

Untersuchungen zur
Autophagocytose in der Hefe
Saccharomyces cerevisiae.
Proteinwechselwirkungen,
Klonierung und
Charakterisierung des *SAI1*-Gens

von der Fakultät Chemie der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von
Daniela Bernreuther

Hauptberichter: Priv.-Doz. Dr. M. Thumm
Mitberichter: Prof. Dr. D. H. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 16. August 2002

Institut für Biochemie
der Universität Stuttgart
2002

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Mutter, die mich während meiner gesamten Ausbildungszeit finanziell und moralisch unterstützt hat.

Herrn Prof. Dr. Dieter H. Wolf danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas. Herrn Priv.-Doz. Dr. Michael Thumm danke ich für die Unterstützung bei dessen Bearbeitung, für zahlreiche Diskussionen und Anregungen, sowie für die Möglichkeit selbständig wissenschaftlich zu arbeiten.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei allen Institutsmitgliedern bedanken. Vor allem die anregenden Diskussionen und gegenseitigen Hilfeleistungen von Peter Deak, Ulrike Epple, Frank Josupeit, Steffen Reiche und Katja Sovarasteanu haben hierzu beigetragen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Mann Martin, der mich nicht nur in technischen Angelegenheiten bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt hat, sondern auch durch die Mithilfe bei der Betreuung unseres Sohnes Kai während meiner Promotionszeit.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als eukaryontischer Modellorganismus	1
1.2	Transportprozesse in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
1.2.1	Protein-Sortierung	2
1.2.2	Vesikeltransportprozesse in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3
1.2.2.1	Sekretion	3
1.2.2.2	Endocytose	3
1.2.2.3	Vakuoläre Biogenese	4
1.2.2.4	Amino-peptidase I Transport	5
1.3	Proteolyse in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
1.3.1	Selektive Proteolyse (cytosolisch)	6
1.3.2	Unselektive Proteolyse (lysosomal)	8
1.4	Autophagocytose	10
1.4.1	Aut1p/Apg3p	12
1.4.2	Apg1p/Aut3p	12
1.4.3	Aut2p/Apg4p	12
1.4.4	Aut4p	13
1.4.5	Cvt17p/Aut5p	13
1.4.6	Aut7p/Cvt5p/Apg8p	13
1.4.7	Apg9p/Aut9p/Cvt7p	14
1.4.8	Apg2p	14
1.4.9	Apg1p/Aut3p Kinase-Komplex	15
1.4.10	Phosphatidylinositol-3 Kinase Komplex	16
1.4.11	Ubiquitinähnliche Proteinsysteme	16
1.5	Protein-Protein Wechselwirkungen	17
1.5.1	Chemische Methoden	18
1.5.1.1	Cross-Linking	18

1.5.2	Biochemische Methoden	19
1.5.2.1	Affinitätschromatographie	19
1.5.2.2	Affinitätsblotting	20
1.5.2.3	Immunpräzipitation	21
1.5.3	Molekularbiologische Methoden	21
1.5.3.1	Protein-Sonden	21
1.5.3.2	Phagen-Display	21
1.5.3.3	Two-Hybrid System	22
1.5.4	Genetische Methoden	24
1.5.4.1	Extragene Suppressoren	24
1.5.4.2	Synthetisch-letaler Screen	24
1.6	Zellzyklus	25
1.6.1	Kontrolle des Zellzyklus	26
1.7	<i>Laccaria bicolor</i>	27
2	Themenstellung	29
3	Material und Methoden	30
3.1	Abkürzungsverzeichnis	30
3.2	Material	30
3.2.1	Chemikalien und Bezugsquellen	30
3.2.2	Antikörper	31
3.2.3	Medien	31
3.2.3.1	Medien für Hefekulturen	32
3.2.3.2	Medien für <i>E. coli</i>	32
3.3	Dauerkulturen	33
3.4	Wachstumsbedingungen	33
3.5	Stämme	33
3.5.1	<i>E. coli</i> Stämme	33
3.5.2	Hefestämme	33

