

**Funktionsanalyse des *Saccharomyces cerevisiae*
Proteins Fgy1 und dessen Einfluss auf die heterologe
Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4
aus Säugetieren**

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

vorgelegt von
Dörthe Voss
aus Oberhausen

Düsseldorf 2005

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

Referent: Prof. Dr. C. P. Hollenberg

1. Koreferent: Prof. Dr. H. Bünemann

2. Koreferent: Prof. Dr. E. Boles

Tag der mündlichen Prüfung: 12.04.2005

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als heterologes Expressionssystem .	1
1.2	Die Familie der GLUT-Glukosetransporter	2
1.2.1	GLUT1, ein Glukosetransporter aus Säugetieren.....	5
1.2.2	Der GLUT4-Glukosetransporter aus Säugetieren.....	6
1.2.3	Glukosetransportdefekte und davon abhängige Krankheiten	7
1.2.4	Heterologe Expression von GLUT1 und GLUT4 in der Hefe	8
1.3	Erkenntnisse zum Fgy1-Protein aus <i>S. cerevisiae</i>	10
1.4	Ziel dieser Arbeit.....	12
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Stämme und Medien.....	13
2.1.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	13
2.1.2	Medien und Anzucht von <i>E. coli</i>	13
2.1.3	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme	13
2.1.4	Medien und Anzucht von Hefestämmen.....	16
2.2	Plasmide.....	17
2.3	Genbank.....	19
2.4	Synthetische Oligonukleotide.....	19
2.5	Chemikalien	24
2.6	Enzyme.....	25
2.7	Antikörper	25
2.8	Transformation.....	26
2.8.1	Transformation von <i>E. coli</i>	26
2.8.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	26
2.9	Präparation von DNA.....	27
2.9.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	27
2.9.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	27

2.9.3	Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	27
2.10	Enzymatische Modifikation von DNA	28
2.10.1	DNA-Restriktion.....	28
2.10.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	28
2.10.3	Ligation.....	28
2.11	PCR-Amplifizierung von DNA	28
2.12	DNA-Aufreinigung.....	29
2.13	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	29
2.14	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	29
2.15	Sequenzierung von DNA	30
2.16	<i>In-vitro</i> Mutagenese	30
2.17	Klonierung von Plasmiden über <i>in-vivo</i> Rekombination.....	30
2.17.1	Konstruktion eines Plasmids mit 1x HA-Epitop am 5'-Ende von <i>MAL31</i>	31
2.17.2	Konstruktion von Plasmiden mit einer <i>Bam</i> HI-Schnittstelle in hydrophilen Bereichen von GLUT1.....	31
2.18	Gen-Deletionen in <i>S. cerevisiae</i>	32
2.19	Proteinpräparation der Membranfraktion	33
2.20	Bestimmung der Wachstumsrate von <i>S. cerevisiae</i>	33
2.21	Herstellung von Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i>	34
2.22	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	34
2.22.1	Bestimmung mit Mikrobiuret.....	34
2.22.2	Bestimmung mit Bradford	34
2.23	Endoglykosidase H-Behandlung von Proteinextrakten	35
2.24	Zellfraktionierung durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation.....	35
2.25	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacryl- amidgelen	36
2.26	Nachweis von Proteinen über PonceauS-Färbung.....	36
2.27	Nachweis von Proteinen über Coomassie-Färbung.....	36
2.28	Nachweis von Proteinen über Silber-Färbung	36

2.29	Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot-Analyse	.37
2.30	Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern37
2.31	Messung von Enzymaktivitäten in <i>S. cerevisiae</i>38
2.31.1	Herstellung von Rohextrakten38
2.31.2	Bestimmung der sauren Phosphatase Aktivität38
2.32	Extraktion von Phospholipiden aus Zellmembranen39
2.33	Dünnschichtchromatographie39
2.34	TNP-Präzipitation von Plasmamembran-Proteinen40
2.34.1	Herstellung eines Proteinextrakts aus der Plasmamembran41
2.34.2	Immunpräzipitation von TNP-modifizierten Plasmamembran-Proteinen	41
2.35	Protein-Aufreinigung über "Tandem-Affinity-Purification" (TAP)42
2.35.1	Konstruktion des Stammes DVY.0642
2.35.2	Herstellung des Proteinextrakts42
2.35.3	TAP-Aufreinigung43
2.35.4	Proteinkonzentrierung mittels TCA-Fällung43
2.36	Kreuzung von Hefestämmen, Tetradenanalyse und Bestimmung des Paarungstyps44
2.37	Phänotyp „Microarray“-Analyse44
2.38	Mikroskopische Untersuchungen44
3	Ergebnisse45
3.1	Nachweis der Lokalisierung von Fgy145
3.1.1	Lokalisierung von Fgy1 mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation und Western-Blot-Analyse45
3.1.2	Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von Fgy1-HA45
3.1.3	Lokalisierung von Fgy1 mittels GFP-Fusion48
3.2	Vergleich zweier Hefestämme mittels Phänotyp-Microarrays48
3.3	Untersuchung einer Funktion von Fgy1 bei der Lokalisierung von Plasmamembranproteinen50
3.3.1	Untersuchungen zur Lokalisierung von GLUT150

3.3.1.1	Lokalisierung eines GLUT1-GFP Fusionsproteins im <i>fgy1-1</i> mutanten Stamm.....	50
3.3.1.2	Gegenüberstellung der Lokalisierung von GLUT1 durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation	51
3.3.2	Überprüfung eines Einflusses von Fgy1 auf die Lokalisierung von Mal31	52
3.4	Untersuchung eines Einflusses von Fgy1 auf den Phosphatignalweg	54
3.4.1	Konstruktion von <i>PHO84</i> -Deletionsstämmen	54
3.4.2	Bestimmung der Enzymaktivität der sauren Phosphatase	55
3.5	Vergleich der Phospholipidzusammensetzung der Plasmamembran mittels Dünnschichtchromatographie.....	57
3.6	Untersuchung einer Funktion von Fgy1 bei der Vesikelfusion mit der Plasmamembran.....	59
3.6.1	Untersuchung eines Einflusses von Fgy1 nach Deletion bzw. Überexpression des Gens auf die Temperatursensitivität von <i>sec</i> -mutanten Hefestämmen	61
3.6.1.1	Deletion von <i>FGY1</i> in <i>sec</i> -Mutanten Hefestämmen	61
3.6.1.2	Klonierung eines <i>FGY1</i> -Überexpressionsplasmids	61
3.6.1.3	Durchführung von Tropftests zur Überprüfung des Wachstums bei unterschiedlichen Temperaturen	62
3.6.2	Lokalisierung von GLUT1-GFP in <i>sec</i> -Mutanten Stämmen.....	66
3.7	Suche nach Interaktionspartnern von Fgy1 mittels „Tandem-Affinity-Purification“	68
3.8	Suche nach GLUT1-aktivierenden Mutanten mit einer Transposongenbank.....	69
3.8.1	Deletion von <i>HTA1</i> und <i>CTR9</i>	73
3.9	Vergleich der Expression von GLUT1 in verschiedenen <i>S. cerevisiae</i> Stämmen	76
3.10	Topologische Untersuchungen zur Struktur von GLUT1	77
3.10.1	Integration der Suc2-Reporter-kassette in hydrophile Bereiche von GLUT1	79

3.10.2	Analyse des Glykosylierungszustandes der GLUT1-Suc2 Proteine durch Western-Blot-Analyse	83
3.11	Lokalisierung von GLUT1 mittels TNP-Präzipitation	84
3.12	Test auf Funktionalität von GLUT1	86
3.13	<i>In-vitro</i> Mutagenese in GLUT4.....	88
3.13.1	Klonierung eines Plasmids mit <i>in-vitro</i> Mutagenese in GLUT4.....	89
3.13.2	Überprüfung der Funktionalität von GLUT4 ^{V85→M}	91
3.14	Untersuchung des Einflusses einer <i>erg6</i> -Deletion auf die Aktivität von GLUT1 und GLUT4.....	92
3.14.1	Konstruktion eines <i>erg6</i> -Deletionsstammes	93
3.14.2	Untersuchung des Wachstumsverhaltens des <i>erg6</i> -Deletionsstammes.....	94
3.15	Überprüfung eines Effekts von <i>rsp5</i> -Mutanten auf die Aktivität von GLUT1 und GLUT4 in <i>S. cerevisiae</i>	96
3.15.1	Klonierung einer <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette in den Promotorbereich von <i>RSP5</i>	97
3.15.2	Wachstumstests der Stämme DVY.07 und DVY.08	98
3.15.3	Deletion der C2-Domäne von <i>RSP5</i>	100
3.15.4	Test der Aktivität von GLUT1 und GLUT4 in dem Stamm DVY.09.....	101
4	Diskussion	102
4.1	Lokalisierung von Fgy1.....	102
4.2	Untersuchungen zur Identifizierung einer Funktion von Fgy1.....	104
4.2.1	Einfluss von Fgy1 auf den Transport von Plasmamembranproteinen	104
4.2.2	Untersuchung eines Einflusses bei der Integration von Membranproteinen in die Plasmamembran	105
4.2.3	Analyse einer Funktion von Fgy1 im <i>PHO</i> -Signalweg	110
4.2.4	Versuch einer Identifizierung der Funktion von Fgy1 über bekannte Funktionen anderer Proteine	113
4.3	Untersuchungen zur Klärung der funktionellen Expression der heterologen Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 in Hefe	116

4.3.1	Versuch des Nachweises der topologischen Struktur von GLUT1 in Hefe.....	116
4.3.2	Rekonstitution von GLUT1 in Liposomen und Test auf Funktionalität	116
4.3.3	Test der Aktivität von GLUT4 ^{V85→M}	117
4.3.4	Effekt einer <i>erg6</i> -Deletion auf die Funktionalität von GLUT1 bzw. GLUT4.....	118
4.3.5	Einfluss von Endocytose-defekten <i>rsp5</i> -Mutanten auf die Aktivität von GLUT1 und GLUT4.....	122
4.4	Modell einer Funktion von Fgy1 beruhend auf bisherigen Erkenntnissen	125
5	Zusammenfassung	128
6	Anhang	129
6.1	Datenblatt zu den Ergebnissen der Phänotyp-Microarrays.....	129
7	Literaturverzeichnis	130
8	Abkürzungsverzeichnis	142

1 EINLEITUNG

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird schon seit Jahrhunderten für die Herstellung von Bier, Wein und Backwaren eingesetzt. Dabei spielt die Eigenschaft der Hefe, verschiedene Zucker, besonders die Glukose, vollständig zu Ethanol und Kohlenstoffdioxid umsetzen zu können, eine entscheidende Rolle. Die Fähigkeit Glukose und andere Zucker aufzunehmen und sie dann zur Gewinnung von Energie in Form von ATP zu nutzen, bedeutet für viele Organismen von einfachen Bakterien bis hin zu eukaryontischen Zellen der Säugetiere, also auch des Menschen, ihr Wachstum und Überleben zu sichern. Im Verlauf der Evolution entwickelten sich unterschiedliche Mechanismen zum Transport der hydrophilen Zuckermoleküle über die hydrophobe Lipiddoppelschicht der Plasmamembran ins Lumen einer Zelle. Dazu gehören z.B. Protonen-Symport-Systeme oder das Phosphotransferase-System bei Bakterien bzw. Na⁺-Glukose-Kotransporter oder Systeme mit erleichterter Diffusion in Eukaryonten (Saier, 2000; Walmsley *et al.*, 1998).

Die Hefe *S. cerevisiae* ist auch in der Forschung von großem Nutzen. Zur Erforschung grundlegender Stoffwechselfvorgänge und zur Lösung medizinischer Probleme wird sie vermehrt als Modellorganismus eingesetzt.

1.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als heterologes Expressionssystem

Im Jahr 1996 wurde das Projekt zur Sequenzierung des Genoms der Hefe *S. cerevisiae* erfolgreich abgeschlossen (Goffeau *et al.*, 1996). Das relativ kleine, haploide Genom von $1,2 \times 10^7$ Basenpaaren umfasst ca. 6000 offene Leserahmen verteilt auf 16 Chromosomen. Die geringe Größe des nun bekannten Genoms, sowie dessen einfache Manipulierbarkeit, aber auch die einfache und kostengünstige Kultivierung machen die Hefe zu einem idealen System zur Expression heterologer Proteine um diese in ihren Funktionen genauer charakterisieren und analysieren zu können. Von Vorteil ist zudem, dass sich viele grundlegende Mechanismen der Hefe in Bezug auf Wachstumskontrolle oder auch Kohlenstoffmetabolismus auf höhere Eukaryonten übertragen lassen. Heute steht schon eine Vielzahl von Mutanten mit Defekten im Transport von z.B. Aminosäuren zur Verfügung, die zur Untersuchung heterologer Transportproteine in Hefe eingesetzt werden können. Durch Einführen weiterer Gendelektionen in das Hefegenom kann die Hintergrundaktivität häufig reduziert oder ganz unterdrückt werden.

Um die Möglichkeit zu erhalten Hexosetransporter in Hefe zu untersuchen war im Rahmen einer früheren Arbeit ein Hefestamm konstruiert worden, bei dem alle Gene der endogenen, glukosetransportierenden Proteine der Hefe deletiert worden waren (Wieczorke *et al.*, 1999). Dazu gehörten die Hexosetransporter Hxt1-17, der Galaktosetransporter Gal2 und außerdem drei Mitglieder der Maltosepermease-Familie Agt1, Mph2 und Mph3. Dieser komplette *hxt*-null Stamm EBY.VW4000 konnte nicht nur zur besseren Charakterisierung einzelner Hxt-Proteine eingesetzt werden, sondern eignet sich auch zur Expression heterologer Glukosetransporter in Hefe.

Immer mehr heterologe Proteine können funktionell in Hefe exprimiert werden. Trotzdem treten auch hier weiterhin Probleme auf, die für eine erfolgreiche funktionelle Expression beseitigt werden müssen. Häufig sind heterologe Transporterproteine aufgrund von Fehlfaltung oder unzureichender Modifikation inaktiv oder werden in intrazellulären Kompartimenten zurückgehalten (Kasahara und Kasahara, 1996; 1997).

1.2 Die Familie der GLUT-Glukosetransporter

Der Prozess des Glukosetransports über die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran ins Zellinnere wird über spezielle integrale Membranproteine ermöglicht. In Säugetierzellen erfolgt dieser Transfer über zwei unterschiedliche Transportprotein-Familien. SGLT1 und SGLT2 gehören zu einer der Familien und sind Na^+ -abhängige Glukose-Symporter (Hediger *et al.*, 1989; Wells *et al.*, 1993). Ein drittes Mitglied dieser Familie, SGLT3, wurde erst kürzlich als Glukosesensor charakterisiert (Diez-Sampedro *et al.*, 2003).

Bei der zweiten Transportprotein-Familie handelt es sich um die GLUT-Proteine. Die GLUT-Transporter der Säugetiere transportieren neben Glukose auch andere Hexosen über erleichterte Diffusion passiv entlang eines Konzentrationsgradienten. Sie gehören ebenso wie die Hexosetransporter (Hxt) der Hefe zu einer großen Transporter-Superfamilie (MFS, „major facilitator superfamily“) (Baldwin, 1993; Marger und Saier, 1993; Mueckler, 1994). Mitglieder dieser Superfamilie zeichnen sich durch eine Struktur von 12 Transmembranhelices mit cytoplasmatisch lokalisierten Amino- und Carboxyltermini aus. Die GLUT-Proteine unterscheiden sich voneinander in ihren Substratspezifitäten, durch ihre gewebe- und zellspezifische Expression, sowie durch kinetische und regulatorische Eigenschaften, die ihre Funktionen reflektieren. Bisher konnten 14 Mitglieder der GLUT-Proteinfamilie identifiziert und

für dreizehn von ihnen der Transport von Zuckermolekülen nachgewiesen werden. In Tabelle 1 wurden die Verteilung und Funktionen der einzelnen GLUT-Proteine zusammengefasst.

Tab. 1: Die Glukosetransport-Familie (GLUT) aus Säugetieren. Ein tabellarischer Überblick über ihr Vorkommen in Geweben und ihre biologischen Funktionen im Organismus.

Bezeichnung	Distribution	Biologische Funktion	Referenz
GLUT1	hauptsächlich in Erythrozyten und Gehirn; Plazenta	Genereller basaler Glukosetransport; Transport über Blut-Gewebe-Schranken	Mueckler <i>et al.</i> , 1985; Baldwin, 1993; Mueckler, 1994
GLUT2	Leber, pankreatische β -Zellen, Niere, Dünndarm	Intestinale und renale Absorption; pankreatische und hepatische Kontrolle der Glukose-Homeostasis; Transport von Glukose und Fruktose	Fukumoto <i>et al.</i> , 1988; Baldwin, 1993; Mueckler, 1994; Wood und Trayhurn, 2003
GLUT3	Neuronen im Gehirn	Aufnahme aus dem cerebralen Fluid in Parenchymzellen des Gehirns	Kayano <i>et al.</i> , 1988; Baldwin, 1993; Mueckler, 1994
GLUT4	Skelett- und Herzmuskelzellen, Adipozyten, Gehirn	Glukosetransport in Zellen insulin-sensitiver Gewebe	Baldwin, 1993; Mueckler, 1994; Rayner <i>et al.</i> , 1994
GLUT5	Dünndarm-Schleimhaut, Hoden, Niere	Transport von Fruktose	Kayano <i>et al.</i> , 1990; Baldwin, 1993; Mueckler, 1994
GLUT6 (GLUT9)	Milz, Leukozyten, Gehirn	Niedrige Affinität für Glukose; besitzt di-Leucin Motif, das verantwortlich ist für intrazelluläre Lokalisation; bisher noch kein Translokationsstimulus identifiziert	Doege <i>et al.</i> , 2000a; Lisinski <i>et al.</i> , 2001
GLUT7	Dünn-, Dickdarm, Hoden, Prostata	Transport von Fruktose und Glukose; hohe Sequenzähnlichkeit zu GLUT5	Li <i>et al.</i> , 2004
GLUT8 (GLUTX1)	hauptsächlich in Hoden; geringe Anteile auch in Dünndarm, Skelettmuskeln und Gehirn	Hoch-affiner Glukosetransporter; besitzt di-Leucin Motif wie GLUT6; vermutlich reguliert über Stillhormone	Doege <i>et al.</i> , 2000b; Ibberson <i>et al.</i> , 2000; Lisinski <i>et al.</i> , 2001; Zhao <i>et al.</i> , 2004
GLUT9	Leber, Niere; geringe Anteile auch in Plazenta, Leukozyten, Lunge und Dünndarm	Vermutlich kritisch für die Präimplantationsentwicklung eines Embryos	Phay <i>et al.</i> , 2000; Augustin <i>et al.</i> , 2004; Carayannopoulos <i>et al.</i> , 2004

GLUT10	Skelettmuskeln, Herz, Leber, Pankreas	Genlokalisierung deutet auf Funktion in Diabetes mellitus Typ II	Dawson <i>et al.</i> , 2001; McVie-Wylie <i>et al.</i> , 2001
GLUT11	Herz- und Skelettmuskeln (1); Leber, Lunge, Luftröhre und Gehirn (2)	Alternatives Spleißen resultiert in 2 Isoformen: (1) kurze Form hat niedrige Affinität für Glukose, (2) transportiert Fruktose	Doege <i>et al.</i> , 2001; Sasaki <i>et al.</i> , 2001; Wu <i>et al.</i> , 2002
GLUT12	Herz, Prostata, Skelettmuskeln, Adipozyten	Transport von Glukose; involviert in Gukoseaufnahme in Brustkrebs- und Prostatakrebszellen	Rogers <i>et al.</i> , 2002; 2003; Chandler <i>et al.</i> , 2003
GLUT14	Hoden	noch nicht geklärt; resultierte vermutlich aus Duplikation von GLUT3, da Identität zu GLUT3 von 95%	Wu und Freeze, 2002
HMIT	Gehirn	H ⁺ -gekoppelter Inositoltransporter	Uldry <i>et al.</i> , 2001

Die GLUT-Proteine wurden inzwischen aufgrund von Sequenzähnlichkeiten und charakteristischen Elementen in drei Subfamilien eingeteilt (Joost und Thorens, 2001; Joost *et al.*, 2002; Wood und Trayhurn, 2003). Die Gruppe der Klasse I Transporter besteht aus den Proteinen GLUT1 bis GLUT4 und GLUT14 (Abb. 1). GLUT1-4 sind sehr gut charakterisiert und unterscheiden sich hauptsächlich durch ihre Verteilung in verschiedenen Geweben. GLUT14 wurde wegen seiner 95%-igen Identität zu GLUT3 ebenfalls dieser Subfamilie zugeordnet (Scheepers *et al.*, 2004). Die Klasse II Facilitatoren beinhalten den Fruktose-spezifischen Transporter GLUT5 und drei ihm verwandte Proteine GLUT7, GLUT9 und GLUT11. Zur Klasse III zählen neben GLUT6 auch GLUT8, GLUT10, GLUT12 und HMIT. Die Klasse III GLUTs sind charakterisiert durch einen verkürzten extrazellulären loop1. Zudem befindet sich die Glykosylierungsstelle nicht, wie bei den anderen GLUT Proteinen, im ersten extrazellulären Bereich, sondern in loop9 (Joost und Thorens, 2001).

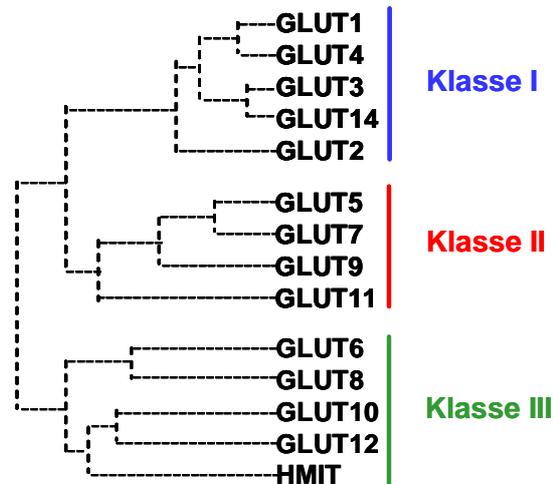


Abb. 1: Dendrogramm der Familie der humanen Glukosetransporter. Die GLUT-Proteine werden in drei Subfamilien (Klasse I, II, III) eingeteilt entsprechend ihrer Sequenzähnlichkeiten und charakteristischen Elemente.

Sequenzvergleiche aller 14 identifizierten GLUT-Transporter erlaubt neben der allgemeinen Struktur von 12 Transmembrandomänen die Festlegung weiterer charakteristischer Zucker/Polyol-Signaturen: (1) sieben konservierte Glycinreste in den Helices, (2) mehrere basische und saure Reste in intrazellulären Bereichen der Proteine, (3) zwei konservierte Tryptophan- und (4) zwei konservierte Tyrosinreste (Joost und Thorens, 2001).

1.2.1 GLUT1, ein Glukosetransporter aus Säugetieren

Die GLUT1-Isoform der Glukosetransporter aus Säugetieren wurde als erstes Protein der GLUT-Familie 1977 von Kasahara und Hinkle aus humanen Erythrozytenmembranen aufgereinigt. 1985 folgte die Klonierung und Sequenzierung des Gens (Mueckler *et al.*, 1985). GLUT1 vermittelt den Glukosetransport in endo- und epithelialen Zellen, die Blut-Gewebe-Schranken bilden (Takata *et al.*, 1990), wie die Blut-Hirn-, Blut-Nerven- und auch Blut-Augen-Schranken. Hauptsächlich ist GLUT1 in Erythrozyten zu finden, wo es mit ca. 6% der gesamten Membranproteinmenge am stärksten vertreten ist (Allard und Lienhard, 1985). GLUT1 hat nicht nur eine Transportfunktion in Zellen Erwachsener, sondern ist besonders auch im Fötus für den Transport von Glukose in Geweben, wie Herz, Leber und Fett, und über die Plazenta verantwortlich (Takata *et al.*, 1990; Baldwin, 1993). Kinetische Untersuchungen von GLUT1 haben gezeigt, dass dieser Transporter durch eine breite Substratspezifität charakterisiert ist und neben Hexosen auch Pentosen transportiert. In *zero-trans*

Aufnahmemessungen von Glukose in humanen Zellen durch GLUT1 wurde ein K_m -Wert ermittelt, der bei der physiologischen Temperatur von 37°C 7 mM beträgt und damit nahe der durchschnittlichen Blutzuckerkonzentration von 5 mM liegt (Jacquez, 1984; Lowe und Walmsley, 1986). Über GLUT1 wird die Zelle konstitutiv mit Glukose versorgt und das Transporterprotein hat somit eine generelle Funktion bei der Aufrechterhaltung eines basalen Levels von Glukose innerhalb der Zelle (Baldwin, 1993; Mueckler, 1994).

1.2.2 Der GLUT4-Glukosetransporter aus Säugetieren

GLUT4 ist neben GLUT1 der wohl am besten charakterisierte Glukosetransporter in Säugern und zeigt in seiner Sequenz eine 65%-ige Identität zu GLUT1 (Baldwin, 1993). Bereits 1980 wurde publiziert, dass in Adipozyten der Ratte Insulin die Translokation eines Glukosetransporters aus intrazellulären Vesikeln zur Plasmamembran stimuliert (Cushman und Wardzala, 1980; Suzuki und Kono, 1980). Die Klonierung des Gens gelang 1988 bzw. 1989 mehreren voneinander unabhängigen Arbeitsgruppen (James *et al.*, 1988; Birnbaum, 1989; Kaestner *et al.*, 1989). Die Lokalisierung von GLUT4 konnte hauptsächlich in Geweben nachgewiesen werden, in denen der Glukosetransport über Insulin reguliert wird. Dies sind Adipozyten, Skelettmuskeln und das Herz (James *et al.*, 1989).

In Abwesenheit von Insulin befindet sich die Mehrheit (>90%) der GLUT4-Transporterproteine in intrazellulären Strukturen. In diesen Zellen ist die Rate der GLUT4-Exozytose 10-fach langsamer als die des konstitutiv zwischen der Plasmamembran und intrazellulären Vesikeln zirkulierenden Transferrin-Rezeptors (Tfr) (Tanner und Lienhard, 1984; Holman *et al.*, 1994). Es konnten verschiedene GLUT4-beihaltende Vesikelpopulationen identifiziert werden. Eine besteht aus endosomalen Vesikeln und Strukturen des trans-Golgi-Netzwerks. GLUT4 scheint sich hier in einem ständigen Kreislauf zu bewegen (Bryant *et al.*, 2002; Karylowski *et al.*, 2004) Bei der zweiten handelt es sich um spezielle GLUT4 Vorratsvesikel (GSV, „GLUT4 storage vesicle“), die nach Insulinstimulation direkt zur Plasmamembran transloziert werden (Kandror und Pilch, 1996; Hashiramoto und James, 2000; Ramm *et al.*, 2000). Insulin verursacht einen ca. 10-fachen Anstieg der GLUT4-Exozytose bei gleichzeitigem Abfall der GLUT4-Endozytoserate (Sato *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2000). Die Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran ist das Resultat zweier voneinander unabhängiger Signalwege, die nach Bindung von Insulin an seinen Rezeptor ausgelöst werden. Neben dem PI3-Kinase-Signalweg wurde noch ein CAP/Cbl abhängiger Signalweg identifiziert (Khan und Pessin, 2002). In Skelettmuskeln konnte auch nachgewiesen werden,

dass GLUT4 unabhängig von Insulin durch Muskelkontraktionen zur Plasmamembran transloziert werden kann (Lund *et al.*, 1995).

1.2.3 Glukosetransportdefekte und davon abhängige Krankheiten

Glukose ist die Hauptenergiequelle in heterotrophen Organismen und spielt daher eine zentrale Rolle im Metabolismus und bei der zellulären Homöostase. Gewebe, wie das Gehirn, benötigen eine konstante Zufuhr von Glukose um ihre Funktionen erfüllen zu können. Eine zu geringe Glukosekonzentration kann zu plötzlichen Anfällen, Bewusstlosigkeit und auch irreparablen Zellschäden führen (Scheepers *et al.*, 2004).

Primäre Glukosetransportdefekte scheinen jedoch nur sehr selten aufzutreten. Ein Grund dafür könnte einfach die Tatsache reflektieren, dass eine komplette Defizienz des Glukosetransports mit einer normalen Entwicklung eines Organismus inkompatibel ist (Brown, 2000). Trotzdem konnten bisher einige Erkrankungen auf Defizienzen im Transport von Glukose zurückgeführt werden.

Das Fanconi-Bickel Syndrom wurde 1949 zum ersten Mal beschrieben und stellt damit eine der ersten entdeckten Krankheiten dar, die in Zusammenhang mit Defekten im Glukosetransport stehen (Fanconi und Bickel, 1949). Hierbei handelt es sich um einen genetischen Defekt ausgelöst durch eine Mutation im GLUT2 Gen (Santer *et al.*, 1997), der sich unter anderem in einer Akkumulation von Glykogen und Fettzellen in Leber sowie Niere und auch Kleinwüchsigkeit äußert (Santer *et al.*, 1998; Pascual *et al.*, 2004). Diese Krankheit wird autosomal rezessiv vererbt (Brown, 2000; Santer *et al.*, 2002). 1962 wurde ein weiterer autosomal rezessiv vererbter Gendefekt beschrieben, der als Glukose-Galaktose Malabsorption bezeichnet wurde (Lindquist und Meeuwisse, 1962). Der Defekt beruht auf Mutationen im SGLT1-Gen (Turk *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1997) und verursacht wässrige Diarrhö und dadurch eine lebensbedrohliche Dehydratation (Pascual *et al.*, 2004). Renale Glykosurie wird auf Defekte im SGLT2-Gen zurückgeführt (Brown, 2000). Vor wenigen Jahren wurden auch im Glukosetransporter GLUT1 Mutationen entdeckt, die für ein Krankheitsbild verantwortlich gemacht werden konnten (Klepper *et al.*, 1999; Seidner *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000). Erstmals war diese GLUT1 Defizienz im Jahre 1991 von De Vivo *et al.* beschrieben und nach ihm als De Vivo-Krankheit oder auch GLUT1DS bezeichnet worden. GLUT1DS führt zu einem beeinträchtigten Glukosetransport über die Blut-Gehirn-Schranke, der in epileptischer Encephalopathie mit Entwicklungsverzögerung resultiert (Klepper *et al.*, 2001). Es konnte nachgewiesen werden, dass es sich um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung handelt.

Von großer Bedeutung für die Forschung ist die Untersuchung des Insulin-regulierten Glukosetransporters GLUT4 im Zusammenhang mit Typ II Diabetes, also der nicht-Insulin-abhängigen Diabetes mellitus (NIDDM). Typ II Diabetes ist charakterisiert durch beeinträchtigte Nutzbarmachung von Glukose und Resistenz gegenüber der Eigenschaft von Insulin, Glukoseaufnahme zu stimulieren (Shulman, 2000). Untersuchungen zeigten, dass der Defekt im Glukosetransport in erkrankten Zellen aus einer reduzierten Auffüllung des GLUT4 Proteins in intrazelluläre Vorratsvesikel, erniedrigte GLUT4-Expression und auch Störungen bei der GLUT4-Translokation zur Plasmamembran resultiert (Desrois *et al.*, 2004; Eriksson *et al.*, 1992; Garvey *et al.*, 1989; 1991). Bisher wurden noch keine Mutationen im GLUT4 Gen identifiziert und so fehlen die Beweise, die einen Zusammenhang zwischen GLUT4-Polymorphismus und NIDDM belegen könnten (Bjorbaek *et al.*, 1994; Lesage *et al.*, 1997).

Auch in der Krebsforschung ist die genaue Charakterisierung der GLUT Proteine sehr wichtig. Maligne Zellen weisen einen beschleunigten Metabolismus und einen erhöhten Bedarf an ATP auf. Warburg beobachtete schon 1956, dass Krebszellen eine sehr hohe Glykolyserate haben. Bis heute wurde weiter intensiv geforscht und so konnte gezeigt werden, dass verschiedene GLUT Gene in Tumorzellen eine erhöhte Expression aufweisen (Macheda *et al.*, 2004). Außerdem wurden GLUT-Isoformen in malignen Geweben nachgewiesen, in denen sie normalerweise nicht exprimiert werden (Younes *et al.*, 1997; Zamora-Leon *et al.*, 1996). Aufgrund der Beteiligung der GLUT-Transporter am Wachstum von Krebszellen könnten sie ein bedeutungsvolles Ziel bei der Behandlung verschiedener Krebsarten darstellen.

1.2.4 Heterologe Expression von GLUT1 und GLUT4 in der Hefe

Die heterologe Expression der beiden Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 aus Säugetieren in *S. cerevisiae* stellte ein Problem dar. Mit dem hexosetransport-defizienten Stamm EBY.VW4000 (1.1) stand ein Hefestamm zur Untersuchung der heterologen Transporter zur Verfügung. Jedoch konnte nach Expression der einzelnen Proteine in diesem Stamm kein aktiver Glukosetransport beobachtet werden (Wieczorke *et al.*, 2003).

GLUT1 war schon in anderen heterologen Systemen, wie *Xenopus*-Oozyten (Gould *et al.*, 1991), CHO-Zellen oder auch Insekten-Zellen (Yi *et al.*, 1992) funktionell exprimiert worden. Kasahara und Kasahara hatten 1996 bzw. 1997 versucht GLUT1 und GLUT4 in Hefe zu exprimieren, aber auch sie konnten keine Glukoseaufnahme über die Plasmamembran nachweisen. Lokalisierungs-

experimente zeigten hier, dass sowohl GLUT1 als auch GLUT4 in intrazellulären Kompartimenten zurückgehalten wurde.

Von Wieczorke *et al.* (2003) durchgeführte Untersuchungen zur Lokalisierung der beiden GLUT-Proteine in dem *hxf*-Stamm mittels GFP-Fusion zeigten, dass GLUT1 an der Plasmamembran lokalisiert war (Abb. 2A). Dagegen konnte GLUT4 nur in intrazellulären Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 2B).

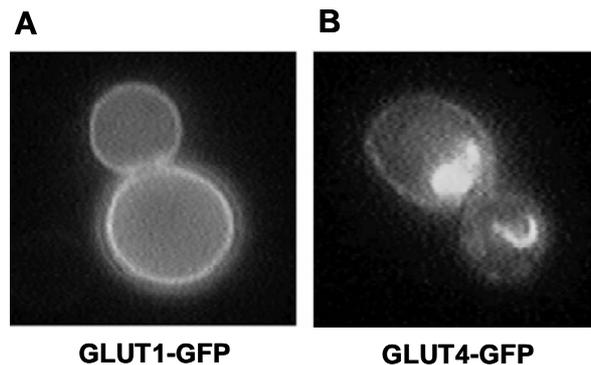


Abb. 2: Lokalisierung von GLUT1 und GLUT4 mittels GFP-Fusion. (A) GLUT1-GFP wurde an der Plasmamembran lokalisiert; (B) GLUT4-GFP zeigte eine intrazelluläre Lokalisierung. Die Abbildung wurde publiziert in Wieczorke *et al.*, 2003.

Das Einführen zusätzlicher Mutationen in den *hxf*-Stamm zur funktionellen Expression von GLUT1 und GLUT4 in Hefe war notwendig. Durch Bestrahlung GLUT1-exprimierender Zellen mit einer sub-letalen Dosis UV-Strahlen konnten Suppressorkolonien erhalten werden, die auf glukosehaltigem Medium wachsen konnten (Wieczorke *et al.*, 2003). Untersuchungen mit vier Suppressorkolonien identifizierten Mutationen innerhalb der GLUT1-kodierenden Sequenz. Eine fünfte Suppressorkolonie war auch nach Expression des Wildtyp GLUT1-Gens weiterhin in der Lage auf Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Hierbei musste es sich also um eine Mutation im Genom der Hefe handeln, die die nicht-funktionelle Expression von GLUT1 aufhob. Das mutierte Allel wurde mit *fgy1-1* für „functional expression of GLUT1 in yeast“ bezeichnet.

Diese Mutation reichte allerdings nicht aus auch GLUT4 funktionell zu exprimieren. Im Rahmen einer weiteren Doktorarbeit wurde jedoch mit Hilfe einer Insertionsgenbank (Transposongenbank) eine *hxf fgy1-1 fgy4X*-Mutante isoliert, die in der Lage war, mit GLUT4 wieder auf Glukosemedium zu wachsen. Die nähere Untersuchung dieser Mutation identifizierte *fgy4* als Allel des *ERG4*-Gens der Hefe (Dlugai, 2002). Das *ERG4*-Gen kodiert für das Enzym Sterol-C-24(28)-

Reduktase, welches den letzten Schritt der Ergosterolbiosynthese katalysiert (Zweytick *et al.*, 2000). Ein *erg4*-Deletionsstamm akkumuliert statt Ergosterol die Ergosterolvorstufe Ergosta-5,7,22,25(28)-Tetraen-3 β -ol in der Plasmamembran.

1.3 Erkenntnisse zum Fgy1-Protein aus *S. cerevisiae*

Bei dem Fgy1-Protein der Hefe *S. cerevisiae* handelt es sich um ein Protein mit unbekannter Funktion. Innerhalb eines synthetisch-letalen Screens wurde das für Fgy1 kodierende Gen *YMR212c* im Jahr 2001 von Lenburg und O'Shea isoliert. Sie hatten nach Mutanten gesucht, die in Verbindung mit der Deletion von *PHO85* eine synthetische Letalität zeigten. *PHO85* kodiert für eine nicht-essentielle Cyclin-abhängige Kinase, die in die Regulation mehrerer zellulärer Prozesse involviert ist und deren Substratspezifität in Abhängigkeit von Interaktionen mit unterschiedlichen Cyclinen definiert wird (Uesono *et al.*, 1987; Toh-e *et al.*, 1988). Pho85 bildet z.B. mit dem Cyclin Pho80 einen Komplex, dem eine Funktion im *PHO*-Signaltransduktionsweg zukommt (Toh-e und Shimauchi, 1986; Lenburg und O'Shea, 1996). Das von Lenburg und O'Shea (2001) identifizierte, auf Chromosom XIII liegende Gen, wurde mit *EFR3* für „PHO Eighty-Five-Requiring“ bezeichnet und unter diesem Namen wird es auch in der SGD-Datenbank geführt. Wieczorke *et al.* (2003) isolierten über Komplementation der *fgy1-1* Mutation mit einer Genbank ein Plasmid, das das *FGY1*-Wildtypallel enthielt. Das Fgy1 Protein wurde für die nicht-funktionelle Expression des Glukosetransporters GLUT1 aus Säugern in Hefe verantwortlich gemacht.

Das Gen *EFR3/FGY1* kodiert für ein 782 Aminosäuren langes Protein mit einer Größe von 90 kDa. Laut der SGD-Datenbank handelt es sich um ein nicht-essentielles Protein. Unsere Arbeitsgruppe stellte allerdings fest, dass die Deletion von *FGY1* je nach Stammhintergrund und verwendeter Kohlenstoffquelle zu unterschiedlichen Phänotypen führte (Wieczorke, 2001). Während die Deletion von *FGY1* im *hxf*-Stamm EBY.VW4000, der vom CEN.PK-Stamm abstammte, letal war, wurde das Wachstum im Stamm W303 durch eine *fgy1*-Deletion lediglich verlangsamt.

Fgy1 wurde in voneinander unabhängigen Untersuchungen an der Zellperipherie lokalisiert. Mit Hilfe einer Modifikation des von Aronheim *et al.* (1997) entwickelten Sos-Recruitment-Systems (SRS), mit dem eine Untersuchung der Membranlokalisierung von Proteinen möglich ist, konnte eine Lokalisierung an der Plasmamembran gezeigt werden (Wieczorke, 2001). Auch Huh *et al.* (2003)

konnten mit Hilfe der Fusion des grün-fluoreszierenden Proteins GFP an Fgy1 diese Lokalisierung nachweisen.

Ein Hydrophatiblot gab Aufschluss über die Domänenstruktur des Proteins. Demnach besitzt das Fgy1-Protein eine Transmembrandomäne. Das Lokalisierungsexperiment mittels hSos-Fusion an Fgy1 zeigte außerdem, dass sich der C-Terminus des Proteins im Zytoplasma befinden muss (Wieczorke, 2001). Über eine „Two-Hybrid“-Analyse wurde allerdings eine Interaktion von Fgy1 mit Glg2 publiziert (Ito *et al.*, 2001). Das *S. cerevisiae* Gen *GLG2* („glykogenin-like gene“) kodiert für ein selbst-glukosylierendes Protein, das homolog zum Glykogenin der Säugetiere ist. Zusammen mit dem Protein Glg1 ist Glg2 verantwortlich für die Akkumulation des Polysaccharids Glykogen, das unter Nährstoffmangel verstoffwechselt wird. Beide Proteine dienen als Substrate für die Elongation durch die Glykogensynthase (Cheng *et al.*, 1995). Mit Hilfe des von Fields und Song (1989) beschriebenen „Two-Hybrid“-Systems können Interaktionen zwischen löslichen Proteinen und nicht zwischen Membranproteinen nachgewiesen werden, so dass aufgrund der Experimente zur Identifizierung von Fgy1 als Plasmamembranprotein hier noch Klärungsbedarf besteht.

In *S. cerevisiae* wurden keine homologen Proteine zu Fgy1 identifiziert. Eine erweiterte Suche über die SGD-Datenbank in Datenbanken anderer Organismen (NCBI PSI-BLAST search) ergab mehrere homologe Proteine in anderen Organismen, dessen Funktionen jedoch auch unbekannt sind. So wurden z.B. ein Protein aus *Eremothecium gossypii* (AER343Cp), ein unbenanntes Protein aus *Kluyveromyces lactis*, ein unbenanntes Protein aus *Candida glabrata*, zwei im Menschen (KIAA0953, KIAA0143) und auch eins in *Schizosaccharomyces pombe* identifiziert. Ein Vergleich mit der *Candida albicans* Datenbank zeigte auch ein noch unbekanntes Protein (*IPF11045*) mit schwacher Ähnlichkeit zu Fgy1.

Bei der *fgy1-1* Mutation handelt es sich um eine Verkürzung des Proteins am C-Terminus um 120 Aminosäuren. Ein Vergleich der Sequenz des mutierten Gens mit der Wildtyp-Sequenz ergab eine einzelne Insertion von Adenosin zwischen die Nukleotide Adenosin an Position 1978 und Cytosin an Position 1979 des offenen Leserahmens (Wieczorke, 2001). Bedingt durch die Rasterschubmutation erfolgt eine Verschiebung des ursprünglichen Leserahmens, welche die Aminosäuresequenz verändert. Diese Veränderung hat einen vorzeitigen Abbruch der Translation zur Folge, hervorgerufen durch ein kurz hinter der Adenosin-Insertion auftretendes Stop-Codon. Eine Kreuzungsanalyse belegte, dass es sich bei der genomischen *fgy1-1* Mutation um eine rezessive Mutation handelt, da die GLUT1-

vermittelte Glukoseaufnahme in heterozygot-diploiden Zellen (*fgy1-1/FGY1*) durch das dominante *FGY1*-Wildtypallel verhindert wurde.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollte eine Funktionsanalyse des *Saccharomyces cerevisiae* Proteins Fgy1/Efr3 durchgeführt werden. Mit Hilfe verschiedener Methoden sollte eine mögliche Funktion des Proteins eingegrenzt und dann näher untersucht werden. Mit Charakterisierung von Fgy1 könnte ein weiteres Protein von der Liste der Proteine unbekannter Funktion gestrichen werden. Außerdem wäre die Identifizierung seiner Aufgaben in Hefe von großer Bedeutung für das Verständnis seiner Rolle in der heterologen Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4. So könnten die Erkenntnisse für die Expression weiterer heterologer Proteine genutzt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Stämme und Medien

2.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

Tab. 2: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli* (*E. coli*) Stämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
DH5 α F'	<i>F'</i> (ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15) Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r_k⁻ m_k⁺</i>) <i>supE44</i> λ <i>gyrA96 thi-1 relA1</i>	Gibco BRL, Gaithersburg/MD, USA
DH10B	<i>F'</i> , <i>mcrA</i> Δ -(<i>mrr hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 ara</i> Δ 139 Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ <i>rpsL end A1 nupG</i>	Gibco BRL Gaithersburg/MD, USA
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^r</i>) <i>uvrC</i> [<i>F' proAB lac^fZ</i> Δ M15 <i>Tn10</i> (<i>Tet^r</i>)] ^f	Stratagene

2.1.2 Medien und Anzucht von *E. coli*

Vollmedium (LB): 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, pH 7,5
(nach 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 der *E. coli* Zellen erfolgte bei 37°C.

2.1.3 *S. cerevisiae*-Stämme

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

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
CEN.PK2-1C (= VW1A)	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	K.-D. Entian, Frankfurt
EBY109A	<i>MATa leu1</i>	E. Boles, Frankfurt

EBY109B	<i>MATα leu1</i>	E. Boles, Frankfurt
EBY.18ga	<i>MATα Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	Wieczorke <i>et al.</i> , 1999
EBY.S7	<i>MATα Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	Wieczorke <i>et al.</i> , 2003
EBY.VW4000	<i>MATα Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	Wieczorke <i>et al.</i> , 1999
NY782	<i>MATα sec9-4 ura3-52 leu2-3,112</i>	Walworth <i>et al.</i> , 1992
NY1217	<i>MATα sec18-1 ura3-52 leu2-3,112</i>	Abeliovich <i>et al.</i> , 1998
RWY16D	<i>MATα/α Δhxt1-17/Δhxt1-17 Δgal2/Δgal2 Δagt1/Δagt1 Δstl1/Δstl1 leu2-3,112/ leu2-3,112 ura3-52/ ura3-52 trp1-289/ trp1-289 his3-Δ1/ his3-Δ1 MAL2-8^C/ MAL2-8^C SUC2/ SUC2</i>	Wieczorke, Düsseldorf
RWY95-1D	<i>MATα ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 ade2-1 can1-100</i>	Wieczorke, Düsseldorf 2001
RWY95-1A	<i>MATα fgy1::kanMX ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 ade2-1 can1-100</i>	Wieczorke, Düsseldorf 2001
SDY.022 (EBY.F4-1)	<i>MATα Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 erg4::kanMX leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	Wieczorke <i>et al.</i> , 2003
SDY.025	<i>MATα Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 erg4::kanMX leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	S. Dlugai, 2002
YSYA321	<i>MATα Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 fbp1::kanMX leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8C SUC2</i>	K. Lyuten (Sympore), Tübingen
W303	<i>MATα/α ura3-1/ura3-1 leu2-3,112/leu2-3,112 trp1-1/trp1-1 his3-11/his3-11 ade2-1/ade2-1 can1-100/can1-100</i>	E. Boles, Frankfurt

Tab. 4: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte *S. cerevisiae* Stämme

Stamm	Genotyp	parentaler Stamm	Quelle/Referenz
DVY.095	<i>MATα Δfgy1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 ade2-1 can1-100</i>	W303	diese Arbeit
DVY.01	<i>MATα pho84::kanMX ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 ade2-1 can1-100</i>	W303	diese Arbeit
DVY.02	<i>MATα pho84::kanMX Δfgy1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 his3-11 ade2-1 can1-100</i>	W303	diese Arbeit
DVY.03	<i>MATα Δfbp1 Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	CEN.PK2-1C	diese Arbeit

DVY.04	<i>MATa fgy1::kanMX sec9-4 ura3-52 leu2-3,112</i>	NY782	diese Arbeit
DVY.05	<i>MATa fgy1::kanMX sec18-1 ura3-52 leu2-3,112</i>	NY1217	diese Arbeit
DVY.06	<i>MATa FGY1-TAP K.I.URA3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	CEN.PK2-1C	diese Arbeit
DVY.07	<i>MATa Prom.RSP5::kanMX Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	CEN.PK2-1C	diese Arbeit
DVY.08	<i>MATa Prom.RSP5::kanMX Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 fgy1-1 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	CEN.PK2-1C	diese Arbeit
DVY.09	<i>MATa rsp5ΔC2⁴⁻⁴¹⁴ Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	CEN.PK2-1C	diese Arbeit
DVY.011	<i>MATa/α Δhxt1-17/Δhxt1-17 Δgal2/Δgal2 Δagt1/Δagt1 Δstl1/Δstl1 leu2-3,112/leu2-3,112 ura3-52/ura3-52 trp1-289/TRP1 his3-Δ1/his3-Δ1 MAL2-8^C/MAL2-8^C SUC2/SUC2</i>	CEN.PK2-1C	diese Arbeit
DVY.012	<i>MATa/α Δhxt1-17/Δhxt1-17 Δgal2/Δgal2 Δagt1/Δagt1 Δstl1/Δstl1 leu2-3,112/leu2-3,112 ura3-52/ura3-52 trp1-289/TRP1 his3-Δ1/his3-Δ1 MAL2-8^C/MAL2-8^C SUC2/SUC2</i>	CEN.PK2-1C	diese Arbeit
DVY.013	<i>MATa/α erg6::kanMX/ERG6 Δhxt1-17/Δhxt1-17 Δgal2/Δgal2 Δagt1/Δagt1 Δstl1/Δstl1 leu2-3,112/leu2-3,112 ura3-52/ura3-52 trp1-289/TRP1 his3-Δ1/his3-Δ1 MAL2-8^C/MAL2-8^C SUC2/SUC2</i>	CEN.PK2-1C	diese Arbeit
DVY.014	<i>erg6::kanMX Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2 TRP1</i>	CEN.PK2-1C	diese Arbeit
DVY.033	<i>MATa hta1::kanMX Δfbp1 Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	CEN.PK2-1C	diese Arbeit
DVY.035	<i>MATa ctr9::kanMX Δfbp1 Δhxt1-17 Δgal2 Δagt1 Δstl1 Δmph2 Δmph3 leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-Δ1 MAL2-8^C SUC2</i>	CEN.PK2-1C	diese Arbeit

2.1.4 Medien und Anzucht von Hefestämmen

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

Minimalmedium (YNB): 0,67% Yeast nitrogen base w/o amino acids pH 6,3, Aminosäure/Nukleobase-Lösung, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegebenen Konzentration.

Konzentration der Aminosäuren und Nukleobasen im Minimalmedium:

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

Die Zugabe von Aminosäuren und Basen erfolgte nach Zimmermann (1975).

Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen bzw. auf Zellen mit genomisch integriertem *Kluyveromyces lactis URA3*-Markergen wurde die jeweilige Aminosäure oder Base nicht hinzu gegeben.

Innerhalb dieser Arbeit wurden folgende Kohlenstoffquellen verwendet: Ethanol, Galaktose, Glukose und Maltose. Galaktose, Glukose und Maltose wurden mit dem Medium autoklaviert, Ethanol wurde nach dem Autoklavieren dem Medium zugegeben. Die Selektion auf Geneticinresistenz wurde auf Vollmediumsplatten mit 200 mg/l G418 durchgeführt (Longtine *et al.*, 1998). Für die Selektion auf Verlust eines Plasmids mit *URA3*-Marke wurden YNB-Agarplatten verwendet, die neben Uracil 1 mg/ml FOA enthielten (Boeke *et al.*, 1984).

Um Enzymaktivitätsbestimmungen durchzuführen wurde ein Vollmedium (YEP) ohne Phosphat (YPD-Pi) bzw. mit definierter Phosphatkonzentration (YPD+Pi) hergestellt (Kaneko *et al.*, 1982). Dazu wurden 20 g/l Pepton, 10 g/l Hefeextrakt in einem Liter Wasser gelöst. Zur Lösung wurden 10 ml/l 1M MgSO₄ und 10 ml/l 30% Ammoniumhydroxidlösung gegeben. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Medium gefiltert und der pH-Wert mit 1N HCl auf 5,8 eingestellt. Vor dem Autoklavieren wurde dem Medium 20 g/l Glukose zugesetzt. Um ein Medium mit definierter Phosphatkonzentration zu erhalten wurde dem Medium nach Ausfällen des Phosphats und nach Zugabe der Glukose 1M KH₂PO₄ in einer Endkonzentration von 10 mM dazugegeben.

