

# Untersuchung der Bifunktionalität des endosomalen Proteins Snf7

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

vorgelegt von Stefanie Huppert  
aus Schleswig

Düsseldorf 2005

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

Referent: Prof. Dr. R. Kölling

Koreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2005

---

# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>4</b>
1.1 Proteintransport in Hefe.....	4
1.2 Der endozytische Weg.....	5
1.3 Vps-Mutanten.....	8
1.4 Die ESCRT-Maschinerie .....	10
1.5 Die ESCRTIII-Komponente Snf7 .....	12
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Stämme und Medien .....</b>	<b>15</b>
2.1.1 Bakterienstämme .....	15
2.1.2 Medien und Anzucht von <i>E. coli</i> .....	15
2.1.3 Hefestämme.....	15
2.1.4 Medien und Anzucht von Hefestämmen .....	17
<b>2.2 Plasmide .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Synthetische Oligonukleotide.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 Chemikalien und Enzyme.....</b>	<b>23</b>
<b>2.5 Antikörper .....</b>	<b>24</b>
<b>2.6 Transformationen .....</b>	<b>25</b>
2.6.1 Transformation von <i>E. coli</i> .....	25
2.6.2 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	25
<b>2.7 Präparation von Nukleinsäuren.....</b>	<b>26</b>
2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	26
2.7.1.1 Alkalische Lyse .....	26
2.7.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mit Säulen .....	26
2.7.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	26
2.7.3 Isolierung von Nukleinsäurefragmenten aus Agarosegelen .....	27
2.7.4 Reinigung von PCR-Fragmenten .....	27
2.7.5 Restriktion von Nukleinsäuren.....	27
2.7.6 Entfernung von Überhängen an 3 Enden .....	28
2.7.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	28
2.7.8 DNA-Ligation .....	28
2.7.9 Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten durch Gel-Elektrophorese .....	29
2.7.10 Sequenzierung von DNA-Fragmenten .....	29
2.7.11 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren.....	29
2.7.12 PCR-Amplifikation von Nukleinsäuren .....	30
2.7.13 Spezifische Amplifikation von Plasmid-DNA .....	30
2.7.14 Spezifische Amplifizierung chromosomaler DNA.....	30
2.7.15 Kolonie-PCR zur Überprüfung von Deletionen in <i>S.cerevisiae</i> .....	31
2.7.16 Isolierung von Ribonukleinsäuren aus Hefe.....	32
<b>2.8 DNA-RNA-Hybridisierung („Northern-Blot“-Analyse) und Detektion.....</b>	<b>32</b>
2.8.1 Elektrophoretische Auftrennung von RNA auf Formaldehydgelen .....	32
2.8.2 Kapillarblot-Aufbau .....	33

# Inhaltsverzeichnis

---

2.8.3 Hybridisierung.....	33
<b>2.9 Analyse von Proteinen .....</b>	<b>34</b>
2.9.1 Herstellung von Hefe-Rohextrakten.....	34
2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	35
2.9.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blotting .....	35
2.9.4 Phosphatasebehandlung von Proteinen .....	36
2.9.5 Co-Immunopräzipitation .....	36
2.9.6 Präparation von Fusionsproteinen.....	36
2.9.7 Aufreinigung von Fusionsproteinen.....	37
2.9.8 Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	38
<b>2.10 Zellfraktionierungen.....</b>	<b>38</b>
2.10.1 Differentielle Zentrifugation .....	38
2.10.2 Flotation Gradienten.....	39
2.10.3 Sucrose-Dichte-Gradienten .....	40
<b>2.11 Pulse Chase Experimente und Immunopräzipitation.....</b>	<b>40</b>
2.11.1 Pulse-Chase-Experiment .....	40
2.11.2 CPY-Sorting .....	41
2.11.3 Immunopräzipitation .....	41
<b>2.12 Immunfluoreszenz.....</b>	<b>42</b>
<b>2.13 Tropftests .....</b>	<b>42</b>
<b>2.14 Gendelektion in <i>S. cerevisiae</i> .....</b>	<b>43</b>
<b>2.15 <i>SNF7</i>-Mutagenese .....</b>	<b>43</b>
<b>2.16 Invertase-Assay .....</b>	<b>44</b>
<b>2.17 Isolierung von Zellkernen.....</b>	<b>44</b>
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 Untersuchung der Wachstumsphänotypen von Deletionsmutanten der <i>SNF7</i>-Familie .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2 Untersuchung der Snf7-Funktionen.....</b>	<b>48</b>
3.2.1 PCR-Mutagenese von <i>SNF7</i> .....	48
3.2.2 Untersuchung der Ste6-Stabilisierung in <i>snf7</i> -Mutanten.....	53
3.2.3 CPY-Sorting-Defekt.....	55
3.2.4 Messung der <i>SUC2</i> -Aktivität in <i>snf7</i> -Mutanten .....	57
3.2.5 Untersuchung der Membranassoziation von Snf7-Mutanten .....	58
3.2.5.1 Charakterisierung der Membranassoziation von Snf7 mit Flotationsexperimenten .....	58
3.2.5.2 Zellfraktionierung von Snf7 durch Differentielle Zentrifugation .....	60
3.2.5.3 Fraktionierung von Snf7 im Sucrose-Dichte-Gradienten .....	63
3.2.6 Konstruktion einer Snf7-Mutante durch „Site-directed mutagenesis“ .....	65
<b>3.3 Untersuchung der Protein-Protein Interaktionen von Snf7 .....</b>	<b>66</b>
3.3.1 Unterteilung von Snf7 in vier Domänen.....	66
3.3.2 Two-Hybrid Analyse.....	67
3.3.3 Native Co-Immunopräzipitation von Snf7 und seinen Interaktionspartnern.....	70
3.3.4 Untersuchung des Einflusses von $\Delta snf7$ auf den Turnover von Bro1, Rim13, Rim20 und Ygr122w .....	72
3.3.5 Untersuchung von Snf7-Interaktionspartner auf Funktionen im endozytischen Weg.....	73
<b>3.4 Der Zellkern als Wirkungsort für Snf7.....</b>	<b>75</b>
3.4.1 Untersuchung der Zellkernfunktion von Snf7 .....	75
3.4.1.1 Einfluss von Snf7 auf die Transkription von <i>SUC2</i> .....	75
3.4.1.2 Mig1 als potentielles Zielprotein für Snf7 .....	76

# Inhaltsverzeichnis

---

3.4.2 Lokalisation von Snf7 .....	77
3.4.2.1 Isolierung von Zellkernen.....	77
3.4.2.2 Immunfluoreszenz-Experimente.....	78
<b>3.5 Charakterisierung des Snf7-Interaktionspartners Ygr122w .....</b>	<b>80</b>
3.5.1 Wachstumsdefekt der <i>YGR122W</i> -Deletion auf Raffinose .....	80
3.5.2 Untersuchung der Membranassoziation von Ygr122w .....	81
3.5.2.1 Untersuchungen der Membranassoziation durch Flotations-Experimente .....	81
3.5.2.2 Untersuchung der Membranassoziation mit differentieller Zentrifugation.....	82
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>84</b>
4.1 Trennung der Snf7 Funktionen durch Mutagenese.....	84
4.2 Die Funktion von Snf7 im Zellkern .....	87
4.3 Charakterisierung des Snf7-Interaktionspartners Ygr122w .....	89
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>92</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>93</b>
<b>7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>99</b>

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Proteintransport in Hefe

Die eukaryotische Zelle besitzt eine Reihe von Proteintransportwegen, die für einen kontinuierlichen Austausch und Nachschub von Komponenten innerhalb der Zelle sorgen und somit die Zellintegrität aufrechterhalten.

Ein Großteil der neu synthetisierten Proteine werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) gefaltet und zum Golginetzwerk transportiert. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Transmembranproteine des ERs, des Golgiapparates, der Lysosomen, Endosomen, sekretorischer Vesikel und der Plasmamembran. Vom Golginetzwerk aus erfolgt die weitere Verteilung dieser Proteine auf verschiedenen Transportwegen. Die richtige Verteilung der Membranproteine wird durch proteininterne Signalsequenzen gewährleistet, die auch für den korrekten Einbau in die Zielmembranen verantwortlich sind.

Ein Haupttransportweg ist der Sekretionsweg. Über ihn werden Proteine in Vesikeln sowohl zur Vakuole, als auch zur Zelloberfläche transportiert. Hierbei besitzt das *trans*-Golgi Kompartiment eine wichtige Verteilerfunktion, da von ihm mindestens drei verschiedene Transportwege ausgehen. Eine Sorte von Vesikeln transportiert lösliche und Vakuolenmembran-Proteine zum prävakuolären Kompartiment (PVC) (Horazadovsky *et al.*, 1995; Conibear und Stevens, 1995), das ein endosomales Kompartiment ist, welches Proteine entweder in Richtung Vakuole, entlang des endozytischen Weges weiterleitet, oder Proteine wieder zurück zur Plasmamembran sortiert. Ferner wurden von Harsay und Bretscher (1995) zwei weitere Vesikeltypen identifiziert, die verschiedene Arten von Proteinen und Enzymen direkt zur Plasmamembran transportieren. Der Transport von Plasmamembran- und Zellwandkomponenten ist wichtig für das Wachstum der Zelle. Mutanten mit einer Blockade des sekretorischen Weges haben ein defektes Zellwandwachstum (Novick und Sheckman, 1979, 1983; Novick *et al.*, 1980; Pryer *et al.*, 1992).

Weitere Transportwege, die das *trans*-Golginetzwerk als Verteilstation nutzen, sind der CPY-Weg und der ALP-Weg. Der CPY-Weg ist ein biosynthetischer Weg über den neusynthetisierte Proteine und Enzyme zur Vakuole bzw. Vakuolenmembran transportiert werden. Das Modellprotein, mit dessen Hilfe der CPY-Weg

charakterisiert wurde, ist die Carboxypeptidase Y. Sie ist eine vakuoläre Hydrolase, die auf ihrem Weg zur Vakuole das ER, den Golgi-Apparat und eine endosomale Struktur, das prävakuoläre Kompartiment (PVC) durchläuft. Während des Durchlaufens dieser Kompartimente erfährt die CPY verschiedene posttranslationale Modifikationen, die jeweils spezifisch für ein Kompartiment sind. Diese Modifikationen in Form von Glykosylierung und proteolytischer Spaltung führen zu den unterschiedlichen Formen, der p1- (ER), p2- (Golgi) und der reifen m-Form (Vakuole) (Stevens *et al.*, 1982).

Der ALP- (alkalische Phosphatase) Weg umgeht die endosomalen Kompartimente. Die in Golgivesikel verpackten Proteine (dazu zählen ALP und das vakuoläre Syntaxin Vam3) werden direkt zur Vakuole transportiert (Piper *et al.*, 1997). Das Signal für diesen Transportweg liegt am zytosolischen Ende der alkalischen Phosphatase. Fehlt diese Signalsequenz, so erfolgt der Transport des Proteins über den endosomalen Weg (Piper *et al.*, 1997).

Bei Proteinen, die über den CVT- („cytoplasm-to-vacuole targeting“) Weg in die Vakuole transportiert werden, erfolgt keine Verteilung über das *trans*-Golgi Netzwerk. Proteine, wie z. B. die Aminopeptidase I (API) werden direkt aus dem Zytoplasma in die Vakuole transportiert. Wie CPY wird auch API als inaktive Präform synthetisiert und in der Vakuole in seine reife Form überführt. API nutzt für seinen Transport Komponenten des Autophagozytose-Weges.

In diesen Transportwegen erfolgt der Materialaustausch zwischen den Organellen durch Vesikel. Für die Selektion der zu transportierenden Proteine sind Hüllproteine zuständig, die mit ihnen direkt oder indirekt interagieren (Shekman und Orci. 1996; Cosson und Letourneur, 1997; Pishvae und Payne, 1998; Schmid, 1997; Söllner, 1995; Woodman, 1997; Mayer *et al.*, 1996)

## 1.2 Der endozytische Weg

Die Endozytose ist ein Prozess durch den eukaryotische Zellen in der Lage sind extrazelluläre Flüssigkeiten und Partikel sowie Plasmamembranproteine durch Einstülpung der Plasmamembran aufzunehmen. Dies geschieht an bestimmten Stellen der Plasmamembran, den „clathrin-coated pits“. An den „clathrin-coated pits“ konzentrieren sich z. B. Oberflächenproteine, die dann gezielt in Vesikel verpackt werden. Für die Vesikelbildung werden Clathrin und Adaptin gebraucht. Mehrere

## Einleitung

---

Clathrinuntereinheiten bilden zusammen ein Proteingeflecht aus, das auf der dem Zytoplasma zugewandten Membranseite die Ausbildung von „Clathrin-coated-pits“ bewirkt. An die „Clathrin-coated-pits“ bindet Adaptin, das spezifische Oberflächenproteine gebunden hat. Eine Bindung von Adaptin und Clathrin fördert die Biegung der Membran und hilft so bei der Vesikelbildung. Die Abschnürung der Vesikel von der Membran wird von der GTPase Dynamin kontrolliert. Nach abgeschlossener Vesikelbildung wird die Clathrinhülle wieder entfernt und steht für neue Vesikelbildungen zur Verfügung.

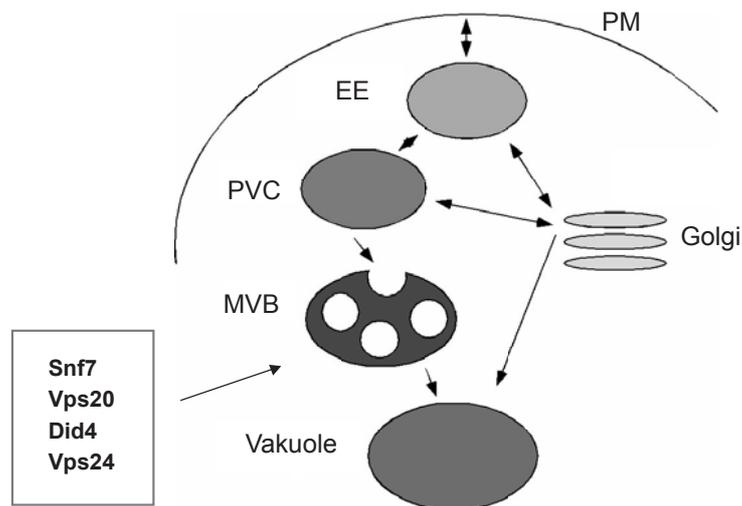
Auf ihrem Weg zur Vakuole passiert das aufgenommene Material mehrere Kompartimente: das frühe Endosom, das „Prevacuolar compartment“ (PVC) und das späte Endosom (Abb. 1). Dies sind membranumschlossene Organellen, die sich in ihrer Morphologie und in ihrer zellulären Lokalisation voneinander unterscheiden. In den frühen Endosomen entscheidet sich, ob die endozytierten Proteine weiter zur Vakuole transportiert werden, oder ob sie wieder zur Zelloberfläche zurückgebracht werden (Recycling) (Gruenberg und Maxfield, 1995). Anschließend durchlaufen Proteine, die auf dem Weg zur Vakuole sind, das PVC, über das auch der Transport von Proteinen aus dem sekretorischen Weg zur Vakuole erfolgt (Vida *et al.*, 1993). Deshalb ist das PVC der Schnittpunkt des biosynthetischen und des endosomalen Weges. In späten Endosomen werden die endozytierten Proteine mit Hilfe der ESCRT- („endosomal sorting complex required for transport“) Maschinerie in Vesikel verpackt. Bei der ESCRT-Maschinerie handelt es sich um drei heterooligomere Komplexe, die für die Rekrutierung und Sortierung von Cargoproteinen an die endosomale Membran zuständig sind (Katzmann, *et al.*, 2001; Babst *et al.*, 2002a; Babst *et al.*, 2002b). Lokalisiert ist sie an späten Endosomen, die in ihrem Inneren Vesikel enthalten („Multivesicular bodies“ /MVBs) (Felder *et al.*, 1990; Gruenberg und Maxfield, 1995). Diese Vesikel entstehen aus Einschnürungen der Endosomenmembran und enthalten das Zellmaterial, das zur Vakuole transportiert werden soll. Die Endosomen wandern zur Vakuole und entlassen dort ihren Inhalt ins Vakuolenlumen durch Fusion mit der Vakuolenmembran. (Babst *et al.*, 2002).

Die Existenz der Endozytose in *S. cerevisiae* wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes „Lucifer Yellow“ (LY), der sich in der Vakuole der Hefezellen anhäuft, nachgewiesen (Riezman, 1985). Das erste Oberflächenprotein, dessen Aufnahme in Hefezellen nachgewiesen werden konnte, war der  $\alpha$ -Faktorrezeptor Ste2 (Chvatchko *et al.*, 1986; Jenness und Spatrick, 1986). Es folgten der a-

## Einleitung

Faktorrezeptor Ste3 (Davis *et al.*, 1993) und der  $\alpha$ -Faktortransporter Ste6 (Berkower *et al.*, 1994, Kölling und Hollenberg, 1994).

Der  $\alpha$ -Faktortransporter Ste6 gehört, zur Familie der ABC- (ATP-Binding-Cassette) Transporter (Kuchler *et al.*, 1989; McGrath und Varshavsky, 1989). Ste6 ist ein integrales Membranprotein, das aus zwei homologen Hälften mit je sechs Transmembrandomänen und aus einer konservierten ATB-Bindedomäne besteht. Die beiden Hälften von Ste6 sind über eine Linkerregion miteinander verbunden. Obwohl Ste6 zur Zelloberfläche transportiert wird, befindet sich Ste6 nur transient an der Zelloberfläche. Es ist ein sehr kurzlebiges Protein und wird, über den Endozytoseweg, schnell zur Vakuole transportiert und dort wieder abgebaut. Die Halbwertszeit von Ste6 beträgt nur ca. 20 min (Kölling und Hollenberg, 1994).



**Abb. 1: Schematische Darstellung von Proteintransportwegen in *S. cerevisiae*.**

Das *trans*-Golginetzwerk verteilt Proteine auf verschiedene Transportwege. Proteine können direkt zur Vakuole über den ALP-Weg transportiert werden oder über ein endosomales Kompartiment (PVC). In sekretorischen Vesikeln werden Proteine auch direkt zur Plasmamembran gebracht, wo sie entweder sekretiert oder in die Membran eingebaut werden. Ferner können Proteine von der Plasmamembran endozytiert und über verschiedene endosomale Kompartimente zur Vakuole transportiert werden. Auch ein Rücktransport der Proteine zur Plasmamembran, kurz nach ihrer Endozytierung, ist möglich; man spricht von einem „Recyclen“ der Proteine. An MVB's sitzen die Proteine des ESCRTIII-Komplexes, die den Proteintransport in die Vakuole regulieren. Die Pfeile geben die Transportrichtung der Proteine an. PM: Plasmamembran; EE: frühe Endosomen; PVC: prävakuoläres Kompartiment, spätes Endosom; MVB: multivesicular body.

### 1.3 Vps-Mutanten

Bei Untersuchungen des endozytischen Weges wurde eine Reihe von Mutanten isoliert, die den Proteintransport in die Vakuole blockieren. Es handelt sich um die Gruppe der *vps*- (vacuolar-protein-sorting) Mutanten. Nachgewiesen wurde ihr Einfluss auf den endozytischen Weg mit Hilfe der Carboxypeptidase Y (CPY), die normalerweise ins Lumen der Vakuole transportiert und dort prozessiert wird, in *vps*-Mutanten aber in der unreifen p2-Form aus der Zelle sekretiert wird (Robinson *et al.*, 1988; Rothman *et al.*, 1989). Wie ihr Name schon sagt, zeigen die *vps*-Mutanten Effekte im Bereich der Vakuolen. Sie zeigen eine vom Wildtyp unterschiedliche Vakuolenmorphologie und wurden aufgrund dieser Unterschiede in die sechs Klassen A-F eingeteilt (Raymond *et al.*, 1992).

Zur Klasse A (class A) gehören *vps*-Mutanten, deren Vakuolenmorphologie der Morphologie in Wildtypzellen entspricht. Klasse B (class B) Mutanten besitzen viele kleine, vakuolenartige Kompartimente, und *vps*-Mutanten der Klasse C (class C) scheinen überhaupt keine Vakuolen zu besitzen (Banta *et al.*, 1988). Vps Klasse C Proteine bilden zusammen mit zwei Proteinen der Klasse B den HOPS-Komplex (Vps11, 16, 18, 33 (Klasse C), 39, 41 (Klasse B)), der an der Fusion von Vakuolen und Transportvesikeln mit der Vakuole beteiligt ist (Rieder und Emr, 1997). Ein Problem mit der Vakuolenvererbung besitzen Klasse D (class D) Mutanten. Mutterzellen dieser Mutanten besitzen Vakuolen, die aber nicht an die Tochterzellen weitergegeben werden (Raymond *et al.*, 1992). Proteine, die zur Klasse D gehören sind u. a. Vps21, Pep12 und Vps45. Zusammen bewirken sie die Fusion von, aus dem *trans*-Golginetzwerk stammenden Vesikeln mit dem PVC (Horazdovsky *et al.*, 1994; Singer-Kruger *et al.*, 1994). In Klasse E Mutanten (class E) kann man ein vergrößertes spätes Endosom an der Vakuole beobachten, in dem sich Proteine (z. B. Ste6 und Ste3) ansammeln, deren Transport zur Vakuole blockiert ist. Mutanten der Klasse F (class F) haben eine Vakuolenmorphologie, die einer Mischung aus Klasse A und B entspricht: Die Zellen besitzen eine große zentrale Vakuole, die von vielen kleineren Vakuolen umgeben ist (Raymond *et al.*, 1992).

Zur Gruppe der class E Proteine gehören Snf7 (Vps32) und Mos10 (Vps60). Sequenzvergleiche zeigten (Abb. 2), dass diese Proteine zusammen mit vier weiteren class E Proteinen (Vps20, Did2 (Vps46), Vps24, Did4 (Vps2)) eine Proteinfamilie bilden (Kranz *et al.*, 2001; Howard *et al.*, 2001). Alle Proteine weisen

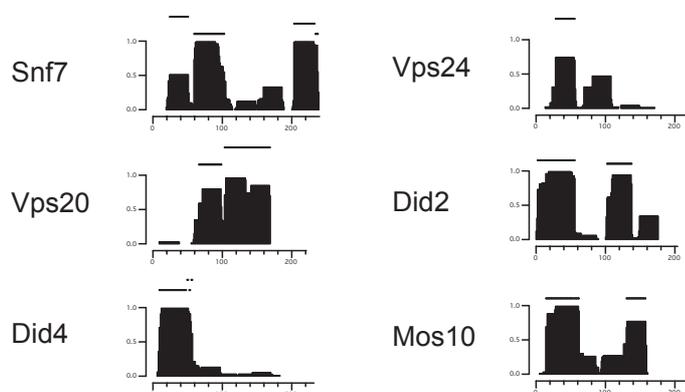
# Einleitung

Did2	1	-----MSR--NSAAGLENTLFQL
Did4	1	-----MSLFEWVFGKNV--TPQERLKKDQRAL
Vps24	1	-----MDYIKKAIWGP--DPKEQQRIRSVL
Snf7	1	-----MWSLSLFGWITS--SNAKNKIESPTKAIT
Vps20	1	-----MGQKSSIKVHITK--TDRAILEVKSISKD
Mos10	1	MGFLAREKVVHLKKVVIGGSQDWLKHYSKLFKAIMNRIFGYGNKSHDQLLQESNQSM
Did2	17	KFTTSKQLQKQANKKASKEEKQETNKLKR-ALNENEDIS----RIYASNAIRKKNERL
Did4	26	ERTQRERERKRLKLELQDKKLVSEIKKSAKNGQVAAA----KVQAKDLVBTRNYIQ
Vps24	25	RKNGRNIEKSLRELITVLQNKTKQLIKKSAKKNQVYRTV----RLYAKELYQLNKQYD
Snf7	24	VRLREHINLLSKKQSHLRRTQITNQENE-ARIFLTKGN----KVMAKNALKIKKTIIE
Vps20	26	E-IHKFTRRTDNLILLVSKSLKDLIRKKNPENYKSNMK----VRFLKRIHYQEHLL
Mos10	58	NQAQQLSNRISQLDITQIAQLNLFQLQNIQKNLQRSNNKQPSLRKQALKILNKRKQLE
Did2	68	QLLK----LASRVDSVASRVQTAVTM-RQVSASMGQVCKGMDKALQNMNLQQLTMI
Did4	78	KFDN----MKALQLQAISLRITQAVRSS-DQMTSRMSSEATGLLAGMNRMTNLPQLQRIS
Vps24	77	RMYT----SRAQLDSDVRMKIDEAIRM-NTLSNQMAADSAGLMREVNLSLVRLLPQLRNTM
Snf7	75	QLLSKVEGTMESMEQQLFSIIESANLN-LETMRAMQEGAKAMKITIHSGLDIDKVDIETM
Vps20	77	QQAS--DQLINLLENMVLTEFLKMT-KQFINGLKNGNEILKKLIN--KEFSNVDEL
Mos10	115	NMKDSLDSQSWSMTQAQLTNDLNQVNT-MITINALKQNTNAMKAQYGIKIDKQLDMQ
Did2	120	DKFEQGFEDLDTSVNVYEDMGVNSDAMLVDNDK-VDELMSKVADFNGLK--QSA
Did4	130	MEFEKQSDLMGQRQEFMDEAIDNVMGDEVEDDEEADELIVNKVLDIETGVDLNSQLQST
Vps24	129	DELKELMKSGIITSEMVDDTMESVGDVGEEMDEAVDEEVNKLIVQYTNKFKVNDQV
Snf7	131	DEIREQVELGDEISDAISRP-LITGANVEVDEDE-JLDEELDMLAQENANQETSIVNN
Vps20	128	DDVQDQIAYQNEIINETLSRSLVGTSNYEDDLDKELDALES ELNPEKMNNAKVANMPS
Mos10	171	DEMDDLIEQGDLELQEVLLAMN-NNISGLELDDISDAELDAELDALAQEDFTLPTSS--ENS
Did2	173	KLDNVPEIKAKEVNVDDDEK-----EDKLAQRRLRALRG-----
Did4	187	PONLVSNAPIAEETAMGIPPEPIGA-----GSEFHGNPDDDLQARLNTLKKQT---
Vps24	186	PTVELAANEIEEQEIPDEKVDDEEA-----DR-----MVNEMRERLRLAQN-----
Snf7	186	NVNAAPISLENKVSLLPSPVSNKIKQSENSVKDGEIEEEDDEDEKALRELQAEMLA
Vps20	185	TEGLPSPQGEQTEQKEREEFATE-----ERSDTKEPLAALLS-----
Mos10	225	LGNMDMPSYLLGANAPPAFIDEDE-----PNLDTEDKNKALLES AQ---

**Abb. 2: Angehörige der „Snf7-Familie“ im Sequenzvergleich.**

Aminosäuresequenzvergleich von Did2, Did4, Vps24, Snf7, Vps20 und Mos10. Identische Aminosäuren sind eingerahmt.

Bereiche mit hoher „coiled-coil“ Bildungswahrscheinlichkeit auf (Abb. 3). Bei „coiled-coils“ handelt es sich um mehrere (2-5), umeinandergewundene  $\alpha$ -Helices, die als Proteininteraktionsdomänen weit verbreitet sind. Möglicherweise bilden die Proteine der Snf7-Familie untereinander oder mit weiteren Proteinen Komplexe aus.



**Abb. 3: Angehörige der „Snf7-Familie“ und ihre Fähigkeit zur Bildung von superspiralisierten  $\alpha$ -Helices („coiled coils“).**

Snf7, Vps20, Did4, Vps24, Did2 und Mos10 wurden mit dem Programm Macstripe 2.0a1 von Alex Knight, basierend auf dem Algorithmus von Andrei Lupas (Lupas, 1996) analysiert. Gezeigt wird die Wahrscheinlichkeit der „coiled coil“-Bildung.

Interessanterweise befinden sich die „coiled-coil“ bildenden Regionen jeweils an unterschiedlichen Stellen der Proteine, woraus man schließen kann, dass auch unterschiedliche Regionen der Proteine für die Proteinwechselwirkungen zuständig

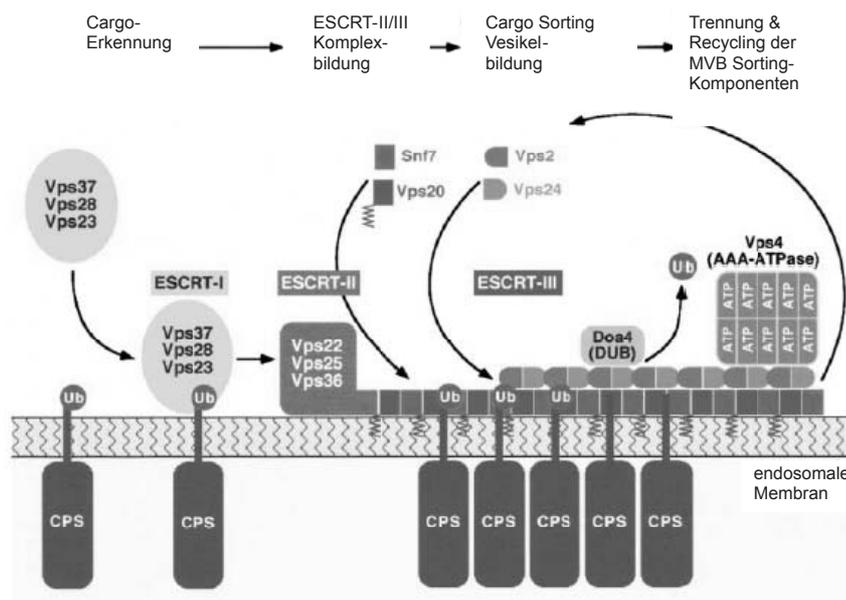
sind. In der Tat wurde eine Komplexbildung von Snf7, Vps20, Vps24 und Did4 beschrieben. Diese vier Proteine bilden zusammen den ESCRTIII- Komplex (Babst *et al.*, 2002b). Mos10 und Did2 konnten bislang noch keinen Proteinkomplexen zugeordnet werden.

### 1.4 Die ESCRT-Maschinerie

Die ESCRT-Maschinerie ist an späten Endosomen lokalisiert und besteht aus den drei heterooligomeren Komplexen ESCRTI, II und III, die für die MVB-Vesikelbildung und für die Sortierung von endozytischen Proteinen in MVB-Vesikel gebraucht werden. Die Proteine der ESCRT-Komplexe gehören zur Gruppe der class E Vps-Proteine, wobei sich die einzelnen Komplexe wie folgt zusammensetzen: ESCRTI (Katzmann *et al.*, 2001) besteht aus Vps23, Vps28 und Vps37, ESCRTII (Babst *et al.*, 2002a) ist zusammengesetzt aus Vps22, Vps25 und Vps36 und ESCRTIII (Babst *et al.*, 2002b) besteht aus Vps20, Snf7 (Vps32), Vps24 und Did4 (Vps2). Die einzelnen Proteine, aus denen sich die drei Komplexe zusammensetzen, sind hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert und werden bei Bedarf an die Endosomenmembran zur Komplexbildung rekrutiert. Diese drei Komplexe funktionieren kaskadenartig hintereinander. ESCRTI ist in der Lage Ubiquitin zu binden, das als Proteinmodifikation als Abbausignal für Proteine dient. Wahrscheinlich erfolgt die Bindung über die „UBC-like domain“ von Vps23 (Katzmann *et al.*, 2001). Auf diese Weise werden ubiquitinierte Cargoproteine am Endosom von ESCRTI erkannt und gebunden. Anschließend erfolgt die Aktivierung von ESCRTII durch ESCRTI. Der genaue Ablauf dieser Aktivierung ist unbekannt, jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass zumindest die Rekrutierung von ESCRTII an die Endosomenmembran nicht von ESCRTI reguliert wird. Auch eine physische Interaktion zwischen diesen beiden Komplexen konnte bislang nicht gezeigt werden (Babst *et al.*, 2002a). ESCRTII liegt transient mit der endosomalen Membran assoziiert vor. Es bindet an das myristoylierte Vps20-Protein und setzt so die Rekrutierung von Vps20 und Snf7 aus dem Zytoplasma an die Endosomenmembran in Gang. Vps20 und Snf7 liegen löslich im Zytoplasma vor. Nach der Rekrutierung an die Endosomenmembran oligomerisieren sie zu einem membranassoziierten Subkomplex. Dieser Subkomplex ist Teil des ESCRTIII-Komplexes, der durch die Rekrutierung von Vps24 und Did4 und deren

## Einleitung

Oligomerisierung zu einem zweiten Subkomplex vervollständigt wird (Babst *et al.*, 2002b). Mittels dieser ESCRT-Maschinerie wird ubiquitiniertes Cargo an der Endosomenmembran angehäuft und durch Einstülpung der Membran in MVB-Vesikel verpackt. Darüber hinaus wird das deubiquitinierende Protein Doa4 über Snf7 und ein weiteres Protein, Bro1, an die Endosomenmembran rekrutiert (Odorizzi *et al.*, 2003; Luthala und Odorizzi, 2004). Doa4 entfernt das Ubiquitin der Cargoproteine, um es für die Zelle wieder verfügbar zu machen. Anschließend erfolgt die Vesikelbildung. Wie es genau zur Biegung und Einstülpung der Endosomenmembran kommt ist jedoch noch nicht bekannt. Nach Abschluss der Selektion und Sortierung der Cargoproteine werden die Vps-Proteine ins Zytoplasma entlassen und so für einen neuen Sortierungszyklus bereitgestellt. Hierfür wird der ESCRTIII-Komplex durch die AAA-type ATPase Vps4, die von Vps24 und Did4 rekrutiert wird, wieder in seine Bestandteile zerlegt (Babst *et al.*, 2002b).



**Abb. 4: Model für die ESCRT-Sortierungsmaschinerie von ubiquitiniertem endosomalem Cargo an MVBs (nach Babst *et al.*, 2022b).**

An Endosomen werden ubiquitinierte Proteine (hier Carboxypeptidase S (CPS)) durch den ESCRT-I-Komplex erkannt. Dieser aktiviert daraufhin ESCRTII, der für die Rekrutierung und Oligomerisierung von Snf7, Vps20, Vps24 und Did4 (Vps2) zuständig ist. Die Oligomerisierung dieser kleinen „coiled-coil“ Proteine führt zur Bildung von ESCRTIII. Dieser Komplex reichert die ubiquitinierten Cargoproteine an der endosomalen Membran an. Durch Einstülpen der Membran bilden sich Vesikel. Zuvor bindet das deubiquitinierende Protein Doa4 an ESCRTIII und entfernt den Ubiquitinanhang der Cargoproteine. Die AAA-type ATPase Vps4 wird nach der MVB-Bildung an ESCRTIII rekrutiert und sorgt für die Abspaltung des Komplexes von der Membran.

Zusätzlich zu ihrer Funktion an Endosomen, scheint die ESCRT-Maschinerie in Säugern auch an der Vermehrung von Retroviren beteiligt zu sein. Retroviren

vermehren sich, indem sie die Virus-Partikel in die Zellmembran ihrer Wirtszelle verpacken und so durch Abschnürung der Zellmembran neue Viren bilden. Da die Viren keine eigenen Proteine für die Vesikelbildung besitzen, müssen sie sich der entsprechenden Vesikelbildungsmaschinerie ihrer Wirtszelle bedienen. Das Säugerhomolog von Vps23 (ESCRTI-Komponente), TSG101, bindet an eine bestimmte Domäne des HIV-1 Gag-Proteins und ist, wie Vps23, in der Lage, Ubiquitin zu binden. Möglicherweise werden so auch die Virenpartikel in Vesikeln angehäuft und verpackt. Weitere Experimente mit Zellen, deren Vps-Weg gestört ist, zeigen, dass die HIV-1 Viren einen intakten Vps-Weg benötigen, um Viren aus der Wirtszelle schleusen zu können (Garrus *et al.*, 2001). Dies spricht für eine Beteiligung der ESCRT-Maschinerie an der Bildung neuer Retroviren an der Zellmembran.

