlich verlangsamtes Wachstum, - = kein Wachstum.

Temperatur-sensitives Gen	<i>gsf2</i> -Deletion	Wildtyp	<i>GSF2</i> -Überexpression	Inkubationstemperaturen
Wt	+++	+++	++	25°C
	+++	+++	++	37°C
<i>sec12-1</i>	+++	+++	++	25°C
	+	-	-	37°C
<i>sec13-1</i>	+++	+++	++	25°C
	+++	+++	++	30°C
<i>sec13-4</i>	+++	+++	++	25°C
	+++	++	-	42°C
<i>sec16-2</i>	+++	+++	++	25°C
	-	-	-	37°C
<i>sec18-1</i>	+++	+++	++	25°C
	++	+	-	30°C
<i>sec23-1</i>	+++	+++	++	25°C
	+++	++	+	30°C
<i>sec62-1</i>	+++	+++	+++	25°C
	+	-	-	37°C

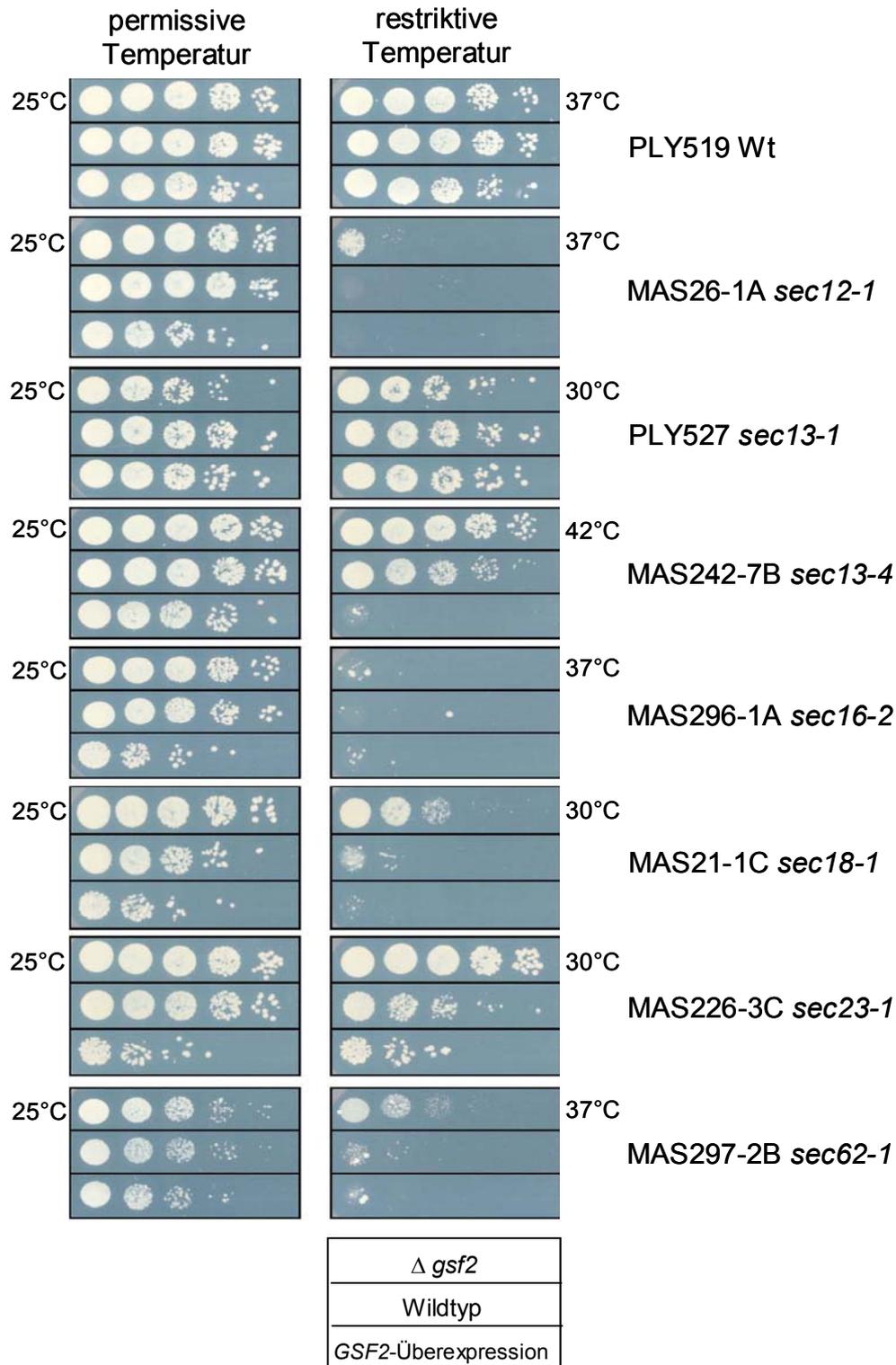


Abb. 23: **Genetische Interaktion von *GSF2* mit verschiedenen Temperatur-sensitiven *sec*-Mutanten.** Dargestellt sind die Tropftests der verschiedenen *sec*-Stämme mit *gsf2*-Deletion, Wildtypsituation und *GSF2*-Überexpression. Die Transformanten wurden von einer $OD_{600nm}=1,0-0,0001$ in $1/_{10}$ -Verdünnungen auf eine Selektivmediumsplatte ohne Uracil mit 1% Glukose getropft und bei den jeweils angegebenen Temperaturen inkubiert (permissive Temperatur = 25°C; restriktive Temperatur = verschieden).

In Abb. 23 sind die Tropftests dargestellt: Die Mehrzahl der getesteten *sec*-Mutanten ließ auf eine genetische Interaktion des jeweiligen *SEC*-Gens mit *GSF2* schließen. Nur der Wildtypstamm, der *sec13-1* und der *sec16-2*-Stamm zeigten keine Veränderung im Wachstumsverhalten bei An- und Abwesenheit von Gsf2. Im Gegensatz zu dem *sec13-1*-Stamm zeigte der Tropftest allerdings einen deutlichen Effekt bei der *GSF2*-Überexpression im *sec13-4*-Stamm. Somit war davon auszugehen, dass bei den gewählten Temperaturen der Effekt einer *GSF2*-Überexpression im *sec13-4*-Stamm deutlicher zur Geltung kam als im *sec13-1*-Stamm. Auffällig war, dass die Überexpression von *GSF2* auch schon bei der permissiven Temperatur (25°C) einen negativen Wachstumseffekt hatte. Die Tropftests besagten, dass *GSF2* genetisch sowohl mit Genen interagiert, die eine Rolle bei der Bildung der COPII-Vesikel spielen (wie *SEC12*, *SEC13* und *SEC23*), aber auch mit Genen, die im Sekretionsweg wichtig sind (wie *SEC18* und *SEC62*). *Sec18* spielt eine entscheidende Rolle bei der Membranfusion der Vesikel mit der Golgi-Membran (Barlowe, 1997). Bei *Sec62* handelt es sich um ein Komponente der post-translationalen Translokations-Maschinerie (Wittke *et al.*, 2000). Da die genetischen Interaktionspartner von *GSF2* unterschiedliche Aufgaben im Sekretionsweg haben, konnte mit Hilfe der genetischen Interaktionsstudien *Gsf2* keine konkrete Aufgabe in der Zelle zugewiesen werden.

3.4.6 Split-Ubiquitin System (SUS)

Das Split-Ubiquitin System (SUS) (Johnsson und Varshavsky, 1994a; 1994b; Varshavsky, 1997; Stagljar *et al.*, 1998) wurde verwendet, um Interaktionen von Membranproteinen bzw. von einem Membranprotein und einem löslichen Protein nachzuweisen. Im Gegensatz zum Two-Hybrid System wird bei dieser Methode der Nachweis einer Interaktion nicht über Proteindomänen sondern mit vollständigen Proteinen durchgeführt, die sich zudem noch an ihrem Wirkort in der Hefezelle befinden können. Das Ubiquitin-Protein ist ein konserviertes Protein aus 76 Aminosäuren, das in der Zelle als Abbausignal an Proteine fusioniert wird. Ubiquitinierte Proteine werden bei korrekter Konformation des Ubiquitin-Proteins unmittelbar nach der Fusion von den Ubiquitin-spezifischen Proteasen (UBPs) erkannt und hinter der letzten Aminosäure des Ubiquitins an der Ubiquitin-Polypeptid-Verbindung gespalten. Bei dem Split-Ubiquitin System wird ein zu untersuchendes Protein an den N- oder den C-Terminus der **N**-terminalen Hälfte des **Ubiquitin**-Proteins (AS 1-37), genannt **Nub**, fusioniert, und das zweite zu untersuchende Protein fusioniert man an den N-Terminus der **C**-terminalen Hälfte des **Ubiquitin**-Proteins, genannt **Cub** (AS 35-76). An den C-Terminus des **Cub**-Proteins ist zusätzlich ein Reporterprotein fusioniert, das sich aus dem **P**roteinA, der DNA-Bindedomäne **LexA** und dem Transkriptionsaktivator **VP16** zusammen-

setzt. (**CubPLV**). Bei einer Koexpression zweier Fusionsproteine reassoziieren Nub und CubPLV und es erfolgt eine Abspaltung des Reporters PLV durch die Ubiquitin-spezifischen Proteasen (Abb. 24). Das PLV gelangt in den Zellkern und kann dort z.B. *lacZ*-, *HIS3*- oder *ADE2*-Reportergene aktivieren. Die Interaktion kann mit Hilfe von Messungen der β -Galaktosidaseaktivität (2.33.1, 2.33.2) oder durch Wachstumstests auf Medium ohne Histidin und Adenin nachgewiesen werden. Die Effizienz der Reassoziaton der beiden Ubiquitinhälften Nub und Cub kann herabgesetzt werden, wenn anstelle des nativen Nub eine mutierte Version eingesetzt wird. Eine mögliche Mutation ist der Aminosäureaustausch Ile¹³→Gly¹³ (NubWT→NubG). Fusioniert man nun zwei Proteine, die miteinander interagieren, an Cub und an NubG, so erhöht sich die lokale Konzentration der Cub- und NubG-Fusionsproteine, die Reassoziaton zu einem Ubiquitin-Protein wird gefördert, der PLV-Reporter wird abgespalten und aktiviert im Kern vorhandene Reportergene.

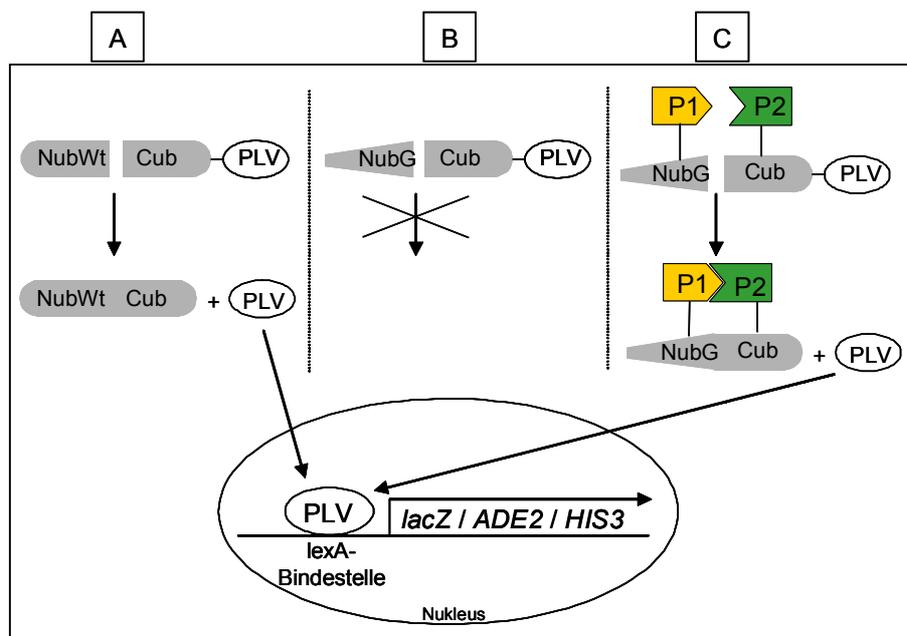


Abb. 24: **Schematische Darstellung des Split-Ubiquitin Systems.** (A) Bei einer Koexpression von NubWt und CubPLV reassoziieren die beiden Hälften und bilden ein vollständiges Ubiquitin. Das Reporterprotein PLV wird durch die Ubiquitin-spezifischen Proteasen abgespalten und gelangt in den Nucleus. (B) Die Reassoziaton der beiden Ubiquitinhälften kann durch eine Mutation des Nub an Position 13 (Ile¹³→Gly¹³) (NubG) verhindert werden, so dass die beiden Hälften nicht reassoziieren und das Reporterprotein PLV nicht abgetrennt wird. (C) Bei einer Fusion eines Proteins P1 an NubG und eines Proteins P2 an CubPLV reassoziieren die beiden Ubiquitinhälften wenn P1 und P2 miteinander interagieren. Das Reporterprotein PLV wird abgespalten, gelangt in den Nucleus und bindet an die *lexA*-Bindestellen im Promotor. Dies führt zur Aktivierung der Transkription der *lacZ*-, *ADE2*- und *HIS3*-Reportergene.

Um das Split-Ubiquitin System zu nutzen, wurden zunächst neue Stämme konstruiert. Ziel war die Konstruktion zweier Stämme, die sich zum einen in ihrem

Paarungstyp unterscheiden, um die Koexpression der zu untersuchenden Proteine mittels Paarung durchführen zu können, und die zum anderen verschiedene Reportergene, wie *lacZ*-, *HIS3*- oder *ADE2*-Reportergene, unter Kontrolle des *lexA*-Proteins besitzen. Dadurch könnten die Interaktionen mittels β -Galaktosidaseaktivitäts-Messungen (2.33.1, 2.33.2) oder durch einfache Wachstumstests auf Medium ohne Histidin und Adenin nachgewiesen werden. Die Konstruktion des Stammes **THY.AP4** erfolgte nach der unter 2.30.1.1 beschriebenen Methode und resultierte in einem *lexA*-kontrollierten *lacZ*-Gen und in *lexA*-kontrollierten *HIS3*- und *ADE2*-Auxotrophien. Als Paarungsstamm sollte der Stamm **THY.AP5** dienen, dem wie unter 2.30.1.2 beschrieben das *ADE2*-Gen deletiert wurde. Nach Konstruktion beider Stämme THY.AP4 und THY.AP5 wurden die Paarungstypen nach der unter 2.32 beschriebenen Methode verifiziert.

Neben den neuen Stämmen sollten für das Split-Ubiquitin System auch neue Vektoren konstruiert werden. Ziel waren ein neuer CubPLV-Vektor, ein NubG-Vektor für N-terminale Fusionen und ein NubG-Vektor für C-terminale Fusionen. Alle drei Vektoren sollten identische Sequenzbereiche enthalten, damit ein einziges PCR-Produkt mittels *in vivo*-Rekombination in alle drei Vektoren kloniert werden konnte. In die Vektoren wurden identische Linker-Sequenzen eingefügt, so dass diese Linker-Sequenzen bei der homologen Rekombination zur Klonierung genutzt werden können. Es wurden Alanin- und Prolin-reiche Linker-Sequenzen und zusätzlich das *kanMX*-Gen, das bei den *in vivo*-Rekombinationen als Gegenselektionsmarker dienen sollte, in die Vektoren kloniert. Der Austausch eines Gens gegen das *kanMX*-Gen bei der homologen Rekombination sollte aufgrund der entstehenden Geneticin-Sensitivität überprüft werden. Die Konstruktion der Vektoren **pFGY1p-kanMX-CubPLV**, **pADH1p-NubG-kanMX** und **pADH1p-kanMX-NubG** erfolgte nach der unter 2.30.2 beschriebenen Methode.

Um die Interaktion verschiedener Hexosetransporter und der Glutathion-Transferase Gtt1 mit Gsf2 zu untersuchen, wurden die Gene über *in vivo*-Rekombination in die neu konstruierten Vektoren wie unter 2.30.3 beschrieben kloniert. Die homologe Rekombination zur Klonierung der Plasmide **pHXT1-CubPLV**, **pHXT2-CubPLV**, **pHXT3-CubPLV**, **pHXT7-CubPLV**, **pNubG-HXT1**, **pNubG-HXT2**, **pNubG-HXT3**, **pNubG-HXT7**, **pHXT1-NubG**, **pHXT2-NubG**, **pHXT3-NubG**, **pHXT7-NubG** wurde in dem *hxt*-Nullstamm EBY.VW4000 durchgeführt. Somit konnte im Anschluss an die Klonierung die Funktionalität der Konstrukte überprüft werden. Dazu wurden die Transformanten auf Selektivmedium ohne Leucin bzw. Tryptophan mit 2% Glukose inkubiert und das Wachstumsverhalten studiert (Tab. 17). Die homologe Rekombination zur Klonierung der Plasmide **pGSF2-CubPLV**, **pNubG-GSF2**, **pNubG-GSF2^{STOP}** und

pGSF2-NubG erfolgte in dem Stamm THY.11 (=JBY01 $\Delta gsf2$). Der Funktionalitätstest dieser Konstrukte erfolgte durch Wachstumsuntersuchungen der Transformanten auf Selektivmedium ohne Leucin bzw. Tryptophan mit 1% Glukose. Die Funktionalität der Konstrukte **pGTT1-CubPLV**, **pNubG-GTT1** und **pGTT1-NubG** konnte nicht überprüft werden.

Tab. 17: **Funktionalitätsuntersuchung der Split-Ubiquitin Konstrukte.** Die Plasmide pHXT1-CubPLV, pHXT2-CubPLV, pHXT3-CubPLV, pHXT7-CubPLV, pNubG-HXT1, pNubG-HXT2, pNubG-HXT3, pNubG-HXT7, pHXT1-NubG, pHXT2-NubG, pHXT3-NubG, pHXT7-NubG wurden in dem Stamm *hxt*-Nullstamm EBY.VW4000 auf Funktionalität untersucht. Das Wachstumsverhalten der Transformanten wurde auf Selektivmediumsplatten ohne Leucin bzw. Tryptophan mit 2% Glukose überprüft. Die Plasmide pGSF2-CubPLV, pNubG-GSF2, pNubG-GSF2^{STOP} und pGSF2-NubG wurden in dem Stamm THY.11 (=JBY01 $\Delta gsf2$) auf Selektivmedium ohne Leucin bzw. Tryptophan mit 1% Glukose getestet. Die Funktionalität der Konstrukte pGTT1-CubPLV, pNubG-GTT1 und pGTT1-NubG konnte nicht überprüft werden (n.d.).

Plasmid	Medium	Wachstumsphänotyp
pHXT1-CubPLV	2% Glukose	kein Wachstum
pHXT2-CubPLV	2% Glukose	kein Wachstum
pHXT3-CubPLV	2% Glukose	kein Wachstum
pHXT7-CubPLV	2% Glukose	kein Wachstum
pGSF2-CubPLV	1% Glukose	Wachstum
pGTT1-CubPLV	n.d.	n.d.
pNubG-HXT1	2% Glukose	Wachstum
pNubG-HXT2	2% Glukose	Wachstum
pNubG-HXT3	2% Glukose	Wachstum
pNubG-HXT7	2% Glukose	Wachstum
pNubG-GSF2	1% Glukose	Wachstum
pNubG-GSF2 ^{STOP}	1% Glukose	Wachstum
pNubG-GTT1	n.d.	n.d.
pHXT1-NubG	2% Glukose	Wachstum
pHXT2-NubG	2% Glukose	Wachstum
pHXT3-NubG	2% Glukose	Wachstum
pHXT7-NubG	2% Glukose	Wachstum
pGSF2-NubG	1% Glukose	Wachstum
pGTT1-NubG	n.d.	n.d.

Tab. 17 zeigt, dass alle in den Vektor pFGY1p-kanMX-CubPLV klonierten Hexosetransportergene *HXT1*, *HXT2*, *HXT3* und *HXT7* das Wachstum des Stammes EBY.VW400 auf Glukose nicht wieder herstellen konnten. Das CubPLV-

Konstrukt war eventuell aufgrund seiner Größe von 135 Aminosäuren nicht geeignet, um es an Plasmamembranproteine zu fusionieren ohne deren Funktionalität zu beeinträchtigen. Die Fusionen mit NubG hingegen waren funktionell, unabhängig davon, ob NubG N- oder C-terminal fusioniert wurde.

Zur Analyse der Interaktionen mit dem Split-Ubiquitin System wurden die Cub-Plasmide (pHXT1-CubPLV, pHXT2-CubPLV, pHXT3-CubPLV, pHXT7-CubPLV, pGTT1-CubPLV) in den Stamm THY.AP4 und die Nub-Plasmide (pNubG-GSF2, pNubG-GSF2^{STOP}, pGSF2-NubG) in den Stamm THY.AP5 transformiert. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle das Plasmid pCPLV, das das Reporterprotein PLV konstitutiv exprimiert, und als Negativkontrolle der Vektor YEplac181 in den Stamm THY.AP4 transformiert. In den Stamm THY.AP5 wurden noch als Kontrollen das Plasmid pNubWt, das konstitutiv ein cytoplasmatisches NubWt-Protein exprimiert, und der Leervektor YEplac112 transformiert. Um eine Koexpression der zu untersuchenden Proteine zu erzielen, wurden die THY.AP4- und die THY.AP5-Transformanten nach der unter 2.32 beschriebenen Methode gekreuzt. Die quantitative Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität der diploiden Doppeltransformanten wurden nach der unter 2.33.2 beschriebenen Methode durchgeführt.