Feste Nährböden enthielten zusätzlich 1,8% Agar.

Die Anzucht der Hefezellen erfolgte bei 30°C. Temperatursensitive Stämme wurden zunächst bei einer permissiven Temperatur von 25°C angezogen und darauf folgend bei einer restriktiven Temperatur von 34-42°C inkubiert.

2.2 Plasmide

Tab. 5: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Quelle/Referenz	Beschreibung
pGEM4ZhsGLUT4	H. Al Hasani, Köln	DNA-Vorlage zur Amplifizierung von humanem GLUT4
p423MET25FGY1-HA	Dörthe Voss, 2001	Amplifizierung des <i>FGY1</i> -ORFs von dem Plasmid pRW7S-T1-19 mittels PCR; <i>in-vivo</i> Rekombination in das mit <i>EcoRI</i> und <i>SpeI</i> geschnittene Plasmid p423MET25-HA
p426HXT7-6His (p426H7)	Becker und Boles, 2003	2 μ Expressionsplasmid zur Herstellung von Fusionsproteinen mit 6xHis-Epitop; <i>URA3</i> -Selektionsmarker, verkürzter <i>HXT7</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
p426MAL31	Wieczorke <i>et al.</i> , 1999	<i>MAL31</i> -ORF kloniert in <i>EcoRI/SalI</i> linearisierten Vektor p426MET25 hinter regulierbaren <i>MET25</i> -Promotor
pBS1539	Puig <i>et al.</i> , 2001	DNA-Vorlage zur Amplifikation der TAP-tag Sequenz inklusive <i>URA3</i> -Selektionsmarker aus <i>Kluyveromyces lactis</i>
pFG112	Gilstring und Ljungdahl, 2000	DNA-Vorlage zur Klonierung einer 144 bp großen Reporterkassette aus dem <i>SUC2</i> -Gen
pRS306RSP5 Δ C2	Rosine Haguenaer-Tsapis, Paris	Integrationsplasmid pRS306 (Sikorski und Hieter, 1989) mit integriertem <i>RSP5ΔC2</i> ORF; <i>AMP^R</i> -Selektionsmarker und <i>URA3</i> -Selektionsmarker
pRW7S-T1-19	Wieczorke, 2001	Im Rahmen der Komplementation von <i>fgy1-1</i> aus einer Genbank isoliertes Plasmid; <i>URA3</i> -Selektionsmarker
pSH47	Güldener <i>et al.</i> , 1996	Cre-Rekombinase hinter dem <i>GAL2</i> -Promotor der Hefe; <i>URA3</i> -Selektionsmarker
pUG6	Güldener <i>et al.</i> , 1996	DNA-Vorlage für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Deletion von Genen mit dem <i>loxP::kanMX::loxP</i> -Selektionsmarker

YEpFGY1-GFP	Wieczorke, 2001	C-terminale Fusion Fgy1 mit GFP in 2 μ -Expressionsvektor p426MET25-GFP; <i>URA3</i> -Selektionsmarker, <i>MET25</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
YEprGLUT1-GFP	Wieczorke <i>et al.</i> , 2003	C-terminale Fusion von GLUT1 der Ratte mit GFP in 2 μ -Expressionsvektor; <i>URA3</i> -Selektionsmarker, <i>MET25</i> -Promotor und <i>CYC1</i> -Terminator
YEp4H7-hsGLUT1	Wieczorke <i>et al.</i> , 2003	GLUT1 des Menschen hinter dem verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in 2 μ Vektor mit <i>URA3</i> -Selektionsmarker und <i>CYC1</i> -Terminator
YEp4H7-hsGLUT4	Wieczorke <i>et al.</i> , 2003	GLUT4 des Menschen hinter dem verkürzten <i>HXT7</i> -Promotor in 2 μ Vektor mit <i>URA3</i> -Selektionsmarker und <i>CYC1</i> -Terminator
YIp5	Botstein <i>et al.</i> , 1979	Integrationsvektor mit <i>AMP^R</i> -Selektionsmarker und <i>URA3</i> -Markergen
YIplac204	Gietz und Sugino, 1988	Integrationsvektor mit <i>AMP^R</i> -Selektionsmarker mit <i>TRP1</i> -Markergen

Tab. 6: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
p426HXT7FGY1	Klonierung von <i>FGY1</i> der Hefe in p426HXT7-6His unter Aussparung des His ₆ -Epitops
p426H7HA-MAL31	Klonierung eines am 5'-Ende mit 1x HA-tag modifiziertem <i>MAL31</i> im Plasmid p426HXT7-6His
p426H7GLUT4 ^{V85M}	Mutagenisiertes humanes GLUT4 durch Austausch von Valin an Position 85 gegen Methionin im p426HXT7-6His
YEp4H7-hsGLUT1 ^{BamHI-150}	Integration der Sequenz 5' GGATCC ^{3'} als <i>Bam</i> HI-Restriktionschnittstelle an Position 150 bp von GLUT1 in YEp4H7-hsGLUT1
YEp4H7-hsGLUT1 ^{BamHI-273}	Integration der Sequenz 5' GGATCC ^{3'} als <i>Bam</i> HI-Restriktionschnittstelle an Position 273 bp von GLUT1 in YEp4H7-hsGLUT1
YEp4H7-hsGLUT1 ^{BamHI-357}	Integration der Sequenz 5' GGATCC ^{3'} als <i>Bam</i> HI-Restriktionschnittstelle an Position 357 bp von GLUT1 in YEp4H7-hsGLUT1
YEp4H7-hsGLUT1 ^{BamHI-459}	Integration der Sequenz 5' GGATCC ^{3'} als <i>Bam</i> HI-Restriktionschnittstelle an Position 459 bp von GLUT1 in YEp4H7-hsGLUT1
YEp4H7-hsGLUT1 ^{SUC2-151-1}	Klonierung des 144 bp <i>Bam</i> HI-Fragmentes von <i>SUC2</i> aus dem Vektor pFG112 in das mit <i>Bam</i> HI linearisierte Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 ^{BamHI-150}
YEp4H7-hsGLUT1 ^{SUC2-151-2}	Klonierung des 144 bp <i>Bam</i> HI-Fragmentes von <i>SUC2</i> aus dem Vektor pFG112 in das mit <i>Bam</i> HI linearisierte Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 ^{BamHI-150}

YEp4H7-hsGLUT1 ^{SUC2-274-1}	Klonierung des 144 bp <i>Bam</i> HI-Fragmentes von <i>SUC2</i> aus dem Vektor pFG112 in das mit <i>Bam</i> HI linearisierte Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 ^{<i>Bam</i>HI-273}
YEp4H7-hsGLUT1 ^{SUC2-274-2}	Klonierung des 144 bp <i>Bam</i> HI-Fragmentes von <i>SUC2</i> aus dem Vektor pFG112 in das mit <i>Bam</i> HI linearisierte Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 ^{<i>Bam</i>HI-273}
YEp4H7-hsGLUT1 ^{SUC2-358-1}	Klonierung des 144 bp <i>Bam</i> HI-Fragmentes von <i>SUC2</i> aus dem Vektor pFG112 in das mit <i>Bam</i> HI linearisierte Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 ^{<i>Bam</i>HI-358}
YEp4H7-hsGLUT1 ^{SUC2-358-2}	Klonierung des 144 bp <i>Bam</i> HI-Fragmentes von <i>SUC2</i> aus dem Vektor pFG112 in das mit <i>Bam</i> HI linearisierte Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 ^{<i>Bam</i>HI-358}

2.3 Genbank

Es wurde eine *S. cerevisiae* miniTn3::*lacZ*::*LEU2*-Genbank mit chromosomalen Fragmenten im Vektor pHSS6 verwendet (Seifert *et al.*, 1986; Burns *et al.*, 1994).

2.4 Synthetische Oligonukleotide

Tab. 7: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotide	Sequenz 5' → 3'	Beschreibung
a1-ERG6	GATGCAACAGGGTAAGATCAG	Aufwärtsprimer zum Nachweis der <i>erg6</i> -Deletion
a4-ERG6	GCAAGAAATCCAATGGCTTTC	Abwärtsprimer zum Nachweis der <i>erg6</i> -Deletion
a1-FGY1	ACTCTGTAAAATTCAACTTTG	Aufwärtsprimer zum Nachweis der <i>fgy1</i> -Deletion
a4-FGY1	CGAGTACTTCCTTTCAAGAAT	Abwärtsprimer zum Nachweis der <i>fgy1</i> -Deletion
a1-PHO84	CCACGTGGACGTGTTATTTCCA	Aufwärtsprimer zum Nachweis der <i>pho84</i> -Deletion
a4-PHO84	TGAATCAAACCAGATCAGATC	Abwärtsprimer zum Nachweis der <i>pho84</i> -Deletion
a1-RSP5delC2	TAGTGCGTTTTTAGTTCGATA	Aufwärtsprimer zum Nachweis der Deletion der C2-Domäne von <i>RSP5</i>
a4-RSP5delC2	TTAAATCTTCTGGGGTTTGTC	Abwärtsprimer zum Nachweis der Deletion der C2-Domäne von <i>RSP5</i>

a1-RSP5-kanMX	ATATTTCTACCTTTTTATATA	Aufwärtsprimer zum Nachweis der Integration der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Kassette in der Promotorbereich von <i>RSP5</i>
a4-RSP5-kanMX	ATACGTCCCTCTTATATAATG	Abwärtsprimer zum Nachweis der Integration der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Kassette in der Promotorbereich von <i>RSP5</i>
a1-TSC3	GGCACGATTTGGAAAGATAACC	Aufwärtsprimer zum Nachweis der <i>tsc3</i> -Deletion
a4-TSC3	TGCGAGTGACCATCAATCCCG	Abwärtsprimer zum Nachweis der <i>tsc3</i> -Deletion
a1-YNL094	CAGGCAGAACGTTGTGCTCTT	Aufwärtsprimer zum Nachweis der <i>ynl094</i> -Deletion
a4-YNL094	CTATTGAGGACTTCCCGACAG	Abwärtsprimer zum Nachweis der <i>ynl094</i> -Deletion
a1-YNL194	CCCAACATAATCTTAAGGGCC	Aufwärtsprimer zum Nachweis der <i>ynl194</i> -Deletion
a4-YNL194	CCGATGCTACCGGCACCGGTG	Abwärtsprimer zum Nachweis der <i>ynl194</i> -Deletion
f-Hxt7pr-Fgy1	AACACAAAAACAAAAAGTTTTTTTAA TTTTAATCAAAAAATGCAGTTGTCTA TGCGGAT	Aufwärtsprimer zur Klonierung von <i>FGY1</i> hinter den <i>HXT7</i> -Promotor in das Plasmid p426HXT7-6His
r-Hxt7pr-Fgy1	GAATGTAAGCGTGACATAACTAATTA CATGACTCGAGTCAAGTGGAGGAGA AAATTT	Abwärtsprimer zur Klonierung von <i>FGY1</i> hinter den <i>HXT7</i> -Promotor in das Plasmid p426HXT7-6His
FGY1-TAPf	GAAGATTTACATTCTTTAAGTTCAAG AGGTAAAATTTCTCCTCCAATTCCA TGAAAAGAGAAG	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung des TAP-tags aus dem Plasmid pBS1539 und anschließender genomischer Integration des „tags“ an das 5'-Ende von <i>FGY1</i>
FGY1-TAPr	CTCTTGCCCTTGAAAGCATCCACAG CTGTCCGTCAAAAATTAATTTCTAC GACTCACTATAGGG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung des TAP-tags aus dem Plasmid pBS1539 und anschließender genomischer Integration des „tags“ an das 5'-Ende von <i>FGY1</i>
fSUC	CAGGTGCTTTCTCTGGCTCCA	Aufwärtsprimer zur Überprüfung der Integration und Orientierung einer <i>SUC2</i> -Reporter-kassette
G4VM-1	CCCTCTGGGCCCTCTCCATGGCCAT CTTTCCGTGG	Aufwärtsprimer zur Integration einer <i>in-vitro</i> Mutagenese in humanem GLUT4; Austausch von Valin an Position 85 gegen Methionin
G4VM-2	CCACGGAAAAGATGGCCATGGAGA GGGCCAGAGGG	Abwärtsprimer zur Integration einer <i>in-vitro</i> Mutagenese in humanem GLUT4; Austausch von Valin an Position 85 gegen Methionin

Glycv	ATGATTACGCCAAGCGCGCAA	Aufwärtsprimer zur Klonierung einer <i>Bam</i> HI Schnittstelle in humanes GLUT1 in Kombination mit einem der Primer Glyk1z – Glyk4z
Glycz	CAGGGTAGCTGCTCCAGCAGT	Abwärtsprimer zur Klonierung einer <i>Bam</i> HI Schnittstelle in humanes GLUT1 in Kombination mit einem der Primer Glyk1v – Glyk4v
Glyc1v	TACAACCAGACATGGGTCCACGGAT CCCGCTATGGGGAGAGCATCCTG	Aufwärtsprimer zur Klonierung einer <i>Bam</i> HI Schnittstelle in-frame zwischen Basen 150/151 der GLUT1-Sequenz in Kombination mit Glykz in YEp4H7-hsGLUT1
Glyc2v	CTTTTCGTTAACCGCTTTGGCGGAT CCCGGCCGAATTC AATGCTGATG	Aufwärtsprimer zur Klonierung einer <i>Bam</i> HI Schnittstelle in-frame zwischen Basen 273/274 der GLUT1-Sequenz in Kombination mit Glykz in YEp4H7-hsGLUT1
Glyc3v	TCGAAACTGGGCAAGTCCTTTGGAT CCGAGATGCTGATCCTGGGCCGC	Aufwärtsprimer zur Klonierung einer <i>Bam</i> HI Schnittstelle in-frame zwischen Basen 357/358 der GLUT1-Sequenz in Kombination mit Glykz in YEp4H7-hsGLUT1
Glyc4v	GTGTCACCCACAGCCTTTTCGTGGAT CCGGGGCCCTGGGCACCCTGCAC	Aufwärtsprimer zur Klonierung einer <i>Bam</i> HI Schnittstelle in-frame zwischen Basen 459/460 der GLUT1-Sequenz in Kombination mit Glykz in YEp4H7-hsGLUT1
Glyc1z	CAGGATGCTCTCCCCATAGCGGGAT CCGTGGACCCATGTCTGGTTGTA	Abwärtsprimer zur Klonierung einer <i>Bam</i> HI Schnittstelle in-frame zwischen Basen 150/151 der GLUT1-Sequenz in Kombination mit Glykv in YEp4H7-hsGLUT1
Glyc2z	CATCAGCATTGAATTCCGCCGGGAT CCGCCAAAGCGGTTAACGAAAAG	Abwärtsprimer zur Klonierung einer <i>Bam</i> HI Schnittstelle in-frame zwischen Basen 273/274 der GLUT1-Sequenz in Kombination mit Glykv in YEp4H7-hsGLUT1
Glyc3z	GCGGCCCAGGATCAGCATCTCGGA TCCAAAGGACTTGCCCAGTTTCGA	Abwärtsprimer zur Klonierung einer <i>Bam</i> HI Schnittstelle in-frame zwischen Basen 357/358 der GLUT1-Sequenz in Kombination mit Glykv in YEp4H7-hsGLUT1
Glyc4z	GTGCAGGGTGCCAGGGCCCCGGA TCCACGAAAGGCTGTGGGTGACAC	Abwärtsprimer zur Klonierung einer <i>Bam</i> HI Schnittstelle in-frame zwischen Basen 459/460 der GLUT1-Sequenz in Kombination mit Glykv in YEp4H7-hsGLUT1

HA-M1	AACACAAAAACAAAAAGTTTTTTTAA TTTTAATCAAAAAATGTACCCATACG ACGTTCCCAGACTACGCTCCAGGTA TGAAGGGATTATCCTCATTAATAAAC	Aufwärtsprimer zur Klonierung eines Plasmids mit 1x HA-tag am 5'-Ende von <i>MAL31</i> direkt hinter dem Startcodon; Amplifizierung von <i>MAL31</i> aus dem Plasmid p426MAL31
HA-M2	GAATGTAAGCGTGACATAACTAATTA CATGACTCGAGTCATTTGTTACAA CAGATGAGGTG	Abwärtsprimer zur Klonierung eines Plasmids mit 1x HA-tag am 5'-Ende von <i>MAL31</i> direkt hinter dem Startcodon; Amplifizierung von <i>MAL31</i> aus dem Plasmid p426MAL31
hsG4-F7	TTAATTTTAATCAAAAAATGCCGTCG GGCTTCCAA	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung von humanem GLUT4; enthält Bindestelle für t71-ORFs
k2-kanMX	TTGTCGCACCTGATTGCCCG	Überprüfung einer Deletion mittels der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Kassette in Kombination mit dem entsprechenden a1-Primer
k3-kanMX	TATGGAAGTGCCTCGGTGAG	Überprüfung einer Deletion mittels der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Kassette in Kombination mit dem entsprechenden a4-Primer
M13pUC(-40)	GTTTTCCCAGTCACGAC	Abwärts-Sequenzierprimer, bindet in <i>lacZ</i> , -40 bp vor terminalem Repeat des mTn3- <i>lacZ/LEU2</i>
S1-ERG6	ATGAGTGAAACAGAATTGAGAAAA GACAGGCCCAATTCATTTTCGTACG CTGCAGGTTCGAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>ERG6</i>
S2-ERG6	TTATTGAGTTGCTTCTTGGAAGTTT GGGAGGGGGTTTTCGGCGCATAGGC CACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>ERG6</i>
S1-YMR212	ATGCAGTTGTCTATGCGGATGATGT TCACACCAAACATCAGAAACTGTT CGTACGCTGCAGGTTCGAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>FGY1</i>
S2-YMR212	CTCTTGCCCTTGAAAGCATCCACAG CTGTCCGTCAAAAACCTAATTTTCGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>FGY1</i>
S2-FGY1	TCAAGTGGAGGAGAAAATTTTACCT CTTGAACCTAAAGAATGTAAATCGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>FGY1</i>
S1-HTA1	ATGTCCGGTGGTAAAGGTGGTAAAG CTGGTTCAGCTGCTAAAGCTTCT TTCGTACGCTGCAGGTTCGAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>HTA1</i>
S2-HTA1	TTATAATTCTTGAGAAGCCTTGGTAG CCTTGGCAGACTTCTTTGGCAA GCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>HTA1</i>
S1-PHO84	ATGAGTTCCGTCAATAAAGATACTAT TCATGTTGCTGAAAGAAGTCTTTTCG TACGCTGCAGGTTCGAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>PHO84</i>

S2-PHO84	TTATGCTTCATGTTGAAGTTGAGATG GGCTGGAAGATTCAATGTCATTGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>PHO84</i>
S1-promRSP5	ATAGCTTTGAGAACTGAGAATGTAG CTTTGACGCTGCTATTTTCGTACGCT GCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Integration der Kassette in den Promotorbereich von <i>RSP5</i>
S2-promRSP5	GATACTCGAGTACCCTAAAAATGGT TAAGCGTATGTCTTGCATAGGCCAC TAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Integration der Kassette in den Promotorbereich von <i>RSP5</i>
S1-TSC3	ATGACACAACATAAAAAGCTCGATGG TGTACATACCCACCACTAAGGAATT CGTACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>TSC3</i>
S2-TSC3	TCAAAGGAAGCAATACTTTAGTATAC CGAAGAACTCAAACCTGAAAATGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>TSC3</i>
S1-YNL094	ATGAATAGTCAAGGTTACGATGAAA GCTCTTCCTCTACTGCTGCTACTTTC GTACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>YNL094</i>
S2-YNL094	TTAGTTTGAATACTTCTCCCTAATTC TGCGAATACTGTCTTCCAAACTGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>YNL094</i>
S1-YNL194	ATGTCCTACAAAAAGTTTGTGTACTT TATTAACCTTTTCTTTCTACTATTCGT ACGCTGCAGGTCGAC	Aufwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>YNL194</i>
S2-YNL194	CTATGATACAACAGGAACATTCTGTT CAGTATAGACGCGTTCCTCTTGGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG	Abwärtsprimer zur Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette zur Deletion von <i>YNL194</i>
t2-hsG4	ACATGACTCGAGGTCGACGGTATCG ATAAGCTTATCAGTCGTTCTCATCTG G	Abwärtsprimer zu hsG4-F7 bzw. t71-ORFs; Klonierung von humanem GLUT4 vor den <i>CYC1</i> -Terminator über homologe Rekombination
t71-ORFs	ACAAAGAATAAACACAAAAACAAAAA GTTTTTTAATTTTAATCAAAAA	Aufwärtsprimer zur Klonierung von DNA-Fragmenten hinter den <i>HXT7</i> -Promotor über homologe Rekombination in Hefe
TAPf	CGATGACTTTAAAGACGCAAA	Aufwärtsprimer zur Überprüfung der Integration des TAP-tags an das 5'-Ende von <i>FGY1</i>
TAPr	ATCACTCTTGCCCTTGAAAGC	Abwärtsprimer zur Überprüfung der Integration des TAP-tags an das 5'-Ende von <i>FGY1</i>

2.5 Chemikalien

Tab. 8: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Chemikalien

Firma	Chemikalien
Acros Organics	Lysin, Maltose, Natriumacetat, Imidazol
Amersham Biosciences	ProteinA Sepharose CL-4B
BD	Trypton
biomers	Synthetische Oligonukleotide
Biorad	„Precision Plus Protein Standard (Dual Colors)“, Poly-Prep Chromatographie Säulen, 10x Tris/Glycin/SDS-Buffer, Laemmli Puffer, „Ready Gel“ 4-15% Tris-HCl
Braun-Melsungen	Glasperlen 0,45 mm
Caesar & Loretz	Glukose
Calbiochem	G418 Sulfat
Camag	Fiterpapier 20x20 cm,
Difco	Bacto Agar, Pepton, Trypton, „Yeast Nitrogen Base w/o amino acids“, „Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate“, Maltose
Fluka	Butanol, CDCFDA, Glycin, tri-Natriumcitrat Dihydrat, 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure Lösung, Aprotinin
Fujifilm	Röntgenfilm
Gibco BRL	Agarose, T4-DNA-Ligase
Invirogen	Silver Quest™ (Silberfärbe Kit)
J.T. Baker	Magnesiumchlorid, Natriumchlorid, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Saccharose, Glycerol
MBI	Lambda-DNA
Merck	Adenin, Ammoniumperoxidisulfat (APS), Dimethylformamid (DMF), EDTA, Leucin, Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 , TEMED, Tween 20, Tween 80, Uracil, DC-Platten 20 x20 cm Kieselgel 60, β -Mercaptoethanol
Millipore	Immobilon-N PVDF-Membran
New England Biolabs	Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, EndoH
Oxoid	Yeast Extract, Agar Bacteriological
Pharmacia	dNTP-Mix
Pierce	SuperSignal ULTRA chemiluminescent substrate
Qiagen	QIAquick PCR Purification Kit, QIAprep Spin Miniprep Kit, Plasmid Mini Kit, QIAEX II Gel Extraction Kit, QIAquick Gel Extraction Kit
Riedel-de Haen	Essigsäure, Ethanol, Methanol, Formaldehydlösung
Roche	Alkalische Phosphatase, Expand High Fidelity PCR System, Protease Inhibitoren „Complete“, T4-DNA-Ligase, Nonidet P40
Roth	Ammoniumsulfat, Ampicillin, Brillant Blau G250, Chloroform (Trichlormethan), Diethylether, Dithiothreitol (DTT), EGTA, Ethanol, Ethylacetat, Methanol, Milchpulver, Gel30 Acrylamid, Glycerin, Glycin, Glukose, n-Heptan, D-Sorbitol, PMSF, 2-Propanol, Saccharose, SDS ultra

	pure (Natriumdodecylsulfat), TEMED, Toluol, Trichloressigsäure (TCA), TRIS,
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Polyklonaler Pma1-Antikörper
Seikagaku Kogyo Co. Ltd.	Zymolyase
Serva	Albumin Bovine Fraction V (BSA), Ammoniumperoxidisulfat (APS), Natriumdodecylsulfat (SDS), servapor Dialyseschlauch (Ø 21 mm)
Sigma	Ampicillin, 4-Androsten-3,17-dione, Benzamidin hydrchlorid hydrat, n-Dodecyl-β-D-Maltosid, Ergosterol, Ethidiumbromid, β-Glukoronidase, Lithiumacetat, Perchlorsäure, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Phenylendiamin-Dihydrochlorid, L-α-Phosphatidylcholin, L-α-Phosphatidylethanolamin, L-α-Phosphatidylglycerol (Cardiolipin), L-α-Phosphatidylinositol, L-α-Phosphatidylserin, Polyethyleneglucol (PEG 3350), Poly-L-Lysin, „Prestained“ Molekulargewichtsstandard, Triton X-100, p-Nitrophenylphosphat, Pepstatin, Leupeptin, Chymostatin, Rabbit IgG-Agarose
Sigma ARK	Synthetische Oligonukleotide
Toronto Research Chemicals Inc.	5-FOA
Whatman	3 MM Papier

2.6 Enzyme

Nicht einzeln aufgeführte Enzyme wurden von der Firma Roche bezogen. Restriktionsenzyme wurden von den Firmen New England Biolabs oder Roche bezogen.

2.7 Antikörper

Tab. 9: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Quelle/Referenz
anti-ALP	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen die alkalische Phosphatase aus Hefe	Molecular Probes
anti-Dpm1	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen die cytosolische Domäne der Dolicholphosphat-Mannose-Synthase aus Hefe	Molecular Probes
anti-GLUT1 (C-terminal) (CBL242)	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen ein zwölf Aminosäuren langes Peptid des C-Terminus von GLUT1	Cymbus Biotechnology LTD

anti-HA High Affinity	Monoklonaler Antikörper aus Ratte gegen ein Epitop des Hämagglutinins des humanen Influenzavirus	Roche
anti-Mal31	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen Genprodukt von Gen1 der fünf <i>MAL</i> loci	Lucero <i>et al.</i> , 1993
anti-Pep12	Monoklonaler Antikörper aus Maus gegen den N-Terminus der cytosolischen Domäne von Pep12 aus Hefe	Molecular Probes
anti-Pma1	Polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die H ⁺ -ATPase aus Hefe	R. Kölling, Düsseldorf
anti-Pma1 (yL-14)	Polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen die H ⁺ -ATPase aus Hefe	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
anti-TNP	Polyklonaler Antikörper aus Ziege gegen Trinitrophenol (TNP)	Abcam
anti-Kaninchen IgG (H+L) POD-Konjugat	Sekundär-Antikörper gegen Kaninchenantikörper gekoppelt an Peroxidase	Dianova
anti-Maus	Sekundär-Antikörper gegen Mausantikörper gekoppelt an Peroxidase	Roche
anti-Ratte-IgG-POD Fab Fragmente	Sekundär-Antikörper gegen Rattenantikörper gekoppelt an Peroxidase	Roche
Anti-Ziege	Sekundär-Antikörper gegen Ziegeantikörper gekoppelt an Peroxidase	Santa Cruz Biotechnology, Inc.

2.8 Transformation

2.8.1 Transformation von *E. coli*

E. coli Zellen wurden mit der Elektroporationsmethode nach Dower *et al.* (1988) und Wirth (1993) mittels eines GENE-PULSER-Gerätes der Firma BIORAD oder alternativ mittels eines Easyject prima Geräts der Firma EQUIBO transformiert.

2.8.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Transformation von *S. cerevisiae* Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode von Gietz und Woods (1994). Zur Selektion auf eine Geneticin-Resistenz wurden die Zellen vor dem Ausplattieren für 4h bei 30°C (25°C für Zellen temperatursensitiver Stämme) in Vollmedium inkubiert.

2.9 Präparation von DNA

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

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

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

Die Zellen aus einer stationären Hefekultur (5 ml) wurden geerntet, gewaschen und in 300 µl Puffer 1 (Plasmid Mini Kit, Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von 600 µl Puffer 2 und 2/3 Volumen Glasperlen ($\varnothing = 0,45$ mm) wurden die Zellen 8 min mit einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen. Der Überstand wurde mit ½ Volumen Puffer 3 versetzt, gemischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 10000 rpm wurde die Plasmid-DNA im Überstand mit gleichem Volumen Isopropanol gefällt. Die durch 30-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm pelletierte DNA wurde mit 70%igem kaltem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen. 1 µl der DNA wurde anschließend für eine Transformation in *E. coli* (2.8.1) eingesetzt.

2.9.3 Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

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

mit 70%igem kaltem Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Durch Zugabe von 40 µl Wasser wurde die DNA bei 37°C resuspendiert. Die Ausbeute betrug ca. 10 µg DNA. Zur Kontrolle wurden 8 µl der genomischen DNA in einem 0,6%igen Agarosegel aufgetrennt.

2.10 Enzymatische Modifikation von DNA

2.10.1 DNA-Restriktion

Die sequenzspezifische Spaltung der DNA erfolgte mit 2-5 U Restriktionsenzym pro µg Plasmid-DNA für 2-3 Stunden bei 37°C.

2.10.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

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

2.10.3 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem 20 µl Ansatz bestehend aus Vektor-DNA, 2-5-fachem, molarem Überschuss Fragment-DNA und 1 U T4-Ligase. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.11 PCR-Amplifizierung von DNA

Die Polymerasekettenreaktion wurde mit dem Expand™ High Fidelity PCR System (Roche) in einem Gesamtvolumen von 50 µl nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zu der zu amplifizierenden DNA wurden 0,2 mM dNTP-Mix, 1 x Puffer 2 (1,5 mM MgCl₂), oder bei schwierigen Amplifikationen 1 x Puffer 3 (ohne MgCl₂) sowie 1-4 mM MgCl₂, 2-3 U Polymerase und je 100 pmol der entsprechenden Oligonukleotidprimer gegeben. Als Synthesevorlage dienten entweder 1-10 ng Plasmid-DNA oder ein bis zwei Hefekolonien (Volumen ca. 3 µl). Die Hefekolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher von einer Agarplatte genommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die ganzen Zellen wurden durch einminütiges Erhitzen in der Mikrowelle aufgeschlossen. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler der Firma Techne durchgeführt.

Die PCR-Bedingungen wurden nach Bedarf wie folgt gewählt:

- | | | | |
|----|--------------------------------------|--------|--|
| 1. | Denaturierung der DNA | 1x | 5 min, 95°C |
| 2. | Denaturierung der DNA | 18-35x | 30-45 sec, 95°C
(30 s bei Plasmid-DNA, 45 s bei ganzen Zellen) |
| | Annealing | | 30-45 s, 48-56°C |
| | DNA-Synthese (Elongation) | | 1 min pro 1 kb zu amplifizierender DNA
(Produkte < 3 kb bei 72°C, Produkte > 3 kb bei 68°C) |
| 3. | Verlängerung der synthetisierten DNA | 1x | 5 min, 72/68°C |

Die Zugabe der Polymerase erfolgte nach dem ersten Denaturierungsschritt („hot-start PCR“). Die Reaktionsprodukte wurden durch Agarosegelelektrophorese überprüft und bei Bedarf aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte entweder mittels Verwendung des „QIAquick PCR Purification Kit“ nach Angaben des Herstellers (2.12) oder durch Isolierung aus einem Agarosegel (2.14).

2.12 DNA-Aufreinigung

Die DNA wurde mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.13 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente mit einer Größe von 0,2-20 kb wurden in 0,6-1%igen Agarosegelen aufgetrennt. Als Gel- und Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) (Maniatis *et al.*, 1982). Als Größenstandard diente eine mit *EcoRI* und *HindIII* geschnittene Lambda-Phagen-DNA. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/10 Volumen Blaumarker (0,2 % Bromphenolblau, 25 % Glycerin) versetzt. Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zu der noch heißen Agarose und durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) nach der Auftrennung sichtbar gemacht.

2.14 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel unter langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten und unter Verwendung des „QIAex II Gel

Extraction Kit“ (Qiagen) oder des „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) entsprechend der vom Hersteller angegebenen Anleitung isoliert.

2.15 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA oder von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) oder SRD (Scientific Research and Development GmbH, Oberursel) durchgeführt.

2.16 *In-vitro* Mutagenese

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

2.17 Klonierung von Plasmiden über *in-vivo* Rekombination

Für eine *in vivo*-Klonierung von DNA-Fragmenten in *S. cerevisiae* wurde zunächst das zu klonierende Gen bzw. die DNA-Sequenz in einer PCR (2.11) amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide enthielten im 3'-Bereich 20-22 bp, die homolog zum 5'- bzw. 3'-Ende der zu amplifizierenden DNA-Sequenz waren und besaßen zusätzlich spezifische 5'-terminale Anhänge von 39 bp, die homolog zu dem gewählten Integrationsbereich der Zielvektoren waren. Der Vektor wurde durch Restriktion im Integrationsbereich linearisiert (2.10.1), gereinigt (2.14) und zusammen mit dem PCR-Produkt in die Hefe transformiert (2.8.2). Die Zellen wurden im Anschluss auf Minimalmedium ausplattiert, das für die Selektion auf den Auxotrophiemarker des Vektors die entsprechende Aminosäure bzw. Base nicht enthielt. Auf diese Weise wuchsen nur solche Transformanten, die aufgrund homologer Rekombination des DNA-Fragments mit dem linearisierten Vektor ein stabiles, zirkuläres Plasmid besaßen. Die Plasmide wurden aus Hefe isoliert (2.9.2), in *E. coli* amplifiziert (2.8.1) und durch eine anschließende Restriktionsanalyse (2.10.1) und in einigen Fällen durch Sequenzierung (2.15) überprüft.

2.17.1 Konstruktion eines Plasmids mit 1x HA-Epitop am 5'-Ende von *MAL31*

Mittels PCR (2.11) sollte das 1x HA-Epitop an das 5'-Ende des Gens *MAL31* kloniert werden und das *HA-MAL31* dann über homologe Rekombination in das Plasmid p426HXT7-6His hinter den *HXT7*-Promotor kloniert werden. Die Klonierung des HA-Epitops wurde mit dem Oligonukleotidpaar HA-M1/HA-M2 (Tab. 7) durchgeführt. Der Aufwärtsprimer HA-M1 wurde so konstruiert, dass er am 5'-Ende einen homologen Bereich zum Plasmid p426HXT7-6His besitzt, gefolgt von der Basenfolge „ATG“ und der Sequenz für das 1x HA-Epitop. Danach folgt eine kurze Linkersequenz „CCAGGT“ und ein homologer Bereich zum *MAL31* beginnend mit dem Startcodon. Als DNA-Vorlage der PCR für die *MAL31*-Sequenz diente das Plasmid p426MAL31. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt (2.12) und anschließend durch Agarosegelelektrophorese überprüft. Das Plasmid p426HXT7-6His wurde mit den Enzymen *EcoRI/BamHI* geschnitten und das DNA-Fragment durch Extraktion aus einem Agarosegel gewonnen. Für die homologe Rekombination wurden das PCR-Produkt und das geöffnete Plasmid in den Stamm CEN-PK2-1C transformiert und Transformanten auf synthetischem Medium mit 2% Glukose ohne Uracil selektiert. Das Plasmid wurde aus Hefezellen isoliert, in *E. coli* amplifiziert und erneut isoliert. Die Richtigkeit des Plasmids p426H7-HAMAL31 wurde über Restriktion und Sequenzierung überprüft.

2.17.2 Konstruktion von Plasmiden mit einer *BamHI*-Schnittstelle in hydrophilen Bereichen von *GLUT1*

Mittels homologer Rekombination wurde eine *BamHI*-Schnittstelle unter Einhaltung des Leserahmens an verschiedene Positionen innerhalb der *GLUT1* Sequenz des Plasmids YEp4H7-hsGLUT1 kloniert. Die Positionen sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tab. 10: Auflistung der Integrationspositionen der *BamHI*-Schnittstelle in die DNA-Sequenz von *GLUT1*.

Gen	Position in Basensequenz
GLUT1	150/151 bp
	273/274 bp
	357/358 bp
	459/460 bp

Es wurden PCR-Reaktionen mit den Oligonukleotidpaaren Glycv und Glyc1z-Glyc4z bzw. Glycz und Glyc1v-Glyc4v durchgeführt (Tab. 7). Die Primer Glyc1v-

Glyc4v bzw. Glyc1z-Glyc4z wurden so konstruiert, dass sie die Sequenz der *Bam*HI-Schnittstelle „GGATCC“ und 5' und 3' von dieser Sequenz jeweils 21 Basen enthielten, die homolog bzw. komplementär zur Sequenz von GLUT1 genau an der Position waren, an die die *Bam*HI-Schnittstelle kloniert werden sollte. Als DNA-Vorlage für die PCR-Reaktionen diente die GLUT1 Sequenz des Plasmids YEp4H7-hsGLUT1. Die PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese auf die richtigen Fragmentgrößen hin überprüft. Das Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Sac*I und *Bst*EII linearisiert und das benötigte DNA-Fragment aus einem Agarosegel extrahiert (2.14). Für die homologe Rekombination wurden anschließend die PCR-Produkte zusammen mit dem linearisierten Plasmid in den Stamm EBY.S7 transformiert und Transformanten auf synthetischem Medium mit 1% Maltose ohne Uracil selektiert. Die Plasmide wurden aus Hefezellen isoliert (2.9.2), zur Amplifikation in *E. coli* transformiert (2.8.1) und aus diesen Zellen reisoliert (2.9.1). Die erfolgreiche Integration der *Bam*HI-Schnittstelle wurde durch Restriktion mit den Enzymen *Eco*RI und *Bam*HI überprüft. Die Plasmide wurden mit YEp4H7-hsGLUT1^{*Bam*HI-150}, YEp4H7-hsGLUT1^{*Bam*HI-273}, YEp4H7-hsGLUT1^{*Bam*HI-357} und YEp4H7-hsGLUT1^{*Bam*HI-459} bezeichnet.

2.18 Gen-Deletionen in *S. cerevisiae*

Die Deletion von Genen wurde mit dem *loxP-kanMX-loxP*/Cre-Rekombinase-System nach Güldener *et al.* (1996) durchgeführt. Die Deletion wird dabei durch homologe Integration einer *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette in die chromosomale DNA bei gleichzeitiger Deletion des gewünschten Gens erzielt.

In einer PCR-Reaktion (2.11) wurde zunächst die *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit den entsprechenden Oligonukleotiden S1 und S2 synthetisiert. Diese 70mere weisen einerseits 48 bp lange homologe Bereiche zu den 5'- bzw. 3'-flankierenden Sequenzen des zu deletierenden Gens oder zu der zu deletierenden DNA-Region auf und andererseits 22 bp lange homologe Bereiche zu den *loxP*-flankierenden Sequenzen. Die amplifizierten Deletionskassetten enthielten folglich neben dem Kanamycin-Resistenzgen auch die homologen Bereiche zu dem zu deletierenden Gen. Nach Transformation der Deletionskassetten in die Hefe (2.8.2) erfolgte die Selektion auf Kanamycin-resistente Klone auf G418-haltigen Vollmediumsplatten. Die ersten 48 Basenpaare des Gens blieben aufgrund der Wahl der Oligonukleotide bei der homologen Rekombination erhalten. Die Deletion wurde

durch PCR (2.11) mit ganzen Zellen unter Verwendung der Oligonukleotidpaare a1/a4, k2-kanMX/a1 oder k3-kanMX/a4 verifiziert.

Das integrierte *kanMX*-Modul kann durch Expression der Cre-Rekombinase durch Rekombination der *loxP*-Stellen effizient exzidiert werden und das *loxP-kanMX-loxP*/Cre-Rekombinase-System somit erneut verwendet werden. Die Zellen wurden dafür mit dem Plasmid pSH47 transformiert, welches das Gen für das Enzym Cre-Rekombinase unter Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotors trägt. Nach einer mindestens 2-tägigen Inkubation der Transformanten auf Galaktose- bzw. Maltose-haltigem Medium wurden die Kolonien auf G418-haltiges Medium replikaplattiert und G418-sensitive Kolonien isoliert. Die Exzision des *kanMX*-Gens wurde unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide in einer PCR (2.11) überprüft.

2.19 Proteinpräparation der Membranfraktion

Für eine Präparation der Membranproteinfraktion wurden 50 OD₆₀₀-Einheiten einer exponentiell wachsenden Hefekultur für 6 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, in 3 ml Wasser aufgenommen und nochmals abzentrifugiert. Die Hefesedimente wurden bei -20°C eingefroren. Es wurden 0,25 ml Glasperlen und 0,2 ml Tris-Mix (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 5 mM EDTA) mit 0,2 mM PMSF zugegeben und die Zellen mit einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen. Nach Zugabe von 0,2 ml Tris-Mix wurde der Überstand abgenommen und für 45 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,4 ml Tris-Mix mit 5 M Harnstoff aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Membranproteinfraktion wurde durch eine 45-minütige Zentrifugation bei 12000 rpm sedimentiert. Das Sediment wurde in 0,32 ml Tris-Mix resuspendiert, 80 µl 50%ige TCA zugegeben, die Proben für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Imidazolpuffer (0,4 M Imidazol, 225 mM NaCl, 7,5 mM EDTA) gelöst. Es wurden 2-5 µg Protein mit 0,2% Bromphenolblaulösung versetzt und auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.20 Bestimmung der Wachstumsrate von *S. cerevisiae*

Zur Bestimmung der Wachstumsraten wurden die Stämme in Minimalmedium mit 1% Maltose herangezogen, durch Zentrifugation geerntet, zweimal mit Minimalmedium ohne Kohlenstoffquelle gewaschen und anschließend mit einer Anfangs-OD_{600nm} von 0,1 (1x10⁶ Zellen/ml) in Minimalmedium mit der jeweils angegebenen Kohlenstoffquelle angeimpft. In einem Zeitraum von 2-160 h wurden

jeweils 1 ml-Proben der Kultur entnommen und diese nach einer entsprechenden Verdünnung gegen eine Leerprobe des gleichen Mediums als Referenz bei 600 nm spektralphotometrisch gemessen.

2.21 Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae*

Die Zellen einer 100 ml Hefekultur ($OD_{600}=0,5-0,8$) wurden für 8 min bei 2500 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml STED10-Lösung (10% Saccharose; 10 mM Tris/HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA; 1 mM DTT) gewaschen und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde rasch in 250 μ l eiskalter STED10-Lösung mit 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF und 1x Proteaseinhibitormix (Protease-Inhibitor „Complete“, Roche) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von Glasperlen (\varnothing 0,45 mm) bis zum Meniskus der Flüssigkeit und anschließendem Schütteln auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) für 3 min. Nach Zugabe von 1 ml STED10-Lösung, versetzt mit 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF und 1x Proteaseinhibitormix, wurde der Ansatz gemischt, der Überstand abgenommen und für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert um Glasperlen und Zelltrümmer zu sedimentieren. 1 ml dieses Überstandes wurde bei -20°C eingefroren.

Der erhaltene Extrakt konnte entweder für eine Saccharosedichtegradientenzentrifugation (2.24) eingesetzt werden oder der spezifische Nachweis von Proteinen wurde direkt durch eine Western-Blot-Analyse (2.25, 2.29) erbracht.

2.22 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.22.1 Bestimmung mit Mikrobiuret

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

2.22.2 Bestimmung mit Bradford

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Als Standard diente Rinderserumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0-200 $\mu\text{g/ml}$. 500 μ l Protein-haltige wässrige Lösung wurden mit 1 ml Bradford-Farbstoffreagenz (60 mg Coomassie brilliant blue G250, 3% Perchlorsäure ad 1 l)

versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt.

2.23 Endoglykosidase H-Behandlung von Proteinextrakten

Für die Endoglykosidase H-Behandlung (EndoH) wurden die Proteinextrakte (2.21) nach Angaben des Herstellers wie folgt behandelt: 10-20 µl Rohextrakt wurden mit $\frac{1}{10}$ Volumen Denaturierungs-Puffer (von New England Biolabs) versetzt und 10 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurde $\frac{1}{10}$ Volumen G5-Puffer (von New England Biolabs) und 1 µl EndoH (New England Biolabs) zugegeben. Die Ansätze inkubierten für 1 h bei 37°C und wurden anschließend bei -20°C weggefroren. Als Kontrolle dienende unbehandelte Aliquots wurden bis auf die Zugabe von EndoH gleich behandelt.

Der spezifische Nachweis der Proteine erfolgte durch anschließende SDS-Gelelektrophorese (2.25) und Western-Blot-Analyse (2.29).

2.24 Zellfraktionierung durch Saccharosedichtegradienten-zentrifugation

Die Herstellung des Gradienten erfolgte nach Kölling und Hollenberg (1994) in einem SW40-Zentrifugationsgefäß (Beckmann), indem 4 ml STED50 (53% Saccharose, 10 mM Tris/HCl pH7,6, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,2 mM PMSF und 1x Protease-Inhibitor-Mix), 4 ml STED36 (wie STED53, jedoch mit 36% Saccharose), 4 ml STED20 (wie STED53, jedoch mit 20% Saccharose) sorgfältig übereinander geschichtet wurden. Das Gefäß wurde dicht mit Parafilm verschlossen und vorsichtig in eine horizontale Lage gebracht. Nach dreistündiger Diffusion bei 4°C wurde der kontinuierliche Gradient aufgerichtet und mit 1 ml Proteinextrakt (2.21) überschichtet. Nach Zentrifugation für 14 h in einem Beckmann SW40-Rotor mit 30000 rpm wurden Fraktionen zu 700 µl vom Gradienten abgenommen. Aliquots wurden mit gleichem Volumen 2x Probenpuffer (100mM Tris/HCl pH6,8, 4mM EDTA, 4%SDS, 20%Glycerin, 20mM DTT, 0,02% Bromphenolblau) versetzt und bei -20°C eingefroren.

Jeweils 50 µl der Gradientenfraktionen wurden elektrophoretisch aufgetrennt (2.25). Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte durch Western-Blot-Analyse (2.29).

2.25 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) beruht auf der Methode von Laemmli (1970). Zur Auftrennung der Proteine wurden ein 5%iges Sammelgel (5,9 ml H₂O, 2,5 ml Upper Tris (0,4% SDS, 0,5 M Tris HCl pH 6,8), 1,6 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 75 µl 20% APS, 15 µl TEMED) und ein 10%iges Trenngel (16,2 ml H₂O, 10 ml Lower Tris (0,4% SDS, 1,5 M Tris HCl, pH 8,8), 13,3 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 200 µl APS, 25 µl TEMED) verwendet (Maniatis, 1982). Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 0,192 M Glycin und 0,1% SDS. Die Proben wurden mit 2x Probenpuffer (100 mM Tris/HCl pH6,8, 4 mM EDTA, 4% SDS, 20% Glycerin, 20 mM DTT, 0,02% Bromphenolblau) versetzt und die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 55 V über Nacht. Als Molekulargewichtsstandard diente der „Prestained High Molecular Weight Standard“ von Sigma bzw. der „Precision Plus Protein Standards, Dual Color“ von Biorad.

2.26 Nachweis von Proteinen über PonceauS-Färbung

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

2.27 Nachweis von Proteinen über Coomassie-Färbung

Der Nachweis von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte mit einer Coomassie Färbelösung (0,1% Coomassie G250, 50% Ethanol, 7,5% Eisessig) für 20 min bei Raumtemperatur. Zur Entfärbung wurde eine Lösung bestehend aus 50% Ethanol und 7,5% Eisessig verwendet. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde bis zum gewünschten Entfärbungsgrad in dieser Lösung geschwenkt.

2.28 Nachweis von Proteinen über Silber-Färbung

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

2.29 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blot-Analyse

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Millipore) transferiert. Die Übertragung erfolgte in Blotting-Puffer (25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 20% Methanol) für 2-3 h bei 55 V (250 mA). Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation der Membran für 1-3 h in PBSTB (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,3% Tween20, 3% BSA) oder TBSTM (50 mM Tris/HCl pH7,5, 150 mM NaCl, 0,1% TritonX100, 1% Milchpulver) blockiert. Die Reaktion mit dem Primärantikörper (in PBSTB oder TBSTM verdünnt) erfolgte für 1-14 h bei Raumtemperatur. Danach wurde die Membran 3x mit PBST (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,3% Tween20) oder TBST (50 mM Tris/HCl pH7,5, 150 mM NaCl, 0,1% TritonX100) gewaschen und anschließend für 1-2 h mit dem Sekundärantikörper (in PBSTB oder TBSTM verdünnt) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde wiederum 3x mit PBST oder TBST gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch eine Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenz-Reaktion nach Zugabe eines Chemilumineszenz-Substrates (SuperSignal ULTRA Chemiluminescent Substrate, Pierce) und anschließende Detektion durch Auflegen eines Röntgenfilms.

2.30 Nachweis von Proteinen mit spezifischen Antikörpern

Tab. 11: eingesetzte Verdünnungen der verwendeten Antikörper

Antikörper	Primär/Sekundär	Verdünnung/Konzentration
anti-GLUT1	primär	1:2000
anti-HA	primär	1:1000
anti-Pma1 (Kölling, Düsseldorf)	primär	1:1000
anti-Pma1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	primär	1:1000
Anti-Pep12	primär	1:1500
anti-ALP	primär	1:100
anti-Dpm1	primär	1:1000
anti-TNP	primär	40 µg
anti-Kaninchen	sekundär	1:18750
anti-Ratte	sekundär	1:10000
anti-Maus	sekundär	1:12500
anti-Ziege	sekundär	1:15000

2.31 Messung von Enzymaktivitäten in *S. cerevisiae*

2.31.1 Herstellung von Rohextrakten

5 ml Hefekultur wurden über Nacht in YPD-Pi bzw. YPD+Pi (2.1.4) in 50 ml Falcongefäßen geschüttelt. Die Zellen wurden für 5 min bei 2000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5 ml 0,01 M Natriumacetatpuffer pH 4,0 gewaschen, erneut für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Nach erneutem Resuspendieren in 5 ml 0,01 M Natriumacetatpuffer wurden die Zellen in ein Reagenzglas überführt und wieder unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dem Zellpellet das gleiche Volumen Glasperlen (\varnothing 0,45 mm) zugegeben. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte für 5 min auf einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR). 1,5 ml 0,01 M Natriumacetatpuffer pH 4,0 (4°C) wurden zum Zellaufschluss dazugegeben und der Überstand in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde der Überstand erneut in ein frisches Eppendorfgefäß pipettiert. Der erhaltene Rohextrakt wurde auf Eis aufbewahrt und für die saure Phosphatase-Aktivitätsbestimmung eingesetzt.

2.31.2 Bestimmung der sauren Phosphatase Aktivität

Die Aktivität der in den periplasmatischen Raum sekretierten sauren Phosphatase kann gemessen werden durch die Farbreaktion der Umsetzung von p-Nitrophenol zu p-Nitrophenolat durch Zugabe von NaCO₃. Die saure Phosphatase katalysiert die Umsetzung des Substrats p-Nitrophenyl-Phosphat zu p-Nitrophenol und anorganischem Phosphat.

Die Reaktion fand in einem Gesamtvolumen von 1 ml statt. 990 µl des Gesamtvolumens setzten sich aus dem, wie unter 2.31.1 beschrieben, hergestellten Rohextrakt und 0,05 M Natriumacetatpuffer zusammen. Der Ansatz wurde 1 min bei 35°C im Wasserbad vorinkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 10 µl einer 100 x Stammlösung (0,64 mg/ml) des Substrats p-Nitrophenyl-Phosphat gestartet. Es folgte eine Inkubation des Reaktionsansatzes bei 35°C im Wasserbad für 5-10 min. 500 µl gesättigte NaCO₃-Lösung wurde in eine Küvette vorgelegt und nach Ablauf der Inkubationszeit 500 µl des Reaktionsansatzes dazugegeben und dadurch die Enzymreaktion gestoppt. Das freigesetzte p-Nitrophenol geht in alkalischer Lösung in p-Nitrophenolat über. Die Lösung färbt sich gelb und die Farbentwicklung konnte bei 400 nm spektralphotometrisch bestimmt werden. Die Messung fand gegen einen Blindwert zusammengesetzt aus 990 µl 0,05 M Natriumacetatpuffer und 10 µl 100 x

Stammlösung p-Nitrophenyl-Phosphat statt. Die Gesamtproteinkonzentration des Rohextrakts wurde mit Mikrobiuret (2.22.1) bestimmt und die spezifische Enzymaktivität berechnet.