### 1.5 Die ESCRTIII-Komponente Snf7

Die einzelnen Komponenten, aus denen sich die ESCRT-Maschinerie zusammensetzt, sind zwar bekannt, jedoch sind noch viele Fragen zu ihren proteinspezifischen Funktionen offen. Ein bereits recht gut charakterisiertes Protein der ESCRT-Familie ist die ESCRTIII-Komponente Snf7. Snf7 wurde ursprünglich in einem Screen isoliert, der dazu diente Mutanten zu identifizieren, die für die Derepression des *SUC2*-Gens, das für das Enzym Invertase kodiert, benötigt werden. (Vallier und Carlson, 1991). *SUC2* wird bei hohen Glukosekonzentrationen reprimiert, gleichzeitig werden nur die Gene, die für die Glukoseverwertung benötigt werden, exprimiert. Bei niedrigen Glukosekonzentrationen dagegen wird *SUC2* verstärkt exprimiert; die Invertasemenge in der Zelle steigt, und kann bei Bedarf die Hydrolyse von Raffinose und Saccharose katalysieren. Die meisten der in diesem Screen isolierten *snf* (sucrose-non-fermenting) -Mutanten sind nicht mehr in der Lage die *SUC2*-Repression aufzuheben, weshalb sie nicht auf Medien wachsen können, die Saccharose oder Raffinose, aber keine Glukose als Kohlenstoffquelle enthalten. *SNF1* kodiert für eine Serin/Threonin-Kinase, die für die Auflösung der Glukoserepression benötigt wird (Celenza und Carlson, 1986; Schüller und Enzian, 1988) und *SNF4* kodiert für ein Protein, das mit *SNF1* assoziiert vorliegt und als positiver Regulator der Kinase agiert (Celenza *et al.*, 1989; Schüller und Enzian, 1988). Die Glukosederepression wird durch den Snf1-Kinase-Komplex reguliert,

## Einleitung

---

indem er bei Glukosemangel den Transkriptionsrepressor Mig1 phosphoryliert. Mig1, das die Expression glukose-reprimierter Gene unterdrückt, wird dadurch inaktiviert. Weitere *SNF* Gene (*SNF2*, *SNF5*, *SNF6* und *SNF11*) kodieren für Proteine, die Teil des Swi-Snf Chromatinremodeling Komplexes sind (Hirschhorn *et al.*, 1992; Coté *et al.*, 1994; Treich *et al.*, 1995). Die ebenfalls im Screen isolierten Proteine Snf7 und Snf8/Vps22 (Komponente von ESCRTII) werden der Gruppe der „class E“ Vps-Funktionen zugeordnet. Wie aber ihre endosomale Funktion mit dem *snf*-Phänotyp zusammenhängt ist noch unklar.

In genomweiten Screens wurden mehrere Interaktionspartner von Snf7 identifiziert. Dazu zählen Bro1/Vps31, Rim13, Rim20, Vps20, Vps4 und ein noch nicht charakterisiertes Protein, Ygr122w. Bro1 gehört, wie bereits erwähnt, zur „class E“ Vps-Proteingruppe und hat eine Funktion an späten Endosomen, wo es das deubiquitinierende Protein Doa4 an ESCRTIII rekrutiert das wiederum zu einer Deubiquitinierung der Cargoproteine in den MVBs führt (Odorizzi *et al.*, 2003). Eine direkte Interaktion zwischen Bro1 und Snf7 wurde noch nicht gezeigt, jedoch sprechen massenspektrometrische Analysen für eine Assoziation dieser beiden Proteine (Gavin *et al.*, 2002). Auch das Bro1-Homolog Rim20 interagiert mit Snf7. Rim20 ist Teil des Rim101-Weges, der für die Regulation der transkriptionellen Zellantwort auf einen veränderten pH wichtig ist. Rim101 ist ein Transkriptionsfaktor, der als funktionell inaktives Protein gebildet wird. Erst die proteolytische Abspaltung seines C-terminalen Endes durch Rim13 führt zur Aktivierung seiner Repressorfunktion (Li und Mitchell, 1997; Lamb und Mitchell, 2003). Trotz seiner Homologie zu Bro1 besitzt Rim20 offenbar keine endosomale Funktion.

Auch in Säugern gibt es ein Protein, das homolog ist zu Bro1 und Rim20: das „ALG-2-interacting protein X“ (ALIX/AIP1). ALIX bindet an die Snf7-Säugerhomologen CHMP4a und CHMP4b. Die subzelluläre Lokalisation und die Ergebnisse von Überexpressionsexperimenten von Chmp4b sprechen für eine gemeinsame Funktion von Chmp4b und ALIX im endosomalen Weg (Kato *et al.*, 2003). Ferner zeigen *in vitro* Experimente, dass ALIX möglicherweise eine Funktion bei der Einstülpung der endosomalen Membran hat, indem es an lysobisphosphatidylsäure-haltige Membranen bindet, die typisch für späte Endosomen sind (Matsuo *et al.*, 2004).

Neben Rim20 interagiert noch ein weiteres Protein des Rim101-Weges mit Snf7: Rim13 (Ito *et al.*, 2001). Rim13 ist eine Protease, die für die proteolytische Aktivierung von Rim101 gebraucht wird. Snf7 und Rim20 könnten ein Gerüst bilden,

## Einleitung

---

das die Protease Rim13 in unmittelbare Nähe des Substrates Rim101 bringt (Xu und Mitchell, 2001). Neue Experimente zeigen, dass die Regulation der Rim101-Prozessierung durch ESCRT-Untereinheiten unabhängig von ihrer Rolle im Turnover von Plasmamembranproteinen geschieht (Xu *et al.*, 2004).

Weitere Interaktionspartner von Snf7 sind, wie bereits beschrieben, die ESCRTIII-Komponente Vps20 und die AAA-Type ATPase Vps4. Über den Interaktionspartner Ygr122w ist nur bekannt, dass seine Deletionsmutante, wie  $\Delta snf7$ , auf Raffinose einen Wachstumsdefekt zeigt.

Neben ihrer beschriebenen Funktion an Endosomen scheinen Snf7 und die anderen „class E“ Vps Proteine noch weitere Funktionen in der Zelle zu haben. Diese Vermutung basiert auf der Beobachtung, dass es in *vps*-Mutanten zwar zu einer Ansammlung von Proteinen im „class E“ Kompartiment kommt, gleichzeitig aber *vps*-Mutanten unterschiedliche Wachstumsphänotypen auf verschiedenen Medien zeigen. Dieses Phänomen wäre erklärbar mit einer zweiten Funktion, die die Vps-Proteine zusätzlich zu ihrer endosomalen Funktion in der Zelle ausüben.

Ziel dieser Arbeit sollte deshalb sein, zu untersuchen, ob es möglich ist, die endosomale Funktion von der nicht-endosomalen in *vps*-Mutanten zu trennen. Zu diesem Zweck wurde das Vps-Protein Snf7 benutzt, das möglicherweise, zusätzlich zu seiner endosomalen Funktion, eine Funktion am Zellkern besitzt, indem es die *SUC2*-Derepression reguliert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Stämme und Medien

#### 2.1.1 Bakterienstämme

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

Stamm	Genotyp	Referenz/Quelle
DH5αF'	F'(Φ 80 (Δ <i>lacZ</i> ) M15) Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17 r<sub>k</sub><sup>-</sup>m<sub>k</sub><sup>+</sup> supE44 thi-1 gyrA relA1</i>	Gibco BRL, Gaithersburg MD, USA (Woodstock <i>et al.</i> , 1989)
XL1-Blue	F'::Tn10 <i>proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal<sup>r</sup>) thi hsdR17 (rk-mk<sup>+</sup>) supE44 relA1 lac</i>	(Bullock <i>et al.</i> , 1987)

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

Die Zellen wurden in Vollmedium (1% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% NaCl) bei 37°C angezogen. Für Platten wurde dem Medium 2% Agar zugegeben. Selektioniert wurden die Zellen durch Zugabe von Ampicillin (50 µg/ml) ins Medium.

#### 2.1.3 Hefestämme

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

Stamm	Genotyp	Referenz/Quelle
JD52	MATa <i>ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801</i>	Jürgen Dohmen, Köln
PJ69-4A	MATa <i>trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996
RKY1509	MATa <i>ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δydr486c (mos10)::kanTEF</i>	Andreas Kranz <i>et al.</i> , 2001
RKY1511	MATa <i>ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δvps4::HIS3</i>	Andreas Kranz <i>et al.</i> , 2001
RKY1654	MATa <i>ura3-52 his3-Δ200 leu2-3,112 trp1-Δ63 lys2-801 Δmos10::HIS3</i>	Ralf Kölling, Düsseldorf

## Material und Methoden

---

Tab. 3: Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Hefestämme; soweit nicht anders beschrieben, beruhen alle Stämme auf dem Wildtyp-Stamm JD52

Stamm	Genotyp
RKY1728	MATa $\Delta did2::HIS3$
RKY1730	MATa $\Delta vps24::HIS3$
RKY1732	MATa $\Delta did4::HIS3$
RKY1828	MATa $\Delta did4::kanMX \Delta vps24::HIS3$
RKY1829	MATa $\Delta snf7::HIS3 \Delta vps20::kanMX$
RKY1835	MATa $\Delta did2::HIS3 \Delta mos10::kanMX$
RKY1852	MATa $\Delta snf7::TRP1$
RKY1853	MATa $\Delta vps20::TRP1$
RKY1854	MATa $\Delta snf7::TRP1 suc2::[CUP1p-STE6-HIS3]$
RKY1922	MATa $\Delta bro1::kanMX$
RKY1948	MATa $\Delta ygr122w::HIS3$
RKY1949	MATa $YGR122w-13myc::HIS3$
RKY2030	MATa $\Delta snf7::TRP1 BRO1-13myc::kanMX$
RKY2042	MATa $\Delta snf7::TRP1 YGR122w-13myc::HIS3$
RKY2058	MATa $MIG1-13myc::HIS3$
RKY2061	MATa $\Delta vps4::HIS3 \Delta snf7::kanMX6$
RKY2082	MATa $\Delta snf7::TRP1 VPS20-13myc::kanMX$
RKY2097	MATa $\Delta snf7::TRP1 RIM20-13myc::kanMX$
RKY2100	MATa $\Delta rim20::kanMX$
RKY2102	MATa $\Delta rim13::kanMX$
RKY2104	MATa $\Delta snf7::kanMX MIG1-13myc::HIS3$
RKY2107	MATa $\Delta snf7::TRP1 RIM13-13myc::kanMX$
RKY2126	MATa $\Delta snf7::TRP1 VPS4-13myc::kanMX$

---

### 2.1.4 Medien und Anzucht von Hefestämmen

Die Anzucht der Hefestämme erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, bei 25°C. Die verwendeten Medien waren:

Vollmedium (YEED):	1% Hefeextrakt, 2% Pepton, 2% Kohlenstoffquelle
Synthetisches Minimalmedium (SM):	0,67% Yeast Nitrogen Base (YNB) w/o Aminosäuren, 2% Kohlenstoffquelle, Aminosäuren und Basen wurden wie folgt zugegeben: 1% Casein-Hydrolysat, 30 µg/ml Uracil, Adenin, Histidin, Tryptophan, Methionin, Lysin, Leucin

Die Zugabe von Glukose, Raffinose, Koffein oder Kongorot erfolgte wie beim Vollmedium.

Als Kohlenstoffquelle wurden 2% bzw. 0,1% Glukose oder 2% Raffinose verwendet. Feste Nährböden enthielten zusätzlich 2% Agar. Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen wurde die entsprechende Aminosäure oder Base dem Medium nicht zugesetzt. Die Selektion auf Geneticinresistenz erfolgte auf Vollmediumplatten mit 200 µg/ml G418 (Longtine *et al.*, 1998).

Zur Untersuchung von Wachstumsphänotypen wurden den Medien 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> (Stammlösung 0,5 M CuSO<sub>4</sub>/steril filtriert), 7 mM Koffein (100 mM Stammlösung/steril filtriert) oder 0,5 mg/ml Kongorot (1 mg/ml) zugegeben.

## 2.2 Plasmide

Tab. 4: Verwendete Plasmide; alle *GAL4-AD*-Plasmide verfügen über einen *LEU2*- und die *GAL4-BD*-Vektoren über einen *TRP1*-Selektionsmarker.

Plasmid	Referenz/Quelle	Beschreibung
pFA6a-kanMX6	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)	Template für die PCR-Amplifikation von Fragmenten zur Gendeletion mit <i>S. pombe his5<sup>+</sup></i> -Selektionsmarker
pFA6a-TRP1	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)	Template für die PCR-Amplifikation von Fragmenten zur Gendeletion mit <i>TRP1</i> -Selektionsmarker
pFA6a-13myc-His3MX6	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)	Template für die PCR-Amplifikation von Fragmenten zur C-terminalen Markierung von Proteinen mit <i>HIS3</i> -Selektionsmarker
pFA6a-13myc-kanMX6	(Longtine <i>et al.</i> , 1998)	Template für die PCR-Amplifikation von Fragmenten zur C-terminalen Markierung von Proteinen mit kan <sup>r</sup> -Selektionsmarker
YCplac22	(Gietz und Sugino, 1988)	CEN/ARS Vektor mit <i>TRP1</i> Selektionsmarker
YCplac33	(Gietz und Sugino, 1988)	CEN/ARS Vektor mit <i>URA3</i> Selektionsmarker
pGEX3X	Amersham	Plasmid zur Herstellung von GST Fusionsproteinen
pACT2	BD Clontech	<i>GAL4 AD</i> Vektor für Two-Hybrid-System
pRK329	Andreas Kranz, Düsseldorf	<i>GAL DB</i> Vektor für 2-Hybrid System
pRK641	Andreas Kranz, Düsseldorf	<i>S. cerevisiae</i> 1.3 kb <i>VPS4</i> PCR-Fragment, amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer 388+389) mit der Schnittstelle <i>Bam</i> HI in pRK296 (pACT2 mit Stoplinker). <i>GAL AD</i> Vektor für Two-Hybrid-system.
pRK709	Ralf Kölling, Düsseldorf	<i>S. cerevisiae</i> 728 bp GST PCR-Fragment aus pGEX3X (Primer 527+528) mit den Schittstellen <i>Sma</i> I/ <i>Bam</i> HI in pRK638 (PEP12p-5'Sos-Pep12-Fusions-Vektor).
pRK723	Ralf Kölling, Düsseldorf	<i>human/S. cerevisiae</i> 0,6 kb <i>Sal</i> I/ <i>Pst</i> I 3HA-Fragment aus pFA6a-3HA His3MX6 (2 $\mu$ Tagging-Vektor mit 3HA-Tag)

## Material und Methoden

---

Tab. 5: In dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pRK771	<i>S. cerevisiae</i> 1404 bp <i>SNF7</i> PCR Fragment amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer 612+613) mit den Schnittstellen <i>Sall/BamHI</i> (CEN/ARS <i>SNF7-GFP</i> Fusionsvektor)
pRK796	<i>S. cerevisiae</i> 1829 bp <i>SNF7</i> PCR-Fragment amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer 758+759) mit den Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>Sall</i> in YCplac22. Plasmid zur Mutagenese von <i>SNF7</i>
pRK861	<i>S. cerevisiae</i> 1843 bp <i>SNF7</i> PCR-Fragment amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer 758+759) mit den Schnittstellen <i>BamHI</i> und <i>Sall</i> in YCplac33
pRK914	<i>SNF7</i> K69,70,71E Mutagenese mit Primern 981 + 982. QuickChange Mutagenese eines möglichen Endosomenrückhaltesignals in <i>Snf7</i> , <i>SNF7</i> K69,70,71E Variante ohne Tag in pRK861
pRK941	<i>S. cerevisiae</i> 560 bp <i>SNF7</i> PCR Fragment amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer 1026+1029) mit den Schnittstellen <i>BamHI/Sall</i> in pRK329 ( <i>GAL DB</i> Vektor). <i>GAL-DB-SNF7 C</i> -Fragment,
pRK942	<i>S. cerevisiae</i> 745 bp <i>SNF7</i> PCR Fragment amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer 1026+1030) mit den Schnittstellen <i>BamHI/Sall</i> in pRK329 ( <i>GAL DB</i> Vektor). <i>GAL-DB-SNF7 D</i> -Fragment,
pRK943	<i>S. cerevisiae</i> . 2535 bp <i>BRO1</i> PCR Fragment amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer 1031+1032) mit den Schnittstellen <i>BamHI/XhoI</i> in pACT2 ( <i>GAL4 AD</i> Vektor)
pRK945	<i>S. cerevisiae</i> . 2331 bp <i>RIM13</i> PCR Fragment amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer 1033+1034) mit den Schnittstellen <i>BamHI/XhoI</i> in pACT2 ( <i>GAL4 AD</i> Vektor)
pRK957	<i>S. cerevisiae</i> 200 bp <i>SNF7</i> PCR Fragment amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer 1026+1027) mit den Schnittstellen <i>BamHI/Sall</i> in pRK329 ( <i>GAL DB</i> Vektor). <i>GAL-DB-SNF7 A</i> -Fragment,
pRK958	<i>S. cerevisiae</i> 380 bp <i>SNF7</i> PCR Fragment amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer 1026+1028) mit den Schnittstellen <i>BamHI/Sall</i> in pRK329 ( <i>GAL DB</i> Vektor). <i>GAL-DB-SNF7 B</i> -Fragment
pRK959	<i>S. cerevisiae</i> . 2065 bp <i>RIM20</i> PCR Fragment amplifiziert von chromosomaler DNA (Primer 1035+1036) mit den Schnittstellen <i>BamHI/XhoI</i> in pACT2 ( <i>GAL4 AD</i> Vektor)
pRK1009	<i>S. cerevisiae</i> . 1259 bp <i>YGR122W</i> PCR Fragment (Primer 1124+1125) mit den Schnittstellen <i>BamHI/XhoI</i> in pACT2 ( <i>GAL4 AD</i> Vektor)
pRK1013	<i>S.cerevisiae</i> 590 bp <i>SNF7p</i> PCR-Fragment amplifiziert von chromosomaler DNA (P1115+1116) mit den Schnittstellen <i>SmaI/EcoRI</i> in pRK709 ( <i>GST-Pep12</i> -Fusions-Vektor)
pRK1014	<i>S. cerevisiae</i> . 739 bp <i>VPS20</i> Fragment <i>SmaI/BamHI</i> aus pRK842 in pACT2 ( <i>GAL4 AD</i> Vektor)
pRK1017	<i>S. cerevisiae</i> 371 bp <i>SNF7 B</i> Fragment <i>BamHI/Sall</i> aus pRK958 in pRK1013 ( <i>GST</i> -Vektor mit <i>Snf7</i> -Promotor)
pRK1028	<i>S. cerevisiae</i> 551 bp <i>SNF7 C</i> Fragment <i>BamHI/Sall</i> aus pRK941 in pRK1013 ( <i>GST</i> -Vektor mit <i>Snf7</i> -Promotor)
pRK1029	<i>S. cerevisiae</i> 731 bp <i>SNF7 D</i> Fragment <i>BamHI/Sall</i> aus pRK942 in pRK1013 ( <i>GST</i> -Vektor mit <i>Snf7</i> -Promotor)

## Material und Methoden

---

pRK1037	<i>S. cerevisiae</i> 191 bp <i>SNF7</i> A Fragment <i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I aus pRK942 in pRK1013 (GST-Vektor mit <i>Snf7</i> -Promotor)
pRK1048	<i>S. cerevisiae</i> 2331 bp <i>SNF7</i> PCR-Fragment (fehleranfällige PCR) amplifiziert von pRK796 (Primer 627 + 628) in YCplac33 ( <i>SNF7</i> -Mutante 3)
pRK1049	<i>S. cerevisiae</i> 2331 bp <i>SNF7</i> PCR-Fragment (fehleranfällige PCR) amplifiziert von pRK796 (Primer 627 + 628) in YCplac33 ( <i>SNF7</i> -Mutante 5)
pRK1050	<i>S. cerevisiae</i> 2331 bp <i>SNF7</i> PCR-Fragment (fehleranfällige PCR) amplifiziert von pRK796 (Primer 627 + 628) in YCplac33 ( <i>SNF7</i> -Mutante 8)

---

## 2.3 Synthetische Oligonukleotide

Tab.6: Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligo	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung
#329	GCAAGAACAGTTCAGTAGAGATTTTGGTCA AGAAGGTAACCGGATCCCCGGGTTAATTAA	Primer F2 zur PCR-basierten Modifikation des <i>VPS4</i> -ORFs
#330	ATGTACACAAGAAATCTACATTAGCACGTT AATCAATTGAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Primer R1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>VPS4</i> -ORFs
#331	ACGGAAGCAGCAGAAAACATAACAGTATTGA TAAATAAGCCGGATCCCCGGGTTAATTAA	Primer F1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>SNF7</i> -ORFs
#332	TGAAAAAGCATTAAGAGAACTACAAGCAGA AATGGGGCCGGATCCCCGGGTTAATTAA	Primer F2 zur PCR-basierten Modifikation des <i>SNF7</i> -ORFs
#333	ACCTTTTTTTTTCTTTCATCTAAACCGCA TAGAACACGTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Primer R1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>SNF7</i> -ORFs
#414	CTGCTGAATTAACCTCCACTTGGTGCTTTTG TATATATCGACGGATCCCCGGGTTAATTAA	Primer F1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>VPS20</i> -ORFs
#415	CATTCCCTTTATTTTTAATTTTGAAGCTAC ATACAGACATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Primer R1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>VPS20</i> -ORFs
#440	GGAGAGATCAGACACTAAGGAACCTTTAGC ATTACTATCCCGGATCCCCGGGTTAATTAA	Primer F2 zur PCR-basierten Modifikation des <i>VPS20</i> -ORFs
#573	CTACTTTGAAAGTATAGGAAGTCAGACATC GCACTGAGAACGGATCCCCGGGTTAATTAA	Primer F1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>DID2</i> -ORFs
#574	AACGTAATGATGAACTAAAAATGCATGACC TGTTAGCATGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Primer R1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>DID2</i> -ORFs

---

## Material und Methoden

---

#577	TTGGGGGGCAGTTTTCTGGGCAATACAAAG TTTACTTTTGC GGATCCCCGGGTTAATTAA	Primer F1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>VPS24</i> -ORFs
#578	ACTTATTTATTTATTTTCTTTGTACAGTCA CAGTAACACTGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Primer R1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>VPS24</i> -ORFs
#581	AAGGCTGATTGTTTCACCCTTGGACACAGA ACGTTAAACACGGATCCCCGGGTTAATTAA	Primer F1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>DID4</i> -ORFs
#582	TATAGTATAGACCTATTATTCATTAAATAT ACTCAGAGCGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Primer R1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>DID4</i> -ORFs
#612	CCCGGATCCCCTCTAAACGGGGGATAA	Upstream Primer zur Amplifikation des <i>SNF7</i> ORFs mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle
#613	CCCGTCGACGCCCATTTCTGCTTGTA	Downstream Primer zur Amplifikation des <i>SNF7</i> ORFs mit <i>Sal</i> I Schnittstelle
#627	AACGACCGAGCGCAGCGAGT	Upstreamprimer des Polylinkers von YCpLac33 für <i>SNF7</i> -PCR-Mutagenese
#628	GGAGAAAATACCGCATCAGG	Downstreamprimer des Polylinkers von YCpLac33 für <i>SNF7</i> -PCR-Mutagenese
#758	CCCGGATCCAAATGGTTGTTATTTCGAG	Upstreamprimer zur Amplifikation des <i>SNF7</i> ORFs mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle
#759	CCCGTCGACGAGAACTGTCTTTCCCTC	Downstreamprimer zur Amplifikation des <i>SNF7</i> ORFs mit <i>Sal</i> I Schnittstelle
#802	CCCATACGATTCATGTTTCGAC	Sequenzierprimer für <i>SNF7</i> -Mutanten
#852	ACTGGAGCATTACTAGGTTTACTACTCACT GGTTCTACTCCGGATCCCCGGGTTAATTAA	Primer F1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>BRO1</i> -ORFs
#853	AAAAAAAAAGCTACAATAAAATTAAGAAATA AGAAATGCACGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Primer R1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>BRO1</i> -ORFs
#897	TTGAACTTTAAAGTGAAAAGTAGCTCTAAC AAAATAAATCCGGATCCCCGGGTTAATTAA	Primer F1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>YGR122W</i> -ORFs
#898	ACATGTGTATATTTTTATGCAAAATTCATA GTAGAGTAGAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Primer R1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>YGR122W</i> -ORFs
#899	AGACTCAAATAATGCAACCCACAATTGCGG TAATTATTTTCGGATCCCCGGTAAATTAA	Primer F2 zur PCR-basierten Modifikation des <i>YGR122W</i> -ORFs
#906	TCGAACAAC TTTTAAGTA	Sequenzierprimer für <i>SNF7</i> -Mutanten
#915	ACCCATAAGAAGTTTACCGTTGCCCTTCCC ACACATGGACCGGATCCCCGGGTTAATTAA	Primer F2 zur PCR-basierten Modifikation des <i>MIG1</i>
#916	TTGTCTTTTGATTTATCTGCACCGCCAAAA ACTTGTCTAGCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Primer R1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>MIG1</i>

---

## Material und Methoden

---

#981	ATGGCGAAGAATGCTtTaAAAgAGgAGgAG ACAATCGAACAACTT	Upstreamprimer für <i>SNF7</i> Quickchange-Mutagenese
#982	AAGTTGTTTCGATTGTCTCTCTCTTTTAA AGCATTCTTCGCCAT	Downstreamprimer für <i>SNF7</i> Quickchange-Mutagenese
#1020	CTCTGTTTTTGATGAAAATATGTACTCCAA ATACAGCAGTCGGATCCCCGGGTTAATTAA	Primer R2 zur PCR-basierten Modifikation des <i>BRO1</i> -ORFs
#1026	CCCCGATCCCCGATGTGGTCATCACTTTTTG G	Upstreamprimer für Amplifizierung der <i>SNF7</i> -Fragmente A, B, C, D mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle
#1027	CCCGTCGACTCATTATTGCCCCTCGTCAA	Downstreamprimer für Amplifizierung des <i>SNF7</i> A Fragmentes mit <i>Sal</i> I Schnittstelle
#1028	CCCGTCGACTCAGCCACTGTGAATAGTTTT	Downstreamprimer für Amplifizierung des <i>SNF7</i> B Fragmentes mit <i>Sal</i> I Schnittstelle
#1029	CCCGTCGACTCAGGACGTTTCTTGGTTAGC	Downstreamprimer für Amplifizierung des <i>SNF7</i> C Fragmentes mit <i>Sal</i> I Schnittstelle
#1030	CCCGTCGACTCAAAGCCCCATTTCTGC	Downstreamprimer für Amplifizierung des <i>SNF7</i> D Fragmentes mit <i>Sal</i> I Schnittstelle
#1031	CCCCGATCCCCGATGAAACCTTACTTATTTG	Upstreamprimer zur Amplifikation des <i>BRO1</i> -ORFs mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle
#1032	CCCCTCGAGCTAACTGCTGTATTTGGA	Downstreamprimer zur Amplifikation des <i>BRO1</i> -ORFs mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle
#1033	CCCCGATCCCCGATGAATGATGGCATGAG	Upstreamprimer zur Amplifikation des <i>RIM13</i> -ORFs mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle
#1034	CCCCTCGAGACCCCCAAATGTAGTGCT	Downstreamprimer zur Amplifikation des <i>RIM13</i> -ORFs mit <i>Xho</i> I Schnittstelle
#1035	CCCCGATCCCCGATGAGTGAAGTCTTGCC	Upstreamprimer zur Amplifikation des <i>RIM20</i> -ORFs mit <i>Bam</i> HI Schnittstelle
#1036	CCCCTCGAGATGGAAAGGAGGATGAC	Downstreamprimer zur Amplifikation des <i>RIM20</i> -ORFs mit <i>Xho</i> I Schnittstelle
#1115	CCCGAATTCTCAGTATTACGTATAAACTG	Upstreamprimer zur Amplifikation des <i>SNF7</i> -Promotors mit <i>Eco</i> RI Schnittstelle
#1116	CCCCCGGGGCTTATTTATCAATACTGT	Downstreamprimer zur Amplifikation des <i>SNF7</i> -Promotors mit <i>Sma</i> I Schnittstelle
#1122	AATCAGAATTGAAAAATACTCCGATGATGT GATACCAAAACGGATCCCCGGGTTAATTAA	Primer F2 zur PCR-basierten Modifikation des <i>RIM13</i> -ORFs
#1123	GTAAAAAGGATGGATAGACAGTTCTTGAGA TAAAGCACAGGAATTTCGAGCTCGTTTAAAC	Primer R1 zur PCR-basierten Modifikation des <i>RIM13</i> -ORFs

---

### 2.4 Chemikalien und Enzyme

Acros	Lysin, Natrium Carbonat, Glyzin
Amersham	Amplify, Protein A-Sepharose, $\alpha P^{32}$ dATP, Ficoll™ PM400
Axis-Shield	Optiprep™
Bio-Rad	Affigel 15
Braun Melsungen	Glasperlen Ø 0,45µm
Difco	Bacto Agar, Casaminoacids, Pepton, Trypton, Yeast Extract, Yeast Nitrogen Base,
Fluka	Formaldehyd, Kupfersulfat-5xH <sub>2</sub> O
Fuji	Röntgenfilme
GibcoBRL	Agarose, Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, T4-Polymerasepuffer
ICN	Trans <sup>35</sup> S-Label, NBT
J. T. Baker	CaCl <sub>2</sub> , NaCl, NaOH, PEG4000, Kaliumacetat
Kodak	Röntgenfilme
Life Technologies	G418/Geneticin, Kongorot
Merck	APS, EDTA, Leucin, TEMED, HEPES
New England Biolabs	Restriktionsendonukleasen, BSA
Perkin Elmer	Gene Screen Membran
Qiagen	QIAprep® Spin Miniprep Kit (250), QIAquick® Gel extraction Kit (250), QIAquick® PCR purification Kit (250)
Roche	Alkalische Phosphatase, BCIP, Restriktionsendonukleasen, Expand Long PCR System, Lumi Light Western Blotting Substrate, Heringssperma DNA
Roth	DTT, Gel 30 Acrylamid, Glyzin, IPTG, TCA
Schleicher & Schuell	Nitrozellulose-Membran, Membranfilter 45µm
Seikagaku Kogyo Co. Ltd	Zymolyase
Serva	Glyzerin, SDS, Ethidiumbromid, Triton-X-100, Tween 20 Ampicillin, Lithiumacetat, BCIP, NBT, PonceauS, Prestained Molecular Marker, Sucrose, Triton-X-100, Servablau (Coomassie Brilliant Blue R250)
Sigma	BSA (IgG-frei), Tris, Sorbitol, Koffein, Raffinose, MOPS, EGTA, reduziertes Glutathion
Thermo Hybaid	Synthetische Oligonukleotide
Whatman	3 MM Papier

### 2.5 Antikörper

Tab. 7: monoklonale Antikörper

Primärantikörper	Herkunft	Verdünnung im Westernblot	Referenz
anti-ALP	aus Maus	1 : 500	Molecular Probes
anti-c-myc (9E10)	aus Maus	1 : 1000	BAbCO (Berkley Antibodies Co.)
anti-Haemagglutinin (HA)	aus Maus	1 : 500	BAbCO (Berkley Antibodies Co.)
anti-Pep12	aus Maus	1 : 1000	Molecular Probes

Tab. 8: Polyklonale Antikörper

Primärantikörper	Herkunft	Verdünnung im Westernblot	Referenz
anti-CPY	aus Hase	-	R. Kölling, Düsseldorf
anti-Pep12	aus Hase	1 : 500	H. Pelham
anti-Pma1	aus Hase	1 : 1000	R. Kölling, Düsseldorf
anti-Snf7 (K43)	aus Hase	1 : 5000	diese Arbeit
anti-Ste6	aus Hase	1 : 200	R. Kölling, Düsseldorf
anti-F1 ATPase	aus Hase	1 : 1000	G. Schatz

Tab. 9: Sekundär-Antikörper

Sekundär Antikörper	Verdünnung	Referenz
Phosphatase-gekoppelt, anti-Maus	1 : 5000	Dianova
Phosphatase-gekoppelt, anti-Hase	1 : 5000	Dianova
Peroxidase-gekoppelt, anti-Maus	1 : 5000	Dianova
Peroxidase-gekoppelt, anti-Hase	1 : 5000	Dianova
FITC-gekoppelt, anti-Maus	1 : 5000	Dianova

### 2.6 Transformationen

#### 2.6.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* erfolgte nach dem Protokoll 3 von Hanahan, 1985. Kompetenten *E. coli* Zellen wurde 1 µg Plasmid-DNA zugegeben und der Transformationsansatz 45 min auf Eis aufgetaut. Nach einem Hitzeschock von 45 sek bei 42°C wurden die Zellen in 900 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) bei 37°C für 1 h inkubiert. 200 µl des Transformationsansatzes wurden auf Selektivmedium ausplattiert.

Bei Transformation eines Ligationsansatzes wurden die Bakterien, vor dem ausplattieren, 1 min bei 5000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden im verbliebenen Restmedium resuspendiert und komplett ausplattiert.

#### 2.6.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von Hefe mit Plasmid-DNA wurde nach der Lithium-Acetat-Methode durchgeführt (Ito *et al.*, 1983). 5ml einer exponentiellen Kultur ( $OD_{600} = 0,4-7$ ;  $2-4 \times 10^7$  Zellen/ml) wurden abzentrifugiert (5 min, 500g), die Zellen einmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in 200 µl Li-Acetat in TE resuspendiert. Zu diesem Ansatz wurden 10 µl denaturierter Heringssperma-DNA (10 mg/ml), 1 µg Plasmid-DNA und 1,5 ml 40% PEG4000 in 0,1 M Li-Acetat in TE zugegeben und mit den Zellen vermischt. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei, je nach Stamm, 30 bzw. 25°C auf einem Schüttler folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 20 min. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 500g abzentrifugiert, das Pellet in 200 µl sterilem Wasser resuspendiert und auf Selektivmedium ausplattiert. Zur Selektion auf Genitcinresistenz wurden die Zellen nach dem Hitzeschock abzentrifugiert und das Pellet in Vollmedium resuspendiert. Nach einer Inkubation bei 25°C bzw. 30°C für 2 h wurden die Zellen, wie gehabt, auf G418-haltigem Nährboden ausplattiert.

## 2.7 Präparation von Nukleinsäuren

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

#### 2.7.1.1 Alkalische Lyse

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der modifizierten Methode der alkalischen Lyse (Maniatis *et al.*, 1982). Zellen aus 1,5 ml einer stationären Übernachtskultur wurden geerntet und in 300 µl P1-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 µg RNase A) resuspendiert. 300 µl P2 Puffer (0,2 M NaOH; 1% SDS) wurden zugegeben. Nach mehrmaligem Invertieren (10x) wurden 300 µl P3 Puffer (3 M Li-Acetat pH 5,5) hinzugefügt und die Suspension wieder invertiert (10x). Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Probe bei 13 000 rpm 10 min in einer Eppendorfszentrifuge zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und die DNA mit 1ml Ethanol (96%) gefällt und anschließend 10 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde durch Zugabe von 500 µl P4-Puffer (100 mM Li-Acetat, pH 6) und 1 ml Ethanol (96%) gefällt. Nach wiederholter Zentrifugation für 10 min bei 13 000 rpm wurde das DNA-Pellet in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-Cl, pH 8,0; 1 mM EDTA) resuspendiert. Für Restriktionsanalysen wurden 200 ng isolierter Plasmid-DNA in einem 20 µl Ansatz geschnitten.