In Abb. 25A ist deutlich zu erkennen, dass die β -Galaktosidaseaktivität des Reporterproteins pCPLV mit fast $400 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ weitaus größer ist, als die übrigen gemessenen Enzymaktivitäten. Daher wurde in Abb. 25B auf das Ergebnis der Positivkontrolle verzichtet. Die Interaktionen der CubPLV-Konstrukte mit NubWt führten in allen Bestimmungen zu der höchsten Aktivität. Die mit NubWt gemessenen Enzymaktivitäten spiegeln die maximal messbaren Aktivitäten wieder, da das Protein löslich im Cytoplasma vorliegt und somit ungehindert mit dem Cub der CubPLV-Konstrukte reassoziieren kann. Bei den Interaktionen von Hxt1-CubPLV und Hxt3-CubPLV mit NubG-Gsf2 oder NubG-Gsf2^{STOP} entsprechen die gemessenen Enzymaktivitäten annähernd den Messwerten bei Interaktion mit pNubWt. Dies deutet darauf hin, dass Gsf2 direkt mit den Hexosetransportern Hxt1 und Hxt3 interagiert. Die gemessenen Enzymaktivitäten für Hxt7-CubPLV und Gtt1-CubPLV mit NubG-Gsf2 oder NubG-Gsf2^{STOP} sind in Relation zu den Messungen mit pNubWt wesentlich geringer und deuten auf eine wesentlich schwächere Interaktion mit Gsf2 hin. Für HXT2-CubPLV konnte keine Interaktion mit NubG-Gsf2 oder NubG-Gsf2^{STOP} beobachtet werden. Ebenso konnten für alle CubPLV-Konstrukte keine Interaktionen mit Gsf2-NubG beobachtet werden. Die gemessenen Enzymaktivitäten für Gsf2-NubG waren in allen Fällen mit den Aktivitäten für YEplac181 vergleichbar, was als Negativkontrolle für die CubPLV-Konstrukte diente.

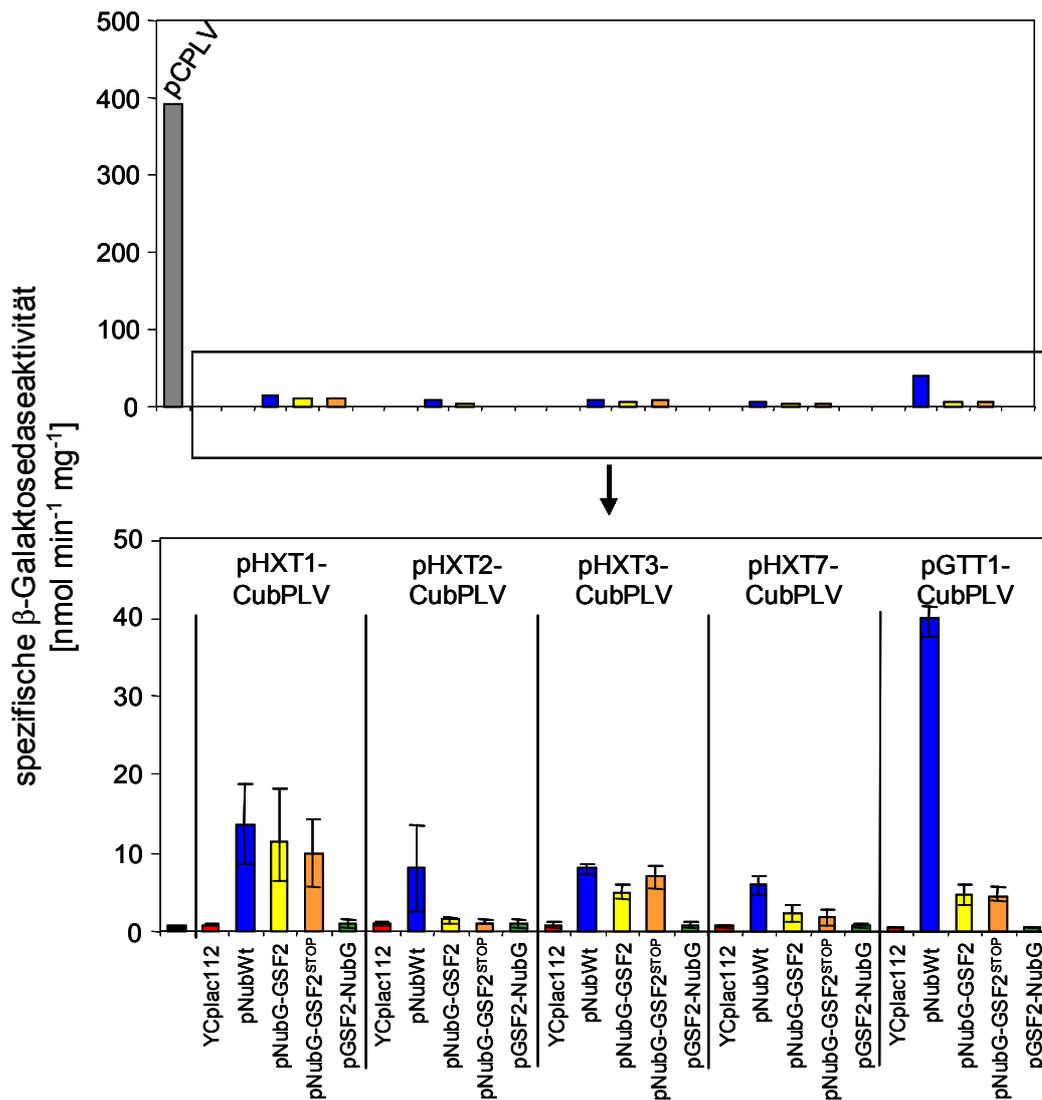


Abb. 25: **Quantitative Bestimmung der spezifischen β -Galaktosidaseaktivität ($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) im Split-Ubiquitin System.** Die transformierten Stämme THY.AP4 und THY.AP5 wurden gekreuzt und die β -Galaktosidaseaktivität nach Anzucht der diploiden Transformanten auf Selektivmedium ohne Leucin und Tryptophan mit 2% Glukose durchgeführt. Dargestellt sind die Ergebnisse der β -Galaktosidaseaktivitäts-Bestimmung inklusive der Positivkontrolle (pCPLV+YCplac112) und die Ergebnisse ohne die Positivkontrolle (pCPLV+YCplac112). Aufgeführt sind die Mittelwerte aus 2 (Messungen mit YCplac112 oder pNubWt) oder 4 (Messungen mit pNubG-GSF2, pNubG-GSF2^{STOP} oder pGSF2-NubG) Messungen mit den Fehlerindikatoren der Einzelmessungen.

Der in Abb. 26A dargestellte qualitative β -Galaktosidase-Test (X-Gal Overlay-Assay) verdeutlicht nochmals die unterschiedlich starken Interaktionen von Gsf2 mit den Hexosetransportern Hxt1, Hxt2 und Hxt7. Die diploiden Transformanten wurden auf Selektivmedium ohne Leucin und Tryptophan herangezogen und der X-Gal Overlay-Assay nach der in Kapitel 2.33.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Blaufärbungen und entsprechend die Interaktionen von NubG-Gsf2 bzw. NubG-Gsf2^{STOP} mit Hxt1-CubPLV sind stärker als die mit Hxt7-CubPLV und

diese wiederum stärker als die mit Hxt2-CubPLV. Zusätzlich ist eine Interaktion von Hxt1-CubPLV und etwas schwächer eine Interaktion von Hxt7-CubPLV mit NubG-Gtt1 zu beobachten, während Hxt2-CubPLV nicht interagiert. Mit den Konstrukten Gsf2-NubG und Gtt1-NubG konnte keine Blaufärbung beobachtet werden. Der Test von Gtt1-CubPLV zeigte wie schon die quantitativen Messungen in Kombination mit NubG-Gsf2 und NubG-Gsf2^{STOP} eine Interaktion. Die in Abb. 26B zusätzlich getesteten Interaktionen von Gsf2-CubPLV mit den Hexosetransportern führte zu folgenden Ergebnissen: Die Versuche mit Gsf2-CubPLV (Abb. 26C) zeigte deutliche Blaufärbungen in Kombination mit allen N-terminalen Fusionen von NubG (NubG-Hxt1, NubG-Hxt2, NubG-Hxt7 und NubG-Gtt1). Bei C-terminaler Fusion von NubG waren allerdings keine Blaufärbungen zu erkennen (Hxt1-NubG, Hxt2-NubG, Hxt7-NubG und Gtt1-NubG).

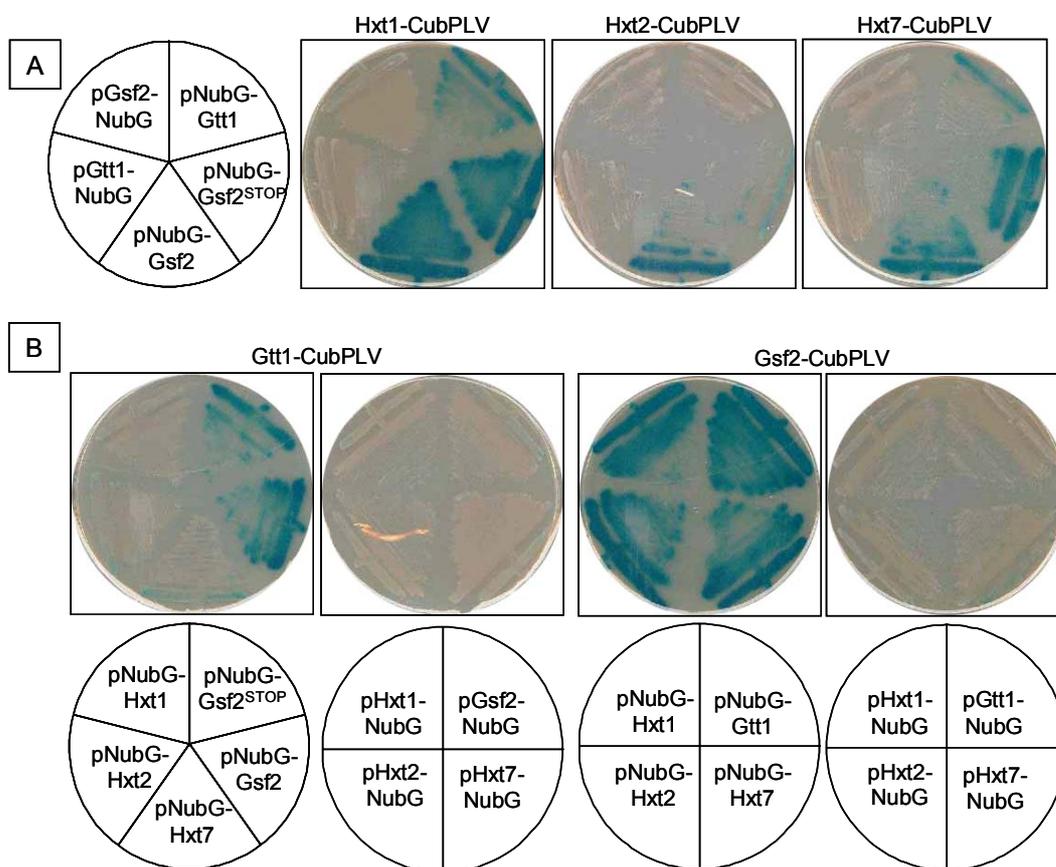


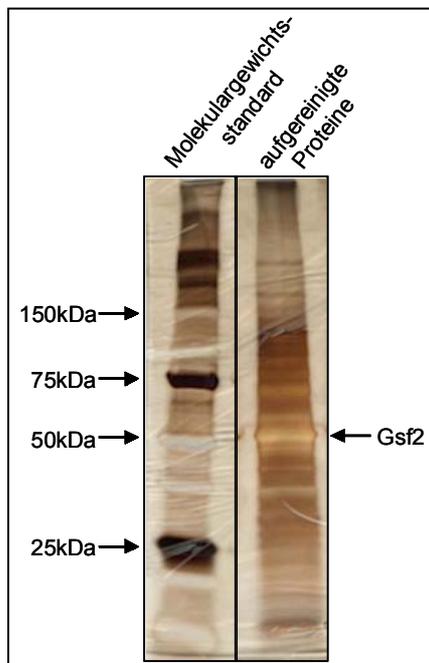
Abb. 26: **X-Gal Overlay-Assays zur Detektion von Protein-Interaktionen mit dem Split-Ubiquitin System.** Dargestellt sind die Kombinationen mit Hxt1-CubPLV, Hxt2-CubPLV und Hxt7-CubPLV (**A**), mit Gtt1-CubPLV und mit Gsf2-CubPLV (**B**). Die diploiden Transformanten wurden auf Selektivmediumsplatten ohne Leucin und Tryptophan mit 2% Glukose herangezogen.

Die Interaktionsstudien mit dem Split-Ubiquitin System konnten zeigen, dass Gsf2 bei N-terminaler Fusion von NubG direkt mit Hxt1-CubPLV und Hxt3-CubPLV interagiert. Die Interaktionen mit Hxt7-CubPLV und Gtt1-CubPLV waren

wesentlich schwächer, und eine Interaktion mit Hxt2-CubPLV konnte nur bei dem qualitativen β -Galaktosidase-Tests beobachtet werden. Auffallend war, dass es keine Unterschiede in der Interaktionsstärke bei der Nutzung von pNubG-GSF2^{STOP} im Vergleich zu pNubG-GSF2 gab. Trotz verdecktem Dilysin-Motivs bei Expression des Linkers A2 war NubG-Gsf2 funktionell. Zusätzlich waren die positiven Interaktionsergebnisse mit Gsf2 nach N-terminaler Fusion von NubG ein Indiz dafür, dass Gsf2 mindestens zwei Transmembrandomänen hat. Bis zu diesem Zeitpunkt war nur eine Transmembrandomäne für Gsf2 mit einem cytoplasmatischen C-Terminus publiziert worden (Sherwood und Carlson, 1999; vgl. 1.3). Da allerdings die Ubiquitin-spezifischen Proteasen, die für die Abspaltung des Reporterproteins PLV notwendig sind, cytoplasmatisch sind, müssen alle Interaktionen im Cytoplasma stattfinden. Folglich mußte auch der N-Terminus von Gsf2 cytoplasmatisch liegen, was bedeutet, dass Gsf2 neben der postulierten noch mindestens eine weitere Transmembrandomäne besitzen muß. Weitere Untersuchungen der Topologie von Gsf2 werden in Kapitel 3.6 beschrieben.

3.4.7 Suche nach weiteren Interaktionspartnern (TAP-Tag)

Mit Hilfe eines TAP-getaggten Gsf2-Proteins sollten weitere Interaktionspartner von Gsf2 isoliert und mittels Massenspektrometrie (MS) identifiziert werden. Der Stamm 3GS1-D-11 (Open Biosystems) besitzt einen TAP-Tag an den C-Terminus



von Gsf2 fusioniert. Der TAP-Tag kodiert für eine IgG-Bindedomäne des Proteins A, für eine TEV-Protease-Erkennungssequenz und für eine Calmodulin-Bindedomäne (Rigaut *et al.*, 1999). Der Stamm wurde wie unter 2.31.1 beschrieben herangezogen und die Proteinextrakte erstellt. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte nativ über zwei Affinitätschromatographien nach Kapitel 2.31.2. Die Proteine wurden aufkonzentriert (2.31.3) und elektrophoretisch aufgetrennt (2.31.4). Mittels colloidaler Coomassie-Färbung (2.28) oder mittels Silber-Färbung (2.29) wurden die Proteine detektiert (Abb. 27) und die einzelnen sichtbaren Proteinbanden isoliert.

Abb. 27: Silber-Färbung der über Gsf2-TAP aufgereinigte Proteine

Die Protein-Gelblöckchen wurden entfärbt, Trypsin-behandelt und in einer massenspektrometrischen Analyse charakterisiert (2.31.5). Die postulierten Größen aufgrund der elektrophoretischen Mobilität im Polyacrylamidgel wurde mit den publizierten Größen der in der MS identifizierten Proteine verglichen. In Tab. 18 sind diejenigen Proteine aufgeführt, deren beobachtete elektrophoretische Mobilität mit der publizierten Proteingröße übereinstimmte und bei denen die Massenspektrometrie eine Fehler-Wahrscheinlichkeit von unter 50% vorhersagte.

Tab. 18: Zusammen mit Gsf2-TAP aufgereinigte und in der MS identifizierte Proteine.

Position im Gel	Protein	Fehler-Wahrscheinlichkeit	Proteinfunktion
1	Rpl25	0,389	Komponente der großen Ribosomen-Untereinheit (60S)
2	Rpl13B	0,143	Komponente der großen Ribosomen-Untereinheit (60S)
3	Rps8A/ Rps8B	0,0406	Komponente der kleinen Ribosomen-Untereinheit (40S)
4	Rps3	0,00141	Komponente der kleinen Ribosomen-Untereinheit (40S)
5	Rpl4A	$8,76 \cdot 10^{-05}$	Komponente der großen Ribosomen-Untereinheit (60S)
6	Tef1/ Tef2	$5,17 \cdot 10^{-13}$	fungiert in der Bindungsreaktion der Aminoacyl-tRNA mit dem Ribosom
7	Gsf2	$5,20 \cdot 10^{-19}$	
8	Cdc19	0,000845	Pyruvatkinase
9	Vma2	0,000832	regulatorische Untereinheit der vakuolären H-ATPase
10	Ssb1	0,00016	Mitglied der „stress-seventy subfamily B“; in die Translation involviert; eventuell führt es das naszierende Polypeptid durch das Ribosom
11	Ssa2	$9,78 \cdot 10^{-14}$	Mitglied der HSP70-Familie
12	Sse1	0,0479	Mitglied der HSP70-Familie
13	Eft1/ Eft2	0,342	Elongationsfaktor 2 (EF-2); katalysiert die ribosomale Translokation während der Proteinsynthese
14	Kap123	0,00141	Karyopherin β , vermittelt den Nukleus-Import von ribosomalen Proteinen vor der Assemblierung und den Import der Histon-Komponenten H3 und H4

Die grau unterlegten Interaktionspartner Tef1/Tef2, Sse1 und Kap123 waren in einem zweiten Screen nach Interaktionspartnern für ein anderes Plasmamembranprotein ebenfalls gefunden worden (D. Voss, persönliche Mitteilung). Zusätzlich wurde in diesem zweiten Versuch ebenfalls eine Untereinheit der V-ATPase (Vma1) und ein Mitglied der „stress-seventy subfamily B“ Ssb2 identifiziert, die mit den Gsf2-Interaktionspartnern Vma2 und Ssb1 (grau unterlegt) große Verwandtschaft zeigen. Ssa2 gehört genauso wie Sse1 und Sse2 zu der HSP70-Familie, so dass auch diese Interaktion angezweifelt werden mußte. Vermutlich führte die Zugabe des Detergenz (TritonX100) bei der Präparation der

Proteinextrakte dazu, dass sich die verschiedenen Hitzchock-Proteine an die hydrophoben Bereiche des getaggtten Gsf2-Proteins anlagern konnten und dadurch mit aufgereinigt wurden. Eine Interaktion von Gsf2 mit der Pyruvatkinase Cdc19 (Alias: Pyk1) war nicht erwartet worden und ist wahrscheinlich nur auf das sehr große Vorkommen von Cdc19 in der Hefezelle bei Wachstum auf Glukose zurückzuführen (291000 ± 24100 Proteine pro Zelle; <http://yeastgfp.ucsf.edu/>).

Nach der Analyse der Ergebnisse zeigte sich, dass zusammen mit Gsf2 mehrere Proteine mit einer Funktion an den Ribosomen aufgereinigt wurden (fett gedruckte Proteinennamen). Dabei handelte es dreimal um eine Komponente der grossen Ribosomen-Untereinheit 60S (Rpl4A, Rpl13B, Rpl25), zweimal um eine Komponente der kleinen Ribosomen-Untereinheit 40S (Rps3, Rps8A/Rps8B) und um einen Elongationsfaktor (Eft1/Eft2). Die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung deutete somit darauf hin, dass Gsf2 eine Rolle im ER hat, die an die Ribosomen gekoppelt sein könnte. Eventuell hilft Gsf2 bei der Translokation neu-synthetisierter Proteine ins ER bzw. im Falle der Hexosetransporter in die ER-Membran.

3.5 Einfluss von Gsf2 und Sar1 auf andere Transportproteine

Die Tropftests der genetischen Interaktionsstudien zeigten, dass die Überexpression von *GSF2* einen generellen, negativen Wachstumseffekt auf die verschiedenen Temperatur-sensitiven *sec*-Stämme hatte (vgl. 3.4.5). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Gsf2 notwendig ist um den Hexosetransporter Hxt1 an die Plasmamembran zu translozieren. Neben Hxt1 im Falle einer *gsf2*-Deletion sind in *S. cerevisiae* weitere Transportproteine bekannt, die aufgrund unterschiedlichster Ursachen im ER der Zelle zurückgehalten werden. Im Folgenden sollte der Einfluss einer Überexpression von *GSF2* und auch einer Überexpression von *SAR1* auf diese Transportproteine untersucht werden.

3.5.1 Einfluss auf den Säuger-Glukosetransporter GLUT4

Wieczorke *et al.* (2003) publizierten, dass für die funktionelle, heterologe Expression der Säuger-Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 in *S. cerevisiae* zusätzliche Mutationen in der Hefe notwendig sind. Während GLUT1 durch eine Mutation in dem Gen *FGY1* in der Hefe funktionell war, wurden große Anteile an GLUT4 weiterhin im ER zurückgehalten. Erst durch die Deletion von *ERG4* zusätzlich zur *fgy1*-Mutation konnte GLUT4 effizient in der Hefe zur Plasmamembran transloziert werden (Dlugai, 2003).