2.32 Extraktion von Phospholipiden aus Zellmembranen

Die Plasmamembranfraktion wurde nach der Methode „Proteinpräparation der Membranfraktion“ (2.19) erhalten. Die Membranfraktion wurde in 500 μ l Imidazolpuffer aufgenommen. Aus diesem Extrakt wurden dann die Phospholipide nach Robl *et al.* (2001) isoliert. Dazu wurde der Extrakt mit 3 ml Chloroform/Methanol im Verhältnis 2:1 versetzt und in einem Reagenzglas 3-5 min auf einem Vortex geschüttelt und danach für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen, die verbleibende, organische Phase in ein frisches Reagenzglas pipettiert und mit 3 ml 10%igem Methanol gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für 15 min bei 2000 rpm, die wässrige Phase wurde erneut verworfen und der Waschvorgang wiederholt. Die organische Phase wurde in ein steriles 2 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert und die Flüssigkeit in einer Speed-Vac (Concentrator 5301, Eppendorf) verdampft. Das Lipidpellet wurde in 30 μ l Toluol aufgenommen und konnte für die Dünnschichtchromatographie eingesetzt werden.

2.33 Dünnschichtchromatographie

Bevor die Dünnschichtchromatographie, wie von Ruiz und Ochoa (1997) beschrieben, durchgeführt werden konnte, wurden die 20x20 cm großen Kieselgelplatten über Nacht in einem Gemisch von Chloroform/Methanol/Wasser in einem Verhältnis von 60/40/10 inkubiert. Die Platten wurden dann getrocknet und für 30 min bei 110°C gebacken. Zur Gasraumsättigung der Chromatographie-Doppeltrogkammer wurde zuerst nur ein Trog mit 20 ml des Fließmittels gefüllt und zusätzlich noch ein mit dem Fließmittel getränktes Filterpapier in den Trog gestellt. Es folgte eine 5-minütige Inkubation. Während dieser Inkubationszeit wurde jeweils ein Aliquot von 10 μ l der zu untersuchenden Lipidextrakte mit Hilfe eines Kapillarröhrchens punktförmig auf die Kieselgelplatte aufgetragen ca. 1 cm vom Rand der Platte entfernt. Die Kieselgelplatte wurde mit den aufgetragenen Lipidextrakten nach unten in den leeren Trog gestellt, erneut für 2 min inkubiert und dann der erste Schritt der Chromatographie durch Einfüllen von 20 ml Fließmittels auf den Boden des leeren Trogs gestartet. Um die verschiedenen Phospholipide voneinander zu trennen wurden unterschiedliche Fließ-

mittelgemische nacheinander eingesetzt. Vor jedem neuen Fließmittelgemisch wurde die Kieselgelplatte getrocknet und es fand eine Gasraumsättigung der Chromatographiekammer mit dem neuen Fließmittel statt.

Die einzelnen Fließmittel, deren Lauflänge und Laufdauer sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tab. 12: Eingesetzte Lösungsmittel, deren Konzentration, Lauflänge und Laufdauer in der Dünnschichtchromatographie

	Lösungsmittel	Konzentration	Lauflänge in cm	Laufdauer (ca.) in min
1	Chloroform/Methanol/Wasser	60/40/10	1	0,5-1
2	Chloroform/Methanol/Wasser	65/40/5	2	1-2
3	Ethylacetat/2-Propanol/ Ethanol/Chloroform/Methanol/ 0,25% KCl	35/5/20/22/15/9	5	15
4	Toluol/Diethylether/Ethanol	60/40/3	7,5	16
5	n-Heptan/Diethylether	94/8	11	25
6	n-Heptan	100	13	40

Nach dem letzten Lösungsmittel wurde die Platte aus der Chromatographiekammer entfernt, gut getrocknet und dann für ca. 10 sec zum Entwickeln in einer Lösung aus 10% CuSO₄ (w/v), 8 % H₃PO₄ (v/v) inkubiert, dabei wurden die Lipide verkohlt (Bitman und Wood, 1982). Nach erneutem Trocknen wurde die Platte für 2 min bei 200°C erhitzt. Die aufgetrennten Lipide erschienen nun als schwarze Flecken auf der Kieselgelplatte.

Zu jeder chromatographischen Auftrennung wurden auch bekannte Phospholipide gelöst in Toluol als Standard mit aufgetragen und aufgetrennt. Als Standardleiter diente ein Gemisch aus Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylglycerol (PG), Phosphatidylcholin (PC) und dem Sterol Ergosterol (Sigma). Die Standards wurden jeweils in einer Konzentration von 0,25 µg eingesetzt.

2.34 TNP-Präzipitation von Plasmamembran-Proteinen

Trinitrobenzol-Sulfonsäure (TNBS) kann Zellmembranen nicht durchdringen und reagiert somit nur mit extrazellulär zugänglichen Domänen von Proteinen intakter Zellen, an die sodann eine Trinitrophenol(TNP)-Gruppe kovalent gebunden wird.

Mittels Antikörpern, die gegen TNP gerichtet sind, können diese modifizierten Proteine spezifisch angereichert und über Western-Blot-Analyse (2.29) detektiert werden (Novick und Scheckman, 1983).

2.34.1 Herstellung eines Proteinextrakts aus der Plasmamembran

150 ml einer ÜN-Kultur wurden bei einer $OD_{600}=1,0$ geerntet und mit Waschpuffer (20 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 , pH7,9, 300 mM NaCl) versetzt mit 0,25 mM $CaCl_2$ gewaschen. Das Pellet wurde in 100 mM $NaHCO_3$ pH9,2/ 0,25 mM $CaCl_2$ / 10 mM TNBS resuspendiert und 45 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Der Zellaufschluss erfolgte in 50 mM Natriumphosphat-Puffer pH7,9/ 3 mM DTT/ 1 mM PMSF/ 2,2 mM Benzamidin mit Glasperlen (\varnothing 0,45mm) für 5 min auf einem Vibrax bei 4°C. Das Zelllysate wurde 10 min bei 2000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Plasmamembranfraktion für 40 min bei 16000 g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 100 μ l IP-Puffer (50 mM Na_2HPO_4/NaH_2PO_4 , pH 8,0, 150 mM NaCl) versetzt mit 1% n-Dodecyl- β -D-Maltosid resuspendiert und die Plasmamembranproteine durch 5-minütige Inkubation auf einem Drehrad bei 4°C solubilisiert. Nicht gelöste Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 15000 rpm und 4°C entfernt, der Überstand abgenommen und mit dreifachem Volumen IP-Puffer verdünnt.

2.34.2 Immunpräzipitation von TNP-modifizierten Plasmamembran-Proteinen

Der Plasmamembran-Proteinextrakt wurde mit anti-TNP Antikörpern (40 μ g) versetzt und über Nacht auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die Immobilisierung des Antikörper-Protein-Komplexes erfolgte durch Zugabe von 40 μ l Protein A-Sepharose (Amersham Biosciences) und Inkubation auf dem Drehrad für eine Stunde. Anschließend wurde die Sepharose dreimal mit je 700 μ l IP-Puffer/ 0,2% n-Dodecyl- β -D-Maltosid gewaschen und der gereinigte Antikörper-Protein-Komplex mit 50 μ l 2x Probenpuffer (100 mM Tris/HCl pH6,8, 4 mM EDTA, 4% SDS, 20% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau) versetzt mit 20 mM DTT bei Raumtemperatur eluiert. Das Eluat wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20°C gelagert.

Eine Analyse der Proben erfolgte über eine SDS-Gelelektrophorese (2.25) und anschließenden Western-Blot (2.29).

2.35 Protein-Aufreinigung über “Tandem-Affinity-Purification” (TAP)

Die Tandem-Affinitäts-Aufreinigung (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 zwei IgG Bindedomänen des Protein A aus *Staphylococcus aureus* (Rigaut *et al.*, 1999).

2.35.1 Konstruktion des Stammes DVY.06

Der Stamm CEN.PK2-1C wurde genutzt, um den TAP-tag über homologe Rekombination genomisch an den C-Terminus von *FGY1* zu fusionieren. Dazu wurde mit Hilfe der Oligonukleotide FGY1-TAPf und FGY1-TAPr der TAP-tag und der Selektionsmarker *URA3* aus *Kluyveromyces lactis* von dem Plasmid pBS1539 (Puig *et al.*, 2001) amplifiziert. Das Oligonukleotid FGY1-TAPf besitzt 5'-terminal einen homologen Bereich zum 3'-Ende des offenen Leserahmens von *FGY1* im Hefegenom ohne das Stopcodon und der 3'-terminale Bereich hybridisiert an das 5'-Ende der CBP-kodierenden Sequenz. Das Oligonukleotid FGY1-TAPr bindet mit seinem 5'-Ende direkt an die Sequenz im Genom hinter dem Stopcodon von *FGY1* und besitzt 3'-terminal eine homologe Sequenz zum Vektor pBS1539 abwärts des Selektionsmarkers. Beide Oligonukleotide wurden so gewählt, dass sie den offenen Leserahmen beibehielten. Das PCR-Produkt wurde nach der Aufreinigung in den Stamm CEN.PK2-1C transformiert. Die Selektion der Hefetransformanten erfolgte auf uracilfreiem Minimalmedium. Über PCR mit den Oligonukleotiden TAPf und TAPr und Sequenzierung wurde die richtige Integration des TAP-tags verifiziert. Das Oligonukleotid TAPf bindet im 3'-Bereich von *FGY1* kurz vor dem Stopcodon und TAPr im Terminationsbereich von *FGY1* und damit nach erfolgreicher Integration hinter dem TAP-tag und dem *URA3*-Selektionsmarker. Der neu konstruierte Stamm wurde mit DVY.06 (*FGY1-TAP K.I.URA3*) bezeichnet.

2.35.2 Herstellung des Proteinextrakts

Der Hefestamm wurde in 2 l YEP mit 2% Glukose bei einer $OD_{600nm}=1,0-2,0$ durch Zentrifugation mit 2 g geerntet, zweimal mit kaltem Wasser gewaschen und anschließend in Trockeneis eingefroren. Die Zellen wurden in einfachem Volumen Puffer A (10 mM K-Hepes pH7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 2 mM Benzamidine, 1 μ M Leupeptin, 2 μ M Pepstatin A, 4 μ M Chymostatin, 2,6 μ M Aprotinin) schnell aufgetaut und anschließend dreimal mittels French Press (SIM AMINCO, SIM Instruments, Inc.) mit einem Druck von 8,27 MPa (1200 psi) aufgebrochen. KCl wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,2 M

zugefügt und der Extrakt wurde für 30 min bei 25000 g und der Überstand anschließend für 1 h bei 100000 g zentrifugiert. Die mittlere der drei entstandenen Phasen wurde abgenommen und gegen 2 l Puffer D (20 mM K-Hepes pH7,9, 50 mM KCl, 0,2mM EDTA pH8,0, 0,5 mM DTT, 20% Glycerin, 0,5 mM PMSF, 2 mM Benzamidin) für 3 h bei 4°C dialysiert. Der Proteinextrakt wurde anschließend in Trockeneis eingefroren und dann bei -80°C gelagert.

2.35.3 TAP-Aufreinigung

Alle Aufreinigungsschritte wurden in 0,8 x 4 cm Poly-Prep Säulen der Firma Biorad durchgeführt. 200 µl IgG Sepharose wurden in eine Säule überführt und mit 10 ml IPP150-Puffer (10 mM Tris-HCl pH8,0, 150 mM NaCl, 0,1% Nonidet P40) gewaschen. Der Proteinextrakt wurde mit 10 mM Tris-HCl pH8,0, 10 mM NaCl und 0,1% Nonidet P40 versetzt, zu den Sepharose-Kugeln auf die Säule gegeben und für 2 h bei 4°C inkubiert. Durch Gravitationsfluss wurde der ungebundene Extrakt entfernt und die gebundenen Proteine dreimal mit 10 ml IPP150-Puffer gewaschen. 10ml TEV-Spaltungspuffer (10 mM Tris-HCl pH8,0, 150 mM NaCl, 0,1% Nonidet P40, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT) lief über die Säule bevor 1 ml TEV-Spaltungspuffer und 100 Units TEV-Protease für 2 h bei 16°C in der Säule inkubierten. Das anschließend durch Gravitationsfluss gewonnene Eluat wurde auf Eis aufbewahrt.

200 µl Calmodulin-beads wurden in eine frische Säule pipetiert und mit 10 ml IPP150 Calmodulin-Bindungspuffer (10 mM Tris-HCl pH8,0, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 150 mM NaCl, 1 mM Magnesiumacetat, 1 mM Imidazol, 2 mM CaCl₂, 0,1% Nonidet P40) gewaschen. Das Eluat wurde mit 3 ml IPP150 Calmodulin-Bindungspuffer pro 1 ml Extrakt und mit 3 µl 1 M CaCl₂ pro 1 ml Extrakt versetzt bevor es auf die Säule überführt und für 1 h bei 4°C inkubiert wurde. Die Calmodulin-beads wurden mit 30 ml IPP150 Calmodulin-Bindungspuffer gewaschen und die gebundenen Proteine anschließend mit 1 ml IPP150 Calmodulin-Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl pH8,0, 10 mM 2-Mercaptoethanol, 150 mM NaCl, 1 mM Magnesiumacetat, 1 mM Imidazol, 0,1% Nonidet, 2 mM EGTA) eluiert.

2.35.4 Proteinkonzentrierung mittels TCA-Fällung

Das Eluat wurde mit ¼ Volumen 100%iger TCA versetzt und für mindestens 12 h bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine für 30 min mit 13000 rpm bei 4°C abzentrifugiert, einmal mit kaltem (-20°C) Aceton versetzt mit 0,05 N HCl, anschließend mit kaltem (-20°C) 100%igem Aceton gewaschen und in einer Speed-Vac (Concentrator 5301, Eppendorf) getrocknet.

2.36 Kreuzung von Hefestämmen, Tetradenanalyse und Bestimmung des Paarungstyps

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

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

2.37 Phänotyp „Microarray“-Analyse

Die Methode wird beschrieben in einer Veröffentlichung von Bochner *et al.* (2001). Die Phänotyp „Microarray“-Analyse wurde durchgeführt von Biolog, Inc. in Hayward, Kalifornien. Es wurden zehn Analysen mit verschiedenen Medienzusätzen im Hinblick auf die Auswirkungen auf den Metabolismus der Hefe durchgeführt.

2.38 Mikroskopische Untersuchungen

Mikroskopische Untersuchungen wurden mit lebenden, nicht-fixierten Zellen mit einem Zeiss Axioskop durchgeführt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde ein FITC-Filter (Zeiss) verwendet. Die Bilder wurden mit einer AxioCam (Zeiss) aufgenommen und mit der Software „Adobe Photoshop 7.0“ bearbeitet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Nachweis der Lokalisierung von Fgy1

Es gibt verschiedene Möglichkeiten die Lokalisierung von Proteinen nachzuweisen. Die Fraktionierung eines Zellextraktes von einer in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Kultur durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation (2.24) und anschließender Western-Blot-Analyse (2.29) dient als eine Möglichkeit des Nachweises der intrazellulären Verteilung von Proteinen. Das Verteilungsmuster der Proteine in den Fraktionen unterschiedlicher Dichte kann dann mit der Lokalisierung bekannter Markerproteine verglichen werden. Ausgehend von den erhaltenen Ergebnissen kann auf die Lokalisierung der zu untersuchenden Proteine geschlossen werden.

Eine weitere Möglichkeit bietet die Fusion der Sequenz des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) an den N- oder C-Terminus des Proteins. Die Lokalisierung des Fusionsproteins in der Zelle wird dann über Fluoreszenzmikroskopie sichtbar.

3.1.1 Lokalisierung von Fgy1 mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation und Western-Blot-Analyse

Um Fgy1 über Western-Blot-Analyse nachweisen zu können musste das Protein mit einem Epitop fusioniert werden gegen das Antikörper verwendet werden konnten. Aus diesem Grund wurde in einer früheren Arbeit das Plasmid p423MET25-Fgy1-HA konstruiert, das ein mit einem 3-fachen HA-Epitop am 5'-Ende versehenes *FGY1* exprimiert (Voss, 2001).

Es wurde ein Proteinextrakt (2.21) des $\Delta fgy1$ -Stammes RWY95-1A, der das Plasmid p423MET25-Fgy1-HA enthielt, hergestellt. Dieser Extrakt wurde durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation einer subzellulären Fraktionierung unterzogen. Nach erfolgter SDS-Gelelektrophorese (2.25) und Western-Blot-Analyse (2.29) zeigte sich eine Lokalisierung von HA-markiertem Fgy1 zum einen in den Fraktionen 17 und 18, welche eine hohe Dichte haben und der Lokalisierung von Plasmamembranproteinen zugeordnet sind, zum anderen aber auch in Fraktionen geringerer Dichte, was auf eine zusätzliche Lokalisation in intrazellulären Strukturen hindeutet (Kölling und Hollenberg, 1994) (Abb. 3A).

3.1.2 Bestimmung der intrazellulären Lokalisation von Fgy1-HA

Die Lokalisation von HA-markiertem Fgy1 in intrazellulären Kompartimenten der Zelle sollte nun mit der Lokalisation bekannter Markerproteine verglichen werden.

Dazu wurde die Verteilung der Markerproteine Dpm1 (Dolichol-Phosphat-Mannose-Synthase in der Membran des endoplasmatischen Retikulums), Pep12 (endosomales Protein der t-SNARE-Familie) und ALP (alkalische Phosphatase in der Vakuolenmembran) der Verteilung von Fgy1-HA im Saccharosedichtegradienten gegenübergestellt und im Anschluss densitometrisch ausgewertet. Die Bestätigung der Lokalisation eines Teils der Fgy1-HA Proteine in der Plasmamembran sollte durch einen Vergleich mit der Lokalisation von Pma1, dem Markerprotein der Plasmamembran (Serrano *et al.*, 1986), erfolgen.

Wie Abb. 3A zeigt, kolokalisiert Fgy1 in den Fraktionen hoher Dichte mit der Lokalisation von Pma1 in der Plasmamembran. Auch die densitometrische Bestimmung der Verteilung von Fgy1 bestätigte, dass Fgy1, wie Pma1, in der Plasmamembran lokalisiert ist (Abb. 3B).

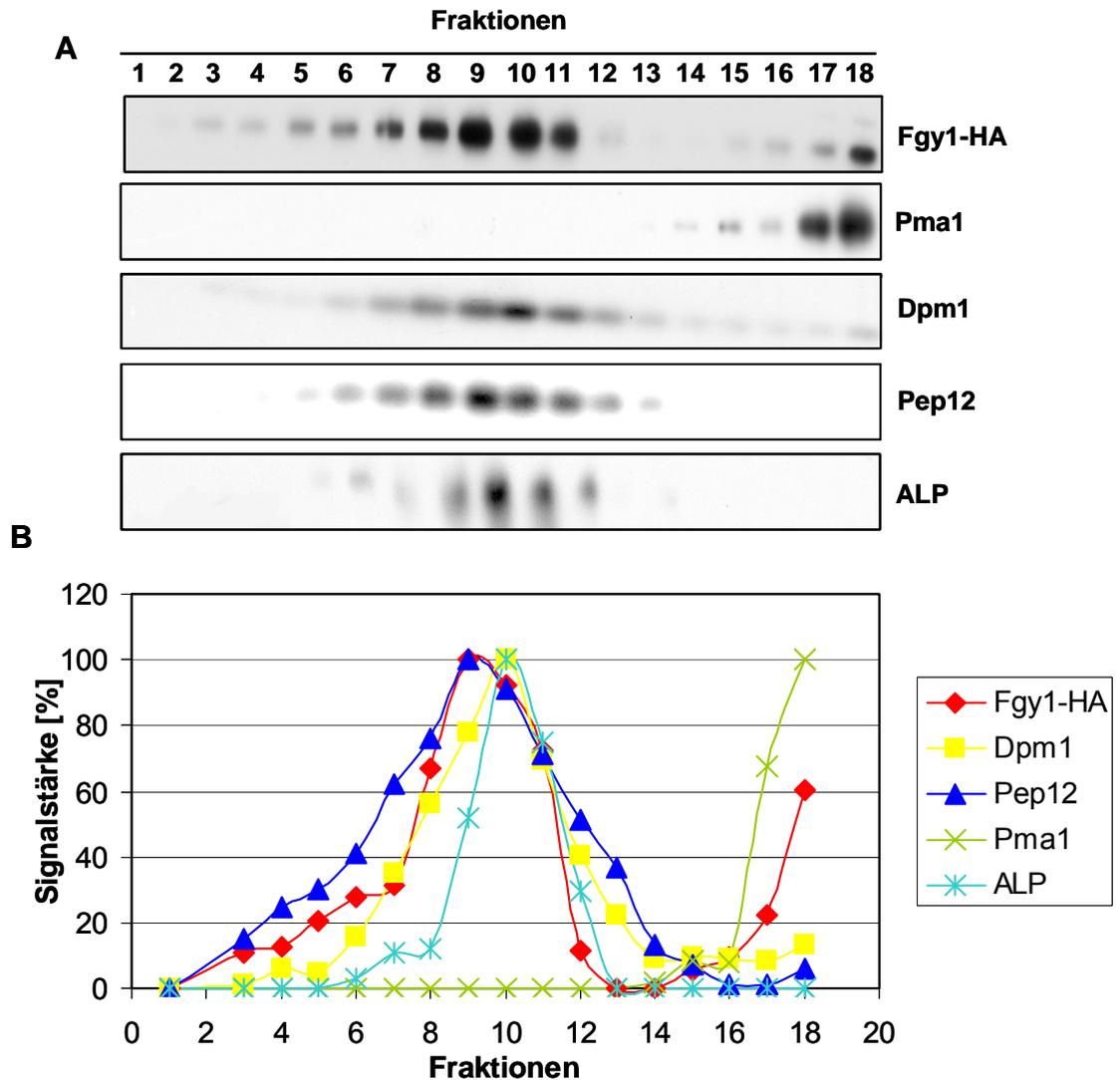


Abb. 3: Fraktionierung von HA-markiertem Fgy1 durch Dichtegradientenzentrifugation. Ein Proteinextrakt des $\Delta fgy1$ -Stammes RWY95-1A mit dem p423MET25-Fgy1-HA Plasmid wurde mittels Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert (20-50% Saccharose, geringste Dichte in Fraktion 1). Durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse wurde die Verteilung von Fgy1-HA und der Markerproteine Pma1, Dpm1, Pep12 und ALP untersucht. Es wurden polyklonale Antikörper gegen Pma1 und monoklonale Antikörper gegen das HA-Epitop, Dpm1, Pep12 und ALP verwendet (A). Die Western-Blots wurden eingescannt und die Signalintensität wurde mit dem Programm ScionImage quantifiziert. Das stärkste Signal wurde als 100% definiert (B).

Bei der intrazellulären Lokalisation von Fgy1-HA zeigte sich die größte Akkumulation von Fgy1-HA in der neunten Fraktion (Abb. 3A). In dieser Fraktion erreichte auch das Fraktionierungsprofil für das Protein Pep12, das als Marker für die Endosomenmembran diente, seinen höchsten Punkt, wohingegen Dpm1 und ALP ihre größte Akkumulation in Fraktion zehn zeigten (Abb. 3B). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass Fgy1-HA sowohl in der Plasmamembran, als auch in der Endosomenmembran lokalisiert ist.

3.1.3 Lokalisierung von Fgy1 mittels GFP-Fusion

Die Lokalisierung von Fgy1 wurde zudem fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe der grün-fluoreszierenden Eigenschaft des GFP-Proteins aus *Aequorea victoria* untersucht. Dazu wurde das Plasmid YEpFGY1-GFP in die Stämme RWY95-1A ($\Delta fgy1$), EBY.S7 (*hxt fgy1-1*) und EBY.VW4000 (*hxt*) transformiert. Transformanten wurden in synthetischem Medium ohne Methionin inkubiert um die Expression des unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors liegenden *FGY1*-GFP Gens zu induzieren. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte in den drei untersuchten Stämmen für Fgy1-GFP eine Lokalisierung an der Plasmamembran (Abb. 4).

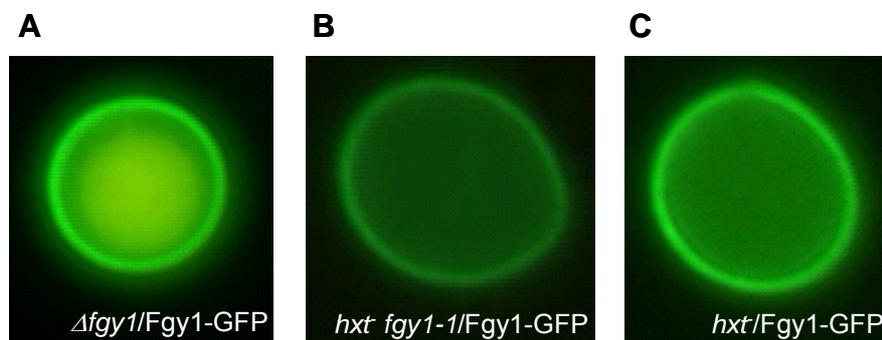


Abb. 4: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisierung von Fgy1. Die Hefestämme RWY95-1A ($\Delta fgy1$) (A), EBY.S7 (*hxt fgy1-1*) (B) und EBY.VW4000 (*hxt*) (C) mit dem Plasmid YEpFGY1-GFP wurden in synthetischem, 1%igem Maltosemedium ohne Uracil und Methionin angezogen.

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zur Lokalisierung von HA-markiertem Fgy1 sowohl in der Plasmamembran als auch in der Endosomenmembran (3.1.2), bestätigt aber das von Huh *et al.* (2003) publizierte Ergebnis. Sie hatten ebenfalls durch GFP-Fusion Fgy1 an der Zellperipherie lokalisiert.

Im $\Delta fgy1$ -Stamm RWY95-1A fluoresziert neben dem Fgy1-GFP als grüner Ring an der Plasmamembran die Vakuole leicht orange. Für diese Fluoreszenz ist ein roter Farbstoff verantwortlich der von *ade2*-Mutantenstämmen in der Vakuole gespeichert wird (Weismann *et al.*, 1987).

3.2 Vergleich zweier Hefestämme mittels Phänotyp-Microarrays

Bochner *et al.* (2001) haben mit den sogenannten Phänotyp-Microarrays eine Methode entwickelt mit der sich gleichzeitig viele verschiedene zelluläre Phänotypen testen lassen und bieten die Durchführung dieser Tests in der Firma

„Biolog, Inc.“ an. Die Tests werden in Mikrotiterplatten durchgeführt. In jeder Vertiefung einer Platte wird ein unterschiedlicher Phänotyp getestet. Untersucht werden können zum einen Phänotypen, die den Metabolismus einer Zelle betreffen, zum anderen jene, welche die Sensitivität gegenüber chemischen Substanzen aufzeigen. Das Prinzip dieser Technologie basiert darauf, die Zellatmung als universellen Reporter zu nutzen. Je nach Stärke der Atmung wird eine bestimmte Menge eines Farbstoffes umgesetzt, die Zunahme der Farbtintensität wird über einen Zeitraum von 24-48 Stunden gemessen und digitalisiert. Um die Phänotypen zweier Zelllinien miteinander vergleichen zu können werden die Graphen der gemessenen Farbtintensitäten in unterschiedlichen Farben dargestellt. Die Graphen werden dann farblich übereinander gelegt um Unterschiede zu erkennen. Sind Unterschiede in den Graphen vorhanden, lassen sich Rückschlüsse auf den untersuchten Phänotypen ziehen.

Ein Ziel dieser Arbeit sollte sein, die Funktion von *Fgy1* in *S. cerevisiae* zu charakterisieren. Um Ansätze zu finden, in welche Richtung diese Untersuchungen gehen sollten, wurden die beiden Stämme RWY95-1D (*FGY1*) und RWY95-1A ($\Delta fgy1$) von „Biolog, Inc.“ Phänotyp-Microarrays unterzogen. Es wurden Tests in Bezug auf verschiedene Kohlenstoff-, Stickstoffquellen und den Einfluss unterschiedlicher pH-Werte und Salztoleranz durchgeführt.

Der Vergleich der Stämme RWY95-1D (*FGY1*) und RWY95-1A ($\Delta fgy1$) ergab keine spezifischen Unterschiede, die sich auf bestimmte einzelne Phänotypen beschränkten. Schon für den als Referenzstamm dienenden Stamm RWY95-1D wurde festgestellt, dass er nicht mit Saccharose und auch nicht mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle wächst. Der Stamm RWY95-1A ($\Delta fgy1$) zeigte im Vergleich zu seinem Referenzstamm einen generellen Defekt im Kohlenstoffmetabolismus. Er wuchs gar nicht oder nur sehr schlecht auf Kohlenstoffquellen wie Galaktose, Mannose, Fruktose, Pyruvat oder auch Glukose. Ein langsames Wachstum des *fgy1*-Deletionsstammes gegenüber dem Stamm RWY95-1D (*FGY1*) auf Medium mit Glukose wurde auch in unserer Arbeitsgruppe beobachtet. Die Tests zur Salztoleranz der beiden Stämme führten zu dem Ergebnis, dass beim RWY95-1A-Stamm eine allgemein erniedrigte Salztoleranz vorliegt. Hier konnte keine Spezifität festgestellt werden. Der $\Delta fgy1$ -Stamm ist hypersensitiv gegenüber allen getesteten osmotischen Agenzien. Untersuchungen zur pH Toleranz des *fgy1*-Deletionsstammes zeigten, dass er einen Wachstumsdefekt bei pH 5,5 bzw. pH 6 aufweist, aber bei einem pH von 4,5 und Zugabe von Homoserin oder Norvalin besser wächst als der Referenzstamm. Auch für die Tests zum Stickstoffmetabolismus ließ sich nur ein genereller

Wachstumsdefekt für den Stamm RWY95-1A ($\Delta fgy1$) feststellen. Die ausführlichen Ergebnisse der Phänotyp-Microarrays sind im Anhang dargestellt (6.1).

Da diese Ergebnisse eher ein universelles Wachstumsdefizit des *fgy1*-Deletionsstammes gegenüber dem Referenzstamm zeigen, konnten sie nicht als Ausgang für weitere Untersuchungen zur Funktion von Fgy1 genutzt werden.

3.3 Untersuchung einer Funktion von Fgy1 bei der Lokalisierung von Plasmamembranproteinen

GLUT1 ermöglicht im Stamm EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) Wachstum auf Medium mit Glukose, im *hxf*-Stamm dagegen nicht. Daher muss das Transporterprotein im *fgy1-1* mutanten Stamm in der Plasmamembran integriert vorliegen. Es stellte sich die Frage, ob Fgy1 für eine Mislokalisierung von GLUT1 und vielleicht auch von anderen Transportproteinen verantwortlich ist. Mit Hilfe von Lokalisierungsexperimenten sollte untersucht werden, ob Fgy1 eine Funktion bei der Sekretion von GLUT1 bzw. der Maltosepermease Mal31 auf dem Weg zur Plasmamembran ausübt.

3.3.1 Untersuchungen zur Lokalisierung von GLUT1

3.3.1.1 Lokalisierung eines GLUT1-GFP Fusionsproteins im *fgy1-1* mutanten Stamm

Die Lokalisierung von GLUT1 in *S. cerevisiae* wurde schon in früheren Experimenten durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht (Kasahara und Kasahara, 1996) Die Experimente hatten gezeigt, dass GLUT1 in intrazellulären Strukturen, vermutlich im endoplasmatischen Retikulum, zurückgehalten wurde. Im Gegensatz dazu konnten Wieczorke *et al.* (2003) durch C-terminale Fusion des grün-fluoreszierenden Proteins GFP an die Sequenz des GLUT1-Gens und Expression dieses Fusionsproteins in einem *hxf*-Stamm eine Lokalisierung von GLUT1-GFP an der Zelloberfläche nachweisen. Erklärt wurde dieser Unterschied mit der Nutzung unterschiedlicher Hefestämme. Kasahara und Kasahara (1996) hatten ihre Untersuchungen in einem Stamm durchgeführt, der nur partiell in einigen endogenen Glukosetransportern deletiert war, in dem von Wieczorke *et al.* (2003) benutzten Stamm waren dagegen alle endogenen Glukosetransporter der Hefe deletiert.

Zum Vergleich der Lokalisierung von GLUT1 wurde das GLUT1-GFP exprimierende Plasmid YEprGLUT1-GFP zum einen in den Stamm EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) und zum anderen in EBY.VW4000 (*hxf*) transformiert. Die Lokalisierung

von GLUT1-GFP wurde fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Es konnte kein Unterschied in der Lokalisierung von GLUT1-GFP zwischen dem *fgy1-1* mutanten Stamm und dem *hxt*-Stamm nachgewiesen werden, der auf eine Funktion von Fgy1 beim Transport von GLUT1 zur Plasmamembran hingedeutet hätte. In beiden Stämmen war GLUT1-GFP an der Zelloberfläche lokalisiert (Abb. 5).

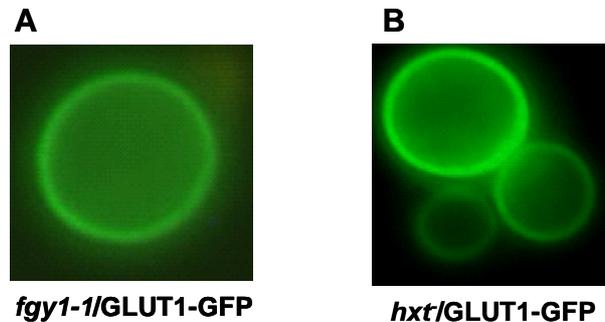


Abb. 5: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Lokalisierung des Fusionsproteins GLUT1-GFP in den Hefestämmen EB.Y.S7 (*hxt fgy1-1*) (A) und EB.Y.VW4000 (*hxt*) (B). Die Zellen wurden in synthetischem Medium ohne Uracil und Methionin bei 30°C herangezogen.

3.3.1.2 Gegenüberstellung der Lokalisierung von GLUT1 durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation

Eine mögliche Funktion von Fgy1 bei der Lokalisierung von GLUT1 sollte durch eine weitere Untersuchung überprüft werden. Fraktionierung durch einen Saccharosedichtegradienten und anschließende Western-Blot-Analyse sollte Aufschluss über die intrazelluläre Verteilung von GLUT1 in Hefezellen geben. Sollte Fgy1 die Sekretion von GLUT1 auf dem Weg vom endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran beeinträchtigen, müsste GLUT1 in einem Stamm, der *FGY1* exprimiert, in intrazellulären Kompartimenten nachzuweisen sein. In einem *fgy1*-Deletionsstamm müsste GLUT1 aber an der Plasmamembran lokalisiert sein.

Das Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 wurde in die Stämme RWY95-1A (Δ *fgy1*) und RWY95-1D (*FGY1*) transformiert und Proteinextrakte von in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Kulturen dieser Stämme hergestellt (2.21). Die Proteinextrakte wurden mit Saccharosedichtegradienten fraktioniert und die Verteilung von GLUT1 in der Zelle nach SDS-PAGE in einem Western-Blot analysiert. In Abbildung 6 ist die Lokalisierung von GLUT1 in den Stämmen RWY95-1A und RWY95-1D gegenübergestellt. Es zeigte sich, dass GLUT1 in beiden Stämmen in Fraktionen höherer Dichte lokalisiert ist, dies entspricht einer Lokalisierung an der Plasmamembran.

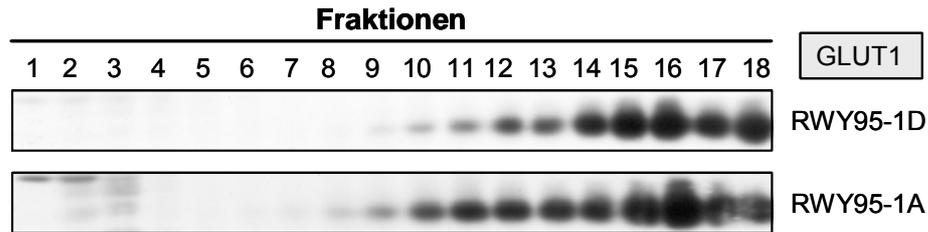


Abb. 6: Fraktionierung von GLUT1 durch Dichtegradientenzentrifugation. Proteinextrakte der GLUT1 exprimierenden Stämme RWY95-1D (*FGY1*) und RWY95-1A (Δ *fgy1*) wurden mit einem Saccharosedichtegradienten (20-50% Saccharose, geringste Dichte in Fraktion 1) fraktioniert. Mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse wurden die Fraktionen auf die Anwesenheit des Proteins GLUT1 hin untersucht. Es wurden spezifische, polyklonale Antikörper gegen GLUT1 eingesetzt.

Dieses Ergebnis deckt sich mit einem von Wieczorke *et al.* (2003) durchgeführten Fraktionierungsexperiments in den Stämmen EBY.18ga (*hxf*) und EBY.S7 (*hxf fgy1-1*). Auch hier konnte kein Unterschied in der Lokalisierung von GLUT1 in Abhängigkeit von Fgy1 nachgewiesen werden. Somit kann gefolgert werden, dass Fgy1 wohl keinen Einfluss auf die Lokalisierung von GLUT1 zur Plasmamembran ausübt. Es bleibt aber zu klären, ob Fgy1 eine Funktion bei der Integration von GLUT1 in die Plasmamembran zukommt.

3.3.2 Überprüfung eines Einflusses von Fgy1 auf die Lokalisierung von Mal31

Ergebnisse früherer Untersuchungen gaben Anlass zu der Frage, ob Fgy1 vielleicht einen Einfluss auf die Lokalisierung der Maltosepermease Mal31 ausübt. Messungen der Maltoseaufnahme in den Stämmen RWY95-1D (*FGY1*) und RWY95-1A (Δ *fgy1*) hatten gezeigt, dass die Maltoseaufnahme im *fgy1*-Deletionsstamm RWY95-1A gegenüber dem Stamm RWY95-1D deutlich reduziert war, wobei für den *FGY1* exprimierenden Stamm RWY95-1D schon eine verringerte Maltoseaufnahme verglichen mit einem anderen Wildtyp-Hefestamm CEN.PK2-1C nachgewiesen wurde (Wieczorke, 2001).

Mit Hilfe eines Fraktionierungsexperiments durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation sollte überprüft werden, ob die geringere Maltoseaufnahmekapazität des Δ *fgy1*-Stammes darauf zurückzuführen ist, dass in diesem Stamm die Maltosepermease Mal31 falsch lokalisiert ist.

Ein erster Versuch, Mal31 nach Fraktionierung durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation nachzuweisen, scheiterte, obwohl *MAL31* auf einem

Überexpressionsplasmid unter Kontrolle des *MET25*-Promotors in den Zellen vorlag, dies machte die Expression der Permease unabhängig von einer Induktion durch Maltose (Voss, 2001). Erklärt wurde dies damit, dass die isolierte Menge des Proteins trotz Überexpression noch zu gering war und außerdem zeigte der gegen Mal31 gerichtete Antikörper nur eine recht unspezifische Bindung. Aus diesem Grund wurde ein Plasmid konstruiert, auf dem die kodierende Sequenz der Maltosepermease Mal31 am 5'-Ende mit einem 1x HA-Epitop versehen war und es zudem durch Klonierung hinter den konstitutiven *HXT7*-Promotor überexprimiert wurde (2.17.1). Das so konstruierte Plasmid p426H7HA-MAL31 wurde in die beiden Hefestämme RWY95-1D (*FGY1*) und RWY95-1A ($\Delta fgy1$) transformiert und Proteinextrakte (2.21) von Kulturen dieser transformierten Stämme hergestellt. Die Kulturen waren in synthetischem Medium ohne Uracil mit 0,2% Glukose herangezogen worden um die Glukose-induzierte Inaktivierung der Maltosepermease und den Abbau des Proteins zu verhindern (Riballo *et al.*, 1995; Medintz *et al.*, 1996). Die Extrakte wurden einer Fraktionierung durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation unterzogen. Anschließend erfolgte die Analyse der Verteilung von HA-Mal31 in den beiden Stämmen durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse mit gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörpern. Der Vergleich der Lokalisierung von HA-Mal31 in den zwei Stämmen zeigte keinen Unterschied (Abb. 7).



Abb. 7: Verteilung von HA-Mal31 nach Fraktionierungsexperiment durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation. Das Plasmid p426H7HA-MAL31 wurde in die Stämme RWY95-1D (*FGY1*) und RWY95-1A ($\Delta fgy1$) transformiert. Proteinextrakte wurden einer Fraktionierung unterzogen und die Fraktionen in einer SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse eingesetzt. Es wurde ein spezifischer, monoklonaler Antikörper gegen das HA-Epitop verwendet.

In den Fraktionen 17 und 18, die eine hohe Dichte haben, wurde nur wenig Protein detektiert. Eine Lokalisierung in diesen Fraktionen weist auf eine Lokalisierung an der Plasmamembran hin. Der Hauptanteil des Proteins konnte in Fraktionen

geringerer Dichte nachgewiesen werden, was auf eine Lokalisierung in intrazellulären Strukturen hindeutet (Kölling und Hollenberg, 1994). Das Ergebnis dieses Lokalisierungsexperiments lässt den Schluss zu, dass Fgy1 auch keine Funktion bei der Sekretion der Maltosepermease Mal31 auf dem Weg zur Plasmamembran hat.

3.4 Untersuchung eines Einflusses von Fgy1 auf den Phosphatsignalweg

Lenburg und O'Shea (2001) führten zur näheren Charakterisierung der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) Pho85 Untersuchungen durch, innerhalb derer das *FGY1*-Gen aufgrund von synthetischer Letalität einer *fgy1*-Deletion mit der *pho85*-Deletion isoliert wurde. Dieses Gen wurde von ihnen mit *EFR3* (PHO Eighty-Five Requiring) benannt. Wieczorke (2001) konnte in Zellen mit Deletion von *FGY1* eine erhöhte Sensitivität gegenüber Arsenat nachweisen. Die Aufnahme von Arsenat in die Zelle erfolgt über den Phosphattransporter Pho84 und kann dort als Phosphat-Analog wirken (Bun-ya *et al.*, 1996; Johnson, 1971). Beide Ergebnisse deuteten auf eine mögliche Beteiligung von Fgy1 an der Phosphataufnahme bzw. deren Regulation. Diese Beteiligung wäre unabhängig von der Phosphatkonzentration. Ogawa *et al.* (2000) führten Untersuchungen durch, die zeigten, dass die *FGY1*-Expression nicht durch Phosphat reguliert wird.

Die beobachteten Phänotypen waren der Anstoß für die Untersuchung einer Funktion von Fgy1 im *PHO*-Signaltransduktionsweg. Der Einfluss von Fgy1 sollte durch Messung der Enzymaktivität der sauren Phosphatase Pho5 in einem *FGY1*-Wildtyp-, einem *fgy1*-Deletionsstamm und in den zwei Stämmen mit einer zusätzlichen *pho84*-Deletion überprüft werden.

Die vom *PHO5*-Gen kodierte saure Phosphatase wird in den periplasmatischen Raum sekretiert (Ogawa *et al.*, 2000). Die Regulation der Transkription von *PHO5* erfolgt über den *PHO*-Signalweg je nach Verfügbarkeit von Phosphat im Medium; Phosphatmangel induziert die Expression von *PHO5*, ein großes Angebot an Phosphat reprimiert sie (Suomalainen *et al.*, 1960). Der über den *PHO*-Signalweg regulierte Transport von Phosphat über die Plasmamembran wird von dem H^+/P_i Kotransporter Pho84 ermöglicht (Bun-Ya *et al.*, 1991).

3.4.1 Konstruktion von *PHO84*-Deletionsstämmen

Vor Durchführung der Pho5-Enzymaktivitätsbestimmung sollte *PHO84* in den Stämmen RWY95-1D (*FGY1*) und RWY95-1A (Δ *fgy1*) deletiert werden. Dazu

musste in einem ersten Schritt das integrierte *kanMX*-Modul durch Expression der Cre-Rekombinase über Rekombination der *loxP*-Stellen aus dem Stamm RWY95-1A ($\Delta fgy1$) exzisiert werden (2.18). Der so entstandene $\Delta fgy1$ -Stamm wurde mit DVY.095 bezeichnet und konnte nun erneut für eine Gendeletion mit Hilfe der *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette eingesetzt werden. Die Konstruktion der $\Delta pho84$ -Stämme wurde wie in Abschnitt 2.18 beschrieben durchgeführt. Die Amplifikation der Deletionskassette aus dem Plasmid pUG6 erfolgte mit dem Oligonukleotidpaar S1-PHO84/S2-PHO84. Nach Aufreinigung wurde das PCR-Produkt in die beiden Stämme RWY95-1D (*FGY1*) und DVY.095 ($\Delta fgy1$) transformiert. Die erfolgreiche Deletion von *PHO84* durch Ersetzen der Gensequenz mit der Sequenz der Deletionskassette wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden a1-PHO84/a4-PHO84 und zusätzlich mit den Primern a1-PHO84/k2-*kanMX* (2.4) verifiziert. Die zwei neu konstruierten Stämme erhielten die Bezeichnungen DVY.01 (*pho84::kanMX FGY1*) und DVY.02 (*pho84::kanMX* $\Delta fgy1$).

3.4.2 Bestimmung der Enzymaktivität der sauren Phosphatase

Die Enzymaktivität der sekretierten, sauren Phosphatase sollte in den vier Stämmen RWY95-1D (*FGY1*), RWY95-1A ($\Delta fgy1$), DVY.01 (*pho84::kanMX FGY1*) und DVY.02 (*pho84::kanMX* $\Delta fgy1$) sowohl in Gegenwart einer definierten Menge Phosphat (10 mM) als auch unter Phosphatmangelbedingungen (2.1.4) gemessen werden. Die Werte der ermittelten spezifischen Aktivitäten sollten vor dem Hintergrund einer Funktion von Fgy1 bei der Phosphataufnahme oder deren Regulation miteinander verglichen werden.

Es wurden Rohextrakte aus Kulturen der vier Stämme hergestellt (2.31.1), die dann für die Enzymaktivitätsmessung eingesetzt wurden (2.31.2). Die berechneten Werte der spezifischen Enzymaktivität von Pho5 in Units/mg Protein sind in Abbildung 8 dargestellt.

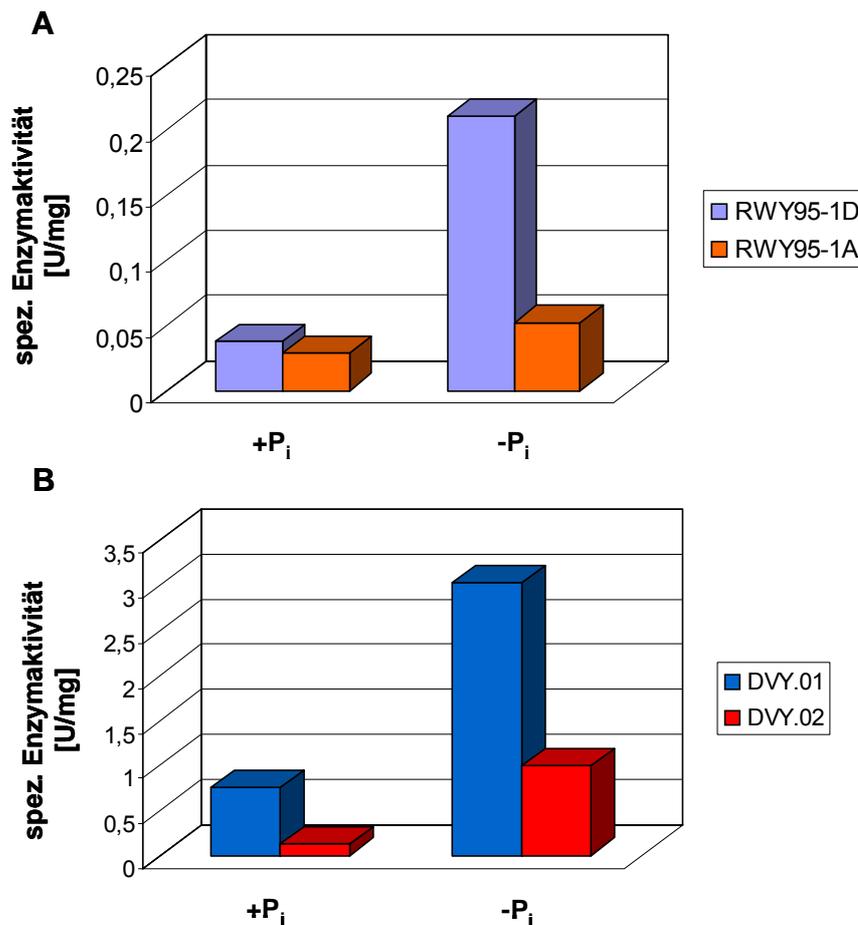


Abb. 8: Darstellung der ermittelten Enzymaktivitäten im Säulendiagramm. Die Enzymaktivität von Pho5 wurde jeweils in Gegenwart von 10 mM Phosphat (+P_i) und unter Phosphatmangelbedingungen (-P_i) ermittelt. Die Werte der Enzymaktivitäten der Stämme RWY95-1D (*FGY1*), RWY95-1A (Δ *fgy1*) (**A**), DVY.01 (*pho84::kanMX FGY1*) und DVY.02 (*pho84::kanMX* Δ *fgy1*) (**B**) sind als Säulen in U/mg Protein dargestellt.

Bei Verfügbarkeit von Phosphat (+P_i) wurden für Pho5 sowohl im *FGY1*-Wildtypstamm RWY95-1D als auch im Δ *fgy1*-Stamm RWY95-1A Werte für die Enzymaktivität von 0,037 U/mg bzw. 0,028 U/mg errechnet, die zeigen, dass die Expression der sauren Phosphatase reprimiert ist (Abb. 8A). Liegt ein Phosphatmangel vor, so wird die Expression des *PHO5*-Gens induziert; dies konnte mit einer Pho5-Enzymaktivität von 0,210 U/mg im *FGY1*-Stamm RWY95-1D bestätigt werden. Dagegen lässt sich für den Stamm RWY95-1A (Δ *fgy1*) sagen, dass *PHO5* unter Phosphatmangel weiterhin reprimiert ist. Die Enzymaktivität betrug hier 0,052 U/mg. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass *Fgy1* hier eine Funktion haben könnte. Es lässt sich jedoch nicht sagen, ob diese Funktion in einer direkten Beeinflussung des Phosphattransporters Pho84 oder

durch einen Einfluss auf den Signalweg nach der Phosphataufnahme zu erklären ist.

Die Deletion von *PHO84* hat eine konstitutive Expression von *PHO5* unabhängig von der Phosphatkonzentration zur Folge (Lenburg und O'Shea, 1996). Durch Bestimmung der Pho5-Enzymaktivität in den Δ *pho84*-Stämmen DVY.01 (*pho84::kanMX FGY1*) und DVY.02 (*pho84::kanMX Δ fgy1*) sollte der mögliche Einfluss der *fgy1*-Deletion auf die *PHO5*-Expression näher untersucht werden. Der Phänotyp der konstitutiven *PHO5*-Expression konnte in beiden Stämmen bei Verfügbarkeit von Phosphat und auch bei Mangel an Phosphat bestätigt werden. Alle vier Werte zeigen eine erhöhte Enzymaktivität (Abb. 8B). Die Aktivität von Pho5 war in dem Doppeldelentionsstamm DVY.02 mit 0,996 U/mg niedriger als im *FGY1*-Wildtypstamm mit *pho84*-Deletion DVY.01 mit einem Wert von 3,031 U/mg.