#### 2.7.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit Säulen

Plasmid-DNA, die für Sequenzierungen und Klonierungen in besonders reiner Form vorliegen muss, wurden mit dem QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (250) der Firma Qiagen, Hilden, aus *E. coli* Zellen isoliert. Die Präparation erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

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

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus Hefe erfolgte nach der Methode von Robzyk und Kassir (1992). Die Plasmid-DNA wurde aus 1,5ml stationärer Hefekulturen isoliert. Die Zellen wurden geerntet und in 100 µl STET (8% Sucrose; 50 mM

Tris pH 8,0; 50 mM EDTA; 5% Triton X-100) resuspendiert. Es folgte ein 5-minütiger Zellaufschluss mit 0,2 g Glasperlen ( $\varnothing$  0,45 mm). Anschließend wurden zu der Suspension 100  $\mu$ l STET zugegeben, kurz gemischt und 3 Minuten bei 95°C gekocht. Die Suspension wurde auf Eis kurz inkubiert und die Zelltrümmer und Glasperlen bei 10 000 rpm 10 min abzentrifugiert (Kühlzentrifuge Sigma 2K 15). 100  $\mu$ l des Überstandes wurden mit 50  $\mu$ l 7,5M NH<sub>4</sub>Ac versetzt und mindestens eine Stunde bei -20°C inkubiert. Dadurch wurden chromosomale DNA, lange RNAs und andere Verunreinigungen präzipitiert und durch Zentrifugation (4°C, 13 000g) aus der Lösung entfernt. Die Plasmid-DNA wurde aus 100  $\mu$ l Überstand mit 200  $\mu$ l kaltem Ethanol (absolut, 96%) gefällt. Bei 4°C und 13 000 g wurde die Plasmid-DNA abzentrifugiert und in 20  $\mu$ l Wasser gelöst. Für die Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli* wurden 10  $\mu$ l benutzt.

### **2.7.3 Isolierung von Nukleinsäurefragmenten aus Agarosegelen**

Um DNA-Fragmente bestimmter Länge aus einem Agarose-Gel zu isolieren, wurden diese unter einer UV-Lampe ( $\lambda$ = 312nm) ausgeschnitten. Die Isolierung aus dem Gel erfolgte mit dem QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (250) von Qiagen, Hilden, nach Anweisung des Herstellers.

### **2.7.4 Reinigung von PCR-Fragmenten**

PCR-Fragmente wurden mit dem "QIAquick<sup>®</sup> Spin PCR Purification Kit" der Fa. Qiagen nach Vorschrift des Herstellers gereinigt.

### **2.7.5 Restriktion von Nukleinsäuren**

Die sequenzspezifische Spaltung der Nukleinsäuren erfolgte nach Anweisung der Hersteller. Die Enzyme stammten von Roche bzw. von der Fa. New England Biolabs. Pro  $\mu$ g Plasmid-DNA wurden 2-5 U Enzym eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 1-2 Stunden oder über Nacht bei, je nach Enzym, 25 °C oder 37°C.

### **2.7.6 Entfernung von Überhängen an 3' Enden**

3'-Überhänge wurden mit der T4-DNA Polymerase (2-5 U/μg DNA), nach der von Maniatis *et al.*, 1982 beschriebenen Methode, entfernt. Der Reaktionsmix enthielt DNA, T4-Polymerase, T4-Polymerasepuffer (50 mM Tris-Cl pH 8,0; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT) und 0,1 mM dNTPs. Die Inkubation des Reaktionsmixes erfolgte 30min bei 16°C.

### **2.7.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Bei der Dephosphorylierung wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen aus doppelsträngigen, linearen DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP = calf-intestine-phosphatase) entfernt. Es wurde 1 U CIP pro Reaktionsansatz eingesetzt. Die Dephosphorylierung erfolgte für 1 h bei 37°C. Anschließend wurde der Reaktionsansatz über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt, aus dem der gewünschte, linearisierte und dephosphorylierte Vektor isoliert werden konnte.

### **2.7.8 DNA-Ligation**

Für die Ligation von Vektor-DNA mit Fragment-DNA wurde Plasmid-DNA mit den entsprechenden Enzymen geschnitten und auf einem 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das gewünschte Vektorfragment und die benötigte Fragment-DNA wurden aus dem Gel isoliert. Die Ligation erfolgte mit einem zweimolaren Überschuss an Fragment-DNA gegenüber der Vektor-DNA. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 16°C mit 1 U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) und T4 Ligasepuffer inkubiert. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes lag zwischen 20 und 30 μl.

### **2.7.9 Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten durch Gel-Elektrophorese**

Die Längenbestimmung von DNA-Fragmenten erfolgte elektrophoretisch in 1%igen Agarose-Gelen. Als Gel- und Laufpuffer wurde 0,5x TAE-Puffer (20 mM Tris, 10 mM Li-Acetat, 1 mM EDTA pH 8,0) verwendet. Ethidiumbromid wurde dem Gel und Laufpuffer in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Die DNA-Proben wurden in einem Verhältnis von 1:10 in Ladepuffer (0,2% Bromphenolblau in 25% Glycerin) aufgenommen. Die DNA-Fragmente wurden maximal bei 250 V aufgetrennt. Als Größen- und Konzentrationsstandard diente 1 µg DNA des Phagen λ, die mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* geschnitten worden war.

### **2.7.10 Sequenzierung von DNA-Fragmenten**

Die Sequenzierung von DNA-Proben wurde von den Firmen Seq-Lab oder GATC durchgeführt.

### **2.7.11 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren**

Für die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurden ca. 10-20 ng DNA-Fragment eingesetzt. Die DNA wurde in einem Gesamtvolumen von 20 µl in TE-Puffer aufgenommen und 10 min bei 95°C denaturiert. Nach anschließender Überführung der DNA in ein Eisbad wurden sofort 10 µl OLX-Puffer (5x Puffer: 250 mM 1 M Tris-Cl pH 7,5; 150 mM, 1 M MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 12,5 µl von 10 mM dNTPs (dCTP/dGTP/dTTP) → 250 µM; 150 µl Oligos pd(N<sub>6</sub>), Pharmacia 90 U/ml; mit dH<sub>2</sub>O auf 500 µl auffüllen) zugegeben. Es folgte die Zugabe von 2 µl BSA (10 mg/ml), 5 µl αP<sup>32</sup>dATP und 2 U Klenowenzym. Der Reaktionsansatz wurde mit dH<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Aufreinigung der Sonde wurden kleine Sephadexsäulen hergestellt. Hierfür wurde in den Boden eines 1 ml Eppendorfreaktionsgefäßes mit einer Kanüle ein Loch gebohrt und das Gefäß in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gesetzt. Das 1 ml Gefäß wurde mehrmals mit Sephadex 50 aufgefüllt und 3 min bei 5 000 rpm abzentrifugiert bis das Gefäß mit Sephadex gefüllt war. Das, mit Sephadex, gefüllte Gefäß wurde auf ein neues 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gesetzt. Auf die Sephadexsuspension

wurde die Sonde gegeben und 3 min bei 5 000 rpm in einer Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert. Die Sonde wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C weggefroren.

### 2.7.12 PCR-Amplifikation von Nukleinsäuren

Für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden die „Expand high fidelity“ Polymerase (Roche) und die „Pfu Ultra<sup>TM</sup> HF“ Polymerase (Stratagene) Kits benutzt. Die Amplifizierung erfolgte im „Primus 25/96 thermocycler“ (MWG Biotech). Die PCR-Reaktionsansätze hatten ein Volumen von 25-50 µl. Der dNTP-Mix (jeweils 2 mM von dATP, dTTP, DGTP, dCTP) entstammte nicht diesem System, sondern wurde aus Lösungen der einzelnen Nukleotide (Gibco BRL) hergestellt.

### 2.7.13 Spezifische Amplifikation von Plasmid-DNA

Für die Amplifikation von Plasmid-DNA wurden 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µM der entsprechenden Oligonukleotiden, 200 mM dNTP-Mix, 1 µg Plasmid-DNA und 1 U Enzym benutzt. Das folgende Programm wurde für die Amplifikation von DNA-Fragmenten verwendet:

- |    |     |             |                                |
|----|-----|-------------|--------------------------------|
| 1. |     | 4 min 94°C  | DNA-Denaturierung              |
| 2. | 30X | 30 sek 94°C | DNA-Denaturierung              |
|    |     | 1 min 55°C  | Annealing der Primer           |
|    |     | x min 68°C  | DNA-Synthese<br>(Verlängerung) |
| 3. |     | 10 min 68°C | DNA-Synthese                   |

Die DNA-Verlängerungszeit betrug 1 min pro kb der erwarteten DNA-Fragmentlänge.

### 2.7.14 Spezifische Amplifizierung chromosomaler DNA

Für die DNA-Amplifizierung chromosomaler DNA wurde ein Reaktionsmix bestehend aus 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 µM von jedem Primer, 200 µM dNTP-Mix, 1 µg DNA und 1 U „Expand High Fidelity“ DNA-Polymerase. Der Reaktionsmix wurde mit dH<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt.

## Material und Methoden

---

Bei Verwendung der Pfu Ultra DNA-Polymerase setzte sich der Reaktionsmix bei einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  wie folgt zusammen: 5  $\mu\text{l}$  10x Pfu-Puffer, 40 mM dNTP-Mix, 1  $\mu\text{M}$  von jedem Primer, 1  $\mu\text{g}$  chromosomale DNA,  $\text{dH}_2\text{O}$  ad 50  $\mu\text{l}$ .

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

- |    |     |             |                                |
|----|-----|-------------|--------------------------------|
| 1. |     | 4 min 94°C  | DNA-Denaturierung              |
| 2. | 30X | 1 min 94°C  | DNA-Denaturierung              |
|    |     | 1 min 55°C  | Annealing der Primer           |
|    |     | x min 68°C  | DNA-Synthese<br>(Verlängerung) |
| 3. |     | 10 min 68°C | DNA-Synthese                   |

Die Annealingtemperatur, Verlängerungszeit und die Zahl der Zyklen wurde an die Schmelzpunkttemperatur der Oligonukleotide und an die Länge des erwarteten PCR-produktes angepasst. Bei Verwendung der Pfu Ultra Polymerase erfolgte die DNA-Synthese bei 72°C. Die Verlängerungszeit betrug 2 min pro 1 kb bei 25-28 Zyklen. Bei einer Verlängerungszeit von 1 min pro 1 kb wurde die Zyklenzahl auf 35 erhöht.

### 2.7.15 Kolonie-PCR zur Überprüfung von Deletionen in *S.cerevisiae*

Als „Template“ für die Polymerase-Kettenreaktion wurde eine Hefekolonie in 20  $\mu\text{l}$  einer 0,02 M NaOH-Lösung resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen in der Mikrowelle bei voller Leistung 30 Sekunden erhitzt.

Ansatz für die Reaktion:

- 2  $\mu\text{l}$  Zellsuspension
- 1  $\mu\text{l}$  Oligonukleotid (3'Ende) (20 pmol/ $\mu\text{l}$ )
- 1  $\mu\text{l}$  Oligonukleotid (5'Ende) (20 pmol/ $\mu\text{l}$ )
- 6  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix (2 mM)
- 3  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM)
- 1,5  $\mu\text{l}$  „Expand High Fidelity Buffer without  $\text{MgCl}_2$ “
- 18  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$
- 1 U DNA-Polymerase

Die PCR-Reaktion erfolgte wie unter 2.7.13.

### **2.7.16 Isolierung von Ribonukleinsäuren aus Hefe**

Für die Isolation von RNA aus Hefe wurden 5 OD Zellen einer exponentiellen Kultur ( $OD_{600} = 0,2-0,8$ ) abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 200  $\mu$ l Extraktionspuffer (0,5 M NaCl; 0,2 M Tris-HCl pH 7,6; 0,01 M EDTA; 1% SDS) resuspendiert und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 200  $\mu$ l einer 1+1 Mischung Phenol/Chloroform wurden 400 mg Glasperlen zugegeben und 2,5 min auf einem Vortexer aufgeschlossen. Anschließend wurden 300  $\mu$ l Extraktionspuffer und 300  $\mu$ l Phenol/Chloroform zugegeben und wieder eine Minute gevortext. Die Zelltrümmer wurden 5 min bei 13 000 rpm in einer Eppendorfsentrifuge abzentrifugiert. Die wässrige, obere Phase wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Bei Bearbeitung von mehreren Proben wurden diese nach diesem Schritt auf Eis gesammelt. Nach Inkubation auf Eis wurde das gleiche Probenvolumen an Phenol/Chloroform zugegeben, kurz geschüttelt und 5 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und die RNA mit dem 2,5 fachen Volumen Ethanol gefällt. Die RNA wurde durch eine Zentrifugation von 10 min bei 13 000 rpm pelletiert und zweimal mit 3 M Li-Acetat pH 6,0 gewaschen (kräftig vortexen, bis sich das Pellet ablöst), um die DNA zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand verworfen und die RNA mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Die RNA wurde durch Zentrifugation bei 13 000 rpm, 5 min, wieder pelletiert. Das RNA-Pellet wurde in 100  $\mu$ l sterilem  $H_2O$  resuspendiert. Die RNA-Menge wurde durch Messung im Spektrometer ermittelt.

## **2.8 DNA-RNA-Hybridisierung („Northern-Blot“-Analyse) und Detektion**

### **2.8.1 Elektrophoretische Auftrennung von RNA auf Formaldehydgelen**

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA-Proben erfolgte auf einem Agarose-Formaldehyd-Gel. Für die Herstellung des Geles (200 ml Endvolumen) wurden 1,2% Agarose in 150 ml  $H_2O$  aufgekocht und auf 60°C abgekühlt. Das Gel wurde, nach

Zugabe von 20 ml 10x MOPS-Puffer (0,2 M Morpholinopropanesulfonic acid; 0,05 M Li-Acetat; 0,01 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH7,0) und 6% Formaldehyd, gegossen. Als Gelpuffer diente 1x MOPS-Puffer. Die RNA-Proben (2 µg) wurden in Probenpuffer (50% Formamid; 6% Formaldehyd; 1x MOPS-Puffer) aufgenommen (Gesamtvolumen 20 µl) und 15 min bei 60°C erhitzt. Anschließend wurden 2 µl Blaumarker zu den Proben gegeben und das Gel beladen. Der Gellauf erfolgte bei 100 V für ca. 4h.

### 2.8.2 Kapillarblot-Aufbau

Nach beendetem Gellauf wurde das Gel (2.8.1) in 5-fachem Volumen dH<sub>2</sub>O 5 min gewaschen. Dies wurde viermal wiederholt, um das Formaldehyd aus dem Gel zu waschen. Eine Gene Screen Plus Membran (Perkin Elmer, Boston) wurde auf die Gelgröße zurechtgeschnitten und einige Sekunden in dH<sub>2</sub>O gewässert. Anschließend wurde die Membran 15 min in 10x SSPE-Puffer (20x SSPE: 3 M NaCl; 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O; 0,02 M EDTA-Na<sub>2</sub>; pH 7,4 mit NaOH) inkubiert. Ein Kapillarblot, bestehend aus (von unten nach oben) 2x Whatman, Gel (mit den Geltaschen nach unten), Gene Screen Membran, 3x Whatman, Stapel Papierhandtücher, Gewicht 1,5-2kg, wurde aufgebaut und mit Parafilm, der an den Rand der Membran gelegt wurde, rundherum abgedichtet. Der RNA-Transfer erfolgte über Nacht (ca. 16 h) in 10x SSPE-Puffer. Nach Abbau des Blots wurde die Membran mehrmals in 2x SSPE-Puffer gewaschen. Dabei wurden Agarosereste vorsichtig mit den Fingern (Handschuhe!) abgerieben. Die transferierte RNA wurde mittels UV-Bestrahlung auf der Membran fixiert (2 min unter einer Lampe des Typs G8T5 8000 µW/cm<sup>2</sup>) und in 2x SSPE-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Membran auf einem Whatmanpapier gut abgetropft und 2 h bei 80°C gebacken.

### 2.8.3 Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurde die Membran in 2x SSPE-Puffer gewässert. In einem Hybridisierungsröhrchen wurde die Membran mit 20 ml vorgewärmter Prähybridisierungslösung bei 42°C 4 h in einem Hybridisierungsofen, inkubiert (Prähybridisierungslösung: 5x SSPE; 50% (w/v) deionisiertes Formamid, 5x Denhardt's Lösung (100x Denhardt's: 1 gm Polyvinylpyrrolidone, MW 40 000;

1 gm Bovine Serum Albumine; 1 gm Ficoll 400; in 50 ml H<sub>2</sub>O; steril filtriert); 1% SDS; 10% Dextransulfat, Na-Salz/MW 500,00; 100 µg/ml denaturierte Heringssperma DNA), Es folgte ein Austausch durch eine Hybridisierungslösung (wie Prähybridisierungslösung, nur ohne unspezifische DNA). Zu der Hybridisierungslösung wurde die zuvor mit einer Sephadexsäule aufgereinigte und 5 min bei 95°C denaturierte Sonde (2.7.11) zugegeben, ohne dabei die Membran direkt zu berühren. Die Hybridisierung erfolgte für 16-24 h bei 42°C im Hybridisierungssofen. Die hybridisierte Membran wurde 2 mal 15 min in 200ml 2x SSPE-Puffer, 2 mal 45 min in 2x SSPE-Puffer + 2% SDS (bei 65°C) und 2 mal 15 min in 200 ml 0,1x SSPE-Puffer (bei Raumtemperatur) gewaschen. Die feuchte Membran wurde in Klarsichtfolie eingepackt und auf einen Röntgenfilm (Fuji RX oder Kodak X-OMAT™) gelegt, der für 1- 6 h exponiert wurde.

## 2.9 Analyse von Proteinen

### 2.9.1 Herstellung von Hefe-Rohextrakten

Zwei OD<sub>600</sub> Einheiten einer exponentiellen Hefekultur wurden durch Zentrifugation bei 500 g geerntet. Nach Waschen der Zellen mit H<sub>2</sub>O wurden die Zellen in 100 µl Lysispuffer (0,3 M Sorbitol; 50 mM HEPES; 10 mM NaN<sub>3</sub>; pH 7,5) mit Proteaseinhibitoren (je 0,5 µg/ml von Aprotinin, Antipain, Chymostatin, Leupeptin und Pepstatin A; 1,6 µg Benzamidin; 1 µg/ml Phenanthrolin und 170 µg/ml Phenylmethylsulfonyl Fluorid) resuspendiert. Die Zellyse erfolgte durch Schütteln mit Glasperlen auf einem Vortexschüttler (Vibrax) (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) für 5 min bei 4°C. Zu dem Zelllysate wurden 150 µl Probenpuffer (4% SDS; 20% Glycerin; 125 mM Tris-Cl, pH 6,8; 0,2% Bromphenolblau) mit 40 mM DTT zugegeben und 15-30 min bei 50°C inkubiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Vor Beladung eines SDS-Gels (2.9.2) mit den Zellextraktproben wurden sie nochmal bei 50°C aufgelöst. Es wurden 0,2 OD<sub>600</sub> Einheiten pro Probe auf das Gel geladen.

### **2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen, nach Laemmli (1970), in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid Gelsystem aufgetrennt. Es wurden ein 5%iges Sammelgel (125 mM Tris-Cl, pH 6,8; 0,1% SDS; 0,025% APS; 0,1% TEMED; 5% Acrylamid) und ein 7,5-10%iges Trenngel (375 mM Tris-Cl, pH 8,8; 0,1% SDS; 0,025% APS; 0,1% TEMED; 7,5-10% Acrylamid) benutzt. Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris; 0,192 M Glyzin; 0,1% SDS; pH 8,3. Die Proteine wurden bei maximal 250 V und 35 mA aufgetrennt.

### **2.9.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western-Blotting**

Nach ihrer gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Proteintransfer erfolgte in Transferpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glyzin; 20% Methanol) 3 h bei 60 V oder über Nacht bei 40 V. Durch eine reversible Anfärbung mit dem Farbstoff Ponceau S wurde der Proteintransfer auf die Membran nachgewiesen. Durch eine Inkubation der Membran in PBS/TWEEN (10 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2; 150 mM NaCl; 0,05% TWEEN 20) mit 1% Magermilchpulver wurden unspezifische Bindungen der Antikörper vermindert. Die Membran wurde 90 min mit Primärantikörpern (verdünnt in PBS/TWEEN mit 1% Trockenmilch) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran in PBS/TWEEN für jeweils 5 min, erfolgte eine Inkubation mit einem Zweitantikörper für 1 h in PBS/TWEEN. Anschließend wurde die Membran zweimal 5 min mit PBS/TWEEN gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden entweder durch alkalische Phosphatase oder Peroxidase nachgewiesen. Für die Detektierung mit alkalischer Phosphatase wurde die Membran noch zusätzlich 5 min in Substratpuffer (0,1 M Tris-Cl, pH 8,8; 0,1 M NaCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>) inkubiert. Die Antikörper wurden in einer enzymatischen Farbreaktion nachgewiesen. Als Substrate hierfür dienten 0,1 mg/ml BCIP und 1 mg/ml NBT. Die Membran wurde anschließend mit dem DUOSCAN f40 Scanner (Agfa) eingescannt.

Für die Detektion über Peroxidase wurde das „Lumi Light Kit“ (Roche) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Die Lumineszenz wurde mit dem „LAS“ (luminescence imaging system) von Fuji nachgewiesen.

Die Signale wurden mit den Programmen „NIH Image“ oder „Image J“ quantifiziert.

### 2.9.4 Phosphatasebehandlung von Proteinen

Es wurden 4 OD<sub>600</sub> einer exponentiellen Hefekultur geerntet und das Pellet 5 min bei 95°C gekocht. Nach Resuspendierung in 100 µl SDS Probenpuffer wurden die Zellen durch Schütteln mit Glasperlen aufgeschlossen und die Zelltrümmer 5 min bei 500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde 1:5 mit 60 mM Tris-Cl pH 6,8 verdünnt. Ein Aliquot, das 0,2 OD<sub>600</sub> Einheiten entspricht, wurde mit 5 U CIP 4h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 Volumen 2x SDS Gel-Probenpuffer wurden die Proben wieder 5 min bei 95°C erhitzt und komplett auf ein SDS-Gel geladen.

### 2.9.5 Co-Immunopräzipitation

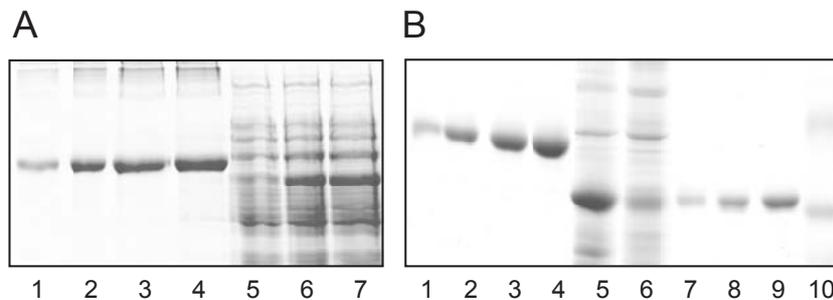
Es wurden 5 OD<sub>600</sub> Zellen einer exponentiellen Hefekultur (OD<sub>600</sub><0,8; 5x10<sup>7</sup>/ml) geerntet, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und in 100 µl Lysispuffer (0,3 M Sorbitol; 10 mM NaN<sub>3</sub>; 50 mM HEPES pH 7,5) mit Proteaseinhibitoren (2.9.1) resuspendiert. Die Zellen wurden durch Schütteln mit Glasperlen aufgeschlossen. Nach Zugabe von 650 µl Lysispuffer (mit Proteaseinhibitoren) wurden die Zelllysate in 1% Triton-X-100 30 min auf Eis inkubiert. (Hier wurden 30 µl Probe als Totalextrakt entnommen und mit 30 µl Probenpuffer versetzt.) Anschließend wurden die Zellextrakte 5 min bei 500 g zentrifugiert, um die Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde 1 h bei 4°C mit Antikörpern und eine weitere Stunde bei 4°C mit 50 µl Protein A-Sepharose Beads (20% Lösung) inkubiert. Die Protein A-Beads wurden dreimal mit Lysispuffer in einer Tischzentrifuge bei 4°C gewaschen (2x 1 min 150g, 1x 20 sek 13 000g) und anschließend in 50 µl Probenpuffer (100 mM DTT) und 50 µl Lysispuffer aufgenommen und vor dem Gelauftrag 15 min bei 37°C inkubiert.

### 2.9.6 Präparation von Fusionsproteinen

1000 ml Zellen einer exponentiellen *E. coli*-Kultur (Zellen transformiert mit einem Plasmid, das ein GST-SNF7-Fusionskonstrukt enthält) wurden mit 1 mM IPTG 4h bei 37°C induziert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in Lysispuffer (50 mM Tris-Cl pH 7,6; 5 mM EDTA pH 8,0; 0,3 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 µg/ml DNase 1; Proteaseinhibitoren), mit einem Endvolumen von 10 ml, aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte zweimal in der French Press bei 10 000 PSI. Der Zellextrakt

## Material und Methoden

wurde 10 min in einem JA20-Rotor bei 10 000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20°C weggefroren. Auf einem SDS-Gel wurde die Induzierung von Snf7-GST durch Anfärben der Proteinextrakte mit dem Farbstoff Coomassieblau (0,025% Coomassie Brilliant Blue R250; 20% Methanol; 7% Essigsäure) getestet. Nach 4 h IPTG-Induktion sollte eine deutliche Anhäufung des Proteins zu beobachten sein (Abb. 5A). Als Protein-Mengenstandard diente BSA.



**Abb. 5: Induktion des Snf7-GST Fusionsproteines.** A: Gst-Snf7-Proteinmenge nach Induktion mit 1mM IPTG nach 0, 2 und 4h (A; Spur 5-7). B: Snf7-GST-Fusion nach Aufreinigung auf einer GST-Säule. *E. coli* Zellextrakt vor (B, Spur 5) und nach Lauf über die Säule (B, Spur 6) als Kontrolle für die Affinitätsbindung von Snf7 an die Säulenmatrix. Eluiertes Snf7-Protein aus drei verschiedenen Eluat ist in den Spuren B 7-9 zusehen. Es wurden je 2,5 µl von 1ml Eluat aufgetragen. In den Spuren A/B 1-4 wurde BSA als Proteinstandard (1-4 µg) aufgetragen. Das Gel wurde in Coomassieblaulösung angefärbt.

### 2.9.7 Aufreinigung von Fusionsproteinen

Die Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen erfolgte mit Glutathion-Sepharose gefüllten Säulen. Hierfür wurde eine Säule mit 1x PBS gereinigt, bis sie tropfte. Anschließend wurde die Säule mit Sepharose aufgefüllt (Total 1 ml Sepharose). Die Säule wurde mit 20 ml 1x PBS pH 7,4 gewaschen (Tropfgeschwindigkeit der Säule: ~1 ml/5min). Die Fusionsproteinprobe (Überstand aus 2.9.6) wurde bei höchster Geschwindigkeit abzentrifugiert und der Überstand durch eine Membran (Porendurchmesser 0,4 µm) filtriert damit die Säule nicht durch Zellreste verstopft wird. Der Probenüberstand wurde auf die Säule gegeben (Tropfgeschwindigkeit der Säule: ~1 ml/5 min). Nach Probendurchlauf erfolgte ein Waschen der Säule mit 20 ml 1x PBS. Die Elution des Fusionsproteins erfolgte mit 20 ml Elutionspuffer (50 mM Tris-Cl pH 8,0; 10 mM reduziertes Glutathion), wobei 1 ml Fraktionen gesammelt wurden. Die Proben wurden bei 4°C aufbewahrt. Die eluierte Proteinmenge in den einzelnen Proben wurde auf einem SDS-Gel mit anschließender Färbung mit dem Farbstoff Coomassie-Blau (0,025% Coomassie Brilliant Blue R250; 20% Methanol; 7% Essigsäure) ermittelt (Abb. 5B). Als Proteinmengen-Standard dienten

unterschiedliche Mengen an BSA. 1,5 mg des Fusionsproteins wurden an Serumun zur Immunisierung von Kaninchen geschickt.

### **2.9.8 Affinitätsreinigung von Antikörpern**

Die Aufreinigung von Snf7 Antikörpern erfolgte über Affigel 15 Säulen, an die Snf7-Protein gebunden war. Für die Bindung des Snf7 Proteins an die Säule musste das Protein, das sich in einem Tris-Puffer befand (2.10.7), mit HEPES pH 7,5 dialysiert werden, um es in ein saures Milieu zu bringen. Für die Herstellung der Säule wurden 2 ml Affigel 15 dreimal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Es wurde 1 ml Gel mit 1 ml Snf7-Protein (in HEPES) gemischt und 4 h bei 4°C leicht geschüttelt. Das Gel wurde in eine angefeuchtete Säule gegeben. Um zu testen, ob das Protein an die Säule gebunden hatte, wurde der Durchfluss aufgefangen und auf einem Coomassie Gel getestet, ob Protein im Durchfluss zu finden war. Die Säule wurde mit 16 ml 6 M Guanidin HCl und 50 ml Puffer A (50 mM Tris-Cl pH 7,4) gewaschen. Nach Zugabe des Antikörperserums (Durchfluss max. 5 ml/h) wurde die Säule mit 20 ml Puffer A gewaschen. Es folgten Waschschrirte mit 40 ml Guanidin HCl und 20 ml Puffer A. Die Elution der Antikörper erfolgte mit Elutionspuffer (0,2 M Glyzin; 1 mM EGTA pH 2,7). Das Auffangen des Eluates erfolgte in 1 ml Schritten. Um zu erkennen, ab wann das saure Eluat aus der Säule tropfte, wurde kontinuierlich der pH mit Teststäbchen überprüft. Das Eluat wurde mit 500 µl Glycerin/ml Eluat konserviert und bei -20°C eingefroren.

## **2.10 Zellfraktionierungen**

### **2.10.1 Differentielle Zentrifugation**

10 OD<sub>600</sub> Einheiten von Zellen einer exponentiellen Hefekultur wurden geerntet und in H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Zellen wurden in 250 µl Lysispuffer mit Proteinaseinhibitoren (2.9.1) resuspendiert und mit Glasperlen 5 min bei 4°C durch Schütteln auf einem Vibrax aufgeschlossen. Nach Zugabe von 400 µl Lysispuffer wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 500 g, 5 min, entfernt. Der Überstand wurde in drei Proben aufgeteilt: 100 µl Zellextrakt wurden mit 100 µl Gelprobenpuffer (2.9.1) versetzt

(Zellextrakt), 150 µl wurden mit 1% Triton-X-100 versetzt und eine 150 µl Probe blieb unbehandelt. Die beiden 150 µl Proben wurden 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 13 000g und 4°C für 10 min. Das resultierende Pellet P13 wurde in 150 µl Lysispuffer und 150 µl Gelprobenpuffer (+ 40 mM DTT) resuspendiert. Der Überstand wurde bei 100 000g 1 h lang zentrifugiert und man erhielt das P100 Pellet und den S100 Überstand. Das P100 Pellet wurde in 150 µl Lysispuffer und 150 µl Gelprobenpuffer resuspendiert. Die S100 Fraktion wurde in 150 µl Gelprobenpuffer aufgenommen. Alle Proben wurden 15-30 min bei 50°C erhitzt. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mit Westernblotting nachgewiesen. Die Probenmenge entsprach 0,2 OD<sub>600</sub> Einheiten Zellen.

### **2.10.2 Flotation Gradienten**

Es wurden 10 OD<sub>600</sub> Einheiten einer exponentiellen Hefekultur geerntet und mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 µl TNE-Puffer (50 mM Tris-Cl pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA) mit Proteinaseinhibitoren (2.9.1) aufgenommen. Die Zellen wurden durch Schütteln auf einem Vibrax mit Glasperlen aufgeschlossen. Nach Zugabe von 250 µl TNE-Puffer (+ Proteaseinhibitoren) wurden die Zelltrümmer, durch eine Zentrifugation bei 500 g für 5 min, entfernt. 125 µl des Überstandes wurde mit 250 µl einer 60% Optiprep Lösung (Axis-Shield) gemischt (Endkonzentration 40%) und in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Zellextrakt suspension wurde überschichtet mit 600 µl einer 30%igen Optiprep Lösung (Optiprep verdünnt in TNE-Puffer) und 100 µl TNE-Puffer. Der Gradient wurde bei 77000g 4°C für 2 h in einem TLA 100.2 Rotor in einer Beckmann Tisch-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Sechs gleiche Fraktionen wurden von oben nach unten abgenommen und mit gleicher Menge Gelprobenpuffer (2.10.1) 15-30 min bei 50°C inkubiert. Gleiche Probenmengen wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine mit Westernblotting nachgewiesen.

### **2.10.3 Sucrose-Dichte-Gradienten**

100 ml Zellen einer exponentiellen Hefekultur wurden durch Vakuumfiltration auf Nitrozellulosefiltern geerntet. Die Zellen wurden in STED10-Puffer (10% Sucrose, 10 mM Tris-Cl pH7,6; 10 mM EDTA; 1 mM DTT plus Proteinaseinhibitoren (2.9.1)) resuspendiert und mit Glasperlen 5 min durch Schütteln auf einem Vibrax lysiert. Nach einer weiteren Zugabe von 1 ml STED10 Puffer wurden Zelltrümmer bei 5 min und 500 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf einen Gradienten, bestehend aus 4 ml STED53 (53% Sucrose), STED36 (36% Sucrose), STED20 (20% Sucrose) in einem SW40 Zentrifugenröhrchen, geschichtet. Zuvor wurde der Gradienten 3 h in horizontaler Position gelagert, damit sich die Sucroselösungen gleichmäßig verteilen. Der, mit Zellextrakt beladene, Gradient wurde 14 h bei 30 000 rpm, 4°C, in einem Beckmann SW40-Rotor zentrifugiert. Es wurden 18 700 µl Fraktionen von oben nach unten abgenommen. Jeweils 250 µl der einzelnen Fraktionen wurden mit 250 µl Gelprobenpuffer (2.9.1) 15-30 min bei 37°C solubilisiert. Jeweils 50 µl der Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine mit Westernblotting nachgewiesen.

## **2.11 Pulse Chase Experimente und Immunopräzipitation**

### **2.11.1 Pulse-Chase-Experiment**

Zur Bestimmung von Protein-Halbwertszeiten wurden Hefezellen über Nacht in Minimalmedium (YNB und Aminosäuren) angezogen. Es wurden 5 OD<sub>600</sub> Einheiten logarithmisch wachsender Zellen abzentrifugiert und in 3 ml frischem Medium aufgenommen (2 OD<sub>600</sub>/ml). Die Zellen wurden 20 min bei 30°C inkubiert. Die radioaktive Markierung neu synthetisierter Proteine erfolgte durch Zugabe von 70 µCi Trans<sup>35</sup>S-Label (ICN) („Pulse“). Nach 15 min wurde 1/50 Volumen konzentrierte Chase-Lösung (0,3% Cystein; 0,4% Methionin) beigemischt („Chase“). Nach 0, 20, 40, 60 min wurden Aliquots zu je 500 µl abgenommen. Die Zellen wurden 1 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert und mit 10 mM NaN<sub>3</sub> gewaschen. Die Pellets wurden in 120 µl Lysispuffer (2.9.1) mit Proteaseinhibitoren (2.9.1) resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 400 mg (±5 mg) Glasperlen (Ø 0,45 mm) überführt. Der Aufschluss erfolgte durch dreiminütiges Schütteln auf einem Vibrax.

Nach Zugabe von 100 µl 2x Probenpuffer (2.9.1) wurden die Zellextrakte 30 min bei 50°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben zur Immunopräzipitation (2.11.3) eingesetzt.