3.6	Oligonukleotide	36
3.7	Vektoren, Plasmide und Genbanken	39
3.7.1	pRS315 und pRS425	39
3.7.1.1	pDB1 und pDB2	39
3.7.1.2	pDB3 und pDB4	39
3.7.1.3	pDB5 und pDB6	40
3.7.1.4	pRS426/ <i>AUT2</i>	40
3.7.2	pGAD-C1, pGAD-C2 und pGAD-C3	40
3.7.2.1	pDB10	40
3.7.2.2	pDB11	40
3.7.2.3	pDB12	40
3.7.2.4	pDB13	41
3.7.2.5	pDB14	41
3.7.2.6	pDB15	41
3.7.2.7	pDB19	41
3.7.2.8	pDB21	41
3.7.2.9	pDB22	41
3.7.2.10	pGAD-C3/ <i>AUT1</i>	41
3.7.2.11	pGAD-C1/ <i>AUT7</i>	41
3.7.2.12	pGAD-C1/ <i>TUB1</i> , pGAD-C1/ <i>TUB2</i> und pGAD-C1/ <i>TUB3</i>	41
3.7.3	pGBD-C1, pGBD-C2 und pGBD-C3	42
3.7.3.1	pDB20	42
3.7.3.2	pGBD-C1/ <i>TUB2</i>	42
3.7.3.3	pGBD-C1/ <i>TUB3</i>	42
3.7.4	pAS1-CYH2	42
3.7.4.1	pAS1-CYH2/ <i>AUT1</i>	42
3.7.4.2	pAS1-CYH2/ <i>AUT2</i>	43
3.7.4.3	pAS1-CYH2/ <i>AUT7</i>	43
3.7.4.4	pAS1-CYH2/ <i>AUT9</i>	43

3.7.5	pGEX-Vektoren	43
3.7.5.1	pDB9	43
3.7.5.2	pGEX-4T-3/ <i>AUT2</i>	43
3.7.5.3	pGEX-4T-3/ <i>AUT7</i>	43
3.7.5.4	pGEX-4T-3/ <i>VAM3</i>	43
3.7.6	pRN295 und pRN369	44
3.7.6.1	pDB7 und pDB8	44
3.7.6.2	pGFP-N/ <i>AUT2</i> und pGFP-C/ <i>AUT2</i>	44
3.7.6.3	pGFP-N/ <i>AUT7</i> und pGFP-C/ <i>AUT7</i>	44
3.7.6.4	pGFP-N/ <i>AUT9</i> und pGFP-C/ <i>AUT9</i>	44
3.7.7	pT7Blue	44
3.7.7.1	pF6.3	44
3.7.8	pBR401, pBR402 und pBR422	45
3.7.8.1	pDB16, pDB17 und pDB18	45
3.7.9	pUG6	45
3.7.10	p3XHA-HIS5	45
3.7.11	YL2H-Genbank	46
3.8	Molekularbiologische Methoden	46
3.8.1	Vorbehandlung von Glasperlen	46
3.8.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	46
3.8.3	Isolierung von Plasmid DNA aus Hefe (Plasmid-rescue)	47
3.8.4	Isolierung von RNA aus Hefe	47
3.8.5	Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe	47
3.8.6	Restriktionsverdau von DNA	48
3.8.7	Agarose-Gelelektrophorese	48
3.8.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	49
3.8.9	Ligation von DNA-Fragmenten	49
3.8.10	Transformation von <i>E. coli</i>	49
3.8.10.1	Herstellung kompetenter Zellen	49

3.8.10.2	Transformation durch Elektroporation	49
3.8.11	Transformation in Hefe	50
3.8.11.1	“Rapid”-Transformation für Plasmide	50
3.8.11.2	Transformation von DNA-Fragmenten ins Genom	50
3.8.11.3	Genbanktransformation	51
3.8.12	Polymerasekettenreaktion (PCR)	52
3.8.13	Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)	52
3.8.14	Southern Blot	53
3.8.14.1	Herstellung markierter Sonden	53
3.8.14.2	Transfer der DNA	54
3.8.14.3	Hybridisierung und Detektion	54
3.9	Zellbiologische und biochemische Methoden	54
3.9.1	Kreuzung haploider Hefestämme	54
3.9.2	Sporulation und Tetradendisektion	54
3.9.3	Bestimmung des Paarungstyps von <i>S. cerevisiae</i> (Matingtest)	55
3.9.4	Vesikeltest (Test auf Akkumulation autophagischer Vesikel)	55
3.9.5	Untersuchung auf Überlebensfähigkeit unter Hungerbedin- gungen	56
3.9.6	Kernfärbung lebender Hefezellen	56
3.9.7	Two Hybrid Screen	56
3.9.7.1	Genbanktransformation	56
3.9.7.2	β -Galactosidase-Filter-Test	56
3.9.7.3	β -Galactosidase-Flüssig-Test	57
3.9.7.4	Plasmidverlust	57
3.9.7.5	Test auf “falsch Positive”	58
3.10	Proteinchemische Methoden	58
3.10.1	Herstellung von Proteinrohextrakten	58
3.10.1.1	Aufschluß unter nativen Bedingungen	58
3.10.1.2	Denaturierende alkalische Lyse	58
3.10.2	Proteinbestimmung nach Bradford	59