Die Ergebnisse der Enzymtests deuten darauf hin, dass die Deletion von *FGY1* einen negativen Einfluss auf die Expression von *PHO5* ausübt, da die Werte der Pho5-Enzymaktivität in den Δ *fgy1*-Stämmen gegenüber den *FGY1*-Wildtypstämmen reduziert sind. Der Effekt von *Fgy1* scheint sich jedoch nicht direkt auf *Pho84* zu beziehen. Er könnte aber schon im Transport von Phosphat zu finden sein. Ein Einfluss im *PHO*-Signalweg kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden.

3.5 Vergleich der Phospholipidzusammensetzung der Plasmamembran mittels Dünnschichtchromatographie

Die Plasmamembran von *S.cerevisiae* fungiert als relativ undurchlässige Barriere für hydrophile Moleküle. Spezialisierte Proteine sind für die selektive Aufnahme oder auch Sekretion von gelösten Substanzen über diese Membran verantwortlich (van der Rest *et al.*, 1995). Als Lipiddoppelschicht setzt sich die Plasmamembran aus drei Lipidklassen, den Phospholipiden, Sphingolipiden und Sterolen, aber auch aus Proteinen zusammen. Zu den Phospholipiden zählen Phosphatidylcholin, -ethanolamin, -inositol, -serin und -glycerol (Cardiolipin). In Hefezellen werden drei komplexe Sphingolipide synthetisiert, Inositol-Phosphat-Ceramid (IPC), Mannosyl-Inositolphosphat-Ceramid (MIPC) und Mannosyl-Diinositolphosphat-Ceramid (M(IP)₂C) (Dickson, 1998). Ergosterol bildet das Hauptsterol in der Plasmamembran von Hefezellen (Zinser *et al.*, 1991).

Es sollte untersucht werden, ob die Deletion von *FGY1* die Zusammensetzung der Plasmamembran in Bezug auf die Phospholipide bzw. Ergosterol verändert. Mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie lassen sich Lipidgemische einfach

auftrennen. Kieselgel dient hier als stationäre Phase. Entsprechend ihrer Affinität zur stationären Phase werden die einzelnen Komponenten des zu trennenden Lipidgemisches unterschiedlich stark vom Fließmittel mitgenommen. Das Laufmittel wandert infolge von Kapillarkräften in der Kieselgelschicht nach oben.

Das Vorhandensein der verschiedenen Phospholipide und auch des Sterols Ergosterol in der Plasmamembran wurde in den zwei Stämmen RWY95-1A ($\Delta fgy1$) und RWY95-1D ($FGY1$) überprüft. Dazu wurde die Membranfraktion dieser Stämme isoliert (2.19) und die Phospholipide aus der Zellmembran extrahiert (2.32). 10 μ l des in Toluol gelösten Lipidextraktes wurden dann für die Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Durch Verwendung unterschiedlicher Fließmittelgemische (Tab. 12, 2.33) konnten die einzelnen Lipidkomponenten aufgetrennt und durch Verkohlung nach der Methode von Bitman und Wood (1982) sichtbar gemacht werden (2.33). Vergleicht man die aufgetrennten Lipide beider Stämme miteinander, so ließ sich kein Unterschied in der Zusammensetzung der Extrakte feststellen (Abb. 9).

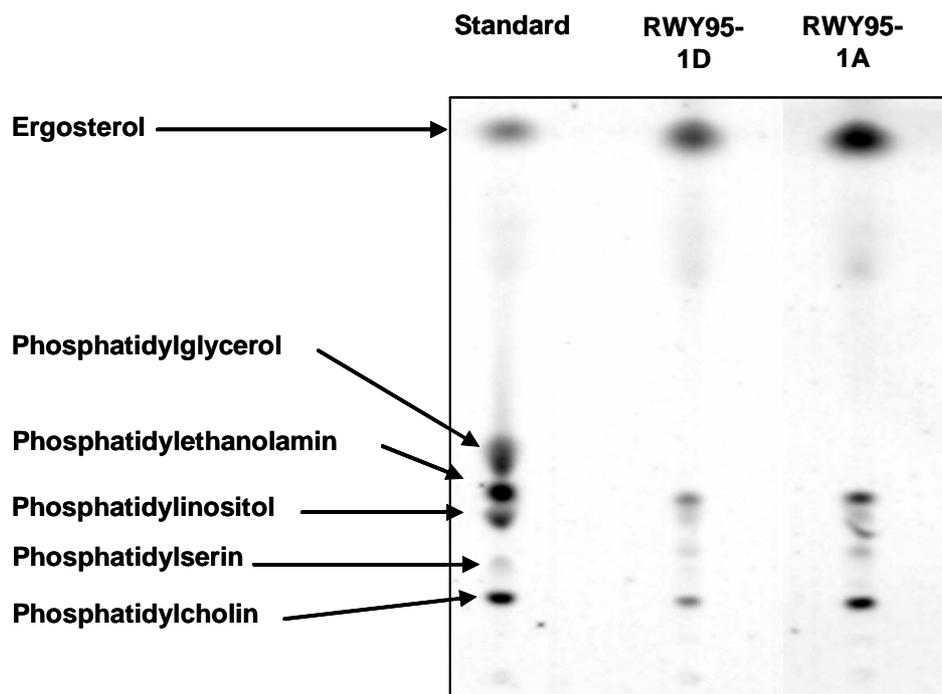


Abb. 9: Auftrennung von Lipidextrakten aus der Plasmamembran durch Dünnschichtchromatographie. Es wurden Lipidextrakte der Plasmamembranfraktion der Stämme RWY95-1D ($FGY1$) und RWY95-1A ($\Delta fgy1$) hergestellt und chromatographisch auf einer mit Kieselgel beschichteten Glasplatte aufgetrennt. Als Standard diente ein Gemisch von je 0,25 μ g Phosphatidylcholin, -serin, -inositol, -ethanolamin, -glycerol (Cardiolipin) und Ergosterol gelöst in Toluol.

Außer Phosphatidylglycerol konnten die anderen Phospholipide und auch Ergosterol durch Vergleich mit dem aufgetragenen Standard nachgewiesen werden. In der Literatur finden sich verschiedene Angaben zu dem Gehalt der einzelnen Lipide in der Plasmamembran. Nach Zinser *et al.* (1991) macht das Phosphatidylglycerol oder auch Cardiolipin nur 0,2% des Lipidgehalts der Plasmamembran aus, Patton und Lester (1991) hingegen haben einen Anteil von 4,2% Phosphatidylglycerol publiziert. Unterschiede in der Zusammensetzung der Plasmamembran lassen sich durch unterschiedliche Stämme, Kultivierungsbedingungen oder auch Extraktionsmethoden erklären. Für die beiden untersuchten Stämme deutet dies darauf hin, dass in ihren Plasmamembranen nur ein geringer, nicht-detektierbarer Anteil an Phosphatidylglycerol vorliegt, da die Kultivierungsbedingungen und auch die Lipidextraktion für beide Stämme gleich war. Aufgrund dieses Resultates lässt sich schließen, dass die Deletion von *FGY1* nicht zu einer derartigen Veränderung der Plasmamembranzusammensetzung führt, dass einzelne Phospholipide oder Ergosterol nicht mehr vorhanden sind. Für den Stamm EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) war über eine gaschromatographische Analyse ebenfalls nachgewiesen worden, dass die Mutation in *FGY1* keinen Einfluss auf die Anwesenheit von Ergosterol in der Plasmamembran von Hefezellen hat (Dlugai, 2002).

3.6 Untersuchung einer Funktion von Fgy1 bei der Vesikelfusion mit der Plasmamembran

Die Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran stellt auf dem Weg der Proteine vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zur Plasmamembran den letzten Schritt bei der Sekretion von Proteinen dar.

Mit Hilfe von temperatursensitiven (ts) *sec*-Mutanten kann der Sekretionsprozess von Proteinen in der Hefe verfolgt werden. Bei einer permissiven Temperatur von 25°C wachsen *sec*-mutante Stämme normal. Inkubation bei der restriktiven Temperatur von 37°C führt dazu, dass Zellen dieser *sec*-Stämme den Sekretionsprozess der Proteine an dem Punkt abbrechen, an dem das jeweilige *Sec*-Protein seine Funktion ausübt. Dies führt zu einer Akkumulation von intermediären Strukturen des Sekretionsweges und den in diesen Organellen enthaltenen Proteinen. Die Akkumulation ist durch Rückführen der Zellen auf 25°C reversibel (Novick *et al.*, 1980).

Das *SEC9*-Gen der Hefe *S. cerevisiae* wurde identifiziert als eines von zehn spät-aggierenden essentiellen *SEC*-Genen, die für den post-Golgi Transport von

Vesikeln zur Plasmamembran benötigt werden (Novick *et al.*, 1980; 1981). Für das Sec9 Protein konnte eine Lokalisierung an der Plasmamembran nachgewiesen werden (Brennwald *et al.*, 1994). Bei dem *sec9-4*-mutanten Allel handelt es sich um eine temperatursensitive Mutation mit einer Transition des Nukleotids Guanin zu Adenin, die in Substitution von Asparagin zu Glycin in der Proteinsequenz resultiert (Brennwald *et al.*, 1994). In *sec9-4*-mutanten Zellen konnte bei der restriktiven Temperatur von 37°C die Akkumulation von zwei Strukturen nachgewiesen werden: „Berkeley bodies“ und Vesikel von 80-100 nm Durchmesser (Novick *et al.*, 1981). Diese Strukturen sind kennzeichnend für eine Funktion beim post-Golgi Transport von Vesikeln im Sekretionsweg der Proteine. Inkubation von *sec9-4*-mutanten Zellen bei 37°C verhindert die Fusion von post-Golgi Vesikeln mit der Plasmamembran.

Ein weiteres Beispiel ist das *SEC18* Gen. Für die temperatursensitive *sec18-1* Mutation konnte gezeigt werden, dass bei der restriktiven Inkubationstemperatur von 37°C der Transfer von Proteinen auf dem Weg vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat blockiert ist (Novick *et al.*, 1980; 1981). Aufgrund dieser Mutation akkumulieren *sec18-1* Zellen Proteine im ER, was zu einer Ausbreitung von Strukturen des ER führt. Das essentielle *SEC18*-Gen wurde über Komplementation der *sec18-1* Mutation mit Hilfe einer Genbank isoliert (Eakle *et al.*, 1988).

Bisher konnte gezeigt werden, dass Fgy1 keinen Einfluss auf den Transport von GLUT1 oder auch Mal31 zur Plasmamembran hat. Beide Transporterproteine sind unabhängig von der Expression von WT-*FGY1* oder mutiertem *fgy1* an der Plasmamembran lokalisiert (3.3). Für Fgy1 selbst konnte auch eine Lokalisierung an der Plasmamembran nachgewiesen werden (3.1; Wiczorke, 2001). Daher kam die Idee, dass Fgy1 in die Integration dieser Proteine in die Plasmamembran involviert sein könnte. Ein Hinweis darauf war, dass die Aktivität der generellen Aminosäurepermease Gap1 im Δ *fgy1*-Stamm gegenüber dem Wildtyp-Stamm um das 1,5-fache erhöht war (persönliche Mitteilung von Bruno André, Brüssel). Fgy1 könnte also eine Funktion im späten Stadium des Sekretionsweges von Proteinen haben und als eine Art negativer Regulator bei der Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran fungieren. Die Deletion des Gens würde diese negative Regulation aufheben und durch eine erhöhte Vesikelfusion mehr Permeasen in die Plasmamembran inseriert werden, was die erhöhte Gap1-Aktivität erklären könnte.

Mit Hilfe der zwei *sec*-mutanten Hefestämme NY782 (*sec9-4*) und NY1217 (*sec18-1*) sollte untersucht werden, ob Fgy1 eine Funktion bei der Vesikelfusion mit der Plasmamembran ausübt.

3.6.1 Untersuchung eines Einflusses von Fgy1 nach Deletion bzw. Überexpression des Gens auf die Temperatursensitivität von *sec*-mutanten Hefestämmen

Die Inkubation des *sec9-4*-mutanten Stammes NY782 bei der restriktiven Temperatur von 37°C führt zur Akkumulation von Vesikeln unterhalb der Plasmamembran, die Fusion der Vesikel mit der Membran findet nicht statt. Es sollte getestet werden, ob zwischen Fgy1 und Sec9 eine genetische Interaktion besteht und so die Deletion oder Überexpression von *FGY1* in der Lage ist, den temperatursensitiven Phänotypen des *sec9-4*-Stammes zu beeinflussen.

Der *sec18-1* Stamm NY1217 diente als Kontrolle. Diese *ts*-Mutante zeigt bei einer Inkubationstemperatur von 37°C eine Akkumulation von Proteinen im ER. Bei einer angenommenen Funktion von Fgy1 bei der Vesikelfusion mit der Plasmamembran, sollte weder die Überexpression noch Deletion von *FGY1* den Phänotypen verändern.

3.6.1.1 Deletion von *FGY1* in *sec*-Mutanten Hefestämmen

Die Deletion von *FGY1* in den Stämmen NY782 (*sec9-4*) und NY1217 (*sec18-1*) wurde mit der *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette, wie in Abschnitt 2.18 beschrieben, durchgeführt. Die Amplifikation der Deletionskassette aus dem Plasmid pUG6 erfolgte über PCR mit dem Oligonukleotidpaar S1-YMR212/S2-FGY1 (2.4). Geneticin-resistente Transformanten wurden ausgewählt und die richtige Integration der *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette über PCR mit den Oligonukleotiden a1-FGY1/a4-FGY1 und anschließender Agarosegelelektrophorese überprüft. Die neu konstruierten $\Delta fgy1$ -Deletionsstämme wurden mit DVY.04 (*sec9-4* $\Delta fgy1$) und DVY.05 (*sec18-1* $\Delta fgy1$) bezeichnet.

3.6.1.2 Klonierung eines *FGY1*-Überexpressionsplasmids

Die Klonierung des *FGY1*-Überexpressionsplasmid erfolgte über homologe Rekombination, wie in Abschnitt 2.17 beschrieben. Die DNA-Sequenz von *FGY1* wurde über PCR mit dem Oligonukleotidpaar f-Hxt7pr-Fgy1/r-Hxt7pr-Fgy1 aus dem Plasmid pRW7S-T1-19 amplifiziert. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde zusammen mit dem durch *EcoRI/BamHI* linearisierten Vektor p426HXT7-6His in den Stamm EBY.VW4000 transformiert. Transformanten wurden durch Selektion auf synthetischem Medium mit 1% Maltose ohne Uracil auf die Anwesenheit eines zirkulären Plasmids überprüft. Aus ausgewählten Kolonien wurde die DNA isoliert (2.9.2), diese in *E. coli* transformiert (2.8.1) und wieder aus den Zellen reisoliert (2.9.1). Das isolierte Plasmid wurde über Restriktion mit dem Enzym *XhoI* auf seine Richtigkeit getestet und mit p426HXT7-FGY1 bezeichnet.

3.6.1.3 Durchführung von Tropftests zur Überprüfung des Wachstums bei unterschiedlichen Temperaturen

Nach Konstruktion der $\Delta fgy1$ -Stämme DVY.04 (*sec9-4* $\Delta fgy1$) und DVY.05 (*sec18-1* $\Delta fgy1$) und des Überexpressionsplasmids p426HXT7-FGY1 sollte untersucht werden, ob die Deletion oder Überexpression von *FGY1* die Temperatursensitivität der *sec9-4*-mutanten Stämme beeinflusst. Die *sec18-1*-mutanten Stämme dienten als negative Kontrolle, da hier kein Effekt von *FGY1* auf den Phänotypen zu erwarten war. Es sollten Tropftests von Flüssigkulturen bei verschiedenen Temperaturen inkubiert und das Wachstum der aufgetropften Zellen miteinander verglichen werden. Dazu wurden zwei Wachstumsstudien durchgeführt.

Für die erste wurden das Überexpressionsplasmid p426HXT7-FGY1 und der Leervektor p426HXT7-6His jeweils in die Stämme NY782 (*sec9-4*) und NY1217 (*sec18-1*) transformiert. Außerdem wurde der Leervektor p426HXT7-6His auch in die Stämme DVY.04 (*sec9-4* $\Delta fgy1$) und DVY.05 (*sec18-1* $\Delta fgy1$) transformiert und Transformanten auf synthetischem Medium mit 2% Glukose ohne Uracil selektiert. 5 ml Flüssigkulturen dieser Transformanten wurden herangezogen um Tropftests durchführen zu können. Ausgehend von einer OD_{600} von 1 wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt mit einer OD_{600} von 0,1; 0,01; 0,001 und 0,0001. Die fünf Verdünnungen jeder Kultur wurden nun auf synthetische Mediumsplatten mit 2% Glukose ohne Uracil aufgetropft. Nach zwei Tagen Inkubationszeit der Zellen bei Temperaturen von 25°C, 30°C, 35°C, 37°C und 42°C konnte das Wachstum der einzelnen transformierten Zellen miteinander verglichen werden (Abb. 10).

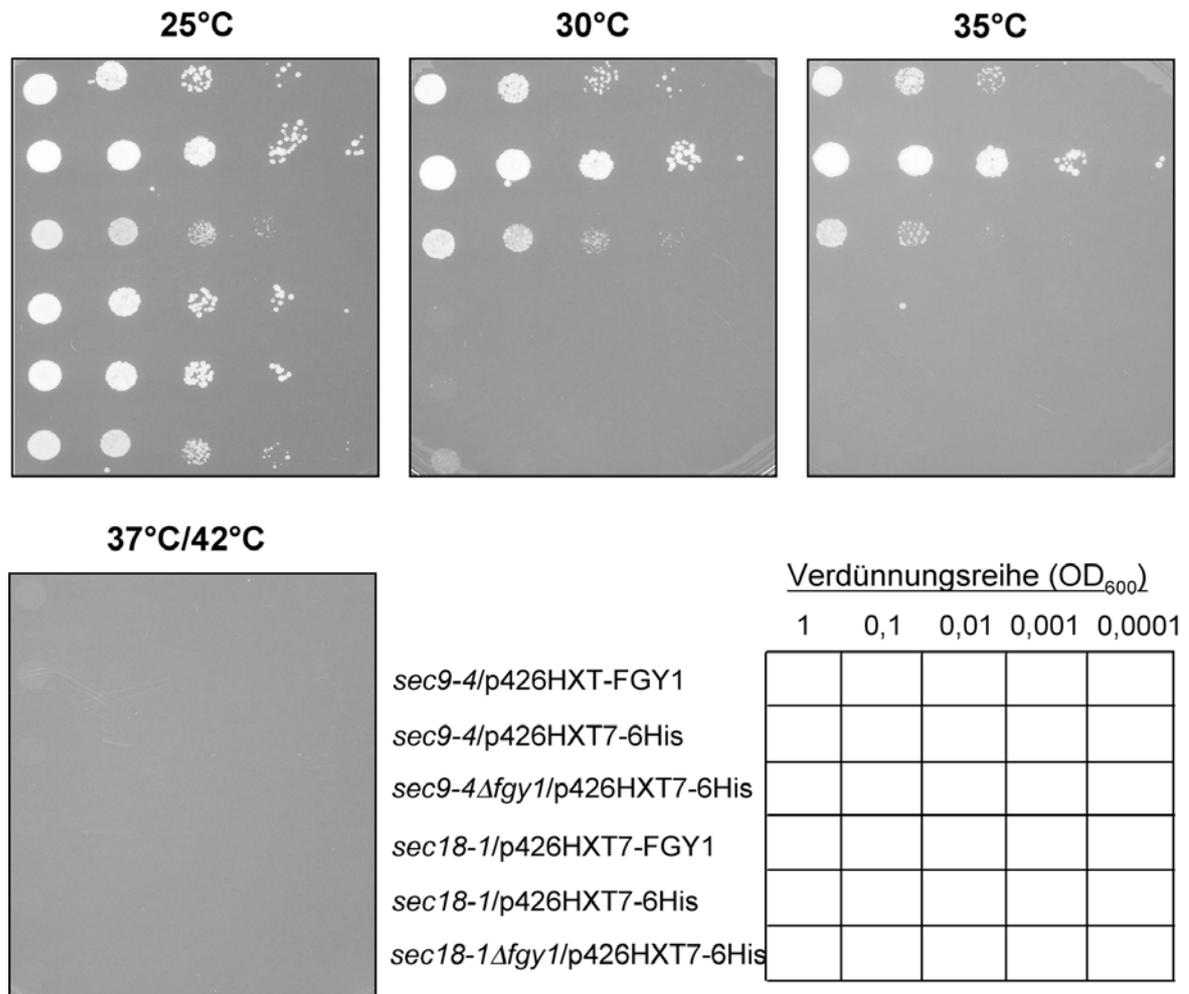
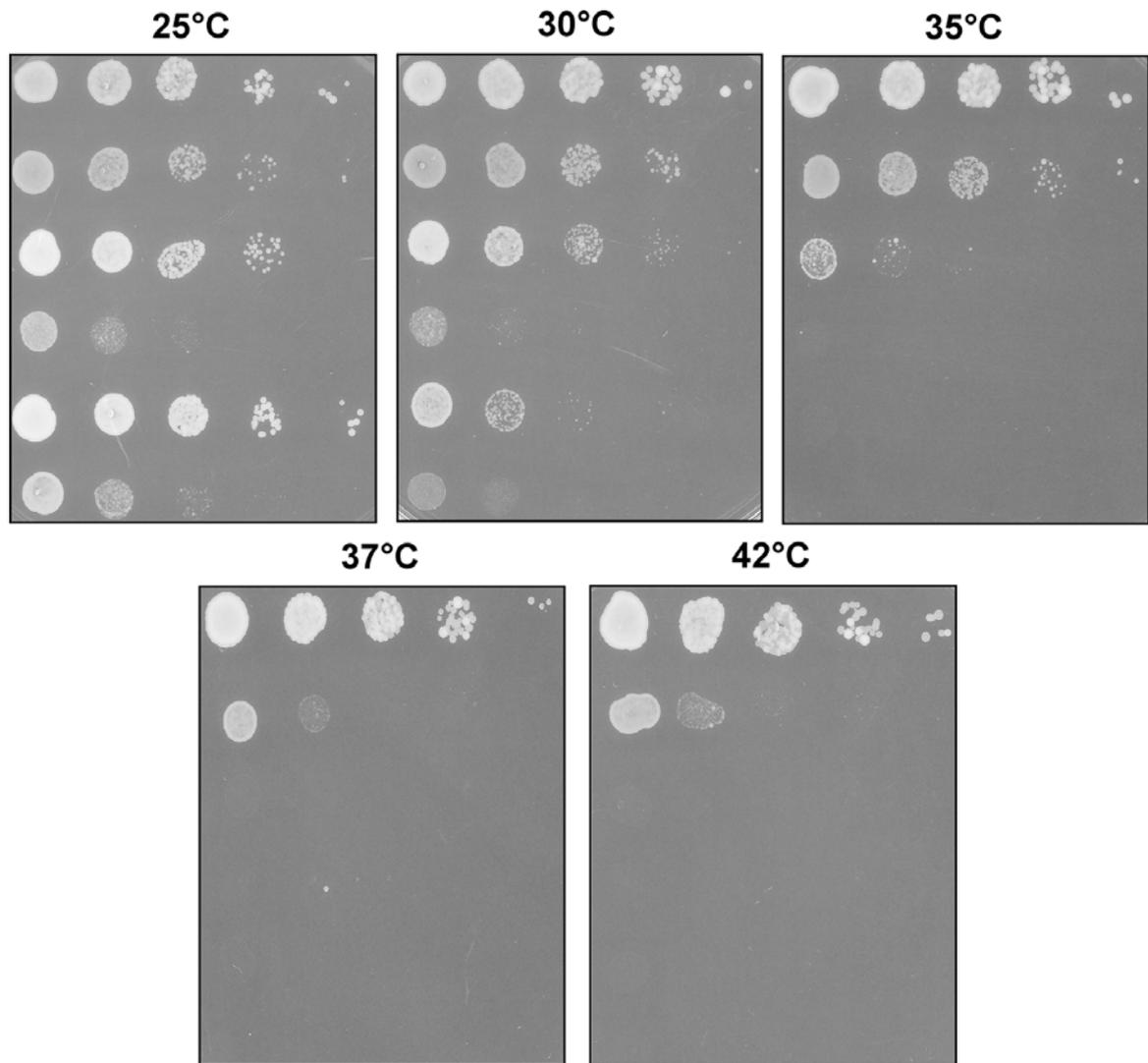


Abb. 10: Tropftests der *sec*-mutanten Stämme. Verglichen wurden das Wachstum der Stämme NY782 (*sec9-4*) und NY1217 (*sec18-1*) transformiert mit den Plasmiden p426HXT7-FGY1 bzw. p426HXT7-6His, DVY.04 (*sec9-4 Δfgy1*) und DVY.05 (*sec18-1 Δfgy1*) transformiert mit dem Plasmid p426HXT7-6His. Es wurden Verdünnungsreihen von OD₆₀₀=1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 hergestellt und 4 µl dieser Kulturen auf synthetisches Medium mit 2% Glukose ohne Uracil getropft. Die Inkubation fand für zwei Tage bei 25°C, 30°C, 35°C, 37°C und 42°C statt.

Nach Inkubation bei der permissiven Temperatur von 25°C konnten schon Unterschiede beobachtet werden. Der mit dem Leervektor p426HXT7-6His transformierte Stamm NY782 (*sec9-4*) zeigte normales Wachstum. Im Vergleich dazu verursachten sowohl die Überexpression, als auch die Deletion von *FGY1* ein verlangsamtes Wachstum. Diese Ergebnisse trafen auch nach Inkubation der Zellen bei 30°C und 35°C zu. Für die drei Stämme, die die *sec18-1* Mutation enthielten, ließ sich bei 25°C kein Unterschied durch Überexpression oder Deletion von *FGY1* im Vergleich zum Ausgangsstamm beobachten. Diese drei Stämme wuchsen allerdings schon ab einer Temperatur von 30°C nicht mehr. Für die drei *sec9-4*-mutanten Stämme traf dies erst ab der restriktiven Temperatur von 37°C zu.

Um den Effekt der *fgy1*-Deletion in den beiden *sec*-mutanten Stämmen zu überprüfen wurde eine zweite Wachstumsstudie durchgeführt. Dieses Mal wurden die Stämme NY782 (*sec9-4*) und DVY.04 (*sec9-4 Δfgy1*) zusammen mit NY1217 (*sec18-1*) und DVY.05 (*sec18-1 Δfgy1*) auf Vollmedium mit 2% Glukose getropft. Zusätzlich wurden der Stamm RWY95-1D (*FGY1*), der dem W303-Wildtypstamm entspricht, und der *Δfgy1*-Stamm RWY95-1A mit aufgetropft um das Wachstum der *sec*-mutanten Stämme mit einem *Δfgy1*-Stamm zu vergleichen, der keine Mutation in den *SEC*-Genen aufweist. Der Ablauf der Tropftests und die Inkubationstemperaturen entsprachen denen der ersten Wachstumsstudie. Nach zweitägiger Inkubation wurde das Wachstum der Zellen miteinander verglichen (Abb. 11).



	Verdünnungsreihe (OD ₆₀₀)				
	1	0,1	0,01	0,001	0,0001
<i>FGY1</i>					
<i>Δfgy1</i>					
<i>sec9-4</i>					
<i>sec9-4Δfgy1</i>					
<i>sec18-1</i>					
<i>sec18-1Δfgy1</i>					

Abb. 11: Tropftests der *sec*-mutanten Stämme im Vergleich zu Stämmen ohne Mutationen in den *SEC*-Genen. Verglichen wurde das Wachstum der Stämme RWY95-1D (*FGY1*), RWY95-1A (*Δfgy1*), NY782 (*sec9-4*), DVY.04 (*sec9-4 Δfgy1*), NY1217 (*sec18-1*) und DVY.05 (*sec18-1 Δfgy1*). Es wurden Verdünnungsreihen von OD₆₀₀=1; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 hergestellt und 4 μl dieser Kulturen auf Vollmedium mit 2% Glukose getropft. Die Inkubation fand für zwei Tage bei 25°C, 30°C, 35°C, 37°C und 42°C statt.

Dieser Tropftest zeigte ebenfalls bei 25°C Wachstumsunterschiede. Der *sec9-4 Δfgy1*-Stamm DVY.04 wächst hier schon schlechter als der dazugehörige Ausgangsstamm NY782 (*sec9-4*). Dieses Ergebnis konnte auch für die als Kontrolle dienenden Stämme DVY.05 (*sec18-1 Δfgy1*) und NY1217 (*sec18-1*) beobachtet werden. Ab der restriktiven Temperatur von 37°C zeigten alle vier *sec*-mutanten Stämme kein Wachstum mehr. Nur der WT-Stamm RWY95-1D wuchs bis 42°C gut. Allgemein lässt sich nach den beiden Wachstumsstudien feststellen, dass die drei *Δfgy1*-Stämme RWY95-1A, DVY.04 und DVY.05 gegenüber ihren parental Stämmen einen Wachstumsdefekt aufweisen.

3.6.2 Lokalisierung von GLUT1-GFP in *sec*-Mutanten Stämmen

Mit Hilfe von GLUT1-GFP sollte ein weiterer Versuch durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob die Deletion von *FGY1* die durch die *sec9-4* Mutation verursachte Akkumulation von Vesikeln unterhalb der Plasmamembran bei einer Inkubationstemperatur von 37°C beeinflusst. Die Lokalisierung von GLUT1-GFP sollte in den Stämmen NY782 (*sec9-4*), DVY.04 (*sec9-4 Δfgy1*), NY1217 (*sec18-1*) und DVY.05 (*sec18-1 Δfgy1*) fluoreszenzmikroskopisch miteinander verglichen werden. Dazu wurde das Plasmid YEprGLUT1-GFP in diese vier Stämme transformiert. Transformanten wurden über Nacht in synthetischem Medium ohne Methionin bei 25°C herangezogen um die Expression des unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors liegenden GLUT1-GFP Gens zu induzieren. Die Kulturen wurden für weitere fünf Stunden bei der restriktiven Temperatur von 37°C inkubiert, was zur Ausprägung des *sec*-mutanten Phänotyps führte. Dieser wurde anschließend durch fluoreszenzmikroskopische Lokalisierung von GLUT1-GFP untersucht. Die Beobachtungen ergaben, dass die *fgy1*-Deletion weder im *sec9-4*-mutanten Stamm, noch in Zellen mit der *sec18-1* Mutation eine Veränderung des in den Ausgangsstämmen zu erwartenden Phänotyps hervorrief (Abb. 12).

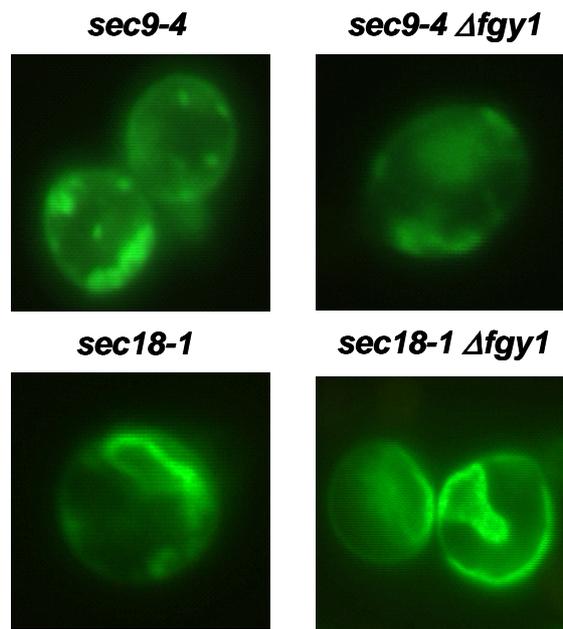


Abb. 12: Lokalisierung von GLUT1-GFP in *sec*-mutanten Stämmen. Das Plasmid YEprGLUT1-GFP wurde in die Stämme NY782 (*sec9-4*), DVY.04 (*sec9-4 Δfgy1*), NY1217 (*sec18-1*) und DVY.05 (*sec18-1 Δfgy1*) transformiert. Nach Heranziehen der Transformanten bei 25°C und anschließender 5-stündiger Inkubation bei 37°C wurde der temperatursensitive *sec*-mutante Phänotyp durch die Lokalisierung von GLUT1-GFP in den Stämmen untersucht.

Im Stamm NY782 (*sec9-4*) wurde GLUT1-GFP in Vesikeln nachgewiesen, die sich unterhalb der Plasmamembran akkumulierten. Dieselbe Lokalisierung zeigte sich auch im Stamm DVY.04 (*sec9-4 Δfgy1*). In den zwei *sec18-1*-mutanten Stämmen wurde GLUT1-GFP unabhängig von *Δfgy1* im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten.

Die Ergebnisse der Wachstumsstudien und der Lokalisierung von GLUT1-GFP geben keinen Aufschluss über das Vorliegen einer genetischen Interaktion zwischen Fgy1 und Sec9. Es konnte keine spezifische Beeinflussung des *sec9-4*-mutanten Phänotyps festgestellt werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Fgy1 in den Vorgang der Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran involviert ist. Die Funktion von Fgy1 kann der Funktion von Sec9 in diesem Prozess nachgeschaltet sein.

3.7 Suche nach Interaktionspartnern von Fgy1 mittels „Tandem-Affinity-Purification“

Die Methode der „Tandem-Affinity-Purification“ (TAP) bietet nach genomischer Fusion des TAP-tags an Zielproteine die Möglichkeit diese Proteine, die unter Kontrolle ihres eigenen Promotors stehen und so auf natürlichem Level exprimiert werden, aufzureinigen (Rigaut *et al.*, 1999). Der TAP-tag besteht aus einem Calmodulin-bindenden Peptid (calmodulin binding peptide, CBP), einer TEV-Protease Schnittstelle („TEV protease cleavage site“) und zwei IgG Bindedomänen des Protein A aus *Staphylococcus aureus*.

Mit Hilfe dieser Aufreinigungsmethode lassen sich Proteinkomplexe identifizieren, ohne dass deren Zusammensetzung vorher bekannt ist. Die biochemische Untersuchung sollte genutzt werden um Proteine zu finden, die in einem Komplex mit Fgy1 in der Hefezelle vorliegen. Bei bekannter Funktion dieser Proteine ließe sich so auf eine mögliche Funktion von Fgy1 schließen, die mit weiteren Experimenten bestätigt werden müsste.

Das Prinzip beruht darauf, dass die Sequenz des TAP-tags genomisch an ein zu untersuchendes Protein fusioniert wird (Puig *et al.*, 2001). Im Falle von Fgy1 wurde diese Fusion im Stamm CEN.PK2-1C, wie in Abschnitt 2.35.1 beschrieben, durchgeführt. Der modifizierte Hefestamm DVY.06 (*FGY1-TAP K.I.URA3*) wurde dann in einer Flüssigkultur herangezogen und ein Proteinextrakt dieser Kultur hergestellt (2.35.2). Die Aufreinigung erfolgte über das Auftragen des Extrakts auf zwei aufeinanderfolgende Affinitätsäulen (2.35.3). Die erste Säule wurde mit einer IgG-Sepharose Suspension befüllt. An diese findet die Bindung des zu untersuchenden Proteins über die Sequenz des Protein A des TAP-tags statt. Dadurch werden auch alle mit dem Zielprotein assoziierten Proteine in der Säule zurückgehalten und erst mittels TEV-Protease, die den Proteinkomplex an der TEV-Protease Schnittstelle des TAP-tags ablöst, aus der Säule eluiert. In einer zweiten mit Calmodulin-beads gefüllten Säule wird der Proteinkomplex über das Calmodulin-bindende Peptid in Gegenwart von Calcium gebunden. Mittels eines speziellen Elutionspuffers wurde der Proteinkomplex wieder von der Säule gewaschen und das Eluat zur Konzentrierung der Proteine einer TCA-Fällung unterzogen (2.35.4). Im Proteinpellet sollten sich jetzt das Fgy1-Protein und zusätzlich alle mit Fgy1 assoziierten Proteine befinden. Mit Hilfe einer SDS-PAGE wurden die Proteine aufgetrennt. Dazu wurde das getrocknete Proteinpellet in 10 µl Wasser aufgenommen und 10 µl Laemmli-Puffer (Biorad) hinzugegeben. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel (Biorad) geladen und die SDS-PAGE auch mit 1x Tris-Laufpuffer von Biorad durchgeführt um Kontamination mit Kreatin zu

vermeiden. Nach der Auftrennung wurde das SDS-Gel einer Silberfärbung (2.28) unterzogen (Abb. 13).

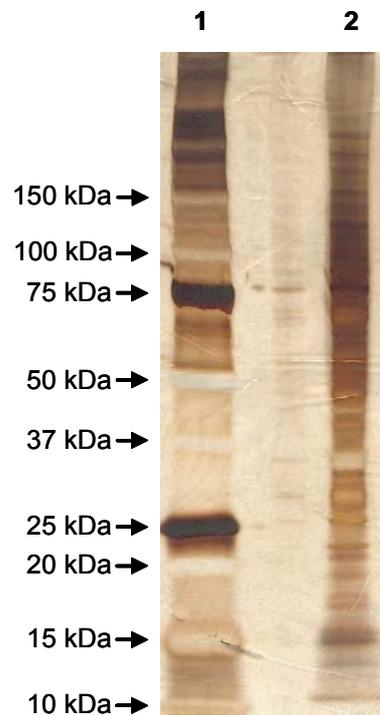


Abb. 13: SDS-Gel nach Silberfärbung. Nach der TAP-Aufreinigung wurden die Proteine über SDS-PAGE getrennt. Um die Proteinbanden im Gel sichtbar zu machen wurde das Gel einer Silberfärbung (Invitrogen) unterzogen. In Spur 1 wurden 5 μ l Proteingrößenstandard aufgetragen, in Spur 2 das in Wasser gelöste Proteinpellet.

Die Silberfärbung des Polyacrylamidgeles machte eine Vielzahl von Proteinen sichtbar, die über die TAP-Aufreinigung des mit TAP-tag versehenen Proteins Fgy1 isoliert wurden. Es ist davon auszugehen, dass trotz einiger artefaktischer Interaktionen viele Interaktionspartner von Fgy1 identifiziert werden können. Nach Separation der einzelnen sichtbaren Proteinbanden aus dem SDS-Gel können sie für eine massenspektrometrische Messung eingesetzt werden.

3.8 Suche nach GLUT1-aktivierenden Mutanten mit einer Transposongenbank

Die Charakterisierung der Funktion von Fgy1 wäre ein wichtiger Schritt um zu verstehen, wie sein aktivierender Einfluss auf den Glukosetransport durch GLUT1 in Hefe zu erklären ist. In den vorherigen Abschnitten wurden Untersuchungen zu möglichen Funktionen von Fgy1 dargestellt, die Erkenntnisse für mögliche Modelle einer Funktion brachten. Jetzt sollte über einen weiteren Versuchsansatz auf die

Funktion von Fgy1 geschlossen werden können. Mit Hilfe einer Transposongenbank wurde nach weiteren Mutationen im Hefegenom gesucht, die einen aktivierenden Effekt auf GLUT1 ausüben und somit zu Wachstum auf glukosehaltigem Medium führen. Die Idee war, über bekannte Funktionen der identifizierten Proteine auf die Funktion von Fgy1 schließen zu können und neue Ansätze für weitere Untersuchungen zu erhalten.

Die Insertionsgenbank besteht aus Plasmiden mit DNA-Fragmenten des Hefegenoms, die in *E. coli* mit einem mini-Tn3::*lacZ*::*LEU2* Transposon mutagenisiert wurden (Seifert *et al.*, 1986; Burns *et al.*, 1994). Der allgemeine Ablauf dieser Methode ist in Abbildung 14 skizziert.

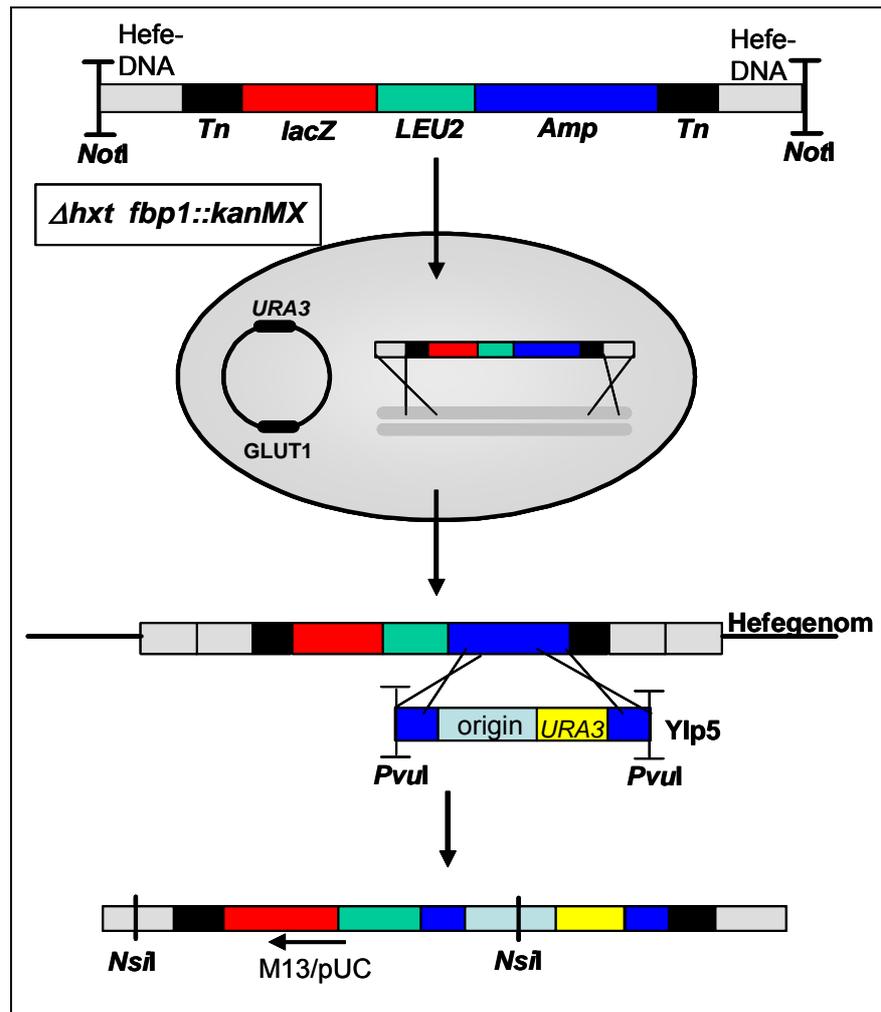


Abb. 14: Schematische Darstellung der homologen Rekombination einer bakteriellen Insertionsgenbank in das Hefegenom. Mit dem Restriktionsenzym *NotI* werden die mutagenisierten Hefe-DNA-Sequenzen aus dem Vektor geschnitten und anschließend in den *GLUT1*-exprimierenden Stamm YSYA321 (*hxt fbp1::kanMX*) transformiert. Nach Insertion des mit *PvuI* linearisierten Plasmids *Ylp5* wird die chromosomale DNA isoliert, mit *NsiI* geschnitten und zirkularisiert. Mit dem Oligonukleotid M13pUC(-40) kann ein Teil des chromosomalen DNA-Abschnitts, in den sich die Genbank inseriert hatte, sequenziert werden.

Die mutagenisierten Hefe-DNA-Sequenzen wurden mit dem Restriktionsenzym *NotI* aus dem Vektor pHSS6 geschnitten und der Restriktionsansatz dann in den zu mutagenisierenden Hefestamm transformiert. Für diese Transformation wurde der Stamm YSYA321 (*hxt fbp1::kanMX*) verwendet, in den zuvor das Plasmid *YEp4H7-hsGLUT1* transformiert worden war.

Der Stamm YSYA321 entspricht dem *hxt*-Stamm EBY.VW4000 mit einer zusätzlichen Deletion des *FBP1*-Gens. Das *FBP1*-Gen kodiert für das Enzym Fruktose-1,6-bisphosphatase und ist in der Glukoneogenese für die Umsetzung von Fruktose-1,6-bisphosphat zu Fruktose-6-Phosphat verantwortlich. Eine

Deletion dieses Gens führt dazu, dass über die Glukoneogenese keine Glukose aus Ethanol gebildet werden kann, so dass Wachstum auf Medium mit Glukose und Ethanol nur stattfinden kann, wenn ein aktiver Glukosetransporter exprimiert wird. Der Stamm kann dann mit Ethanol als Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen und es reichen geringe Glukoseaufnahmeraten zur Komplementation der Glukoseauxotrophie aus.

Über Rekombination sollten sich die chromosomalen, Transposons enthaltenden DNA-Fragmente der Genbank in die homologen Bereiche des Hefegenoms integrieren, was in Ersetzen der genomischen Kopie durch die mutagenisierte Version resultierte (Burns *et al.*, 1994). Die Transformanten wurden durch Ausplattieren auf synthetischem Medium mit 1% Maltose ohne Uracil und Leucin selektiert. Durch Replikaplattieren der Transformanten auf das gleiche Basismedium mit 2% Glukose und 2% Ethanol wurde nach Klonen gesucht, die wieder auf glukosehaltigem Medium wachsen konnten. In diesen Fällen wären die Fragmente der Transposongenbank in Gensequenzen des Hefegenoms integriert worden, deren Deletion zu einem aktiven, Glukose-transportierenden GLUT1 Protein führten.

Nach Replikaplattierung wurden 18 Kolonien erneut auf glukose-/ethanolhaltigem Medium ausgestrichen um das Wachstum zu überprüfen. Nur fünf Kolonien zeigten weiterhin deutliches Wachstum. Bevor die durch die Transposongenbanksequenzen ausgeschalteten Gene näher charakterisiert werden konnten, wurden die fünf Kolonien auf YNB-Medium mit 1% Maltose und 1 mg/ml FOA ausgestrichen, damit die Zellen das GLUT1-exprimierende Plasmid mit *URA3*-Selektionsmarker verloren (Boeke *et al.*, 1984). Nach Verlust des Plasmids wurden die Zellen wiederum mit dem Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 transformiert. Zellen ohne und mit Plasmid wurden zum einen auf glukosehaltiges Vollmedium und zum anderen auf synthetisches Medium ohne Uracil und Leucin mit 2% Glukose und 2% Ethanol ausgestrichen. Es sollte sichergestellt werden, dass Wachstum des mutagenisierten Stammes auf Medium mit Glukose nur auf Vorhandensein des Plasmids YEp4H7-hsGLUT1 zurückzuführen war. Beide Tests verliefen erfolgreich. Zellen ohne Plasmid wuchsen nicht mehr und Zellen mit Plasmid wuchsen wieder auf glukosehaltigem Medium. Zur Charakterisierung der ausgeschalteten Gene wurde jetzt das mit *PvuI* linearisierte Integrationsplasmid YIp5, welches für Hefe (*URA3*-Gen) und *E. coli* (*Amp*-Resistenzgen) selektierbare Gene trägt, in die Zellen der fünf positiven Hefekolonien ohne das Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 transformiert. YIp5 wurde dabei über homologe Rekombination in das *Amp*-Gen des Bakterientransposons integriert. Im Anschluss an die Isolierung der gesamten chromosomalen DNA (2.9.3) wurde diese mit dem

Restriktionsenzym *Nsi*I geschnitten. Dabei wurde auch ein Teil des Gens, in welches sich das Transposon inseriert hatte, mit herausgeschnitten. Durch Zugabe von T4-Ligase wurden die DNA-Fragmente zirkularisiert, in *E. coli* transformiert und die Plasmide wieder aus *E. coli* isoliert. Mittels des Sequenzierprimers M13pUC(-40), der in der Transposonsequenz bindet, wurde die mit herausgeschnittene, genomische DNA aus Hefe ansequenziert.

Die Sequenzierung identifizierte fünf verschiedene Gene, in die sich das Transposon integriert hatte: *HTA1*, *CTR9*, *PAF1*, *SPT16* und ein unbekannter ORF *YKR096w*. *HTA1* kodiert für eins der beiden H2A Histone, das H2A1, das sich mit dem Histon H2B als stabiles Dimer aneinanderlagert. Im Zellkern liegen die Histone zusammen mit der DNA als Chromatin vor (Brandt *et al.*, 1980). Die Genprodukte von *CTR9* und *PAF1* bilden zusammen einen stabilen Komplex und haben eine Funktion bei der Zellzyklus-abhängigen Genexpression in der späten G₁-Phase (Koch *et al.*, 1999). Die Einzeldelation oder Doppelmutation beider Gene führt zur Ausbildung derselben Phänotypen, wie z.B. Temperatursensitivität bei 37°C. Ctr9 und Paf1 sind außerdem Teil eines größeren Komplexes, der mit der RNA-Polymerase II assoziiert ist (Mueller und Jaehning, 2002) und für den eine Funktion bei der Elongation durch die RNA-Polymerase II nachgewiesen werden konnte (Krogan *et al.*, 2002; Rondón *et al.*, 2003). Spt16 fungiert ebenso wie Ctr9 und Paf1 als Elongationsfaktor bei der Transkription. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Spt16 mit Histonen und auch mit dem Ctr9/Paf1-Komplex assoziiert ist (Krogan *et al.*, 2002).

Ein Kontrollversuch sollte nun zeigen, ob die Deletion dieser Gene zu einer funktionellen Expression von GLUT1 führt. Die Deletionen sollten für *HTA1* und *CTR9* durchgeführt werden. Für die Deletion von *PAF1* wird in der Literatur zusätzlich zur Temperatursensitivität noch langsames Wachstum beschrieben (Mueller und Jaehning, 2002) und da Ctr9 und Paf1 dieselbe Funktion in der Hefe erfüllen, fiel die Wahl auf *CTR9*. Bei *SPT16* handelt es sich um ein für die Hefe essentielles Gen (Malone *et al.*, 1991), so dass die Deletion des Gens nicht möglich war.

3.8.1 Deletion von *HTA1* und *CTR9*

Die Deletion der Gene *HTA1* und *CTR9* wurde wie in Abschnitt 2.18 beschrieben mit dem *loxP-kanMX-loxP*/Cre-Rekombinase-System in dem Stamm DVY.03 durchgeführt, der dem Stamm YSYA321 entspricht, nur dass hier das *kanMX*-Modul durch Expression der Cre-Rekombinase aus dem Genom exzidiert wurde (2.18) um weitere Deletionen vornehmen zu können. Die *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette wurde über PCR mit den Oligonukleotidpaaren S1-HTA1/S2-

HTA1 bzw. S1-CTR9/S2-CTR9 amplifiziert und die Überprüfung der Deletionen erfolgte mit den Primerpaaren a1-HTA1/a4-HTA1 sowie a1-CTR9/a4-CTR9 (2.4). Die daraus resultierenden Stämme DVY.03 $\Deltahta1$ (DVY.033) und DVY.03 $\Deltactr9$ (DVY.035) wurden mit den Plasmiden YEp4H7-hsGLUT1 und p426HXT7-6His transformiert. Die Selektion der Transformanten des $\Deltactr9$ -Stammes erfolgte wegen des temperatursensitiven Phänotyps bei 25°C. Zusätzlich wurden auch die Stämme DVY.03 und EBY.S7 (*fgy1-1*) mit dem Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 transformiert. Die transformierten Zellen wurden zur Überprüfung des Wachstums auf synthetischem Medium ohne Uracil mit 2% Glukose und 2% Ethanol ausgestrichen. Transformanten mit Plasmid p426HXT7-6His dienten als negative Kontrolle, der Stamm EBY.S7 mit GLUT1 als positive Kontrolle. GLUT1-exprimierende Transformanten des Stammes DVY.03 sollten zeigen, dass nun stattfindendes Wachstum auf Glukose auf die Deletion von *HTA1* bzw. *CTR9* zurückzuführen ist. Für beide Deletionsstämme $\Deltahta1$ (Abb. 15A) und $\Deltactr9$ (Abb. 15B) konnte Wachstum auf glukosehaltigem Medium beobachtet werden. Verglichen mit dem GLUT1-exprimierenden *fgy1-1*-Mutantenstamm war dieses Wachstum aber deutlich geringer.