Es sollte überprüft werden, ob die Überexpression von *SAR1* neben *Hxt1* bei einer *gsf2*-Deletion auch GLUT4 im Falle einer fehlenden *erg4*-Deletion zur Plasmamembran translozieren kann. Verwendet wurde für diesen Versuch ein *hxt*-Nullstamm YSYA320, der schon die erforderliche Mutation im *FGY1*-Gen besitzt und zusätzlich das Gen für die Fruktose-1,6-Bisphosphatase (*FBP1*) deletiert hat. Durch die Deletion von *FBP1* handelt es sich bei Wachstum auf Ethanol als Kohlenstoffquelle um einen Glukose-auxotrophen Stamm, der neben der C-Quelle für das Wachstum (Ethanol) geringe Mengen Glukose benötigt. Glukose oder alternativ andere C₆-Zucker sind für diesen *fbp1*-Deletionsstamm essentiell um daraus Komponenten der Zellwand aufzubauen, die aus Ethanol aufgrund der fehlenden Glukoneogenese nicht synthetisiert werden können. Die Wachstumsstudien wurden folglich mit einem Gemisch aus Ethanol und Glukose durchgeführt, um von dem Wachstumsverhalten direkt auf die Funktionalität von GLUT4 schließen zu können. Der Stamm YSYA320 wurde mit dem Plasmid YEpH2-rGLUT4 in Kombination mit p426SAR1 bzw. p426SAR1^{Δi} transformiert und die Wachstumsuntersuchungen nach der unter 2.20 beschriebenen Methode durchgeführt (Abb. 28).

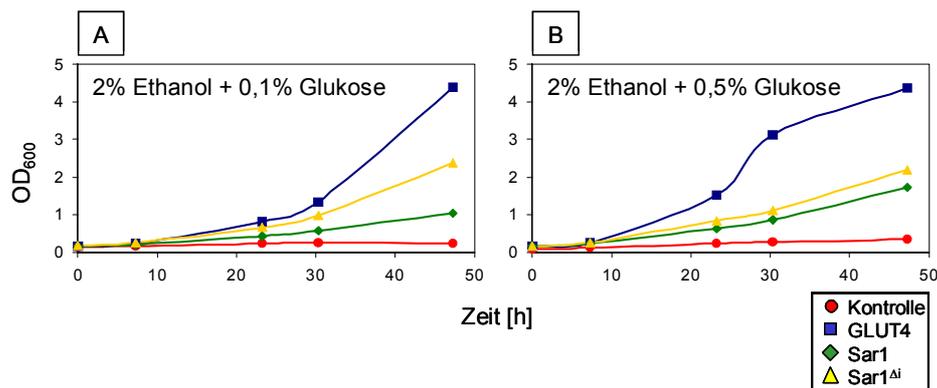


Abb. 28: **Einfluss der *SAR1*-Überexpression auf den Glukosetransporter GLUT4.** Der Stamm YSYA320 wurde mit den Plasmiden YEpH2-rGLUT4 + p426HXT7-HIS (**GLUT4**), YEpH2-rGLUT4 + p426SAR1 (**Sar1**), YEpH2-rGLUT4 + p426SAR1^{Δi} (**Sar1^{Δi}**) oder YCplac112 + p426HXT7-6HIS (**Kontrolle**) transformiert und die Wachstumsuntersuchungen in Selektivmedium ohne Tryptophan und Uracil mit **A**) 2% Ethanol und 0,1% Glukose und **B**) 2% Ethanol und 0,5 % Glukose durchgeführt.

Die Wachstumstudien zeigten, dass der Stamm YSY320 schon mit GLUT4 alleine wachsen konnte. Da geringe Mengen an GLUT4 auch bei Anwesenheit von *ERG4* zur Plasmamembran gelangen, zeigte der Stamm langsames Wachstum. Durch die Überexpression von *SAR1* zeigte sich eine deutliche Verlangsamung des Wachstums, unabhängig von der An- oder Abwesenheit des Introns. Die Überexpression von *SAR1* hatte somit keinen positiven Einfluss auf die Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran.

3.5.2 Einfluss auf die generelle Aminosäurepermease Gap1

Ljungdahl *et al.* (1992) beschrieben eine neue Komponente des Sekretionsweges, die notwendig ist, um verschiedene Aminosäuretransporter und darunter auch die generelle Aminosäurepermease Gap1 zur Plasmamembran zu translozieren. Bei diesem Protein Shr3 handelt es sich um ein ER-Protein, dessen Fehlen in der Zelle zu einer Akkumulation verschiedener Aminosäurepermeasen im ER führt (vgl. 1.4). Da die Funktion von Shr3 für die Aminosäuretransporter und von Gsf2 für die Hexosetransporter vergleichbar waren, sollte überprüft werden, ob Gsf2 oder der Multicopy-Suppressor Sar1 die Aufgabe von Shr3 übernehmen können.

Die beiden Stämme CAY28 (*SHR3*-Wildtypstamm) und IKY1 (*shr3* Δ 6-Mutationsstamm) (freundlicherweise von P. Ljungdahl zur Verfügung gestellt) wurden mit den Plasmiden YCpHA-GSF2, p426GSF2, p426SAR1, p426SAR1 Δ i und dem Vektor p426HXT7-6HIS transformiert und die Wachstumsuntersuchungen nach der unter 2.20 beschriebenen Methode durchgeführt (Abb. 29). Die Wachstumsstudien wurde in MC-Medium durchgeführt, um durch die Nutzung von L-Citrullin als Stickstoffquelle die Expression von *GAP1* zu induzieren.

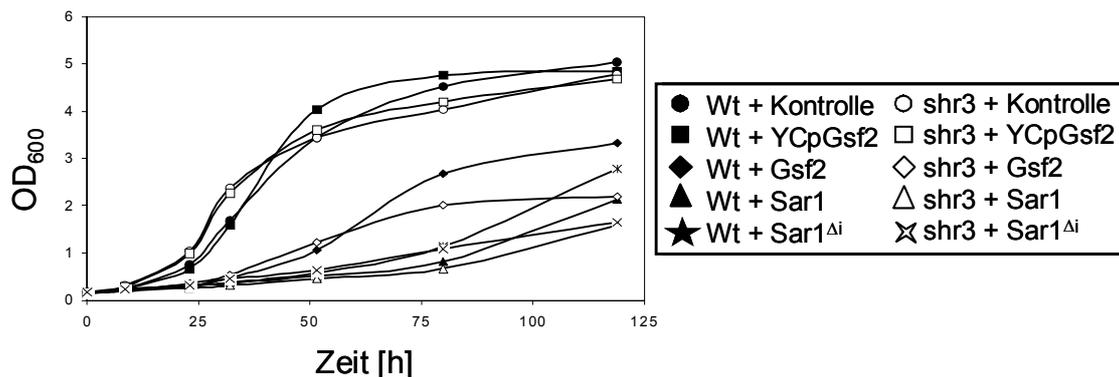


Abb. 29: **Einfluss der GSF2- und SAR1-Überexpression auf die generelle Aminosäurepermease Gap1.** Die Stämme CAY28 (**Wt**) und IKY1 (**shr3**) wurden mit den Plasmiden YCpHA-GSF2 (**YCpGsf2**), p426GSF2 (**Gsf2**), p426SAR1 (**Sar1**), p426SAR1 Δ i (**Sar1 Δ i**) und dem Vektor p426HXT7-6HIS (**Kontrolle**) transformiert und die Wachstumsuntersuchungen in MC-Medium durchgeführt.

Die Wachstumsstudien zeigten, dass weder die Überexpression von *GSF2* noch die Überexpression von *SAR1* einen positiven Effekt auf das Wachstum einer der Stämme hatte. Das Gegenteil war zu beobachten: Die Überexpressionen führte zu einem verlangsamten Wachstum. Einzig die Transformanten mit dem Zentromerplasmid YCpHA-GSF2 zeigten keinen negativen Wachstumseffekt.

Aus den Überexpressionsstudien von *GSF2* und *SAR1* konnte geschlossen werden, dass keines der beiden Gene zu einer generellen Translokation von im

ER zurückgehaltenen Proteinen zur Plasmamembran führen kann. Die Überexpression von *SAR1* ermöglicht die Translokation von Hxt1 zur Plasmamembran, führte in den übrigen Versuchen allerdings zu einem verlangsamten Wachstum.

3.6 Topologie von Gsf2

Sherwood und Carlson (1999) beschrieben die Topologie von Gsf2 mit einem cytoplasmatischen C-terminalen Dilysin-Motiv, einem ER-luminalen N-Terminus und einer putativen Transmembrandomäne, die im Bereich der Aminosäuren 177-198 liegen sollte. Da allerdings die Interaktionsstudien von Gsf2 im Split-Ubiquitin System bei N-terminaler Fusion des NubG-Konstruktes ein positives Ergebnis zeigten (vgl. 3.4.6) und nur Interaktionen, die im Cytosol stattfinden, detektierbar sind, konnte geschlussfolgert werden, dass auch der N-Terminus von Gsf2 cytosolisch vorliegen muß. Folglich mußte Gsf2 mindestens zwei Transmembrandomänen besitzen. Kyte-Doolittle Hydrophobizitäts-Plots deuteten auf einen zweiten hydrophoben Aminosäuresequenzbereich N-terminal der ersten postulierten Transmembrandomäne hin (Abb. 30A). Somit bestand die Möglichkeit, dass C- und auch N-Terminus von Gsf2 cytosolisch sein konnten.

Zur Überprüfung der Gsf2-Topologie sollte nach der von Gilstring und Ljungdahl (2000) publizierten Methode eine *SUC2*-Reporterkassette in das *GSF2*-Gen integriert und die Glykosylierung des Suc2-Reporters untersucht werden. Die Invertase Suc2 wird bei der Translokation durch das ER effizient glykosyliert. Eine 159bp lange, von *Bam*HI-Restriktionsschnittstellen flankierte Reporterkassette kodiert für interne 53 Aminosäuren von Suc2 mit 3 NXS/T Glykosylierungsstellen (Gilstring und Ljungdahl, 2000). Diese *SUC2*-Topologie-Reporterkassette sollte klassisch über Ligation an verschiedenen Positionen im *GSF2*-Gen integriert werden. Da die Glykosylierung im ER-Lumen stattfindet, wäre im Falle einer Lokalisation der Suc2-Reporterkassette im ER-Lumen eine Glykosylierung des Proteins nachzuweisen, während im Falle einer Lokalisation im Cytoplasma keine Glykosylierung zu beobachten wäre. Zu Beginn mussten *Bam*HI-Restriktionserkennungssequenzen an die unterschiedlichen Positionen in das Plasmid YCpHA-GSF2 integriert werden: Die erste Integration wurde an Position *HA-GSF2*⁴³, die zweite an Position *HA-GSF2*⁵¹¹ und die dritte an Position *HA-GSF2*¹¹⁸⁶ nach der unter 2.17.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Die vordere Position der *SUC2*-Reporterkassette sollte direkt hinter der Sequenz des HA-Tags liegen, die mittlere *Bam*HI-Restriktionserkennungssequenz sollte in dem

Bereich zwischen der postulierten 1. und der mutmaßlichen 2. Transmembrandomäne liegen und die hintere *Bam*HI-Restriktionserkennungssequenz sollte im hinteren Bereich von HA-GSF2 integriert sein. Die mit einer *Bam*HI-Schnittstelle versehenen Plasmide YCpHA-GSF2^{BamHI-43}, YCpHA-GSF2^{BamHI-511} und YCpHA-GSF2^{BamHI-1186} wurden mittels *Bam*HI-Restriktion linearisiert und die *SUC2*-Reporterkassette wie unter 2.17.1 beschrieben integriert. Die durch Restriktionsanalyse und PCR verifizierten Plasmide YCpHA-GSF2^{SUC2-43}, YCpHA-GSF2^{SUC2-511} und YCpHA-GSF2^{SUC2-1186} wurden zusammen mit den Kontrollplasmiden YCplac33 und YCpHA-GSF2 in den *gsf2*-Deletionsstamm THY.11 transformiert.

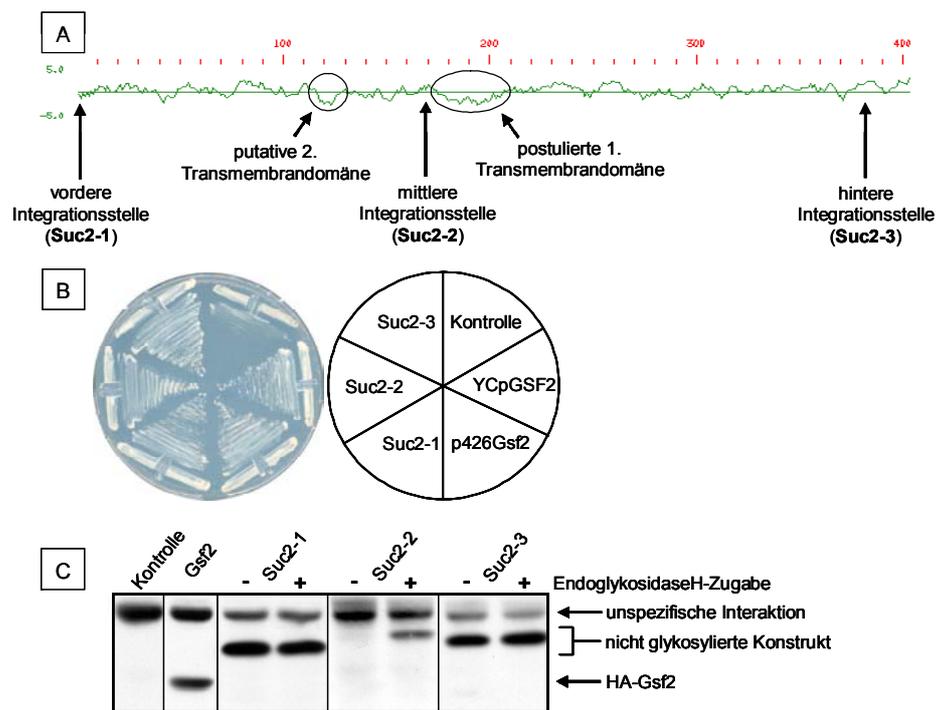


Abb. 30: **Topologie von Gsf2.** (A) Dargestellt ist ein Kyte-Doolittle Hydrophobizitäts-Plot von Gsf2. Markiert sind die hydrophoben Bereiche, die die Positionen der postulierten 1. und der mutmaßlichen 2. Transmembrandomäne zeigen. Zusätzlich wurden die Positionen der 3 integrierten *SUC2*-Topologie-Reporterkassetten markiert. (B) Dargestellt ist die Wachstumsstudie des Stämme THY.11 transformiert mit YCplac33 (Kontrolle), YCpHA-GSF2 (YCpGsf2), p426GSF2 (p426Gsf2), YCpHA-GSF2^{SUC2-43} (Suc2-1), YCpHA-GSF2^{SUC2-511} (Suc2-2) und YCpHA-GSF2^{SUC2-1186} (Suc2-3) auf Selektivmedium ohne Uracil mit 1% Glukose. (C) Dargestellt sind die Western-Blot-Analyse der THY.11-Transformationen YCplac33 (Kontrolle), YCpHA-GSF2 (Gsf2), YCpHA-GSF2^{SUC2-43} (Suc2-1), YCpHA-GSF2^{SUC2-511} (Suc2-2) und YCpHA-GSF2^{SUC2-1186} (Suc2-3). Die Transformanten wurden in Selektivmedium ohne Uracil mit 1% Maltose herangezogen. Die Proteinextrakte wurden einmal unbehandelt (-) und einmal nach einer EndoglykosidaseH-Behandlung (+) aufgetragen. Die Detektion der HA-Gsf2-Proteine erfolgte mit einem gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörper.

Wachstumsuntersuchungen der Transformanten auf Selektivmediumsplatten mit 1% Glukose zeigten, dass alle drei Integrationen der *SUC2*-Reporter-kassette die Funktionalität von Gsf2 nicht beeinträchtigten. Die Transformanten zeigten dasselbe Wachstumsverhalten wie die mit YCpHA-GSF2 und mit p426GSF2 transformierten Kontrollstämme, während der mit YCplac33 transformierte Stamm kein Wachstum zeigte (Abb. 30B). Von allen Transformanten wurden Proteinextrakte hergestellt (2.21) und diese im Anschluss an eine EndoglykosidaseH-Behandlung (2.23) mittels Western-Blot-Analyse detektiert (2.25, 2.26). Neben den verschiedenen *GSF2*-Konstrukten konnte auch bei dem mit YCplac33 transformierten Stamm ein Protein detektiert werden (Abb. 30C). Es stellte sich heraus, dass der gegen das HA-Epitop gerichtete Antikörper mit einem Hefe-eigenen Protein interagiert und somit in allen Ansätzen eine unspezifische Bande detektiert wurde. Die EndoglykosidaseH-Behandlungen zeigten, dass der Suc2-Reporter nach Integration am N-Terminus von Gsf2 (Suc2-1) und auch nach Integration im C-terminalen Bereich (Suc2-3) nicht glykosyliert wird. Im Gegensatz dazu führte die Integration von Suc2 in dem Bereich zwischen der postulierten 1. und der mutmaßlichen 2. Transmembrandomäne zu einer Glykosylierung. Die glykosylierte Form des *SUC2-2*-Konstruktes war aufgrund der Überlagerung mit der unspezifischen Bande nicht zu erkennen. Allerdings führte die Zugabe von EndoglykosidaseH bei diesem Extrakt zu einer größeren elektrophoretischen Mobilität des Proteins, was eine Entfernung der Zuckerkette bestätigte.

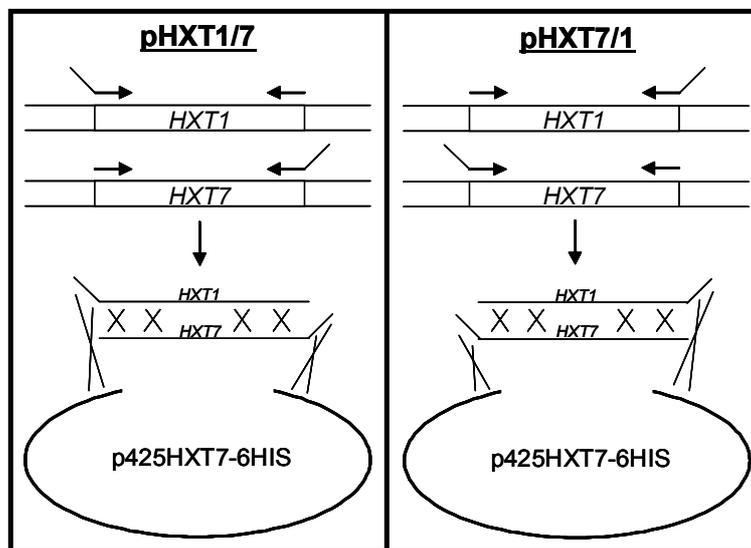
Somit konnte mit Hilfe der *SUC2*-Topologie-Reporter-kassette nachgewiesen werden, dass Gsf2 nicht nur eine sondern mindestens zwei Transmembrandomänen besitzt.

3.7 Hxt1/7-Chimäre

3.7.1 Spontane, ungerichtete Chimäre

Die vorhergehenden Untersuchungen des Einflusses von Gsf2 auf die verschiedenen Hexosetransporter zeigten deutlich, dass Gsf2 stärker mit Hxt1 als mit Hxt7 interagiert (3.4.6) und dass die Abwesenheit von Gsf2 einen wesentlich stärkeren Wachstumsdefekt in *HXT1*-Einzelexpressionsstämmen als in *HXT7*-Einzelexpressionsstämmen bei Wachstum auf Glukose auslöst (3.2.1). Mit Hilfe der Konstruktion chimärer Hxt1/7- und Hxt7/1-Proteine sollte überprüft werden, ob spezielle Proteindomänen von Hxt1 als Erkennungssequenz für Gsf2 dienen. Die Übergänge der Gensequenzen sollten bei der Klonierung der Chimäre an willkürlichen Positionen durch ungerichtete, spontane homologe Rekombination erzielt werden. Da die *HXT1*- und *HXT7*-Sequenzen in großen Teilen identisch

getrennte PCR-Reaktionen durchgeführt. Die Amplifikation des *HXT1*-ORFs erfolgte im Falle der pHXT1/7-Plasmide mit den Oligonukleotiden fp4HXT1/rHXT1 und im Falle der pHXT7/1-Plasmide mit fHXT1/rp4HXT1. Dementsprechend wurden für die Amplifikation des *HXT7*-ORFs im Falle der pHXT1/7-Plasmide die Oligonukleotide fHXT7/rp4HXT7 und im Falle der pHXT7/1-Plasmide fp4HXT7/rHXT7 eingesetzt. Somit wurde in jeder PCR ein PCR-Produkt erzielt, das einen homologen Anhang zu dem verwendeten Vektor p425HXT7-6HIS enthält. Durch die Kombination zweier PCR-Produkte in einer Transformation konnten nur solche Transformanten wachsen, die aufgrund von drei *in vivo*-Rekombination der zwei PCR-Produkte und dem linearisierten Vektor ein stabiles, zirkuläres Plasmid enthielten. Die homologen Rekombinationen der PCR-Produkte



mit dem linearisierten Vektor fanden gezielt an definierten DNA-Sequenzen statt, während die homologen Rekombinationen zwischen dem *HXT1*-PCR-Produkt und dem *HXT7*-PCR-Produkt willkürlich in Bereichen der ORFs stattfinden konnten, die eine genügend hohe Homologie aufwiesen (Abb. 31).