3.10.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	59
3.10.4	Anfärbung von Proteinen auf SDS-Gelen	60
3.10.4.1	Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G 250	60
3.10.4.2	Silver Stain	60
3.10.5	Western Blot	61
3.10.6	Detektion von Proteinen auf Membranen	61
3.10.6.1	Anfärbung der Proteine mit Ponceau S	61
3.10.6.2	Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250	61
3.10.6.3	Immunologischer Nachweis von Proteinen	61
3.10.7	Isolierung und von GST-Fusionsproteinen	62
3.10.8	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	63
3.10.9	Affinitätschromatographie	63
3.10.10	Affinitätschromatographie mit Rindertubulin	63
3.10.11	Immunfluoreszenz	64
3.10.12	Immunpräzipitation	65
4	Ergebnisse	66
4.1	Das Aut7-Protein	66
4.1.1	Isolierung des Aut7p zur 3D-Strukturermittlung	66
4.1.2	<i>Laccaria bicolor</i>	66
4.1.2.1	Überleben bei Hungerung	68
4.1.2.2	Reifung der Aminopeptidase I	68
4.1.2.3	Akkumulierung autophagischer Vesikel in der Vakuole	69
4.2	Das Aut2-Protein	70
4.2.1	Überleben bei Hungerung	70
4.2.2	Herstellung polyklonaler Antikörper gegen das Aut2-Protein	71
4.2.3	Interaktionen des Aut2-Proteins	72
4.2.3.1	Interaktion des Aut2-Proteins mit dem Aut9-Protein	72
4.2.3.2	Interaktion des Aut2-Proteins mit dem Aut1-Protein	75

4.2.3.3	Interaktion des Aut2-Proteins mit dem Aut7-Protein	76
4.2.3.4	Two-Hybrid-Screen mit dem Aut2-Protein	76
4.3	Das Sai1-Protein	79
4.3.1	Two-Hybrid-Screen mit dem Aut9-Protein	79
4.3.2	Das Sai1-Protein	80
4.3.3	Two-Hybrid mit den Proteinen Aut1p, Aut2p, Aut7p und Aut9p	83
4.3.4	Die <i>sai1</i> Δ -Mutante	85
4.3.4.1	Überleben bei Hungerung	88
4.3.4.2	Reifung der Aminopeptidase I	88
4.3.4.3	Akkumulierung autophagischer Vesikel in der Va- kuole	89
4.3.4.4	Sporulation	89
4.3.4.5	Proteinabbaurate	90
4.3.5	Affinitätschromatographie mit dem GST-Sai1-Protein . . .	90
4.3.6	Das GFP-Sai1-Protein und das Sai1-GFP-Protein	93
4.3.7	Überexpression des Sai1-Proteins	100
4.3.8	Das Sai1-HA ₃ Protein	109
4.3.8.1	Hungerinduktion	111
4.3.8.2	Coimmunopräzipitation mit dem Sai1-HA ₃ -Protein	114
4.3.8.3	Immunfluoreszenz	116
4.3.9	Wachstum und Morphologie von <i>autx</i> Δ <i>sai1</i> Δ -Doppelmutanten	117
4.4	Das Sai2-Protein	118
4.4.1	Die <i>sai2</i> Δ -Mutante	120
4.4.2	Das Sai2-HA ₃ Protein	123
4.4.3	Überexpression des Sai2-Proteins	124
4.5	Interaktion des Vam3p mit Tubulin	125

5	Diskussion	128
5.1	Das Aut7-Protein	128
5.2	Das Aut2-Protein	130
5.3	Das Sai1-Protein	131
5.4	Das Sai2-Protein	136
5.5	Das Vam3-Protein	137
6	Zusammenfassung	138

1 Einleitung

1.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als eukaryontischer Modellorganismus

Die Bier- und Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist als Vertreter der Ascomyceten (Schlauchpilze) der bekannteste und am besten untersuchte einzellige Eukaryont. Sie besitzt alle wesentlichen Organellen höherer eukaryontischer Systeme, ist jedoch einfacher, schneller und kostengünstiger als diese zu untersuchen. Ihre durch Membranen abgegrenzten Kompartimente erfordern gleichfalls effiziente und kontrollierte Transport-, Sortierungs- und Regulationsmechanismen, die erstaunlich homolog zu denen in komplexen, mehrzelligen Organismen sind. So existieren in menschlichen Zellen hochkonservierte Gene (z.B. die *RAS*-Gene), die in der Lage sind Mutationen im Genom niederer Eukaryonten zu komplementieren. Ein Beispiel eines homologen Prozesses ist die Fusion sekretorischer Vesikel mit der Plasmamembran in Hefe mit der Fusion synaptischer Vesikel mit der Plasmamembran in Nervenzellen von Säugern (Ferro-Novick and Jahn [1994], Bennett and Scheller [1993]).