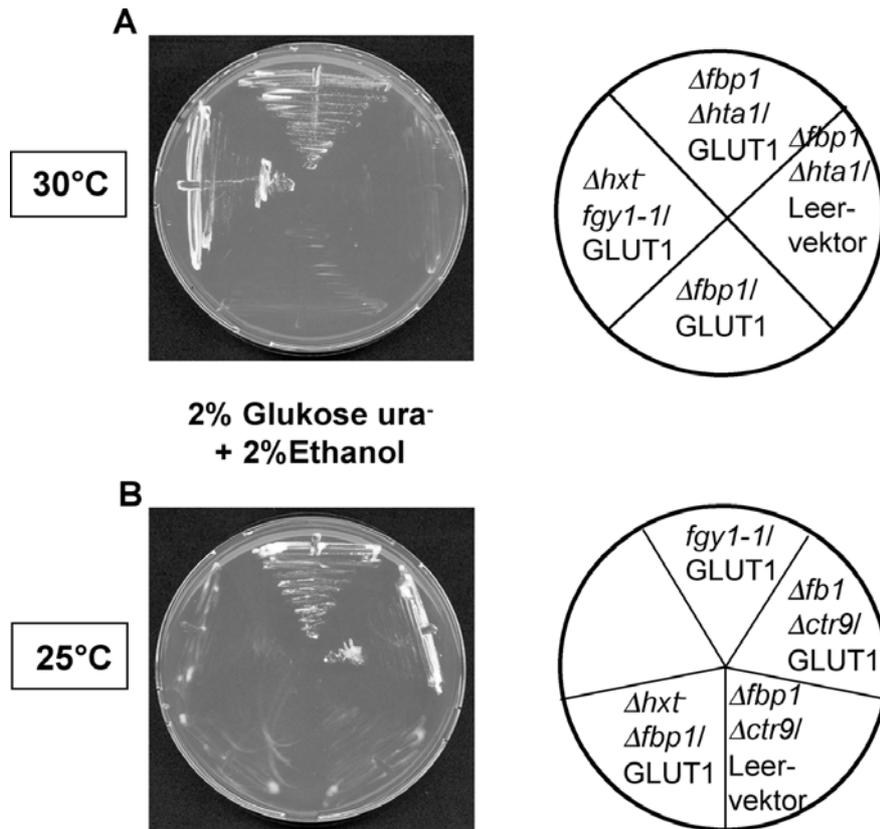


Abb. 15: Wachstumstests der GLUT1-exprimierenden Stämme DVY.033 (*hxt⁻ Δfbp1 Δhta1*) (A) und DVY.035 (*hxt⁻ Δfbp1 Δctr9*) (B). Das Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 wurde in die Stämme DVY.033, DVY.035, DVY.03 (*Δfbp1*) und EBY.S7 (*hxt⁻ fgy1-1*) transformiert. Zusätzlich wurde das Plasmid p426HXT7-6His (Leervektor) auch in die Stämme DVY.033 und DVY.035 transformiert. Transformanten wurden auf synthetisches Medium ohne Uracil mit 2% Glukose und 2% Ethanol ausgestrichen und für 3 Tage bei 30°C (A) bzw. 25°C (B) inkubiert.

Als Histon H2A ist das Genprodukt von *HTA1* im Zellkern lokalisiert. Auch für Ctr9 wurde eine Lokalisierung im Nukleus nachgewiesen (Koch *et al.*, 1999). Beide Proteine sind an der Transkription in Hefe beteiligt. Für Fgy1 konnte eine Lokalisation in der Plasmamembran und in der Endosomenmembran gezeigt werden (3.1). Schon die unterschiedliche Lokalisierung der Proteine macht es schwierig, eine einfache Übertragung auf eine mögliche Funktion von Fgy1 vorzunehmen.

3.9 Vergleich der Expression von GLUT1 in verschiedenen *S. cerevisiae* Stämmen

Bisher konnte noch nicht befriedigend erklärt werden, warum GLUT1 in den Stämmen EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) und DVY.033 (*hxf Δfbp1 Δhta1*) Wachstum auf Glukose ermöglicht, in den *hxf*-Stämmen EBY.VW4000 und EBY.18ga hingegen nicht. Deshalb sollte mit der einfach durchzuführenden Western-Blot-Analyse untersucht werden, ob sich die in der Zelle befindliche Proteinmenge dieser vier Stämme speziell in Bezug auf GLUT1 unterscheidet. Die Hypothese war, dass die Expression von GLUT1 in den beiden Stämmen EBY.S7 und DVY.033 positiv beeinflusst wird.

Das Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 wurde in die vier Stämme EBY.S7 (*hxf fgy1-1*), DVY.033 (*Δhta1*), EBY.VW4000 (*hxf Δmph2 Δmph3*) und EBY.18ga (*hxf*) transformiert. Kulturen dieser GLUT1-exprimierenden Stämme wurden bei gleicher optischer Dichte geerntet und Proteinextrakte hergestellt (2.21). Mittels Bradford-Reagenz wurde eine Bestimmung der Gesamtproteinmenge der Extrakte durchgeführt (2.22.2) und 60 µg Gesamtprotein jedes Extrakts für eine SDS-PAGE und anschließende Western-Blot-Analyse eingesetzt. Um die aufgetragene Menge an Gesamtprotein nachzuweisen wurden die Proteine der aufgetrennten Extrakte im SDS-Polyacrylamidgel mit einer Coomassie-Färbelösung (2.27) angefärbt und die PVDF-Membran nach dem „Blotting“-Vorgang einer PonceauS-Färbung (2.26) unterzogen (Daten nicht gezeigt). Sowohl das gefärbte Gel als auch die angefärbte Membran zeigten, dass die Extrakte der vier Stämme unterschiedlich stark angefärbt wurden. Dies ließ den Schluss zu, dass trotz Proteinbestimmung und Auftragen rechnerisch gleicher Menge an Gesamtprotein die nachgewiesenen Gesamtproteinmengen differierten. Die Western-Blot-Analyse wurde bis zum Ende weitergeführt um zu überprüfen, ob die detektierbare Menge an GLUT1 vom Verhältnis her den durch die Färbungen beobachteten Gesamtproteinmengen entsprach. In Abbildung 16 ist das Ergebnis der Western-Blot-Analyse dargestellt. Das Vorkommen des GLUT1-Proteins in den Extrakten wurde durch Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen GLUT1 analysiert. Zusätzlich wurde auch das Protein Dpm1 über spezifische Antikörper nachgewiesen um die Intensität dieser Banden mit den Banden des GLUT1-Proteins vergleichen zu können.

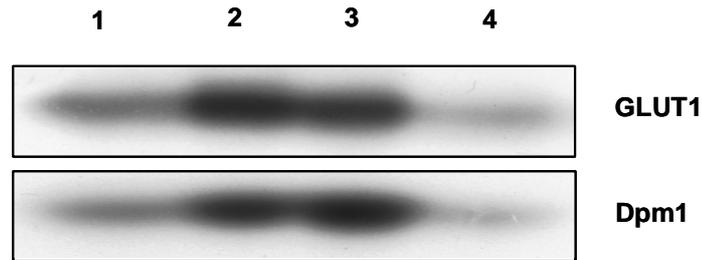


Abb. 16: Nachweis von GLUT1 und Dpm1. Proteinextrakte der GLUT1-exprimierenden Stämme EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) (1), EBY.18ga (*hxf*) (2), EBY.VW4000 (*hxf Δ mph2 Δ mph3*) (3) und DVY.033 (*Δ hta1*) (4) wurden einer Western-Blot-Analyse unterzogen. Zum Nachweis von GLUT1 wurde ein spezifischer, polyklonaler Antikörper verwendet. Dpm1 wurde mit einem spezifischen, monoklonalen Antikörper detektiert.

Es zeigte sich, dass die Intensität der Banden von GLUT1 und Dpm1 im Extrakt desselben Stammes gleich war, was darauf hindeutet, dass die exprimierte Menge der beiden Proteine etwa gleich hoch war. Ein Vergleich der nachgewiesenen Menge an GLUT1 in den Extrakten der einzelnen Stämme mit der Intensität der Färbungen der Gesamtproteinmenge von SDS-Polyacrylamidgel und PVDF-Membran zeigte, dass die Quantität an detektiertem GLUT1 in den vier Stämmen vom Verhältnis her jeweils der beobachteten Gesamtproteinmenge entsprach. Die Stämme EBY.18ga (2) und EBY.VW4000 (3) zeigten nach den Färbvorgängen die höchsten Mengen an Gesamtprotein. Auch die durch Antikörper nachgewiesene Menge an GLUT1 war in diesen zwei Stämmen größer als in den Stämmen EBY.S7 (1) und DVY.033 (4). Im Stamm DVY.033 (*Δ hta1*) wurden die Proteinbanden durch die Färbungen nur sehr schwach sichtbar, dies trifft auch auf die GLUT1-Bande nach Antikörperdetektion zu. Sollte die Aktivität von GLUT1 in den Stämmen EBY.S7 und DVY.033 durch eine erhöhte Expression verursacht werden, wäre hier eine intensivere GLUT1-Bande im Vergleich zur Gesamtproteinmenge und auch zur Intensität der Dpm1-Bande erwartet worden. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass sich die Aktivität von GLUT1 in den Stämmen EBY.S7 und DVY.033 nicht durch eine erhöhte Expression erklären lässt.

3.10 Topologische Untersuchungen zur Struktur von GLUT1

Analysen der Aminosäuresequenz von GLUT1 nach der Methode von Kyte und Doolittle (1982) und auch mit Hilfe des Algorithmus von Eisenberg *et al.* (1984) deuteten darauf hin, dass GLUT1 zwölf transmembrane Helices besitzt (Mueckler *et al.*, 1985; Baldwin, 1993). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die N- und C-

terminale Region, sowie eine große zentrale hydrophile Region (Reste 207-271) im Zytoplasma lokalisiert sind und dass die Region zwischen Transmembrandomäne eins und zwei extrazellulär ist, da dort mit der Aminosäure Asparagin an Position 45 eine N-Glykosylierungsstelle vorliegt (Cairns *et al.*, 1984; Baldwin, 1993).

Die Membrantopologie von GLUT1 wurde weiter untersucht um die Strukturvorhersagen bestätigen zu können. Dazu inserierten Hresko *et al.* (1994) die vollständige erste extrazelluläre Domäne von GLUT4 als Glykosylierungsepitop in jede der vorhergesagten hydrophilen Domänen von GLUT1 außer der ersten, da die extrazelluläre Orientierung dieser Domäne durch die endogene Glykosylierungsstelle bekannt war. Die mutierten Transportproteine wurden *in-vivo* in *Xenopus*-Oozyten exprimiert. Anhand des Glykosylierungszustandes konnten nach EndoH-Behandlung Rückschlüsse auf eine zytoplasmatische oder extrazelluläre Orientierung der einzelnen Domänen gezogen werden. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse für die *in-vivo* Expression bestätigten das vorhergesagte Modell für GLUT1.

Um auszuschließen, dass GLUT1 aufgrund von Topologieveränderungen, die durch Expression des Proteins in Hefe hervorgerufen wurden, nicht funktionell ist, sollte die Transmembranstruktur von GLUT1 in Hefe untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein von Gilstring und Ljungdahl (2000) konstruiertes Reporterkonstrukt verwendet. Dieses topologische Konstrukt besteht aus einem internen Segment von *SUC2*, das drei NXS/T Glykosylierungsstellen enthält und unter Beibehaltung des Leserahmens in die Sequenz eines zu untersuchenden Proteins kloniert werden kann. *SUC2* aus *S. cerevisiae* kodiert für eine sekretierte und intrazellulär verbleibende Invertase (Carlson und Botstein, 1982). Die sekretierte Form der Invertase wird an mehreren Stellen effizient glykosyliert, was die Nutzung von Suc2 als topologisches Reporterkonstrukt interessant macht. Eine Untersuchung der Membrantopologie von Gap1, der generellen Aminosäurepermease aus *S. cerevisiae*, durch Integration der Suc2-Reporterkassette zeigte, dass neun der dreizehn klonierten Hybridproteine zur Plasmamembran gelangten und auch ihre Funktionalität beibehielten (Gilstring und Ljungdahl, 2000). Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass nach Integration des Konstrukts die nativen Eigenschaften eines Proteins erhalten bleiben. Durch Analyse des Glykosylierungszustandes nach EndoH-Behandlung, SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse können dann Aussagen zur Topologie des zu untersuchenden Proteins getroffen werden.

3.10.1 Integration der Suc2-Reporterkassette in hydrophile Bereiche von GLUT1

Das Suc2-Reporterkonstrukt sollte jeweils unabhängig in die ersten vier hydrophilen Bereiche nach dem NH₂-Terminus von GLUT1 integriert werden. Die Integration sollte über Ligation in die Sequenz von GLUT1 erfolgen (Gilstring und Ljungdahl, 2000). Deshalb musste in einem ersten Schritt eine *Bam*HI-Schnittstelle „GGATCC“ über homologe Rekombination (2.17.2) unter Einhaltung des Leserahmens in GLUT1 kloniert werden, über die GLUT1 an der gewünschten Integrationsstelle des *SUC2*-Reporterkonstrukts linearisiert werden konnte. In Abbildung 17 sind die Positionen in GLUT1 innerhalb der Aminosäuresequenz dargestellt, in die die Glykosylierungssequenzen aus Suc2 integriert werden sollten.

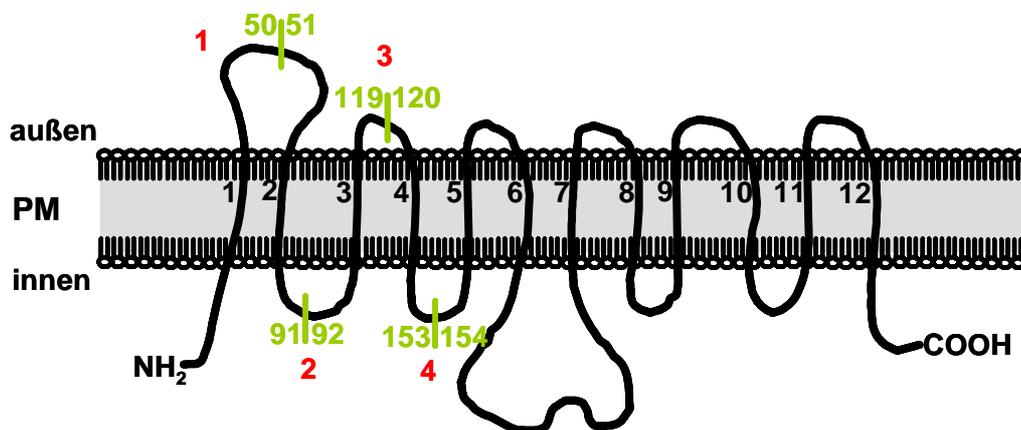


Abb. 17: Darstellung der Insertionsstellen des *Suc2*-Reporterkonstrukts in GLUT1. Dieses sollte in die ersten vier hydrophilen Bereiche (1-4) zwischen Positionen 50/51, 91/92, 119/120 und 153/154 der Aminosäuresequenz integriert werden.

Im ersten hydrophilen Bereich wurde die *Bam*HI-Schnittstelle zwischen Position 150 und 151 (AS 50/51) der DNA-Sequenz von GLUT1 integriert. Bei der Wahl der Insertionsstellen in den hydrophilen Bereichen zwei bis vier fiel die Entscheidung auf die von Hresko *et al.* (1994) verwendeten Positionen zur Integration der ersten extrazellulären Domäne von GLUT4 als Glykosylierungsepitop in GLUT1. Sie konnten über eine Untersuchung der Glukose-Aufnahmeaktivität von GLUT1 nachweisen, dass GLUT1 nach Integration des Glykosylierungsepitops in allen drei Fällen noch aktiv war. Die Positionen der *Bam*HI-Insertionen sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Nach erfolgreicher Integration der *Bam*HI-Schnittstelle wurden die Plasmide YEp4H7-hsGLUT1^{*Bam*HI-150}, YEp4H7-hsGLUT1^{*Bam*HI-273}, YEp4H7-hsGLUT1^{*Bam*HI-357} und YEp4H7-hsGLUT1^{*Bam*HI-459} in den Stamm EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) transformiert

und GLUT1^{BamHI} auf seine Funktionalität durch Ausstreichen auf synthetischem, 2%igem Glukosemedium ohne Uracil überprüft. Der Wachstumstest ergab, dass GLUT1 mit integrierter *Bam*HI-Schnittstelle an Basenpositionen 150 (AS 50/51), 273 (AS 91/92) oder 357 (AS 119/120) der DNA-Sequenz weiterhin in der Lage war Glukoseaufnahme zu ermöglichen, aber die Klonierung der Schnittstelle an Position 459 (AS 153/154) in einem inaktiven GLUT1 Transporterprotein resultierte (Tab 13).

Tab. 13: Überprüfung der Aktivität von GLUT1 nach Integration der *Bam*HI-Schnittstelle.

Transformanten des Stammes EBY.S7 mit Plasmiden YEp4H7-hsGLUT1^{BamHI-150}, YEp4H7-hsGLUT1^{BamHI-273}, YEp4H7-hsGLUT1^{BamHI-357} und YEp4H7-hsGLUT1^{BamHI-459} wurden auf synthetischem, 2%igem Glukosemedium ohne Uracil für drei Tage bei 30°C inkubiert. Gutes Wachstum (+), kein Wachstum (-)

Stamm	Plasmid	Position der <i>Bam</i> HI-Insertion	Wachstum
EBY.S7	YEp4H7-hsGLUT1 ^{BamHI-150}	150	+
	YEp4H7-hsGLUT1 ^{BamHI-273}	273	+
	YEp4H7-hsGLUT1 ^{BamHI-357}	357	+
	YEp4H7-hsGLUT1 ^{BamHI-459}	459	-

In einem zweiten Schritt sollte nun die Sequenz des Suc2-Reporterkonstrukts in die Plasmide hineinligiert werden. Der Ligationsschritt wurde mit den drei Plasmiden YEp4H7-hsGLUT1^{BamHI-150}, YEp4H7-hsGLUT1^{BamHI-273} und YEp4H7-hsGLUT1^{BamHI-357} durchgeführt, die ein aktives GLUT1 exprimierten. Die drei Plasmide wurden mit dem Enzym *Bam*HI linearisiert und über Agarosegelextraktion (2.14) aufgereinigt. Die Reporter-kassette lag auf dem Plasmid pFG112 (Gilstring und Ljungdahl, 2000) mit *Bam*HI-Schnittstellen am 5'- und 3'-Ende vor. Durch Restriktion (2.13) mit dem Enzym *Bam*HI und anschließender Agarosegelextraktion wurde das *SUC2*-Reporterkonstrukt erhalten. Dieses wurde in die linearisierten Plasmide ligiert (2.10.3) und die Ligationsansätze in *E.coli* transformiert. Nach Präparation der Plasmide aus *E. coli* wurden diese über erneute Restriktion mit *Bam*HI und PCR auf Vorhandensein der *SUC2*-Kassette überprüft. Die PCR wurde mit dem Oligonukleotidpaar fSUC/Glykz durchgeführt und ergab nur bei richtiger Orientierung des *SUC2*-Reporterkonstrukts von 5' zu 3' ein Produkt von ca. 160 bp. Aus beiden

Überprüfungen wurden jeweils zwei Plasmide mit korrekter Integration der *SUC2*-Kassette erhalten (Tab. 14).

Tab. 14: Plasmide nach Integration des *SUC2*-Reporterkonstrukts über Ligation. Aufgelistet sind der Plasmidname, die Basenposition in der Sequenz von GLUT1, an der die Integration der *SUC2*-Kassette erfolgte und der hydrophile Bereich im GLUT1-Protein, in dem die Insertion stattfand.

Plasmid	Integration an Basenposition	hydrophiler Bereich
YEp4H7-hsGLUT1 ^{SUC2-151-1}	151	1
YEp4H7-hsGLUT1 ^{SUC2-151-2}		
YEp4H7-hsGLUT1 ^{SUC2-274-1}	274	2
YEp4H7-hsGLUT1 ^{SUC2-274-2}		
YEp4H7-hsGLUT1 ^{SUC2-358-1}	358	3
YEp4H7-hsGLUT1 ^{SUC2-358-2}		

Diese Plasmide wurden wiederum einem Funktionalitätstest unterzogen, indem sie in den Stamm EBY.S7 (*hxt fgy1-1*) transformiert wurden. Zusätzlich wurden auch die Plasmide YEp4H7-hsGLUT1 und p426HXT7-6His als positive und negative Kontrolle mittransformiert. Transformanten wurden zum Test auf Wachstum auf synthetischem Medium mit 2% Glukose ohne Uracil ausgestrichen. Nach 4-tägiger Inkubation bei 30°C wuchsen nur die Zellen, die natives GLUT1 exprimierten. Transformanten der sechs Plasmide mit integrierter *Suc2*-Kassette in GLUT1 zeigten kein Wachstum auf Glukosemedium (Abb. 18).

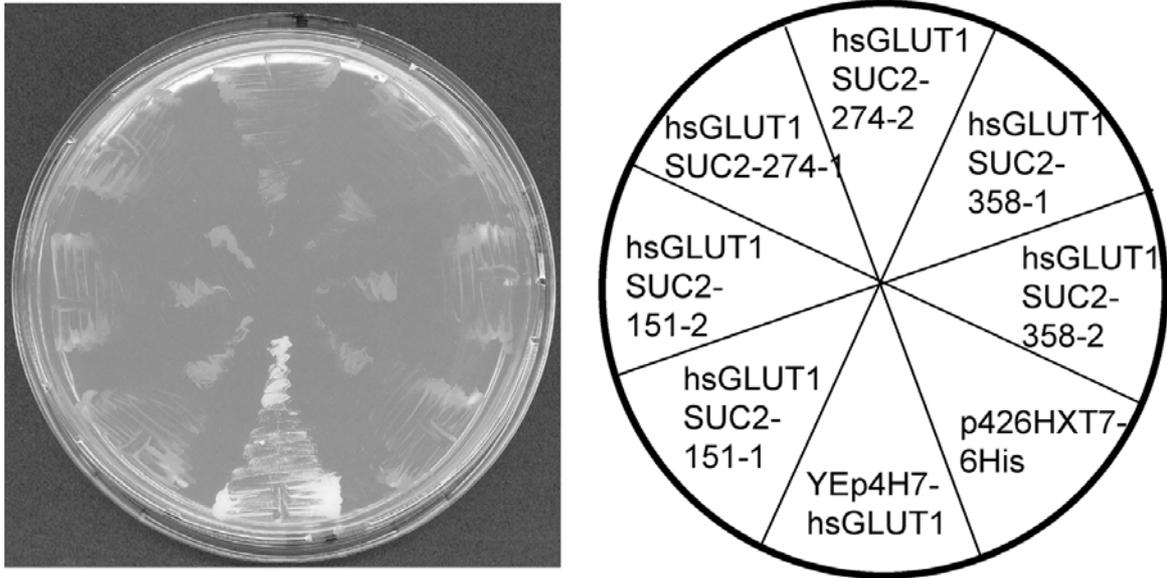
2% Glukose ura⁻

Abb. 18: Wachstumstest zur Überprüfung der Funktionalität von GLUT1-Suc2. Die Plasmide YEp4H7-hsGLUT1^{SUC2-151-1}, YEp4H7-hsGLUT1^{SUC2-151-2}, YEp4H7-hsGLUT1^{SUC2-274-1}, YEp4H7-hsGLUT1^{SUC2-274-2}, YEp4H7-hsGLUT1^{SUC2-358-1}, YEp4H7-hsGLUT1^{SUC2-358-2}, YEp4H7-hsGLUT1 und p426HXT7-6His wurden in den Stamm EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) transformiert. Wachstum wurde auf synthetischem, 2%igem Glukosemedium ohne Uracil getestet.

Da kein Wachstum beobachtet werden konnte, wurden die Plasmide sequenziert um auszuschließen, dass eine durch die Konstruktion der Plasmide entstandene Mutation eine Expression der GLUT1 Hybridproteine verhinderte. Die Sequenzierung ergab für die *SUC2*-Reporter-kassette eine Größe von 144 bp ohne Mutation (Abb. 19). Die drei Glykosylierungsstellen waren vorhanden und auch der Leserahmen in GLUT1 wurde nicht unterbrochen.

DNA	GGA	TCC	CAA	CCC	ATT	GCT	ATC	GCT	CCC	AAG	CGT
AS	n	s	q	p	i	a	i	a	p	k	r
DNA	AAC	GAT	TCA	GGT	GCT	TTC	TCT	GGC	TCC	ATG	GTG
AS	n	d	s	g	a	f	s	g	s	m	v
DNA	GTT	GAT	TAC	AAC	AAC	ACG	AGT	GGG	TTT	TTC	AAT
AS	v	d	y	n	n	t	s	g	f	f	n
DNA	GAT	ACT	ATT	GAT	CCA	AGA	CAA	AGA	TGC	GTT	GCG
AS	d	t	i	d	p	r	q	r	c	v	a
DNA	ACT	TAT	GGA	TCC							
AS	t	y	g	s							

Abb. 19: Sequenz des *SUC2*-Reporterkonstrukts mit *Bam*HI-Schnittstelle jeweils am 5'- und 3'-Ende. Dargestellt wird die DNA-Sequenz (DNA, obere Zeile) und die daraus resultierende Aminosäuresequenz (AS, untere Zeile). Die *Bam*HI-Schnittstellen sind in rot, die drei Glykosylierungsstellen in blau gekennzeichnet.

Die Sequenz der GLUT1-Suc2 Hybridproteine ergab keine Hinweise, welche die fehlende Aktivität der Proteine auf Glukosemedium erklären könnten. Deshalb wurde die Untersuchung der Membranstruktur von GLUT1 fortgesetzt.

3.10.2 Analyse des Glykosylierungszustandes der GLUT1-Suc2 Proteine durch Western-Blot-Analyse

Die Topologie von GLUT1 sollte in zwei *S. cerevisiae* Stämmen miteinander verglichen werden. Es stellte sich die Frage, ob sich die Topologie von GLUT1 im *hxf*-Stamm, der mit GLUT1 weiterhin nicht auf Glukose wächst, von der im *hxf*-Stamm mit der *fgy1-1*-Mutation, für den die Expression eines aktiven GLUT1 nachgewiesen worden war (Wieczorke *et al.*, 2003), unterschied. Aus diesem Grund wurden die sechs GLUT1-*SUC2* exprimierenden Plasmide (Tab. 14) und YEp4H7-hsGLUT1 und p426HXT7-6His als positive und negative Kontrolle in die Stämme EBY.VW4000 (*hxf*) und EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) transformiert. Transformanten wurden in synthetischem Medium mit 1% Maltose ohne Uracil bis zur logarithmischen Phase herangezogen und Proteinextrakte dieser Kulturen hergestellt (2.21). Es wurden Aliquots der Extrakte genommen und mit dem Enzym EndoH inkubiert (2.23). Die behandelten Aliquots wurden neben einem unbehandelten Aliquot (2.23) desselben Proteinextrakts einer SDS-Gelelektrophorese und anschließenden Western-Blot-Analyse unterzogen.

Mit dem Western-Blot konnte nur im Falle der Expression von WT-GLUT1 dieses mit dem anti-GLUT1 Antikörper (2.7, 2.30) nachgewiesen werden. Weder die mit EndoH behandelten, noch die unbehandelten Aliquots der GLUT1-Suc2

Proteinextrakte zeigten ein Signal im Blot. Um zu überprüfen, ob die GLUT1-*SUC2* Gene generell exprimiert wurden, wurden mit Aliquots der puren Extrakte eine weitere SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse durchgeführt. Auch hier konnte sowohl im *hxt*-, als auch im *hxt fgy1-1*-Stamm nur natives GLUT1 nachgewiesen werden (Abb. 20).

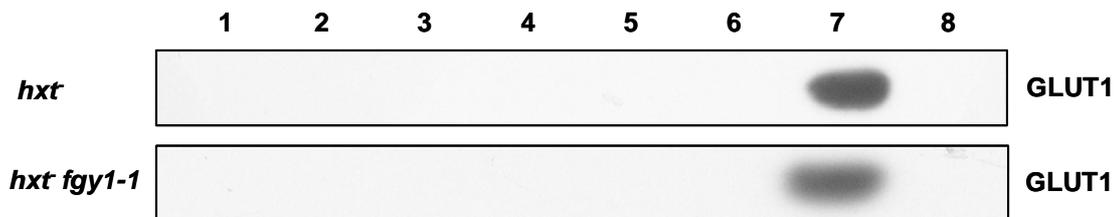


Abb. 20: Nachweis der GLUT1-Suc2 Hybridproteine. Von den Stämmen EBY.VW4000 (*hxt*) und EBY.S7 (*hxt fgy1-1*) mit den Plasmiden YEp4H7-hsGLUT1^{SUC2-151-1} (1), YEp4H7-hsGLUT1^{SUC2-151-2} (2), YEp4H7-hsGLUT1^{SUC2-274-1} (3), YEp4H7-hsGLUT1^{SUC2-274-2} (4), YEp4H7-hsGLUT1^{SUC2-358-1} (5), YEp4H7-hsGLUT1^{SUC2-358-2} (6), YEp4H7-hsGLUT1 (7) bzw. p426HXT7-6His (8) wurden Proteinextrakte hergestellt. Es wurde ein spezifischer, polyklonaler Antikörper gegen GLUT1 zum Nachweis der GLUT1-Suc2 Hybridproteine und von nativem GLUT1 eingesetzt.

Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die GLUT1-Suc2 Hybridproteine aufgrund des integrierten Suc2-Reporterkonstrukts nicht exprimiert oder rasch abgebaut werden; dies würde auch das nicht-stattfindende Wachstum von Transformanten mit diesen Konstrukten auf glukosehaltigem Medium erklären.

3.11 Lokalisierung von GLUT1 mittels TNP-Präzipitation

Trinitrobenzol-Sulfonsäure (TNBS) kann Zellmembranen nicht durchdringen (Gordesky und Marinetti, 1973; Litman, 1974) und reagiert somit nur mit extrazellulär zugänglichen Domänen von Proteinen intakter Zellen. TNBS reagiert spezifisch mit freien Aminogruppen, an die sodann eine Trinitrophenol(TNP)-Gruppe kovalent gebunden wird (Okuyama und Satake, 1960; Satake *et al.*, 1960) (Abb. 21). Mittels Antikörpern, die gegen TNP gerichtet sind, können diese modifizierten Proteine spezifisch angereichert und über Western-Blot-Analyse detektiert werden (Novick und Scheckman, 1983).

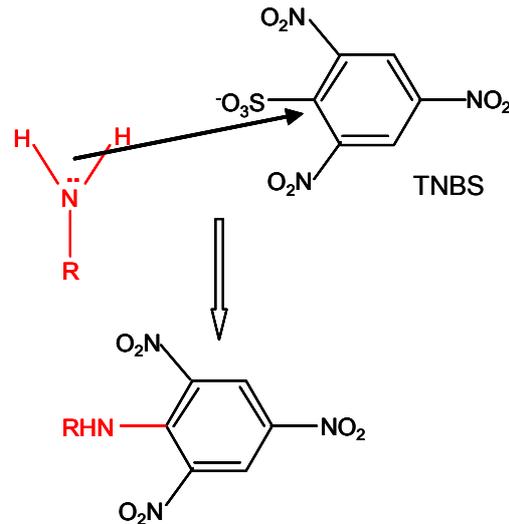


Abb. 21: Darstellung der Reaktion von Trinitrobenzol-Sulfonsäure (TNBS) mit freien Aminogruppen.

Vorherige Lokalisierungsexperimente mittels Saccharosedichtegradienten hatten gezeigt, dass GLUT1 in den Stämmen EBY.S7 (*hxf fgy1-1*), EBY.18ga (*hxf*), RWY95-1A (Δ *fgy1*) und RWY95-1D (*FGY1*) an der Plasmamembran lokalisiert ist (Wieczorke *et al.*, 2003; Abschnitt 3.3.1.2). Die Methode der TNP-Präzipitation sollte nun Aufschluss über die Integration von GLUT1 in die Plasmamembran geben. Der Versuch wurde in den Stämmen EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) und EBY.18ga (*hxf*) durchgeführt.

In einem ersten Schritt wurde das Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 in die zwei Stämme transformiert und von Kulturen der GLUT1-exprimierenden Stämme TNP-modifizierte Proteinextrakte aus der Plasmamembran hergestellt (2.34.1). Die TNP-modifizierten Plasmamembran-Proteine wurden durch Zugabe von anti-TNP Antikörpern (2.7, 2.30) einer Immunpräzipitation unterzogen (2.34.2). Die Immobilisierung der Antikörper-Protein-Komplexe erfolgte durch Zugabe von Protein A-Sepharose. Die dadurch gebundenen Antikörper-Protein-Komplexe wurden durch Zugabe von 2x-Probenpuffer eluiert und das Eluat anschließend durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit von GLUT1-Proteinen überprüft. Zusätzlich wurden auch Antikörper gegen die Plasmamembran ATPase Pma1 eingesetzt um nachzuweisen, dass in beiden untersuchten Stämmen Plasmamembran-Proteinextrakte erhalten wurden.

In den beiden Stämmen EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) und EBY.18ga (*hxf*) konnte GLUT1 nur im *fgy1-1*-Stamm nachgewiesen werden (Abb. 22). Der Kontrollnachweis mit Pma1-Antikörpern zeigte jedoch, dass in den Extrakten beider Stämme Plasmamembranproteine vorhanden waren.

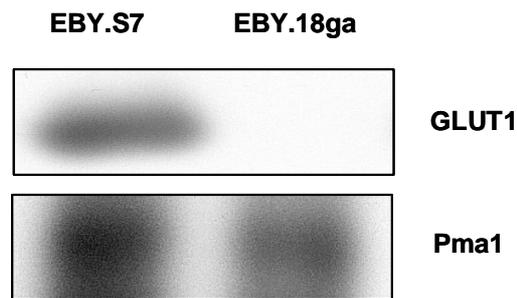


Abb. 22: Western-Blot-Analyse nach TNP-Präzipitation. TNP-präzipitierte Proteinextrakte der GLUT1-exprimierenden Stämme EBY.S7 (*hxf fgy1-1*), EBY.18ga (*hxf*) wurden auf die Anwesenheit von GLUT1 und Pma1 untersucht. Es wurden spezifische, polyklonale Antikörper gegen GLUT1 und Pma1 verwendet.

Dass GLUT1 im *hxf*-Stamm über TNP-Präzipitation nicht in der Plasmamembran detektiert werden konnte und dieser Stamm mit GLUT1 nicht auf glukosehaltigem Medium wachsen kann, deutet darauf hin, dass das GLUT1 Transporterprotein in diesem Stamm nicht in die Plasmamembran integriert wird. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass GLUT1 zwar in der Plasmamembran vorliegt, aber nicht korrekt in die Membran inseriert wird, so dass eine Modifizierung von außerhalb nicht erfolgen kann. Die für diese zwei Stämme erhaltenen Ergebnisse können durch ein früheres Experiment bestätigt werden. In diesem wurde die Lokalisierung von GLUT1 über Immunfluoreszenz-Mikroskopie überprüft (Voss, 2001). GLUT1 konnte in nicht-permeabilisierten Zellen nur im *fgy1-1*-Stamm EBY.S7 mit fluoreszierenden Antikörpern in der Plasmamembran nachgewiesen werden, nicht jedoch im *hxf*-Stamm EBY.18ga.

3.12 Test auf Funktionalität von GLUT1

Im vorherigen Abschnitt 3.11 wurde durch TNP-Präzipitation gezeigt, dass GLUT1 in einem hexosetransport-defizienten Hefestamm nicht in die Plasmamembran integriert wird, so dass eine Aufnahme von Glukose über dieses Transportprotein nicht möglich ist. Saccharosedichtegradientenzentrifugation und Fluoreszenzmikroskopie mittels GFP-Fusion hatten jedoch auch das Ergebnis gebracht, dass das Protein sich auch in dem *hxf*-Stamm an der Plasmamembran befindet (3.3.1). Es wäre also wichtig herauszufinden, ob eine mögliche Mislokalisierung des Proteins den einzigen Grund darstellt, weshalb kein Wachstum auf glukosehaltigem Medium stattfindet und das Protein an sich funktionell in den Zellen eines *hxf*-Stammes vorliegt.

Kasahara und Kasahara (1996) hatten durch Immunfluoreszenzmikroskopie das GLUT1 Protein in intrazellulären Strukturen lokalisiert. Nach Rekonstitution dieses in Hefe heterolog exprimierten Proteins in Liposomen und Durchführung von Messungen der Glukoseaufnahme konnten sie jedoch nachweisen, dass die spezifische Aktivität des in Hefe exprimierten GLUT1 mit der des GLUT1 aus Erythrozyten vergleichbar ist. Dies ließ den Schluss zu, dass trotz Mislokalisierung des Proteins in ihrem Stamm GLUT1 funktionell in den Hefezellen exprimiert wurde.

Die Funktionalität des GLUT1 Transporterproteins sollte nun in dem *hxf*-Stamm EBY.VW4000 überprüft werden. Dieser Versuch wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Cesare Indiveri an der Universität von Kalabrien durchgeführt. GLUT1 sollte aus den beiden Stämmen EBY.VW4000 (*hxf*) und EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) isoliert, in Liposomen rekonstituiert und dann Glukoseaufnahmemessungen durchgeführt werden. Dazu wurden das Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 und auch der Leervektor p426HXT7-6His in die zwei Stämme transformiert. Der GLUT1-exprimierende Stamm EBY.S7 sollte als positive Kontrolle bei der Aufnahmemessung dienen. Der Leervektor stellte in beiden Stämmen die negative Kontrolle dar. Transformanten wurden in Flüssigkultur in synthetischem Medium mit 1% Maltose ohne Uracil bis zu einer OD₆₀₀ von 2 herangezogen, die Zellen abzentrifugiert, gewaschen und die gefrorenen, transformierten Zellen dann nach Italien geschickt, wo der Versuch zu Ende geführt wurde. Nach Rekonstitution in Liposomen brachte die Messung der Aufnahme von Glukose über GLUT1 das Ergebnis, dass GLUT1 auch im *hxf*-Stamm EBY.VW4000 aktiv exprimiert wird. Die gemessene Glukosetransportrate ist in beiden GLUT1-exprimierenden Stämmen EBY.VW4000 und EBY.S7 vergleichbar (Abb. 23).

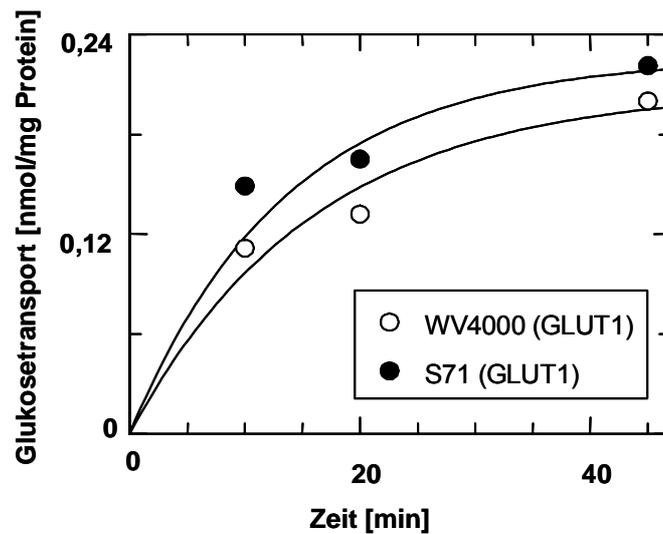


Abb. 23: Gegenüberstellung der Glukosetransportraten in den Stämmen EBY.VW4000 (*hxf*) und EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) mit GLUT1-exprimierendem Plasmid. Das Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 wurde in die Stämme EBY.VW4000 (*hxf*) und EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) transformiert. Das Protein wurde aus den Stämmen isoliert, in Liposomen rekonstituiert und Glukoseaufnahmemessungen durchgeführt. Die Glukoseaufnahmerate ist in nmol/mg Protein dargestellt. (Die Abbildung wurde von Cesare Indiveri zur Verfügung gestellt.)

Dieser Versuch hat gezeigt, dass GLUT1 im *hxf*-Stamm EBY.VW4000 aktiv vorliegt und so deutet vieles darauf hin, dass der Grund für das fehlende Wachstum dieses Stammes in einer Mislokalisierung von GLUT1 zu finden ist.

3.13 *In-vitro* Mutagenese in GLUT4

Der in Hefe heterolog exprimierte Glukosetransporter GLUT4 war wie GLUT1 nicht in der Lage, Glukoseaufnahme in einem hexosetransport-defizienten Hefestamm zu ermöglichen (Wieczorke *et al.*, 2003). Über Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde nachgewiesen, dass das Glukosetransporterprotein GLUT4 in intrazellulären Kompartimenten der Zelle verbleibt und nicht zur Plasmamembran transportiert wird (Kasahara und Kasahara, 1997). Zu demselben Ergebnis gelangten Wieczorke *et al.* (2003) durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchung einer C-terminalen Fusion von GFP an GLUT4. Fraktionierung mittels Saccharose-dichtegradientenzentrifugation und anschließender Western-Blot-Analyse zeigte ebenfalls die intrazelluläre Lokalisierung. Ein Vergleich der Lokalisierung von GLUT4 mit der des Markerproteins Dpm1 ließ den Schluss zu, dass GLUT4 im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten wird (Dlugai, 2002).

Um GLUT4 in Hefezellen aktiv in der Plasmamembran zu exprimieren ist neben der *fgy1-1*-Mutation, noch eine weitere Mutation im Genom der Hefe erforderlich (Wieczorke *et al.*, 2003). Mit Hilfe einer Transposongenbank wurde herausgefunden, dass es sich bei dieser Mutation um eine Deletion des *ERG4*-Gens handelt (Dlugai, 2002). *ERG4* kodiert für eine Sterol-C-24(28)-Reduktase, welche den letzten Schritt der Ergosterolbiosynthese katalysiert (Zweytick *et al.*, 2000). Erst die zusätzliche Deletion von *ERG4* im *fgy1-1* Mutantenstamm EBY.S7 führte zur Expression eines funktionellen GLUT4-Proteins in der Plasmamembran.

Auf der Suche nach GLUT1 aktivierenden Mutationen in *S. cerevisiae* wurden auch Plasmide isoliert, die durch eine Mutation in der Sequenz von GLUT1 selbst ein funktionelles GLUT1 Transporterprotein in Hefe exprimierten (Wieczorke *et al.*, 2003). Transformation dieser Plasmide in den glukosetransport-defizienten Stamm EBY.18ga ermöglichte Wachstum der Transformanten auf synthetischem Kompletmedium mit 10 mM Glukose als einziger Kohlenstoffquelle ohne zusätzliche Mutation in *FGY1*. Sequenzierung dieser GLUT1 Sequenzen ergab, dass es sich bei den Mutationen jeweils um den Austausch einer einzelnen Base handelte, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz zur Folge hatte. Die Aminosäure-Austausche waren alle in der ersten Hälfte der zweiten vorhergesagten Transmembrandomäne lokalisiert. Eine dieser Mutationen führte z.B. zum Austausch der Base Guanin₂₀₅ durch Adenin, wodurch die Aminosäure Valin an Position 69 durch Methionin ersetzt wurde (GLUT1^{V69→M}).

Durch Einführen einer Mutation mittels *in-vitro* Mutagenese in GLUT4, die der von GLUT1^{V69→M} entsprach, sollte untersucht werden, ob mutagenisiertes GLUT4 auch schon in dem *hxf erg4*-Stamm SDY.025 ohne die Mutation in *FGY1* Glukoseaufnahme ermöglichen kann.

3.13.1 Klonierung eines Plasmids mit *in-vitro* Mutagenese in GLUT4

Der Aminosäureaustausch durch *in-vitro* Mutagenese in der Basenabfolge von GLUT4 sollte genau an der Position der Aminosäuresequenz in der zweiten Transmembrandomäne vorgenommen werden, an der auch der Aminosäureaustausch von Valin₆₉ zu Methionin in GLUT1 erfolgt war. Dazu war ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 erforderlich (Abb. 24).

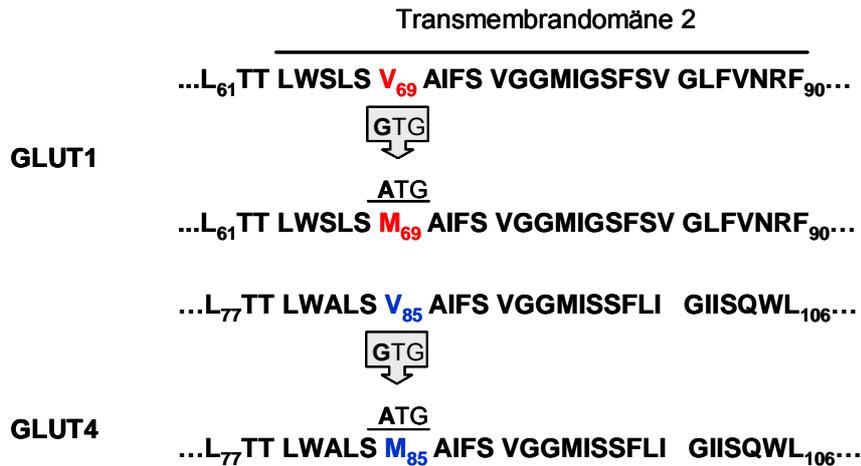


Abb. 24: Vergleich der Aminosäuresequenz von GLUT1 und GLUT4. Dargestellt ist die Aminosäuresequenz in Transmembrandomäne zwei der beiden Proteine. In rot ist die Aminosäure Valin an Position 69 in GLUT1 und der Austausch zu Methionin markiert, in blau die Aminosäure Valin an Position 85 in GLUT4, die der Position in der zweiten Transmembrandomäne von GLUT1 entspricht, und ebenfalls der Austausch zu Methionin.

Der Vergleich zeigte, dass in GLUT4 das Ersetzen der Base Guanin an Position 253 der DNA-Sequenz durch Adenin zu dem gewünschten Austausch in der Aminosäuresequenz von Valin₈₅ zu Methionin führte.

Ein über PCR mutagenisiertes GLUT4 sollte mittels homologer Rekombination (2.17) in das mit *EcoRI/BamHI* linearisierte Plasmid p426HXT7-6His kloniert werden. Es wurden zwei Oligonukleotide G4VM-1 und G4VM-2 (Tab. 7) konstruiert. G4VM-1 entspricht mit einer Länge von 36 bp der Sequenz von GLUT4 von Position 236 bis 271. Hier wurde Guanin an Position 18 des Oligonukleotids durch Adenin ersetzt. Das Oligonukleotid G4VM-2 enthält die komplementäre Sequenz von G4VM-1. Es wurden zwei PCR-Reaktionen angesetzt mit dem Plasmid pGEMaZhsGLUT4 als DNA-Vorlage der GLUT4-Sequenz. Für die eine PCR wurde das Oligonukleotidtrio hsG4-F7/T71-ORFs/G4VM2 und für die andere das Primerpaar G4VM-1/T2-hsG4 (2.4) genutzt. Die beiden erhaltenen PCR-Produkte enthielten in ihrer Sequenz den Basenaustausch von Guanin zu Adenin und gleichzeitig auch homologe Bereiche zum Plasmid p426HXT7-6His für die Rekombination in Hefe zu einem Plasmid mit mutagenisiertem GLUT4^{V85→M}. Die PCR-Produkte wurden zusammen mit dem linearisierten Plasmid p426HXT7-6His in den Hefestamm SDY.025 (*hxf erg4*) transformiert und Transformanten auf synthetischem Medium mit 1% Maltose ohne Uracil selektiert. Transformanten wurden direkt auf ihr Wachstum auf demselben Medium mit Glukose anstatt der Maltose getestet. Aus Kolonien, die in

der Lage waren auf Glukosemedium zu wachsen, wurde das über Rekombination gebildete Plasmid p426H7GLUT4^{V85→M} isoliert und in *E. coli* amplifiziert. Nach erneuter Plasmidisolierung wurde es über Restriktion überprüft und außerdem durch Sequenzierung (2.15) die erfolgreiche *in-vitro* Mutagenese verifiziert.

3.13.2 Überprüfung der Funktionalität von GLUT4^{V85→M}

Die Funktionalität von GLUT4^{V85→M} wurde eingehender untersucht. Dazu wurden die Plasmide p426H7GLUT4^{V85→M}, YEp4H7-hsGLUT4 und p426HXT7-6His in die Stämme SDY.025 (*hxf erg4*), SDY.022 (*hxf fgy1-1 erg4*) und EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) transformiert und Wachstum auf synthetischem Medium ohne Uracil mit 0,1% Glukose überprüft.

Tab. 15: Darstellung der Ergebnisse des Wachstumstests. Transformanten der drei Stämme SDY.025 (*hxf erg4*), SDY.022 (*hxf fgy1-1 erg4*) und EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) wurden auf synthetischem Medium mit 0,1% Glukose ohne Uracil ausgestrichen. Die Zellen wurden für drei Tage bei 30°C inkubiert. (++) sehr gutes Wachstum, (+) gutes Wachstum, (-) kein Wachstum

Stamm	Genotyp	Plasmid	Wachstum +/-
SDY.025	<i>hxf erg4</i>	p426H7GLUT4 ^{V85→M}	+
		YEp4H7-hsGLUT4	-
		p426HXT7-6His	-
SDY.022	<i>hxf fgy1-1 erg4</i>	p426H7GLUT4 ^{V85→M}	++
		YEp4H7-hsGLUT4	++
		p426HXT7-6His	-
EBY.S7	<i>hxf fgy1-1</i>	p426H7GLUT4 ^{V85→M}	+
		YEp4H7-hsGLUT4	+
		p426HXT7-6His	-

Die Wachstumstests zeigten, dass im Stamm SDY.025 Wachstum durch GLUT4^{V85→M} ermöglicht wird. Die *erg4*-Deletion des Stammes und die zusätzlich eingeführte *in-vitro* Mutagenese in GLUT4 führen auch schon ohne die *fgy1-1* Mutation zu Wachstum auf glukosehaltigem Medium. Dagegen waren mit nativem GLUT4 transformierte Zellen nicht in der Lage auf glukosehaltigem Medium zu wachsen. Erwartungsgemäß ließ sich im Stamm SDY.022 sowohl mit nativem als auch mit mutiertem GLUT4-Protein Wachstum beobachten. Sowohl GLUT4 als auch GLUT4^{V85→M} ermöglichten im Stamm EBY.S7 Wachstum auf glukosehaltigem Medium (Tab. 15). Dieses Ergebnis haben auch schon Wieczorke *et al.* (2003) beschrieben, die es so erklärten, dass die starke

Überexpression von GLUT4 durch den *HXT7*-Promotor in dem *fgy1-1*-Stamm schon ausreicht, einen Teil von GLUT4 funktionell in der Plasmamembran zu exprimieren.

3.14 Untersuchung des Einflusses einer *erg6*-Deletion auf die Aktivität von GLUT1 und GLUT4

Der Einfluss von Deletionen im Ergosterolbiosyntheseweg auf die funktionelle Expression von GLUT-Transporterproteinen wurde bereits in einer früheren Arbeit untersucht (Dlugai, 2002). Nachdem die Deletion von *ERG4* im *fgy1-1* mutanten Stamm dazu geführt hatte, dass das GLUT4 Protein funktionell in der Plasmamembran exprimiert worden war, war untersucht worden, ob die Deletion weiterer Gene von an der Ergosterolbiosynthese beteiligten Proteinen einen Effekt ausübt. Die Untersuchungen wurden parallel mit GLUT1 bzw. GLUT4 exprimierenden Zellen eines $\Delta erg4$ bzw. $\Delta erg5$ -Einzeldelentionsstammes und eines $\Delta erg4\Delta erg5$ -Doppeldelentionsstammes, die zusätzlich die *fgy1-1*-Mutation enthielten, durchgeführt. Es zeigte sich, dass GLUT1 in allen drei Stämmen Wachstum auf Glukose ermöglichte, was aber wohl eher auf die vorhandene *fgy1-1*-Mutation zurückzuführen war. Dahingegen exprimierte zusätzlich zum *erg4*-Deletionsstamm nur der $\Delta erg4\Delta erg5$ -Doppeldelentionsstamm ein funktionelles GLUT4-Protein. Alle drei untersuchten Stämme produzieren aufgrund der Deletionen in der Ergosterolbiosynthese kein Ergosterol mehr, sondern akkumulieren verschiedene Vorstufen oder Nebenprodukte in der Plasmamembran (Smith *et al.*, 1996; Zweytick *et al.*, 2000).