### 2.11.2 CPY-Sorting

Hefezellen wurden in Minimalmedium (YNB mit Aminosäuren/ohne Methionin) exponentiell angezogen und 1 OD<sub>600</sub> Einheit geerntet. Die Zellen wurden in 500 µl Minimalmedium (+ Aminosäuren, + 1 mg/ml BSA, IgG-frei) resuspendiert und 10 min bei 30°C inkubiert. Die radioaktive Markierung neu synthetisierter Proteine erfolgte durch Zugabe von 70 µCi Trans<sup>35</sup>S-Label (ICN) („Pulse“). Nach 15 min wurde 1/50 Volumen konzentrierte Chase-Lösung (0,3% Cystein; 0,4% Methionin) beigemischt („Chase“). Nach 40 min erfolgte die Zugabe von 500 µl 2x S-Puffer (2,4 M Sorbitol; 0,1 M Tris-Cl pH 7,5; 2 mM MgCl<sub>2</sub>) mit Proteaseinhibitoren (2.9.1), 40 mM DTT (Endkonzentration) und 10 mM NaN<sub>3</sub> (Endkonzentration). Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurden 20 µg Zymolyase zugegeben und 25 min bei 30°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 5 000 rpm für 5 min. Diese Zentrifugation wurde mit dem Überstand einmal wiederholt und die Pellets aus den beiden Zentrifugationsschritten zusammen mit 100 µl 1 M Tris-Cl pH 6,8 in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde nach Zugabe von 100 µl 2x Gelprobenpuffer (2.10.1) 10 min bei 95°C gekocht, anschließend 2 min bei 13 000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Der Pelletüberstand (nach Zentrifugation bei 5 000 rpm, 5 min) wurde mit 100 µl 50% TCA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 13 000 rpm für 30 min. Das TCA-Pellet wurde in 100 µl 1 M Tris-Cl pH 6,8 und 100 µl 2x Gelprobenpuffer (2.9.1) resuspendiert und 10 min bei 90°C gekocht. Anschließend wurden die Proben zur Immunopräzipitation (2.11.3) eingesetzt.

### 2.11.3 Immunopräzipitation

Zu den Proben wurde 800 µl IP-Dilutionspuffer (1,25% Triton X-100; 6 mM EDTA; 60 mM Tris/HCl, pH 7,6) gegeben. Unlösliches Zellmaterial wurde durch eine fünfminütige Zentrifugation abgetrennt. Nach Inkubation mit 3 µl 9E10-Antiserum

(anti-c-myc) über Nacht bei 4°C erfolgte die Zugabe von 50 µl einer 20%igen Protein A-Sepharose-Lösung. Die Proben wurden weitere 3 h bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal mit IP-Puffer (1% Triton X-100; 0,2% SDS; 150 mM NaCl; 50 mM Tris/HCl, pH 7,6; 5 mM EDTA) gewaschen. Das Pellet wurde in 50 µl IP-Puffer aufgenommen und mit 50 µl Probenpuffer (2.9.1) und 100 mM DTT versetzt. Die Denaturierung erfolgte für 30 min bei 50°C. Jeweils 50 µl des immunpräzipitierten Materials wurden auf ein SDS-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt (2.9.2). Anschließend wurden die Gele 30 min in Entfärbelösung (20% Methanol, 7% Essigsäure) fixiert, für weitere 30 min mit Amplify behandelt und 2 h bei 80°C getrocknet. Die Proteine wurden durch Autoradiografie mit einem Kodak Röntgenfilm nachgewiesen. Eine Quantifizierung der Banden erfolgte densitometrisch (DUOSCAN f40, AGFA) mit dem Programm „NIH Image“.

### 2.12 Immunfluoreszenz

Exponentiell gewachsene Zellen wurden 4 h mit Formaldehyd (Endkonzentration 5%) bei 30°C fixiert. Die fixierten Zellen wurden nach Pringle *et al.*, 1989 sphäroplastiert und auf einen „Multi-well“ Objektträger gebracht, der vorher mit 0,1% Polylysin (Sigma) behandelt worden war. Die Zellen wurden zuerst 90 min mit anti-HA Mausprimärantikörpern (1:100 verdünnt in PBS + 1 mg/ml BSA, IgG frei) inkubiert und anschließend vier Mal mit 1x PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit einem FITC-konjugierten anti-Maus Zweitantikörper (1:200 verdünnt in 1x PBS/BSA) für 90 min. Die Zellen wurden wieder viermal mit 1x PBS gewaschen und 5 min mit 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (1 mg/ml in PBS) zur Anfärbung der Zellkerne inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zeiss Axioskop Mikroskop untersucht. Es wurde ein FITC-Filterset benutzt und die Zellen wurden mit einer CCD (charge-coupled device) Kamera (AxioCam, Zeiss) fotografiert.

### 2.13 Tropftests

Um das Wachstum auf verschiedenen Kohlenstoffquellen in Anwesenheit verschiedener Chemikalien zu testen, wurden die Hefezellen auf die entsprechenden Platten getropft und bei 25°C inkubiert. Für die Kontrolle auf Temperatursensitivität

wurden die Zellen bei 37°C angezogen. Von jedem zu testenden Stamm wurden jeweils 4 Verdünnungen einer logarithmisch wachsenden Kultur auf eine Platte getropft. Die erste Verdünnung enthielt eine Zellmenge, die 0,5 OD<sub>600</sub> Einheiten entsprach. Die weiteren Verdünnungen erfolgten in 1:10 Schritten.

### **2.14 Gendeletion in *S. cerevisiae***

Die Deletion von Genen erfolgte nach der auf PCR basierenden von Longtine *et al.*, 1998, beschriebenen Methode. Bei dieser Methode werden Gen-Deletionen und Gen-Modifikationen durch homologe Rekombination von Markern in die chromosomale DNA generiert. Hierfür wurden 60-mere Oligonukleotide verwendet, deren 20 3'-ständigen Basen die Amplifikation eines Selektionsmarkers erlauben, der auf einem Plasmid vorliegt. Die 40 5'-ständigen Basen erlauben die homologe Rekombination ins Genom. Mit dieser Methode wurden auch Proteine C-terminal mit einem Epitop markiert. Die erfolgreiche Deletierung von Genen wurde in einer weiteren PCR-Reaktion getestet. C-terminale Proteinmodifikationen wurden mit Westernblotting nachgewiesen.

### **2.15 SNF7-Mutagenese**

Zur Herstellung von SNF7-Mutationen wurde eine fehleranfällige PCR-Reaktion durchgeführt. Der Reaktionsmix enthielt folgende Bestandteile: 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MnCl<sub>2</sub>; 0,5 mM dNTPs, 1 µM Primer; 4 U Taq-Polymerase, 2 ng Template DNA (pRK796). Die PCR-Reaktion erfolgte in 35 Zyklen mit 1 min Annealing bei 57,4°C und einer Verlängerungszeit von 4 min bei 68°C. Die PCR-Fragmente wurden mit dem linearisierten Vektor YCplac33 (*Bam*HI/*Sall*) in den Hefestamm RKY1854 co-transformiert. His<sup>+</sup>-Transformanten wurden auf SD-Platten mit 0,5 mM CuSO<sub>4</sub> und den benötigten Aminosäuren (ohne Histidin und Uracil) selektiert.

### 2.16 Invertase-Assay

Es wurden 2 OD<sub>600</sub> Einheiten von Hefezellen, die in SD/CAS (SD 1% Casaminoacids + Tryptophan) mit 5% Glukose exponentiell angezogen worden waren, geerntet, gewaschen und in SD/CAS + 0,1% Glukose aufgenommen und 2 h bei 25°C inkubiert, um die Expression von Invertase zu induzieren. Anschließend wurden die Zellen geerntet, zweimal in kaltem 10 mM NaN<sub>3</sub> gewaschen und in 100 µl 0,1 M Li-Acetat resuspendiert. Die Zellen wurden durch Schütteln in Glasperlen aufgeschlossen. Eine passende Menge Zellextrakt (1-10 µl) wurde 20 min bei 37°C mit Li-Acetat pH 5,0 und 25 µl 0,5 M Sucrose (frisch hergestellt) inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 150 µl 0,2 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und dreiminütiges Kochen bei 95°C gestoppt. Die Proben wurden auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 1 ml Reaktionsmix (2,5 mg/ml Glukose-Oxidase; 0,5 mg/ml Peroxidase; 0,3 mg/ml o-Dianisidin; 0,1 M K-Phosphat pH 7,0) 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 6 N HCl wurde die Absorption bei 540 nm gemessen.

### 2.17 Isolierung von Zellkernen

Zellkerne wurden nach der modifizierten Methode von Hurt *et al.*, 1988, isoliert. Die Hefezellen wurden in Vollmedium mit 5% Glukose exponentiell (OD<sub>600</sub><0,8; 5x10<sup>7</sup>/ml) angezogen. 800 OD<sub>600</sub> Zellen wurden geerntet und in 100 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Zellen wurden in 25 ml 0,1 M Tris-Cl pH 9,4; 10 mM DTT resuspendiert und 10 min bei 25°C geschüttelt. Danach wurden die Zellen mit 50 ml S-Puffer (1,2 M Sorbitol; 20 mM K-Phosphat, pH 7,4) gewaschen und in 25 ml S-Puffer mit 2 mg Zymolyase T100 und 2 mM DTT resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei 30°C für 1 h bei leichtem Schütteln. Die Zellen wurden 5 min bei 500 g pelletiert und in 50 ml 18% Ficoll 400, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM K-Phosphat, pH 6,5; aufgenommen. Die Zellen wurden mit einem großen Pistill 30x „gedounced“. Nach Zugabe von 50 ml 2,4 M Sorbitol; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM K-Phosphat, pH 6,5; wurden die lysierten Zellen bei 750 g 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals mit den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand 25 min bei 8 500 g zentrifugiert und das Pellet wurde vorsichtig in 4 ml 0,3 M Sucrose; 16,6% Ficoll 400; 0,5 M MgCl<sub>2</sub>; 20 mM K-Phosphat, pH 6,5; aufgenommen und nochmals 10x, diesmal mit einem dünneren Pistill, „gedounced“. Das Zelllysate wurde für 10 min bei 500 g abzentrifugiert und der Überstand wurde auf einen

## Material und Methoden

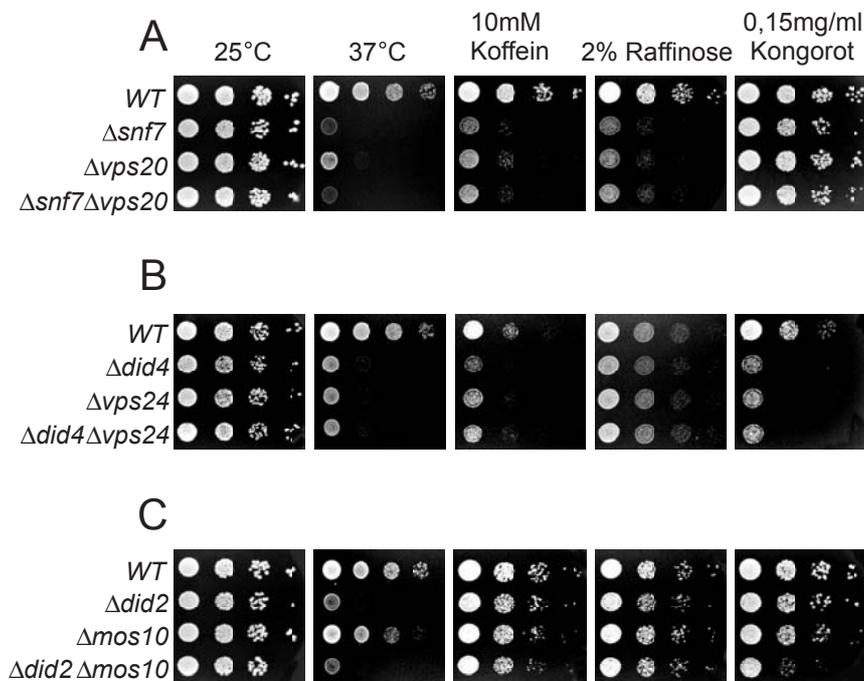
---

Sucroseschichtgradienten mit 2 ml Schritten von 2, 1,8; 1,5; 1,3 und 1,2 M Sucrose in 9% Ficoll 400; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 20 mM K-Phosphat, pH 6,5 geschichtet. Der Gradient wurde 1 h bei 25 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Bande an der Grenze zwischen 1,8 M und 2 M Sucrose sollte die Zellkerne enthalten. Nach allen Zentrifugationsschritten wurde mit DAPI die Anwesenheit von Zellkernen unter dem Mikroskop getestet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Untersuchung der Wachstumsphänotypen von Deletionsmutanten der SNF7-Familie

Über die sechs Proteine aus der Snf7-Familie ist bekannt, dass sie alle an Endosomen lokalisiert sind. Das Endosom scheint gleichzeitig ihr Wirkungsort zu sein. Um mehr über die Funktion dieser Proteine zu erfahren, sollten Deletionsstämme auf Wachstumsdefekte untersucht werden. Hierfür wurden Verdünnungsreihen der Deletionsstämme auf unterschiedliche Medien getropft (Abb. 6).



**Abb. 6: Untersuchung der Wachstumsphänotypen von Deletionsmutanten.**

Untersucht wurde das Wachstum der Deletionsstämme (A)  $\Delta snf7$  (RKY1852),  $\Delta vps20$  (RKY1853),  $\Delta snf7\Delta vps20$  (RKY1829), (B)  $\Delta did4$  (RKY1732),  $\Delta vps24$  (RKY1730),  $\Delta did4\Delta vps24$  (RKY1828), (C)  $\Delta did2$  (RKY1728),  $\Delta mos10$  (RKY1654) und  $\Delta did2\Delta mos10$  (RKY1835) im Vergleich zum Wildtyp JD52 (RKY1558). Die Zellen wurden in Vollmedium angezogen und in 1:10 Verdünnungen (von links nach rechts) auf verschiedene Medien getropft. Gezeigt ist das Wachstum bei 25°C, 37°C, auf 10 mM Koffein, 2% Raffinose und 0,15 mg/ml Kongorot in Vollmedium (YEPD). Mit Ausnahme der Platten, denen Raffinose als einzige Kohlenstoffquelle zugesetzt worden war, enthielten alle Medien 2% Glukose. Die Platten wurden, wenn nicht anders angegeben, für 3 -5 Tage bei 25°C inkubiert.

## Ergebnisse

---

Neben dem Wachstum auf Vollmedium bei unterschiedlichen Temperaturen, wurde das Wachstum auf Koffein, Kongorot und Raffinose untersucht. Die Wirkung von Koffein und Kongorot ist nicht genau bekannt. Vermutlich wirken beide Substanzen destabilisierend auf die Zellwand. Ferner aktivieren beide Substanzen den Slit2-MAP-Kinase-Weg, der wichtig für die Aufrechterhaltung der Zellintegrität ist (Schmitz *et al.*, 2002). Raffinose wurde statt Glukose als Kohlenstoffquelle dem Medium zugegeben, um zu testen ob die Glukosederepression in den Deletionsstämmen noch funktioniert. Hefen sind normalerweise in der Lage unterschiedliche Kohlenstoffquellen zu nutzen, sie bevorzugen jedoch Glukose. In Anwesenheit von Glukose werden alle Gene, die zur Verwertung anderer Kohlenstoffquellen, wie z. B. Raffinose, benötigt werden, reprimiert. Diese Glukoserepression muss bei Abwesenheit von Glukose aufgehoben werden, um die Hefen in die Lage zu versetzen, andere Kohlenstoffquellen nutzen und damit auch wachsen zu können.

Die Tropftests auf diesen verschiedenen Medien zeigten interessanterweise, dass die Deletionsstämme unterschiedliche Wachstumsphänotypen aufweisen, obwohl alle *SNF7*-Homologen eine Funktion an ein und demselben Kompartiment, dem Endosom, haben. Bei näherer Betrachtung war auffällig, dass die Einzeldelentionsstämme  $\Delta snf7$  und  $\Delta vps20$  (Abb. 6A) sowie  $\Delta vps24$  und  $\Delta did4$  (Abb. 6B) jeweils identische Wachstumsmuster zeigten. Im Gegensatz dazu wiesen die *DID2*- und *MOS10*-Deletionsstämme distinkte Wachstumsphänotypen auf.

*Snf7*, *Vps20*, *Vps24* und *Did4* bilden zusammen den ESCRTIII-Komplex, der an späten Endosomen zur Bildung von MVB-Vesikeln gebraucht wird. Entsprechend zeigten die vier Einzeldelentionen ähnliche Wachstumsphänotypen. Sie waren temperatursensitiv bei 37°C und waren empfindlich gegenüber Koffein im Wachstumsmedium. Trotzdem gab es auch Unterschiede im Wachstumsverhalten der ESCRTIII-Deletionsstämme: auf Raffinose zeigten  $\Delta snf7$  und  $\Delta vps20$  einen Wachstumsdefekt. Sie haben anscheinend Probleme, Raffinose als alternative Kohlenstoffquelle zu verwerten. Dies weist auf einen Defekt der Glukosederepression hin. Die anderen beiden ESCRTIII-Deletionsmutanten  $\Delta vps24$  und  $\Delta did4$  wachsen dagegen normal auf Raffinoseplatten. Stattdessen zeigen sie jedoch einen starken Wachstumsdefekt auf Platten mit Kongorot. Die Zugabe von Kongorot ins Medium hatte jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum der *SNF7*- und *VPS20*- Deletionsstämme.

Did2 und Mos10 sind nicht Teil des ESCRTIII-Komplexes. Die *DID2*-Deletionsmutante ist temperatursensitiv bei 37°C, sie zeigt aber ansonsten weder auf Koffein, noch auf Raffinose und Kongorot einen Wachstumsdefekt. Der *MOS10*-Deletionsstamm wuchs auf allen Wachstumsmedien normal und zeigte keinen spezifischen Wachstumsdefekt.

Die identischen Wachstumsphänotypen von  $\Delta snf7$  und  $\Delta vps20$  sowie von  $\Delta vps24$  und  $\Delta did4$  bei 37°C, auf Koffein, Raffinose und Kongorot deuten darauf hin, dass die vier Proteine jeweils paarweise eine gemeinsame Funktion ausüben. In diesem Fall sollte eine entsprechende Doppeldeletion gegenüber den Einzelmutanten zu keiner weiteren Beeinträchtigung des Wachstums führen. Bestätigt wurde dies durch  $\Delta snf7\Delta vps20$  und  $\Delta vps24\Delta did4$  Doppelmutanten, die auf den getesteten Medien die gleichen Wachstumsphänotypen zeigten wie die Einzelmutanten.

Dagegen kam es bei der  $\Delta mos10\Delta did2$  Doppeldeletionsmutante zu einem synthetischen Wachstumsdefekt auf Kongorotplatten, der bei den jeweiligen Einzelmutanten nicht aufgetreten war. Dies deutet darauf hin, dass Mos10 und Did2 parallele Funktionen ausüben.

Die Unterschiede im Wachstum von  $\Delta snf7$ ,  $\Delta vps20$ ,  $\Delta vps24$  und  $\Delta did4$  auf Raffinose und Kongorot zeigen, dass es noch zusätzliche Unterschiede in der Funktion dieser vier Proteine geben muss, obwohl die entsprechenden Proteine Teil eines gemeinsamen Komplexes sind. Dies wurde exemplarisch an Snf7 weiter untersucht.

## 3.2 Untersuchung der Snf7-Funktionen

### 3.2.1 PCR-Mutagenese von *SNF7*

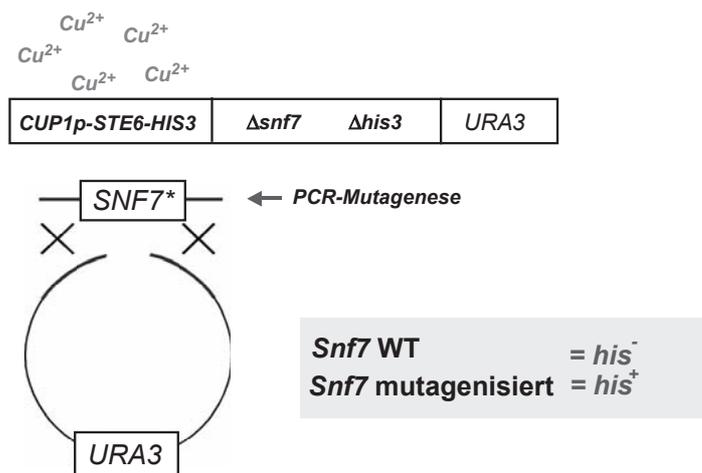
Worin bestehen die unterschiedlichen Funktionen von Snf7? Zum einen ist Snf7 ein endosomales Protein, das Teil des ESCRTIII-Komplexes ist. Dieser Komplex wird an späten Endosomen zur Bildung von MVB-Vesikeln benötigt, die Membranproteine über den endosomalen Weg der Vakuole und somit ihrem Abbau zuführen. Zum anderen scheint Snf7 eine Rolle bei der Kontrolle der Genexpression im Zellkern zu spielen, worauf auch der ursprüngliche Name (*SNF* = *s*ucrose *n*on *f*ermenting) hindeutet. Dies zeigt auch der Wachstumsdefekt der *SNF7*-Deletion auf Raffinose (Abb. 6A). Die *SUC2*-Derepression scheint in dieser Deletion stark beeinträchtigt zu

## Ergebnisse

sein (*SUC2* kodiert für das Enzym Invertase, das Raffinose und Saccharose durch Hydrolyse spaltet).

Um zu testen, ob sich diese beiden Funktionen trennen lassen, wurde nach *snf7*-Mutanten gesucht, bei denen die endosomale Funktion gestört ist, die übrigen Funktionen aber intakt sind. Mutanten, die in der endosomalen Funktion gestört sind, sollten zu einer Stabilisierung von Proteinen führen, die über den endosomalen Weg abgebaut werden, wie z. B. Ste6 (Kölling und Losko, 1997), während Mutanten mit einem Defekt in der *SUC2*-Derepression nicht mehr auf Raffinoseplatten wachsen sollten.

Als Nachweis für eine gestörte Endosomenfunktion diente die Stabilisierung des Proteins Ste6. Die Stabilisierung von Ste6 wurde mit Hilfe eines speziellen Hefestammes nachgewiesen.



### Abb.7: SNF7-Mutagenese-Screen

PCR-Mutagenese von *SNF7* auf dem Plasmid pRK796. Das PCR-Produkt und der Vektor YCplac33 wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I geschnitten und co-transformiert in den Stamm RKY1854. In diesem *SNF7-HIS3*-Deletionsstamm wurde *SUC2* durch die *CUP1-STE6-HIS3*-Kassette ersetzt. Eine Aktivierung des *CUP1*-Promotors erfolgte durch Zugabe von 0,3-0,5 mM  $\text{CuSO}_4$ . Die Selektion der Transformanten erfolgte auf SD  $-\text{his-ura} +0,5$  mM  $\text{CuSO}_4$ .

In diesem Hefestamm wurde in den *SUC2*-Lokus eine Kassette zum Nachweis von Ste6 integriert. Dieses Hilfsmittel ist nötig, da Ste6 nicht ohne weiteres direkt nachgewiesen werden kann. Die Kassette enthält *STE6* fusioniert an *HIS3*, das zur Histidinsynthese benötigt wird. Diese *STE6-HIS3*-Fusion steht unter der Kontrolle des regulierbaren *CUP1*-Promotors, so dass die Expression der *STE6-HIS3*-Kassette durch Zugabe von Kupferionen in Form von  $\text{CuSO}_4$  reguliert werden kann.

Wie kann die Stabilisierung von Ste6 mit Hilfe dieser Kassette nachgewiesen werden? Ste6 ist ein instabiles Protein. Es wird nach seiner Synthese wieder schnell dem Abbau in der Vakuole zugeführt, so dass seine Halbwertszeit in der Zelle nur ca.

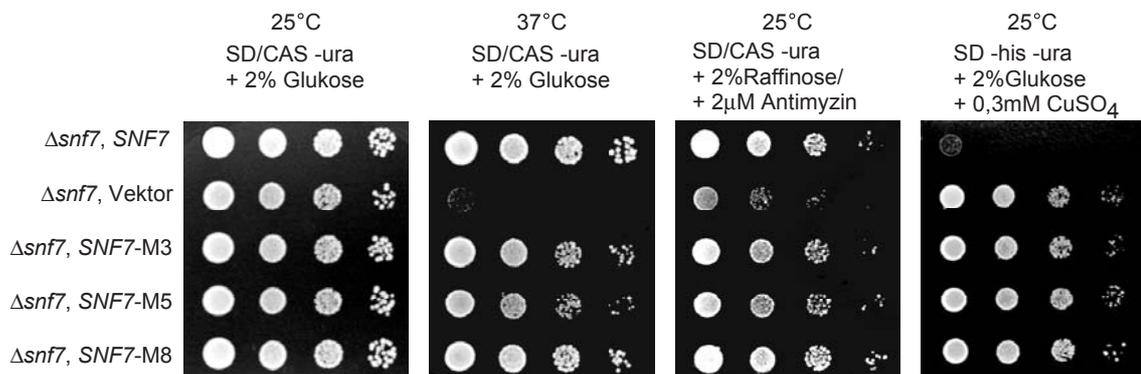
## Ergebnisse

---

20 min beträgt (Kölling und Hollenberg, 1994). Damit die Kasette in dieser Form funktioniert, wurde in diesem Hefestamm noch zusätzlich *HIS3* deletiert. Auf diese Weise steht der Zelle Histidin nur in Form des Ste6-His3-Fusionsproteins zur Verfügung. Durch Kupferzugabe wird in der Zelle das Ste6-His3-Fusionsprotein gebildet. In einer Wildtypzelle wird Ste6, und somit auch das Fusionsprotein, wieder schnell abgebaut. Hierdurch kommt es zu einer unzureichenden Versorgung der Zelle mit Histidin. Da der Hefestamm histidinauxotroph ist, kann eine Wildtypzelle auf Medium ohne Histidin nicht wachsen. Kommt es in einer Mutante zu einem verlangsamten Abbau und somit zu einer Anhäufung von Ste6-His3 in der Zelle, so sind diese Hefen in der Lage auf Medium ohne Histidin zu wachsen. Die Selektion nach Zellen, die Ste6 stabilisieren, fand deshalb auf Platten statt, die  $\text{CuSO}_4$ , aber kein Histidin enthielten. Um mit Hilfe dieses Stammes *snf7*-Mutanten erzeugen zu können, wurde zusätzlich *SNF7* deletiert, um es durch mutagenisierte *SNF7*-Varianten ersetzen zu können. Zur Erzeugung von *snf7*-Mutanten wurde *SNF7* durch eine fehleranfällige PCR-Reaktion mutagenisiert. Das PCR-Fragment mit dem mutagenisierten *SNF7*-Gen wurde zusammen mit einem linearisierten Hefevektor in Hefezellen des Teststammes transformiert. In Hefe wurden dann durch homologe Rekombination zwischen dem PCR-Fragment und dem Vektor intakte Plasmide rekonstituiert. Als Selektionsmarker für die Plasmide diente der *URA3*-Marker (Abb. 7). Die Transformanten wurden auf Platten, die Kupfer für die Induzierung des *CUP1*-Promotors, jedoch kein Histidin und kein Uracil enthielten, ausplattiert. Auf diesen Platten sollten nur solche Zellen wachsen können, die aufgrund einer Mutation in *SNF7* eine höhere Ste6-His3-Aktivität aufweisen. Zellen, die eine *SNF7*-Wildtypkopie erhalten haben, sollten auf diesen Platten dagegen nicht wachsen. Um einen Überblick zu erhalten, wie viele Transformanten in diesem Screen getestet worden sind, wurde eine definierte Menge des Transformationsansatzes auf Selektivmedium ohne Kupfer, aber mit Histidin ausplattiert. Auf diesen Platten sollten alle Transformanten wachsen, die ein intaktes Plasmid erhalten haben. Die Transformanten wurden ausgezählt und deren Zahl auf die Gesamtmenge des Transformationsansatzes hochgerechnet. Auf diese Weise wurde die Zahl von ca. 35000 getesteten Transformanten ermittelt. Unter diesen ca. 35000 potentiellen Transformanten befanden sich 128 Transformanten, die auf  $-\text{his}$ -Platten wachsen konnten. Diese  $\text{his}^+$  Transformanten wurden daraufhin auf die  $\Delta\text{snf7}$ -Phänotypen, wie Temperatursensitivität und Wachstumsdefekt auf Raffinose, getestet (nicht gezeigt).

## Ergebnisse

Unter den getesteten *his*<sup>+</sup> Transformanten befanden sich 20 Transformanten, die auf Raffinoseplatten und bei Wachstum auf 37°C Wildtypcharakter zeigten, d. h. sie wuchsen auf Raffinose und waren nicht temperatursensitiv (Beispiele in Abb. 8). Dies zeigt, dass tatsächlich eine genetische Trennung der verschiedenen *Snf7*-Funktionen möglich ist.



**Abb. 8: *SNF7*-Funktionen können genetisch getrennt werden.**

RKY1852 (*Δsnf7*) und RKY1854 (*Δsnf7* [*CUP1p-STE6-HIS3*]) wurden transformiert mit verschiedenen *SNF7*-Plasmiden (von oben nach unten): pRK861 (WT *SNF7*), YCplac33 (Vektorkontrolle), pRK1048 (*SNF7-M3*), pRK1049 (*SNF7-M5*), pRK1050 (*SNF7-M8*). Übernachtskulturen, gewachsen in SD/CAS-Medium, wurden in 1:10 Verdünnungen auf verschiedene Platten getropft und 3-5 Tage bei verschiedenen Temperaturen inkubiert (von links nach rechts): SD/CAS, 25°C; SD/CAS, 37°C, SD/CAS mit 2% Raffinose als einziger Kohlenstoffquelle (+ 2 μg/ml Antimyzin), 25°C; SD + Leucin, Lysin, Tryptophan (=his), 0,5 mM Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25°C).

In diesem Screen konnten *snf7*-Mutanten isoliert werden, deren endosomale Funktion einerseits gestört ist (Wachstum auf Kupferplatten, ohne Histidin), deren andere Funktionen aber intakt sind (Wachstum auf Raffinose und bei 37°C). Die Trennung der Wachstumsphänotypen deutet darauf hin, dass *Snf7* zwei, voneinander unabhängige, Funktionen ausüben kann.

Nachfolgend wurden mehrere Mutanten ausgewählt und aus ihnen die Plasmide, die das mutagenisierte *SNF7* tragen, isoliert und sequenziert. Die Sequenzierung sollte Aufschluss über die Mutationen geben, die zu den entsprechenden Phänotypen führen. Die stattgefundenen Nukleotid- und Aminosäureaustausche in den Mutanten sind in Tab. 10 aufgelistet. Die Sequenzierung zeigte, dass bei den meisten Mutanten mehrere Nukleotidaustausche stattgefunden haben. Obwohl es dadurch schwer ist zu bestimmen, welche der

## Ergebnisse

---

**Tab. 10: SNF7-Mutanten**

---

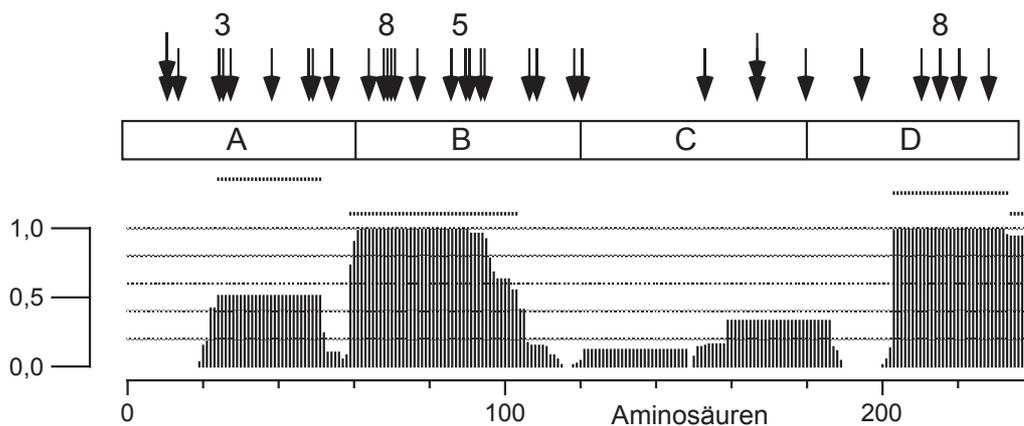
Mutanten	DNA Mutation(en)	Proteinmutation(en)
1	G289A A326G A467G	A97T E109G N156S
2	T89A G331A A367G G655C A671G A696G	I30N A111T I123V E219Q E224G R232K
3	T77G	L26W
4	T692C	L231S
5	T277C	S93P
7	G81T A236C T509C T548C	R27S K79T L170P V183A
8	A208G T641C	K70E V214A
9	T77C T163C	L26S -
11	A86G T89A A198G T274C T592C	H29R I30N - F92S S198P
13	A263C C361T T509C	E88G L121F L170P
24	A120C A149G G151A A166G T288C	L40F E50G A51T T56A -
31	A44G A211G A214G T218C	N15S K71E T72A I73T

---

## Ergebnisse

Mutationen für die Ausprägung der Phänotypen verantwortlich ist, ist es auffällig, dass die Mutationen gehäuft in der N-terminalen Hälfte von Snf7 vorkommen (Abb. 9).

Die Mutationen konzentrieren sich vor allem in Regionen mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der „coiled-coil“-Bildung. Da „coiled-coil“ bildende Domänen bei Protein-Protein-Interaktionen mitwirken, sind diese Regionen möglicherweise wichtig für die Bildung des ESCRTIII-Komplexes und somit auch für die endosomale Funktion von Snf7.



**Abb. 9: Verteilung der SNF7-Mutationen**

Die Aminosäuresequenz von Snf7 wurde mit dem Programm Macstripe 2.0 von Alex Knight analysiert, das auf dem Coils-Algorithmus von Andrei Lupas basiert (Lupas, 1996). Gezeigt wird die Wahrscheinlichkeit der "coiled-coil"-Bildung. Der breite Balken über den Diagrammen zeigt die Unterteilung von Snf7 in die vier gleichgroßen Domänen A, B, C und D.

Die Pfeile stehen für die einzelnen Mutationen des SNF7-Mutagenese-Screens. 3, 5 und 8 sind, die in dieser Arbeit untersuchten, Mutanten.

Zur weiteren Untersuchung wurden die Mutanten M3, M5 und M8 ausgewählt. Die Mutanten M3 und M5 besitzen beide nur einen Nukleotidaustausch, der jeweils auch zu einem Aminosäureaustausch geführt hat. In Mutante M8 haben zwei Nukleotidaustausche stattgefunden.

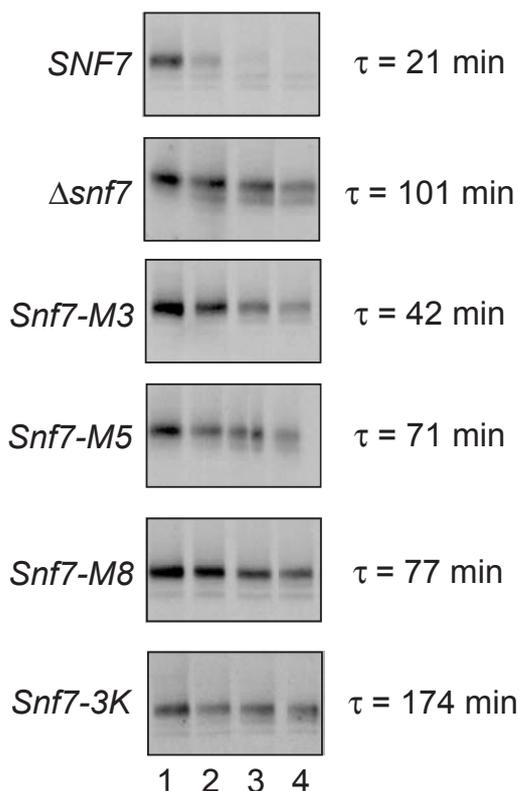
### 3.2.2 Untersuchung der Ste6-Stabilisierung in *snf7*-Mutanten

Die im Screen isolierten Mutanten M3, M5 und M8 wachsen aufgrund einer Anhäufung des Ste6-His3 Fusionsproteins in der Zelle auf Medium mit CuSO<sub>4</sub> und ohne Histidin. Dies ist ein Indiz dafür, dass in diesen Mutanten der Proteinabbau über den endozytischen Weg blockiert ist. Eine andere Möglichkeit, die zu einem Wachstum auf diesen Platten führen könnte, wäre aber auch ein

## Ergebnisse

Genexpressionseffekt. In diesem Fall würde eine erhöhte Expression von *STE6-HIS3* zu der beobachteten höheren His3-Aktivität führen.