Abb. 31: Schematische Darstellung der *in vivo*-Rekombination in Hefe zur Klonierung der pHXT1/7- und pHxt7/1-Plasmide.

Zusätzlich zu den Chimären wurden als Kontrollen die Wildtyp-Gensequenzen von *HXT1* und *HXT7* mittels der Oligonukleotide fp4HXT1/rp4HXT1 bzw. fp4HXT7/rp4HXT7 amplifiziert und ebenfalls über homologe Rekombination in den durch Restriktion geöffneten Vektor p425HXT7-6HIS^{BamHI/HindIII} kloniert. Die Kontrollplasmide **p425HXT1** und **p425HXT7** wurden in den *gsf2*-Deletionsstamm THY.14 (= EBY.VW4000 Δ *gsf2*) transformiert und das Wachstumsverhalten der Transformanten auf Glukose-haltigen Mediumsplatten untersucht (Tab. 20). Es sollte ein Glukosekonzentration bestimmt werden, bei der die *HXT1*-Transformanten aufgrund der Abwesenheit von Gsf2 nur noch sehr langsam

wachsen können, während auf Hxt7 kein ersichtlicher Einfluss zu beobachten ist. Am besten geeignet erschien eine Glukosekonzentration von 0,75%.

Tab. 20: **Wachstumsverhalten des mit p425HXT1 und p425HXT7 transformierten *gsf2*-Deletionsstamm THY.14.** Getestet wurde das Wachstum bei verschiedenen Glukosekonzentrationen auf Selektivmediumsplatten ohne Leucin. Dargestellt ist das Wachstumsverhalten mit „+++“ als „sehr schnelles Wachstum“, über „+/-“ als „extrem langsames Wachstum“ bis zu „-“ als „kein Wachstum“.

Glukosekonzentration	p425Hxt1	p425Hxt7
0,1%	-	+++
0,5%	-	+++
0,75%	+/-	+++
1,0%	+/-	++
1,5%	+	+
2,0%	++	+/-
5,0%	+++	-

Das Wachstumsverhalten der pHXT1/7- und pHXT7/1-Plasmide im *hxt*-Nullstamm EBY.VW4000 wurde ebenfalls auf Selektivmedium ohne Leucin mit 0,75% Glukose überprüft. Nur die Plasmide derjenigen Transformanten, die aufgrund eines funktionellen Chimärs auf Glukose wachsen konnten, wurden weiter charakterisiert. 12 Plasmide, die ein Wachstum auf Glukose ermöglichten, wurde anschließend in den *gsf2*-Deletionsstamm THY.14 (= EBY.VW4000 Δ *gsf2*) transformiert und das Wachstumsverhalten erneut überprüft. 5 Plasmide wurden sequenziert, um die Position des Überganges von *HXT1* zu *HXT7* bzw. von *HXT7* zu *HXT1* zu identifizieren. Ein Vergleich des Wachstumsverhaltens in Abhängigkeit von *Gsf2* mit den Sequenzierergebnissen sollte einen Hinweis darauf geben, welche Sequenzbereiche von Hxt1 und Hxt7 unterschiedlich und als Erkennungssequenz bei Hxt1 für *Gsf2* notwendig sind (Tab. 21).

Tab. 21: **Charakterisierung der Hxt1/7- und Hxt7/1-Chimäre.** Dargestellt sind die Ergebnisse der Wachstumstests auf Selektivmediumsplatten ohne Leucin mit 0,75% Glukose in den Stämmen EBY.VW4000 (*GSF2*-Wildtypstamm) und THY.14 (*gsf2*-Deletionsstamm). Das Wachstumsverhalten wurde mit „+++“ als „sehr schnelles Wachstum“, über „+/-“ als „extrem langsames Wachstum“ bis zu „-“ als „kein Wachstum“ dargestellt. Die Sequenzierergebnisse geben die Position des Überganges im Gen in Basenpaaren (bp) an. Die Aminosäuresequenzen geben den Übergang in Aminosäuren (AS) auf Proteinebene an.

Plasmide	EBY.VW4000 (<i>GSF2</i>)	THY.14 (Δ <i>gsf2</i>)	Sequenzierergebnisse	Aminosäuresequenz
p425HXT7-6HIS	-	-		
p425HXT1	+++	+/-		
p425HXT7	+++	+++		
pHXT1/7 ⁸⁴	++	++	<i>HXT1</i> ^{1-252bp} , <i>HXT7</i> ^{253-1713bp}	Hxt1 ^{1-84AS} ; Hxt7 ^{85-571AS}
pHXT7/1 ⁸¹	++	-	<i>HXT7</i> ^{1-243bp} , <i>HXT1</i> ^{244-1713bp}	Hxt7 ^{1-81AS} ; Hxt1 ^{82-571AS}
pHXT7/1 ³³⁹	+	-	<i>HXT7</i> ^{1-1017bp} , <i>HXT1</i> ^{1018-1713bp}	Hxt7 ^{1-339AS} ; Hxt1 ^{340-571AS}
pHXT7/1 ³⁶⁹	++	-	<i>HXT7</i> ^{1-1107bp} , <i>HXT1</i> ^{1108-1713bp}	Hxt7 ^{1-369AS} ; Hxt1 ^{370-571AS}
pHXT7/1 ⁴⁸⁴	++	++	<i>HXT7</i> ^{1-1452bp} , <i>HXT1</i> ^{1453-1713bp}	Hxt7 ^{1-484AS} ; Hxt1 ^{485-571AS}

Das Wachstumsverhalten der Chimäre Hxt1/7⁸⁴ und Hxt7/1⁴⁸⁴ zeigte keinen Unterschied bei An- und Abwesenheit von Gsf2 und war mit dem Wachstumsphänotyp der p425HXT7-Transformanten vergleichbar. Der Austausch von 84 Aminosäuren am N-Terminus (=Hxt1/7⁸⁴) oder von 87 Aminosäuren am C-Terminus (=Hxt7/1⁴⁸⁴) von Hxt7 gegen Hxt1 zeigte somit keinen Effekt. Bei den Chimären Hxt7/1⁸¹, Hxt7/1³³⁹ und Hxt7/1³⁶⁹ war hingegen ein Unterschied im Wachstumsverhalten in Abhängigkeit von Gsf2 zu beobachten: Ein C-terminaler Austausch von 202 Aminosäuren von Hxt7 gegen Hxt1 (=Hxt7/1³⁶⁹) war ausreichend, damit die Anwesenheit von Gsf2 für eine Translokation des Chimärs zur Plasmamembran notwendig ist. Ein Vergleich der Chimäre Hxt7/1³⁶⁹ und Hxt7/1⁴⁸⁴ führte zu der Annahme, dass im Bereich von Hxt1³⁶⁹⁻⁴⁸⁴ eine Domäne liegen könnte, die als Erkennungssequenz von Hxt1 für Gsf2 und folglich für die Translokation von Hxt1 notwendig ist (vgl. Abb. 33).

3.7.2 Genomisch-integrierte Chimäre

Neben den durch ungerichtete homologe Rekombination entstandenen Chimären, sollte der Einfluss von Gsf2 auch auf Stämme, die genomisch integriert ein HXT1/7-Chimär besaßen, untersucht werden. In den Stämmen (freundlicherweise von K. Otterstedt zur Verfügung gestellt) wurde das *GSF2*-Gen nach der unter 2.19.1 beschriebenen Methode deletiert. Die *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette wurde mittels der Oligonukleotide S1-GSF2 und S2-GSF2 amplifiziert und die

Verifikation der Deletion erfolgte mit den Oligonukleotiden A1-GSF2 und A4-GSF2. In Tab. 22 aufgeführt sind die *GSF2*-Wildtyp- und *gsf2*-Deletionsstamm-Bezeichnungen, sowie die Positionen des Überganges der Chimärsequenzen.

Tab. 22: **Bezeichnung der Chimär-Stämme.** Aufgeführt sind die Stammbezeichnungen der Stämme mit genomisch integrierten Chimär-Sequenzen, die Bezeichnungen der korrespondierenden *gsf2*-Deletionsstämme und die Position des Überganges von der *HXT1*- zur *HXT7*-Sequenz (TMD = Transmembrandomäne).

<i>GSF2</i> - Wildtypstamm	<i>gsf2</i> - Deletionsstamm	Position des Überganges der Chimär-Sequenzen
KOY.PK2-1C.83	THY.25	isogener Wildtypstamm
KOY.VW100	THY.26	<i>hxt</i> -Nullstamm
KOY.HXT1P	THY.27	<i>HXT1</i> -Einzelexpressionsstamm
KOY.HXT7P	THY.28	<i>HXT7</i> - Einzelexpressionsstamm
KOY.TM1P	THY.29	<i>HXT1/7</i> -Chimär in der 1. TMD (<i>HXT1</i> ¹⁻²³¹ - <i>HXT7</i> ²³²⁻¹⁷¹³)
KOY.TM2P	THY.30	<i>HXT1/7</i> -Chimär in der 2. TMD (<i>HXT1</i> ¹⁻³⁹¹ - <i>HXT7</i> ³⁹²⁻¹⁷¹³)
KOY.TM3P	THY.31	<i>HXT1/7</i> -Chimär in der 3. TMD (<i>HXT1</i> ¹⁻⁴⁴⁹ - <i>HXT7</i> ⁴⁵⁰⁻¹⁷¹³)
KOY.TM4P	THY.32	<i>HXT1/7</i> -Chimär in der 4. TMD (<i>HXT1</i> ¹⁻⁵⁵¹ - <i>HXT7</i> ⁵⁵²⁻¹⁷¹³)
KOY.TM5P	THY.33	<i>HXT1/7</i> -Chimär in der 5. TMD (<i>HXT1</i> ¹⁻⁶²⁷ - <i>HXT7</i> ⁶²⁸⁻¹⁷¹³)
KOY.TM6P*	THY.34	<i>HXT1/7</i> -Chimär in der 6. TMD (<i>HXT1</i> ¹⁻⁷⁴¹ , <i>Ser279Tyr</i> _ <i>HXT7</i> ⁷⁴²⁻¹⁷¹³)
KOY.TM11P	THY.35	<i>HXT1/7</i> -Chimär in der 11. TMD (<i>HXT1</i> ¹⁻¹⁴³⁷ - <i>HXT7</i> ¹⁴³⁸⁻¹⁷¹³)
KOY.TM12P	THY.36	<i>HXT1/7</i> -Chimär in der 12. TMD (<i>HXT1</i> ¹⁻¹⁵⁰³ - <i>HXT7</i> ¹⁵⁰⁴⁻¹⁷¹³)
TM4 (7-1)	THY.37	<i>HXT7/1</i> -Chimär in der 4. TMD (<i>HXT7</i> ¹⁻⁵⁵¹ - <i>HXT1</i> ⁵⁵²⁻¹⁷¹³)

Die Stämme besaßen, mit Ausnahme des Wildtypstammes KOY.PK2-1C.83, nur einen Hexosetransporter (Hxt1, Hxt7) oder ein Chimär, so dass der Einfluss der An- und Abwesenheit von Gsf2 erneut direkt auf Mediumsplatten (1% SCD) getestet werden konnte (nicht dargestellt). Es zeigte sich, dass der Einfluss von Gsf2 auf die Hexosetransporter Hxt1 und Hxt7 in den KOY-Stämmen identisch mit den vorher verwendeten Stämmen war: Es war ein Wachstumsunterschied bei *HXT1*-Expression (KOY.HXT1P/THY.27) in Abhängigkeit von Gsf2 zu beobachten ist, während das Wachstum der *HXT7*-Einzelexpressionstämme (KOY.HXT7P/THY.28) davon unbeeinflusst blieb. Es zeigte sich allerdings, dass bei allen Chimären die Abwesenheit von Gsf2 zu einem verlangsamten Wachstum führte. Auch ein N-terminaler Übergang von Hxt1 zu Hxt7 bei Aminosäure 77 (=KOY.TM1P) führte bei Abwesenheit von Gsf2 zu einem extrem verlangsamten Wachstum. Dies widersprach dem mit pHXT1/7⁸⁴ gemachten Ergebnis (Tab. 21). Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse bestand darin, dass der Einfluss von Gsf2 auf Plasmid-kodierte Chimäre und auf genomisch-integrierte Chimäre nicht vergleichbar ist. Obwohl in beiden Fällen die chimären

Gene unter die Kontrolle des verkürzten, konstitutiven *HXT7*-Promotors gestellt wurden, befinden sich aufgrund der genomischen Integration im Vergleich zur Klonierung auf Überexpressionsplasmide weniger Chimär-Proteine in der Zelle. Außerdem war nicht auszuschließen, dass die unterschiedlichen Stämme, die verwendet wurden, nicht vergleichbar sind.

3.7.3 Plasmid-kodierte Chimär-Sequenzen

Um die Beobachtungen aus 3.7.1 und 3.7.2 zu verifizieren, sollten die Chimär-Sequenzen aus den KOY-Stämmen ebenfalls in den Vektor p425HXT7-6HIS kloniert werden. Mittels PCR wurden mit den Oligonukleotiden fp4HXT1 und rp4HXT7 die Chimär-Sequenzen der Stämme KOY.TM1P, KOY.TM2P, KOY.TM3P, KOY.TM4P, KOY.TM5P und KOY.TM6P* amplifiziert und nach der unter 2.17 beschriebenen Methode in den durch Restriktion geöffneten Vektor p425HXT7-6HIS^{BamHI,HindIII} kloniert. Die Plasmide **p425TM1**, **p425TM2**, **p425TM3**, **p425TM4**, **p425TM5** und **p425TM6** wurden mittels Restriktionsanalyse überprüft und anschließend zusammen mit den Chimär-Plasmiden pHxt1/7⁸⁴, pHxt7/1³⁶⁹ und pHxt7/1⁴⁸⁴ sowie dem Leervektor p425HXT7-6HIS in die Stämme EBY.VW4000 und THY.14 (= EBY.VW4000 Δ *gsf2*) transformiert. Das Wachstumsverhalten der Transformanten wurde in Flüssigkultur nach der unter 2.20 beschriebenen Methode untersucht (Abb. 32).

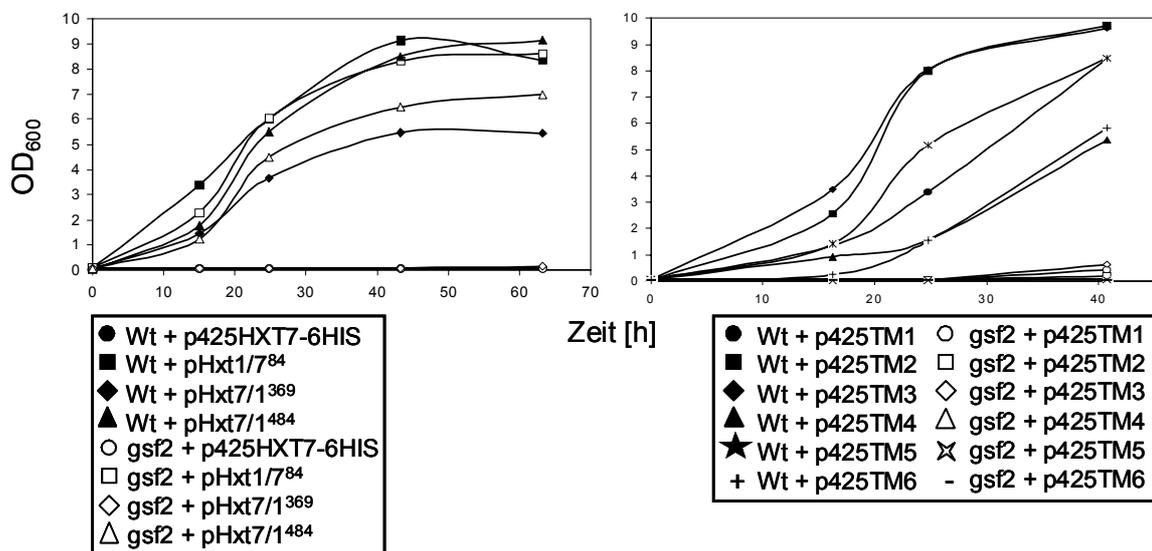


Abb. 32: **Wachstumsuntersuchungen der Chimäre in den Stämmen EBY.VW4000 und THY.14.** Die Stämme EBY.VW4000 (Wt) und THY.14 (*gsf2*) wurden mit den Plasmiden p425TM1, p425TM2, p425TM3, p425TM4, p425TM5, p425TM6, pHxt1/7⁸⁴, pHxt7/1³⁶⁹, pHxt7/1⁴⁸⁴ und dem Vektor p425HXT7-6HIS transformiert und die Wachstumsuntersuchungen in Selektivmedium ohne Leucin mit 1% Glukose durchgeführt.

Vergleichbar mit den Wachstumstests auf Mediumsplatten der Chimäre Hxt1/7⁸⁴, Hxt7/1³⁶⁹ und Hxt7/1⁴⁸⁴ zeigten auch die Wachstumsuntersuchungen in Flüssigkultur, dass die An- und Abwesenheit von Gsf2 keinen Einfluss auf Hxt1/7⁸⁴, einen geringen Einfluss auf Hxt7/1⁴⁸⁴ und einen starken Einfluss auf das Wachstum mit Hxt7/1³⁶⁹ auf Glukose hat. Bei den neu klonierten p425TM1-TM6 Plasmiden zeigte sich, dass das Wachstumsverhalten identisch mit den genomisch-integrierten Chimären in die KOY-Stämme war: In allen 6 Fällen führte die Abwesenheit von Gsf2 zu einem deutlich verlangsamten Wachstumsverhalten. Ein Vergleich der Transformationen mit pHxt1/7⁸⁴ und p425TM1 führte somit auch weiterhin zu der widersprüchlichen Feststellung, dass der N-Terminus von Hxt1 im Falle von p425TM1 (77 AS) ausreichend ist, damit das Chimär bei Abwesenheit von Gsf2 nicht mehr zur Plasmamembran transloziert wird, während im Falle von Hxt1/7⁸⁴ ein N-Terminus von 84 AS von Hxt1 nicht ausreicht, um denselben Effekt zu beobachten (vgl. Abb. 33).

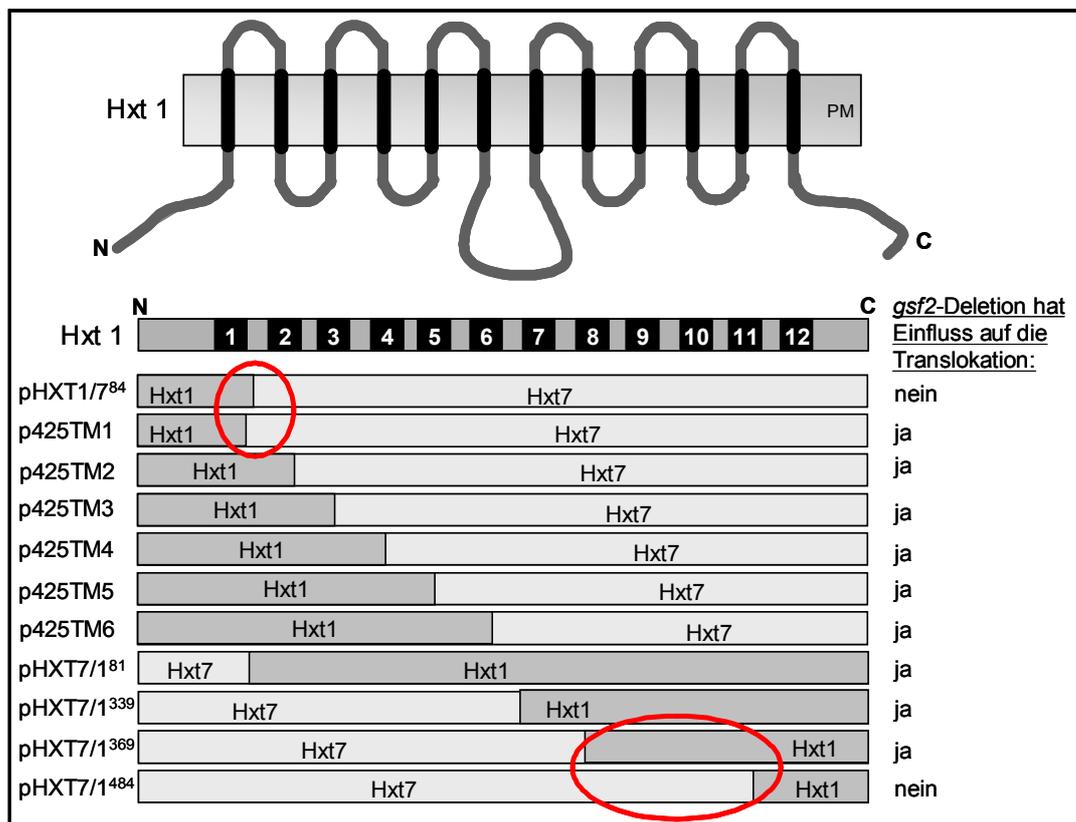


Abb. 33: Schematische Darstellung aller getesteten Chimäre.

Die Ergebnisse der Wachstumsstudien verschiedener Chimäre legten die Vermutung nahe, dass als Erkennungssequenz von Hxt1 für Gsf2 nicht eine einzelne Proteindomäne entscheidend ist. Eventuell spielt die räumliche Anordnung der 12 Transmembrandomänen und der cytoplasmatischen Bereiche zueinander eine

wichtige Rolle für die Erkennung durch Gsf2, so dass durch den Austausch einzelner Sequenzbereiche kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden kann.