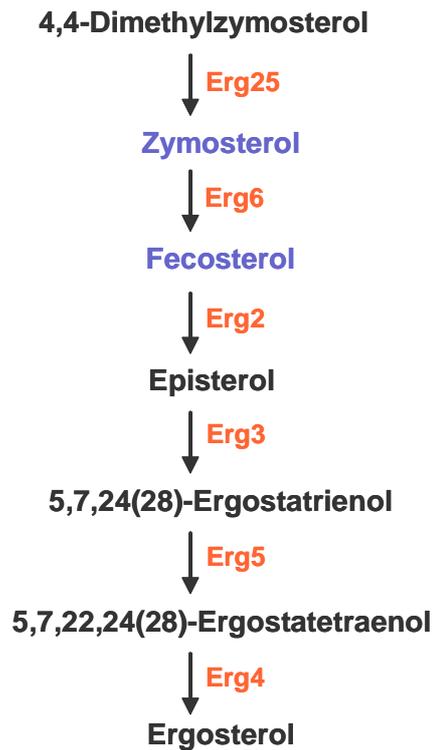


Abb. 25: Die letzten Schritte des Ergosterolbiosyntheseweges. Dargestellt sind die Produkte der letzten sechs Umwandlungsschritte der Synthese des Endproduktes Ergosterol, sowie die daran beteiligten Enzyme.

Es sollte nun untersucht werden, ob die Deletion von *ERG6* einen Einfluss auf die funktionelle Expression der heterologen Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 ausübt. *ERG6* kodiert ein Enzym des Ergosterolbiosyntheseweges, die C-24 Sterol-Methyltransferase, welches für die Umwandlung von Zymosterol zu Fecosterol verantwortlich ist (Gaber *et al.*, 1989) (Abb. 25). Die Deletion von *ERG6* führt zu einer Akkumulation von hauptsächlich zwei Ergosterolvorstufen: Zymosterol und Cholesta-5,7,24-trienol (Munn *et al.*, 1999).

3.14.1 Konstruktion eines *erg6*-Deletionsstammes

In früheren Versuchen war die Deletion von *ERG6* im haploiden Stamm EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) nicht erfolgreich verlaufen (Dlugai, 2002). Deshalb sollte jetzt durch Deletion von *ERG6* in dem diploiden Stamm RWY16D (2n EBY.18ga) und anschließender Tetradenanalyse (2.36) ein haploider Stamm mit Deletion in *ERG6* konstruiert werden. Die Deletion von *ERG6* führt dazu, dass die Aufnahme von Tryptophan nicht mehr effizient erfolgt (Gaber *et al.*, 1989). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Ursache dafür im Transport der Tryptophan-

permease Tat2 zur Vakuole statt zur Plasmamembran zu finden ist (Umebayashi und Nakano, 2003).

Der diploide Stamm RWY16D ist jedoch Tryptophan auxotroph. In das Genom des diploiden Stammes RWY16D (*trp*⁻) musste also erst das durch *EcoRV*-linearisierte Integrationsplasmid YIpLac204 integriert werden um ein mutiertes *trp1*-Allel durch das Wildtyp-Allel zu ersetzen. Dem Stamm wurde so die Synthese von Tryptophan ermöglicht und Transformanten wurden auf synthetischem Medium mit 1% Maltose ohne Tryptophan selektiert. Der daraus resultierende diploide Stamm wurde mit DVY.012 (*trp1-289/TRP1*) bezeichnet und dieser Stamm wurde auch für die Deletion von *ERG6* eingesetzt. Die *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette wurde mit dem Oligonukleotidpaar S1-ERG6/S2-ERG6 über PCR amplifiziert und die Deletion wie in Abschnitt 2.18 beschrieben durchgeführt. Der diploide Stamm DVY.012 Δ *erg6* wurde mit DVY.013 (*erg6::kanMX/ERG6 trp1-289/TRP1*) bezeichnet und nach Sporulation (2.36) einer Tetradenanalyse unterzogen.

Zwei Sporen unabhängiger Tetraden, die auf Maltosemedium mit G418 gewachsen waren, wurden in einer PCR mit den Oligonukleotiden a1-ERG6/a4-ERG6 auf die Integration der *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette anstelle des *ERG6*-Gens überprüft. Als negative Kontrolle wurde eine Spore benutzt, die kein Wachstum auf G418-Medium zeigte, und zusätzlich wurde auch der diploide Stamm DVY.013 über PCR getestet. Beide PCR-Produkte, der auf G418 gewachsenen Sporen, zeigten nach Auftrennung im Agarosegel eine Bandengröße, die der *loxP-kanMX-loxP*-Kassette entsprach. Dagegen zeigte das PCR-Produkt der negativen Kontrolle die Größe, die für das *ERG6*-Gen erwartet wurde und im diploiden Stamm konnten sowohl die Deletionskassette als auch *ERG6* nachgewiesen werden. Mit den beiden Sporen waren jetzt haploide Stämme mit einer Deletion des *ERG6*-Gens erhalten worden. Einer der Stämme wurde mit DVY.014 (*erg6::kanMX TRP1*) benannt und dieser wurde für die folgenden Wachstumsversuche eingesetzt.

3.14.2 Untersuchung des Wachstumsverhaltens des *erg6*-Deletionsstammes

Der *erg6*-Deletionsstamm DVY.014 sollte nun daraufhin untersucht werden, ob die heterologen Glukosetransporterproteine GLUT1 und GLUT4 diesem Stamm ein Wachstum auf Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle ermöglichen. Gleichzeitig sollte getestet werden, ob auch GLUT4^{V85→M} als aktiver Transporter in diesem Stamm exprimiert wurde. Deshalb wurden die Plasmide YEp4H7-hsGLUT1, YEp4H7-hsGLUT4, p426H7GLUT4^{V85→M} und das Plasmid p426HXT7-6His als negative Kontrolle in den Stamm DVY.014 transformiert. Das Wachstum

der Transformanten wurde anschließend auf synthetischem Medium ohne Uracil mit 0,1%, 0,5% und 2% Glukose überprüft. Die Ergebnisse des Wachstumstests sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tab. 16: Ergebnis des Wachstumstests im Stamm DVY.014 ($\Delta erg6$) mit exprimiertem GLUT1, GLUT4 bzw. GLUT4^{V85→M}. Der *erg6*-Deletionsstamm mit den Plasmiden YEp4H7-hsGLUT1, YEp4H7-hsGLUT4, p426H7GLUT4^{V85→M} oder p426HXT7-6His wurde auf Agarplatten mit synthetischem Medium ohne Uracil mit 0,1%, 0,5% und 2% Glukose ausgestrichen und 5 Tage bei 30°C inkubiert. (+) Wachstum, (-) kein Wachstum, (+/-) Bildung von Suppressoren

Stamm	Plasmid	0,1% Glukose	0,5% Glukose	2% Glukose
DVY.014 ($\Delta hxt \Delta erg6$)	YEp4H7-hsGLUT1	+	+	+
	YEp4H7-hsGLUT4	-	-	-
	p426H7GLUT4 ^{V85→M}	+/-	+/-	+/-
	p426HXT7-6His	-	-	-

Der Wachstumstest deutet darauf hin, dass die Deletion von *ERG6* einen positiven Effekt auf die aktive Expression von GLUT1 ausübt. Der $\Delta erg6$ -Stamm mit GLUT1 war als einziger der drei getesteten in der Lage auf Glukosemedium zu wachsen. Der mit YEp4H7-hsGLUT4 transformierte Stamm zeigte, verglichen mit den Zellen, die als negative Kontrolle ausgestrichen waren, kein Wachstum, ebenso wie GLUT4^{V85→M} exprimierende Transformanten, die aber nach fünf Tagen Inkubation bei 30°C Suppressormutanten bildeten.

Das Ergebnis des Wachstumsverhaltens des transformierten *erg6*-Deletionsstammes konnte in flüssigem Medium bestätigt werden (Abb. 26). Auch hier zeigte nur der GLUT1 exprimierende Stamm Wachstum in den drei Medien mit 0,1%, 0,5% und 2% Glukose. Nach ca. 100 Stunden Inkubation bei 30°C wuchs auch der $\Delta erg6$ -Stamm mit p426H7GLUT4^{V85→M}, was sich durch das Durchsetzen von Suppressormutanten erklären lässt.

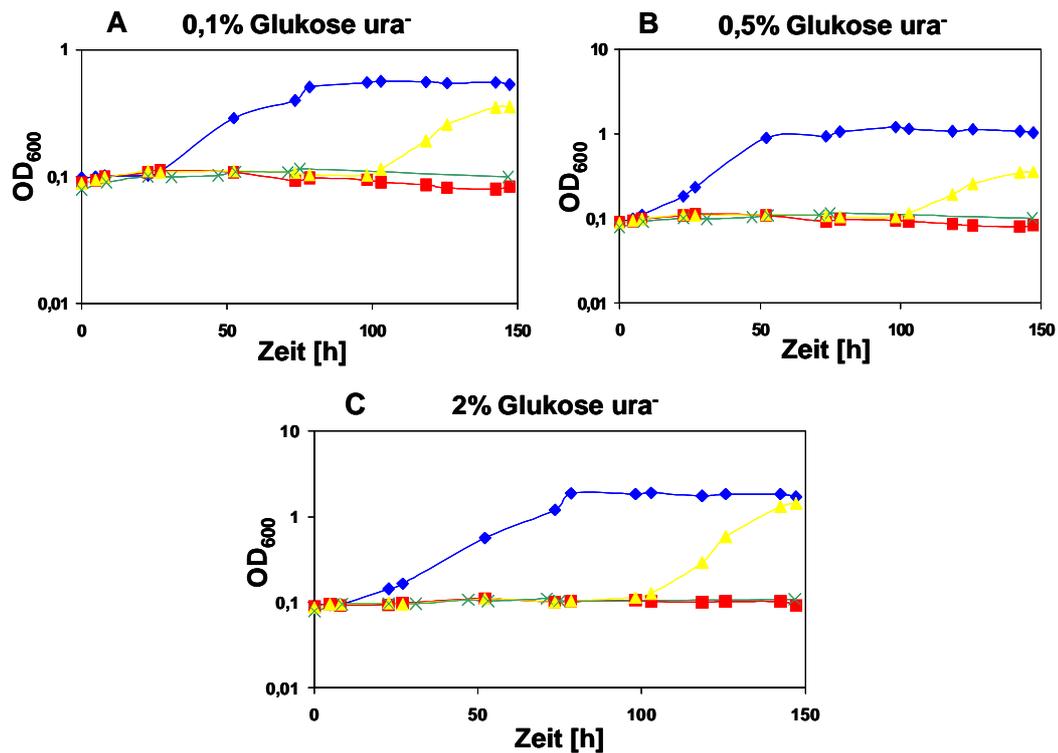


Abb. 26: Wachstum des $\Delta erg6$ -Stammes mit Expression von GLUT1, GLUT4 bzw. GLUT4^{V85→M}. Der *erg6*-Deletionsstamm mit dem Plasmid YEp4H7-hsGLUT1 (♦) bzw. YEp4H7-hsGLUT4 (■) bzw. p426H7GLUT4^{V85→M} (▲) bzw. p426HXT7-6His (x) wurde in synthetischem Medium mit 1% Maltose ohne Uracil herangezogen. Nach Waschen in synthetischem Medium ohne Kohlenstoffquelle wurde der mit den verschiedenen Plasmiden transformierte Stamm in synthetischem Medium mit 0,1% (A), 0,5% (B) und 2% (C) Glukose ohne Uracil mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Proben wurden den Kulturen jeden Tag zur Bestimmung der OD₆₀₀ entnommen.

3.15 Überprüfung eines Effekts von *rsp5*-Mutanten auf die Aktivität von GLUT1 und GLUT4 in *S. cerevisiae*

Das essentielle Protein Rsp5 aus *S. cerevisiae* wurde charakterisiert als eine E3-Ubiquitin-Ligase (Huibregtse *et al.*, 1995). Datenbankvergleiche zeigten, dass das Protein Npi1 identisch zu Rsp5 ist (Hein *et al.*, 1995). Seine Funktion besteht in der Übertragung des Ubiquitins auf Lysinreste verschiedener Substratproteine, wie z.B. Gap1 (generelle Aminosäurepermease), Fur4 (Uracilpermease) oder auch Ste2 (α -Faktor Rezeptor) (Hein *et al.*, 1995; Galan *et al.*, 1996; Dunn und Hicke, 2001). Die Ubiquitinierung von Plasmamembranproteinen in Hefe dient als Signal

für die Endozytose und die darauffolgende Degradation dieser Proteine in der Vakuole (Hicke, 1997).

Es wurden Untersuchungen durchgeführt, die zeigten, dass mittels Mutationen in *RSP5* die Endocytose von Proteinen negativ beeinflusst werden kann. Bei diesen Mutationen handelt es sich zum einen um eine spontane Ty-Transposon Insertion im Promotorbereich von *RSP5*, die zu einem reduzierten Expressionslevel von *RSP5* führt (Hein *et al.*, 1995). In dem zweiten mutanten Stamm ist die N-terminale C2-Domäne (Aminosäuren 2-138) von Rsp5, die für die Lebensfähigkeit der Hefezelle nicht essentiell ist (Springael *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999), deletiert.

Außerdem wurde Rsp5 über Lokalisierungsexperimente punktuell an der Plasmamembran verteilt nachgewiesen; entsprechend zu Membraneinstülpungen, aus denen Endosomen entstehen und auch an Strukturen direkt an der Vakuole (Wang *et al.*, 2001). Vergleiche mit der Lokalisation von Rsp5 zu der von den chromosomalen Markern für das Endosom Pep12 und Vps32 zeigte eine Ko-Lokalisation dieser Proteine.

Aufgrund der Erkenntnisse, dass Rsp5 eine Funktion bei der Endozytose von Transportproteinen der Plasmamembran ausübt, sollte mit Hilfe der zwei *rsp5*-Mutanten untersucht werden, ob ein Einfluss auf die in Hefe heterlog exprimierten Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 besteht. Falls eine fehlende Aktivität der beiden Glukosetransporter darauf zurückzuführen ist, dass sie zu schnell abgebaut werden, könnte ein Defekt bei der Endozytose aus der Plasmamembran eine Aufnahme von Glukose über die beiden Transporter ermöglichen.

3.15.1 Klonierung einer *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette in den Promotorbereich von *RSP5*

Eine Anfrage bei Bruno André (Universität Brüssel) nach der *rsp5*-Mutante mit der Ty-Transposon Insertion im Promotorbereich ergab, dass derselbe Effekt mit der Integration der *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette in den Promotorbereich von *RSP5* erreicht werden konnte. Es sollten jetzt Stämme mit integrierter Deletionskassette konstruiert werden, die nur noch ein reduziertes Level an *RSP5* exprimierten und so defekt in der Ubiquitinierung von Plasmamembrantransportern und der darauffolgenden Endocytose von Proteinen aus der Plasmamembran waren.

Die *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette sollte in den Promotorbereich von *RSP5* der Hefestämme EBY.VW4000 (*hxf*), EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) und SDY.022 (*hxf*)

fgy1-1 Δerg4) kloniert werden. Vor Beginn des Versuchs musste die noch im Stamm SDY.022 vorhandene *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette mittels Cre-Rekombinase verloren gehen, was jedoch nicht rechtzeitig realisiert werden konnte, so dass dieses Experiment nur mit den zwei Stämmen EBY.VW4000 (*hxf*) und EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) durchgeführt wurde. Die Integration der Deletionskassette erfolgte über homologe Rekombination nach demselben Ablauf wie die Deletion eines Gens (2.18). Mit dem Oligonukleotidpaar S1-promRSP5/S2-promRSP5 wurde die *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette über PCR aus dem Plasmid pUG6 amplifiziert. Nach Aufreinigung (2.12) und Überprüfung durch Agarosegelelektrophorese (2.13) wurde das PCR-Produkt in die beiden Stämme transformiert und Transformanten auf Vollmedium mit 1% Maltose und G418 selektiert. Die erfolgreiche Integration des *kanMX*-Moduls wurde mit den Oligonukleotiden a1-RSP5-kanMX und a4-RSP5-kanMX mittels PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese überprüft. Die Deletionskassette ersetzte einen Bereich von 287 bp im Promotorbereich von *RSP5* 459 bp aufwärts von dem Startcodon ATG. Die zwei konstruierten Stämme wurden mit DVY.07 (*hxf Prom.RSP5::kanMX*) und DVY.08 (*hxf fgy1-1 Prom.RSP5::kanMX*) bezeichnet.

3.15.2 Wachstumstests der Stämme DVY.07 und DVY.08

Nach Konstruktion der Stämme DVY.07 (*hxf Prom.RSP5::kanMX*) und DVY.08 (*hxf fgy1-1 Prom.RSP5::kanMX*) sollte jetzt überprüft werden, ob die eingeführte Mutation einen Einfluss auf die Aktivität der Transporterproteine GLUT1 und GLUT4 ausübt. Dazu wurden Wachstumstests durchgeführt. Die Plasmide YEp4H7-hsGLUT1, YEp4H7-hsGLUT4 und p426HXT7-6His wurden in die beiden Stämme DVY.07 und DVY.08 transformiert. Zusätzlich wurden die Plasmide YEp4H7-hsGLUT1 und YEp4H7-hsGLUT4 auch in die Ausgangsstämme EBY.VW4000 (*hxf*) und EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) transformiert um das Wachstum der GLUT1- und GLUT4-exprimierenden Stämme miteinander vergleichen zu können. Die Transformanten wurden auf synthetischem Medium mit 1% Maltose ohne Uracil selektiert und anschließend wurde das Wachstum der Transformanten in flüssigem, synthetischem Medium mit 0,5% Glukose ohne Uracil über einen Zeitraum von 50 h spektralphotometrisch gemessen (2.20). Die Ergebnisse der Wachstumsüberprüfung sind in Abbildung 27 dargestellt.

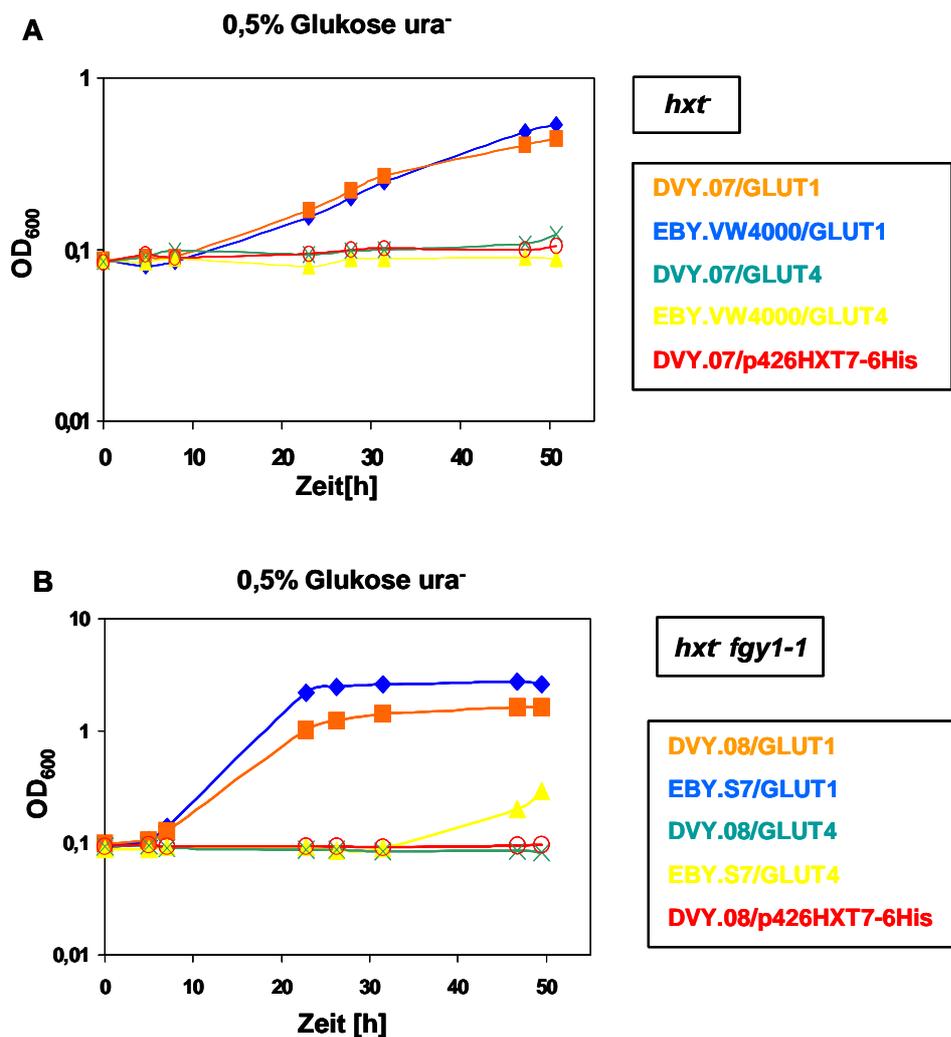


Abb. 27: Wachstumstests in 0,5% glukosehaltigem, synthetischem Medium ohne Uracil. Die Plasmide YEp4H7-hsGLUT1, YEp4H7-hsGLUT4 wurden in die Stämme DVY.07 (*hxt Prom.RSP5::kanMX*) und EB.Y.VW4000 (*hxt*) (A) bzw. DVY.08 (*hxt fgy1-1 Prom.RSP5::kanMX*) und EB.Y.S7 (*hxt fgy1-1*) (B) transformiert. Als negative Kontrolle diente das Plasmid p426HXT7-6His transformiert in die Stämme DVY.07 und DVY.08. In einem Zeitraum von 50 h wurden Proben für die Bestimmung der OD₆₀₀ entnommen.

Der Wachstumstest im *hxt*-Stammhintergrund zeigte (Abb. 27A), dass weder GLUT1 noch GLUT4 durch die eingeführte Mutation in *RSP5* in ihrer Aktivität positiv beeinflusst wurden. GLUT1 ermöglicht nach Expression sowohl im Stamm EB.Y.VW4000 als auch im Stamm DVY.07 ein leichtes Hintergrundwachstum in der Flüssigkultur. Nach Expression von GLUT4 lässt sich in beiden Stämmen kein Wachstum erkennen. Das Plasmid p426HXT7-6His diente sowohl im Stamm DVY.07 als auch im DVY.08 als negative Kontrolle. Das Wachstumsverhalten der Transformanten im *fgy1-1*-Stammhintergrund ließ ebenfalls den Schluss zu, dass die Integration der *kanMX*-Deletionskassette in den Promotorbereich von *RSP5*

keinen positiven Einfluss auf die Aktivität von GLUT1 oder GLUT4 hatte (Abb. 27B). Für die Expression von GLUT1 im Stamm DVY.08 (*hxf fgy1-1 Prom.RSP5::kanMX*) konnte eher ein geringer negativer Effekt beobachtet werden. Die Zellen dieses Stammes wuchsen geringfügig schlechter im direkten Vergleich mit GLUT1-exprimierenden Zellen des Stammes EBY.S7. Sie erreichten ihre stationäre Phase bei einer niedrigeren OD₆₀₀. Der Stamm DVY.08 war mit GLUT4 nicht in der Lage in glukosehaltigem Medium zu wachsen. Im GLUT4-exprimierenden Stamm EBY.S7 ließ sich nach ca. 35 h ein geringes Wachstum beobachten; dies ist vermutlich auf das Durchsetzen eines Suppressors zurückzuführen.

3.15.3 Deletion der C2-Domäne von *RSP5*

Die Deletion der N-terminalen C2-Domäne in *Rsp5* sollte in den Stämmen EBY.VW4000 (*hxf*), EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) und SDY.022 (*hxf fgy1-1 Δerg4*) durchgeführt werden. Das Plasmid pRS306+RSP5ΔC2 zur Durchführung der Deletion wurde von Rosine Haguenaer-Tsapis (Universität Paris) zur Verfügung gestellt. Bei diesem handelt es sich um ein integratives Plasmid mit einer Kopie eines mutierten *rsp5*-Gens, bei dem die für die C2-Domäne kodierende Sequenz (Basen 4-414) deletiert ist (Wang *et al.*, 2001) und mit einem selektierbaren *URA3*-Markergen. Das Plasmid pRS306+RSP5ΔC2 wurde mit dem Restriktionsenzym *AgeI* linearisiert und nach Agarosegeleextraktion (2.14) in die Stämme EBY.VW4000 (*hxf*), EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) und SDY.022 (*hxf fgy1-1 Δerg4*) transformiert. Transformanten wurden auf Medium mit 1% Maltose ohne Uracil selektiert. Die Integration des Plasmids erfolgte über homologe Rekombination in den Locus des *RSP5*-Gens, was zu einer Duplikation im Hefegenom führte. Im *RSP5*-Locus lag dann das WT-Gen neben dem mutierten Gen vor. Aufgrund des *URA3*-Markergens konnte die Exzision des Plasmids aus dem Hefegenom und der Verlust aus der Zelle über die Zugabe von 5'-FOA zu 1%igem synthetischem Maltosemedium erreicht werden (Boeke *et al.*, 1984).

5'-FOA resistente Kolonien wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des mutierten *rsp5ΔC2*-Gens überprüft. Es musste sicher gestellt werden, dass das WT-Gen zusammen mit dem Plasmid aus dem Genom herausrekombiniert und nur die mutierte Form des Gens im Genom verblieben war. Die PCR wurde mit den Primern a1-RSP5delC2/ a4-RSP5delC2 in den drei neu konstruierten, aber auch den drei Ausgangsstämmen EBY.VW4000 (*hxf*), EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) und SDY.022 (*hxf fgy1-1 Δerg4*) durchgeführt. Die Deletion der C2-Domänenkodierenden Sequenz in *RSP5* führt zu einem Verlust von ca. 400 bp, so dass nach erfolgter PCR über die zu erwartenden Größenunterschiede der DNA-

Fragmente zwischen WT-*RSP5* und *rsp5ΔC2* unterschieden werden konnte. Die Überprüfung vieler PCR-Produkte in einem Agarosegel brachte das Ergebnis, dass nur in dem Stamm EBY.VW4000 (*hxf*) die Integration des *rsp5ΔC2*-Gens ins Genom erfolgreich verlaufen war. Dieser Stamm wurde mit DVY.09 (*hxf rsp5ΔC2⁴⁻⁴¹⁴*) bezeichnet.

3.15.4 Test der Aktivität von GLUT1 und GLUT4 in dem Stamm DVY.09

Ebenso wie in den Stämmen DVY.07 (*hxf Prom.RSP5::kanMX*) und DVY.08 (*fgy1-1 Prom.RSP5::kanMX*) (3.15.2) wurde auch in dem Stamm DVY.09 (*hxt-rsp5ΔC2⁴⁻⁴¹⁴*) überprüft, ob ein Einfluss der Deletion der C2-Domäne auf die Aktivität der heterologen Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 besteht. Es wurden wiederum Wachstumstests durchgeführt. Dazu wurden die Plasmide YEp4H7hsGLUT1, YEp4H7hsGLUT4 und der Leervektor p426HXT7-6His in den Stamm DVY.09 und zusätzlich in den Ausgangsstamm EBY.VW4000 transformiert. Transformanten wurden auf synthetischem Medium mit 1% Maltose ohne Uracil selektiert. Zur Überprüfung der Aktivität der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 wurden Transformanten beider Stämme anschließend auf synthetisches Medium mit 2% Glukose ohne Uracil ausgestrichen.

Nach 3-tägiger Inkubation bei 30°C konnte weder für den GLUT1-exprimierenden noch für den GLUT4-exprimierenden Stamm DVY.09 Wachstum auf glukosehaltigem Medium beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass auch die *rsp5ΔC2*-Mutante keinen positiven Einfluss auf die Aktivität von GLUT1 und GLUT4 hat.

4 DISKUSSION

Die funktionelle Expression von Proteinen in heterologen Systemen ist für die nähere Charakterisierung dieser Proteine von großer Bedeutung, da auf diese Weise die gleichzeitige Expression ähnlich wirkender Proteine desselben Organismus umgangen werden kann. Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eignet sich aufgrund ihrer leichten Handhabung und Manipulierbarkeit gut für die Expression heterologer Proteine. Durch Deletion von Genen können Mutanten erzeugt werden, in denen störende endogene Aktivitäten unterdrückt werden können.

Trotz vieler Vorteile der Hefe traten Probleme bei der Expression heterologer Proteine auf. Untersuchungen ergaben, daß heterologe Transporterproteine in Hefezellen exprimiert wurden, aber aufgrund unkorrekter Faltung oder Akkumulation von Transporterproteinen der Plasmamembran in intrazellulären Strukturen oft nicht funktionell waren.

Das *FGY1*-Gen wurde im Rahmen einer früheren Doktorarbeit isoliert. Es hatte sich gezeigt, dass die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 aus Säugern nach Expression in einem *hxf*-Stamm (Wieczork *et al.*, 1999) keine Glukoseaufnahme in Zellen dieses Stammes ermöglichten. Eine Mutation im *FGY1*-Gen der Hefe war notwendig um GLUT1 funktionell in der Plasmamembran des *hxf*-Stammes zu exprimieren (Wieczork *et al.*, 2003). Zusätzlich zur *fgy1-1* Mutation musste noch das *ERG4*-Gen der Hefe in dem *hxf*-Stamm deletiert werden um über GLUT4 vermitteltes Wachstum auf glukosehaltigem Medium beobachten zu können (Dlugai, 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Funktion des Fgy1 Proteins aus *S. cerevisiae* identifiziert und charakterisiert werden. Es wurden zum einen Untersuchungen durchgeführt, deren Ergebnisse auf eine Funktion von Fgy1 in der Hefe schließen lassen sollten. Zum anderen wurde die Expression der Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 in Hefe näher untersucht um daraus Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion von Fgy1 ziehen zu können. Es wurden einige Hinweise erhalten, die zu einem Modell der Funktion des Proteins führten.

4.1 Lokalisierung von Fgy1

Die Lokalisierung von Fgy1 in *S. cerevisiae* wurde inzwischen in mehreren Untersuchungen erforscht. In einer früheren Arbeit wurde eine Lokalisierung des Proteins an der Plasmamembran mit Hilfe einer Modifikation des von Aronheim *et*

al. (1997) entwickelten Sos-Recruitment-Systems (SRS), mit dem eine Untersuchung der Membranlokalisierung von Proteinen möglich war, nachgewiesen (Wieczorke, 2001). Zu demselben Ergebnis gelangten Huh *et al.* (2003) durch Fusion des grün-fluoreszierenden Proteins GFP an Fgy1 und anschließender Fluoreszenzmikroskopie.

Innerhalb dieser Arbeit sollte die Lokalisierung von Fgy1 mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation und anschließender Western-Blot-Analyse untersucht werden. Um Fgy1 über Antikörper detektieren zu können wurde ein Fgy1-Protein mit C-terminaler Fusion eines HA-Epitops eingesetzt. Der Vergleich der Verteilung von Fgy1 im Saccharosedichtegradienten mit der Verteilung der vier Markerproteine Dpm1 (Dolichol-Phosphat-Mannose-Synthase in der Membran des endoplasmatischen Retikulums), Pep12 (endosomales Protein der t-SNARE-Familie), ALP (alkalische Phosphatase in der Vakuolenmembran) und Pma1 (ATPase der Plasmamembran) im Western-Blot und nach anschließender densitometrischer Auswertung zeigte eine Kolokalisierung von Fgy1 mit Pma1 an der Plasmamembran und mit Pep12 in Endosomenmembranen (Abb. 3). Die Kolokalisierung von Fgy1 mit Pma1 an der Plasmamembran bestätigte die über Fusion mit hSos und GFP erlangten Ergebnisse. Eine intrazelluläre Lokalisierung von Fgy1 war jedoch noch nicht bekannt.

Um einen Zusammenhang dieser Lokalisierung mit dem für das Lokalisierungsexperiment eingesetzten $\Delta fgy1$ -Stamms RWY95-1A, dessen parentaler Stamm der W303 war, auszuschließen wurde Fgy1 mit C-terminaler GFP-Fusion in drei Stämmen über Fluoreszenzmikroskopie lokalisiert. Diese Stämme hatten als Stammhintergrund entweder den W303- oder den CEN.PK-Stamm. Fgy1-GFP wurde in allen drei Stämmen an der Zellperipherie nachgewiesen (Abb. 4), so dass eventuelle Stamm-bedingte Unterschiede nicht für die intrazelluläre Lokalisation verantwortlich gemacht werden können. Es bleibt allerdings abzuwägen, ob der im W303-Stammhintergrund in der Vakuole gespeicherte rote Farbstoff (Weismann *et al.*, 1987) eine intrazelluläre Fluoreszenz des Fgy1-GFP Fusionsproteins überstrahlen könnte. Ein endosomales GFP-Fluoreszenzsignal könnte in beiden Stammhintergründen auch durch das starke Fluoreszieren des Fgy1-GFP Konstrukts an der Plasmamembran überlagert werden. Auszuschließen ist jedoch nicht, dass das Fgy1-Protein aufgrund eines negativen Einfluss des HA-Epitops in intrazellulären Strukturen zurückgehalten werden könnte.

4.2 Untersuchungen zur Identifizierung einer Funktion von Fgy1

Bis auf die synthetische Letalität einer *pho85*-Deletion mit der *fgy1*-Deletion (Lenburg und O'Shea, 2001) und den Nachweis einer Interaktion mit Glg2 mittels „Two-Hybrid“-Analyse (Ito *et al.*, 2001) gab es keinerlei Anhaltspunkte in Bezug auf eine mögliche Funktion von Fgy1. Der Versuch über die Durchführung einer Phänotyp-Mikroarray-Analyse (Bochner *et al.*, 2001) mit einem *FGY1*-Wildtyp- und einem *fgy1*-Deletionsstamm Hinweise zu erhalten, in welche Richtung die Funktion von Fgy1 innerhalb der Hefezelle zu finden wäre, blieb erfolglos. Es wurde lediglich ein allgemeiner Wachstumsdefekt des Δ *fgy1*-Stammes gegenüber dem *FGY1*-Wildtypstamm festgestellt.

4.2.1 Einfluss von Fgy1 auf den Transport von Plasmamembranproteinen

In einem ersten Experiment sollte mit Hilfe von Lokalisierungsexperimenten untersucht werden, ob Fgy1 eine Funktion beim Transport von GLUT1 zur Plasmamembran ausübt. Da GLUT1 im Stamm EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) Wachstum auf Medium mit Glukose ermöglicht, im *hxf*-Stamm dagegen nicht, muss das Transporterprotein im *fgy1-1*-Mutantenstamm in der Plasmamembran integriert vorliegen. Die Frage, ob Fgy1 für eine Mislokalisierung von GLUT1 und vielleicht auch von anderen Transportproteinen verantwortlich ist, sollte geklärt werden. Der Nachweis des Fusionsproteins GLUT1-GFP in den Stämmen EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) und EBY.VW4000 (*hxf*) zeigte in beiden Stämmen eine deutliche Lokalisierung an der Plasmamembran (Abb. 5). Auch die Western-Blot-Analyse nach Fraktionierung durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation in den Stämmen RWY95-1D (*FGY1*) und RWY95-1A (Δ *fgy1*) ergab eine Akkumulation von GLUT1 in den Fraktionen hoher Dichte, die einer Lokalisierung an der Plasmamembran entsprechen (Abb. 6). Die Lokalisierung von GLUT1 an der Plasmamembran unabhängig von seiner Aktivität in diesen Stämmen wurde auch von Wiczorke *et al.* (2003) nach einem Fraktionierungsexperiment in den Stämmen EBY.18ga (*hxf*) und EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) und mittels GFP-Fusion nachgewiesen. Im Gegensatz dazu hatten Kasahara und Kasahara (1996) GLUT1 durch Immunfluoreszenzmikroskopie in intrazellulären Kompartimenten lokalisiert. Für die unterschiedlichen Ergebnisse in dieser Arbeit und von Wiczorke *et al.* (2003) gibt es zur Zeit keine begründbare Erklärung. Zusammengefasst kann trotz des abweichenden Ergebnisses von Kasahara und Kasahara (1996) gefolgert werden, dass Fgy1 nicht für eine Zurückhaltung von GLUT1 in intrazellulären Strukturen verantwortlich ist.

Auch ein endogenes Plasmamembranprotein der Hefe, die Maltosepermease Mal31, wurde daraufhin untersucht, ob Fgy1 eine Funktion bei dessen

Lokalisierung zur Plasmamembran ausübt. Messungen der Maltoseaufnahme in den Stämmen RWY95-1D (*FGY1*) und RWY95-1A (Δ *fgy1*) hatten gezeigt, dass die Maltoseaufnahme im *fgy1*-Deletionsstamm RWY95-1A gegenüber dem Stamm RWY95-1D deutlich reduziert war, wobei für den WT-Stamm RWY95-1D schon eine verringerte Maltoseaufnahme verglichen mit einem anderen Wildtyp-Hefestamm CEN.PK2-1C nachgewiesen worden war (Wieczorke, 2001). Mit Hilfe der Saccharosedichtegradientenzentrifugation und anschließender Western-Blot-Analyse wurde die Verteilung von Mal31 in den Stämmen RWY95-1D (*FGY1*) und RWY95-1A (Δ *fgy1*) miteinander verglichen. Der Nachweis von Mal31 erfolgte nach Überexpression durch den konstitutiven *HXT7*-Promotor durch Detektion des an Mal31 fusionierten HA-Epitops. HA-Mal31 wurde mit einem geringen Anteil an der Plasmamembran, der Hauptanteil jedoch in intrazellulären Strukturen lokalisiert (Abb. 7). Da in den beiden untersuchten Stämmen kein Unterschied in der Lokalisierung zu beobachten war, lässt sich schließen, dass eine durch die Deletion von *FGY1* bedingte Mislokalisierung der Maltosepermease nicht für die verringerte Maltoseaufnahmekapazität im Δ *fgy1*-Stamm verantwortlich ist und Fgy1 keine Rolle beim Transport von Mal31 zur Plasmamembran spielt.

4.2.2 Untersuchung eines Einflusses bei der Integration von Membranproteinen in die Plasmamembran

Es konnte gezeigt werden, dass Fgy1 keinen Einfluss auf den Transport von GLUT1 zur Plasmamembran ausübt. Unabhängig von seiner Aktivität in den getesteten Stämmen war GLUT1 immer an der Plasmamembran lokalisiert. Schon bestehende Resultate bekräftigten die Annahme, dass Fgy1 in den Prozess der Proteininsertion in die Plasmamembran involviert sein könnte. So war eine 1,5-fach erhöhte Aktivität der generellen Aminosäurepermease Gap1 im Δ *fgy1*-Stamm gegenüber dem Wildtyp-Stamm gemessen worden (persönliche Mitteilung von Bruno André, Brüssel). Dieser Phänotyp ließ sich durch eine erhöhte Anzahl an Gap1-Permeasen in der Plasmamembran erklären. Außerdem hatte eine Lokalisierung von GLUT1 über Immunfluoreszenz-Mikroskopie ergeben, dass GLUT1 in nicht-permeabilisierten Zellen nur im *fgy1-1*-Stamm EBY.S7 mit fluoreszierenden Antikörpern in der Plasmamembran nachgewiesen werden konnte, nicht jedoch im *hxf*-Stamm EBY.18ga (Voss, 2001).

Deshalb wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, die weiter Aufschluss darüber geben sollten, ob Fgy1 die Integration von GLUT1 in die Plasmamembran verhindert bzw. die Deletion von *FGY1* oder die Mutation des Gens die Insertion von GLUT1 fördert.

So wurde mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie die Phospholipidzusammensetzung der Plasmamembran untersucht. Es sollte geklärt werden, ob eine *FGY1*-Deletion zu einer veränderten Lipidzusammensetzung der Membran führt, so dass vielleicht ein bestimmtes Phospholipid oder das Sterol Ergosterol ganz fehlen. Für einige Lipide konnte nachgewiesen werden, dass sie für die Funktion oder auch für die korrekte Faltung und Stabilität spezieller Membranproteine als Ko-Faktoren benötigt werden und in der Zelle häufig als Lipid-Protein Komplexe vorliegen (Opekarová und Tanner, 2003). So konnte gezeigt werden, dass in Hefezellen, die nicht mehr in der Lage waren Phosphatidylethanolamin zu synthetisieren, im Vergleich zu Wildtypzellen eine geringere Aktivität der Aminosäurepermeasen Can1 (Argininpermease), Put4 (Prolinpermease) und auch Gap1 nachzuweisen waren (Robl *et al.*, 2001). Weitere Untersuchungen brachten das Ergebnis, dass Phosphatidylethanolamin als spezifisches Chaperon für den korrekten Transport von Can1 zur Plasmamembran benötigt wird (Opekarová *et al.*, 2002). Das Fehlen von Phosphatidylethanolamin durch Deletion der für die Synthese zuständigen Gene führt dazu, dass Can1 in intrazellulären Kompartimenten der Zelle zurückgehalten wird. Es konnte jedoch kein Einfluss auf die Sekretion der Plasmamembran ATPase Pma1 oder des Hexosetransporters Hxt1 zur Plasmamembran nachgewiesen werden. Kaur und Bachhawat (1999) stellten fest, dass eine veränderte Plasmamembran-zusammensetzung in Stämmen, in denen Mutationen in den letzten Schritten der Ergosterolbiosynthese vorliegen, zu einer reduzierten Aktivität des Pdr5-Proteins führt. Pdr5 gehört zu der Familie der ABC-Transporter und ist als MDR („multidrug resistance“) Ausströmpumpe verantwortlich für die Resistenz gegenüber einer großen Vielzahl von Substanzen (Balzi *et al.*, 1994; Hirata *et al.*, 1994; Mahe *et al.*, 1996). Der Lipidumgebung von Proteinen in der Membran ist also für die optimale Aktivität einiger Proteine von großer Bedeutung.

Dem Sterol als wesentlichem Bestandteil der Plasmamembran von eukaryontischen Zellen kommt eine bedeutende Aufgabe bei der Fluidität und Permeabilität der Membran zu (Lees *et al.*, 1979; Bard *et al.*, 1978). Es wäre gut möglich, dass das Vorkommen unterschiedlicher Sterole in Hefe- und Säugertierzellen die Insertion von GLUT1 beeinflusst. Während in Säugertierzellen Cholesterol vorliegt, ist in der Plasmamembran der Hefe Ergosterol mit fast 90% das am häufigsten vorkommende Sterol (Zweytick *et al.*, 2000). Bei der heterologen Expression von Säugertiertransportproteinen in der Hefe könnte es aufgrund der unterschiedlichen Struktur der Sterole zu Schwierigkeiten bei der Lokalisierung der Proteine kommen.

Die Auftrennung der Lipidextrakte des Stammes RWY95-1D (*FGY1*) und RWY95-1A (Δ *fgy1*) gegen ein Gemisch von als Standard dienenden Lipiden zeigte keinen Unterschied im Auftreten der untersuchten Phospholipide, auch nicht in Bezug auf Ergosterol (Abb. 9). *Fgy1* konnte also keine Funktion in der Phospholipidzusammensetzung der Hefe zugeschrieben werden. Eine gaschromatographische Analyse hatte ebenfalls schon erwiesen, dass auch in dem *fgy1-1* Mutantenstamm EBY.S7 weiterhin Ergosterol in der Plasmamembran zu finden ist (Dlugai, 2002).

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob *Fgy1* eine Funktion bei der Vesikelfusion mit der Plasmamembran ausüben könnte. Im Sekretionsweg der Proteine ausgehend vom endoplasmatischen Retikulum (ER) stellt die Fusion der post-Golgi Vesikel mit der Plasmamembran den letzten Schritt dar. Der Prozess der Vesikelfusion mit einer Membran ist abhängig von dem sogenannten SNARE-Komplex (SNAP Rezeptor), der sich aus mehreren Untereinheiten zusammensetzt (Bennett, 1995). Der Komplex wird gebildet zwischen Membranproteinen auf den Transportvesikeln, den v-SNAREs, und Membranproteinen auf der Zielmembran, den t-SNAREs (Rothman, 1994; Söllner *et al.*, 1993). Das Vorkommen der v-SNAREs in den Membranen der Transportvesikel bestimmt, ob die Vesikel z.B. mit der Membran des ER, des Golgi-Komplexes oder der Plasmamembran fusionieren werden. Auch die t-SNAREs auf den Zielmembranen sind für jede Membran spezifisch. Die Bildung eines SNARE-Komplexes erfolgt durch Interaktion der jeweils für diesen Fusionsschritt komplementären v- und t-SNARE Proteinen.

Das ca. 106 kDa große Protein Sec9 gehört zu dem SNARE-Komplex in *S. cerevisiae*, der für die Fusion von post-Golgi Vesikeln mit der Plasmamembran verantwortlich ist (Brennwald *et al.*, 1994) (Abb. 28). Aufgrund der Homologie von Sec9 zu dem neuronalen Protein SNAP-25, einer t-SNARE Komponente des SNARE-Komplexes im Gehirn von Säugetieren (Oyler *et al.*, 1989; Söllner *et al.*, 1993), wurden Untersuchungen durchgeführt, die Sec9 als t-SNARE Komponente in Hefe identifizierten. Über Cross-linking Studien konnte gezeigt werden, dass Sec9 einen direkten Komplex mit den beiden Proteinen Sso1 und Sso2 bildet (Brennwald *et al.*, 1994). Mit Hilfe von Lokalisierungsexperimenten wurden diese drei Proteine an der Plasmamembran lokalisiert und für Sec9 konnte eine Verteilung über die ganze Peripherie der Zelle nachgewiesen werden. Sso1 und Sso2 stellen die homologen Hefepoteine zu den Proteinen Syntaxin A und Syntaxin B aus Säugetieren dar (Aalto *et al.*, 1993) und alle vier Proteine fungieren neben Sec9 bzw. SNAP-25 als t-SNARE Komponenten des SNARE-

Komplexes. Die dritte Untereinheit des SNARE-Komplexes in Hefe, der die Fusion von post-Golgi Vesikeln mit der Plasmamembran einleitet, wird von den beiden Proteinen Snc1 und Snc2 gebildet (Protopopov *et al.*, 1993). Diese Proteine liegen gebunden an der Membran der post-Golgi Vesikel vor. Der SNARE-Komplex entsteht durch Interaktion der cytoplasmatischen Domäne der v-SNAREs Snc1, Snc2 mit der cytoplasmatischen Domäne der t-SNAREs Sso1, Sso2 in Assoziation mit Sec9 (Brennwald *et al.*, 1994; Rossi *et al.*, 1997).

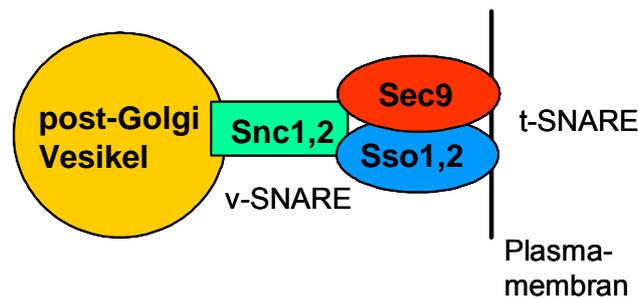


Abb. 28: Fusion von post-Golgi Vesikeln mit der Plasmamembran in *S. cerevisiae*. Dargestellt ist der SNARE-Komplex, der für die Fusion von post-Golgi Vesikeln mit der Plasmamembran verantwortlich ist.

Eine mögliche Rolle von Fgy1 bei der Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran wurde mit Hilfe der *sec*-mutanten Hefestämme NY782 (*sec9-4*) und NY1217 (*sec18-1*) getestet. Stämme mit Mutationen in einzelnen *sec*-Genen zeigen einen temperatursensitiven Phänotypen (Novick *et al.*, 1980; 1981). Bei 25°C ist ein normales Wachstum der Zellen zu beobachten, bei 37°C stellen die Zellen jedoch ihr Wachstum ein und akkumulieren intermediäre Strukturen des Sekretionsweges. In einem *sec9-4* mutanten Stamm erfolgt bei 37°C keine Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran, stattdessen akkumulieren post-Golgi Vesikel unterhalb dieser Membran. Der *sec18-1*-mutante Stamm diente als Kontrolle, da hier eine Inkubation bei der restriktiven Temperatur von 37°C zu einem frühen Stop des Sekretionsweges durch Ansammlung von Proteinen im endoplasmatischen Retikulum führt.

Nach Deletion bzw. Überexpression von *FGY1* in den zwei Stämmen wurde ein Einfluss auf den temperatursensitiven (ts) Phänotypen des *sec9-4*-Stammes untersucht. Die Hypothese war, dass Fgy1 als negativer Regulator bei der Vesikelfusion fungiert. Bei Vorliegen einer genetischen Interaktion zwischen Fgy1 und Sec9 wäre es gut möglich, dass die Deletion von *FGY1* und die damit

wegfallende negative Regulation den temperatursensitiven Phänotyp aufhebt und eine Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran wieder stattfinden kann. Zu diesem Zweck wurden Tropftests mit Inkubation der Zellen bei Temperaturen von 25°C bis 42°C durchgeführt. Sie ergaben jedoch weder einen positiven Wachstumseffekt nach Einbringen eines *FGY1*-Überexpressionsplasmids noch nach Deletion von *FGY1* bei restriktiven Temperaturen (Abb. 10, 11). Es wurde allerdings festgestellt, dass die Deletion von *FGY1* in den getesteten Stämmen generell zu einem schlechteren Wachstum gegenüber ihren parentalen Stämmen führte. Auch ein Vergleich der Lokalisation von GLUT1-GFP in den Stämmen NY782 (*sec9-4*), DVY.04 (*sec9-4 Δfgy1*), NY1217 (*sec18-1*) und DVY.05 (*sec18-1 Δfgy1*) zeigte keine Veränderung des ts-Phänotyps nach Inkubation bei 37°C (Abb. 12). In dem *sec9-4* mutanten Stamm akkumulierten unabhängig von der *fgy1*-Deletion post-Golgi Vesikel an der Plasmamembran. Diese erhaltenen Ergebnisse gaben keinen Aufschluss über eine bestehende Interaktion zwischen Fgy1 und Sec9. Eine Funktion von Fgy1 bei der Vesikelfusion ist weiterhin nicht auszuschließen, da sie der Funktion von Sec9 nachgeschaltet sein könnte und somit der temperatursensitive Phänotyp nicht beeinflusst würde.

Der Nachweis von GLUT1 über die Methode der TNP-Präzipitation in den Plasmamembranen der Stämme EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) und EBY.18ga (*hxf*) sollte zeigen, ob GLUT1 nur in der Plasmamembran inseriert ist, wenn es auch die Aufnahme von Glukose ermöglicht. Das Prinzip der TNP-Präzipitation besteht darin, dass Trinitrobenzol-Sulfonsäure (TNBS) Zellmembranen nicht durchdringen kann (Gordesky und Marinetti, 1973; Litman, 1974) und somit nur mit extrazellulär zugänglichen Domänen von Proteinen intakter Zellen reagiert. TNBS reagiert spezifisch mit freien Aminogruppen, an die sodann eine Trinitrophenol(TNP)-Gruppe kovalent gebunden wird (Okuyama und Satake, 1960; Satake *et al.*, 1960) (Abb. 21). Mittels Antikörpern, die gegen TNP gerichtet sind, können diese modifizierten Proteine spezifisch angereichert und über Western-Blot-Analyse detektiert werden (Novick und Scheckman, 1983). In der Western-Blot-Analyse konnte im Proteinextrakt des *fgy1-1* mutanten Stammes GLUT1 über Antikörper detektiert werden (Abb. 22). Der Nachweis des Proteins im *hxf*-Stamm war nicht möglich. Durch den positiven Nachweis der Plasmamembran ATPase Pma1 wurde jedoch sichergestellt, dass beide Proteinextrakte generell Plasmamembranproteine enthielten. Hier scheint also die Expression von *FGY1* die Insertion von GLUT1 in die Plasmamembran zu verhindern.