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurde die Halbwertszeit von Ste6 mit Pulse-Chase-Experimenten bestimmt (Abb. 10). Hierzu wurde der *SNF7*-Deletionsstamm RKY1852 mit den Plasmiden, welche die mutierten *SNF7*-Varianten enthalten, transformiert. Die Zellen wurden über Nacht exponentiell in Minimalmedium herangezogen und 15 min mit [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert („Pulse“). Nach Zugabe eines Überschusses an nicht-markiertem Methionin („Chase“), wurden in 20-minütigen Abständen Proben entnommen und durch Immunpräzipitation, SDS-Page und Autoradiographie auf die Anwesenheit von Ste6 hin untersucht. Die Ste6-Signalintensitäten wurden densitometrisch quantifiziert und die Halbwertszeit für Ste6 errechnet.



**Abb. 10: Effekt der *SNF7*-Mutationen auf den Ste6-Turnover.**

Der Turnover von Ste6 im Stamm RKY1852 ( $\Delta snf7$ ), transformiert mit verschiedenen *SNF7*-Plasmiden, wurde in Pulse-Chase Experimenten untersucht. Die Zellen wurden 15 min mit [<sup>35</sup>S]-Trans-Label markiert. Nach Zugabe eines Überschusses kalten Methionins und Cysteins wurden in 20-minütigen Abständen (0, 20, 40, 60 min; Spur 1-4) Proben genommen. Ste6 wurde aus den Zellextrakten mit polyclonalen Antikörpern, gerichtet gegen Ste6, präzipitiert. Präzipitiertes Ste6 wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. Folgende Plasmide (von oben nach unten) wurden benutzt: pRK861 (WT *SNF7*), YCplac33 (Vektorkontrolle/ $\Delta snf7$ ), pRK1048 (*SNF7-M3*), pRK1049 (*SNF7-M5*), pRK1050 (*SNF7-M8*), pRK914 (*SNF7-3K*). Die berechneten Ste6-Halbwertszeiten sind angegeben.

Der Ste6-Turnover der Wildtypkontrolle ist mit einer Halbwertszeit von 21 min sehr schnell. In der Vektorkontrolle ( $\Delta snf7$ ) hingegen ist Ste6 mit einer Halbwertszeit von 101 min um ein 5-faches stabiler. In der *SNF7*-Deletionsmutante kommt es zu einer Blockade des Proteinabbaus über den endosomalen Weg, was zu einer Ste6-

Stabilisierung führt. Die Ste6-Halbwertszeit mit den Mutanten M3, M5 und M8 war ähnlich wie in der *SNF7*-Deletionsmutante. Die Halbwertszeit für Ste6 war in Mutante M3 doppelt so hoch wie im Wildtyp, in Mutante M5 und M8 war sie mit 71 und 77 min sogar 3 bis 3,5 mal so hoch.

Dieses Experiment zeigt, dass der His<sup>+</sup>-Phänotyp der *snf7*-Mutanten tatsächlich durch die Stabilisierung von Ste6-His3 zustande kommt.

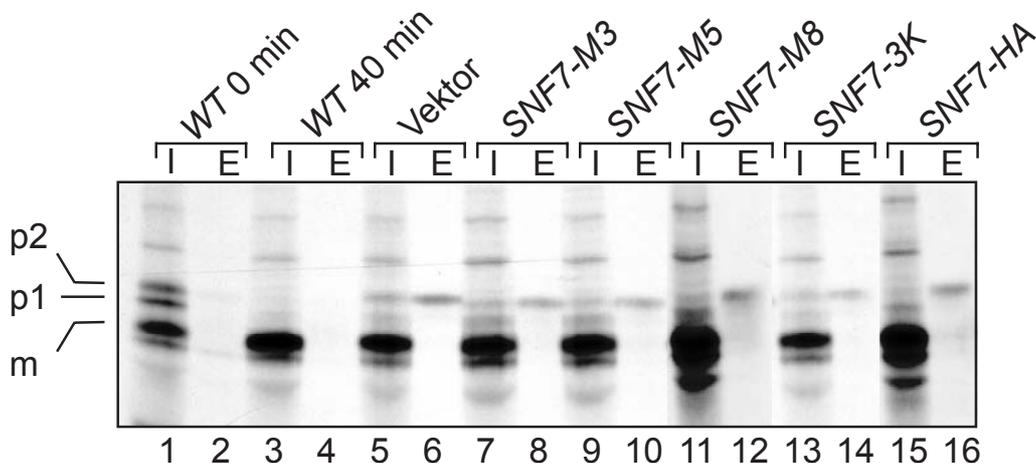
### 3.2.3 CPY-Sorting-Defekt

In *snf7*-Mutanten ist der Transportschritt von Endosom zu Vakuole blockiert, und die Zellen bilden ein "class E" -Kompartiment aus, das einem vergrößerten, spät-endosomalen Organell entspricht (Babst *et al.*, 1998). Die durch PCR-Mutagenese entstandenen *snf7*-Mutanten stabilisieren Ste6, was in Pulse-Chase-Experimenten gezeigt werden konnte. Die Anhäufung von Ste6 in den Zellen ist ein Indiz dafür, dass es in diesen Mutanten ebenfalls zu einer Blockade des endozytischen Weges kommt. Um diese Annahme zu überprüfen und um auszuschließen, dass die *SNF7* Defekte nur allein den Ste6 Turnover betreffen, wurde der intrazelluläre Transport eines weiteren Proteins untersucht: Carboxypeptidase Y (CPY). Diese vakuoläre Hydrolase wird bei ihrem Transport zur Vakuole in verschiedenen Kompartimenten unterschiedlich modifiziert. Die Präpro-Form wird im ER zur p1-Form kernglykosyliert. Die Golgi- oder p2-Form entsteht durch eine fortschreitende Glykosylierung und die reife oder m-Form entsteht schließlich durch die Abspaltung der Prosequenz beim Erreichen der Vakuole. Diese verschiedenen CPY-Formen können anhand ihres unterschiedlichen Laufverhaltens auf einem Gel unterschieden werden. In „vacuolar protein sorting“ (*vps*) Mutanten (z. B.  $\Delta snf7$ ), in denen der endosomale Weg defekt ist, wird die p2-CPY Form fehlsortiert. Man findet sie, statt in der Vakuole, im Kulturmedium.

In diesem Experiment wurden die Reifung und Lokalisation von CPY in den *snf7*-Mutanten mit dem Wildtyp verglichen (Abb. 11). Um ein „Missorting“ nachzuweisen, wurde CPY aus Zellextrakten und Kulturüberständen immunopräzipitiert. Die Zellen wurden hierfür 15 min mit radioaktivem Methionin markiert. Es folgte die Zugabe eines Überschusses nicht-markierten Methionins und Cysteins. Nach 40 min wurde die Zellwand durch Sphäroplastierung entfernt. Die Sphäroplasten repräsentieren die interne Fraktion (I) und die Proteine des Kulturüberstandes die externe Fraktion (E).

## Ergebnisse

In der internen Fraktion des Wildtypstammes findet man nach 40 min hauptsächlich die reife m-Form. Im Überstand findet sich keine der drei Formen (Spur 1-4). Dies bedeutet, dass CPY vollständig in die Vakuole transportiert wird. Keine der Formen wird von den Zellen fehllokalisiert. Die Positivkontrolle für eine Misslokalisierung der Hydrolase, ist der *SNF7*-Deletionsstamm RKY1852, transformiert mit einem Leervektor. Man sieht eine gewisse Anhäufung der glykosylierten p2-Form im Überstand (Spur 6). Die getesteten *snf7*-Mutanten zeigten ebenfalls eine Anhäufung der p2-Form im Überstand (Mutante M3 – Spur 8; Mutante M5 – Spur 10, Mutante M8 – Spur 12). Nichts desto trotz ist der größte Anteil des CPY-Proteins immer noch in der internen Fraktion, als reife m-Form



**Abb. 11: Effekt der *SNF7*-Mutationen auf das CPY-Sorting.**

Das CPY-Sorting wurde im Stamm RKY1852 ( $\Delta snf7$ ), transformiert mit verschiedenen *SNF7*-Plasmiden, untersucht. Die Zellen wurden 15 min lang mit [<sup>35</sup>S] Trans-Label markiert. 40 min nach Zugabe eines Überschusses an nicht markiertem Methionins wurde CPY von Sphäroplasten (I, interne Fraktion/ungerade Zahlen) und vom Kulturüberstand (E, externe Fraktion/gerade Zahlen) immunopräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-Page und Autoradiographie analysiert. Benutzt wurden die Plasmide pRK861 (WT, Spuren 1-4), YCplac33 ( $\Delta snf7$  /Vektorkontrolle, Spuren 5, 6), pRK1048 (*SNF7-M3*, Spuren 7, 8), pRK1049 (*SNF7-M 5*, Spur 9, 10), pRK1050 (*SNF7-M 8*, Spuren 11, 12), pRK914 (*SNF7-3K* Spuren 13, 14), pRK781 (*2 $\mu$ -SNF7-3HA*, Spuren 15, 16). Die Positionen der verschiedenen CPY-Formen sind markiert.

zu finden (Spuren 3, 5, 7, 9 und 11). Auch kleinere Mengen an p1- und p2-Formen konnten in den internen Fraktionen nachgewiesen werden.

Die Misslokalisierung von CPY in den *snf7*-Mutanten zeigt somit, dass die Mutanten einen generellen Defekt im endozytischen Weg aufweisen.

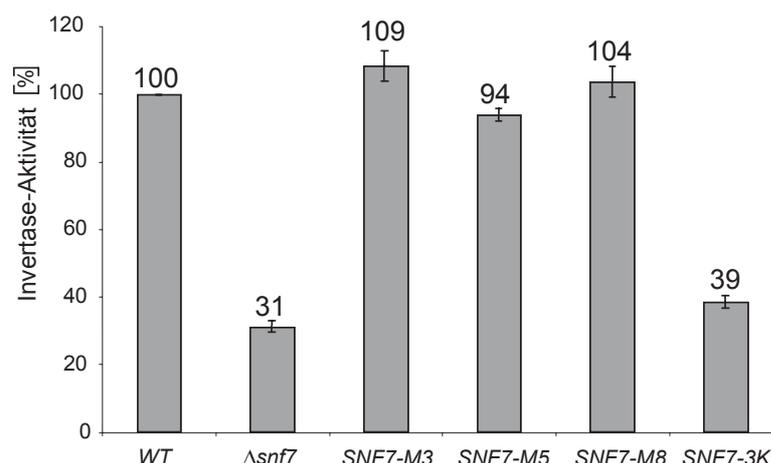
### 3.2.4 Messung der *SUC2*-Aktivität in *snf7*-Mutanten

Die *snf7*-Mutanten wachsen, wie der Wildtyp, auf Medium, das Raffinose anstatt Glukose als Kohlenstoffquelle enthält. Die Glukosederepression und somit auch die Aktivierung des *SUC2*-Gens scheint in diesen Mutanten intakt zu sein.

*SUC2* kodiert für das Enzym Invertase, welches das Disaccharid Saccharose zu Glukose und Fruktose spaltet, und den Zucker auf diese Weise für Hefe erst verwertbar macht. Auch Raffinose wird von Invertase durch Hydrolyse gespalten. Ein direkter Nachweis für die Aktivität des *SUC2*-Gens ist ein Invertase-Assay, mit dem die Invertaseaktivität in Hefezelleextrakten gemessen werden kann. Die Höhe der Enzymaktivität gibt Aufschluss über die gebildete Invertasemenge in den Zellen.

In diesem Versuch wurde die in den *snf7*-Mutanten gebildete Invertasemenge mit dem Wildtyp und der *SNF7*-Deletionsmutante verglichen, um zu zeigen, dass die nicht-endosomalen Funktionen von den *SNF7* Mutationen nicht beeinflusst werden.

Für den Invertase-Assay wurden die Hefen in Selektivmedium mit 5% Glukose über Nacht exponentiell angezogen und anschließend für zwei Stunden in Medium mit 0,1% Glukose inkubiert. Aus gleichen Mengen von Zellen wurden Zellextrakte hergestellt und die Invertaseaktivität bestimmt. In Zellen in denen die Glukoserepression aufgehoben ist, sollte die *SUC2*-Expression und damit auch die Invertase-Produktion ansteigen. Bei einer defekten Glukosederepression entsteht keine, oder nur geringe Mengen an Invertase.



**Abb. 12: Messung der Invertaseaktivität in *snf7*-Mutanten.**

RKY1852 ( $\Delta snf7$ ), transformiert mit verschiedenen *SNF7* Plasmiden, wurde in SD/CAS Medium mit 5% Glukose bis zur exponentiellen Phase angezogen. Die Zellen wurden in SD/CAS Medium mit 0,1% Glukose überführt und 25 bei 25°C inkubiert. Nach 2 h wurde die Invertaseaktivität in Zellextrakten ermittelt, wobei die Wildtypaktivität gleich 100% gesetzt wurde. Gezeigt sind die Durchschnittswerte mehrerer unabhängiger Experimente (mit Standardabweichung). Die benutzten Plasmide sind (von links nach rechts): pRK861 (WT), YCplac33 (Vektorkontrolle), pRK1048 (*SNF7-M3*), pRK1049 (*SNF7-M5*), pRK1050 (*SNF7-M8*), pRK914 (*SNF7-K69, 70, 71E*).

In Abb. 12 ist die gemessene Invertaseaktivität des Wildtyps, der *SNF7*-Deletionsmutante und der *snf7*-Mutanten graphisch dargestellt. Die gemessene Enzymaktivität in der Wildtypkontrolle wurde zum besseren Vergleich auf 100% gesetzt. In der Wildtypsituation funktioniert die Glukosederepression einwandfrei und dient somit als Referenz. Die  $\Delta snf7$ -Negativkontrolle zeigt mit 31% eine mehr als dreifach niedrigere Invertaseaktivität als der Wildtyp. In diesem Stamm ist die Glukosederepression defekt. Die Mutanten dagegen zeigen mit 109% (Mutante M3), 94% (Mutante M5) und 104% (Mutante M8) eine Invertaseaktivität, die vergleichbar mit der des Wildtyps ist.

Bei der Untersuchung der Wachstumsphänotypen der *snf7*-Mutanten zeigte ihr normales Wachstum auf Raffinoseplatten, dass die Glukosederepression intakt zu sein scheint. Die Invertaseaktivitätsmessungen bestätigten die Annahme, dass die Glukosederepression in den *snf7*-Mutanten einwandfrei funktioniert und somit die nicht-endosomalen Funktionen in den Snf7- Mutanten intakt sind.

### **3.2.5 Untersuchung der Membranassoziation von Snf7-Mutanten**

Snf7 liegt als Teil des ESCRTIII-Komplexes mit der endosomalen Membran assoziiert vor. Zusätzlich befindet sich ein Teil des gebildeten Snf7-Proteins frei im Zytoplasma. Dieser Snf7-Anteil ist nicht komplexgebunden. Eine fehlende Membran-Assoziation könnte die Ursache für die endosomalen Defekte der *snf7*-Mutanten sein. Daher wurde die Membran-Assoziation der Mutanten untersucht.

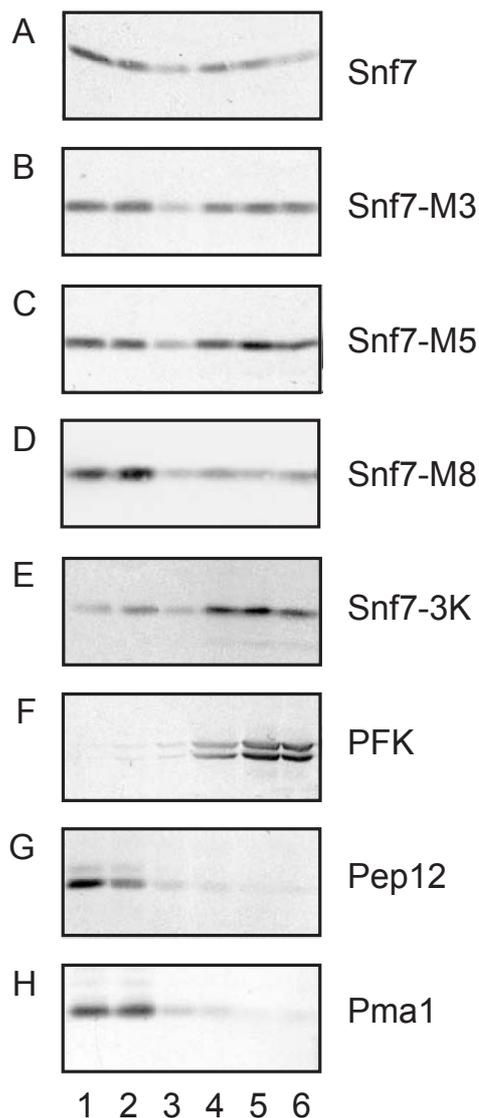
#### ***3.2.5.1 Charakterisierung der Membranassoziation von Snf7 mit Flotationsexperimenten***

Mit Flotationsexperimenten ist es möglich den löslichen Anteil eines Proteins in der Zelle vom membrangebundenen Teil zu trennen. Hierfür wurden Zellextrakte in einer osmotisch inaktiven Lösung hoher Dichte aufgenommen und mit Lösungen geringerer Dichte überschichtet. Während einer Zentrifugation entsteht ein Gradient, indem membrangebundene Proteine aufgrund ihrer geringeren Dichte nach oben wandern. Proteine, die in Komplexen vorliegen oder löslich sind, sammeln sich in den unteren Fraktionen höherer Dichte. Nach einer zweistündigen Zentrifugation

## Ergebnisse

wurden sechs gleiche Fraktionen abgenommen und in einer Western-Analyse die Verteilung von Snf7 im Gradienten untersucht.

Für die Flotationsexperimente wurde ein  $\Delta vps4$  Stamm benutzt, weil in diesem Stamm der Anteil von membranassoziertem Snf7 höher ist. Vps4 wird für die Ablösung der ESCRT-Komplexe von der Endosomenmembran benötigt (Babst *et al.*, 1994). Die mutagenisierten *SNF7*-Varianten wurden mit den entsprechenden Plasmiden in den  $\Delta snf7 \Delta vps4$  Stamm transformiert.



**Abb. 13: Membranassoziation der *snf7*-Mutanten**  
 Zellextrakte von RKY1852 ( $\Delta snf7$ ), transformiert mit verschiedenen *SNF7* Plasmiden, wurden auf einem Optiprep™ Gradienten fraktioniert. Sechs Fraktionen (Spuren 1-6) wurden von dem Gradienten abgenommen (Spuren 1-3 = Membran-Fractionen; Spuren 4-6 = lösliche Fractionen). In den ersten fünf Abbildungen (A-E) wurden die Fraktionen in Western-Analysen mit Antikörpern gegen Snf7 analysiert. Es wurden folgende Plasmide benutzt: pRK861 (WT), YCplac33 (Vektorkontrolle), pRK1048 (*SNF7-M3*), pRK1049 (*SNF7-M5*), pRK1050 (*SNF7-M8*), pRK914 (*SNF7-K69, 70, 71E*). In den letzten drei Abbildungen (F-H) ist die Verteilung der Markerproteine PFK, Pep12 und Pma1 (nachgewiesen durch Westernblotting mit spezifischen Antikörpern) in der Fraktionierung von RKY1852/pRK861 (WT *SNF7*) gezeigt.

**Tab. 11: Anteil von membranassoziertem Snf7 (Fraktionen 1-3)**

<b>WT (A)</b>	<b>62%</b>
<b><i>SNF7-Mutante3</i> (B)</b>	<b>46%</b>
<b><i>SNF7-Mutante5</i> (C)</b>	<b>43%</b>
<b><i>SNF7-Mutante8</i> (D)</b>	<b>68%</b>
<b><i>SNF7-3K</i></b>	<b>27%</b>

Als Kontrollen für lösliche und membranassoziierte Proteine wurden die Phosphofruktokinase (PFK), Pep12 (endosomales SNARE-Protein) und die Plasmamembran-ATPase Pma1 mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 13 F, G, H). Die membranassoziierten Proteine Pep12 und Pma1 konnten in den Fraktionen 1-2 nachgewiesen werden (Abb. 10G, H), während PFK als lösliches

Protein in den Fraktionen 4, 5 und 6 zu finden war (Abb. 13F). Die Fraktionen 1-3 enthalten daher die membranassoziierten Proteine, während die Fraktionen 4-6 die löslichen Proteine enthalten. WT Snf7 lag je zur Hälfte membranassoziiert und löslich vor. Vergleicht man die Anteile des Wildtypproteins in der Membranfraktion (Abb. 13A/Tab. 11)) mit den entsprechenden Anteilen der mutierten Varianten (Abb. 13B-D/Tab. 11), so stellt man keinen nennenswerten Unterschied fest. Der größte Unterschied war 15%. Dabei könnte es sich auch um experimentelle Schwankungen handeln.

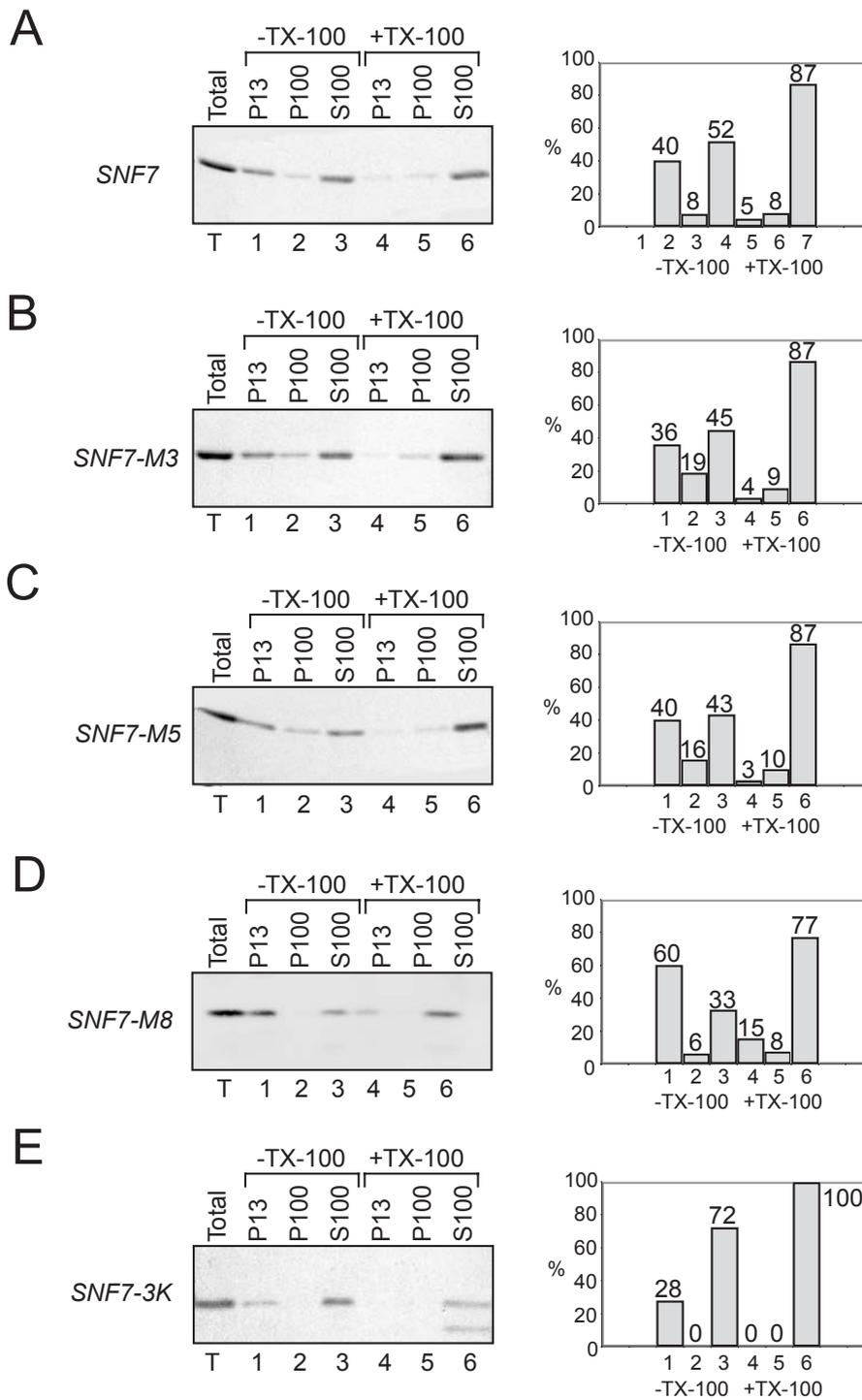
In diesem Experiment konnte daher gezeigt werden, dass die Membranassoziation von Snf7 in den Mutanten nicht beeinträchtigt ist.

### **3.2.5.2 Zellfraktionierung von Snf7 durch Differentielle Zentrifugation**

Eine andere Möglichkeit, sich die Lokalisation von Proteinen anzuschauen, ist die differentielle Zentrifugation. Mit dieser Methode ist es einerseits möglich wie mit Flotationsexperimenten, eine Aussage über die Membranassoziation von Proteinen zu machen, andererseits findet zusätzlich noch eine Auftrennung der membrangebundenen Proteine in zwei Fraktionen statt: In die P13 Fraktion, die Membranen von Vakuole, endoplasmatischem Retikulum, Zellkern, Mitochondrien und Plasmamembran enthält und in die P100 Fraktion, in der sich hauptsächlich Transportvesikel und Golgi-Membranen befinden. Die Membranen des Endosoms verteilen sich gleichmäßig auf diese beiden Fraktionen. Die S100-Fraktion enthält die löslichen Proteine.

Für den Versuch wurden Zellextrakte 10 min bei 13 000g zentrifugiert. Man erhält die P13-Pelletfraktion. Der Überstand wurde zur Trennung in die Pelletfraktion P100 und den Überstand S100 1h bei 100 000g zentrifugiert. Die untersuchten Stämme waren identisch mit den Stämmen aus den Flotationsexperimenten.

WT-Snf7 verteilte sich gleichmäßig über die P13 (Abb. 14A Spur 1) und die S100-Fraktion (Abb. 14A Spur 3). Ein kleiner Anteil (8%) wurde auch in P100 (Abb. 14A Spur 2) beobachtet. Bei Behandlung mit dem Detergenz Triton-X-100, das die Membranen auflöst, wurde nahezu das gesamte Protein in die S100-Fraktion



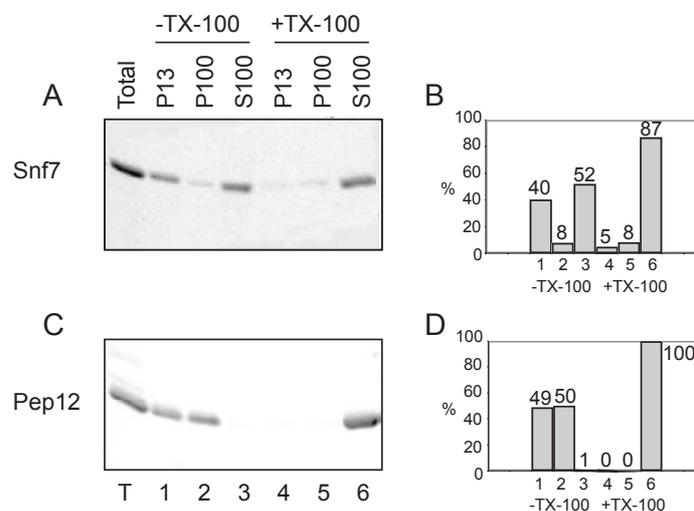
**Abb.14 Zellfraktionierung durch differenzielle Zentrifugation**

Der  $\Delta vps4 \Delta snf7$  Stamm RKY 2061, wurde mit den Plasmiden pRK861 (Wildtyp *SNF7*) (A), pRK1048 (Mutante M3) (B), pRK1049 (Mutante M5) (C), pRK1050 (Mutante M8) (D) und pRK914 (Lysin-Mutante) (E), transformiert. Zellextrakte der *snf7*-Mutanten wurden in zwei Zentrifugationsschritten in die Pelletfraktionen P13 (Spur 1 und 4) und P100 (Spur 2 und 5) sowie in die lösliche Fraktion S100 (Spur 3 und 6) aufgetrennt. In Spur T wurde der Gesamtextrakt aufgetragen. Von allen Fraktionen wurden gleiche Mengen geladen. Eine Hälfte der Extrakte (Spuren 4-6) wurde mit dem Detergenz Triton-X-100 behandelt, die andere Hälfte blieb unbehandelt (Spuren 1-3). Snf7 wurde, nach SDS-Page und Western-Analyse, mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Signalintensitäten wurden densitometrisch quantifiziert und so der Proteinanteil in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Die Gesamtproteinmenge von P13, P100 und S100 wurde gleich 100% gesetzt.

## Ergebnisse

überführt, welche die löslichen Proteine enthält. Die *SNF7*-Varianten zeigten sowohl mit als auch ohne Triton das gleiche Verteilungsmuster wie WT Snf7.

Die Ergebnisse der differentiellen Zentrifugationen decken sich mit den Ergebnissen aus den Flotationsexperimenten. Beide Versuche zeigen, dass Snf7 zu 50-60% mit Membranen assoziiert vorliegt. Unklar ist jedoch, mit welchen Membranen es assoziiert. Snf7 scheint daher nicht exakt am selben endosomalen Kompartiment wie Pep12 lokalisiert zu sein. Laut Literatur sollte Snf7 an Endosomen gebunden sein. In diesem Fall würde man erwarten, dass die Verteilung von Snf7 in der differentiellen Zentrifugation mit der Verteilung des endosomalen Markerproteins Pep12 übereinstimmte. Dies ist jedoch nicht der Fall. In Abb. 15 ist die Verteilung von WT Snf7 und Pep12 gezeigt. Snf7 ist zu gleichen Teilen auf die P13 Membranfraktion (Abb. 15A Spur 1) und die S100-Fraktion (Abb. 15A Spur 3) verteilt. In der P100-Fraktion findet man fast kein Snf7-Protein (Abb. 15A Spur 2). Im Gegensatz dazu ist Pep12 zu gleichen Teilen auf die Membranfraktionen P13 und P100 (Abb. 15B Spur 1 + 2) verteilt und es findet sich kein Pep12 in der S100 Fraktion. Erst die Behandlung mit Triton (Abb. 15 A+B Spur 4-6) führt wieder zu einem gleichen Verteilungsmuster von Snf7 und Pep12.



**Abb. 15: Vergleich der Proteinverteilung von Snf7 und Pep12.**

Zellextrakte des Stammes RKY2061 ( $\Delta vps4 \Delta snf7$ ) transformiert mit pRK861 (*SNF7* WT) wurden in zwei Zentrifugationsschritten in die Pelletfraktionen P13 (Spur 1, 4) und P100 (Spur 2, 5), sowie in die lösliche Fraktion S100 (Spur 3, 6) aufgetrennt. In Spur T wurde der Gesamtextrakt aufgetragen. Von allen Fraktionen wurden gleiche Mengen geladen. Eine Hälfte der Proben wurde mit dem Detergenz Triton-X-100 behandelt (Spur 4-6). Snf7 und Pep12 wurden in einer Westernanalyse spezifisch mit Antikörpern nachgewiesen. Die Signalintensitäten wurden densitometrisch quantifiziert und die Proteinmenge in den einzelnen Fraktionen bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen die Proteinmengen in Prozent. Die Gesamtproteinmenge von P13, P100 und S100 wurde gleich 100% gesetzt. 1: P13, 2: P100, 3: S100, 4: P13 +Triton, 5: P100 +Triton, 6: S100 +Triton.

### **3.2.5.3 Fraktionierung von Snf7 im Sucrose-Dichte-Gradienten**

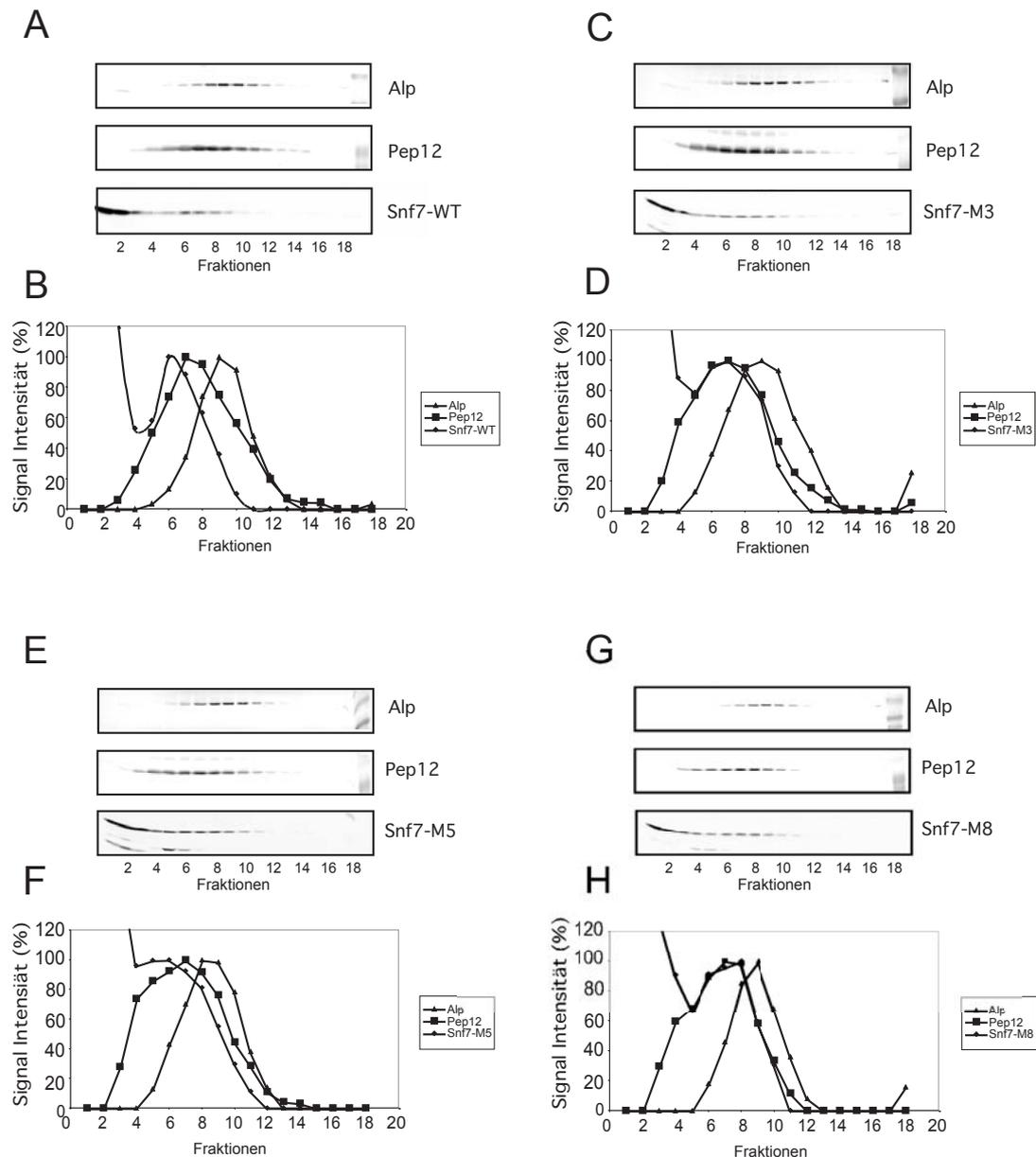
Die Flotationsexperimente und die differentiellen Zentrifugationen haben gezeigt, dass sich die Membranassoziation der *snf7*-Mutanten, im Vergleich zum Wildtyp, nicht verändert hat. Jedoch gab es in der differentiellen Zentrifugation Unterschiede in der Verteilung des endosomalen Proteins Pep12 und Snf7, was für eine Lokalisation dieser Proteine an verschiedenen endosomalen Kompartimenten spricht. In Sucrosegradienten sollte die endosomale Lokalisation der *SNF7*-Varianten näher untersucht werden.