4 DISKUSSION

4.1 Hxt1/4-Chimär

Bei der durch Sherwood *et al.* (2000) identifizierten Mutation *GSF4-1* handelte es sich um ein chimäres Protein der Hexosetransporter Hxt1 und Hxt4. Durch die Klonierung und Expression des *HXT1/4*-Chimärs konnten im Rahmen dieser Arbeit die Eigenschaften des Chimärs näher charakterisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit des Chimärs eine Verlangsamung des Wachstums zur Folge hatte. Dieser Wachstumsphänotyp war allerdings nicht auf das Wachstum auf Glukose als Kohlenstoffquelle beschränkt, sondern war auf allen getesteten Kohlenstoffquellen (Glukose, Galaktose, Maltose und Ethanol) zu beobachten. Die zunächst vermutete Annahme, dass die Anwesenheit der Hexosetransportergene in den *HXT*-Einzelexpressionsstämmen auch bei Wachstum auf alternativen Kohlenstoffquellen einen negativen Wachstumseffekt auslösen könnte, wurde widerlegt. Mittels Wachstumsstudien des *hxt*-Nullstammes *EBY.VW4000* konnte gezeigt werden, dass auch bei Abwesenheit aller Hexosetransporter das Hxt1/4-Chimär zu einem verlangsamten Wachstum führt. Der durch das Chimär verursachte Wachstumsphänotyp hatte seine Ursache somit nicht in der An- oder Abwesenheit der Hexosetransporter. Die Glukoseaufnahmemessungen bestätigten, dass das Hxt1/4-Chimär keinen Einfluss auf die Hexosetransporter hat, da die Glukoseaufnahme in die Hefezelle von dem Chimär unbeeinflusst blieb. Die von Sherwood *et al.* (2000) publizierte Hypothese, dass das Chimär mit den nativen Hexosetransportern interagieren und nicht-funktionelle Komplexe bilden würde, konnte somit widerlegt werden.

Für das verlangsamte Wachstum durch das Hxt1/4-Chimär mußte es somit eine andere Erklärung geben: Entweder interagiert das Hxt1/4-Chimär mit anderen, unter den gewählten Bedingungen benötigten, Transportproteinen. Oder durch das Hxt1/4-Chimär wird ein zentraler zellulärer Prozess so stark beeinträchtigt, dass die Zelle langsamer wächst.

Die Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation zeigte für das Hxt1/4-Chimär eine Lokalisation in intrazellulären Strukturen. Da die Lokalisierung mit dem ER-Marker-Protein Dpm1 übereinstimmte, ist eine Lokalisierung im ER wahrscheinlich. Diese Beobachtung hatte zur Folge, dass die zuvor getroffene Aussage über die Nicht-Funktionalität des Chimärs revidiert werden mußte. Die Wachstumsuntersuchung des *hxt*-Nullstammes *EBY.VW4000* mit Hxt1/4-Chimär auf Glukosehaltigem Medium hatte angedeutet, dass das Chimär nicht in der Lage ist Glukose

zu transportieren. Durch die intrazelluläre Lokalisierung des Chimärs konnte allerdings im nachhinein nicht mehr beurteilt werden, ob das Chimär theoretisch in der Lage ist, Glukose zu transportieren.

Anstelle dessen stellte sich die Frage, ob die ER-Lokalisation des Chimärs auf eine ER-Retention aufgrund einer Falschfaltung zurückzuführen war. Die sehr geringen Messwerte des β -Galaktosidase-Reportersystems bei der Untersuchung des UPR-Signalweges zeigten, dass das Hxt1/4-Chimär im ER nicht falsch gefaltet vorliegt. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass eine Aggregation falsch gefalteter Chimär-Proteine im ER für das verlangsamte Wachstum verantwortlich war.

Es blieben somit zumindest zwei Gründe, warum das Hxt1/4-Chimär zu einem verlangsamten Wachstum der Hefezellen führt: Entweder interagiert das Chimär im ER mit anderen Transport- oder Membranproteinen als den Hexosetransportern und hemmt deren Sekretion, oder das Chimär verursacht im ER ein Problem für die Zelle, das unabhängig von der Translokation der Transportproteine ist. Eine Interaktion des Chimärs mit einem anderen Transportprotein ist vorstellbar. Neben den endogenen Hexosetransportern der Hefe, die einen Aufbau aus 12 Membran-durchspannenden Domänen mit cytosolischem N- und C-Terminus aufweisen (Kruckeberg, 1996), sprechen die Ergebnisse des UPR-Signalweges dafür, dass auch das Chimär korrekt gefaltet und in die ER-Membran integriert vorliegt. Es wird postuliert, dass einige Transportproteine durch Oligomerisierung ihre Funktion an den Membranen ausüben. Für den Säuger-Zuckertransporter GLUT1 konnte gezeigt werden, dass die GLUT1-Untereinheiten ein Tetramer, vermittelt über intramolekulare Disulfidbrücken, bilden (Hebert und Carruthers, 1991;1992; Zottola *et al.*, 1995). Die Gemeinsamkeit des Chimärs mit anderen Membranproteinen, die ebenfalls hydrophile und hydrophobe Proteindomänen besitzen, könnte eine Interaktion ermöglichen. Möglicherweise interagiert das Hxt1/4-Chimär mit einem Membranprotein, das unter den getesteten Bedingungen in der Zelle benötigt wird. Somit könnte das Chimär die Translokation des Proteins zu seiner Zielmembran behindern, und somit im Falle eines Transporters die Aufnahme seines Substrates in die Zelle unterbinden und zu einem verlangsamten Wachstum führen. Bei einem Einfluss des Chimärs unabhängig von Transportproteinen wäre denkbar, dass das Chimär spezielle Proteine oder Faktoren, die im ER lokalisiert sind, bindet und somit entweder indirekt die Translokation oder aber andere Prozesse in der Zelle behindert. So könnte z.B. durch den Abbau des Chimärs aus dem ER über das ERAD-System viel Energie in Form von ATP verbraucht werden oder bei der Polyubiquitinierung des Chimärs im Cytoplasma Ubiquitin dem zellulären

Ubiquitin-Pool entzogen werden. Alternativ könnte der Abbau der Chimäre auch mittels Vesikeltransport über die Vakuole erfolgen. Eventuell entsteht hierbei eine Konkurrenzsituation zwischen der Translokation des Chimärs und der Translokation anderer Proteine. Bei einer Translokation des Chimärs über den Golgi-Apparat könnten Rezeptorproteine limitierend wirken, die entweder zur Verpackung in COPII-Vesikel oder als SNARE-Proteine zum Andocken an die Golgi-Membran benötigt werden.

Es ist schwer vorstellbar, welchen zellulären Prozess das Chimär im ER beeinflussen soll, so dass die Zelle zwar schlechter wachsen kann, die Hexosetransporter allerdings unverändert zur Plasmamembran transloziert werden. Wahrscheinlicher erscheint eine direkte Interaktion des Chimärs im ER mit anderen Proteinen, die eventuell eine ähnliche Topologie wie die Hexosetransporter aufweisen und die durch die Interaktion nicht mehr funktionell sind. Einen detaillierteren Einblick in die Funktion des Hxt1/4-Chimärs könnte man erhalten, wenn Proteine identifiziert würden, die aufgrund des Chimärs tatsächlich in geringerer Anzahl transloziert werden. Ein erster Ansatzpunkt wäre, andere Transporter der Zuckerpermease-Familie (Abb. 1) auf ihre Lokalisation und ihre Transportfähigkeiten zu überprüfen.

Die bei Sherwood und Carlson (1997; 2000) publizierten Ergebnisse hinsichtlich des Chimärs zeigten eine 20fach erhöhte Expression von *SUC2* bei Wachstum auf Glukose, wenn das Chimär anwesend ist. Sie postulierten, dass aufgrund der verminderten Anzahl an funktionellen Hexosetransporter-Komplexen der Glukosetransport inhibiert und der Glukoserepressionsphänotyp aufgehoben sei. Allerdings war bei ihren Experimenten kein Wachstumsunterschied zwischen den Stämmen mit und ohne Chimär zu beobachten. Eine mögliche Erklärung für den *SUC2*-Phänotyp ist, dass eine Komponente des Glukoserepressionssignalweges durch das Chimär nicht an seinen Zielort in der Zelle gelangen kann. Entweder weil auch diese Komponente über das ER transloziert werden muß, oder weil das Chimär mit diesem Protein direkt interagiert. Oder es handelt sich um eine der Komponenten des Glukosesignalweges, die normalerweise direkt mit den Hexosetransportern oder den Glukosesensoren in Interaktion tritt und bei der Generation des Glukosesignals an der Plasmamembran eine Rolle spielen. Ein Kandidat wäre z.B. Std1, das bei der Glukoserepression und auch bei der Expression der Hexosetransporter eine wichtige Rolle spielt und normalerweise mit dem C-Terminus der Glukosesensoren interagiert (Kuchin *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 1999; Lafuente *et al.*, 2000; Schulte *et al.*, 2000). Eventuell bindet Std1 bei Anwesenheit des Chimärs nicht an die Glukosesensoren, sondern aufgrund ähnlicher Topologie an das Chimär und steht für seine eigentliche

Aufgabe an der Plasmamembran nicht mehr zur Verfügung. Dann wäre allerdings aufgrund einer veränderten Expression der Hexosetransporter auch die Glukoseaufnahme verändert, was durch Glukoseaufnahme-Messungen widerlegt wurde. Ein zweiter Kandidat wäre die noch unbekannt Komponente der Glukoserepression, die an der Signalauslösung beteiligt ist. Eventuell handelt es sich bei diesem noch unbekanntem Protein um ein Membranprotein, das an der Plasmamembran mit den Hexosetransportern in Interaktion tritt und das intrazelluläre Glukosesignal des Glukoserepressions-Signalweges generiert. Die Anwesenheit des Hxt1/4-Chimärs könnte zu einer Interaktion zwischen dem noch unbekanntem Protein und dem Chimär führen, die Translokation des Proteins zur Plasmamembran unterbinden und somit die Auslösung eines Glukosesignals unterbinden.

4.2 Gsf2

Sherwood und Carlson (1999) zeigten, dass das ER-Protein Gsf2 notwendig ist, um einzelne Hexosetransporter zur Plasmamembran zu translozieren. Sie konnten nachweisen, dass in *gsf2*-Mutanten der niederaffine Hexosetransporter Hxt1 und der Galaktosetransporter Gal2 im ER akkumulieren, während Hxt2 weiterhin an der Plasmamembran lokalisiert ist.

4.2.1 Gsf2 hilft bei der Translokation verschiedener Hexosetransporter

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass Gsf2 in der Zelle notwendig ist, um verschiedene Hexosetransporter zur Plasmamembran zu translozieren. Der Einfluss einer *gsf2*-Deletion auf die verschiedenen Hexosetransporter erwies sich als unterschiedlich stark ausgeprägt. Während die niederaffinen Hexosetransporter (Hxt1, Hxt3) eine starke Beeinflussung durch Gsf2 zeigten, war bei den übrigen Hexosetransportern (Hxt2, Hxt4, Hxt5, Hxt7) nur eine geringe oder gar keine Beeinflussung zu beobachten.

Frühere fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen von GFP-Gsf2 Konstrukten (Sherwood und Carlson, 1999) und die Lokalisationsvorhersage aufgrund des Dilysin-Motivs (ER-Retentionssignal) von Gsf2 konnten bestätigt werden: Eine HA-getaggte Gsf2-Version zeigte im Saccharosedichtegradienten eine Lokalisation in Fraktionen, die das ER repräsentieren. Die Lokalisationsuntersuchungen der Hexosetransporter Hxt1, Hxt5-HA und Hxt7 bestätigten die Ergebnisse der Wachstumsstudien: Die *HXT5*- und *HXT7*-Einzelexpressionsstämme zeigten unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Gsf2 keinen veränderten

Wachstumsphänotyp und dementsprechend eine unveränderte Lokalisation an der Plasmamembran. Im Gegensatz dazu führte die Abwesenheit von Gsf2 in dem *HXT1*-Einzelexpressionsstamm zu einem stark verlangsamtes Wachstum auf Glukose-haltigem Medium, und die Lokalisationsuntersuchung zeigte dementsprechend, dass Hxt1 bei Abwesenheit von Gsf2 im ER zurückgehalten wird. Gsf2 ist somit in der Zelle notwendig, damit Hxt1, Hxt3 und die Galaktosepermease Gal2, zur Plasmamembran transloziert werden und Glukose bzw. Galaktose über diese Transporter aufgenommen werden kann.

4.2.2 Gsf2 hat keinen Einfluss auf die Konformation von Hxt1

Sherwood und Carlson (1999) hatten publiziert, dass Hxt1-GFP in Abhängigkeit von der An- und Abwesenheit von Gsf2 ein unterschiedliches Laufverhalten in der Western-Blot-Analyse zeigt. Bei Abwesenheit von Gsf2 hatte Hxt1-GFP eine größere elektrophoretische Mobilität als bei Anwesenheit von Gsf2. Verschiedene Experimente im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Beobachtung nicht bestätigen. Es war kein Unterschied in der elektrophoretischen Mobilität von nativem Hxt1 in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit von Gsf2 zu beobachten. Auch der Verzicht auf Denaturierungshilfen führte zu keiner veränderten elektrophoretischen Mobilität von Hxt1. Diese Ergebnisse waren ein erstes Anzeichen dafür, dass Hxt1 im ER nicht in einer anderen Konformation oder Modifikation als an der Plasmamembran vorliegt und Gsf2 somit keine Aufgabe bei der Faltung oder Modifikation von Hxt1 hat.

Die Ergebnisse aus weiteren Experimenten, dass zum einen chemische Chaperone als so genannte Faltungshilfen keinen Einfluss auf den Hexose-transporter Hxt1 im ER hatten, und dass zum anderen das im ER zurückgehaltene Hxt1 den UPR-Signalweg nicht induzierte, deuteten darauf hin, dass Hxt1 im ER nicht falsch gefaltet vorliegt. Mit Hilfe einer *doa4*-Deletion in einem *gsf2*-Deletionsstamm konnte ein kleiner Teil von Hxt1, aufgrund des fehlenden Protein-Abbauweges, zur Plasmamembran transloziert werden. Diese erzwungene Translokation ermöglichte eine Funktionalitätsuntersuchung von Hxt1. Es zeigte sich, dass Hxt1 auch bei Abwesenheit von Gsf2 in dem *doa4*-Deletionsstamm in der Lage ist Glukose zu transportieren. Somit war sichergestellt, dass Gsf2 keinen Einfluss auf die Modifikation oder Konformation von Hxt1 hatte.

Da eine Funktion bei der Konformationsbildung oder bei der Modifikation für Gsf2 ausgeschlossen wurde, blieb für Gsf2 alternativ eine Aufgabe bei der Translokation oder bei der Verpackung von Hxt1, Hxt3 und Gal2 in Transportvesikel.

4.2.3 Topologie von Gsf2

Die Interaktionsstudien von Gsf2 im Split-Ubiquitin System gaben einen ersten Hinweis darauf, dass Gsf2 nicht, wie von Sherwood und Carlson (1999) postuliert, nur eine Transmembrandomäne besitzt. Anhand eines Kyte-Doolittle Hydrophobizitäts-Plots konnte ein zweiter hydrophober Aminosäuresequenzbereich N-terminal der ersten postulierten Transmembrandomäne identifiziert werden. Mittels Integration eines Suc2-Reporters, der bei einer Lokalisation im ER-Lumen glykosyliert wird, konnte die zweite Transmembrandomäne von Gsf2 identifiziert werden. Die Integration des Suc2-Reporters am N- und am C-Terminus führte zu keiner Glykosylierung, wodurch nachgewiesen war, dass beide Termini im Cytosol lokalisiert waren. Im Gegensatz dazu zeigte die Integration zwischen den zwei im Hydrophobizitäts-Plot erkennbaren hydrophoben Bereichen eine Glykosylierung des Suc2-Reporters, so dass geschlußfolgert werden konnte, dass dieser Bereich im ER-Lumen lokalisiert ist. Somit war nachgewiesen worden, dass Gsf2 nicht nur eine sondern mindestens zwei Transmembrandomänen besitzt.

4.2.4 Gsf2 interagiert nicht mit einer bestimmten Proteindomäne

Die Ergebnisse der Wachstumsuntersuchungen verschiedener Hxt1/7- und Hxt7/1-Chimäre zeigten, dass als Erkennungssequenz für Gsf2 nicht nur eine einzelne Proteindomäne entscheidend ist. Obwohl sich zwei Hxt1/7-Chimäre nur in 7 Aminosäuren in dem Loop zwischen 1. und 2. Transmembrandomäne unterscheiden (pHxt1/7⁸⁴ und p425TM1), zeigte das eine Chimär p425TM1 eine ER-Retention aufgrund der Abwesenheit von Gsf2, während das zweite Chimär (pHxt1/7⁸⁴) normal zur Plasmamembran transloziert wurde. Das zurückgehaltene Chimär hatte mit 77 Aminosäuren einen geringeren Anteil an Hxt1 als das normal translozierte Chimär mit 84 Aminosäuren.

Da Hxt1 auch in Abwesenheit von Gsf2 korrekt gefaltet in der Hefezelle vorliegt, spielt eventuell die räumliche Anordnung der 12 Transmembrandomänen und der extra- und intrazellulären Loops zueinander eine wichtige Rolle bei der Verpackung durch Gsf2. Im Falle der Chimäre könnte somit die Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluss auf die Interaktion der Loops zueinander haben, so dass Gsf2 nicht mit dem Protein in Interaktion treten kann. Für den Säuger-Zuckertransporter GLUT1 wurde ein zwei-dimensionales Modell der Anordnung der Transmembrandomänen gezeigt, bei dem die Transmembrandomänen 5, 7, 8, 10 und 11 zusammen den inneren Kanal und die Zucker-Erkennungsstelle bilden (Mueckler und Makepeace, 2002). Eventuell sind auch

bei den Hefe-eigenen Hexosetransportern bestimmte Proteinbereiche verschiedener Loops zum einen für die Erkennung des Zuckermoleküls und zum anderen als Erkennungsbereich für Gsf2 verantwortlich.

4.2.5 Interaktionspartner von Gsf2

4.2.5.1 Multicopy-Suppressoren

Die im Rahmen einer Internetrecherche ermittelte Interaktion von Gsf2 mit der Glutathion-S-Transferase Gtt1 wurde innerhalb dieser Arbeit verifiziert. Jedoch zeigte weder eine Überexpression noch eine Deletion von *GTT1* in einem *gsf2*-Deletionsstamm einen veränderten Wachstumsphänotyp. Ein Effekt von Gtt1 konnte somit zwar nicht beobachtet werden, auszuschließen war eine physiologische Interaktion mit Gsf2 jedoch nicht. Die publizierte Interaktion von Gtt1 und Gsf2 wurde in einem Two Hybrid-System nachgewiesen. Dabei handelt es sich um ein genetisches System zur Detektion von Proteinwechselwirkungen *in vivo* (Fields und Song, 1989). Ein Protein A wird dabei an die Gal4-DNA-Bindedomäne und ein zweites Protein B an die Gal4-DNA-Aktivierungsdomäne fusioniert. Bei einer Interaktion der Proteine A und B kommen die Binde- und die Aktivierungsdomäne in räumliche Nähe zueinander und reassoziieren zu einem funktionellen Transkriptionsfaktor. Dieser gelangt in den Nukleus und induziert dort spezielle Reportergene. Ein Interaktionstest mittels Two Hybrid-System ist meist nur mit löslichen Proteinen oder löslichen Proteindomänen möglich, die bei einer Reassoziierung der Binde- und Aktivierungsdomäne mit in den Nukleus wandern. Die Interaktion von Gtt1 mit Gsf2 wurde in einer Hefe-weiten Two Hybrid-Analyse von ca. 6000 Proteinen gefunden, bei der ausschließlich native Proteine getestet wurden (Ito *et al.*, 2001). Da es sich im Falle von Gsf2 um ein ER-Membranprotein handelt, das nicht mit in den Nukleus wandern kann, war die publizierte Interaktion mit Gtt1 fragwürdig. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Interaktion allerdings im Split-Ubiquitin System bestätigt werden.

Obwohl ein Zusammenhang zwischen Gsf2 und Gtt1 in Wachstumsstudien nicht zu beobachten war, führten die Experimente zur Identifizierung eines Multicopy-Suppressors. Durch die Entfernung der Deletionsmarke *kanMX* in dem *HXT1*-Einzelexpressionsstamm THY.19 zeigte dieser Wachstum auf Glukose, obwohl der isogene Stamm inklusive *kanMX*, THY.11, auf Glukose-haltigem Medium nicht wachsen konnte. Der Grund für die Fähigkeit auf Glukose-haltigem Medium wachsen zu können, resultierte vermutlich aus der Translokation des Hexosetransporters Hxt1 aus dem ER zur Plasmamembran, trotz Abwesenheit

von Gsf2. Die Erklärung für die Translokation von Hxt1 fand sich auf Genom-Ebene: Eine Gen-Karte von Chromosom VIII der Hefe zeigte die räumliche Nähe von *GSF2* und *RSE1*. Eine Überexpression von *RSE1* führte zu einem identischen Wachstumsphänotyp wie der Stamm THY.19. Die Entfernung des *kanMX*-Markers hatte vermutlich einen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität von *RSE1*. Entweder wurde durch die Entfernung des *kanMX*-Deletionsmarkers eine Repressor-Bindestelle unzugänglich, oder ein Transkriptionsaktivator wurde in räumliche Nähe zu dem Start-Codon von *RSE1* gebracht. Jedenfalls führte die Entfernung des *kanMX*-Markers ebenso wie eine Überexpression von *RSE1* dazu, dass Hxt1 zur Plasmamembran transloziert wurde.