Die für die Expression von GLUT1 in Hefe bisher erlangten Ergebnisse der Lokalisierung an der Plasmamembran unabhängig von seiner Aktivität, aber der nicht nachweisbaren Integration des Proteins in einem *FGY1 hxf*-Stamm ähneln Ergebnissen, die für GLUT4 in Ratten-Adipozyten erhalten wurden. Studien, die den Verlauf der Lokalisierung und Aktivität von GLUT4 in der Zelle nach Insulinstimulation über einen längeren Zeitraum untersuchten (Sato *et al.*, 1993; Elmendorf *et al.*, 1999), und Experimente, in denen der stimulatorische Effekt von Insulin auf die Translokation von GLUT4 durch Behandlung der Zellen mit bestimmten Substanzen abgeschwächt wurde (Vannucci *et al.*, 1992; Ferrara und Cushman, 1999), zeigten, dass GLUT4 vor der maximalen Stimulation der Glukosetransport-Aktivität an der Zelloberfläche zu finden ist. In diesen Versuchen wurde nachgewiesen, dass GLUT4 an der Plasmamembran lokalisiert scheint, wenn Methoden wie Western-Blot-Analysen (Vannucci *et al.*, 1992) oder auch konfokale Mikroskopie (Elmendorf *et al.*, 1999) zum Einsatz kamen. GLUT4 war aber nicht in der Plasmamembran detektierbar nach Anwendung von Reagenzien, die abhängig sind von einer extrazellulären Bindestelle an der Zelloberfläche (Vannucci *et al.*, 1992). Daraus wurde der Schluss gezogen, dass ein Teil der GLUT4-enthaltenen Vesikel zwar an die Plasmamembran andocken, diese Vesikel jedoch nicht mit dieser fusionieren, sondern gebunden an regulatorischen Proteinen vorliegen könnten, die die Freisetzung des Transporters verhindern.

Die Existenz von Proteinen, die die vollständige Fusion von Vesikeln mit Membranen kontrollieren, ist durchaus denkbar und wäre auch eine mögliche Funktion für Fgy1.

4.2.3 Analyse einer Funktion von Fgy1 im *PHO*-Signalweg

Die Messung der Enzymaktivität der sekretierten, sauren Phosphatase Pho5 in einem *FGY1*-Wildtyp- bzw. *fgy1*-Deletionsstamm und in diesen Stämmen mit zusätzlicher Deletion der Phosphatpermease Pho84 sollte Aufschluss darüber geben, ob Fgy1 eine Funktion im Phosphatsignalweg zukommt. Da die Doppeldeletion von Pho85 und Fgy1 in synthetischer Letalität resultiert (Lenburg und O'Shea, 2001) und ein $\Delta fgy1$ -Stamm eine erhöhte Arsenatsensitivität zeigt (Wieczorke, 2001), dessen Aufnahme über Pho84 erfolgt, war es erforderlich diese mögliche Funktion näher zu untersuchen. Die Expression von *PHO5* wird über die Verfügbarkeit von anorganischem Phosphat im Medium reguliert (Suomalainen *et al.*, 1960). Bei Phosphatmangel wird die Transkription des Gens über den *PHO*-Signalweg induziert, Überschuss von Phosphat dagegen resultiert in Veränderungen des Signalweges und dadurch wird die *PHO5*-Expression reprimiert. Abbildung 29 gibt einen kurzen Überblick über die Regulation des *PHO*-

Signaltransduktionsweges in Bezug auf *PHO5* Expression in Gegenwart von bzw. Mangel an Phosphat (Lenburg und O'Shea, 1996; Oshima *et al.*, 1996; Persson *et al.*, 1999).

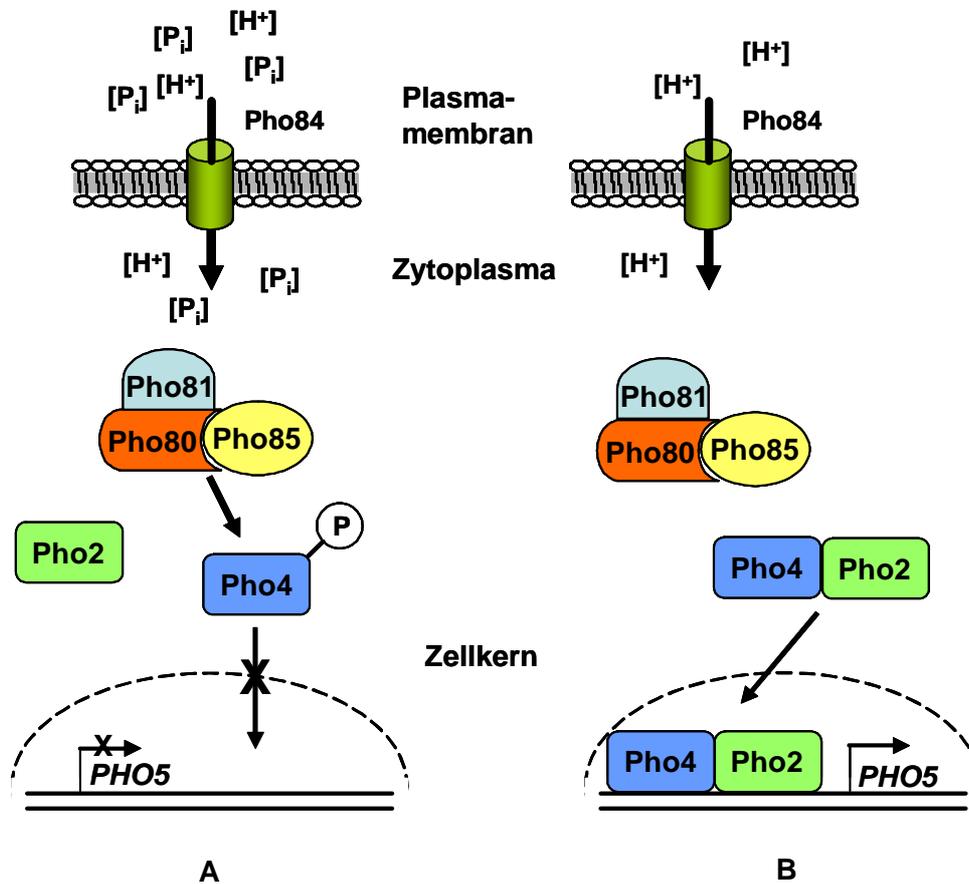


Abb. 29: Schematische Darstellung des *PHO*-Signaltransduktionsweges. Gezeigt ist die unterschiedliche Regulation der an diesem Signalweg beteiligten Gene in Gegenwart von Phosphat (A) und unter Phosphatmangelbedingungen (B). Bei ausreichendem Phosphatangebot im Medium verhindert die Phosphorylierung des Transkriptionsaktivators Pho4 durch die Kinase Pho85 mit ihrem assoziierten Cyclin Pho80 dessen Lokalisierung in den Zellkern. *PHO5*-Expression ist reprimiert (A). Bei Phosphatmangel wird die Expression der sekretorischen, sauren Phosphatase Pho5 durch Translokation von Pho4 und Pho2 in den Zellkern induziert (B).

PHO84 kodiert für einen hochaffinen Phosphattransporter, der für die Aufnahme von Phosphat aus dem Medium verantwortlich ist (Bun-ya *et al.*, 1991). In Gegenwart von hohen Phosphatkonzentrationen im Medium wird das Protein Pho81 (CDK-Inhibitor) inhibiert und so wird die Inaktivierung des Pho80-Pho85 Komplexes aufgehoben (Abb. 29A). Pho80 wurde charakterisiert als ein Cyclin, das mit Pho85, einer nicht-essentiellen Cyclin-abhängigen Protein Kinase (CDK), einen Komplex bildet. Dieser Komplex fungiert dann als negativer Regulator, indem er den Transkriptionsaktivator Pho4 phosphoryliert und somit eine

Lokalisierung von Pho4 in den Zellkern unterbindet (Kaffman *et al.*, 1994). Auch die Lokalisierung von Pho2 in den Nukleus wird inhibiert, da das Protein in einem Komplex mit Pho4 in Kern transportiert wird. Ohne die Transkriptionsaktivatoren Pho4 und Pho2 bleibt die Transkription von *PHO5* reprimiert. Unter Phosphatmangelbedingungen im Medium wird die Expression von *PHO5* dagegen induziert (Abb 29B). Die Interaktion des CDK-Inhibitors Pho81 mit dem Kinase-Komplex Pho80-Pho85 inhibiert dessen Kinaseaktivität (Schneider *et al.*, 1994; Ogawa *et al.*, 1995). Der Cyclin-Kinase Komplex Pho80-Pho85 ist nicht mehr in der Lage Pho4 zu phosphorylieren. Unphosphoryliert wird der Transkriptionsfaktor Pho4 zusammen mit Pho2 in den Nukleus transferiert und aktiviert dort die Transkription des *PHO5* Gens und weiterer *PHO*-Gene, deren Expression ebenfalls über diesen Signalweg reguliert werden, wie z.B. *PHO84*.

Lenburg und O'Shea konnten 1996 nachweisen, dass die Deletion von *PHO84* eine konstitutive Expression von *PHO5* unabhängig von der Phosphatkonzentration im Medium zur Folge hat.

Die Enzymaktivität der sekretierten, sauren Phosphatase Pho5 wurde in den vier Stämmen RWY95-1D (*FGY1*), RWY95-1A ($\Delta fgy1$), DVY.01 (*pho84::kanMX FGY1*) und DVY.02 (*pho84::kanMX \Delta fgy1*) sowohl in Gegenwart einer definierten Menge Phosphat (10 mM) als auch unter Phosphatmangelbedingungen bestimmt. Ein Vergleich der ermittelten Werte zeigte, dass die Deletion von *FGY1* unter Phosphatmangelbedingungen weiterhin die *PHO5*-Expression reprimiert, wohingegen sie im *FGY1*-Wildtypstamm induziert ist (Abb. 8A). Die zusätzliche Deletion von *PHO84* im $\Delta fgy1$ -Stamm führte zwar zur Induktion der *PHO5*-Transkription unabhängig von der Phosphatkonzentration, die Werte der berechneten Enzymaktivitäten sind jedoch wesentlich niedriger als in dem *FGY1*-Wildtypstamm mit *pho84*-Deletion (Abb. 8B). Die Ergebnisse der Enzymtests deuten darauf hin, dass die Deletion von *FGY1* einen negativen Einfluss auf die Expression von *PHO5* ausübt, da die Werte der Pho5-Enzymaktivität in den $\Delta fgy1$ -Stämmen gegenüber den *FGY1*-Wildtypstämmen in allen durchgeführten Messungen reduziert sind. Es lässt sich außerdem schließen, dass Fgy1 keinen direkten Einfluss auf den Phosphattransporter Pho84 ausübt, da auch in den zwei Stämmen mit *pho84*-Deletion ein Effekt der *fgy1*-Deletion auf die Pho5-Enzymaktivität nachgewiesen wurde. Eine mögliche Erklärung für die erniedrigte Pho5-Aktivität wäre, dass die Deletion von *FGY1* zu einer erhöhten Phosphataufnahme durch gesteigerte Insertion von phosphattransportierenden Proteinen in die Plasmamembran führt. So würde selbst bei niedrigen Phosphatkonzentrationen im Medium noch mehr Phosphat transportiert werden können und dies würde im *PHO*-Signalweg zu einer Verhinderung der

Translokation des Transkriptionsaktivators Pho4 in den Zellkern resultieren. Eine *pho84*-Deletion würde dann in einem Δ *fgy1*-Stamm zwar auch zur konstitutiven Expression von *PHO5* führen, ein gesteigerter Phosphattransport über weitere Phosphatpermeasen würde aber eine teilweise Phosphorylierung von Pho4 und somit auch die teilweise Repression von *PHO5* zur Folge haben. Dieser erhöhte Phosphattransport könnte über den ebenfalls durch den *PHO*-Signalweg regulierten Na^+/P_i -Kotransporter Pho89 (Martinez und Persson, 1998) oder über das konstitutiv exprimierte Transportersystem Pho87-Pho90-Pho91 (Wykoff und O'Shea, 2001; Auesukaree *et al.*, 2003) erfolgen. Eine verstärkte Insertion von Pho84 in die Plasmamembran in dem Δ *fgy1*-Stamm wäre auch eine Erklärung für die von Wiczorke (2001) observierte Zunahme der Arsenatsensitivität. Die Funktion von Fgy1 läge somit nicht im *PHO*-Signalweg, sondern eher in einer Kontrollfunktion, welche Proteine in welcher Menge in die Plasmamembran inseriert werden. Ein Einfluss von Fgy1 auf den *PHO*-Signalweg ist jedoch auch nicht auszuschließen.

4.2.4 Versuch einer Identifizierung der Funktion von Fgy1 über bekannte Funktionen anderer Proteine

Die Funktionsanalyse eines unbekanntes Proteins gestaltet sich ohne Hinweise auf eine mögliche Funktion schwierig. Eine Möglichkeit diese Schwierigkeit zu umgehen liegt in der Identifizierung von Interaktionspartnern des zu charakterisierenden Proteins oder in der Identifizierung anderer Proteine, deren Deletionen denselben Phänotypen, wie die Deletion des zu untersuchenden Proteins, zur Folge haben. Sollte dies gelingen und die gefundenen Proteine eine bekannte Funktion haben, so könnten Rückschlüsse auf die Funktion des zu analysierenden Proteins gezogen werden und das Protein dahingehend näher untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit zwei Untersuchungen durchgeführt. Eine hatte zum Ziel mittels „Tandem-Affinity-Purification“ (TAP) Interaktionspartner von Fgy1 zu finden. Diese Methode bietet die Möglichkeit unbekanntes Proteinkomplexe zu identifizieren, deren Proteine unter der Kontrolle ihres eigenen Promotors stehen und so auf natürlichem Level exprimiert werden (Rigaut *et al.*, 1999). Der TAP-tag besteht aus einem Calmodulin-bindenden Peptid (calmodulin binding peptide, CBP), einer TEV-Protease Schnittstelle („TEV protease cleavage site“) und zwei IgG Bindedomänen des Protein A aus *Staphylococcus aureus* und wird genomisch an das zu untersuchende Protein fusioniert (Puig *et al.*, 2001). Die Aufreinigung des Proteinkomplexes war erfolgreich. Durch die Silberfärbung des Polyacrylamidgeles konnte eine Vielzahl

an Proteinbanden sichtbar gemacht werden. Diese sind nach Isolation aus dem Gel für eine massenspektrometrische Analyse einsetzbar. Um zu verifizieren, dass es sich bei den identifizierten Proteinen um reale Interaktionspartner von Fgy1 handelt, stehen dann weitere Untersuchungen bevor.

In der zweiten Untersuchung sollte mit Hilfe einer Transposongenbank nach weiteren Mutanten gesucht werden, die ein Wachstum auf glukosehaltigem Medium in Abhängigkeit von funktionellem GLUT1 zuließen. Die Insertionsgenbank besteht aus Plasmiden mit DNA-Fragmenten des Hefegenoms, die in *E. coli* mit einem mini-Tn3::*lacZ*::*LEU2* Transposon mutagenisiert wurden (Seifert *et al.*, 1986; Burns *et al.*, 1994). Diese Methode wurde in einer bereits abgeschlossenen Doktorarbeit erfolgreich eingesetzt um eine Mutation zu finden, die den Glukosetransporter GLUT4 aus Säugern funktionell in Hefe exprimiert (Dlugai, 2002).

Fünf Hefekolonien konnten isoliert werden, die nach Expression von GLUT1 auf glukosehaltigem Medium wachsen konnten. Die Sequenzierung der mutierten Bereiche identifizierte fünf verschiedene Gene: *HTA1*, *CTR9*, *PAF1*, *SPT16* und einen unbekanntes ORF *YKR096w*. Es wäre zu erwarten gewesen, dass das *FGY1*-Gen über die Methode isoliert worden wäre. Eine Erklärung, warum dies nicht der Fall war, könnte in dem für diesen Screen verwendeten Stamm YSYA321 (*hxt Δ fpb1*) liegen, da er aus dem CEN.PK-Stamm resultiert. In diesem hatte sich die Deletion des kompletten *FGY1*-Gens als letal erwiesen (Wieczorke, 2001). Allerdings konnte das *SPT16*-Gen identifiziert werden, für dessen Deletion ebenfalls Letalität nachgewiesen worden war (Malone *et al.*, 1991). Hier scheint das Transposon nur solche Bereiche des Gens ausgeschaltet zu haben, die nicht essentiell für die Lebensfähigkeit der Zelle sind. Für das *FGY1*-Gen war gezeigt worden, dass die Deletion des C-Terminus auch in einem Stamm mit CEN.PK-Hintergrund möglich war (Wieczorke, 2001). Aus diesem Grund wäre auch eine Isolierung von *FGY1* mit Hilfe der Transposongenbank denkbar, wobei erwähnt werden muss, dass die Entscheidung, welche Kolonien gutes Wachstum auf glukosehaltigem Medium zeigten, sehr schwierig war.

Die vier Gene *HTA1*, *CTR9*, *PAF1* und *SPT16* sind alle in die Transkription involviert (Brandt *et al.*, 1980; Koch *et al.*, 1999; Krogan *et al.*, 2002; Mueller und Jaehning, 2002; Rondón *et al.*, 2003) und für Spt16 konnte gezeigt werden, dass das Proteinen sowohl mit Histonen als auch mit dem Ctr9/Paf1-Komplex assoziiert ist (Krogan *et al.*, 2002). Mit Hilfe dieses Screens wurden also vier Proteine

identifiziert, für die eine Assoziation nachgewiesen wurde, so lässt sich sagen, dass eine große Anzahl von Proteinen abgedeckt wurde.

Über die Deletion dieser Gene wurde kontrolliert, ob sie tatsächlich zu einer funktionellen Expression von GLUT1 führten. Die Deletionen wurden für *HTA1* und *CTR9* durchgeführt. Nach Expression von GLUT1 in den beiden Deletionsstämmen DVY.033 (*hxf Δfbp1 Δhta1*) und DVY.035 (*hxf Δfbp1 Δctr9*) konnte Wachstum auf glukosehaltigem Medium beobachtet werden, das im Vergleich mit dem GLUT1-exprimierenden Stamm EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) aber geringer war (Abb. 15).

Mit der Deletion von *HTA1* bzw. *CTR9* waren Mutanten gefunden worden, die eine funktionelle Expression von GLUT1 zuließen. *HTA1* kodiert für eins der beiden H2A Histone, das H2A1, das sich mit dem Histon H2B als stabiles Dimer zusammenlagert und im Nukleus mit der DNA als Chromatin vorliegt (Brandt *et al.*, 1980; Choe *et al.*, 1982). Ctr9 bildet mit Paf1 einen stabilen Komplex. Seine Funktionen sind in der Zellzyklus-abhängigen Genexpression in der späten G₁-Phase (Koch *et al.*, 1999) und bei der Elongation durch die RNA-Polymerase II zu finden (Krogan *et al.*, 2002; Rondón *et al.*, 2003). Da diese beiden Proteine aufgrund ihrer Funktionen bei der Transkription im Nukleus lokalisiert sind (Koch *et al.*, 1999), Fgy1 jedoch an der Plasmamembran nachgewiesen wurde (Abschnitt 3.1; Wieczorke, 2001), macht die unterschiedliche Lokalisation eine einfache Übertragung auf eine mögliche Funktion von Fgy1 schwierig. Anzunehmen ist, dass die Deletionen von *HTA1* und *CTR9* nicht direkt auf eine funktionelle Lokalisierung von GLUT1 in der Plasmamembran wirken, sondern dass sie die Transkription anderer Gene, vielleicht auch die von *FGY1*, beeinflussen und dies dann die Glukoseaufnahme über GLUT1 ermöglicht. Es wäre auch denkbar, dass die Expression von GLUT1 durch die Deletion von *HTA1* bzw. *CTR9* direkt beeinflusst wird.

Aufgrund dessen stellte sich die Frage, ob sich die Funktionalität von GLUT1 in dem *fgy1-1* mutanten Stamm EBY.S7 durch eine Beeinflussung der Expression erklären ließe. Proteinextrakte der vier GLUT1-exprimierenden Stämme EBY.S7 (*hxf fgy1-1*), DVY.033 (*Δhta1*), EBY.VW4000 (*hxf Δmph2 Δmph3*) und EBY.18ga (*hxf*) wurden in einer Western-Blot-Analyse mit Hilfe von spezifischen Antikörpern auf ihre vorhandenen Proteinmengen an GLUT1 untersucht (Abb. 16). Die Intensität der Banden des ER-Markerproteins Dpm1 diente als Vergleich. Es konnte kein Unterschied in den Intensitäten der Banden von GLUT1 und Dpm1 in

den jeweils gleichen Stämmen festgestellt werden. Weder die Mutation in *FGY1* noch die Deletion von *HTA1* haben einen Effekt auf die Expression von GLUT1.

4.3 Untersuchungen zur Klärung der funktionellen Expression der heterologen Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 in Hefe

Es wurden noch einige Untersuchungen durchgeführt, die zur Klärung der funktionellen Expression von GLUT1 und auch GLUT4 führen sollten. Dadurch gewonnene Erkenntnisse sollten auch zur Findung einer Funktion von *Fgy1* in Hefe und speziell bei der Expression der beiden Glukosetransporter genutzt werden.

4.3.1 Versuch des Nachweises der topologischen Struktur von GLUT1 in Hefe

Mit Hilfe der Untersuchung der topologischen Struktur von GLUT1 in Hefe sollte ausgeschlossen werden, dass GLUT1 aufgrund von Strukturveränderungen nicht funktionell ist. Dazu wurde eine von Gilstring und Ljungdahl (2000) konstruierte *Suc2*-Reporter-kassette in Bereiche zwischen den Transmembrandomänen inseriert. Dadurch sollte über den Nachweis des Glukosylierungszustandes des Proteins eine Aussage über die Struktur von GLUT1 in der Plasmamembran möglich sein. Nach Integration des Konstrukts in GLUT1 konnte das Transporterprotein jedoch kein Wachstum auf glukosehaltigem Medium mehr vermitteln (Abb. 18). Die trotzdem durchgeführte Western-Blot-Analyse zeigte, dass das GLUT1-*Suc2* Protein weder im *hxf*-Stamm noch im *hxf fgy1-1* Stamm über Antikörper detektierbar war (Abb. 20). Eine Sequenzierung der GLUT1-*Suc2* Plasmide zeigte keine Mutationen. Es ist also anzunehmen, dass die Integration des *Suc2* Reporterkonstrukts in GLUT1 zu einer möglichen Fehlfaltung des Proteins führt und es daher rasch abgebaut wird und nicht zur Plasmamembran gelangt.

4.3.2 Rekonstitution von GLUT1 in Liposomen und Test auf Funktionalität

Obwohl einige Untersuchungen schon darauf schließen ließen, dass GLUT1 in dem *hxf*-Stamm nicht in die Plasmamembran eingebaut wird (Abschnitt 3.11), wurde eine Untersuchung durchgeführt um auszuschließen, dass GLUT1 in einem *hxf FGY1*-Stamm aufgrund von nicht vorhandener Funktionalität keinen Glukosetransport vermittelt. Die Rekonstitution von GLUT1 in Liposomen isoliert aus dem *fgy1-1* mutanten Stamm und dem *hxf*-Stamm EB.Y.VW4000 und anschließende Glukoseaufnahmemessungen zeigten, dass GLUT1 in beiden Stämmen mit nahezu gleichen Werten Glukose transportierte (Abb. 23). Zu

demselben Ergebnis waren auch Kasahara und Kasahara (1996) gelangt als sie das in ihrem Stamm in intrazellulären Strukturen zurückgehaltene GLUT1-Protein in Liposomen rekonstituierten und die Aufnahme von Glukose bestimmten. Das nicht stattfindende Wachstum eines GLUT1-exprimierenden *hxf*-Stammes ist also nicht die Folge einer Fgy1-bedingten nicht-funktionellen Expression des heterologen Transporters.

4.3.3 Test der Aktivität von GLUT4^{V85→M}

Die Suche nach GLUT1-aktivierenden Mutationen in einem Δhxt -Stamm der Hefe identifizierte neben der *fgy1-1* Mutation des Hefegenoms auch unterschiedliche Mutationen in GLUT1 selbst (Wieczorke *et al.*, 2003). Hier handelte es sich jeweils um den Austausch einer einzelnen Base, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz zur Folge hatte. Die Aminosäure-Austausche waren alle in der ersten Hälfte der zweiten vorhergesagten Transmembrandomäne lokalisiert. Eine dieser Mutationen führte z.B. zum Austausch der Base Guanin₂₀₅ durch Adenin, wodurch die Aminosäure Valin an Position 69 durch Methionin ersetzt wurde (GLUT1^{V69→M}). Es wurde vermutet, dass für die funktionelle Expression von GLUT1 in Hefe bereits relativ unspezifische Veränderungen der Aminosäuresequenz in der ersten Hälfte der zweiten Transmembrandomäne ausreichen. Eine Mutation in dieser Region könnte unter Umständen Interaktionsstellen für positive oder negative Regulatoren zugänglich machen oder maskieren.

Innerhalb dieser Arbeit wurde der Austausch der Base Guanin an Position 253 gegen Adenin in GLUT4 über in-vitro Mutagenese durchgeführt, dies resultierte in Ersetzen der Aminosäure Valin₈₅ durch Methionin. Diese Mutation entsprach der von GLUT1^{V69→M} (Abb. 24). Das Wachstum GLUT4^{V85→M}-exprimierender Zellen der Stämme SDY.025 (*hxf erg4*), SDY.022 (*hxf fgy1-1 erg4*) und EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) wurde untersucht. GLUT4^{V85→M} war in dem *hxf erg4*-Stamm ohne die *fgy1-1* Mutation in der Lage Wachstum auf glukosehaltigem Medium zu vermitteln (Tab. 15). Dagegen ließen GLUT4-exprimierende Zellen desselben Stammes kein Wachstum zu. GLUT4 wird also ebenso wie GLUT1 durch eine Mutation in der ersten Hälfte der zweiten Transmembrandomäne unabhängig von der *fgy1-1* Mutation funktionell in der Plasmamembran lokalisiert. Eine Mutation in dieser Region scheint den negativen Effekt, den Fgy1 auf die beiden Glukosetransporter ausübt, aufzuheben. Da für GLUT1 gezeigt werden konnte, dass dieser Effekt nicht auf eine direkte Interaktion beruht (Voss, 2001), lässt sich vermuten, dass auch GLUT4 nicht direkt beeinflusst wird.

4.3.4 Effekt einer *erg6*-Deletion auf die Funktionalität von GLUT1 bzw. GLUT4

Für die funktionelle Expression von GLUT4 in Hefezellen ist zusätzlich zur *fgy1-1* Mutation die Deletion von *ERG4* notwendig (Dlugai, 2002). Ein *erg4*-Deletionsstamm akkumuliert die Ergosterolvorstufe Ergosta-5,7,22,25(28)-Tetraen-3 β -ol in der Plasmamembran, da die durch *ERG4* kodierte Sterol-C-24(28)-Reduktase, welche den letzten Schritt der Ergosterolbiosynthese katalysiert, fehlt und somit kein Ergosterol mehr produziert wird (Zweytick *et al.*, 2000). Ergosterol ist das Hauptsterol in der Plasmamembran der Hefe *S. cerevisiae*. Die Untersuchungen des Einflusses von Δ *erg5*-, Δ *erg4*-Deletionen und einer Δ *erg4* Δ *erg5*-Doppeldeletion mit zusätzlicher *fgy1-1* Mutation innerhalb einer früheren Arbeit zeigte, dass GLUT1 in allen drei Stämmen Wachstum auf Glukose ermöglichte (Dlugai, 2002). Dieser Effekt war aber auf die *fgy1-1* Mutation zurückgeführt worden. GLUT4 vermittelte dagegen nur Wachstum im Δ *erg4*- und im Δ *erg4* Δ *erg5*-Stamm. Erklärt wurde dieses Ergebnis mit den unterschiedlichen Strukturen der in der Plasmamembran akkumulierten Sterolintermediate der verschiedenen *erg*-Deletionsstämmen. Ein Vergleich zeigte, dass GLUT4 funktionell war, wenn die Sterolseitenkette eine Methylengruppe am C-24 Atom aufweist (Abb. 30). Die Ergosterolbiosynthese läuft nicht strikt linear ab, sondern die in einem *erg5*-Deletionsstamm akkumulierte Sterolzwischenstufe Ergostatrienol wird durch die Sterolreduktase Erg4 zu Ergostadienol umgewandelt (Smith *et al.*, 1996). Im Gegensatz zur Methylengruppe im Ergostatrienol ist Ergostadienol wie Ergosterol durch eine Methylgruppe am C-24 Atom gekennzeichnet.

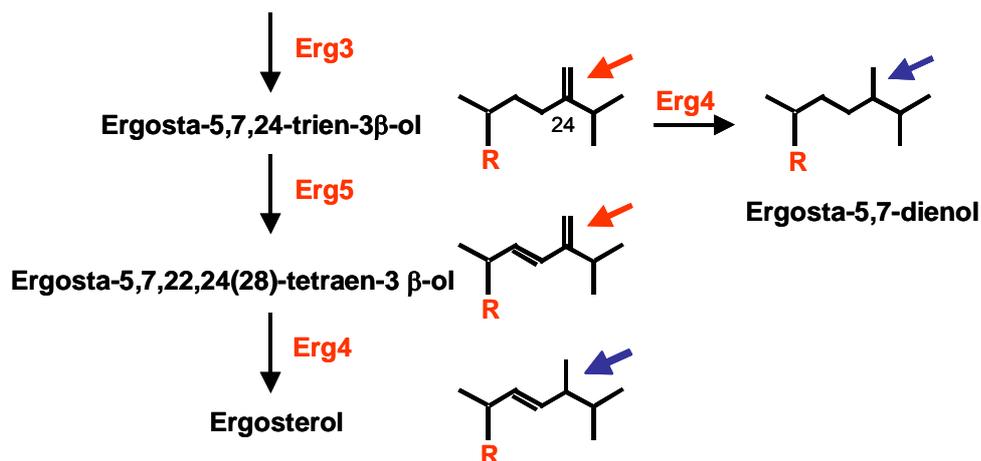


Abb. 30: Darstellung der Sterolseitenketten der letzten Zwischenprodukte der Ergosterolbiosynthese. GLUT4 ist aktiv, wenn am C-24 Atom statt einer Methylgruppe (blauer Pfeil) eine Methylengruppe (roter Pfeil) zu finden ist. In einem Δ *erg5*-Stamm wird Ergostatrienol durch Erg4 zu Ergostadienol umgewandelt.

Es wurde vermutet, dass die GLUT4-Proteine bei der Bildung der sekretorischen Vesikel am endoplasmatischen Retikulum (ER) durch eine direkte Bindung an die Methylengruppe der Sterolseitenkette an die Sterolintermediate Ergostatetraenol bzw. Ergostatrienol, deren Synthese durch ER-lokalisierte Enzyme erfolgt, zur Plasmamembran gelangen. Das würde auch bedeuten, dass die Methylgruppe der Sterolseitenkette im Fall von Ergosterol und Ergostadienol zu einer Hemmung der GLUT4-Translokation führt, da keine Bindung über die Methylgruppe an GLUT4 erfolgen könnte.

Die Deletion des *ERG6*-Gens in *S. cerevisiae* führt wie die Deletion von *ERG5* bzw. *ERG4* dazu, dass statt Ergosterol Sterolintermediate in die Plasmamembran eingelagert werden. *ERG6* kodiert für die C-24 Sterol-Methyltransferase, die für die Umwandlung von Zymosterol zu Fecosterol verantwortlich ist (Gaber *et al.*, 1989) (Abb. 25). Ein *erg6*-Deletionsstamm akkumuliert hauptsächlich zwei Ergosterolvorstufen: Zymosterol (39,4%) und Cholesta-5,7,24-trienol (32,2%) (Munn *et al.*, 1999). Die Struktur dieser zwei Intermediate unterscheidet sich vom Ergosterol hauptsächlich durch das Fehlen der Methylgruppe am C-24 Atom in der Sterolseitenkette (Abb. 31).

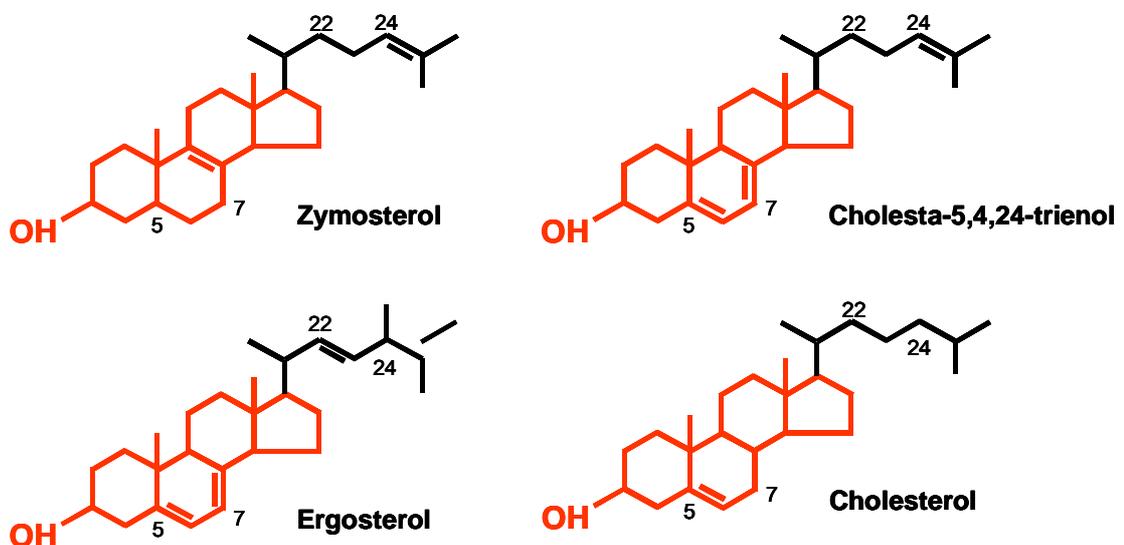


Abb. 31: Struktur der in einem *erg6*-Deletionsstamm akkumulierten Ergosterolvorstufen. Ein wichtiger Unterschied von Zymosterol und Cholesta-5,7,24-trienol im Vergleich zu Ergosterol liegt im Fehlen der Methylgruppe am C-24 Atom. Dem Cholesterol als Hauptsterol in Säugerzellen fehlt ebenfalls diese Methylgruppe.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Deletion von *ERG6* die Aktivität von GLUT1 bzw. GLUT4 in einem *hxf*-Stammhintergrund beeinflusst. Im haploiden Stamm EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) konnte diese Deletionsmutante nicht

realisiert werden (Dlugai, 2002). Ein erneuter Versuch wurde daher in einem diploiden *hxf*-Stamm durchgeführt, der jedoch für Tryptophan auxotroph ist. Da eine *erg6*-Deletion eine gestörte Tryptophan Aufnahme durch Transport der Tryptophanpermease Tat2 zur Vakuole statt zur Plasmamembran verursacht (Gaber *et al.*, 1989; Umebayashi und Nakano, 2003), wurde in dem Stamm über ein Integrationsplasmid ein mutiertes *trp1*-Allel durch das Wildtyp-Allel ersetzt. In dem nun Tryptophan-prototrophen Stamm erfolgte die Deletion des *ERG6*-Gens und über Tetradenanalyse wurde eine haploider *erg6*-Deletionsstamm erhalten.

Dieser Stamm wurde eingesetzt um sein Wachstum nach Expression von GLUT1 bzw. GLUT4 auf glukosehaltigem Medium zu untersuchen. Auch das mutierte GLUT4^{V85→M} Transporterprotein wurde auf seine Aktivität in diesem Stamm getestet. Die Wachstumsstudien wurden auf Mediumsplatten und in Flüssigkultur mit verschiedenen Glukosekonzentrationen durchgeführt (Tab. 16; Abb. 26). Die Ergebnisse beider Untersuchungen zeigten, dass nur GLUT1 in dem *erg6*-Deletionsstamm Wachstum auf Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle ermöglichte. Für den GLUT4-exprimierenden Δ *erg6*-Stamm wurde kein Wachstum beobachtet und GLUT4^{V85→M}-exprimierende Zellen bildeten nur Suppressormutanten. Es stellte sich nun die Frage, wie sich diese unterschiedlichen Ergebnisse erklären ließen.

In Säugerzellen und auch in Hefe wurde inzwischen nachgewiesen, dass Lipid-Rafts am Transport von Proteinen zur Plasmamembran beteiligt sind (Simons und Ikonen, 1997; Brown und London, 1998; Bagnat *et al.*, 2000). Für die Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 konnte in Säugerzellen eine Lokalisierung in Lipid-Rafts nachgewiesen werden (Sakyo und Kitagawa, 2002; Chamberlain und Gould, 2002). Lipid-Rafts sind dynamische Lipid-Mikrodomänen, die in Säugerzellen mit Cholesterol und Sphingolipiden angereichert sind. In Hefezellen bestehen sie hauptsächlich aus Ergosterol und Sphingolipiden. Im Gegensatz zu Säugerzellen, wo die Bildung der Lipid-Rafts im Golgi-Komplex stattfindet, werden diese in Hefezellen bereits im endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet (Bagnat *et al.*, 2000). Dort findet auch der Prozess der Ergosterolbiosynthese statt (Nishino *et al.*, 1981). Die Desaturase Erg5 und die Reduktase Erg4 sind im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert, so dass der vorletzte und letzte Schritt der Ergosterolsynthese im ER vollzogen werden. Die aufwärts von diesen Enzymen fungierende Methyltransferase Erg6 wurde jedoch fast ausschließlich in Lipid-Partikeln lokalisiert (Gaber *et al.*, 1989; Hardwick und Pelham, 1994), die Lipid-Rafts entsprechen. Nur ein sehr geringer Anteil ist auch im ER vorhanden (Leber *et al.*, 1994). Es wäre also denkbar, dass die Ergosterolvorstufe Zymosterol in Hefe schon in Lipid-Partikel verpackt wird, dort von Erg6 zu Fecosterol und

dann nach einem Rückholvorgang im ER zum Endprodukt Ergosterol umgewandelt wird. In den verschiedenen *erg*-Deletionsstämmen wird zwar kein Ergosterol mehr gebildet, aber es werden Ergosterolintermediate in die Membran eingelagert, so dass die Membranzusammensetzung verändert ist (Lees *et al.*, 1995). Für einen Stamm mit Deletion von *ERG6* konnte nachgewiesen werden, dass statt Ergosterol die entstehenden Intermediärprodukte Zymosterol und Cholesta-5,7,24-trienol in Lipid-Rafts lokalisiert sind (Munn *et al.*, 1999; Umabayashi und Nakano, 2003). Diese Zwischenprodukte ähneln dem Sterol der Säugerzellen Cholesterol in der Hinsicht, dass alle drei keine Methylgruppe am C-24 Atom aufweisen (Abb. 31).

In Bezug auf das durch GLUT1-vermittelte Wachstum in dem *erg6*-Deletionsstamm lässt sich schließen, dass die *ERG6*-Deletion in dem *hxf*-Stammhintergrund und die daraus resultierende Veränderung der Zusammensetzung der Lipid-Rafts ausreicht, dass GLUT1 in die Plasmamembran der Hefe inseriert werden kann und Glukoseaufnahme ermöglicht. Um diese Vermutung zu bestätigen müsste die Lokalisierung von GLUT1 im Δ *erg6*-Stamm z.B. mittels TNP-Präzipitation näher untersucht werden. Außerdem wäre es hilfreich zu untersuchen, ob GLUT1 in Hefe überhaupt in Lipid-Rafts zur Plasmamembran gelangt. Eine Übertragung auf eine mögliche Funktion von Fgy1 lässt sich jedoch nicht vornehmen, da Untersuchungen gezeigt hatten, dass die Deletion bzw. Mutation in *FGY1* nicht zu einer Veränderung des Ergosterols als Hauptsterol der Zelle führte (Abschnitt 3.5; Dlugai, 2002).

Im Gegensatz zu GLUT1, das in einem *hxf*-Stamm immer unabhängig von seiner Aktivität an der Plasmamembran lokalisiert war (Abschnitt 3.3.1; Wieczorke *et al.*, 2003), wurde GLUT4 in intrazellulären Strukturen zurückgehalten. In einer früheren Arbeit wurde die Möglichkeit in Betracht gezogen, dass es bei der Bildung der Lipid-Rafts im ER zwischen dem Ergosterol der Hefe und GLUT4 nicht zu einer Interaktion kommt, und GLUT4 aus diesem Grund nicht über die Lipid-Rafts zur Plasmamembran transloziert wird (Dlugai, 2002). Weiterhin wurde spekuliert, dass sich die Lipid-Rafts in einer *erg4*- und einer *erg4erg5*-Deletionsmutante aus den Ergosterolvorstufen Ergostatrienol oder Ergostatetraenol zusammensetzen, es zu einer direkten Interaktion über die Methylengruppe der Sterolseitenkette mit GLUT4 kommt und die Translokation zur Plasmamembran ermöglicht wird. Das nicht stattfindende Wachstum des GLUT4-exprimierenden Δ *erg6*-Stammes ließe sich nach dieser Erklärung auf die fehlende Methylengruppe der Sterolintermediate Zymosterol und Cholesta-5,7,24-trienol zurückführen, da diese somit nicht für eine Interaktion mit GLUT4 zur Verfügung steht. Allerdings müssten hier zur weiteren Klärung Lokalisierungsexperimente

durchgeführt werden um sicher sagen zu können, dass GLUT4 in dem *erg6*-Deletionsstamm in intrazellulären Strukturen zurückgehalten wird. Eine aktive GLUT4 Expression konnte bisher nur bei gleichzeitigem Vorliegen der *fgy1-1* Mutation und der zusätzlichen Deletion von *ERG4* bzw. *ERG4* und *ERG5* beobachtet werden. Interessant wäre also die zusätzliche Einführung der *fgy1-1* Mutation in den Δ *erg6*-Stamm und eine erneute Überprüfung der GLUT4 Aktivität. Außerdem müsste auch für GLUT4 festgestellt werden, ob GLUT4 in Hefe in Lipid-Rafts lokalisiert ist.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass eine Veränderung der Membranzusammensetzung durch Deletion verschiedener *ERG*-Gene nicht dieselben Effekte auf eine aktive Expression von GLUT1 und GLUT4 ausübt, sondern jeder Transporter für sich unterschiedliche Voraussetzungen benötigt.

4.3.5 Einfluss von Endocytose-defekten *rsp5*-Mutanten auf die Aktivität von GLUT1 und GLUT4

Innerhalb dieser Arbeit wurde eine Untersuchung durchgeführt, die klären sollte, ob sich die Aktivität von GLUT1 und GLUT4 in *rsp5*-mutanten Stämmen positiv beeinflussen lässt. Das von *RSP5* kodierte Protein aus *S. cerevisiae* wurde identifiziert über strukturelle Homologie zu dem humanen Protein E6-AP und wird deshalb auch den *hect*- („homologous to the E6-AP carboxyl terminus“)-Domänen Proteinen zugeordnet (Huibregtse *et al.*, 1995). *RSP5* kodiert für eine E3-Ubiquitin-Ligase. Ein Vergleich mit der Datenbank zeigte, dass es sich bei Rsp5 und Npi1 um dasselbe Protein handelt (Hein *et al.*, 1995). Für Rsp5/Npi1 wurde über chromosomale Deletionsversuche nachgewiesen, dass das Protein für die Lebensfähigkeit der Zelle essentiell ist. Durch Übertragung von Ubiquitin auf Lysinreste verschiedener Substratproteine, wie z.B. Gap1 (generelle Aminosäurepermease), Fur4 (Uracilpermease), Ste2 (α -Faktor Rezeptor) oder auch Hxt6 und Hxt7 (Hexosetransporter) leitet Rsp5 die Endocytose der Proteine ein (Hein *et al.*, 1995; Galan *et al.*, 1996; Dunn und Hicke, 2001; Krampe *et al.*, 1998). Die Ubiquitinierung von Plasmamembranproteinen in Hefe dient als Signal für die Endozytose und die darauffolgende Degradation dieser Proteine in der Vakuole (Hicke, 1997).

Die Aminosäuresequenz von Rsp5 zeigt, dass das Protein drei Domänen besitzt, die für seine Funktion von Bedeutung sind. Ein Cystein-Rest innerhalb der ca. 350 Aminosäuren großen, C-terminalen *hect*-Domäne von Rsp5 ist notwendig für die Bildung eines Ubiquitin-Thioesters, bevor das Ubiquitin auf Lysinreste der Substratproteine übertragen wird (Huibregtse *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1999; Rotin *et al.*, 2000). Außer der katalytischen *hect*-Domäne besitzt Rsp5 auch drei WW-

Domänen im zentralen Bereich der Proteinsequenz, die als Protein-Protein Interaktionsmodule fungieren, und eine sogenannte C2-Domäne am N-Terminus (Wang *et al.*, 1999). Die C2-Domäne ist ein weitverbreitetes Protein-Modul, für das eine Interaktion mit verschiedenen Molekülen, wie z.B. Ca^{++} , Phospholipiden oder auch Inositol Polyphosphaten, nachgewiesen wurde (Rizo und Südhof, 1998).

Neben der Lokalisierung von Rsp5 in endosomalen Strukturen konnte in weiteren Untersuchungen gezeigt werden, dass das Protein in den Prozess der Endozytose von einigen Plasmamembranproteinen involviert ist. Es wurden *rsp5*-Mutanten identifiziert, deren Phänotypen die Funktion von Rsp5 bei der Ubiquitinierung und anschließenden Endozytose bestätigten. Die komplette Deletion von *RSP5* ist letal, aber es wurde eine Mutation gefunden, bei der aufgrund einer Insertion eines Ty1 Transposons in den Promotorbereich von *RSP5* ca. 500 bp vor dem Startcodon das Expressionslevel des Gens reduziert wird (Hein *et al.*, 1995). Die Lebensfähigkeit der Zellen wird nicht beeinträchtigt. In diesen Mutanten bleibt die generelle Aminosäurepermease Gap1 nach Zugabe von NH_4^+ zum Medium aktiv und auch stabil in der Plasmamembran lokalisiert. In WT-Zellen führt die Zugabe von NH_4^+ als bevorzugter Stickstoffquelle zu einem schnellen Anstieg der Ubiquitinierung und dem Abbau von Gap1. Mittels Western-Blot-Analysen des Ubiquitinierungszustandes von Gap1 in WT-*RSP5*- und *rsp5*-mutanten Zellen wurde nachgewiesen, dass in den *rsp5*-mutanten Zellen keine Ubiquitinierung von Gap1 erfolgt, also kein Signal für die Endozytose und Degradation von Gap1 vorliegt (Springael und André, 1998). Für die Uracilpermease Fur4 wurden dieselben Ergebnisse wie für Gap1 in Bezug auf die *rsp5*-Mutante festgestellt (Galan *et al.*, 1996). Der über die Ty-Transposon Insertion erreichte Effekt auf die Endozytose kann auch durch Einführen der *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette in den Promotorbereich von *RSP5* erreicht werden (persönliche Mitteilung von Bruno André, Brüssel).

Es wurden Untersuchungen mit einer weiteren *RSP5*-Mutante durchgeführt. Bei dieser Mutation handelt es sich um die Deletion der N-terminalen C2-Domäne (Aminosäuren 2-138), die für die Lebensfähigkeit der Zelle nicht essentiell ist (Springael *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Deletion der C2-Domäne in Rsp5 dazu führt, dass Gap1 nach Zugabe von NH_4^+ zum Medium weiterhin ubiquitiniert wird, aber die Permease nicht endozytiert wird, sondern in der Plasmamembran verbleibt (Springael *et al.*, 1999). Derselbe Effekt der C2-Domänen Deletion in Rsp5 wurde ebenso für die Uracilpermease Fur4 nachgewiesen (Wang *et al.*, 2001).

Nach Konstruktion der Stämme DVY.07 (*hxf Prom.RSP5::kanMX*) und DVY.08 (*hxf fgy1-1 Prom.RSP5::kanMX*) mit *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette im Promotorbereich von *RSP5* (3.15.1) und des Stammes DVY.09 (*hxf rsp5ΔC2⁴⁻⁴¹⁴*), bei dem die C2-Domäne von Rsp5 deletiert worden war (3.15.3), wurden ein GLUT1- bzw. GLUT4-exprimierendes Plasmid in diese Stämme transformiert. Es sollten eigentlich weitere *rsp5*-mutante Stämme konstruiert werden. Die Insertion der Deletionskassette und auch die C2-Domänen Deletion konnten im *erg4*-Deletionsstamm SDY.022 (*hxf fgy1-1*) jedoch nicht realisiert werden. Der Versuch der Deletion der C2-Domäne in dem Stamm EBY.S7 (*hxf fgy1-1*) verlief ebenfalls nicht erfolgreich. Ob die vorliegenden *rsp5*-mutanten Stämme die Aktivität von GLUT1 bzw. GLUT4 positiv beeinflussen können, wurde mit Hilfe von Wachstumsstudien überprüft.

Für den heterologen Glukosetransporter GLUT1 war in Untersuchungen von Wieczorke *et al.* (2003) und innerhalb dieser Arbeit (Abschnitt 3.3.1) gezeigt worden, dass das Protein im *hxf*-Stamm schon an der Plasmamembran lokalisiert, aber nicht funktionell ist. Die Idee war, dass über GLUT1 keine Aufnahme von Glukose erfolgen kann, falls der Transporter in dem *hxf*-Stamm zwar in die Plasmamembran inseriert, jedoch direkt wieder abgebaut wird. Die Lokalisierung des Transporters in der Plasmamembran könnte aufgrund der nicht stattfindenden Endocytose in den *rsp5*-mutanten Stämmen stabilisiert werden. Transport von Glukose vermittelt über GLUT1 und damit Wachstum des *hxf*-Stammes sollten die Folge sein. Die Wachstumstests zeigten jedoch, dass GLUT1-exprimierende *rsp5*-mutante Zellen nicht in der Lage waren, im *hxf*-Stammhintergrund Wachstum auf glukosehaltigem Medium zu ermöglichen (Abb. 27). In dem *fgy1-1* mutanten Stamm EBY.S7, der als Ausgangsstamm für den Stamm DVY.08 (*hxf fgy1-1 Prom.RSP5::kanMX*) diente, führt die Expression von GLUT1 schon zu Wachstum auf glukosehaltigem Medium (Wieczorke *et al.*, 2003). Hier wäre also mit zusätzlicher *rsp5*-Mutation zu erwarten gewesen, dass ein fehlender Endocytoseprozess zu einem besseren Wachstum führen würde, da GLUT1 in der Plasmamembran zurückgehalten wird. Diese Erwartung wurde nicht erfüllt (Abb. 27). Der GLUT1-exprimierende Stamm DVY.08 (*hxf fgy1-1 Prom.RSP5::kanMX*) zeigte kein besseres Wachstum im Vergleich zum GLUT1-exprimierenden Ausgangsstamm. Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass keine der beiden *rsp5*-Mutationen einen Effekt auf die Aktivität von GLUT1 ausübt. Für die negativen Ergebnisse gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen ist es wahrscheinlich, dass GLUT1 im *hxf*-Stamm nicht, wie spekuliert, in die Plasmamembran inseriert wird und nur ein zu schneller Abbau den Transport von Glukose verhindert. Dies wird durch andere Ergebnisse dieser Arbeit gestützt, da

GLUT1 z.B. über TNP-Präzipitation nicht in der Plasmamembran nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 3.11). Es wäre auch möglich, dass GLUT1 in Hefe nicht der Ubiquitinierung über die E3-Ubiquitin-Ligase Rsp5 unterliegt. Dies würde erklären, warum auch im *fgy1-1* Stammhintergrund kein positiver Effekt beobachtet wurde. Um hier Klarheit zu schaffen müsste noch eine Untersuchung durchgeführt werden, ob Rsp5 verantwortlich für die Einleitung der Endocytose von GLUT1 aus der Plasmamembran ist.