Entsprechend ihrer Dichte und Größe verteilen sich die Komponenten des Zellextraktes auf dem Gradienten. Die Verteilung verschiedener Markerproteine wie Pep12, ALP, Dpm1 und Pma1 in den 18 Gradientenfraktionen wurde mit der Verteilung von Snf7 verglichen. Dpm1 und Pma1 sind in Abb. 16 nicht gezeigt, da ihre Verteilung deutlich verschieden von der Snf7 Verteilung war. Wildtyp-Snf7 fraktionierte zu einem großen Teil in den oberen Gradientenfraktionen mit geringerer Dichte (Abb. 16 B; Fraktionen 1 + 2) und zu einem weiteren Teil in der Mitte des Gradienten (Peak in Fraktion 6). Der Snf7-Teil in den oberen Fraktionen entspricht dem löslichen Anteil des Proteins in der Zelle, die Fraktionen 4-8 dem membranassoziierten Teil. Der membrangebundene Proteinanteil zeigte keine Ko-Fraktionierung mit dem endosomalen t-SNARE Pep12, das einen Peak in Fraktion 7 hat. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Snf7 und Pep12 an unterschiedlichen endosomalen Strukturen lokalisiert sind, die mittels Sucrose-Gradienten voneinander getrennt werden können. Diese endosomalen Strukturen könnten frühes und spätes Endosom sein. In den Mutanten M3 und M8 war eine Verschiebung zu beobachten. Die Peakfraktion des membranassoziierten Snf7 war von Fraktion 6 nach 7 verschoben, wodurch es zu einer perfekten Ko-Lokalisation von Snf7 mit Pep12 kommt (Abb. 16D + H). In diesen Mutanten scheint Snf7 misslokalisiert zu sein. Der Sucrosegradient von Mutante M5 (Abb. 16E + F) zeigte keine Verschiebung im Vergleich zur Wildtypvariante. Die Fraktionierung im Sucrosegradienten zeigt, dass Wildtyp-Snf7 und Pep12 unterschiedlich fraktionieren. Beide Proteine können deutlich voneinander getrennt werden, was die Annahme bestätigt, dass sie in getrennten endosomalen Kompartimenten lokalisiert sind.

In zwei der Mutanten kommt es wiederum zu einer Verschiebung von Snf7, die zu einer perfekten Ko-Lokalisierung mit dem endosomalen Marker Pep12 führt. Diese

## Ergebnisse

Varianten sind offensichtlich fehllokalisiert, was den endosomalen Defekt, den sie hervorrufen, erklären könnte.



**Abb.16: Fraktionierung verschiedener Snf7-Varianten in Sucrose-Gradienten.**

Die Lokalisation in Sucrose-Gradienten wurde mit der Verteilung des WT Snf7 im Gradienten verglichen. Zellextrakte von RKY1852, transformiert mit verschiedenen *SNF7*-Plasmiden, wurden auf einem Sucrosegradienten fraktioniert. Es wurden 18 Fraktionen abgenommen und mit Westernblots die Verteilung von Snf7, ALP und Pep12 mit entsprechenden Antikörpern nachgewiesen. Die Signalintensitäten wurden quantifiziert und das stärkste Signal der membranassoziierten Fraktionen wurde gleich 100% gesetzt. Benutzt wurden die Plasmide pRK861 (WT), YCplac33 (Vektorkontrolle), pRK1048 (*SNF7-M3*), pRK1049 (*SNF7-M5*), pRK1050 (*SNF7-M8*). Dreiecke: ALP; Quadrate: Pep12, Rauten: Snf7.

### 3.2.6 Konstruktion einer Snf7-Mutante durch „Site-directed mutagenesis“

Es ist nicht bekannt wie das hydrophile Protein Snf7 an Membranen rekrutiert wird. Für mVps24, das Säugerhomologe des Hefeproteins Vps24, wurde gezeigt, dass es direkt an Phosphatidyl-Inositol 3, 5-Bisphosphat-haltige Membranen bindet (Whitley *et al.*, 2003). Eine Mutante, in der ein Lysin gegen ein Aspartat an der Stelle 49 (K49D) ausgetauscht ist, ist nicht mehr in der Lage ist an PI(3,5)P<sub>2</sub> zu binden. In Anlehnung an Whitley *et al.*, 2003, sollte an vergleichbarer Stelle in Snf7 ebenfalls ein Lysinaustausch vorgenommen werden, um eine potentielle Bindungsstelle für Membranen zu eliminieren. Jedoch befanden sich an bzw. in der Nähe der entsprechenden Position in Snf7 keine Lysine oder Arginine. „Downstream“ von dieser Position befindet sich bei Position 70 aber eine auffällige Anhäufung basischer Aminosäuren. Für die Mutagenese wurden drei der Lysine in diesem Bereich gegen Glutamat ausgetauscht (K69, 70, 71E = 3K Mutante). In den folgenden Versuchen wurde diese Mutante zusammen mit den Mutanten der PCR-Mutagenese untersucht und miteinander verglichen.

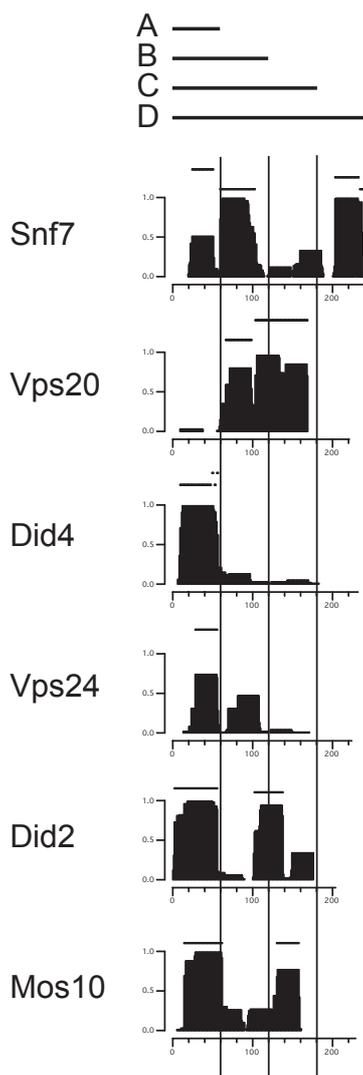
In Flotationsexperimenten zeigte sich, dass die Menge an Snf7-Protein in den Membranfraktionen deutlich reduziert war (25% des Gesamtproteins) (Abb. 13). Der mutagenisierte Teil von Snf7 scheint, wie bei mVps24, wichtig für seine Membranassoziation zu sein. Die *snf7-3K* Mutante verhält sich in allen Experimenten wie die  $\Delta snf7$ -Mutante, was vermuten lässt, dass die *SNF7*-Lysinmutante für ein nicht-funktionales Protein kodiert. Wie die Deletionsmutante stabilisiert die *snf7-3K*-Mutante Ste6 (Abb. 9), die p2-CPY-Form wird misslokalisiert (Abb. 11, Spur 14) und Invertase wird nach einem Transfer auf 0,1% Glukose nicht richtig induziert (Abb. 12).

Anhand dieser Experimente ist es jedoch nicht möglich zu sagen, ob der Verlust der Membranassoziation ein spezifisches Ereignis ist oder, ob es die Folge einer falschen Faltung des Snf7-3K Proteins ist.

### 3.3 Untersuchung der Protein-Protein Interaktionen von Snf7

#### 3.3.1 Unterteilung von Snf7 in vier Domänen

Snf7 besitzt wahrscheinlich mehrere „coiled coil“ Regionen, mit denen es Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingehen kann. In Datenbanken findet man bereits eine Reihe verschiedener Proteine, die mit Snf7 interagieren. Im Folgenden sollte getestet werden, mit welchen Regionen von Snf7 diese Proteine interagieren. In der *SNF7*-Mutagenese war auffällig, dass die meisten Mutationen, die zu einer Stabilisierung von Ste6 geführt haben, im N-terminalen Teil des Proteins zu finden sind, wohingegen im C-Terminus wesentlich weniger Mutationen auftauchen. Möglicherweise ist der N-terminale Bereich des Snf7-Proteins wichtig für seine endosomale Funktion und der C-terminale Bereich zuständig für eine „nicht



**Abb. 17: Coiled-coil bildende Regionen der Mitglieder der Snf7-Familie**

Gezeigt ist die Wahrscheinlichkeit der coiled-coil Bildung in den Sequenzen der sechs Mitglieder der Snf7-Familie in Hefe. Die Wahrscheinlichkeit wurde bestimmt mit dem Programm Macstripe 2.0a1 von Alex Knight, basierend auf dem Algorithmus von Andrei Lupas (Lupas, 1996). Snf7 wurde in vier gleich große Stücke, bestehend aus jeweils 60 Aminosäuren, unterteilt. Diese Snf7-Sequenzen entsprechen den Konstrukten A-D (angedeutet durch schwarze, durchgezogene Linien oberhalb der Diagramme), die für die Interaktionsstudien benutzt wurden.

endosomale“ Funktion. Entsprechend sollte untersucht werden, welche Proteine mit den Snf7-Domänen interagieren, die in der Mutagenese aufgefallen waren. Die „coiled coil“ bildenden Regionen finden sich an unterschiedlichen Positionen bei den Snf7-Homologen (Abb. 17). Vergleicht man die Verteilung dieser Regionen bei den verschiedenen Mitgliedern dieser Proteinfamilie, so entsteht der Eindruck, dass die Proteine durch Duplikation einer Grundstruktur von ca. 60 Aminosäuren Länge entstanden sind. Möglicherweise stammen sie alle von einem "Urprotein" ab, das aus ein oder zwei dieser Module bestand, aus denen durch Duplizierung dieser Strukturen neue Proteine entstanden. In Säugern findet man mehrere Proteine, die aus jeweils zwei dieser Module zusammengesetzt sind. Aus diesem Grunde wurde Snf7 für die weiteren Untersuchungen in Viertel unterteilt.

### 3.3.2 Two-Hybrid Analyse

Es sind bereits mehrere Interaktionspartner von Snf7 beschrieben: Vps4 (eine AAA-type ATPase), Bro1 (rekrutiert Doa4 an Endosomen), Vps20 (Teil von ESCRTIII), Rim13 (Regulator von *IME2*) und Rim20 (Regulator von *IME2*). Aus genomweiten Two-Hybrid Screens ist zudem noch Ygr122w, ein bisher uncharakterisiertes Protein, hervorgegangen. Zum Testen der Interaktion mit Snf7 wurden Plasmide konstruiert, die, ausgehend vom N-Terminus, für ein („A“), zwei („B“), drei („C“) oder vier („D“) Snf7-Module kodieren, wobei „D“ dem Volllängenprotein entspricht. Die Interaktion von Bro1, Vps4, Vps20, Rim13, Rim20 und Ygr122w sollte mit diesen *SNF7*-Einheiten in einem Two-Hybrid-Assay getestet werden, um die Bereiche in Snf7 zu ermitteln, die für die jeweiligen Proteinwechselwirkungen benötigt werden.

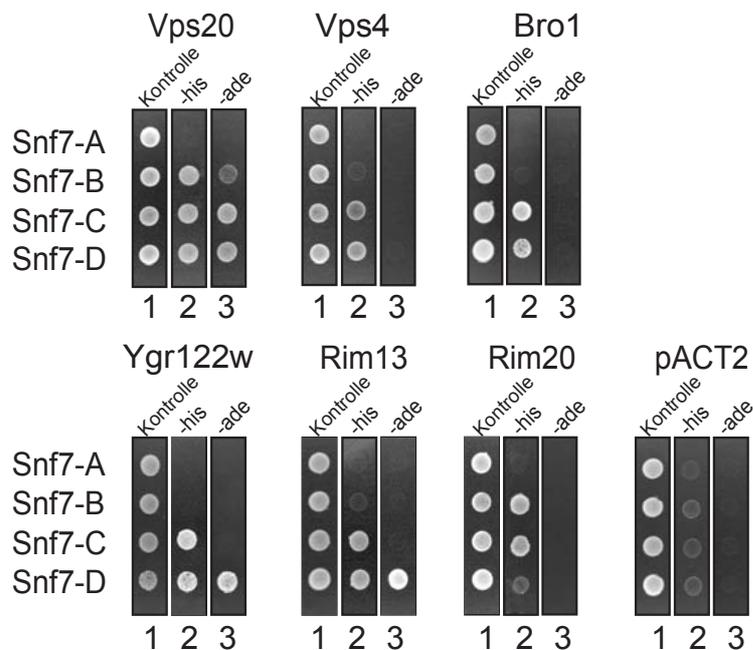
Das Two-Hybrid-System ist ein genetisches System zur Detektierung von Proteinwechselwirkungen (Fields und Song, 1989). Hierfür nutzt man den Transkriptionsfaktor *GAL4*. Es werden 2 $\mu$  Vektoren verwendet, die für die *GAL4*-Aktivierungsdomäne (AD) bzw. Bindedomäne (BD) kodieren. Die kodierenden Bereiche befinden sich unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors. Hinter diese Domänen wird jeweils ein Protein fusioniert. Kommt es zur Interaktion der beiden Fusionsproteine, kommen die Gal4-AD und Gal4-BD zusammen, so dass sie wieder als Transkriptionsfaktor wirken können. Reportergene, in diesem Fall das *HIS3*-, *ADE2*- und *lacZ*-Reportergen, werden von dem Transkriptionsfaktor Gal4 aktiviert, da vor ihren Promotoren Gal4-Bindestellen liegen. Sie dienen als Nachweis für eine

## Ergebnisse

stattgefundene Protein-Protein-Interaktion. Kommt es zu keiner Wechselwirkung zwischen den Fusionsproteinen, werden die Reporter gene nicht aktiviert, da kein aktiver Transkriptionsfaktor gebildet werden kann.

Um die Interaktion einzelner Proteine mit den Snf7-Stücken zu testen, wurden die SNF7-Einheiten „A“, „B“, „C“ und „D“ an die GAL4-BD fusioniert. BRO1, VPS20, VPS4, RIM13, RIM20 und YGR122W wurden an die GAL4-AD fusioniert.

Für die Two-Hybrid-Analyse wurden die GAL4-DB-SNF7 und die GAL4-AD Fusionen in den Two-Hybrid-Testerstamm PJ69-4A transformiert. Zusätzlich wurden die BD-Fusionskonstrukte mit einem Leervektor transformiert, der nur die AD alleine enthielt, um auszuschließen, dass eine Eigenaktivierung stattgefunden hat. Transformanten wurden zunächst auf plasmidselektiven Bedingungen angezogen und anschließend



**Abb. 18: Two-Hybrid-Interaktion zwischen BD-Snf7-Fusionen und AD-Fusionen von Snf7-Interaktionspartnern.**

Die Aktivität der Histidin- und Adenin-Reporter kassetten in Two-Hybrid Interaktionen der SNF7-Fragmente A, B, C, D (pRK957, pRK958, pRK941, pRK942) und der AD-Fusionen mit VPS20 (pRK1014), VPS4 (pRK641), BRO1 (pRK943), YGR122W (pRK1009), RIM13 (pRK945) und RIM20 (pRK959) wurde getestet. Gleiche Mengen Zellsuspension wurde auf SD-Medium (1) +His +Ade (Kontrolle); (2) +Ade (-his); (3) +His (-ade) getropft und für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

auf Medium ohne Histidin bzw. Adenin getropft, um die Aktivierung der Reporter gene zu testen. Getestet wurden, die bereits zu Beginn erwähnten Snf7-Interaktionspartner, Bro1, Bps20, Vps4, Rim13, Rim20 und Ygr122w (Abb. 18).

## Ergebnisse

---

Es wurde keine Interaktion dieser Proteine in Kombination mit dem *GAL4-AD* Vektor pACT2 allein beobachtet, was eine Eigenaktivierung durch die Gal4-DB-Snf7 Fusionen ausschließt. Alle getesteten Proteine, mit Ausnahme von Rim20, zeigten Wachstum auf Medium ohne Histidin bei Transformation mit den C- und D-Fusionen (Abb. 18). Zusätzlich interagierten Gal4-AD-Rim20 und Gal4-AD-Vps20 mit der Snf7-B Fusion. Eine Interaktion mit der Snf7-A Fusion fand mit keiner der getesteten Gal4-AD statt. Aus diesen Two-Hybrid-Wechselwirkungen kann man schließen, dass Bro1, Vps4, Rim13 und Ygr122w an das dritte Snf7-Modul binden, das sowohl in dem Modul „D“ als auch in „C“ vorhanden ist. Im Gegensatz dazu scheinen Rim20 und Vps20 an das zweite Modul zu binden, das in den Snf7-Varianten „B“, „C“, und „D“ präsent ist.

Der Großteil der untersuchten Proteine zeigt eine Wechselwirkung mit dem dritten Modul in Snf7. Dieses Modul entspricht der Region, die in der Mutagenese deutlich weniger von Mutationen betroffen war, als das zweite Modul. Die Annahme, dass diese Region für „nicht endosomale“ Funktionen zuständig ist, wird von den Two-Hybrid Daten unterstützt, da mit Rim13 und Ygr122w Proteine mit dieser Region interagieren, die keine endosomale Funktion besitzen. Auf der anderen Seite steht die Interaktion von Vps20 mit der Region „B“ von Snf7. Diese Region könnte für die endosomale Funktionen zuständig sein. Die getesteten Proteine Bro1 und Vps4 interagieren, wie Rim13 und Ygr122w, mit dem dritten Modul C, obwohl sie eine Funktion am Endosom haben. Der entscheidende Unterschied zu Vps20 scheint ihre fehlende Beteiligung am ESCRTIII-Komplex zu sein.

Nur Rim20 verhält sich ungewöhnlich. Obwohl Rim20 mit der Snf7-B und C Fusion interagiert, zeigt es keine Interaktion mit der Vollängenproteinfusion „Snf7-D“, was aber zu erwarten wäre, da diese Snf7-Variante auch das „B“-Fragment beinhaltet. Möglicherweise ist der Komplex aus Gal-AD-Rim20 Gal-BD-Snf7 (D) aus sterischen Gründen nicht in der Lage, die Transkription zu aktivieren.

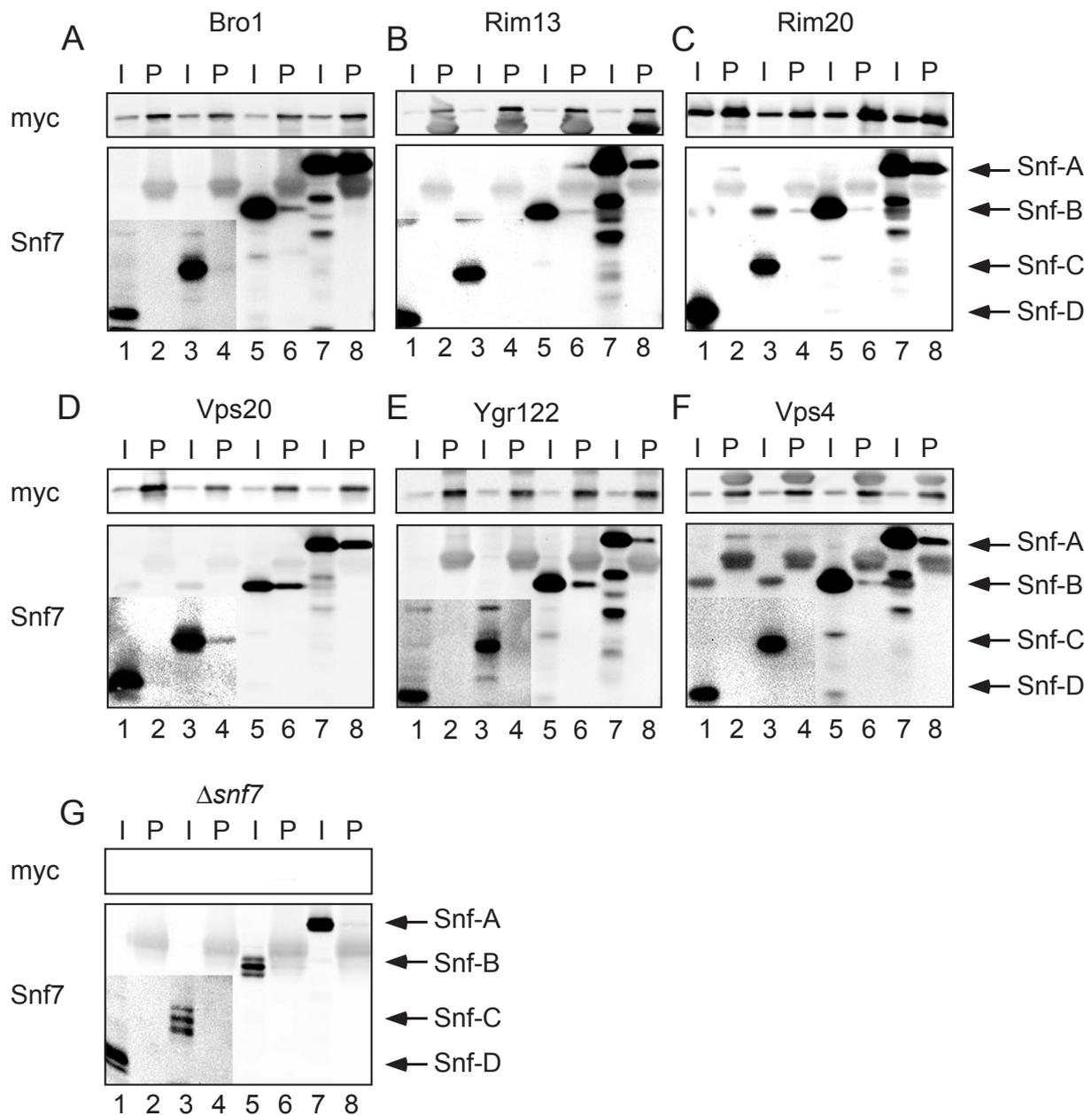
### 3.3.3 Native Co-Immunopräzipitation von Snf7 und seinen Interaktionspartnern

Zusätzlich zum Two-Hybrid-Assay, sollten die Protein-Protein-Interaktionen von Snf7 und seinen Bindungspartnern in einer nativen Co-Immunopräzipitation bestätigt werden. Bei einer Co-Immunopräzipitation binden Antikörper spezifisch ein Protein, das auf diese Weise aus einem Zellextrakt isoliert wird. Nach Auftrag auf ein SDS-Gel und anschließendem Transfer der Proteine auf eine Membran, ist es möglich Proteine, die an das präzipitierte Protein gebunden haben, mit Antikörpern nachzuweisen.

In diesem Fall wurde eine c-myc-Epitop-kodierende Sequenz chromosomal an *BRO1*, *VPS4*, *VPS20*, *RIM13*, *RIM20* und *YGR122W* fusioniert. Dies erfolgte im *SNF7*-Deletionsstamm RKY1852. In diese Stämme wurden Plasmide transformiert, die die *SNF7*-Fragmente „A“, „B“, „C“, „D“, unter der Kontrolle des eigenen Promotors, fusioniert mit einer Glutathion S-Transferase (GST)-Sequenz enthalten. Die potentiellen Interaktionspartner wurden mit anti-myc Antikörpern aus Zellextrakten immunopräzipitiert. In einer Western-Analyse wurde mit Antikörpern, die gegen ein GST-Snf7-Fusionsprotein gerichtet sind, getestet, ob Snf7-GST an die präzipitierten Proteine gebunden hat (Abb. 19). Zusätzlich wurde mit anti-myc Antikörpern die Gesamtmenge an präzipitiertem Protein überprüft.

Die Snf7-D Fusion konnte mit allen getesteten Proteinen präzipitiert werden (Abb. 19). Snf7-C wurde durch Bro1, Vps20, Ygr122w, Rim13, Rim20 und Vps4 präzipitiert. Dabei waren die Signale in den letzten drei Fällen sehr schwach ausgeprägt. Im Falle von Vps20 konnte, wie im Two-Hybrid-System, eine Interaktion mit Snf7-B nachgewiesen werden. Eine Interaktion mit Snf7-A konnte auch mit diesem Immunopräzipitationsexperiment in keinem Fall gezeigt werden. Im Großen und Ganzen stimmen die Ergebnisse der Immunpräzipitation mit den Two-Hybrid Daten überein, da die meisten Proteine wieder mit „C“ interagieren und Vps20 auch die Interaktion im N-terminalen Bereich zeigt. Abweichend hiervon zeigt Rim20 keine Interaktion mit der Snf7-B Fusion. Auch die Interaktion mit der C-Domäne sind bei Rim13 und Rim20 nur sehr schwach ausgeprägt. Wahrscheinlich sind die herrschenden Bedingungen der Co-Immunopräzipitation stringenter als im Two-Hybrid-System. Möglicherweise ist die Interaktion mit der Snf7-C-Fusion schwächer als mit der Snf7-D-Fusion und kann daher nur schlecht nachgewiesen werden.

## Ergebnisse



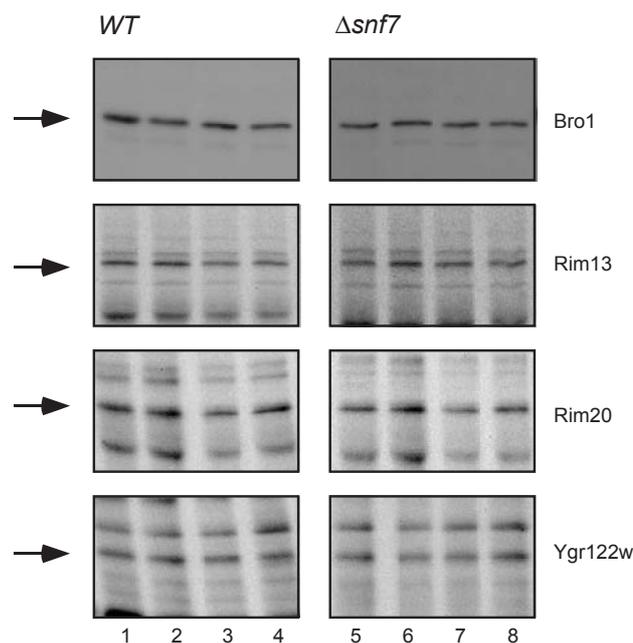
**Abb. 19: Co-Immunopräzipitation zwischen Snf7-Fragmenten und verschiedenen Interaktionspartnern.**

Verschiedene Hefestämme, die chromosomal myc-markierte Versionen der bekannten Snf7-Interaktionspartner exprimieren, wurden transformiert mit „single copy“ Plasmiden, die GST-Snf7 Fusionen exprimieren (wie in Abb. 17 gezeigt): (1, 2) Snf7-A: pRK1037; (3, 4) Snf7-B: pRK1017; (5, 6) Snf7-C: pRK1028; (7, 8) Snf7-D: pRK1029. Die Interaktionspartner wurden aus Zellextrakten mit anti-myc Antikörpern präzipitiert. Die Immunopräzipitate wurden dann durch Westernblotting auf die Anwesenheit von GST-Snf7 Fusion mit Antikörpern gegen Snf7-GST untersucht (untere Teilabbildungen). Mit Anti-myc Antikörpern wurden die 13myc Proteine nachgewiesen (obere Teilabbildungen). (A) RKY2030 (Bro1-13myc), (B) RKY2107 (Rim13-13myc), (C) RKY2097 (Rim20-13myc), (D) RKY2082 (Vps20-13myc), (E) RKY2042 (Ygr122w-13myc), (F) RKY2126 (Vps4-13myc), (G) RKY1852 (Negativkontrolle). Input (I, ungerade Zahlen) entspricht 5% des, für die IPs (P, gerade Zahlen) benutzten, Zellextraktes. Die Snf7-A und Snf7-B Signale wurden selektiv verstärkt, da das Expressionsniveau für diese Varianten sehr niedrig war.

### 3.3.4 Untersuchung des Einflusses von $\Delta snf7$ auf den Turnover von Bro1, Rim13, Rim20 und Ygr122w

Snf7 interagiert sowohl im Two-Hybrid-System als auch in Co-Immunopräzipitationen mit Bro1, Rim13, Rim20 und Ygr122w. In Pulse Chase Experimenten sollte gezeigt werden, ob die Deletion von *SNF7* einen Einfluss auf den Turnover dieser Proteine hat.

Hierfür wurden im Wildtypstamm JD52 (RKY1558) und im *SNF7*-Deletionsstamm RKY1852 jeweils Bro1, Rim13, Rim20 und Ygr122w chromosomal mit einem myc-Epitop versehen. In einem Pulse-Chase Experiment wurden die Proteine nach 15-minütigem „Pulse“ mit radioaktiv markierten Methionin und anschließend „Chase“ mit einem Überschuss nicht-markiertem Methionin und Cystein aus Zellextrakten mit myc-Antikörpern immunpräzipitiert. Die Proben für Zellextrakte wurden in gleichmäßigen Abständen (0, 20, 40, 60 min) nach dem Chase entnommen. Nach Auftrag auf einem SDS-Gel wurden die präzipitierten Proteine per



**Abb. 20: Einfluss der *SNF7*-Deletion auf den Turnover potentieller Interaktionspartner**

Der Turnover von Bro1, Rim13, Rim20 und Ygr122w in den Stämmen JD52 (WT/RKY1558) und  $\Delta snf7$  (RKY1852) wurde in einem Pulse-Chase Experiment untersucht. Die getesteten Proteinen wurden in den verwendeten Stämmen chromosomal mit einer myc-Epitop-Markierung-kodierenden Sequenz versehen. Die Zellen wurden 15 min mit [<sup>35</sup>S]-Trans-Label markiert. Nach Zugabe eines Überschusses kalten Methionins und Cysteins wurden in 20-minütigen Abständen (0, 20, 40, 60 min/ Spur 1-4) Proben genommen. Bro1-myc, Rim13-myc, Rim20-myc und Ygr122w-myc wurden aus den Zellextrakten mit monoclonalen Antikörpern, gerichtet gegen c-myc, präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit Autoradiographie nachgewiesen. 1-4: Wildtyp 0, 20, 40, 60 min Chase; 5-8  $\Delta snf7$  0, 20, 40, 60 min Chase. Die untersuchten Proteinbanden sind durch Pfeile markiert.

Autoradiographie nachgewiesen und die Signale densitometrisch quantifiziert und die Halbwertszeit für die jeweiligen Proteine errechnet. Alle untersuchten Proteine erwiesen sich als stabil, sowohl im Wildtypstamm als auch im *SNF7*-Deletionsstamm (Abb. 20).

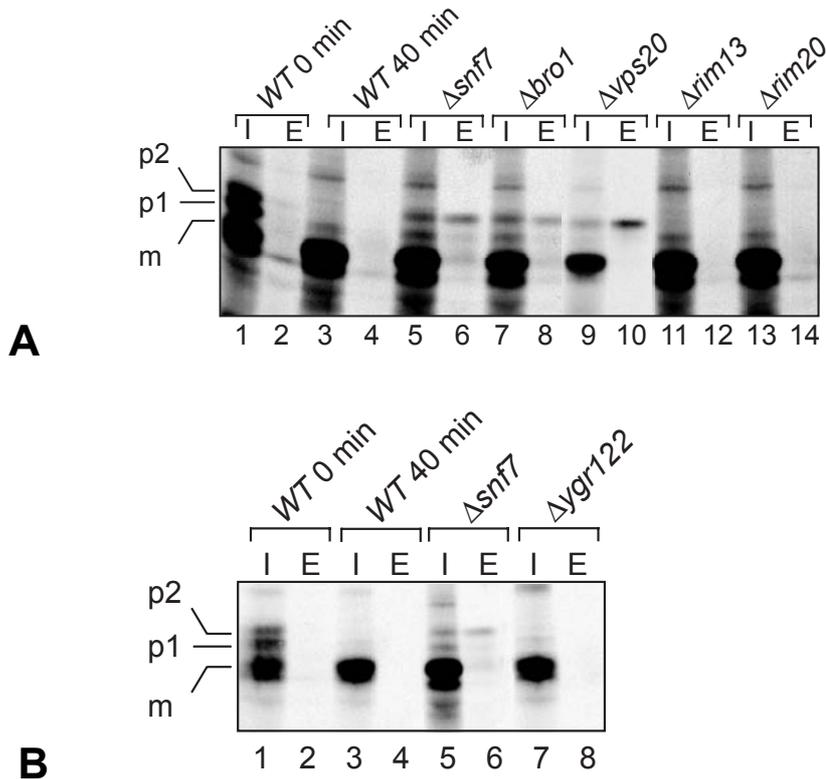
Diese Pulse-Chase Experimente zeigen, dass die Deletion von *SNF7* keinen Einfluss auf den Turnover von Bro1, Rim13, Rim20 und Ygr122w hat. Die untersuchten Proteine werden unabhängig von ihrer Interaktion mit Snf7 stabil exprimiert.

### **3.3.5 Untersuchung von Snf7-Interaktionspartner auf Funktionen im endozytischen Weg**

Snf7 interagiert mit den Proteinen Bro1, Rim13, Rim 20 und Ygr122w. Von Bro1 ist bekannt, dass es zusammen mit Snf7 eine Rolle im endozytischen Weg spielt. Es wird von Snf7 an die Endosomenmembran rekrutiert, von wo aus Bro1 wiederum das deubiquitiniierende Protein Doa4 an die Membran rekrutiert (Odorizzi et al., 2003; Luthala und Odorizzi, 2004). Für Rim13, Rim20 und Ygr122w wurde noch keine Funktion an Endosomen beschrieben.

Mutanten, die zu einer gestörten Endosomenfunktion führen (z. B. *vps*-Mutanten), verhindern den korrekten Transport der vakuolären Hydrolase CPY in die Vakuole, wo sie proteolytisch zu ihrer reifen M-Form gespalten wird. Stattdessen wird CPY als inaktive p2-Form aus den Zellen sekretiert und findet sich im Wachstumsmedium wieder (CPY-Sortingdefekt).

Die Proteine Rim13, Rim20 und Ygr122w sollten auf eine Rolle im endozytischen Weg getestet werden. Hierfür wurden ihre entsprechenden Deletionsmutanten auf einen CPY-Sortingdefekt untersucht (Abb. 21 A + B). Wie von *vps*-Mutanten bereits bekannt, zeigten die *SNF7*- und *Bro1*-und *VPS20*-Deletionsstämme einen CPY-Sortingdefekt. Die p2-Form war in den externen Fraktionen nachweisbar (Abb. 21A; Spur 6, 8, 10). Dagegen zeigten weder  $\Delta rim13$  (A; Spur 12),  $\Delta rim20$  (A; Spur 14) noch  $\Delta ygr122w$  (B; Spur 8) p2-CPY in der externen Fraktion. In diesen Mutanten kommt es nicht zu einem CPY-Sortingdefekt, was gegen eine Funktion im endozytischen Weg spricht.