Es konnte ein physiologischer Zusammenhang zwischen Rse1 und Sar1, einem GTP-Bindeprotein, das für die COPII-Vesikelbildung notwendig ist, hergestellt werden. Rse1 ist mit dem kleinen nukleären RNA-Proteinkomplex (snRNP) U2 assoziiert und spielt eine Rolle beim Splicing der prä-mRNA in der Hefezelle (Caspary *et al.*, 1999; Gottschalk *et al.*, 1999). Auch für das korrekte Splicing von *SAR1*-mRNA wird Rse1 benötigt (Chen *et al.* 1998). Die Vermutung lag nahe, dass die Überexpression von *RSE1* zu einer erhöhten Bildung von Sar1 führen würde. Der bei Abwesenheit von Gsf2 im ER zurückgehaltene Hexosetransporter Hxt1 könnte durch das erhöhte Vorkommen an Sar1 in COPII-Vesikel verpackt und zur Plasmamembran transloziert werden. Ein Zusammenhang zwischen den Wachstumsphänotypen und Sar1 konnte bestätigt werden: Die Überexpression von *SAR1* führte zu einem identischen Wachstumsphänotyp wie die Überexpression von *RSE1*. Unerwartet war allerdings, dass die An- oder Abwesenheit des Introns von *SAR1* keinen Unterschied im Wachstum verursachte. Erwartet worden war, dass bei Überexpression der Intron-freien *SAR1*-Sequenz im Vergleich zur Intron-haltigen Version mehr Sar1-Protein gebildet würden und somit Hxt1 entweder in größeren Mengen oder in kürzerer Zeit zur Plasmamembran gelangen würde. Die Wachstumsstudie zeigte jedoch, dass die Transformanten mit Intron-freier *SAR1*-Sequenz weder besser auf Glukose wachsen konnten, noch dass die lag-Phase kürzer war. Vermutlich führte alleine die Überexpression von *SAR1* inklusive Intron dazu, dass größere Mengen an *SAR1*-prä-mRNA gespliziert wurden. Eventuell resultierte die Überexpression von *SAR1* mit und ohne Intron auch in unterschiedlich großen Mengen an Sar1-Protein, was jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum hatte, da die Menge an Sar1 alleine durch die Überexpression von *SAR1* mit Intron für die Translokation von Hxt1 ausreichend war. Möglicherweise wurde bei der Überexpression von *SAR1* ohne Intron auch eine Konzentration an Sar1 in der Zelle erreicht, die nicht mehr zu einer erhöhten Translokation von Hxt1 führen konnte, da andere beteiligte

Proteine bei der COPII-Vesikelbildung limitierend wurden. So müssen die Coatomer-Proteine Sec13, Sec31, Sec23 und Sec24 nach Bildung, Abschnürung und Zerfall der Hülle erst wieder zum ER recycelt werden, bevor sie für eine neue COPII-Vesikelbildung zur Verfügung stehen. Neben den Coatomeren muß aber auch Sar1-GDP erst durch GTP erneut aktiviert werden, bevor sich neue Vesikel formieren können. Eventuell wirkt auch der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Sec12 limitierend, der für die Aktivierung von Sar1 verantwortlich ist, indem er GTP gegen das gebundene GDP von Sar1 austauscht (Nakano *et al.*, 1988; Oka *et al.*, 1991; Barlowe und Schekman, 1993). Vermutlich führten alle Überexpressionsexperimente von *RSE1* und *SAR1* zu einer Erhöhung der zellulären Sar1-Proteinkonzentration. Das verzögerte Wachstum mit einer extrem verlängerten lag-Phase (Anlaufphase) war in allen Fällen zu beobachten. Dies könnte auf die zeitliche Dauer bis Hxt1 bei Abwesenheit von Gsf2 in die COPII-Vesikel verpackt wird, zurückgeführt werden. Ein ähnlicher Wachstumsphänotyp war auch in der *doa4*-Deletionsmutante THY.50 zu beobachten: Auch dieser Stamm zeigte bei Wachstum auf Glukose eine stark verlängerte lag-Phase von 10-15 Stunden, was ebenfalls auf die Dauer, bis Hxt1 zufällig in COPII-Vesikel mit eingeschlossen wird, zurückgeführt wurde. Eventuell resultierte die verlängerte lag-Phase im Falle der *RSE1* und *SAR1* aber auch aus einer Überlagerung des positiven Effekts auf Hxt1 und des negativen Effekts einer *SAR1*-Überexpression auf das generelle Wachstumsverhalten der Zelle. Wie in anderen Hefestämmen zu beobachten war, führte die Überexpression von *SAR1* dort zu einem generell verlangsamten Wachstum der Zellen (vgl. Kapitel 3.5).

Sar1 gilt als GTP-Bindeprotein als Initiator der COPII-Vesikelbildung. Es stellte sich heraus, dass die Überexpression anderer Proteine, die an der Bildung der COPII-Vesikel beteiligt sind, wie Sec12, Sec16, Sec23 oder Sec24, keinen Einfluss auf die Translokation von Hxt1 zur Plasmamembran hatten. Vermutlich spielt Sar1 bei Abwesenheit von Gsf2 eine entscheidende Rolle bei der Verpackung von Hxt1 in COPII-Vesikel, die von anderen Coatomer-Proteinen nicht übernommen werden kann. So wäre eine direkte Interaktion des Hexosetransporters Hxt1 mit Sar1 denkbar, die zu einer Verpackung in die COPII-Vesikel führt. Ähnliches konnte für Golgi-Glykosyltransferasen nachgewiesen werden, die mit Sar1 direkt über eine C-terminales Motiv interagieren und in die COPII-Vesikel rekrutiert werden (Giraudo und Maccioni, 2003).

Die Bedeutung, die Sar1 als Multicopy-Suppressor von Gsf2 hat, wodurch Hxt1 zur Plasmamembran transloziert wird, wurde dadurch verstärkt, dass die Überexpression von *SAR1* bei anderen im ER zurückgehaltenen Proteinen keinen positiven Einfluss auf deren Translokation hatte. Der Versuch, die zwei Proteine

GLUT4 und Gap1 zur Plasmamembran zu translozieren, zeigte keinen Erfolg. Im Falle des Säuger-Glukosetransporters GLUT4, der bei heterologer Expression in Hefe im ER zurückgehalten wird (Wieczorke *et al.*, 2003; Dlugai, 2003), resultierte die Überexpression von *SAR1* nicht in einer Translokation des Transporters zur Plasmamembran. Im Gegenteil, die Überexpression von *SAR1* führte zu einer Verschlechterung des Wachstums. Die generelle Aminosäurepermease Gap1 wird in *shr3*-Deletionsstämmen ebenfalls zu großen Anteilen im ER zurückgehalten (vgl. Kapitel 1.4) (Ljungdahl *et al.*, 1992). Die Überexpressionen von *SAR1* und *GSF2* führten auch in diesem Versuch zu keiner positiven Translokation von Gap1. Anstelle dessen war zu beobachten, dass die Überexpression von *SAR1* und *GSF2* das langsame Wachstum der Stämme noch verschlechterte. Ein möglicher Erklärungsansatz, dass GLUT4 und Gap1 zwar zur Plasmamembran transloziert wurden, die Proteine allerdings nicht funktionell waren und somit keinen positiven Wachstumsphänotyp zeigen konnten, konnte für Gap1 widerlegt werden, da frühere Experimente zeigten, dass Gap1 unabhängig von Shr3 korrekt in der ER-Membran orientiert vorliegt (Gilstring *et al.*, 1999; Gilstring und Ljungdahl, 2000).

Die Überexpressionsstudien zeigten somit, dass weder Gsf2 noch Sar1 eine generelle Translokation von im ER zurückgehaltenen Proteinen zur Plasmamembran ermöglichen können. Die Überexpression von *SAR1* führte zu einer Translokation von Hxt1 zur Plasmamembran, zeigte in den übrigen Versuchen allerdings einen negativen Wachstumseffekt. Die Translokation von Hxt1 bei Überexpression von *SAR1* kann somit nicht auf ein generelles Phänomen zurückgeführt werden. Sar1 zeigte einen gezielten Einfluss auf die Translokation von Hxt1 bei in Abwesenheit von Gsf2. Dies könnte möglicherweise auf eine direkte Interaktion, wie sie für Golgi-Glykosyltransferasen nachgewiesen wurden (Giraudo und Maccioni, 2003), zurückzuführen sein. Die verlängerte lag-Phase, bis Hxt1 zur Plasmamembran transloziert wird, könnte aus einer Überlagerung des negativen Wachstumseffektes der *SAR1*-Überexpression auf die Zelle und des positiven Einflusses auf die Translokation von Hxt1 resultieren.

4.2.5.2 Genetische Interaktionspartner

Die Suche nach genetischen Interaktionen von Gsf2 mit anderen Sec-Proteinen ergab eine Reihe von positiven Ergebnissen. Außer den *sec13-1*- und *sec16-2*-Stämmen zeigten alle bei der restriktiven Temperatur ein verändertes Wachstumsverhalten in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit von Gsf2. Im Gegensatz zu *sec13-1* zeigte der *sec13-4*-Stamm im Tropftest einen deutlichen Einfluss bei der Überexpression von *GSF2*. Obwohl in beiden Stämmen dasselbe Gen *SEC13* betroffen ist, waren unterschiedliche Resultate zu beobachten. Dies

könnte daraus resultieren, dass bei den gewählten restriktiven Temperaturen der Einfluss einer *GSF2*-Überexpression im *sec13-4*-Stamm deutlicher zur Geltung kam als im *sec13-1*-Stamm. Bei einer feineren Abstufung der gewählten Temperaturen wäre der Effekt möglicherweise auch in dem *sec13-1*-Stamm zu beobachten gewesen. Eventuell führte aber auch ein Unterschied in der Stabilität oder in der durch die Mutation beeinträchtigten Funktion des Proteins zu unterschiedlichen Wachstumsphänotypen. Die Tropftests zeigten, dass *GSF2* genetisch sowohl mit Genen interagiert, die eine Rolle bei der Bildung der COPII-Vesikel spielen (wie *SEC12*, *SEC13* und *SEC23*), als auch mit Genen, die im Sekretionsweg wichtig sind (wie *SEC18* und *SEC62*). *Sec18* spielt eine entscheidende Rolle bei der Membranfusion der Vesikel mit der Golgi-Membran (Barlowe, 1997). Bei *Sec62* handelt es sich um ein Komponente der posttranslationalen Translokations-Maschinerie (Wittke *et al.*, 2000). Gut zu beobachten war, dass die Überexpression von *GSF2* schon bei permissiver Temperatur einen negativen Wachstumseffekt zeigte. Damit bestätigten sich die Beobachtung aus den Wachstumsstudien der Aminosäurepermease *Gap1*. Dies könnte darin begründet sein, dass das gehäufte Vorkommen des ER-Proteins *Gsf2* entweder die Translokation anderer Proteine aus dem ER willkürlich behindert oder gezielt fördert, oder durch die gehäufte Retrotranslokation von *Gsf2* vom Golgi zum ER in COPI-Vesikeln die Retrotranslokation anderer Proteine vernachlässigt wird.

Die positiven genetischen Interaktionen reichen von Komponenten der Proteintranslokation in die ER-Membran (*Sec62*), über die Bildung der COPII-Vesikel (*Sec12*, *Sec13*, *Sec23*) bis hin zur Fusion der Vesikel mit der Golgi-Membran (*Sec18*). Für *Gsf2* vorstellbar wäre daher eine Aufgabe, die direkt nach der Translokation des Proteins in das ER bzw. in die ER-Membran beginnt und bis zur Fusion mit der Golgi-Membran verläuft. Obwohl die meisten Membranproteine direkt an die COPII-Vesikel binden, wäre eine Aufgabe von *Gsf2* als Exportrezeptor, der *Hxt1* bei der Translokation an der ER-Membran direkt aus dem Translokationstransport übernimmt, denkbar (Kuehn *et al.*, 1998; Aridor *et al.*, 1998; Votsmeier und Gallwitz, 2001). Eventuell ist die Interaktion von *Gsf2* mit *Sec62* aber nicht nur auf die Translokation von *Hxt1* in die ER-Membran beschränkt. Für andere Komponenten der Translokations-Maschinerie, *Sec63* und *Sec71*, konnte nachgewiesen werden, dass auch sie aus dem ER zum Golgi transportiert werden. Die Retrotranslokation verläuft in diesen Fällen über den *Rer1*-abhängigen Rücktransport (Sato *et al.*, 1996; 1997). Eventuell erfüllen die ER-ständigen Komponenten der posttranslationalen Translokations-Maschinerie, *Sec63*, *Sec62* und *Sec72*, neben der Translokation von Proteinen noch weitere Aufgaben im ER, wie z.B. die Übergabe der Proteine an die entsprechenden

Rezeptoren in den COPII-Vesikeln. Manche Membranproteine und ein Großteil der löslichen Proteine im ER binden nur indirekt mit Hilfe von Exportrezeptoren an die COPII-Vesikel (Appenzeller *et al.*, 1999; Muniz *et al.* 2000; Powers und Barlowe, 2002). Diese Exportrezeptoren verlassen das ER meist gemeinsam mit dem zu transportierenden Protein, lassen das Protein im Zielkompartiment (Golgi-Apparat) frei und werden selbst mittels Retrotranslokation zum ER recycelt. Wenn man für Gsf2 eine Rolle als Exportrezeptor im ER postuliert, liegt ein Vergleich mit den Mitgliedern der p24-Familie nahe. Dabei handelt es sich um 8 verwandte Transmembranproteinen (Erp1, Erp5, Erp6, Erp24, Erp2, Erp3, Erp4 und Erv25) denen ebenfalls eine Rolle als Hilfsproteine oder Rezeptoren im Sekretionsweg zugeschrieben wird. Identisch mit Gsf2 handelt es sich bei allen p24-Proteinen um Membran-ständige Proteine. Teilweise konnte nachgewiesen werden, dass die p24-Proteine mit Sar1 und Arf1 interagieren und in COPII- und COPI-Vesikeln lokalisiert sind (Belden und Barlowe, 1996; 2001; Schimmoller *et al.*, 1995; Sohn *et al.*, 1996). Im Vergleich zu Gsf2, dessen Deletion in einer Akkumulation von Hxt1 im ER resultiert, führt die Deletion von p24-Genen zu einem verzögerten Transport von Proteinen wie der Glukanosyltransferase Gas1 und der Invertase aus dem ER (Belden und Barlowe, 1996; Elrod-Erickson und Kaiser, 1996).

4.2.5.3 Proteininteraktionen

Die Beobachtungen, dass bei Abwesenheit von Gsf2 Hxt1 im ER zurückgehalten wird, während Hxt7 weiterhin die Plasmamembran erreicht, führte zu der Vermutung, dass Gsf2 mit Hxt1, nicht aber mit Hxt7 interagiert. Um die Interaktion der Membranproteine *in vivo* zu untersuchen, wurde das Split-Ubiquitin System verwendet. Hierbei wurden gezielt Proteine ausgewählt und ihre Interaktion überprüft. Getestet wurden Interaktionen von Gsf2 mit Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt7 und Gtt1. Bei den Interaktionstests mittels β -Galactosidaseaktivitäts-Bestimmung zeigte sich, dass Hxt1-CubPLV und Hxt3-CubPLV mit NubG-Gsf2 und NubG-Gsf2^{STOP} interagieren. Die übrigen Messungen von Hxt2-CubPLV, Hxt7-CubPLV und Gtt1-CubPLV mit NubG-Gsf2 oder NubG-Gsf2^{STOP} zeigten keine oder nur sehr schwache Interaktionen. Auch mittels X-Gal Overlay-Assay konnten die unterschiedlichen Interaktionsstärken der Hexosetransporter mit Gsf2 sichtbar gemacht werden. Wie schon durch die Wachstumsstudien der Einzelexpressionsstämme zu vermuten, waren starke Interaktionen zwischen Hxt1 bzw. Hxt3 und Gsf2 zu beobachten, während die Interaktion von Hxt7 mit Gsf2 schwächer ausfiel und Hxt2 mit Gsf2 keine Interaktion zeigte. Auffallend war, dass in allen Fällen keine Interaktion mit Gsf2-NubG beobachtet werden konnte. Eventuell war dies auf eine Konformation, in der das NubG nicht für eine Interaktion mit CubPLV zugänglich war, zurückzuführen. Die Funktionalität des Proteins Gsf2-NubG war davon jedoch

nicht beeinträchtigt. NubG-Gtt1 interagiert in dem Split-Ubiquitin Test mit Hxt1, etwas schwächer mit Hxt7 und nicht mit Hxt2. In umgekehrter Kombination zeigte Gtt1-Cub-PLV eine Interaktion mit NubG-Gsf2 und NubG-Gsf2^{STOP}. Der Interaktionstest von Gsf2-CubPLV mit den Hexosetransportern zeigte, dass Gsf2 mit allen N-terminalen NubG-Fusionen interagiert, mit den C-terminalen Fusionen jedoch nicht. Ob es sich bei den beobachteten Interaktionen der Hexosetransporter und Gsf2 mit Gtt1 um physiologisch bedeutsame Interaktionen handelt, war auch nach den Split-Ubiquitin Untersuchungen unklar. Bei anderen Interaktionsuntersuchungen von ER-Proteinen hatte sich zuvor gezeigt, dass alleine die räumliche Nähe im ER oder in Transportvesikeln zu einer positiven Interaktion führen kann (Dlugai, 2003).

Das Split-Ubiquitin System zeigte, dass Gsf2 bei N-terminaler Fusion von NubG mit den Hexosetransportern Hxt1 und Hxt3 stark, mit Hxt7 schwächer und mit Hxt2 nicht interagiert, wie es nach den Wachstumsstudien zu erwarten war. Es war kein Unterschied in der Interaktionsstärke zwischen pNubG-GSF2 und pNubG-GSF2^{STOP} zu beobachten, obwohl durch die Expression der Linkersequenz bei NubG-Gsf2 das Dilysin-Motiv verdeckt wurde. Das Protein war trotzdem funktionell, was darauf zurückgeführt werden konnte, dass das Dilysin-Motiv nicht benötigt wurde, da NubG-GSF2 überexprimiert wurde und somit immer neues Protein synthetisiert wurde. Eventuell ist das Dilysin-Motiv aber auch unter natürlichen Bedingungen in der Zelle nicht essentiell, weil entweder eine Retrotranslokation nicht notwendig ist, oder weil Gsf2 über weitere Erkennungsmotive verfügt, die eine Retrotranslokation ermöglichen. Die positiven Interaktionen mit Gsf2 nach N-terminaler Fusion von NubG waren außerdem ein Indiz dafür, dass Gsf2 mindestens zwei Transmembrandomänen hat, was durch die Topologie-Untersuchungen bestätigt werden konnte.

Mittels „Tandem-Affinitäts-Aufreinigung“ (TAP) sollten unbekannte Interaktionspartner von Gsf2 identifiziert werden, um so die Aufgabe von Gsf2 in der Hefezelle besser zu verstehen. Mit Hilfe einer massenspektrometrischen Analyse wurden die mit Gsf2 aufgereinigten Proteine identifiziert. Neben den Interaktionspartnern Tef1/Tef2, Sse1 und Kap123, die wahrscheinlich keine physiologische Bedeutung hatten, da sie auch bei einer anderen TAP-Aufreinigung gefunden wurden, wurden auch Vma2 und Ssb1 als „falsch-positiv“ eingestuft, da sie nah-verwandte Proteine (Vma1 und Ssb2) aus einer zweiten Aufreinigung waren. Die Zugabe des Detergens TritonX100, um Gsf2 aus der ER-Membran zu lösen, hat wahrscheinlich dazu geführt, dass verschiedene Hitzeschockproteine an die hydrophoben Transmembrandomänen von Gsf2 gebunden haben und daher mit aufgereinigt wurden. Auch eine Interaktion von Gsf2 mit der Pyruvatkinase Cdc19

konnte ausgeschlossen werden und wurde darauf zurückgeführt, dass in der Hefezelle sehr große Mengen an Cdc19 bei Wachstum auf Glukose vorkommen (291000 ± 24100 Proteine pro Zelle; <http://yeastgfp.ucsf.edu/>), die Kinase allerdings keine Aufgabe in Zusammenhang mit Gsf2 hat.