Auch in den drei GLUT4-exprimierenden *rsp5*-Stämmen konnte kein Wachstum in Medium mit Glukose als einziger Kohlenstoffquelle beobachtet werden (Abb. 27). Das nach ca. 35 h einsetzende Wachstum im Stamm DVY.08 (*hxt fgy1-1 Prom.RSP5::kanMX*) ist auf das Durchsetzen einer Suppressormutante zurückzuführen. Diese Ergebnisse lassen sich recht einfach erklären. Schon in den für dieses Experiment verwendeten Ausgangsstämmen EBY.VW4000 (*hxt*) und EBY.S7 (*hxt- fgy1-1*) konnte GLUT4 nach Expression in Hefe nur in intrazellulären Strukturen der Zelle lokalisiert werden (Dlugai, 2002; Wieczorke *et al.*, 2003). Erst im *fgy1-1* mutanten Stamm mit zusätzlicher Deletion der Ergosterolreduktase Erg4 wurde GLUT4 an der Plasmamembran nachgewiesen und es erfolgte ein GLUT4-bedingter Transport von Glukose (Dlugai, 2002). Es ist also nicht anzunehmen, dass GLUT4 aufgrund der vorgenommenen *rsp5*-Mutationen zur Plasmamembran transloziert wird. Eine wahrscheinlich weiterhin intrazelluläre Lokalisierung des Proteins verhindert jegliche Aufnahme von Glukose über diesen Transporter. Um diese Vermutung zu bestätigen, wäre jedoch eine Untersuchung der Lokalisation von GLUT4 in den *rsp5*-mutanten Stämmen notwendig. Wie für GLUT1 müsste auch für GLUT4 eine Rsp5-abhängige Ubiquitinierung erst noch verifiziert werden.

4.4 Modell einer Funktion von Fgy1 beruhend auf bisherigen Erkenntnissen

Die Zuordnung einer Funktion für Fgy1 in der Hefe *S. cerevisiae* war trotz vieler Untersuchungen in verschiedene Richtungen nicht möglich. Die erhaltenen Ergebnisse geben aber einige Hinweise in welchem Prozess diese Funktion zu finden ist, so dass ein hypothetisches Modell einer Funktion von Fgy1 erstellt werden konnte, das aber durch weitere Untersuchungen erst verifiziert werden muss.

Alle Ergebnisse zusammengefasst, kann für Fgy1 eine Kontrollfunktion an der Plasmamembran angenommen werden, indem es darüber entscheidet, welche

Vesikel bzw. welche in den Vesikeln transportierten Proteine endgültig mit der Plasmamembran fusionieren. Als integrales Plasmamembranprotein könnte Fgy1 eine Art Sensor sein, der die Freisetzung der Proteine aus post-Golgi Vesikeln nach deren Fusion mit der Plasmamembran reguliert. Diese Funktion kann sich allgemein auf viele Proteine beziehen oder auch nur für bestimmte Proteine zum Ausdruck kommen. Speziell für den heterologen Glukosetransporter GLUT1 könnte dies bedeuten, dass Fgy1 ihn vielleicht aufgrund einer Modifizierung als fremdes Protein erkennt und die Blockierung der Insertion zu einer Akkumulation unterhalb der Plasmamembran führt. Im Falle der *fgy1-1* Mutation entfällt diese Kontrollfunktion, so dass GLUT1 in die Plasmamembran eingebaut wird und so die Aufnahme von Glukose ermöglicht. Das Wegfallen dieser negativen Kontrolle wäre dann z.B. auch die Ursache für die von Bruno André ermittelte erhöhte Gap1-Aktivität oder die gesteigerte Arsenatsensitivität in einem Δ *fgy1*-Stamm (Wieczorke, 2001). Da die *fgy1-1* Mutation in einer C-terminalen Verkürzung des Proteins resultiert, würde die Kontrollfunktion dem zytoplasmatisch lokalisierten C-Terminus zukommen über eine Interaktion mit den Vesikeln, die nach Bildung des SNARE-Komplexes an der Plasmamembran mit dieser fusionieren sollen. Bisher ist eine derartige Kontrollfunktion bei der Fusion von Vesikeln mit der Plasmamembran noch nicht bekannt.

In Abbildung 32 ist die mögliche Funktion von Fgy1 bildlich dargestellt.

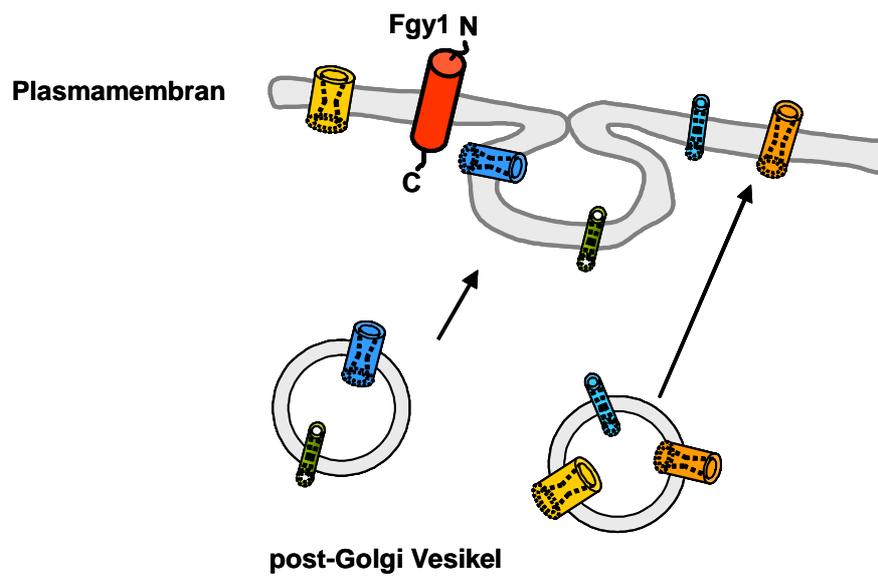


Abb. 32: Darstellung des hypothetischen Modells einer Funktion von Fgy1. Fgy1 könnte eine regulatorische Funktion bei der Freisetzung von Proteinen aus post-Golgi Vesikeln, nachdem diese an die Membran angedockt haben, ausüben. Diese Regulation könnte nur manche Proteine betreffen, deren Vesikel dann nicht vollständig mit der Membran fusionieren, während andere Vesikel ihren Inhalt in die Membran freisetzen können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte die Funktion des bislang unbekanntes Proteins Fgy1/Efr3 aus der Hefe *S. cerevisiae* charakterisiert werden. Die Funktionsanalyse des Proteins wurde für unterschiedliche zelluläre Prozesse der Hefe durchgeführt. Eine Klärung der Funktion von Fgy1 sollte helfen, seinen inhibitorischen Effekt auf die Funktionalität der heterolog in Hefe exprimierten Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 aus Säugetieren zu verstehen.

Saccharosedichtegradientenzentrifugationsexperimente und Nachweis eines Fgy1-GFP Fusionsproteins deuteten auf eine Lokalisierung von Fgy1 an der Plasmamembran bzw. in endosomalen Vesikeln hin. Phänotyp-Microarray-Analysen eines *fgy1*-Deletionsstammes zeigten eine pleiotrophe Funktion des Proteins an. In verschiedenen Experimenten konnte ein genereller Einfluss von Fgy1 auf den intrazellulären Transport von Plasmamembranproteinen oder die Phospholipidzusammensetzung der Plasmamembran ausgeschlossen werden. Untersuchungen des *PHO*-Signalweges deuteten auf eine Funktion von Fgy1 bei der Phosphataufnahme hin.

Mittels einer Transposongenbank wurden mit *HTA1* und *CTR9* weitere Gene gefunden, deren Deletion eine funktionelle Expression von GLUT1 in der Hefe erlauben. Die Produkte beider Gene spielen eine Rolle in der Transkription. Aber weder für die *hta1*-Deletion noch die *fgy1-1* Mutation konnte ein Effekt auf den Expressionslevel des GLUT1-Proteins nachgewiesen werden. Einen ebenfalls positiven Effekt auf die funktionelle Expression von GLUT1 zeigte eine Deletion von *ERG6*, das für die C-24 Sterol-Methyltransferase im Ergosterolbiosyntheseweg kodiert.

Untersuchungen mit Sekretionsmutanten der Hefe deuteten auf eine Funktion von Fgy1 bei der Fusion von sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran nach der Bildung des SNARE-Komplexes. Auch der Nachweis einer fehlenden Zugänglichkeit des GLUT1-Proteins von ausserhalb der Zelle über Modifizierung mit TNBS und anschließende Detektion von GLUT1 ließ darauf schließen, dass das Fgy1 Protein eine korrekte Insertion von GLUT1 in die Plasmamembran der Zellen verhindert. Rekonstitution des Transporters in Liposomen ergab jedoch eine von Fgy1 unabhängige Glukosetransportaktivität. Eine Blockierung der Endozytose in *rsp5*-Mutantenstämmen der Hefe führte nicht zu einer funktionellen Expression von GLUT1.

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse auf eine Beteiligung von Fgy1 bei der Fusion von sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran. Es wurden einige Hinweise erhalten, die dafür sprechen, dass Fgy1, nachdem post-Golgi Vesikel über den SNARE-Komplex an die Membran gebunden wurden, eine regulatorische Funktion dahingehend ausübt, welche Proteine in die Plasmamembran inseriert werden.

6 ANHANG

6.1 Datenblatt zu den Ergebnissen der Phänotyp-Microarrays

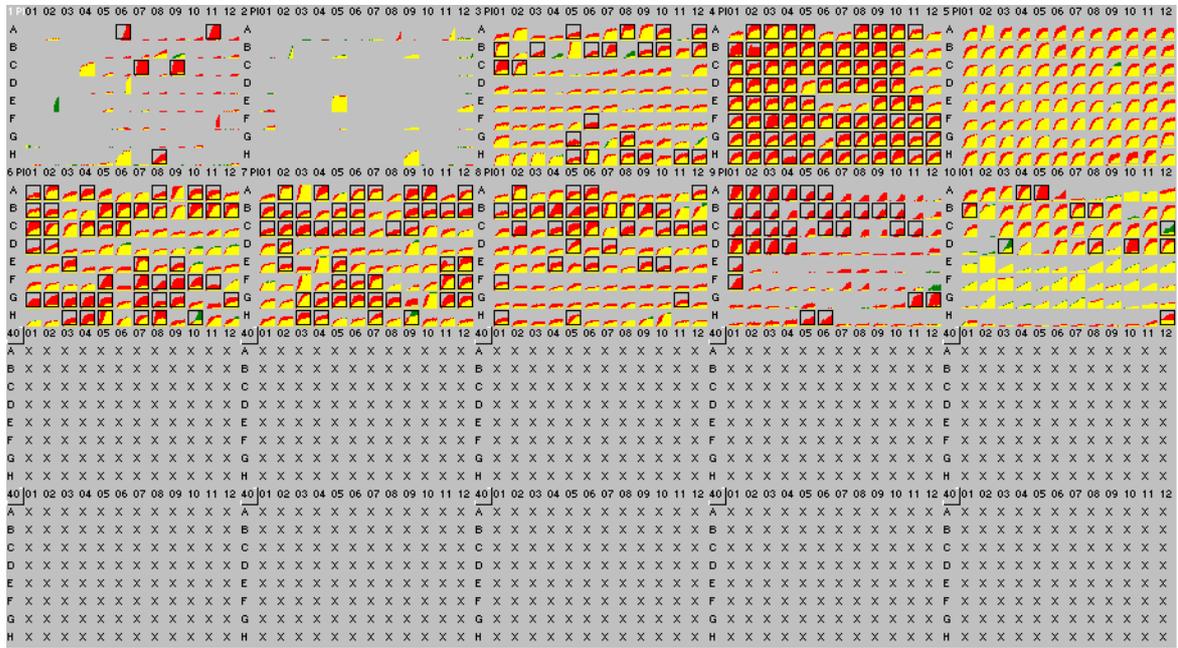


Abb. 33: Farbliche Darstellung der Ergebnisse der Phänotyp-Microarrays. Dem Teststamm RWY95-1A ($\Delta fgy1$) ist die Farbe grün, dem Referenzstamm RWY95-1D ($FGY1$) die Farbe rot zugeteilt. Wo beide Stämme überlappen, ist die Kurve in gelb dargestellt. Schwarze Quadrate bedeuten, dass das Ergebnis reproduzierbar war und es sich nicht um technische Artefakte handelt. Es wurden Tests in zehn Mikrotiterplatten durchgeführt. Platten 1 und 2: Kohlenstoffquellen; Platte 3: Stickstoffquellen; Platte 4: Phosphor- und Schwefelquellen; Platte 5: Nährstoffergänzungen; Platten 6, 7 und 8: Peptid-Stickstoffquellen; Platte 9: Osmolyte; Platte 10: pH-Werte.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aalto, M.K., Ronne, H. und Keränen, S. (1993) Yeast syntaxins Sso1 and Sso2 belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *EMBO* **12**: 4095-4104
- Aaronheim, A., Zandi, D., Hennemann, H., Elledge, S.J. und Karin, M. (1997) Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 3094-3102
- Abeliovich, H., Grote, E., Novick, P. und Ferro-Novick, S. (1998) Tlg2p, a yeast syntaxin homolog that resides on the golgi and endocytic structures. *J. Biol. Chem.* **273**: 11719-11727
- Allard, W.J. und Lienhard, G.E. (1985) Monoclonal antibodies to the glucose transporter from human erythrocytes. Identification of the transporter as a Mr= 55,000 protein *J. Biol. Chem.* **260**: 8668-8675
- Auesukaree, C., Homma, T., Kaneko, Y. und Harashima, S. (2003) Transcriptional regulation of phosphate-responsive genes in low-affinity phosphate-transporter-defective mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**: 843-850
- Augustin, R., Carayannopoulos, M.O., Dowd, L.O., Phay, J.E., Moley, J.F. und Moley K.H. (2004) Identification and characterization of human glucose transporter-like protein-9 (GLUT9): alternative splicing alters trafficking. *J. Biol. Chem.* **279**: 16229-16236
- Bagnat, M., Keranen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A. und Simons, K. (2000) Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 3254-3259
- Baldwin, S.A. (1993) Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1154**: 17-49
- Balzi, E., Wang, M., Leterme, S., Van Dyck, L. und Goffeau, A. (1994) *PDR5*, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator *PDR1*. *J. Biol. Chem.* **269**: 2206-2214
- Bard, M., Lees, N.D., Burrows, L.S. und Kleinhaus, F.W. (1978) Differences in crystal violet uptake and cation-induced death among yeast sterol mutants. *J. Bacteriol.* **135**: 1146-1148
- Becker, J. und Boles, E. (2003): A modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L-arabinose and produces ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 4144-50
- Bennet, M.K. (1995) SNAREs and the specificity of transport vesicle targeting. *7*: 581-586
- Birnbaum MJ (1989) Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell* **57**: 305-15
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic. Acids Res.* **7**: 1513-1523
- Bitman, J. und Wood, D.L. (1982) An improved copper reagent for quantitative densitometric thin-layer chromatography of lipids. *J. Liquid Chromatogr.* **5**: 1155-1162
- Bjorbaek, C., Echwald, S.M., Hubricht, P., Vestergaard, H., Hansen, T., Zierath, J. und Pedersen, O. (1994) Genetic variants in promoters and coding regions of the muscle glycogen synthase and the insulin-responsive GLUT4 genes in NIDDM. *Diabetes* **43**: 976-983
- Bochner, B.R., Gadzinski, P. und Panomitros, E. (2001) Phenotype MicroArrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res.* **11**: 1246-1255
- Boeke, J.D., Lacroute, F. und Fink, G.R. (1984) A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphat decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* **197**: 345-346

- Boles, E. und Miosga, T. (1995) A rapid and highly efficient method for PCR-based site-directed mutagenesis using only one new primer. *Curr. Genet.* **28**: 197-198
- Botstein, D., Falco, S.C., Stewart, S.E., Brennan, M., Scherer, S., Stinchcomb, D.T., Struhl, K. und Davis, R.W. (1997) Sterile host yeasts (SHY): A eukaryotic system of biological containment for recombinant DNA experiments. *Gene* **8**: 17-24
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Brandt, W.F., Patterson, K. und von Holt, C. (1980) The histones of yeast. *Eur. J. Biochem.* **110**: 67-76
- Brennwald, P., Kearns, B., Champion, K., Keränen, S., Bankaitis, V. und Novick, P. (1994) Sec9 is a SNAP-25-like component of a yeast SNARE complex that may be effector of Sec4 function in exocytosis. *Cell* **79**: 245-258
- Brown, G.K. (2000) Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* **23**:237-246
- Brown, D.A. und London, E. (1998) Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**: 111-136
- Bryant, N.J., Govers, R. und James, D.E. (2002) Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Mol. Cell Biol.* **3**: 267-277
- Bun-Ya, M., Nishimura, M., Harashima, S. und Oshima, Y. (1991) The *PHO84* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 3229-3238
- Bun-Ya, M., Shikata, K., Nakade, S., Yompakdee, C., Harashima, S. und Oshima, Y. (1996) Two new genes, *PHO86* and *PHO87*, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **29**: 344-351
- Burns, N., Grimwade, B., Ross-Macdonald, P.B., Choi, E., Finberg, K., Roeder, G.S. und Snyder, M. (1994) Large-scale analysis of gene expression protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **8**: 1087-1105
- Cairns, M.T., Elliot, D.A., Scudder, P.R. und Baldwin, S.A. (1984) Proteolytic and chemical dissection of the human erythrocyte glucose transporter *Biochem. J.* **221**: 179-188
- Carayannopoulos, M.O., Schlein, A., Wyman, A., Chi, M., Keembiyehetty, C. und Moley, K.H. (2004) GLUT9 is differentially expressed and targeted in the preimplantation embryo. *Endocrinology* **145**: 1435-1443
- Carlson, M. und Botstein, D. (1982) Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell* **28**: 145-54
- Chamberlain, L.H. und Gould, G.W. (2002) The v- and t-SNARE proteins that mediate Glut4 vesicle fusion are localised in detergent-insoluble lipid rafts present on distinct intracellular membranes. *J. Biol. Chem.* **277**: 49750-49754
- Chandler, J.D., Williams, E.D., Slavin, J.L., Best, J.D. und Rogers, S. (2003) Expression and localization of GLUT1 and GLUT12 in prostate cancer. *Cancer* **97**: 2035-2042
- Cheng, C., Mu, J., Farkas, I., Huang, D., Goebel, M.G. und Roach, P.J. (1995) Requirement of the self-glucosylating initiator proteins Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 6632-6640
- Choe, J., Kolodrubetz, D. und Grunstein, M. (1982) The two histone H2A genes encode similar protein subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 1484-1487
- Cushman, S.W. und Wardzale, L.J. (1980) Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **255**: 4758-4762

- Dawson, P.A., Mychaleckyj, J.C., Fossey, S.C., Mihic, S.J., Craddock, A.L. und Bowden, D.W. (2001) Sequence and functional analysis of GLUT10: a glucose transporter in the Type 2 diabetes-linked region of chromosome 20q12-13.1. *Mol. Genet. Metab.* **74**: 186-199
- Desrois, M., Sidell, R.J., Gauguier, D., King, L.M. Radda, G.K. und Clarke K. (2004) Initial steps of insulin signaling and glucose transport are defective in the type 2 diabetic rat heart. *Cardiovasc. Res.* **61**: 288-296
- De Vivo, D.C., Trifiletti, R.R., Jacobson, R.I., Ronen, G.M., Behmand, R.A. und Harik, S.I. (1991) Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay. *N Engl J Med.* **325**: 703-709
- Dickson, R.C. (1998) Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison to mammals. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 27-48
- Diez-Sampedro, A., Hirayama, B.A., Osswald, C., Gorboulev, B., Baumgarten, K., Volk, C, Wright, E.M. und Koepsell, H. (2003) A glucose sensor hiding in a family of transporters. *PNAS* **100**: 11753-11758
- Dlugai, S. (2002) Untersuchungen zur funktionellen Expression des humanen Glukosetransporters GLUT4 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und der Nachweis möglicher Interaktionspartner. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Doege, H., Bocianski, A., Joost, H.G. und Schürmann, A. (2000a) Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain and leukocytes. *Biochem. J.* **350**: 771-776
- Doege, H., Schürmann, A., Bahrenberg, G., Brauers, A. und Joost, H.G. (2000b) GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity. *J. Biol. Chem.* **275**: 16275-16280
- Doege, H., Bocianski, A., Scheepers, A., Axer, H., Eckel, J., Joost, H.G. und Schürmann, A. (2001) Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle. *Biochem. J.* **359**: 443-449
- Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**: 6127-6145
- Dunn, R. und Hicke, L. (2001) Multiple roles for Rsp5p-dependent ubiquitination at the internalization step of endocytosis. *J. Biol Chem.* **276**: 25974-25981
- Eakle, K.A., Bernstein, M. und Emr, S.D. (1988) Characterization of a component of the yeast secretion machinery: identification of the *SEC18* gene product. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 4098-4109
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M. und Wall, R. (1984) Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* **179**: 125-142
- Eriksson, J., Koranyi, L., Bourey R., Schalin-Jannti, C., Widen, E., Mueckler, M., Permutt, A.M. und Groop, L.C. (1992) Insulin resistance in type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients and their relatives is not associated with a defect in the expression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT-4) gene in human skeletal muscle. *Diabetologia* **35**: 143-147
- Fanconi, G. und Bickel, H. (1949) Die chronische aminoacidurie (Aminosäure diabetes oder nephrotisch-glukosurischer Zwergwuchs) bei der Glykogenose und der Cystin Krankheit. *Helvetica paediatrica acta* **4**: 359-396
- Fields, S. und Song, O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245-246
- Fukumoto, H., Seino, S., Imura, H., Seino, Y., Eddy, R.L., Fukushima, Y., Byers, M.G., Shows, T.B. und Bell, G.I. (1988) Sequence, tissue distribution, and chromosomal localization of mRNA encoding a human glucose transporter-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 5434-5438

- Gaber, R.F., Copple, D.M., Kennedy, B.K., Vidal, M. und Bard, M. (1989) The yeast gene *ERG6* is required for normal membrane function but is not essential for biosynthesis of the cell-cycle-sparking sterol. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3447-3456
- Galan, J.M., Moreau, V., André, B., Volland, C. und Haguenaer-Tsapis, R. (1996) Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J. Biol. Chem.* **271**: 10946-10952
- Garvey, W.T., Huecksteadt, T.P. und Birnbaum, M.J. (1989) Pretranslational suppression of an insulin-responsive glucose transporter in rats with diabetes mellitus. *Science* **245**: 60-63
- Garvey, W.T., Maianu, L., Huecksteadt, T.P., Birnbaum, M.J., Molina, J.M. und Ciaraldi, T.P. (1991) Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J. Clin. Invest.* **87**: 1072-1081
- Gietz, R.D. und Sugino, A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527-534.
- Gietz, R.D. und Woods, R.A. (1994) High efficiency transformation in yeast. (Invited Book Chapter) In: Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches, ed. J.A. Johnston, Oxford University Press pp. 121-134
- Gilstring, C.F. und Ljungdahl, P.O. (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**: 31488-31495
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. und Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* **275**: 563-567
- Gordesky, S.E. und Marinetti, G. V. (1973) The asymmetric arrangement of phospholipids in the human erythrocyte membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **50**: 1027-1031
- Gould, G.W., Thomas, H.M., Jess, T.J. und Bell, G.I. (1991) Expression of human glucose transporters in *Xenopus oocytes*: kinetic characterization and substrate specificities of the erythrocytes, liver and brain isoforms. *Biochemistry* **30**: 5139-5145
- Güldener, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J., und Hegemann, J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **24**: 2519-2524
- Hardwick, K.G. und Pelham, H.R. (1994) *SED6* is identical to *ERG6*, and encodes a putative methyltransferase required for ergosterol synthesis. *Yeast* **10**: 265-269
- Hashimoto, M. und James, D.E. (2000) Characterization of insulin-responsive GLUT4 storage vesicles isolated from 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 416-27
- Hediger, M.A., Turk, E. und Wright, E.M. (1989) Homology of the human intestinal Na⁺/glucose and *Escherichia coli* Na⁺/proline cotransporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5748-5752
- Hein, C., Springael, J.-Y., Volland, C., Haguenaer-Tsapis, R. und André, B. (1995) *NPI1*, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Microbiol.* **18**: 77-87
- Hicke, L. (1997) Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins. *FASEB J.* **11**: 1215-1226
- Hirata, D., Yano, K., Miyahara, K. und Miyakawa, T. (1994) *Saccharomyces cerevisiae YDR1*, which encodes a member of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily, is required for multidrug resistance. *Curr. Genet.* **26**: 285-294

- Holman, G.D., Lo Leggio, L. und Cushman, S.W. (1994) Insulin-stimulated GLUT4 glucose transporter recycling. A problem in membrane protein subcellular trafficking through multiple pools. *J. Biol. Chem.* **269**: 17516-17524
- Hresko, R.C., Kruse, M., Strube, M. und Mueckler, M. (1994) Topology of the Glut1 glucose transporter deduced from glycosylation scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **269**: 20482-20488
- Huh, W.K., Falvo, J.V., Gerke, L.C., Carroll, A.S., Howson, R.W., Weissman, J.S. und O'Shea, E.K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**: 686-691
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., Beaudenon, S. und Howley, P.M. (1995) A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 2563-2567
- Ibberson, M., Uldry, M. und Thorens, B. (2000) GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues. *J. Biol. Chem.* **275**: 4607-4612
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. und Sakaki, Y. (2001) A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 4569-4574
- Jacquez, J.A. (1984) Red blood cell as glucose carrier: significance for placental and cerebral glucose transfer. *Am. J. Physiol.* **246**: 289-298
- James, D.E., Brown, R., Navarro, J. und Pilch, P.F. (1988) Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature* **333**: 183-185
- James, D.E., Strube, M. und Mueckler, M. (1989) Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* **338**: 83-87
- Johnson, D.L. (1971) Simultaneous determination of arsenate and phosphate in natural waters. *Environ. Sci. Technol.* **5**: 411-414
- Joost, H.G., Bell, G.I., Best, J.D., Birnbaum, M.J., Charron, M.J., Chen, Y.T., Doege, H., James, D.E., Lodish, H.F., Moley, K.H., Moley, J.F., Mueckler, M., Rogers, S., Schurmann, A., Seino, S. und Thorens, B. (2002) Nomenclature of the GLUT/SLC2A family of sugar/polyol transport facilitators. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**: E974-976
- Joost, H.G. und Thorens, B. (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol. Membr. Biol.* **18**: 247-256
- Kaestner, K.H., Christy, R.J., McLenithan, J.C., Braiterman, L.T., Cornelius, P., Pekala, P.H. und Lane, M.D. (1989) Sequence, tissue distribution, and differential expression of mRNA for a putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3150-3154
- Kaffman, A., Herskowitz, I., Tjian, R. und O'Shea, E.K. (1994) Phosphorylation of the transcription factor *PHO4* by a cyclin-CDK complex, *PHO80-PHO85*. *Science* **263**: 1153-1156
- Kandror, K.V. und Pilch, P.F. (1996) Compartmentalization of protein traffic in insulin-sensitive cells. *Am. J. Physiol.* **271**: E1-14
- Kaneko, Y., Toh-e, A. und Oshima, Y. (1982) Identification of the genetic locus for the structural gene and a new regulatory gene for the synthesis of repressible alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **2**: 127-137
- Karylowski, O., Zeigerer, A., Cohen, A. und McGraw, T.E. (2004) GLUT4 is retained by an intracellular cycle of vesicle formation and fusion with endosomes. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 870-882
- Kasahara, M. und Hinkle, P.C. (1977) Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **252**: 7384-90
- Kasahara, T. und Kasahara, M. (1996) Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **315**: 177-182

- Kasahara, T und Kasahara, M (1997) Characterization of rat Glut4 glucose transporter expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: comparison with Glut1 glucose transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1324**: 111-119
- Kaur, R. und Bachhawat, A.K. (1999) The yeast multidrug resistance pump, Pdr5p, confers reduced drug resistance in erg mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **145**: 809-818
- Kayano, T., Burant, C.F., Fukumoto, H., Gould, G.W., Fan, Y.S., Eddy, R.L., Byers, M.G., Shows, T.B., Seino, S. und Bell, G.I. (1990) Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *J. Biol. Chem.* **265**: 13276-13282
- Kayano, T., Fukumoto, H., Eddy, R.L., Fan, Y.S., Byers, M.G., Shows, T.B. und Bell, G.I. (1988) Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J. Biol. Chem.* **263**: 15245-15248
- Khan, A.H. und Pessin, J.E. (2002) Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia* **45**: 1475-1483
- Klepper, J., Wang, D., Fischbarg, J., Vera, J.C., Jarjour, I.T., O'Driscoll, K.R. und De Vivo, D.C. (1999) Defective glucose transport across brain tissue barriers: a newly recognized neurological syndrome. *Neurochem. Res.* **24**: 587-594
- Klepper, J., Willemsen, M., Verrips, A., Guertsen, E., Herrmann, R., Kutzick, C., Flörcken, A. und Voit, T. (2001) Autosomal dominant transmission of GLUT1 deficiency. *Hum. Mol. Genet.* **10**: 63-68
- Koch, C., Wollmann, P., Dahl, M. und Lottspeich, F. (1999) A role for Ctr9p and Paf1p in the regulation of G1 cyclin expression in yeast. *Nucleic Acids Res.* **27**: 2126-2134
- Kölling, R. und Hollenberg, C.P. (1994) The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* **13**: 3261-3271
- Krampe, S., Stamm, O., Hollenberg, C.P. und Boles, E. (1998) Catabolite inactivation of the high-affinity transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS Lett.* **441**: 343-347
- Krogan, N.J., Kim, M., Hoon Ahn, S., Zhong, G., Kobor, M.S., Cagney, G., Emili, A., Shilatifard, A., Buratowski, S. und Greenblatt, J.F. (2002) RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 6979-6992
- Kyte, J. und Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* **157**: 105-132
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lee, W., Ryu, J., Spangler, R.A. und Jung, C.Y. (2000) Modulation of GLUT4 and GLUT1 recycling by insulin in rat adipocytes: kinetics analysis based on the involvement of multiple intracellular compartments. *Biochemistry* **39**: 9358-9366
- Lees, N.D., Bard, M., Kemple, M.D. Hank, R.A. und Kleinhaus, F.W. (1979) ESR determination of membrane order parameter in yeast sterol mutants. *Biochim. Biophys. Acta* **553**: 469-475
- Lenburg, M.E. und O'Shea, E.K. (1996) Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 383-387
- Lenburg, M.E. und O'Shea, E.K. (2001) Genetic evidence for a morphogenetic function of the *Saccharomyces cerevisiae* Pho85 cyclin-dependent kinase. *Genetics* **157**: 39-51

- Lesage, S., Zouali, H., Vionnet, N., Philippi, A., Velho, G., Serradas, P., Passa, P., Demenais, F. und Froguel, P. (1997) Genetic analyses of glucose transporter genes in French non-insulin-dependent diabetic families. *Diabetes Metab.* **23**: 137-142
- Li, Q., Manolescu, A., Ritzel, M., Yao, S., Slugoski, M., Young, J.D., Chen, X.Z. und Cheeseman C.I. (2004) Cloning and functional characterization of the human GLUT7 isoform SLC2A7 from the small intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **287**: G236-242
- Lindquist, B. und Meeuwisse, G. (1962) Chronic diarrhoea caused by monosaccharide malabsorption. *Acta Paediatr.* **51**: 674-685
- Lisinski, I., Schürmann, A., Joost, H.G., Cushman, S.W. und Al-Hasani, H. (2001) Targeting of GLUT6 (formerly GLUT9) and GLUT8 in rat adipose cells. *Biochem. J.* **358**: 517-522
- Litman, B.J. (1974) Determination of molecular asymmetry in the phosphatidylethanolamine surface distribution in mixed phospholipid vesicles. *Biochem.* **13**: 2844-2848
- Longtine, M.S., McKenzie 3rd, A., Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. und Pringle, J.R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 953-961
- Lowe, A.G. und Walmsley, A.R. (1986) The kinetics of glucose transport in human red blood cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **857**: 146-154
- Lucero, P., Herweijer, M. und Lagunas, R. (1993) Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis. *FEBS* **333**: 165-168
- Lund, S., Holman, G.D., Schmitz, O. und Pedersen, O. (1995) Contraction stimulates translocation in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin. *Proc. Natl. acad. Sci. USA* **92**: 5817-5821
- Macheda, M., Rogers, S. und James, D.B. (2004) Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J. Cell. Physiol.*
- Mahe, Y., Lemoine, Y. und Kuchler, K. (1996) The ATP binding cassette transporter Pdr5 and Snq2 of *Saccharomyces cerevisiae* can mediate transport of steroids in vivo. *J. Biol. Chem.* **271**: 25167-25172
- Malone, E.A., Clark, C.D., Chiang, A. und Winston, F. (1991) Mutation in SPT16/CDC68 suppress cis- and trans-acting mutations that affect promoter function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5710-5717
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. und Sambrook, J. (1982) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Marger, M.D. und Saier, M.H. Jr. (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* **18**: 13-20
- Martin, M.G., Lostao, M.P., Turk, E., Lam, J., Kreman, M. und Wright, E.M. (1997) Compound missense mutations in the sodium/D-glucose cotransporter result in trafficking defects. *Gastroenterology* **112**: 1206-1212
- Martinez, P. und Persson, B.L. (1998) Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **258**: 628-638
- McVie-Wylie, A.J., Lamson, D.R. und Chen, Y.T. (2001) Molecular cloning of a novel member of the GLUT family of transporters, SLC2a10 (GLUT10), localized on chromosome 20q13.1: a candidate gene for NIDDM susceptibility. *Genomics* **72**: 113-117
- Mueckler, M. (1994) Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* **219**: 713-725
- Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E. und Lodish, H.F. (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* **229**: 941-945

- Mueller, C.L. und Jaehning, J.A. (2002) Ctr9, Rtf1, and Leo1 are components of the Paf1/RNA polymerase complex. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 1971-1980
- Munn, A.L., Heese-Peck, A., Stevenson, B.J., Pichler, H. und Riezman, H. (1999) Specific sterols required for the internalization step of endocytosis in yeast. *Mol. Biol. Cell* **10**: 3943-3957
- Nishino, T., Hata, S., Taketani, S., Yabusaki, Y. und Katsuki, H. (1981) Subcellular localization of the enzymes involved in the late stage of ergosterol biosynthesis in yeast. *J. Biochem.* **89**: 1391-1396
- Novick, P., Ferro, S. und Schekman, R. (1981) Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* **25**: 461-469
- Novick, P., Field, C. und Schekman, R. (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* **21**: 205-215
- Novick, P. und Schekman, R. (1983) Export of Major Cell Surface Proteins Is Blocked in Yeast Secretory Mutants. *J. Cell Biol.* **96**: 541-547
- Ogawa, N., Noguchi, K., Sawai, H., Yamashita, Y., Yompakdee, C. und Oshima, Y. (1995) Functional domains of Pho81p, an inhibitor of Pho85p protein kinase, in the transduction pathway of P_i signals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 997-1004
- Ogawa, N., DeRisi, J. und Brown, P.O. (2000) New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol. Biol. Cell* **11**: 4309-4321
- Okuyama, T. und Satake, K. (1960) On the preparation and properties of 2,4,6-trinitrophenyl-amino acids and peptides. *J. Biochem.* **47**: 454-466
- Opekarová, M., Robl, I. und Tanner, W. (2002) Phosphatidyl ethanolamine is essential for targeting the arginine transporter Can1p to the plasma membrane of yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1564**: 9-13
- Opekarová, M. und Tanner, W. (2003) Specific lipid requirements of membrane proteins—a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**: 11-22
- Oshima, Y., Ogawa, N. und Harashima, S. (1996) Regulation of phosphate synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* – a review. *Gene* **179**: 171-177
- Oyler, G.A., Higgins, G.A., Hart, R.A., Battenberg, E., Billingsley, ., Bloom, F.E. und Wilson, M.C. (1989) The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J. Cell Biol.* **109**: 3039-3052
- Pascual, J.N., Wang, D., Lecumberry, B., Yang, H., Mao, X., Yang, R. und De Vivo, D.C. (2004) GLUT1 deficiency and other glucose transporter diseases. *Eur. J. Endocrinol.* **150**: 627-633
- Patton, J.L. und Lester, R.L. (1991) The phosphoinositol sphingolipids of *Saccharomyces cerevisiae* are highly localized in the plasma membrane. *J. Bacteriol.* **173**: 3101-3108
- Persson, B.L., Petersson, J., Fristedt, U., Weinander R., Berhe, A. und Pattison, J. (1999) Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1422**: 255-272
- Phay, J.E., Hussain, H.B. und Moley, J.F. (2000) Cloning and expression analysis of a novel member of the facilitative glucose transporter family, SLC2A9 (GLUT9). *Genomics* **66**: 217-220
- Protopopov, V., Govindan, B., Novick, P. und Gerst, J. (1993) Homologs of the synaptobrevin/VAMP family of synaptic vesicle proteins function on the late secretory pathway in *S. cerevisiae*. *Cell* **74**: 855-861
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. und Séraphin, B. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification. *METHODS* **24**: 218-229

- Ramm, G., Slot, J.W., James, D.E. und Stoorvogel, W. (2000) Insulin recruits GLUT4 from specialized VAMP2-carrying vesicles as well as from the dynamic endosomal/trans-Golgi network in rat adipocytes. *Mol. Biol. Cell.* **11**: 4079-91
- Rayner, D.V., Thomas, M.E. und Trayhurn, P. (1994) Glucose transporters (GLUTs 1-4) and their mRNAs in regions of the rat brain: insulin-sensitive transporter expression in the cerebellum. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **72**: 476-479
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M. und Séraphin, B. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat. Biotechnol.* **17**: 1030-1032
- Rizo, J. und Südhof, T.C. (1998) C₂-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J. Biol. Chem.* **273**: 15879-15882
- Robl, I., Grassl, R., Tanner, W. und Opekarová, M. (2001) Construction of phosphatidylethanolamine-less strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Effect on amino acid transport. *Yeast* **18**: 251-260
- Rogers, S., Macheda, M.L., Docherty, S.E., Carty M.D., Henderson, M.A., Soeller, W.C., Gibbs, E.M., James, D.E. und Best, J.D. (2002) Identification of a novel glucose transporter-like protein-GLUT-12. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **282**: E733-738
- Rogers, S., Docherty, S.E., Slavin, J.L., Henderson, M.A. und Best, J.D. (2003) Differential expression of GLUT12 in breast cancer and normal breast tissue. *Cancer Lett.* **193**: 225-233
- Rondón, A.G., Gallardo, M., García-Rubio, M. und Aguilera, A. (2004) Molecular evidence indicating that the yeast PAF complex is required for transcription elongation. *EMBO reports* **5**: 47-53
- Rossi, G., Salminen, A., Rice, L.M., Brunger, A.T. und Brenwald, P. (1997) Analysis of a yeast SNARE complex reveals remarkable similarity to the neuronal SNARE complex and a novel function for the C terminus of the SNAP-25 homolog, Sec9. *J. Biol. Chem.* **272**: 16610-7
- Rothman, J.E. (1994) Mechanismen of intracellular protein transport. *Nature* **372**: 55-63
- Rotin, D., Staub, O. und Haguenaer-Tsapis, R. (2000) Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J. Membrane Biol.* **176**: 1-17
- Ruiz, J.I. und Ochoa, B. (1997) Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. *J. Lipid Res.* **38**: 1482-1489
- Saier, M.H. Jr. (2000) Families of transmembrane sugar transport proteins. *Mol. Microbiol.* **35**: 699-710
- Sakyo, .und Kitagawa, T. (2002) Differential localization of glucose transporter isoforms in non-polarized mammalian cells: distribution of GLUT1 but not GLUT3 to detergent-resistant membrane domains. *Biochim. Biophys. Acta* **1567**: 165-175
- Santer, R., Schneppenheim, R., Dombrowski, A., Gotze, H., Steinmann, B. und Schaub, J. (1997) Mutations in GLUT2, the gene for the liver-type glucose transporter, in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Nat. Genet.* **17**: 324-326
- Santer, R., Schneppenheim, R., Suter, D., Schaub, J. und Steinmann, B. (1998) Fanconi-Bickel syndrome--the original patient and his natural history, historical steps leading to the primary defect, and a review of the literature. *Eur. J. Pediatr.* **157**: 783-797
- Santer, R., Groth, S., Kinner, M., Dombrowski, A., Berry, G.T., Brodehl, J., Leonard, J.V., Moses, S., Norgren, S., Skovby, F., Schneppenheim, R., Steinmann, B. und Schaub, J. (2002) The mutation spectrum of the facilitative glucose transporter gene SLC2A2 (GLUT2) in patients with Fanconi-Bickel syndrome. *Hum. Genet.* **110**: 21-29
- Sasaki, T., Minoshima, S., Shiohama, A., Shintani, A., Shimizu, A., Asakawa, s., Kawasaki, K. und Shimizu, N. (2001) Molecular cloning of a member of the facilitative glucose transporter gene family GLUT11 (SLC2A11) and identification of transcription variants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**: 1218-1224

- Satake, K., Okuyama, T., Ohashi, M. und Shinoda, T. (1960) The spectrophotometric determination of amine, amino acids and peptides with 2,4,6-trinitrobenzene-1-sulfonic acid. *J. Biochem.* **47**: 654-660
- Satoh, S., Nishimura, H., Clark, A.E., Kozka, I.J., Vannucci, S.J., Simpson, I.A., Quon, M.J., Cushman, S.W. und Holman, G.D. (1993) Use of bismannose photolabel to elucidate insulin-regulated GLUT4 subcellular trafficking kinetics in rat adipose cells. Evidence that exocytosis is a critical site of hormone action. *J. Biol. Chem.* **268**: 17820-17829
- Scheepers, A., Joost, H.G. und Schürmann A. (2004) The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *J. Parenter. Enteral. Nutr.* **28**: 364-371
- Schneider, K.R., Smith, R.L. und O'Shea, E.K. (1994) Phosphate-regulated inactivation of the kinase *PHO80-PHO85* by the CDK inhibitor *PHO81*. *Science* **226**: 122-126
- Seidner, G., Alvarez, M.G., Yeh, J.I., O'Driscoll, K.R., Klepper, J., Stump, T.S., Wang, D., Spinner, N.B., Birnbaum, M.J. und De Vivo, D.C. (1998) GLUT-1 deficiency syndrome caused by haploinsufficiency of the blood-brain barrier hexose carrier. *Nat. Genet.* **18**: 188-191
- Seifert, H.S., Chen, E.Y., So, M. und Heffron, F. (1986) Shuttle mutagenesis: A method for transposon mutagenesis for *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 735-739
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M.C. und Fink, G.R. (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature* **319**: 689-693
- Shulman, G.I. (2000) Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* **106**: 171-176
- Sikorski, R.S. und Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19-27
- Simons, K. und Ikonen, E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**: 569-572
- Smith, S.J., Crowley, J.H. und Parks, L.W. (1996) Transcriptional regulation by ergosterol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 5427-5432
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. und Rothman, J.E. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* **362**: 318-24
- Springael, J.-Y. und André, B. (1998) Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **9**: 1253-1263
- Springael, J.-Y., De Craene, J.O. und André, B. (1999) The yeast Npi1/rsp5 ubiquitin ligase lacking its N-terminal C₂ domain is competent for ubiquitination but not for subsequent endocytosis of the Gap1 permease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **13**: 561-566
- Sternberger, L.A., Hardy, P.H. Jr., Cuclis, J.J. und Meyer, H.G. (1970) The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J. Histochem. Cytochem.* **18**: 315-333
- Suomalainen, H., Linko, M. und Oora, E. (1960) Changes in the phosphatase activity of Baker's yeast during the growth phase and location of the phosphatases in the yeast cell. *Biochim. Biophys. Acta* **37**: 482-90
- Suzuki, K. und Kono, T. (1980) Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 2524-2545
- Takata, K., Kasahara, T., Kasahara, M., Ezaki, O. und Hirano, H. (1990) Erythrocyte/ HepG2-type glucose transporter is concentrated in cells of blood-tissue barriers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**: 67-73
- Tanner, L.I. und Lienhard, G.E. (1987) Insulin elicits a redistribution of transferrin receptors in 3T3-L1 adipocytes through an increase in the rate constant for receptor externalization. *J. Biol. Chem.* **262**: 8975-8980

- Toh-e, A., Ueda, Y., Kakimoto, S.-I. und Oshima, Y. (1973) Isolation and characterization of acid phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **113**: 727-738
- Toh-e, A. und Shimauchi, T. (1986) Cloning and sequencing of the *PHO80* gene and *CEN15* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **2**: 129-139
- Toh-e, A., Tanaka, A., Uesono, Y. und Wickner, R.B. (1988) *PHO85*, a negative regulator of the *PHO* system, is a homolog of a protein kinase gene, *CDC28*, of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 162-164
- Turk, E., Zabel, B., Mundlos, S., Dyer, J. und Wright, E.M. (1991) Glucose/galactose malabsorption caused by a defect in the Na⁺/glucose cotransporter. *Nature* **350**: 354-6
- Uesono, Y., Tanaka, K. und Toh-e, A. (1987) Negative regulators of the *PHO* system in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation and structural characterization of *PHO85*. *Nucleic Acids Res.* **15**: 10299-10309
- Uldry, M., Ibberson, M., Horisberger, J.D., Chatton, J.Y., Riederer, B.M. und Thorens, B. (2001) Identification of a mammalian H(+)-myo-inositol symporter expressed predominantly in the brain. *EMBO J.* **20**: 4467-4477
- Umeybayashi, K. und Nakano, A. (2003) Ergosterol is required for targeting of tryptophan permease to the yeast plasma membrane. *J. Cell Biol.* **161**: 1117-1131
- van der Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anruka, Y., Poolman, B. und Konings, W.N. (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* **59**: 304-322
- Voss, D. (2001) Molekulargenetische Untersuchungen zur Funktion des *FGY1*-Gens bei der Expression heterologer Glukosetransporter in *Saccharomyces cerevisiae*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Walmsley, A.R., Barrett, M.P., Bringaud, F. und Gould, G.W. (1998) Sugar transporters from bacteria, parasites and mammals: structure-activity relationships. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 476-481
- Walworth, N.C., Brenwald, P., Kabcenell A.K., Garret, M. und Novick, P. (1992) Hydrolysis of GTP by Sec4 protein plays an important role in vesicular transport and is stimulated by a GTPase-activating protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2017-2028
- Wang, G., Yang, J. und Huibregtse, J.M. (1999) Functional domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 342-352
- Wang, D., Kranz-Eble, P. und De Vivo, D.C. (2000) Mutational analysis of GLUT1 (SLC2A1) in Glut-1 deficiency syndrome. *Hum. Mutat.* **16**: 224-231
- Wang, G., McCaffery, J.M., Wendland, B., Dupré, S., Haguenaer-Tsapis, R. und Huibregtse, J.M. (2001) Localization of the Rsp5p ubiquitin-protein ligase at multiple sites within the endocytic pathway. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 3564-3575
- Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science* **123**: 309-314
- Weisman, L.S., Bacallao, R. und Wickner, W. (1987) Multiple methods of visualizing the yeast vacuole permit evaluation of its morphology and inheritance during the cell cycle. *J. Cell Biol.* **105**: 1539-1547
- Wells, R.G., Mohandas, T.K. und Hediger, M.A. (1993) Localization of the Na⁺/glucose cotransporter gene SGLT2 to human chromosome 16 close to the centromere. *Genomics* **17**: 787-789
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C. P. und Boles, E. (1999) Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **464**: 123-128
- Wieczorke, R. (2001) Molekulargenetische und physiologische Untersuchungen zur Funktion von *FGY1* bei der heterologen Expression von Glukosetransportern in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- Wieczorke, R., Dlugai, S., Krampe, S. und Boles, E. (2003) Characterisation of mammalian GLUT glucose transporters in a heterologous yeast expression system. *Cell. Physiol. Biochem.* **13**: 123-134
- Wirth, R. (1993) Elektroporation: Eine alternative Methode zur Transformation von Bakterien mit Plasmid DNA. *Forum Mikrobiologie* **11**: 507-515
- Wood, S. und Trayhurn, P. (2003) Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br. J. Nutr.* **89**: 3-9
- Wu, X. und Freeze, H.H. (2002) GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics* **80**: 553-557
- Wu, X., Li, W., Sharma, V., Godzik, A. und Freeze, H.H. (2002) Cloning and characterization of glucose transporter 11, a novel sugar transporter that is alternatively spliced in various tissues. *Mol. Genet. Metab.* **76**: 37-45
- Wykoff, D.D. und O'Shea, E.K. (2001) Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **159**: 1491-1499
- Yi, C.K., Charalambous, B.M., Emery, V.C. und Baldwin, S.A. (1992) Characterization of functional human erythrocyte-type glucose transporter (GLUT1) expressed in insect cells using a recombinant baculovirus. *Biochem. J.* **283**: 643-646
- Younes, M., Brown, R.W., Mody, D.R., Fernandez, L. und Lechago, J. (1997) Immunohistochemical detection of Glut3 in human tumors and normal tissues. *Anticancer Res.* **17**: 2747-2750
- Zamora-Leon, S.P., Golde, D.W., Concha, I.I., Rivas, C.I., Delgado-Lopez, F., Baselga, J., Nualart, F. und Vera, J.C. (1996) Expression of the fructose transporter GLUT5 in human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 1847-1852
- Zhao, F.O., Miller, P.J., Wall, E.H., Zheng, Y.C., Dong, B., Neville, M.C. und McFadden T.B. (2004) Bovine glucose transporter GLUT8: cloning, expression, and developmental regulation in mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta* **1680**: 103-113
- Zimmermann, F.K. (1975) Procedures used in the induction of mitotic recombination and mutation in the yeast. *Mutation Res.* **31**: 71-81
- Zinser, E., Sperka-Gottlieb, C.D.M., Fasch, E.V., Kohlwein, S.D., Paltauf, F. und Daum, G. (1991) Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **173**: 2026-2034
- Zweytick, D., Hrastnick, C., Kohlwein, S.D. und Daum, G. (2000) Biochemical characterization and subcellular localization of the sterol C-24(28) reductase, Erg4p, from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **470**: 83-87

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ade	Adenin
AK	Antikörper
Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
bp	Basenpaare
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
5-FOA	„5-Fluoroorotic acid“
g	Erdbeschleunigung
Glu	Glutamat
h	Stunde
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
Lys	Lysin
min	Minuten
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>S. c.</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TNBS	Trinitrobenzol-Sulfonsäure
TNP	Trinitrophenol
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan

ts	temperatursensitiv
U	Einheit der Enzymaktivität
Ura	Uracil
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Danksagungen

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. C. P. Hollenberg für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation am Institut für Mikrobiologie durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. C. P. Hollenberg, Herrn Prof. Dr. H. Büneman und Herrn Prof. Dr. E. Boles danke ich für die freundliche Übernahme des Referats bzw. der Koreferate.

Bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe möchte ich mich für das freundschaftliche Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit und für die stetige Hilfsbereitschaft bei der Beantwortung jeglicher Fragen bedanken.

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

Meinen Eltern und meiner Familie möchte ich besonders für die ständige Unterstützung während des Studiums und der Promotion danken.

Eidesstattliche Erklärung

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

Dörthe Voss

Düsseldorf, den 06.01.2005