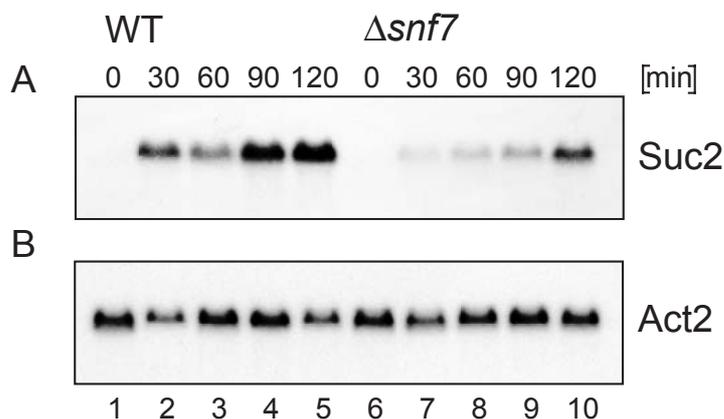
**Abb. 21: Untersuchung verschiedener Deletionsstäme auf endosomale Funktionen.** Benutzt wurden die Deletionsstäme (A): RKY1852 ( $\Delta snf7$ ), RKY1922 ( $\Delta bro1$ ), RKY1853 ( $\Delta vps20$ ), RKY2102 ( $\Delta rim13$ ), RKY2100 ( $\Delta rim20$ ). (B): RKY1948 ( $\Delta ygr122w$ ). Als Kontrolle diente der Wildtypstamm JD52 (RKY1558). Die Zellen wurden 15 min lang mit [ $^{35}$ S] Trans-Label markiert. 40 min nach Zugabe eines Überschusses an nicht markiertem Methionin wurde CPY von Sphäroplasten (I, interne Fraktion/ungerade Zahlen) und vom Kulturüberstand (E, externe Fraktion/gerade Zahlen) immunopräzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-Page und Autoradiographie nachgewiesen.

## 3.4 Der Zellkern als Wirkungsort für Snf7

### 3.4.1 Untersuchung der Zellkernfunktion von Snf7

#### 3.4.1.1 Einfluss von Snf7 auf die Transkription von SUC2

*SUC2* kodiert für das Enzym Invertase, das Kohlenstoffquellen wie Raffinose und Saccharose hydrolysiert. Bei hohen Glukosekonzentrationen im Medium wird die *SUC2*-Expression reprimiert, bei niedrigen Konzentrationen entsprechend aktiviert. Die Deletion von *SNF7* verhindert eine effiziente Derepression von *SUC2* bei geringer Glukosekonzentration im Wachstumsmedium. Die Funktion von Snf7 in der Derepression des *SUC2* Gens konnte in dem Mutagenese-Experiment von seiner endosomalen Funktion getrennt werden. Die genaue Art und Weise wie Snf7 bei der Derepression von *SUC2* wirkt, ist noch unbekannt. Möglich wäre einerseits ein Effekt auf transkriptioneller Ebene, indem Snf7 direkt die Transkription von *SUC2* beeinflusst oder andererseits ein post-transkriptioneller Effekt. In diesem Fall wäre evtl. der Kernexport der mRNA oder die Translation gestört. Eine Northern-Analyse sollte Aufschluss darüber geben, ob Snf7 bereits auf transkriptioneller Ebene wirkt



#### Abb. 22: Untersuchung der Transkriptionsaktivität von SUC2

In einer Northern-Analyse wurde der Einfluss der *SNF7*-Deletion auf die Transkription von *SUC2* untersucht. Hierfür wurden die Hefestämme 1558 (WT) (Spur 1-5) und 1852 ( $\Delta snf7$ ) (Spur 6-10) einem Glukosetransfer von 5% nach 0,1% unterzogen. Die *SUC2* mRNA wurde mit einer radioaktiv-markierten *SUC2*-Sonde durch Autoradiographienachgewiesen (A). Als Kontrolle für eine gleichmäßige Probenauftragung wurde mit einer, gegen Aktin gerichtete, Sonde hybridisiert (B).

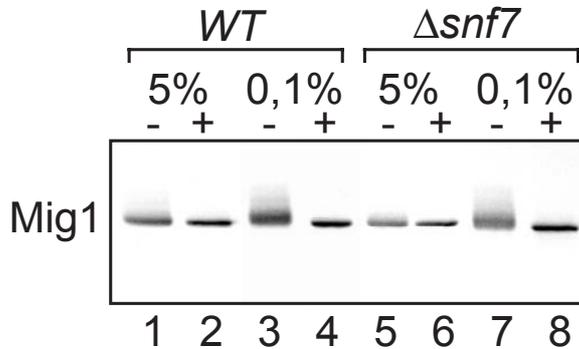
oder erst später. In einer Northern-Analyse wird mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde spezifisch die Anwesenheit von RNA-Transkripten nachgewiesen. In diesem Versuch sollte die *SUC2*-Transkription im Wildtypstamm JD52 und im *SNF7*-Deletionsstamm bei niedrigen Glukosemengen untersucht werden. Wird die Transkription von *SUC2* durch eine Deletion von *SNF7* beeinträchtigt, so würde man eine verminderte *SUC2*-RNA Menge bei einem Transfer auf niedrige Glukosekonzentrationen erwarten. Nach einem Transfer von 5% Glukose auf 0,1% Glukose, wurde in 30-minütigen Abständen RNA isoliert und durch Northern Blotting mit einer spezifischen *SUC2*-Sonde analysiert. Der Wildtypstamm zeigte bereits nach 30 Minuten eine starke transkriptionelle Aktivität von *SUC2*, die sich nach 120 Minuten noch um ein Vielfaches erhöhte (Abb. 22A Spur 5). Im Gegensatz dazu war die transkriptionelle Aktivität im *SNF7*-Deletionsstamm deutlich geringer. Erst nach zwei Stunden zeigt sich eine schwache Aktivität (Abb. 22A Spur 10). Als Kontrolle dafür, dass gleiche RNA-Mengen untersucht worden sind, wurde dieselbe Membran noch mit einer Aktin-Sonde behandelt. Die Aktin-mRNA Mengen waren in beiden Stämmen vergleichbar und wurden durch den Glukosetransfer nicht beeinflusst.

### **3.4.1.2 Mig1 als potentiellles Zielprotein für Snf7**

Bei einer hohen Glukosekonzentration im Wachstumsmedium wird die Expression von *SUC2* durch den Mig1-Repressor verhindert, der an den *SUC2*-Promotor bindet (Nehlin und Ronne, 1990). Mig1 ist ein Zinkfingerprotein, das die Gentranskription während des Wachstums auf Glukose reprimiert. Die Aktivität von Mig1 wird durch Phosphorylierung reguliert. Bei hoher Glukosekonzentration wird Mig1 dephosphoryliert und befindet sich im Zellkern, wo es Transkription reprimiert. Ohne Glukose wird Mig1 schnell durch den Snf1-Kinase-Komplex phosphoryliert und wandert als inaktive Form ins Zytoplasma (Treitel *et al.*, 1998). Snf7 könnte in einen der Schritte dieser Kaskade eingreifen. Um zu sehen, ob die Mig1-Kaskade in einer  $\Delta snf7$  Mutante noch intakt ist, wurde untersucht ob Mig1 nach einem Transfer auf niedrige Glukosekonzentrationen noch phosphoryliert wird. Hierfür wurde Mig1 mit einem myc-Epitop versehen. Nach einem Transfer von 5% Glukose auf 0,1% Glukose im Medium konnten langsamer laufende Formen von Mig1 auf einem Westernblot beobachtet werden. Nach Phosphatasebehandlung veränderten sich die Mig1-Signale zu scharfen Banden, die etwas schneller liefen (Abb. 23). Die

## Ergebnisse

Phosphorylierung von Mig1 bei niedrigen Glukosekonzentrationen war in einer  $\Delta snf7$ -Mutante nicht beeinträchtigt. Dies zeigt, dass die Mig1-Kaskade intakt ist. Snf7 muss somit in Schritte involviert sein, die nach der Inaktivierung von Mig1 ablaufen.



**Abb. 23:**  
**Dephosphorylierungsexperiment von Mig1.** Zellen der Stämme RKY2058 (JD52/Mig1-myc) und RKY2104 ( $\Delta snf7$ /Mig1-myc) wurden in 5% Glukose angezogen bzw. für 1 h von 5% auf 0,1% Glukose transferiert. Gleiche Mengen Zellextrakt wurden aufgetragen. (+) Phosphatase behandelt (Spuren 2, 4, 6 und 8), (-) unbehandelt (Spuren 1, 3, 5 und 7).

### 3.4.2 Lokalisation von Snf7

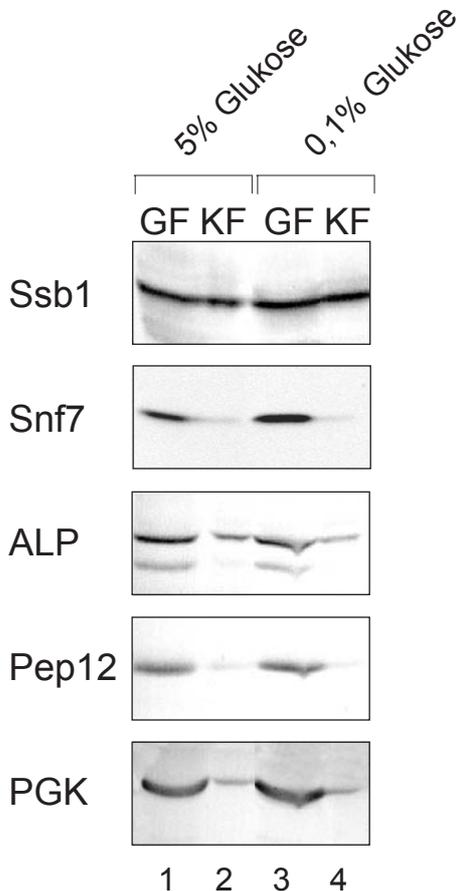
#### 3.4.2.1 Isolierung von Zellkernen

Die Northern-Analyse hat gezeigt, dass Snf7 die Transkription von *SUC2* beeinflusst. Es stellt sich nun die Frage, ob Snf7 auch im Zellkern nachweisbar ist. Dies sollte mit der Isolierung von Zellkernen untersucht werden. Hierfür wurden Zellkerne aus dem Wildtypstamm JD52 isoliert. Der Stamm wurde in 5% Glukose angezogen. Eine Hälfte dieser Kultur wurde für 60 Minuten auf 0,1% Glukose transferiert. In einer Western-Analyse wurde die Kernfraktion (KF) neben der Zellextraktfraktion (Gesamtfraktion/GF) aufgetragen. Als Kernmarker diente das "single-strand-binding protein" Ssb1. Mit Hilfe dieses Markers wurden die Mengen an Kern- und Gesamtfraktion angeglichen, so dass beide Fraktionen die gleiche Menge an Zellkernen enthielten. Mit Antikörpern gegen andere Markerproteine wurde getestet, welche Proteine mit dieser Methode in der Zellkernfraktion angereichert oder abgereichert worden sind. Verglichen mit dem Markerprotein Ssb1 waren alle getesteten Proteine in der Kernfraktion, inklusive Snf7, unabhängig von der Glukosekonzentration abgereichert. Nur das Vakuolenprotein alkalische Phosphatase (ALP) wurde in den Nukleusfraktionen etwas angereichert. Mit einer Anreicherung von Vakuolen kann man rechnen, da sie manchmal über „Nuclear Vacuolar Junctions“ (NVJs) mit dem Zellkern assoziiert vorliegen (Pan et al., 2000) und entsprechend zusammen mit Zellkernen aufgereinigt werden können. Auch eine

## Ergebnisse

kurze Inkubation bei niedrigen Glukosekonzentrationen (10 min) führte zu keiner Anreicherung von Snf7 in der Nukleusfraktion (Daten nicht gezeigt).

In diesem Experiment konnte Snf7 daher nicht in Zellkernen nachgewiesen werden.



**Abb. 24: Untersuchung der Zellkernlokalisierung von Snf7 durch Isolierung von Zellkernen**  
Zellkerne wurden isoliert aus dem Wildtypstamm JD52 (RKY1558). Die Zellen wurden in 5% glukosehaltigem Vollmedium angezogen. Ein Teil der Zellen wurde für eine Stunde auf 0,1% Glukose transferiert. Anhand des Kernmarkers Ssb1 wurde die Auftragsmenge von Gesamtextrakt (Spur 1 + 3) und Kernfraktion (Spur 2 + 4) angeglichen. Nach SDS-Page wurden in einer Western-Analyse die Markerproteine ALP, Pep12 und PGK, sowie Snf7 mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen und auf ihre An- bzw. Abreicherung in der Nukleusfraktion hin untersucht.

### 3.4.2.2 Immunfluoreszenz-Experimente

Snf7 konnte nicht in isolierten und gereinigten Zellkernen nachgewiesen werden. Deshalb sollte die Lokalisation von Snf7 zusätzlich in Immunfluoreszenz-Experimenten beobachtet werden.

Da die polyklonalen Snf7-GST Antikörper hierfür nicht geeignet waren, wurde ersatzweise der Wildtypstamm JD52 mit einem Überexpressionsplasmid transformiert, das für eine mit einem HA-Epitop markierte Snf7-Variante kodiert. Allerdings müssen die Ergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden, da die Überproduktion von Snf7 zu einer Störung der Endosomenfunktion führt. Darüber hinaus scheint die HA-markierte Snf7-Variante einen CPY-Sorting-Defekt aufzuweisen (Abb. 11 Spur 16). Trotz dieser Einschränkungen könnte die

## Ergebnisse

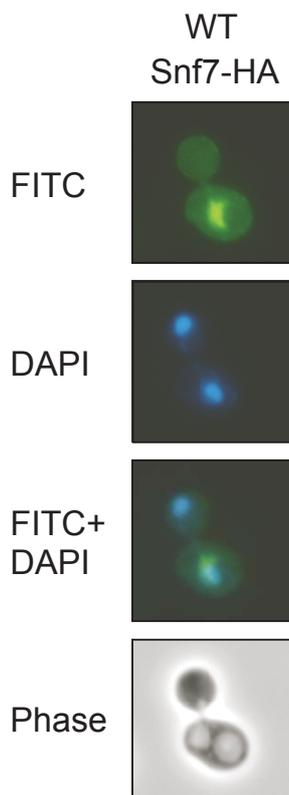
---

Lokalisation des Proteins noch korrekt sein. Dafür spricht auch, dass unsere *snf7*-Mutanten mit defekter Endosomenfunktion noch membranassoziiert vorliegen.

In 50% aller Zellen, in denen Snf7-Fluoreszenz beobachtet wurde, war das Protein in direkter Nähe des Zellkerns lokalisiert (Abb. 25).

Man erkennt deutlich punktförmige Strukturen, die sich oft zwischen Vakuole und Zellkern befinden. Dieses Verteilungsmuster hat Ähnlichkeit mit "Nuclear vacuolar junctions". Sie stellen eine Verbindung zwischen Vakuole und Nukleus dar, über die Zellkernfragmente direkt in die Vakuole zum sofortigen Abbau transportiert werden (Roberts *et al.*, 2003). Auf diese Weise können Teile des Zellkerns abgebaut oder „recycled“ werden.

Das Fluoreszenzmuster von Snf7 deutet auf eine Lokalisation am, jedoch nicht im Zellkern hin.



**Abb. 25: Immunfluoreszenz zur Lokalisation von Snf7.**

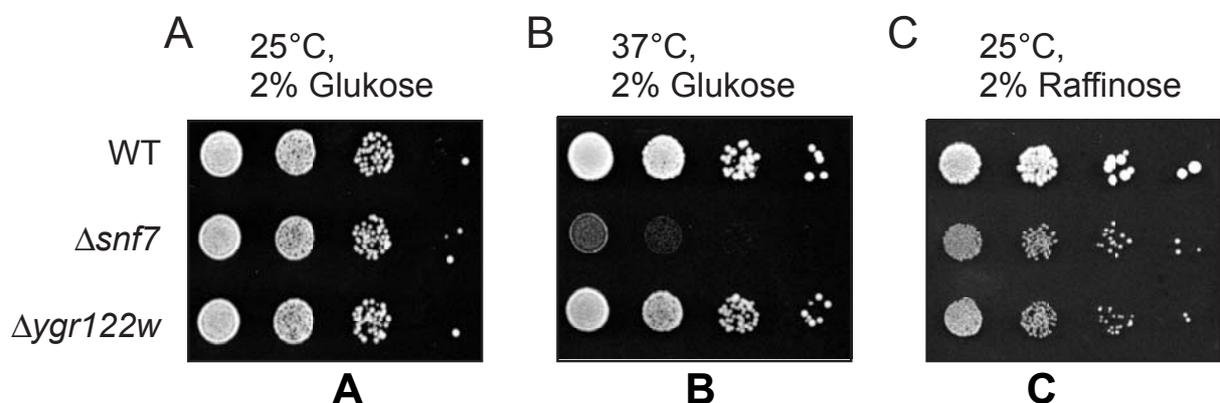
Der Wildtypstamm JD52 wurde mit dem Plasmid pRK781 (*SNF7*-3HA, 2 $\mu$ ) transformiert und über Nacht exponentiell herangezogen. Es wurde ein, gegen HA gerichteter, Primärantikörper benutzt. Als Sekundärantikörper dienten FITC-gekoppelte anti Maus-Antikörper. Gezeigt ist (von oben nach unten): Snf7-HA in1558; DAPI (Zellkerne); FITC und Dapi übereinander gelegt; Phasenkontrast der Hefezelle.

### 3.5 Charakterisierung des Snf7-Interaktionspartners Ygr122w

Ygr122w zeigte in einem Massen-Two-Hybrid Screen eine Interaktion mit Snf7 und Atp14 (Ito *et al.*, 2001). Letzteres ist eine Untereinheit der mitochondrialen ATP Synthase. Die Interaktion von Ygr122w mit Snf7 konnte in einem Two-Hybrid-Assay (Abb. 18) und mit Co-Immunopräzipitation (Abb. 19E) bestätigt werden. Als uncharakterisiertem Interaktionspartner von Snf7 sollten die Eigenschaften von Ygr122w näher untersucht werden.

#### 3.5.1 Wachstumsdefekt der YGR122W-Deletion auf Raffinose

Mit Tropftests sollte untersucht werden, ob  $\Delta ygr122w$  wie  $\Delta snf7$  einen *snf*-Phänotyp zeigt. Hierfür wurde YGR122W im Wildtypstamm JD52 deletiert. Dieser Deletionsstamm wurde in 1:10 Verdünnungen auf Vollmediumplatten getropft, die statt Glukose 2% Raffinose als einziger Kohlenstoffquelle enthielten. Ferner wurde das Wachstum auf Vollmedium mit 2% Glukose bei 25°C bzw. 37°C untersucht (Abb. 26). Als Kontrollen dienten der Wildtypstamm JD52 und der SNF7-Deletionsstamm RKY1852. Auf Vollmedium bei 25°C wuchsen alle drei untersuchten Stämme gleich gut (Abb. 26A). Bei 37°C war die  $\Delta snf7$ -Mutante, wie bereits gezeigt, temperatursensitiv. Die  $\Delta ygr122w$ -Mutante dagegen war nicht temperatursensitiv (Abb. 26 B). Jedoch zeigt sie den „*snf*“-Phänotyp: Auf Platten mit 2% Raffinose (+ 2  $\mu$ M Antimyzin) wächst die  $\Delta ygr122w$ -Mutante genauso schlecht wie die



**Abb. 26: Wachstumsphänotypen der YGR122W-Deletionsmutante.** Serielle 10-fach Verdünnungen von Übernachtskulturen verschiedener Hefestämme wurden auf YPD-Platten mit 2% Glukose bzw. 2% Raffinose (+ 2  $\mu$ M Antimyzin) getropft. Die Platten wurden 3 Tage bei 25°C bzw. 37°C inkubiert. Benutzt wurden folgende Stämme (von oben nach unten): JD52 (WT), RKY1852 ( $\Delta snf7$ ) und RKY1948 ( $\Delta ygr122w$ ).

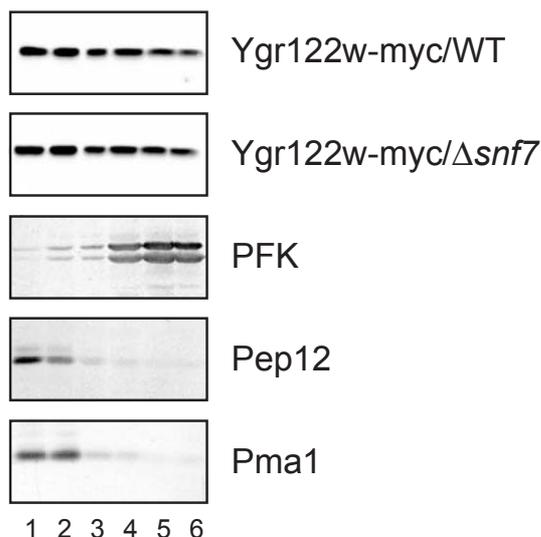
$\Delta snf7$ -Mutante (Abb. 26C).

Der Tropftest zeigt, dass der *YGR122W*-Deletionsstamm, wie der *SNF7*-Deletionsstamm, den „*snf<sup>-</sup>*“-Phänotyp zeigt. Jedoch ist die  $\Delta ygr122w$ -Mutante nicht temperatursensitiv. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Ygr122w nur an einer der nicht-endosomalen Funktionen von Snf7 beteiligt ist.

### 3.5.2 Untersuchung der Membranassoziation von Ygr122w

#### 3.5.2.1 Untersuchungen der Membranassoziation durch Flotations-Experimente

In Flotationsexperimenten sollte die Membranassoziation von Ygr122w in Abhängigkeit von Snf7 untersucht werden. Hierfür wurde Ygr122w sowohl im Wildtypstamm JD52 als auch in der *SNF7*-Deletionsmutante RKY1852 mit einem myc-Epitop markiert. Zellextrakte dieser Stämme wurden in einem Flotationsexperiment fraktioniert und die einzelnen Fraktionen auf einem SDS-Gel aufgetragen. Der Nachweis von Ygr122w erfolgte in einer Westernanalyse mit Antikörpern, die gegen das myc-Epitop gerichtet sind. Als Marker für die löslichen



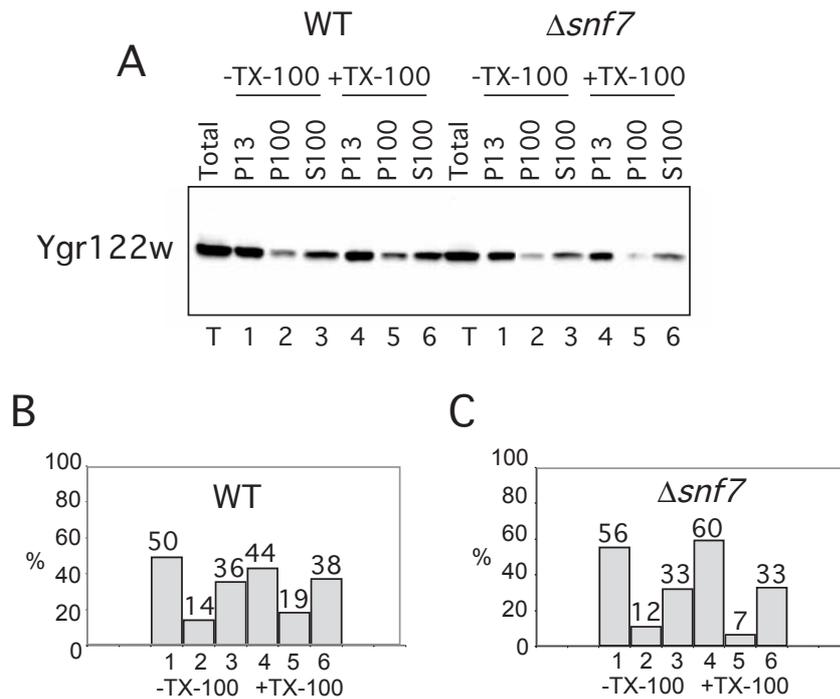
**Abb. 27: Membranassoziation von Ygr122w.** Zellextrakte von RKY1949 (WT/ Ygr122w-myc) und RKY2042 ( $\Delta snf7$ /Ygr122w-myc) wurden in Optiprep™ Flotationsgradienten fraktioniert. Sechs Fraktionen wurden vom Gradienten abgenommen (Spuren 1-3: Membranfraktionen; Spuren 4-6 lösliche Fraktionen). In den oberen beiden Abbildungen wurden die Fraktionen mit Antikörpern, gerichtet gegen myc, in Westernblots analysiert. Die unteren drei Abbildungen zeigen die Verteilung der Markerproteine Pfk, Pep12 und Pma1 im Gradienten. Sie wurden mit entsprechenden Antikörpern in Westernblots nachgewiesen.

Fraktionen (Fraktion 4-6) diente die Phosphofruktokinase (PFK) und als Marker für die Membranproteine dienten das endosomale Protein Pep12 und das Plasmamembranprotein Pma1 (Fraktionen 1-3). Sowohl im Wildtypstamm als auch in

der  $\Delta snf7$ -Mutante zeigte Ygr122w die gleiche Verteilung. Ein gewisser Anteil von Ygr122w war membran-assoziiert. Dieser Anteil des Proteins beträgt in beiden Stämmen etwa 60% (Abb. 27). Die Membranassoziation von Ygr122w ändert sich in einem *SNF7*-Deletionsstamm nicht. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Snf7 nicht für die Membranbindung von Ygr122w benötigt wird.

### **3.5.2.2 Untersuchung der Membranassoziation mit differentieller Zentrifugation**

Gleiche Ergebnisse wie in den Flotationsexperimenten ergaben sich in differentiellen Zentrifugationsexperimenten. Zellextrakte des Wildtypstammes RKY1949 (JD52, Ygr122w-myc) und des *SNF7*-Deletionsstammes RKY2042 ( $\Delta snf7$ , Ygr122w-myc) wurden in mehreren Zentrifugationsschritten in die Fraktionen P13, P100 und S100 fraktioniert, wobei P13 und P100 die nicht-löslichen „Pelletfraktionen“ und S100 die lösliche Proteinfraction repräsentieren. Eine Hälfte der Proben wurde zusätzlich mit dem Detergenz Triton-X-100 (Spuren 4-6) behandelt. Die Proteinmenge von Ygr122w in den einzelnen Fraktionen war im Wildtypstamm und im *SNF7*-Deletionsstamm fast gleich (Abb. 28B). Ohne Behandlung mit Triton ist in beiden Stämmen mit rund 50% der größte Teil des Proteins in der P13 Fraktion zu finden (Abb. 28B, Spur 1). Ein Drittel des Proteins Ygr122w war in der löslichen S100 Fraktion zu finden (Abb. 28B, Spur 3). Nur wenig mehr als 10% des Proteins war in der P100 Fraktion lokalisiert (Abb. 28B, Spur 2). Dieses Verteilungsverhältnis veränderte sich auch nicht bei Behandlung der Zellextrakte mit Triton (Abb. 28B, Spur 4-6). Die unveränderte Proteinverteilung von Ygr122w in der  $\Delta snf7$ -Mutante zeigt wie die Flotationexperimente, dass die Membranlokalisierung von Ygr122w unabhängig von Snf7 ist und somit Ygr122w anscheinend nicht an der endosomalen Membran lokalisiert ist. Nach Behandlung mit Triton-X-100 löst sich das Protein also nicht von Membranen ab. Möglicherweise ist Ygr122w mit Lipid Rafts assoziiert. Lipid Rafts sind Inseln in der Plasmamembran, bestehend aus stark geordneten gesättigten Lipiden und Cholesterin, die, im Gegensatz zu den mehr fluiden und ungeordneten Schichten ungesättigter Lipide, nicht Triton-löslich sind.



**Abb. 28: Fraktionierung von Ygr122w.** Zellextrakte des Wildtypstammes RKY1949 (JD5, Ygr122w-myc) und des *SNF7*-Deletionsstammes RKY2042 ( $\Delta snf7$ , Ygr122w-myc) wurden in zwei Zentrifugationsschritten (A) in die Pelletfraktionen P13 (Spur 1 und 4) und P100 (Spur 2 und 5) sowie in die lösliche Fraktion S100 (Spur 3 und 6) aufgetrennt. In Spur T wurde der Gesamtextrakt aufgetragen. Von allen Fraktionen wurden äquivalente Mengen geladen. Eine Hälfte der Extrakte (Spuren 4-6) wurde mit dem Detergenz Triton-X-100 behandelt, die andere Hälfte blieb unbehandelt (Spuren 1-3). Snf7 wurde, nach SDS-Page und Western-Analyse, mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen, die Signalintensitäten wurden densitometrisch quantifiziert und so die Proteinmenge in den einzelnen Fraktionen bestimmt. In den Balkendiagrammen (B) wurden die Proteinmengen prozentual dargestellt. Die Gesamtproteinmenge von P13, P100 und S100 wurde jeweils gleich 100% gesetzt.

---

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion des endosomalen Proteins Snf7 in Hefe untersucht werden. Snf7 bildet zusammen mit fünf weiteren Proteinen die Snf7-Familie. Diese sechs Proteine gehören zur Gruppe der „class E“ vacuolar protein sorting (Vps) Proteine und werden wahrscheinlich gebraucht für die Internalisierung endosomaler Cargo-Proteine in interne Vesikel an späten Endosomen (Amerik *et al.*, 2000; Kranz *et al.*, 2001; Babst *et al.*, 2002a). Viele der „class E“ Proteine bilden Proteinkomplexe (ESCRT-I, II, III), die kaskadenartig hintereinander bei der MVB-Bildung mitwirken (Katzmann *et al.*, 2001; Babst *et al.*, 2002a; Babst *et al.*, 2002b). Vier der sechs Proteine der Snf7 Familie, Snf7 (Vps32), Vps20, Vps24 und Did4, (Vps2) bilden an der endosomalen Membran den ESCRTIII-Komplex. In der phänotypischen Analyse wurde dies durch die Wachstumsphänotypen der Deletionsmutanten bestätigt. Gleiche Wachstumsdefekte von Snf7, Vps20, Vps24 und Did4 auf Koffein und bei 37°C sprechen für eine gemeinsame Funktion im ESCRTIII-Komplex, wohingegen ihre unterschiedlichen Wachstumsphänotypen auf Raffinose und Kongorot zusätzlich die Beobachtung unterstützen, dass Snf7 mit Vps20 und Vps24 mit Did4 jeweils paarweise Subkomplexe im ESCRT-III Komplex bilden. Die Rolle der anderen beiden Snf7 Homologen, Did2 und Mos10, ist noch unklar. Sie spielen zwar eine Rolle an späten Endosomen (Amerik *et al.*, 2000; Kranz *et al.*, 2001), jedoch konnten sie keinem der ESCRT-Komplexe zugeordnet werden (Babst *et al.*, 2002a). Möglich wäre, dass diese beiden Proteine regulatorische Aufgaben an späten Endosomen erfüllen.

### 4.1 Trennung der Snf7 Funktionen durch Mutagenese

Die Vertreter der „class E“ Vps-Proteinfamilie haben alle eine Funktion im endozytischen Weg. Interessanter Weise zeigen aber ihre Deletionsmutanten unterschiedliche Wachstumsphänotypen auf verschiedenen Medien. Es stellt sich die Frage, wie eine alleinige Funktion an Endosomen zu verschiedenen Phänotypen von Mutanten führen kann. Eine Möglichkeit wäre die spezifische Rekrutierung von Zelloberflächenproteinen durch die Snf7-Homologen. Die Snf7-Homologen könnten jeweils ein spezifisches Set an Cargoproteinen erkennen und sie über den MVB-Weg

ihrem Abbau in der Vakuole zuführen. Für aktivierte Oberflächenrezeptoren, wie z. B. den EGF-Rezeptor, ist gezeigt worden, dass ihr „Signalling“ noch nach der Internalisierung fortläuft und erst durch ihren endgültigen Abbau in der Vakuole gestoppt wird (Burke *et al.*, 2001).

*snf7*-Mutanten zeigen einen *snf*- (sucrose-non-fermenting) Phänotyp, sie können also auf Raffinose oder Saccharose als einziger Kohlenstoffquelle nicht wachsen. Der *snf*-Phänotyp könnte mit einem gestörten Abbau eines Glukosesensors wie z. B. Snf3 erklärt werden. Die Temperatursensitivität der *SNF7*-Deletionsmutanten könnte auf ähnliche Weise durch eine Blockierung des Abbaus von hitzegeschädigten Oberflächenproteinen bedingt sein. Die unterschiedlichen Wachstumsphänotypen könnten jedoch auch durch Störungen in Funktionen bedingt sein, die unabhängig von der endosomalen Funktion sind. Es gibt viele Beispiele von Proteinen, die verschiedene, voneinander unabhängige Funktionen ausüben (Moonlighting) (Jeffrey, 1999).

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, sollte in einem Screen versucht werden, Mutanten zu isolieren, die in ihrer endosomalen Funktion gestört sind, in denen aber die nicht-endosomale Funktion intakt ist. Sind die unterschiedlichen Phänotypen an die endosomale Funktion der Snf7-Homologen gekoppelt, so sollte es nicht möglich sein, solche Mutanten zu erhalten.

In einem Screen wurden *snf7*-Mutanten isoliert, die einen Defekt in ihrer endosomalen Funktion aufweisen, die aber Wildtyp bezüglich ihrer nicht-endosomalen Funktionen sind. Der endosomale Defekt zeigt sich in einer Stabilisierung des  $\alpha$ -Faktortransporters Ste6, der normalerweise über den MVB-Weg abgebaut, in den Mutanten jedoch angehäuft wird. Die Stabilisierung von Ste6 wurde mit Hilfe eines kupferregulierten Ste6-His3-Fusionsproteines nachgewiesen, das bei Anhäufung des Fusionsproteines zu einem Wachstum der Zellen auf Medium führt, das kein Histidin enthält und zusätzlich wurde in Pulse Chase Experimenten ein direkter Nachweis für eine Ste6-Stabilisierung erbracht. Dies zeigt, dass es in den Mutanten tatsächlich zu einer Anhäufung von Ste6 durch einen verlangsamten Abbau kommt und nicht durch eine höhere Expression des *STE6-HIS3*-Fusionskonstruktes. Die isolierten Mutanten führten zwar zu einer Stabilisierung von Ste6, zeigten aber gleichzeitig Wachstum auf Raffinose, was dem Wildtypwachstumsphänotyp entspricht. In den Mutanten kommt es also weiterhin zu einer normalen Induktion von Invertase. Dies wurde sowohl durch Wachstum auf

## Diskussion

---

Platten, die Raffinose als einzige Kohlenstoffquelle enthielten, gezeigt als auch durch Messung der Invertaseaktivität nach Shift auf niedrige Glukosekonzentrationen. Die Mutanten zeigten eine gleichstarke Invertaseinduktion wie der Wildtyp. Der *snf*-Phänotyp scheint somit unabhängig von der endosomalen Funktion zu sein.