Nach Kategorisierung der verbleibenden Interaktionspartner stellte sich heraus, dass nur noch Proteine, die eine Funktion am Ribosom haben, mit Gsf2 interagierten. Dabei handelte es sich in drei Fällen um Komponenten der großen Ribosomen-Untereinheit 60S (Rpl4A, Rpl13B, Rpl25), in zwei Fällen um Komponenten der kleinen Ribosomen-Untereinheit 40S (Rps3, Rps8A/Rps8B) und um einen Elongationsfaktor (Eft1/ Eft2). Die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung mit Gsf2-TAP deutete somit darauf hin, dass Gsf2 eine Aufgabe im ER hat, die an die Ribosomen gekoppelt ist. Eventuell ist Gsf2 auch bei der kotranslationalen Translokation neu-synthetisierten Proteine ins ER bzw. in die ER-Membran notwendig und begleitet die Proteine von dort aus in die COPII-Vesikel und bis zum Golgi-Apparat. Auffällig war, dass weder Hxt1 noch ein anderer Hexose-transporter mit Gsf2-TAP aufgereinigt wurde. Um Hxt1 mit aufzureinigen, hätten wahrscheinlich die Anzuchtbedingungen verändert werden müssen: Der Gsf2-TAP-Stamm wurde im vorliegenden Fall bei 2% Glukose herangezogen. Um Hxt1 stark zu exprimieren und mit aufzureinigen, hätte der Stamm in höheren Glukosekonzentrationen (5% Glukose) und nur bis zum Beginn der logarithmischen Wachstumsphase herangezogen werden dürfen. Möglicherweise führten auch die Aufreinigungsbedingungen, wie z.B. die Zugabe von TritonX100 als Detergenz dazu, dass die Hexosetransporter nicht mit aufgereinigt wurden. Bei zukünftigen Tandem-Affinitäts-Aufreinigungen sollten daher zum einen die Anzuchtbedingungen variiert und die Reinigungsbedingungen optimiert werden, indem z.B. unterschiedliche Detergenzien eingesetzt werden.

4.2.5.4 Funktion von Gsf2

Abschließend kann festgestellt werden, dass Gsf2 in einem weiten Bereich im ER agiert (Abb. 34). Gsf2 ist notwendig, damit die Hexosetransporter Hxt1 und Hxt3, sowie der Galaktosetransporter Gal2 zur Plasmamembran transloziert werden. Bei Hxt1 und Hxt3 handelt es sich um niederaffine Transporter, die zu 86,4% identisch sind (Kruckeberg, 1996). Dass die Affinität der Transporter eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit Gsf2 spielt, konnte ausgeschlossen werden, da Gal2 neben Galaktose Glukose mit hoher Affinität transportiert (Reifenberger *et al.*, 1997; Liang und Gaber, 1996). Der Grund, warum Gsf2 mit diesen drei Transportern in Interaktion tritt und für deren Transport zur Plasmamembran notwendig ist, während andere Transporter auch in Abwesenheit von Gsf2 ihre

Ziellmembran erreichen, bleibt unklar. Proteindomänen, die als Erkennungssequenz für Gsf2 notwendig sind, konnten mit Hilfe von Chimär-Untersuchungen nicht identifiziert werden.

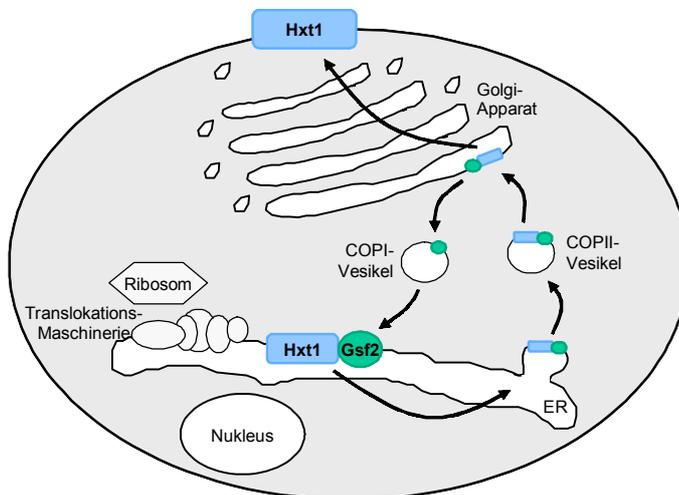


Abb. 34: **Modell der Funktion von Gsf2.**

Die identifizierten Interaktionspartner von Gsf2 reichen vom Ribosom, über die Translokations-Maschinerie und Komponenten der COPII-Vesikelbildung bis zur Fusion der Vesikel mit der Golgi-Membran. Die Aufgabe von Gsf2 scheint daher schon bei der Synthese der Proteine und deren Translokation ins ER zu beginnen. Welche Translokations-Maschinerie (ko- oder posttranslational) die Translokation der Hexosetransporter und von Gsf2 ermöglicht, ist unklar. Im Falle der Ribosomen wurden Komponenten der kotranslationalen und im Falle von Sec62 der posttranslationalen Translokation als Interaktionspartner von Gsf2 identifiziert. Möglicherweise spielt Sec62 allerdings nicht nur bei der posttranslationalen Translokation eine wichtige Rolle, sondern bleibt auch bei der kotranslationalen Translokation mit Sec63 assoziiert (vgl. Abb. 4). Alternativ könnte die beobachtete genetische Interaktion von Gsf2 mit Sec62 auch ein indirekter Effekt sein, der daraus resultiert, dass Sec62 bei dem Proteinabbau im ER zurückgehaltener Hexosetransporter über das ERAD-System eine wichtige Rolle spielt. Jedenfalls scheint Gsf2 die Proteine direkt bei der Translokation zu übernehmen und sie zu den COPII-Vesikeln zu führen, wo es selbst mit verpackt wird, um vom Golgi-Apparat aus über die Retrotranslokation recycelt zu werden. Ähnlich den p24-Proteinen könnte Gsf2 als Rezeptorprotein für die Transporter Hxt1, Hxt3 und Gal2 dienen. Eventuell hat Gsf2 auch eine ähnliche Aufgabe wie Lst1 im Falle von Pma1 und ist eine Komponente der Coatomeere und sorgt für eine optimale

Konformation der COPII-Vesikel, um die Hexosetransporter darin zu verpacken. Detaillierteren Aufschluß über die Funktion von Gsf2 würden Rekonstitutionsexperimente von COPII-Vesikeln geben. Dadurch könnte vermutlich analysiert werden, ob es sich bei Gsf2 um eine Coatmerkomponente handelt oder ob Gsf2 als Rezeptorprotein für die Rekrutierung mancher Hexosetransporter in COPII-Vesikel zuständig ist. Interessant wäre zu erfahren, ob Gsf2 nur für die bereits identifizierten Proteine Hxt1, Hxt3, Gal2 notwendig ist und über welche Erkennungssequenzen diese Proteine verfügen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die *gsf*-Mutanten *GSF4-1* und *gsf2* der Hefe *S. cerevisiae* charakterisiert. Grundlage hierfür waren Studien von Sherwood und Carlson (1997, 1999, 2000), in denen diese Mutanten als Komponenten des Glukoserepressions-Signalweges identifiziert wurden.

Bei der dominanten Mutation *GSF4-1* handelt es sich um ein Chimär der Hexosetransportergene *HXT1* und *HXT4*. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Chimärs zu einer generell reduzierten Wachstumsrate der Hefe führt. Das verlangsamte Wachstum war unabhängig von der eingesetzten Kohlenstoffquelle. Die Glukoseaufnahme blieb unverändert. Ein direkter Einfluss des Chimärs auf die endogenen Hexosetransporter konnte somit ausgeschlossen werden. Das chimäre Hxt1/4-Protein konnte im Endoplasmatischen Retikulum der Hefe lokalisiert werden. Es ergaben sich keine Hinweise auf eine Falschfaltung des Proteins. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass das Chimär entweder die Translokation anderer Proteine aus dem ER beeinflusst oder einen generellen zellulären Prozess stört.

Bei *Gsf2* handelt es sich um ein 46kDa großes ER-Protein mit einem C-terminalen Dilysin-Motiv. Es konnte die Existenz von mindestens zwei Transmembrandomänen nachgewiesen werden. Deletionen von *gsf2* resultierten in einer Akkumulation der Hexosetransporter Hxt1, Hxt3 und Gal2 im ER, während die übrigen endogenen Hexosetransporter Hxt2, Hxt4, Hxt5 und Hxt7 weiterhin an der Plasmamembran lokalisiert waren. Es wurde gezeigt, dass die zurückgehaltenen Transporter offensichtlich korrekt gefaltet und funktionell vorliegen. Eine direkte Interaktion von *Gsf2* mit den Transportern konnte im Split-Ubiquitin System nachgewiesen werden. Genetische und biochemische Interaktionsstudien mittels Multicopy-Analyse, konditional-lethalen Sekretionsmutanten und Tandem-Affinitäts-Aufreinigung identifizierten ribosomale Proteine, Proteine der Translokationsmaschinerie, Proteine der COPII-Vesikelbildung und Proteine der Vesikel-Golgi-Fusion als Interaktionspartner von *Gsf2*. Es wird ein Modell postuliert, bei dem die Aufgabe von *Gsf2* vermutlich schon bei der Synthese spezifischer Hexosetransporter am Ribosom und deren Translokation in die ER-Membran beginnt. *Gsf2* rekrutiert diese Transporter in die COPII-Vesikel und begleitet sie bis zum Golgi-Apparat. Dabei konnte für die Erkennung der Hexosetransporter durch *Gsf2* keine einzelne Proteindomäne nachgewiesen werden. Vielmehr erscheinen globalere Strukturmerkmale verantwortlich zu sein.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Agarraberes FA, Dice JF (2001): A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci.* **114**: 2491-9.
- Ahuatzi D, Herrero P, de la Cera T, Moreno F (2004): The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent. *J Biol Chem.* **279**: 14440-6
- Antonny B, Madden D, Hamamoto S, Orci L, Schekman R (2001): Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol.* **3**: 531-7
- Appenzeller C, Andersson H, Kappeler F, Hauri HP (1999): The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nat Cell Biol.* **1**: 330-4
- Aridor M, Weissman J, Bannykh S, Nuoffer C, Balch WE (1998): Cargo selection by the COPII budding machinery during export from the ER. *J Cell Biol.* **141**: 61-70
- Barlowe C (1997): Coupled ER to Golgi transport reconstituted with purified cytosolic proteins. *J Cell Biol.* **139**: 1097-108
- Barlowe C, Orci L, Yeung T, Hosobuchi M, Hamamoto S, Salama N, Rexach MF, Ravazzola M, Amherdt M, Schekman R (1994): COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell.* **77**: 895-907
- Barlowe C, Schekman R (1993): SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature.* **365**: 347-9
- Barnett JA (1976): The utilization of sugars by yeasts. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* **32**: 125-234
- Bays NW, Gardner RG, Seelig LP, Joazeiro CA, Hampton RY (2001): Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat Cell Biol.* **3**: 24-9
- Becker J, Boles E (2003): A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol. *Appl Environ Microbiol.* **69**: 4144-50
- Belden WJ, Barlowe C (1996): Erv25p, a component of COPII-coated vesicles, forms a complex with Emp24p that is required for efficient endoplasmic reticulum to Golgi transport. *J Biol Chem.* **271**: 26939-46
- Belden WJ, Barlowe C (2001): Distinct roles for the cytoplasmic tail sequences of Emp24p and Erv25p in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *J Biol Chem.* **276**: 43040-8
- Bi X, Corpina RA, Goldberg J (2002): Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature.* **419**: 271-7
- Biederer T, Volkwein C, Sommer T (1996): Degradation of subunits of the Sec61p complex, an integral component of the ER membrane, by the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **15**: 2069-76
- Biederer T, Volkwein C, Sommer T (1997): Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science.* **278**: 1806-9
- Birnboim HC, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **6**: 1513-23.
- Bisson LF (1988): High-affinity glucose transport is under general glucose repression control. *J. Bacteriol.* **170**: 4838-45
- Bisson LF, Fraenkel DG (1983) Involvement of kinase in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **80**: 1730-4.
- Bisson LF, Kunathigan V (2003): On the trail of an elusive flux sensor. *Res Microbiol.* **154**: 603-10
- Boeke JD, Lacroute F, Fink GR (1984): A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphat decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 345-6.
- Boles E (2002): Yeast as a model system for studying glucose transport. In: 'Transmembrane transporters' (Quick MW; ed), Receptor Biochemistry and Methodology (Silbley DR; Series Editor), pp19-36, Wiley, Inc, New York

- Boles E, Hollenberg CP (1997): The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol Rev.* **21**: 85-111
- Boles und André (2004): Role of transporter-like sensors in glucose and amino acid signalling in yeast. IN: *Topics in Current Genetics.* **9**: Molecular Mechanisms Controlling Transmembrane Transport.
- Bordallo J, Plemper RK, Finger A, Wolf DH (1998): Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins. *Mol Biol Cell.* **9**: 209-22
- Brew CT, Huffaker TC (2002): The yeast ubiquitin protease, Ubp3p, promotes protein stability. *Genetics.* **162**: 1079-89
- Brown CR, Hong-Brown LQ, Biwersi J, Verkman AS, Welch WJ (1996): Chemical chaperones correct the mutant phenotype of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *Cell Stress Chaperones.* **1**: 117-25
- Brown CR, Hong-Brown LQ, Welch WJ (1997): Correcting temperature-sensitive protein folding defects. *J Clin Invest.* **99**: 1432-44
- Buziol S, Becker J, Baumeister A, Jung S, Mauch K, Reuss M, Boles E (2002): Determination of in vivo kinetics of the starvation-induced Hxt5 glucose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research.* **2**: 283-91
- Carlson M (1987): Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces* species. *J Bacteriol.* **169**: 4873-7
- Caspary F, Shevchenko A, Wilm M, Séraphin B (1999): Partial purification of the yeast U2 snRNP reveals a novel yeast pre-mRNA splicing factor required for pre-spliceosome assembly. *EMBO* **18**: 3463-74
- Celenza JL, Carlson M (1986): A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science.* **233**: 1175-80
- Chen EJ, Frand AF, Chitoura E, Kaiser CA (1998): A link between secretion and pre-mRNA processing defects in *Saccharomyces cerevisiae* and the identification of a novel splicing gene, *RSE1*. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 7139-46
- Choi JH, Lou W, Vancura A (1998): A novel membrane-bound Glutathione S-Transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *JBC* **273**: 29915-22
- Connolly T, Gilmore R (1993): GTP hydrolysis by complexes of the signal recognition particle and the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol.* **123**: 799-807
- Cosson P, Letourneur F (1994): Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs. *Science.* **263**: 1629-31
- Craven RA, Egerton M, Stirling CJ (1996): A novel Hsp70 of the yeast ER lumen is required for the efficient translocation of a number of protein precursors. *EMBO J.* **15**: 2640-50.
- De Vit MJ, Waddle JA, Johnston M (1997): Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell.* **8**: 1603-18
- Dlugai S (2003): Untersuchungen zur funktionellen Expression des humanen Glukosetransporters GLUT4 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und der Nachweis möglicher Interaktionspartner Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**: 6127-45
- Elbing K, Larsson C, Bill RM, Albers E, Snoep JL, Boles E, Hohmann S, Gustafsson L (2004): Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* **70**: 5323-30
- Elrod-Erickson MJ, Kaiser CA (1996): Genes that control the fidelity of endoplasmic reticulum to Golgi transport identified as suppressors of vesicle budding mutations. *Mol Biol Cell.* **7**: 1043-58
- Entian KD, Schüller HJ (1997): Glucose repression (carbon catabolite repression) in yeast, in 'Yeast sugar metabolism' (F. K. Zimmermann und K.-D. Entian, eds) Technomic Publishing Co, Lancaster PA
- Esnault Y, Blondel MO, Deshaies RJ, Scheckman R, Kepes F (1993): The yeast SSS1 gene is essential for secretory protein translocation and encodes a conserved protein of the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **12**: 4083-93

- Esnault Y, Feldheim D, Blondel MO, Schekman R, Kepes F (1994): SSS1 encodes a stabilizing component of the Sec61 subcomplex of the yeast protein translocation apparatus. *J Biol Chem.* **269**: 27478-85
- Espenshade P, Gimeno RE, Holzmacher E, Teung P, Kaiser CA (1995): Yeast SEC16 gene encodes a multidomain vesicle coat protein that interacts with Sec23p. *J Cell Biol.* **131**: 311-24
- Fewell SW, Travers KJ, Weissman JS, Brodsky JL (2001): The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet.* **35**: 149-91
- Fields S, Song O (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature.* **340**: 245-6
- Finke K, Plath K, Panzner S, Prehn S, Rapoport TA, Hartmann E, Sommer T (1996): A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *EMBO J.* **15**: 1482-94
- Flick KM, Spielewoy N, Kalashnikova TI, Guaderrama M, Zhu Q, Chang HC, Wittenberg C (2003): Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from HXT gene promoters. *Mol Biol Cell.* **14**: 3230-41
- Friedlander R, Jarosch E, Urban J, Volkwein C, Sommer T (2000): A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* **2**: 379-84
- Gardner RG, Swarbrick GM, Bays NW, Cronin SR, Wilhovskiy S, Seelig L, Kim C, Hampton RY (2000): Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling. Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p. *J Cell Biol.* **151**: 69-82
- Ghumman B, Bertram EM, Watts TH (1998): Chemical chaperones enhance superantigen and conventional antigen presentation by HLA-DM-deficient as well as HLA-DM-sufficient antigen-presenting cells and enhance IgG2a production in vivo. *J Immunol.* **161**: 3262-70
- Gietz RD, Sugino A (1988): New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527-34
- Gietz RD, Woods RA (1994): High Efficiency transformation in Yeast. (Invited Book Chapter) In: 'Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches', ed. J.A. Johnston, Oxford University Press pp. 121-134.
- Gilon T, Chomsky O, Kulka RG (1998): Degradation signals for ubiquitin system proteolysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**: 2759-66
- Gilstring CF, Ljungdahl PO (2000): A method for determining the in vivo topology of yeast polytopic membrane proteins demonstrates that Gap1p fully integrates into the membrane independently of Shr3p. *J Biol Chem.* **275**: 31488-95
- Gilstring CF, Melin-Larsson M, Ljungdahl PO (1999): Shr3p mediates specific COPII coatomer-cargo interactions required for the packaging of amino acid permeases into ER-derived transport vesicles. *Mol Biol Cell.* **10**: 3549-65
- Gimeno RE, Espenshade P, Kaiser CA (1995): SED4 encodes a yeast endoplasmic reticulum protein that binds Sec16p and participates in vesicle formation. *J Cell Biol.* **131**: 325-38
- Gimeno RE, Espenshade P, Kaiser CA (1996): COPII coat subunit interactions: Sec24p and Sec23p bind to adjacent regions of Sec16p. *Mol Biol Cell.* **7**: 1815-23
- Giraud CG, Maccioni HJ (2003): Endoplasmic reticulum export of glycosyltransferases depends on interaction of a cytoplasmic dibasic motif with Sar1. *Mol Biol Cell.* **14**: 3753-66
- Glick BS (1995): Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? *Cell.* **80**:11-4
- Goldberg J (1998): Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP-myristoyl switching. *Cell.* **95**: 237-48
- Gottschalk A, Neubauer G, Banroques J, Mann M, Lührmann R, Fabrizio P (1999): Identification by mass spectrometry and functional analysis of novel proteins of the yeast [U4/U6 U5] tri-snRNP. *EMBO* **18**: 4535-48
- Graham LA, Hill KJ, Stevens TH (1998): Assembly of the yeast vacuolar H⁺-ATPase occurs in the endoplasmic reticulum and requires a Vma12p/Vma22p assembly complex. *J Cell Biol.* **142**: 39-49
- Griffith DA, Delipala C, Leadsham J, Jarvis SM, Oesterhelt D (2003): A novel yeast expression system for the overproduction of quality-controlled membrane proteins. *FEBS Lett.* **553**: 45-50

- Griffiths G, Simons K (1986): The trans Golgi network: sorting at the exit site of the Golgi complex. *Science*. **234**: 438-43
- Guijarro JM, Lagunas R (1984): *Saccharomyces cerevisiae* does not accumulate ethanol against a concentration gradient. *J. Bacteriol* **160**: 874-8
- Güldener U, Heck S, Fiedler T, Beinhauer J, Hegemann JH (1996): A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research* **24**: 2519-24
- Güldener U, Heinisch J, Köhler GJ, Voss D, Hegemann JH (2002): A second set of *loxP* marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Research* **30**: e23
- Halme A, Michelitch M, Mitchell EL, Chant J (1996): Bud10p directs axial cell polarization in budding yeast and resembles a transmembrane receptor. *Curr Biol*. **6**: 570-9
- Harter C, Pavel J, Coccia F, Draken E, Wegehingel S, Tschochner H, Wieland F (1996): Nonclathrin coat protein gamma, a subunit of coatomer, binds to the cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**: 1902-6
- Harter C, Reinhard C (2000): The secretory pathway from history to the state of the art. *Subcell Biochem*. **34**: 1-38
- Hawthorne DC, Friis J (1964): Osmotic-remedial mutants. A new classification for nutritional mutants in yeast. *Genetics*. **50**: 829-39
- Hebert DN, Carruthers A (1991): Cholate-solubilized erythrocyte glucose transporters exist as a mixture of homodimers and homotetramers. *Biochemistry*. **30**: 4654-8
- Hebert DN, Carruthers A (1992): Glucose transporter oligomeric structure determines transporter function. Reversible redox-dependent interconversions of tetrameric and dimeric GLUT1. *J Biol Chem*. **267**: 23829-38
- Hiesinger M, Roth S, Meissner E, Schuller HJ (2001): Contribution of Cat8 and Sip4 to the transcriptional activation of yeast gluconeogenic genes by carbon source-responsive elements. *Curr Genet*. **39**: 68-76
- Hill K, Cooper AA (2000): Degradation of unassembled Vph1p reveals novel aspects of the yeast ER quality control system. *EMBO J*. **19**: 550-61
- Hill KJ, Stevens TH (1995): Vma22p is a novel endoplasmic reticulum-associated protein required for assembly of the yeast vacuolar H(+)-ATPase complex. *J Biol Chem*. **270**: 22329-36
- Hiller MM, Finger A, Schweiger M, Wolf DH (1996): ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science*. **273**: 1725-8
- Hitchcock AL, Auld K, Gygi SP, Silver PA (2003): A subset of membrane-associated proteins is ubiquitinated in response to mutations in the endoplasmic reticulum degradation machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**: 12735-40
- Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, Borth N, Mattanovich D (2003): Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotech. and Bioeng*. **85**: 367-75
- Hong SP, Leiper FC, Woods A, Carling D, Carlson M (2003): Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**: 8839-43
- Horak J, Kotyk A (1993): Functional analysis of *apf1* mutation causing defective amino acid transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Mol Biol Int*. **29**: 907-12
- Ito T, Chiba T, Ozawa R, Yoshida M, Hattori M, Sakaki Y (2001): A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**: 4569-74
- Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA (1990): Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J*. **9**: 3153-62
- Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA (1993): Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. **121**: 317-33
- Jansen MLA, De Winde JH, Pronk JT (2002): Hxt-Carrier-Mediated glucose efflux upon exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to excess maltose. *AEM* **68**: 4259-65
- Jiang R, Carlson M (1996): Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev*. **10**: 3105-15

- Johnson AE, van Waes MA (1999): The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **15**: 799-842
- Johnsson N, Varshavsky A (1994a) Split ubiquitin as a sensor of protein interactions *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**: 10340-4
- Johnsson N, Varshavsky A (1994b) Ubiquitin-assisted dissection of protein transport across membranes. *EMBO J.* **13**: 2686-98
- Kim JH, Polish J, Johnston M (2003): Specificity and regulation of DNA binding by the yeast glucose transporter gene repressor Rgt1. *Mol Cell Biol.* **23**: 5208-16
- Ko CH, Liang H, Gaber RF (1993): Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **13**: 638-48
- Kölling R, Hollenberg CP (1994): The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* **13**: 3261-71
- Kotyk A, Alonso A (1985): Transport of ethanol in baker's yeast. *Folia Microbiol* **30**: 90-1
- Krampe S, Stamm O, Hollenberg CP, Boles E (1998): Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS Letters* **441**: 343-7
- Kruckeberg AL (1996): The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol.* **166**: 283-92
- Kuchin S, Vyas VK, Kanter E, Hong SP, Carlson M (2003): Std1p (Msn3p) positively regulates the Snf1 kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **163**: 507-14
- Kuehn MJ, Herrmann JM, Schekman R (1998): COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature.* **391**: 187-90
- Kuehn MJ, Schekman R, Ljungdahl PO (1996): Amino acid permeases require COPII components and the ER resident membrane protein Shr3p for packaging into transport vesicles *in vitro*. *J Cell Biol.* **135**: 585-95
- Kurihara T, Hamamoto S, Gimeno RE, Kaiser CA, Schekman R, Yoshihisa T (2000): Sec24p and Iss1p function interchangeably in transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* **11**: 983-98
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5
- Lafuente MJ, Gancedo C, Jauniaux JC, Gancedo JM (2000): Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* **35**: 161-72
- Lagunas R (1993): Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* **104**: 229-42
- Lau WT, Howson RW, Malkus P, Schekman R, O'Shea EK (2000): Pho86p, an endoplasmic reticulum (ER) resident protein in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for ER exit of the high-affinity phosphate transporter Pho84p. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 1107-12
- Lauring B, Kreibich G, Weidmann M (1995): The intrinsic ability of ribosomes to bind to endoplasmic reticulum membranes is regulated by signal recognition particle and nascent-polypeptide-associated complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 9435-9
- Lederkremer GZ, Cheng Y, Petre BM, Vogan E, Springer S, Schekman R, Walz T, Kirchhausen T (2001): Structure of the Sec23p/24p and Sec13p/31p complexes of COPII. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**: 10704-9
- Lemmon SK, Traub LM (2000): Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr Opin Cell Biol.* **12**: 457-66
- Letourneur F, Gaynor EC, Hennecke S, Demolliere C, Duden R, Emr SD, Riezman H, Cosson P (1994): Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell.* **79**: 1199-207
- Li FN, Johnston M (1997): Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *EMBO J.* **16**: 5629-38
- Lian JP, Ferro-Novick S (1993): Bos1p, an integral membrane protein of the endoplasmic reticulum to Golgi transport vesicles, is required for their fusion competence. *Cell.* **73**: 735-45
- Liang H, Gaber RF (1996): A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of HXT6. *Mol Biol Cell.* **7**: 1953-66

- Liu SH, Wong ML, Craik CS, Brodsky FM (1995): Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell*. **83**: 257-67
- Ljungdahl PO, Gimeno CJ, Styles CA, Fink GR (1992): *SHR3*: a novel component of the secretory pathway specifically required for localization of amino acid permeases in yeast. *Cell*. **71**: 463-78
- Longtine MS, McKenzie 3rd A, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR (1998): Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**:953-61
- Lowe M, Kreis TE (1998): Regulation of membrane traffic in animal cells by COPI. *Biochim Biophys Acta*. **1404**: 53-66
- Ludin K, Jiang R, Carlson M (1998): Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**: 6245-50
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982): Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Martoglio B, Hofmann MW, Brunner J, Dobberstein B (1995): The protein-conducting channel in the membrane of the endoplasmic reticulum is open laterally toward the lipid bilayer. *Cell*. **81**: 207-14
- Matsuoka K, Schekman R, Orci L, Heuser JE (2001): Surface structure of the COPII-coated vesicle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**: 13705-9
- Miller E, Antony B, Hamamoto S, Schekman R (2002): Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO J*. **21**: 6105-13
- Miller EA, Beilharz TH, Malkus PN, Lee MC, Hamamoto S, Orci L, Schekman R (2003): Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell*. **114**: 497-509
- Miller JH (1972): Experiments in molecular genetics. Cold Springer Harbor Laboratory, New York, Ed.3rd.
- Moriya H, Johnston M (2004): Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**: 1572-7
- Mosley AL, Lakshmanan J, Aryal BK, Özcan S (2003): Glucose-mediated phosphorylation converts the transcription factor Rgt1 from a repressor to an activator. *J Biol Chem*. **278**: 10322-7
- Mueckler M, Makepeace C (2002): Analysis of transmembrane segment 10 of the Glut1 glucose transporter by cysteine-scanning mutagenesis and substituted cysteine accessibility. *J Biol Chem*. **277**: 3498-503
- Muniz M, Nuoffer C, Hauri HP, Riezman H (2000): The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J Cell Biol*. **148**: 925-30
- Naik RR, Jones EW (1998): The PBN1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: an essential gene that is required for the post-translational processing of the protease B precursor. *Genetics*. **149**: 1277-92
- Nakano A, Brada D, Schekman R (1988): A membrane glycoprotein, Sec12p, required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in yeast. *J Cell Biol*. **107**: 851-63
- Nakano A, Muramatsu M. (1989): A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol*. **109**: 2677-91
- Ng DT, Brown JD, Walter P (1996): Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol*. **134**: 269-78
- Nickel W, Wieland FT(1998): Biosynthetic protein transport through the early secretory pathway. *Histochem Cell Biol*. **109**: 477-86
- Nilsson T, Jackson M, Peterson PA (1989): Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*. **58**: 707-18
- Obrdlik P, El-Bakkoury M, Hamacher T, Cappellaro C, Vilarino C, Fleischer C, Ellerbrok H, Kamuzinzi R, Ledent V, Blaudez D, Sanders D, Revuelta JL, Boles E, Andre B, Frommer WB (2004): K⁺ channel interactions detected by a genetic system optimized for systematic studies of membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**: 12242-7

- Oka T, Nishikawa S, Nakano A (1991): Reconstitution of GTP-binding Sar1 protein function in ER to Golgi transport. *J Cell Biol.* **114**: 671-9
- Orci L, Glick BS, Rothman JE (1986): A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. *Cell.* **46**: 171-84
- Otterstedt K, Larsson C, Bill RM, Stahlberg A, Boles E, Hohmann S, Gustafsson L (2004): Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Rep.* **5**: 532-7
- Özcan S, Dover J, Johnston M (1998): Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**: 2566-73
- Özcan S, Johnston M (1995): Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (*HXT*) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol Cell Biol.* **15**: 1564-72
- Özcan S, Leong T, Johnston M (1996): Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Mol Cell Biol.* **16**: 6419-26
- Panzner S, Dreier L, Hartmann E, Kostka S, Rapoport TA (1995): Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell.* **81**: 561-70
- Papa FR, Hochstrasser M (1993): The yeast *DOA4* gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human *tre-2* oncogene. *Nature.* **366**: 313-9
- Peng R, De Antoni A, Gallwitz D (2000): Evidence for overlapping and distinct functions in protein transport of coat protein Sec24p family members. *J Biol Chem.* **275**: 11521-8
- Peng R, Grabowski R, De Antoni A, Gallwitz D (1999): Specific interaction of the yeast cis-Golgi syntaxin Sed5p and the coat protein complex II component Sec24p of endoplasmic reticulum-derived transport vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 3751-6
- Pilon M, Schekman R, Romisch K (1997): Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J.* **16**: 4540-8
- Pishvae B, Payne GS (1998): Clathrin coats-threads laid bare. *Cell.* **95**: 443-6
- Plath K, Mothes W, Wilkinson BM, Stirling CJ, Rapoport TA (1998): Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell.* **94**: 795-807
- Plempner RK, Bohmler S, Bordallo J, Sommer T, Wolf DH (1997): Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature.* **388**: 891-5
- Powers J, Barlowe C (1998): Transport of axl2p depends on erv14p, an ER-vesicle protein related to the *Drosophila* cornichon gene product. *J Cell Biol.* **142**: 1209-22
- Powers J, Barlowe C (2002): Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Mol Biol Cell.* **13**: 880-91
- Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, Bragado-Nilsson E, Wilm M, Séraphin B (2001): The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein complex purification. *Methods* **24**: 218-29
- Rapiejko PJ, Gilmore R (1994): Signal sequence recognition and targeting of ribosomes to the endoplasmic reticulum by the signal recognition particle do not require GTP. *Mol Biol Cell.* **5**: 887-97
- Regenberger B, Hansen J (2000): *GAP1*, a novel selection and counter-selection marker for multiple gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**: 1111-9
- Reifenberger E (1995): Genetische und physiologische Untersuchungen zum Hexosetransport in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Reifenberger E, Boles E, Ciriacy M (1997): Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur J Biochem.* **245**: 324-33
- Reifenberger E, Freidel K, Ciriacy M (1995): Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol. Microbiol.* **16**: 157-67
- Rexach MF, Latterich M, Schekman RW (1994): Characteristics of endoplasmic reticulum-derived transport vesicles. *J Cell Biol.* **126**: 1133-48

- Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B (1999): A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol.* **17**: 1030-2
- Roberg KJ, Crotwell M, Espenshade P, Gimeno R, Kaiser CA (1999): *LST1* is a *SEC24* homologue used for selective export of the plasma membrane ATPase from the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* **145**: 659-72
- Roemer T, Madden K, Chang J, Snyder M (1996): Selection of axial growth sites in yeast requires Axl2p, a novel plasma membrane glycoprotein. *Genes Dev.* **10**: 777-93
- Rosenbaum C (1993): Ty-vermittelte Genexpression. Diplomarbeit: Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Rothman JE (1994): Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature.* **372**: 55-63
- Saito-Nakano Y, Nakano A (2000): Sed4p functions as a positive regulator of Sar1p probably through inhibition of the GTPase activation by Sec23p. *Genes Cells.* **5**: 1039-48
- Sanz P, Alms GR, Haystead TA, Carlson M (2000): Regulatory interactions between the Reg1-Glc7 protein phosphatase and the Snf1 protein kinase. *Mol Cell Biol.* **20**: 1321-8
- Sanz P, Nieto A, Prieto JA (1996): Glucose repression may involve processes with different sugar kinase requirements. *J Bacteriol.* **178**: 4721-3
- Sato K, Sato M, Nakano A (1997): Rer1p as common machinery for the endoplasmic reticulum localization of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 9693-8
- Sato K, Sato M, Nakano A (2003): Rer1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes. *Mol Biol Cell.* **14**: 3605-16
- Sato M, Sato K, Nakano A (1996): Endoplasmic reticulum localization of Sec12p is achieved by two mechanisms: Rer1p-dependent retrieval that requires the transmembrane domain and Rer1p-independent retention that involves the cytoplasmic domain. *J Cell Biol.* **134**: 279-93
- Schimmoller F, Singer-Kruger B, Schroder S, Kruger U, Barlowe C, Riezman H (1995): The absence of Emp24p, a component of ER-derived COPII-coated vesicles, causes a defect in transport of selected proteins to the Golgi. *EMBO J.* **14**: 1329-39
- Schmid SL (1997): Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem.* **66**: 511-48
- Schmidt MC, McCartney RR, Zhang X, Tillman TS, Solimeo H, Wolf S, Almonte C, Watkins SC (1999): Std1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **19**: 4561-71
- Schulte F, Wiczorke R, Hollenberg CP, Boles E (2000): The *HTR1* gene is a dominant negative mutant allele of *MTH1* and blocks Snf3- and Rgt2-dependent glucose signaling in yeast. *J Bacteriol.* **182**: 540-2
- Semenza JC, Hardwick KG, Dean N, Pelham HR (1990): ERD2, a yeast gene required for the receptor-mediated retrieval of luminal ER proteins from the secretory pathway. *Cell.* **61**: 1349-57
- Serafini T, Orci L, Amherdt M, Brunner M, Kahn RA, Rothman JE (1991): ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. *Cell.* **67**: 239-53
- Shamu CE, Flierman D, Ploegh HL, Rapoport TA, Chau V (2001): Polyubiquitination is required for US11-dependent movement of MHC class I heavy chain from endoplasmic reticulum into cytosol. *Mol Biol Cell.* **12**: 2546-55
- Shamu CE, Story CM, Rapoport TA, Ploegh HL (1999): The pathway of US11-dependent degradation of MHC class I heavy chains involves a ubiquitin-conjugated intermediate. *J Cell Biol.* **147**: 45-58
- Shaywitz DA, Espenshade PJ, Gimeno RE, Kaiser CA (1997): COPII subunit interactions in the assembly of the vesicle coat. *J Biol Chem.* **272**: 25413-6
- Sherwood PW, Carlson M (1997): Mutations in *GSF1* and *GSF2* alter glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**: 557-66
- Sherwood PW, Carlson M (1999): Efficient export of the glucose transporter Hxt1p from the endoplasmic reticulum requires Gsf2p. *PNAS* **96**: 7415-20

- Sherwood PW, Katic I, Sanz P, Carlson M (2000): A glucose transporter chimera confers a dominant negative glucose starvation phenotype in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **155**: 989-92
- Shimoni Y, Kurihara T, Ravazzola M, Amherdt M, Orci L, Schekman R (2000): Lst1p and Sec24p cooperate in sorting of the plasma membrane ATPase into COPII vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* **151**: 973-84
- Simon SM, Peskin CS, Oster GF (1992): What drives the translocation of proteins? *Proc Natl Acad Sci U S A.* **89**: 3770-4
- Smith CJ, Pearse BM (1999): Clathrin: anatomy of a coat protein. *Trends Cell Biol.* **9**: 335-8.
- Sohn K, Orci L, Ravazzola M, Amherdt M, Bremser M, Lottspeich F, Fiedler K, Helms JB, Wieland FT (1996): A major transmembrane protein of Golgi-derived COPI-coated vesicles involved in coatomer binding. *J Cell Biol.* **135**: 1239-48
- Springer S, Schekman R (1998): Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs. *Science.* **281**: 698-700
- Stagljar I, Korostensky C, Johnsson N, te Heesen S (1998): A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5187-92
- Theodoris G, Fong NM, Coons DM, Bisson LF (1994): High-copy suppression of glucose transport defects by *HXT4* and regulatory elements in the promoters of the *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* **137**: 957-66
- Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P (2000): Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell.* **101**: 249-58
- Treitel MA, Carlson M (1995): Repression by Ssn6-Tup1 is directed by Mig1, a repressor/activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**: 3132-6
- Treitel MA, Kuchin S, Carlson M (1998): Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **18**: 6273-80
- Trilla JA, Duran A, Roncero C (1999): Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* **145**: 1153-63
- Tsai B, Ye Y, Rapoport TA (2002): Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **3**: 246-55
- Tu J, Carlson M (1994): The Glc7 type 1 protein phosphatase is required for glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **14**: 6789-96
- Tzamarias D, Struhl K (1994): Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. *Nature.* **369**: 758-61
- Varshavsky A (1997): The ubiquitin system. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 383-7
- Vincent O, Carlson M (1998): Sip4, a Snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes. *EMBO J.* **17**: 7002-8
- Vincent O, Carlson M (1999): Gal83 mediates the interaction of the Snf1 kinase complex with the transcription activator Sip4. *EMBO J.* **18**: 6672-81
- Vincent O, Townley R, Kuchin S, Carlson M (2001): Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev.* **15**: 1104-14
- Voss D (2001): Molekulargenetische Untersuchungen zur Funktion des *FGY1*-Gens bei der Expression heterologer Glukosetransporter in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Votsmeier C, Gallwitz D (2001): An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export. *EMBO J.* **20**: 6742-50
- Wach A, Brachat A, Poehlmann R, Philippsen P (1994): New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-808
- Walsh MC, Smits, HP, Scholte M, van Dam K (1994): Affinity of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated during growth on glucose. *J. Bacteriol.* **176**: 953-8
- Walter P, Keenan R, Schmitz U (2000): Perspectives: structural biology. SRP-where the RNA and membrane worlds meet. *Science.* **287**: 1212-3

- Waters MG, Serafini T, Rothman JE (1991): 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature*. **349**: 248-51
- Wieczorke R (1998): Molekulargenetische Untersuchungen zur Regulation der Expression von Hexosetransportern in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Wieczorke R, Dlugai S, Krampe S, Boles E (2003): Characterisation of mammalian GLUT glucose transporters in a heterologous yeast expression system. *Cell Physiol Biochem* **13**: 123-34
- Wieczorke R, Krampe S, Weierstall T, Freidel K, Hollenberg CP, Boles E (1999): Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **464**: 123-8
- Wieland F, Harter C (1999): Mechanisms of vesicle formation: insights from the COP system. *Curr Opin Cell Biol.* **11**: 440-6
- Wilkinson BM, Regnacq M, Stirling CJ (1997): Protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *J Membr Biol.* **155**: 189-97
- Wilson WA, Hawley SA, Hardie DG (1996): Glucose repression/derepression in budding yeast: Snf1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr Biol.* **6**: 1426-34
- Winston F, Dollard C, Ricupero-Hovasse SL (1995): Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* **11**: 53-5
- Wirth R (1993): Elektroporation: Eine alternative Methode zur Transformation von Bakterien mit Plasmid DNA. *Forum Mikrobiologie* **11**: 507-15
- Wittke S, Dunnwald M, Johnsson N (2000): Sec62p, a component of the endoplasmic reticulum protein translocation machinery, contains multiple binding sites for the Sec-complex. *Mol Biol Cell.* **11**: 3859-71
- Yang X, Jiang R, Carlson M (1994): A family of proteins containing a conserved domain that mediates interaction with the yeast Snf1 protein kinase complex. *EMBO J.* **13**: 5878-86
- Yoshihisa T, Barlowe C, Schekman R (1993): Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science.* **259**: 1466-8
- Zamenhoff S (1957): Preparation and assay of desoxyribonucleic acids from animals tissue. *Methods Enzymol.* **3**: 696-704
- Zimmermann FK (1975): Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Res.* **31**: 71-81
- Zimmermann FK, Scheel I (1977): Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to carbon catabolite repression. *Mol Gen Genet.* **154**: 75-82
- Zottola RJ, Cloherty EK, Coderre PE, Hansen A, Hebert DN, Carruthers A (1995): Glucose transporter function is controlled by transporter oligomeric structure. A single, intramolecular disulfide promotes GLUT1 tetramerization. *Biochemistry* **34**: 9734-47

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
ARS	autonom replizierende Sequenz
AS	Aminosäure
BIND	“Biomolecular Interaction Network Database”
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel (Zerfälle pro Sekunde)
CEN	Zentromersequenz
Ci	Curie
COP	„coat protein“
cpm	Zerfälle pro Minute (“counts per minute”)
D	Asparaginsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
ds	Doppelstrang
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
<i>E. c.</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatische Retikulum
ERAD	„ER associated protein degradation“
EtBr	Ethidiumbromid
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
Gly	Glycin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H	Histidin
Ile	Isoleucin
K	Lysin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten Konstante
L	Leucin
M	Molar
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
N	Asparagin
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600nm
ORF	offener Leserahmen („open reading frame“)
Pa	Pascal
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PM	Plasmamembran
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Serin
<i>S. c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SGD	„ <i>Saccharomyces</i> genome database“
SRP	„signal recognition particle“
SUS	Split-Ubiquitin System
T	Threonin
TAP	Tandem-Affinitäts-Aufreinigung
TCA	Trichloressigsäure
TG	Trockengewicht
TMD	Transmembrandomäne

ts	temperatursensitiv
U	„units“; Einheit der Enzymaktivität (entspricht $\mu\text{mol}/\text{min}$)
UPR	„unfolded protein response“
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid
z. B.	zum Beispiel

Danksagungen

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

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

Herrn Prof. Dr. Eckhard Boles danke ich für die freundliche Übernahme des 2. Korreferats.

Ein besonderer Dank gilt den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, die hilfreichen Diskussionen und das angenehme Arbeitsklima.

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

Ein Dank gilt meiner Familie und insbesondere meinem Freund, der mich unermüdliche unterstützt hat und mir bei der Lösung der kleinen und großen Computerprobleme eine echte Hilfe war.

Eidesstattliche Erklärung

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

Tanja Hamacher

Düsseldorf, den 21.12.2004