Die Sequenzierung der Mutanten zeigte, dass auffällig viele der Mutationen, die zu einem Defekt der endosomalen Funktion führen, sich im N-terminalen Bereich des Snf7-Proteins befinden. In diesem Proteinabschnitt ist die Wahrscheinlichkeit zur „coiled-coil“-Bildung besonders hoch. Im Gegensatz dazu ergab die Sequenzierung für den C-terminalen Bereich nur eine geringe Anzahl von Mutationen. Dies spricht dafür, dass der N-terminale „coiled-coil“-bildende Teil wichtig für die endosomale Funktion des Proteins ist, während der C-terminale Bereich möglicherweise für die nicht-endosomalen Funktionen benötigt wird. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse der Interaktionsstudien unterstützt. Sowohl die Two-Hybrid-Analyse als auch die Co-Immunopräzipitationsexperimente zeigten, dass Vps20, das zusammen mit Snf7 einen der ESCRTIII-Subkomplexe bildet, mit der N-terminalen Region von Snf7 interagiert. Die N-terminalen „coiled-coil“-Strukturen scheinen somit für die Heterodimerbildung von Snf7 und Vps20 wichtig zu sein. Im Gegensatz dazu interagieren Rim13 und Ygr122w mit dem C-terminalen Ende von Snf7. Beide Proteine spielen keine Rolle im endozytischen Weg, was CPY-Sortingexperimente gezeigt haben: Die CPY wird in *RIM13*- und *YGR122W*-Deletionsmutanten nicht fehlsortiert. Auf der anderen Seite spielen die Proteine Bro1 und Vps4, die ebenfalls mit der C-terminalen Region von Snf7 interagieren, eine Rolle im endozytischen Weg, jedoch sind sie nicht Teil der ESCRT-Komplexe. Dies ist ein Hinweis auf eine Beteiligung des C-Terminus sowohl an endosomalen wie auch an nicht-endosomalen Funktionen von Snf7.

Da die *SNF7*-Mutationen sich in der Vps20-Binderegion häufen, sollte die Bildung des ESCRTIII-Komplexes durch diese Mutationen beeinträchtigt sein. Untersuchungen der Membranassoziation der *snf7*-Mutanten zeigten jedoch, dass die *snf7*-Mutanten immer noch an Membranen gebunden sind. Sowohl in Flotationsexperimenten als auch in differentiellen Zentrifugationen waren gleiche Mengen Snf7 mit Membranen assoziiert unabhängig davon, ob es sich um *snf7*-Mutanten oder den Wildtypstamm handelte. Dies bedeutet, dass der ESCRTIII-Komplex in diesen Mutanten entweder noch intakt ist oder, dass Snf7 auch alleine an die Membran binden kann.

WT-Snf7 co-lokalisiert nicht mit Pep12. Dies deutet darauf hin, dass der ESCRTIII-Komplex und Pep12 an unterschiedlichen endosomalen Strukturen zu finden sind. Dabei könnte es sich um späte bzw. frühe Endosomen handeln. Zwei der *snf7*-Mutanten co-lokalisieren mit Pep12. Dies deutet darauf hin, dass in diesen Mutanten entweder der Zusammenbau des ESCRTIII-Komplexes oder seine Lokalisation gestört ist.

Wie Snf7 an Membranen bindet ist nicht bekannt. Die Membranassoziation von Snf7 scheint durch die Interaktion mit Vps20, das am N-Terminus myristoyliert ist, stabilisiert zu werden (Ashrafi *et al.*, 1998). Jedoch bindet Snf7 auch ohne Vps20 an Membranen. Betrachtet man mVps24, das Säugerhomolog von Vps24, so bindet dieses an Phosphatidyl-Inositol 3, 5-Bisphosphat [PI(3,5)P<sub>2</sub>] haltige Membranen (Whitley *et al.*, 2003). Da die Membranen später Endosomen gehäuft diese Phosphoinositide enthalten, könnte Snf7 auf eine ähnliche Weise direkt über [PI(3,5)P<sub>2</sub>] an endosomale Membranen binden. Hierbei könnte die N-terminale Region von Snf7 eine Rolle spielen, da sie auffällig viele positiv geladene Aminosäuren enthält. Diese Annahme über die Bindung von Snf7 an Membranen wird unterstützt durch die Snf7 K69, 70, 71E Mutante, die in dieser Arbeit konstruiert wurde. Diese Mutante zeigt eine stark reduzierte Membranassoziation.

### 4.2 Die Funktion von Snf7 im Zellkern

Die Expression des für Invertase kodierenden Gens *SUC2* wird durch hohe Glukosekonzentrationen reprimiert. Da Snf7 anscheinend für die volle Derepression von *SUC2* nach einem Shift auf niedrige Glukosekonzentrationen benötigt wird, stellt sich die Frage, wie Snf7 die Invertaseexpression beeinflusst. Die Northernblot-Experimente zeigen, dass Snf7 Einfluss auf die *SUC2* Transkription nimmt. Dies spricht für eine Beteiligung von Snf7 an Prozessen, die am *SUC2*-Promotor stattfinden und so zur *SUC2* Transkription führen. Andererseits könnte Snf7 in das Glukosesignaling eingreifen. Jedoch zeigten die Experimente, dass das Glukosesignaling durch den Verlust der Snf7 Funktion nicht beeinträchtigt ist. Unter glukoselimitierenden Bedingungen wird der Mig1 Repressor, der die *SUC2*-Expression unter hohen Glukosebedingungen reprimiert, durch Phosphorylierung inaktiviert (Treitel *et al.*, 1998). Die Mig1 Phosphorylierung erfolgt aber in der  $\Delta snf7$ -Mutante ganz normal. Deshalb scheint Snf7 in Prozesse am *SUC2* Promotor

einzugreifen, die erst nach der Mig1-Inaktivierung ablaufen. Zusätzlich zur Mig1 Repression wird die *SUC2* Expression durch die Chromatinstruktur am *SUC2* Promotor kontrolliert. Bei der Derepression von *SUC2* wird die Chromatinstruktur durch den Swi-Snf Chromatinremodeling Komplex so verändert, dass die *SUC2* TATA und UAS Regionen der Transkriptionsmaschinerie zugänglich gemacht werden (Hirschhorn *et al.*, 1992). Ein anderer Faktor, der noch zur *SUC2* Expression beiträgt, ist die Acetylierung von Histonen am *SUC2* Promotor durch den SAGA- (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase) Komplex (Pollar und Peterson, 1997). Deshalb ist Snf7 möglicherweise an einem dieser Ereignisse beteiligt. Unterstützt wird diese Annahme durch Beobachtungen, die mit dem Did2 Säugerhomolog, CHMP1 (chromatin modifying protein, charged multivesicular body protein) (Stauffer *et al.*, 2001) gemacht wurden. Dieses Protein wurde als Two-Hybrid Bindungspartner des Polycomblike (Pcl) Proteins identifiziert. Pcl gehört zur Polycombgruppe (PcG) von Proteinen, die zuerst in *Drosophila* entdeckt worden sind. Sie werden für die Aufrechterhaltung des „Gene silencing“ während der *Drosophila*-Entwicklung benötigt. Dieses „PcG-silencing“ wird wahrscheinlich durch Veränderungen in der Chromatinstruktur bewirkt (Shao, *et al.*, 1999). Da die Überexpression von CHMP1 zu einer Kondensation des Chromatins in Interphasekernen führt, die zudem begleitet ist von starken Effekten auf den Zellzyklusverlauf, ist eine allgemeine Funktion der Snf7-Homologen in der Regulation der Chromatinstruktur denkbar.

CHMP1 scheint in den Zellkern zu wandern. Auch mVps24 konnte im Zellkern nachgewiesen werden (Whitley *et al.*, 2003). Deshalb könnten die Säuger Snf-Homologen ihre nicht-endosomale Funktion direkt im Zellkern ausüben. In dieser Arbeit wurden Zellkerne aufgereinigt, jedoch war es nicht möglich, das Hefe Snf7 Protein in den Zellkernfraktionen nachzuweisen. Eine Erklärung wäre, dass das zytoplasmatische Snf7 an der Bildung eines Signals beteiligt ist, das direkt zum Zellkern weitergeleitet wird. Diese Überlegung wird unterstützt durch Ergebnisse, die bei der Untersuchung des „Rim-Weges“ entstanden sind. Die Komponenten des Rim-Weges sind an der transkriptionellen Antwort auf einen basischen pH beteiligt. Ferner sind sie an der Regulierung des invasiven Wachstums beteiligt. Die Aktivierung dieses Weges bewirkt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Rim101 durch eine proteolytische Spaltung. Diese Spaltung ist Snf7 abhängig (Xu *et al.*, 2004). Für Snf7 wird vorgeschlagen, dass es zusammen mit seinem Bindungspartner Rim20 ein Gerüst bildet, das die Protease Rim13 in unmittelbare Nähe des

Substrates RIM101 bringt (Xu und Mitchell, 2001). Diese Daten sprechen mehr dafür, dass diese Spaltung an Endosomen stattfindet, da sie von der gesamten ESCRT Proteinkollektion abhängig ist, die benötigt wird, um einen „core ESCRT-Komplex“ zu bilden (Xu *et al.*, 2004).

Es gibt noch weitere Beispiele in denen Endosomen mit der Signaltransduktion im Zellkern in Zusammenhang gebracht werden. Für die kleine GTPase Rab5, die eine regulatorische Schlüsselrolle in der Endozytose spielt, wurde gezeigt, dass sie an der Übertragung eines Signals zum Zellkern beteiligt ist (Miaczynska *et al.*, 2004). Extrazelluläre Signale bewirken, dass die Rab5 Effektoren APPL1 und APPL2 zum Zellkern wandern, wo sie mit dem Nukleosomen Remodeling und Histondeacetylase-Komplex NuRD/MeCP1 interagieren. Entsprechend könnten die Endosomen als Sensoren fungieren, die eine globale transkriptionelle Antwort auf Änderungen in der Umgebung bewirken, indem sie die Chromatinstruktur verschiedener Gene verändern.

### **4.3 Charakterisierung des Snf7-Interaktionspartners Ygr122w**

In einem Massen-Two-Hybrid-Screen wurde Ygr122w als Interaktionspartner von Snf7 identifiziert (Ito *et al.*, 2001). Diese Interaktion konnte in dieser Arbeit sowohl in einem Two-Hybrid-Experiment als auch in einer Co-Immunopräzipitation bestätigt werden. Eine Phänotypanalyse auf Medium mit Raffinose als einziger Kohlenstoffquelle zeigte, dass die  $\Delta ygr122w$ -Mutante wie die  $\Delta snf7$ -Mutante den *snf*-Phänotyp zeigt. Jedoch zeigt die  $\Delta ygr122w$ -Mutante keine Temperatursensitivität bei 37°C. Für eine nicht-endosomale Funktion spricht das CPY-Sorting der  $\Delta ygr122w$ -Mutante. Im Gegensatz zu den endosomalen Proteinen, die durch *BRO1*, *VPS20* und *SNF7* kodiert sind, führt eine Deletion von *YGR122W* nicht zu einer Mislokalisierung der Carboxypeptidase Y. Wie könnte die Funktion von Ygr122w mit der nicht-endosomalen Funktion von Snf7 zusammenhängen? Da Snf7 wahrscheinlich Einfluss auf Prozesse nimmt, die im Zellkern ablaufen, das Protein selbst aber dort nicht nachgewiesen werden kann, muss Snf7 an der Bildung eines Signals beteiligt sein, das zum Zellkern weitergeleitet wird. Ygr122w könnte somit an der Bildung oder Weiterleitung dieses Signals beteiligt sein. Oder Ygr122w könnte

## Diskussion

---

dafür sorgen, dass das zytoplasmatische Snf7 nicht an Membranen binden kann. Die Bindung von Ygr122w an Snf7 könnte die Bindestelle am N-Terminus, die für die endosomale Funktion wichtig ist, blockieren, so dass Snf7 nicht für endosomale Funktionen zur Verfügung steht, da eine Bindung von Vps20 an Snf7 nicht mehr möglich ist. Auf diese Weise wäre der zytoplasmatische Anteil des Snf7 Proteins funktional klar von dem membranassoziierten Anteil getrennt.

Untersuchungen der Membranassoziation von Ygr122w zeigten keinen Unterschied in der Verteilung des Proteins zwischen WT und  $\Delta snf7$ -Stamm. In beiden Fällen war das Protein gleichmäßig verteilt. Jeweils 50% des Proteins lagen löslich vor und 50% waren mit Membranen assoziiert. Es stellt sich die Frage an welche Membranen Ygr122w bindet. Die unterschiedliche Detergenz-Löslichkeit von Ygr122w-haltigen und endosomalen Membranen deutet darauf hin, dass Ygr122w nicht an Endosomen lokalisiert ist. Aufschluss über die intrazelluläre Lokalisation könnte ein Interaktionspartner von Ygr122w geben, der ebenfalls in einem genomweiten Two-Hybrid-Screen entdeckt worden ist. Es handelt sich dabei um das Protein Atp14 (Ito *et al.*, 2001), einer Untereinheit der Hefe ATP Synthase, die für die Synthese von ATP aus ADP und  $P_i$  in Mitochondrien verantwortlich ist. Die ATP Synthase ist in die innere Mitochondrienmembran eingebettet. Worin könnte der Zusammenhang zwischen Ygr122w, den Mitochondrien und Snf7 bestehen? Ygr122w könnte als Signalmolekül dienen, das zwischen Endosomen und Mitochondrien hin- und herwandert. Ein solcher Signalprozess könnte im Zusammenhang mit einem Stoffaustausch zwischen Endosomen und Mitochondrien stehen. In Säugererythrozyten konnte gezeigt werden, dass ein Transport von Eisen von Endosomen zu Mitochondrien stattfindet, indem es zu einer transienten Interaktion zwischen diesen beiden Organellen kommt (Zhang *et al.*, 2005). Aus Endosomen freigesetztes Eisen muss sowohl die äußere als auch die innere Mitochondrienmembran durchqueren, um die Ferrochelatase zu erreichen, die  $Fe^{2+}$ -Ionen in das erythropoetisch gebildete Protoporphyrin IX einbaut und damit Häm bildet. Entsprechend könnten auch in Hefen Ionen über Endosomen in die Mitochondrien transportiert werden. Weitere Hinweise auf eine Interaktion zwischen Endosomen und Mitochondrien liefern Two-Hybrid Daten: Sowohl die ESCRT-Komponente Vps25 (ESCRT II), als auch Vps2 (ESCRTIII) interagieren wie Ygr122w mit dem mitochondriellen Protein Atp14 (Ito *et al.*, 2001).

## Diskussion

---

Endosomen scheinen viele Aufgaben in der Zelle zu besitzen. Sie regulieren den Transport und Abbau von Oberflächenproteinen, sie transportieren Proteine des biosynthetischen Weges zur Vakuole, endosomale Proteine regulieren transkriptionelle Prozesse und anscheinend transportieren sie Ionen zu den Mitochondrien. Dies zeigt, dass Endosomen an vielen Prozessen in der Zelle beteiligt sind und es sich bei ihnen wahrscheinlich um eine zentrale Einheit in der Zelle handelt, die regulierend in viele Bereiche der Zelle eingreift.

---

## 5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion des endosomalen Proteins Snf7 („sucrose-non-fermenting“) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Snf7 ist Bestandteil des ESCRT-III Komplexes, der an späten Endosomen zusammen mit ESCRT-I und -II für die Rekrutierung und den Transport von Oberflächenproteinen zur Vakuole verantwortlich ist. ESCRT-III besteht aus den beiden heterodimeren Subkomplexen Snf7 (Vps32)/Vps20 und Vps24/Did4 (Vps2). Zwei weitere Proteine, Mos10 (Vps60) und Did2 (Vps 46), scheinen eine Funktion an Endosomen zu haben, konnten bisher aber keinem Komplex zugeordnet werden. Sequenzvergleiche zeigen, dass Snf7, Vps20, Vps24, Did4, Mos10 und Did2 zu einer gemeinsamen Proteinfamilie gehören, der Snf7-Familie. Diese Proteine besitzen Bereiche mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der „coiled-coil“ Bildung, einer Struktur aus  $\alpha$ -Helices. Ihre Deletionsmutanten zeigten in einer Wachstums-Analyse unterschiedliche Phänotypen ( $\Delta snf7$ -Mutanten sind z. B. nicht in der Lage auf Medien mit Raffinose als einziger Kohlenstoffquelle zu wachsen (*snf*-Phänotyp)), was vermuten lässt, dass die Proteine, neben ihrer endosomalen Funktion möglicherweise noch andere, nicht-endosomale Funktionen ausüben. In einem Screen wurden deshalb *snf7*-Mutanten isoliert, deren endosomale Funktion defekt war (Stabilisierung des  $\alpha$ -Faktortransporters Ste6), die aber gleichzeitig eine intakte nicht-endosomale Funktion zeigten (Wachstum auf Raffinose), was dafür spricht, dass Snf7 mehrere unterschiedliche Funktionen in der Zelle hat. Untersuchungen dieser Mutanten zeigten eine Häufung der Mutationen im N-terminalen Bereich von Snf7. In Two-Hybrid-Experimenten und Co-Immunopräzipitationen konnte gezeigt werden, dass das endosomale Protein Vps20 im N-terminalen Bereich von Snf7 bindet, andere Bindungspartner von Snf7 aber in der C-terminalen Region binden, in der nur wenige Mutationen zu finden waren. Der N-terminale Bereich von Snf7 scheint somit für die endosomale Funktion des Proteins zuständig zu sein, während der C-terminale Bereich für die nicht-endosomale Funktion zuständig ist. Eine Analyse der nicht-endosomalen Funktion zeigte, dass Snf7 Prozesse im Zellkern beeinflusst. Der Einfluss von Snf7 auf die *SUC2*-Transkription konnte durch Northernblotting nachgewiesen werden, es scheint daher an der Generierung eines Signals im Zytoplasma beteiligt zu sein, das Prozesse im Zellkern steuert.

---

## 6 Literaturverzeichnis

**Amerik, A. Y., Nowak, J., Swaminathan, S. und Hochstrasser, M. (2000)** The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways. *Mol Biol Cell*, **11**, 3365-3380.

**Ashrafi, K. Farazi, T. A. und Gordon, J. I. (1998)** A role for *Saccharomyces cerevisiae* fatty acid activation protein 4 in regulating protein N-myristoylation during entry into stationary phase. *J Biol Chem*, **273**, 25864-25874.

**Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T. und Emr, S. D. (2002a)** ESCRT-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Dev Cell*, **3**, 271-282.

**Babst, M., Katzmann, D. J., Snyder, W. B., Wendland, B. und Emr, S. D. (2002b)** Endosome-associated Complex, ESCRTII, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Dev Cell*, **3**, 283-289.

**Babst, M., Wendland, B., Estepa, E. J. und Emr, S. D. (1998)** The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J*, **17**, 2982-2993.

**Banta, L. M., Robinson, J. S., Klionsky, D. J. und Emr, S. D. (1988)** Oragnelle assembly in yeast: characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis and protein sorting. *J Cell Biol*, **107**, 1369-83.

**Berkower, C., Loayza, D. und Michaelis, S. (1994)** Metabolic instability and constitutive endocytosis of *STE6*, the  $\alpha$ -factor transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **5**, 1185-1198.

**Burke, P., Schooler, K. und Wiley, H. S. (2001)** Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Mol Biol Cell*, **12**, 1897-1910.

**Celenza, J. L., Eng, F. J. und Carlson, M. (1989)** Molecular analysis of the *SNF4* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the *SNF4* protein with the *SNF1* protein kinase. *Mol Cell Biol*, **9**, 5045-5054.

**Celenza, J. L. und Carlson, M. (1986)** A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science*, **233**, 1175-1180.

**Chvatchko, Y., Howald, I. und Riezman, H. (1986)** Two yeast mutants defective in endocytosis are defective in pheromone response. *Cell*, **46**, 355-64.

**Conibear, E. und Stevens, T. H. (1995)** Vacuolar biogenesis in yeast: sorting out the sorting proteins. *Cell*, **83**, 513-516.

**Cosson, P. und Letourneur, F. (1997)** Coatomer (CPOI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 484-7.

- Coté, J., Quinn, J., Workman, J. L. und Peterson, C. L. (1994)** Stimulation of GAL4 derivative binding to nucleosomal DNA by the yeast *SNF/SWI* complex. *Science*, **265**, 53-60.
- Davis, N. G., Horecka, J. L. und Sprague, G. F., Jr. (1993)** Cis- and trans-acting functions required for endocytosis of the yeast pheromone receptors. *J Cell Biol*, **122**, 53-65.
- Felder, S., Miller, K., Moehren, G., Ullrich, A., Schlessinger, J. und Hopkins, C. R. (1990)** Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body. *Cell*, **61**, 623-634.
- Fields, S. und Song, O.-K. (1989)** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, **340**, 245-246.
- Gavin, A. C., Bosche, M. Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A, Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M. et al. (2002)** Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, **415**, 141-147.
- Garrus, J. E., von Schwedler, U. K., Pomillos, O. W., Morham, S. G., Zavitz, K. H., Wang, H. E., Wettstein, D. A., Stray, K. M., Cote, M., Rich, R. L., et al. (2001)** Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell*, **107**, 55-65.
- Gruenberg, J. und Maxfield, F. (1995)** Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 552-563.
- Harsay, E. und Bretscher, A. (1995)** Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J Cell Biol*, **131**, 297-310
- Hirschhorn, J. N., Brown, S. A., Clark, C. D. und Winston, F. (1992)** Evidence that *SNF2/SWI2* and *SNF5* activate transcription in yeast by altering chromatin structure. *Genes Dev*, **6**, 2288-2298.
- Horazadovsky, B. F., De Wald, D. B. und Emr. S. D. (1995)** Protein transport to the yeast vacuole. *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 544-551.
- Horazadovsky, B. F., Busch, G. R. und Emr, S. D. (1994)** *VPS21* encodes a rab5-like GTP binding protein that is required for the sorting of yeast vacuolar proteins. *EMBO J*, **77**, 579-586.
- Howard, T. L., Stauffer, D. R., Degin, C. R. und Hollenberg, S. M. (2001)** *CHMP1* functions as a member of a newly defined family of vesicle trafficking proteins. *J Cell Sci*, **114**, 2395-404.
- 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 Sci USA*, **98**, 4569-4574.
- Jeffrey, C. J. (1999)** Moonlighting proteins. *Trends Biochem Scie*, **24**, 8-11.

- Jenness, D. D. und Spatrick, P. (1986)** Down regulation of the alpha-factor pheromone receptor in *S. cerevisiae*. *Cell*, **46**, 345-53.
- Katho, K., Shibata, H., Suzuki, H., Nara, A., Ishidoh, K., Kominami, E., Yoshimori, T und Maki, M. (2003)** The ALG2-interacting protein ALIX associates with CHMP4b, a human homologue of yeast Snf7 that is involved in multivesicular body sorting. *J Biol Chem*, **278**, 39104-39113.
- Katzmann, D. J., Babst, M. und Emr, S. D. (2001)** Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, **106**, 145-155.
- 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**, 3261-71.
- Kölling, R. und Losko, S. (1997)** The linker region of the ABC-transporter Ste6 mediates ubiquitination and fast turnover of the protein. *EMBO* **16**, 2251-61.
- Kranz, A., Kinner, A. und Kölling, R. (2001)** A family of small coiled-coil-forming proteins functioning at the late endosome in Yeast. *Mol Biol Cell*, **12**, 711-723.
- Kuchler, K., Sterne, R. E. und Thorner, J. (1989)** *Saccharomyces cerevisiae* STE6 gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *EMBO J.*, **8**, 3937-3984.
- Laemmli, U. K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamb, T. M. und Mitchell, A. P. (2003)** The transcriptionfactor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **23**, 677-686.
- Li, W. und Mitchell, A. P. (1997)** Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics*, **145**, 63-73.
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. und Pringle, J. R. (1998)**. Additional modules for versatile and economical PC-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 953-961.
- Lupas, A. (1996)** Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol*, **266**, 513-525.
- Luthala, N. und Odorizzi, G. (2004)** Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J Cell Biol*, **166**, 717-729.
- Maniatis, T., Fritsch, E und Sambrook, J. (1982)** *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.

- Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Faure, J., Blanc, N. S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R., Parton, R. G., Vilbois, F. und Gruenberg, J. (2004)** Role of LBPA and ALIX in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science*, **303**, 531-534.
- Mayer, A., Wickner, W. und Haas, A. (1996)** Sec18p (NSF)-driven release of Sec17p (alpha-SNAP) can precede docking and fusion of yeast vacuoles. *Cell*, **85**, 83-94.
- McGrath, J. P. und Varshavsky, A. (1989)** The yeast *STE6* gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature*, **340**, 400-404.
- Miaczynska, M., Christoforidis, S., Giner, A., Shevchenko, A., Uttenweiler-Joseph, S., Habermann, B., Wilm, M., Parton, R. G. und Zerial, M. (2004)** APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell*, **116**, 445-456.
- Nehlin, J. O. und Ronne, H. (1990)** Yeast *MIG1* repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. *EMBO J*, **9**, 2891-2898.
- 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. (1979)** Secretion and cell surface growth are blocked in a temperature sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Scie USA*, **76**, 1858-1862.
- Odorizzi, G., Katzmann, D. J., Babst, M., Audhya, A. und Emr, S. D. (2003)** Bro1 is an endosome-associated protein that functions in the MVB pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, **116**, 1893-1903.
- Pan, X., Roberts, P., Chen, Y., Kvam, E., Shulga, N., Huang, K., Lemmon, S. und Goldfarb, D. S. (2000)** Nucleus-vacuolar junctions in *Saccharomyces cerevisiae* are formed through the direct interaction of Vac8p with Nvj1p. *Mol Biol Cell*, **11**, 2445-57.
- Piper, R. C., Bryant, N. J. und Stevens, T. H. (1997)** The membrane protein alkaline phosphatase is delivered to the vacuole by a route that is distinct from the VPS-dependent pathway. *J Cell Biol*, **138**, 531-45.
- Pishvaei, B. und Payne, G. S. (1998)** Clathrin coats-threads laid bare. *Cell*, **95**, 443-6.
- Pollard, K. J. und Peterson, C. L. (1997)** Role for *ADA/GCN5* products in antagonizing chromatin-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, **17**, 6212-6222.
- Preyer, N. K., Wuestehube, L. J. und Schekman, R. (1992)** Vesicle-mediated protein sorting. *Annu Rev Biochem*, **61**, 471-516.

**Prinlge, J. R., Preston, R. A., Adams, A. E. M., Stearns, T., Drubin, D. G., Haarer, B. K. und Jones, E. W. (1989).** Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol*, **31**, 357-434.

**Raymond, C. K., Howald-Stevenson, I., Vater, C. A. und Stevens, T. H. (1992a)** Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E *vps* mutants. *Mol Biol Cell*, **3**, 1389-402.

**Riezman, H. (1985)** Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis. *Cell*, **40**, 1001-1009.

**Roberts, P., Moshitch-Moshkovitz, S., Kvam, E., O'Toole, E., Winey, M. und Goldfarb, D. S. (2003)** Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **14**, 129-141.

**Robzyk, K. und Kassir, Y. (1992)** A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res*, **20**, 3790.

**Rothman, J. H., Howald, I. und Stevens, T. H. (1989)** Characterization of genes required for protein sorting and vacuolar function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

**Schekman, R. und Orci, L. (1996)** Coat proteins and vesicle budding. *Science*, **271**, 1526-33.

**Schmid, S. L. (1997)** Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Annu Rev Biochem*, **66**, 511-48.

**Schmitz, H.-P., Lorberg, A. und Heinisch, J. J. (2002).** Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its amino-terminal HR1 domain. *Mol Microbiol*, **44**, 829-840.

**Schüller, H.-J. und Entian, K.-D. (1987)** Molecular characterization of yeast regulatory gene *CAT3* necessary for glucose derepression and nuclear localization of its product. *Gene*, **67**, 247-257.

**Scott, S. V., Baba, M., Ohsumi, Y. und Klionsky, D. J. (1997)** Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism. *J Cell Biol*, **138**, 37-44.

**Seaman, M. N., McCaffery, J. M. und Emr, S. D. (1998)** A membrane coat complex essential for endosome-to-golgi retrograde transport in yeast. *J Cell Biol*, **142**, 665-681.

**Shao, Z., Raible, F., Mollaaghababa, R., Guyon, J. R., Wu, C. T., Wender, W. und Kingston, R. E. (1999)** Stabilization of chromatin structure by PRC1, a polycomb complex. *Cell*, **98**, 37-46.

**Singer-Kruger, B., Stenmark, H., Dusterhoft, A., Philippsen, P., Yoo, J. S., Gallwitz, D. und Zerial, M. (1994)** Role of three rab5-like GTPases, Ypt51p, Ypt52p and Ypt53p, in the endocytic and vacuolar protein sorting pathways of yeast. *J Cell Biol*, **125**, 283-298.

**Söllner, T. (1995)** SNAREs and targeted membrane fusion. *FEBS Lett*, **369**, 80-3.

**Stauffer, D. R., Howard, T. L., Nyun, T. und Hollenberg, S. M. (2001)** CHMP1 is a novel nuclear matrix protein affecting chromatin structure and cell-cycle progression. *J Cell Sci*, **11**, 2383-2393.

**Stevens, T., Esmon, B. und Schekman, R. (1982)** Early stages in the yeast secretory pathway are required for transport of carboxypeptidase Y to the vacuole. *Cell*, **30**, 439-48.

**Treich, I., Cairns, B. R., de los Santos, T., Brewster, E. und Carlson, M. (1995)** *SNF11*, a new component of the yeast *SNF-SWI* complex that interacts with a conserved region of *SNF2*. *Mol Cell Biol*, **15**, 4240-4248.

**Treitel, M. A., Kuchin, S. und Carlson, M. (1998)** Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **18**, 6273-6280.

**Vallier, L. G. und Carlson, M. (1991)** New Snf genes, *GAL11* and *GRR1* affect *SUC2* expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **129**, 675-684.

**Vida, T. A., Huyer, G. und Emr, S. D. (1993)** Yeast vacuolar proenzymes are sorted in the late golgi complex and transported to the vacuole via a prevacuolar endosome-like compartment. *J Cell Biol*, **121**, 1245-1256.

**Whitley, P., Reaves, B. J., Hashimoto, M., Riley, A. M., Potter, B. V. und Holman, G. D. (2003)** Identification of mammalian Vps24p as an effector of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate-dependent endosome compartmentalization. *J Biol Chem*, **278**, 38786-38795.

**Woodman, P. G. (1997)** The roles of NSF, SNAPs and SNAREs during membrane fusion. *Biochem Biophys Acta*, **1357**, 155-72.

**Xu, W., Smith, F. J., Subaran, R. und Mitchell, A. P. (2004)** Multivesicular body ESCRT components function in pH response regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Mol Biol Cell*, **15**, 5528-5537.

**Xu, W. und Mitchell, A. P. (2001)** Yeast PalA/AIPI/Alix homologue Rim20 associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J Bacteriol*, **183**, 6917-6923.

**Zhang, A. S., Sheftel, A. D. und Ponka, P. (2005)** Intracellular kinetics of iron in reticulocytes: evidence for endosome involvement in iron targeting to mitochondria. *Blood*, **105**, 368-375.

---

## 7 Abkürzungsverzeichnis

<sup>35</sup> S	radioaktives Schwefelisotop
A, mA	Ampère, Milliampère
ABC	"ATP-Binding-Cassette"
ACT	Actin
AD	Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
AK	Antikörper
ALIX/AIP	„ALG-2-interacting protein X“
ALP	"alkaline phosphatase"
API	Aminopeptidase I
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ARS	Autonom replizierende Sequenz
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BD	Bindedomäne
bp	Basenpaare
BRO	"BCK1-like Resistance to Osmotic shock"
BSA	"bovine serum albumin"
°C	Grad Celsius
CAS	"Casamino acids"
CCD	"charge-coupled device"
CEN	Zentromersequenz
CHMP	"chromatin modifying protein, charged multivesicular body protein"
Ci	Curie
CIP	"calf-intestine-phosphatase"
CPY	Carboxypeptidase Y
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
CVT	"cytoplasm-to-vacuole-targeting"
DAPI	4,6-diamidino-2-phenylindole
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DID	"Doa4-independent degradation"
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DPM	"Dolichol Phosphate Mannose synthase"
DTAF	Dichlorotriazinylamino-Fluorescein
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
EE	"early endosomes"
EGF	"epidermal growth factor"
EGTA	Ethylenglykolbis (β-aminoethylether) N, N, N', N'-Tetraacetat
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	"endosomal sorting complex required for transport"
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
GAL	Galaktose
gm, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
GTP	Guanintriphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfon Säure

## Abkürzungsverzeichnis

---

His	Histidin
HIV	"human immunodeficiency virus"
HOPS	"homotypic fusion and vacuole protein sorting"
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K-Acetat	Kaliumacetat
LAS	"Luminescence imaging"
Leu	Leucin
Li-Acetat	Lithiumacetat
Lys	Lysin
M, mM, μM	Molar, Millimolar, Mikromolar
MIG	"Multicopy Inhibitor of GAL gene expression"
min	Minuten
ml, μl	Milliliter, Mikroliter
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MOS	"more of Ste6"
MVB	"multi vesicular body"
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
NVJs	"nuclear-vacuolar junctions"
OD600	optische Dichte bei 600 nm
ORF	"open reading frame"
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	"Phosphate-Buffered Saline"
PcG	Poylcombgruppe
Pcl	"Polycomblike"
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEP	"carboxyPEPTidase Y-deficient"
PFK	Phosphofruktokinase
PGK	Phosphoglycerat Kinase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PI(3,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidyl-Inositol 3,5-Bisphosphat
PM	Plasmamembran
PMA	"Plasma Membrane ATPase"
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVC	"prevacuolar compartment"
RIM	"Regulator of IME2"
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SAGA	Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase
sek	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SM	synthetisches Minimalmedium
SNF	"sucrose-non-fermenting"
SSB	"single-strand-binding protein"
STE	"sterile"
SUC	"Sucrose fermentation"
TCA	Trichloroacetic acid

## Abkürzungsverzeichnis

---

TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
Trp	Tryptophan
ts	temperatursensitiv
TSG	"tumor susceptibility gene"
TX-100	Triton-X-100
U	Einheit der Enzymaktivität
Ura	Uracil
UV	ultraviolette Strahlung
V	Volt
VAM	"vacuole morphology mutants"
VPS	"vacuolar-protein-sorting"
WT	Wildtyp
YEPD	"Yeast extract-Pepton-Dextrose"- Vollmedium
YNB	"yeast nitrogen base"
z. B.	zum Beispiel

Nukleotide und Aminosäuren sind mit dem Ein-Buchstaben-Code (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature) abgekürzt.

---

## Danksagungen

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Ralf Kölling für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die sehr gute Betreuung bedanken. Es war ein Vergnügen mit ihm über Wissenschaft und den Sinn des Lebens zu diskutieren.

Herrn Prof. Dr. Rolf Wagner danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Den derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Kölling Tamara Krsmanović, Agnes Pawelec, Karin Krapka, Andrea Kinner, Tobias Sydor, Carolin Schmitz und Frau Pia Damniz danke ich für die schöne Zeit und die gute Zusammenarbeit.

Besonders möchte ich mich bei Tamara dafür bedanken, dass sie mir im Labor manches Mal aus der Patsche geholfen und meine Launen geduldig ertragen hat. Wir waren ein super Team, was ich sehr vermissen werde.

Ich möchte mich auch bei Andreas Kranz, Ulli Kleinhans und Jens Klabunde (AG Kölling mittagessen associated members) bedanken - bei Andreas für die netten „Foto“-Gespräche, bei Ulli für die vielen netten Teegespräche und die prompte Hilfe bei jeglichen Problemen und bei Jens für's „Telleraufessen“.

Bei allen Mitarbeitern des Institutes bedanke ich mich für die nette Zusammenarbeit und für die vielen schönen gemeinschaftlichen Aktivitäten außerhalb des Labors.

Thorsten Pieh danke ich dafür, dass er den „Zickenalarm“ der letzten Monate/Jahre ohne Murren ertragen hat. Ich gelobe Besserung und verspreche, bald auch mal „richtig“ arbeiten zu gehen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Barbara und Reginald Pieh für ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung. Sie waren immer für mich da und haben mir den Rücken freigehalten. Danke nochmal für das leckere „Essen auf Rädern“ und das tapfere Korrekturlesen dieser Arbeit.

---

Eidesstattliche Erklärung

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

Stefanie Huppert

Düsseldorf, den 27.4.05

---