Die Hefe besitzt einen haplo-diplobiontischen Entwicklungszyklus, wobei sich sowohl die haploide Spore als auch die diploide Zygote durch Knospung (Mitose) vermehren kann. Durch die Verschmelzung zweier Sporen mit unterschiedlichem Geschlecht (Matingtype a und α) entsteht eine diploide Zygote, welche unter nährstoffreichen Bedingungen in diesem Zustand verbleibt und sich ebenfalls nur durch Mitose vermehrt. Unter Streßbedingungen (z. B. Stickstoffmangel und Fehlen einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle) bildet die Hefe durch Meiose vier Sporen, die im Ascus von einer Hülle umgeben sind. Die Gene der ursprünglich diploiden Zellen werden nach der Mendelschen Regeln voneinander unabhängig 2:2 verteilt (Herskowitz [1988]). Diese Fähigkeit der Hefe, kombiniert mit der Tetradenanalyse, ermöglicht es sogar die Vererbung von rezessiven Mutationen zu untersuchen. Für die Zellteilung benötigt sie weniger als zwei Stunden und ist somit für die schnelle Anzucht geeignet. Ihr Genom mit ca. $1,4 \cdot 10^7$ Basenpaaren und 6 000 Genen ist auf 16 Chromosomen verteilt, vollständig sequenziert (Goffeau et al. [1996], Hieter [1996]) und in Datenbanken zugänglich. Es ist mehr als 200 mal kleiner als das Genom eines Säugers (Stryer [1994]) und nur ca. viermal größer als das Genom von *E. coli* und kann so in einer genomischen Bibliothek von einigen tausend Plasmiden oder Phagen untergebracht werden. Das humane Genom besteht zum Vergleich aus ca. $3,5 \cdot 10^9$ Basenpaaren und müßte in einer ungefähr eine Million Klone umfassenden genomischen Bibliothek untergebracht

werden. Dieser Unterschied beruht auf der geringeren genetischen Komplexität und der hohen Dichte an genetischer Information im Hefegenom, da nur wenige Gene Introns (nichtkodierende DNA) aufweisen. Diese Unterschiede im Aufbau des Genoms sowie der unterschiedliche Rekombinationsapparat ermöglichen die gezielte Einführung von Mutationen (*gene targeting* und *gene knockout*), da eine homologe Rekombination sehr viel wahrscheinlicher ist (Orr-Weaver et al. [1981]). Zudem sind zahlreiche genetische Marker und Plasmide verfügbar, die Voraussetzung für genetische Manipulation sind (Ausubel et al. [1997], Guthrie and Fink [1991], Sambrook et al. [1989]). Außerdem ist in Säugerzellen eine korrekte Regulation modifizierter Gene nicht gewährleistet, da das Wildtypgen im Genom erhalten bleibt.

1.2 Transportprozesse in *Saccharomyces cerevisiae*

1.2.1 Protein-Sortierung

Die Komplexität der eukaryontischen Zelle erfordert eine subzelluläre Kompartimentierung, damit kontrollierte Stofftransporte und spezifische Reaktionen stattfinden können. Zur Aufrechterhaltung der Kompartimentierung sind verschiedene Transportmechanismen notwendig, um Proteine an ihren Bestimmungsort zu bringen. Nach der Biosynthese der meisten Proteine (Ausnahmen sind die von Mitochondrien- und Chloroplasten-DNA kodierende Proteine) an den freien Ribosomen werden sie zunächst in zwei Gruppen eingeteilt. Proteine mit einem Signalpeptid für das *endoplasmatische Retikulum* (ER) werden über den sekretorischen Weg transportiert; Proteine ohne diese Signalsequenz über den cytoplasmatischen Weg.

Sekretorischer Weg: Die Proteine werden noch während der Synthese durch die Membran in das ER transferiert. Dort werden sie aufgrund weiterer Signalpeptide auf verschiedenen Wegen weitertransportiert. Proteine mit einer Stop-Transfer-Signalsequenz verbleiben in der Membran des rauhen ER als integrale Membranproteine und können über Vesikeltransport zu anderen Membranen gelangen. Alle anderen Proteine werden zunächst mittels Vesikel zum Golgi-Apparat transportiert und dort weiter sortiert. Proteine mit einem Retentionssignal wandern in Vesikel verpackt wieder ins ER zurück, die restlichen Proteine werden zu den Lysosomen, zur Zellmembran (lösliche Proteine ohne Signal) oder in den extrazellulären Raum transportiert.

Cytoplasmatischer Weg: Proteine, die an freien Ribosomen im Cytoplasma synthetisiert werden, werden aufgrund verschiedener Signale in die Mitochondri-

en, den Zellkern oder in die Peroxisomen transportiert. Die restlichen Proteine verbleiben im Cytoplasma.

1.2.2 Vesikeltransportprozesse in *Saccharomyces cerevisiae*

Viele Proteine werden auf ihrem Weg zum Bestimmungsort in Vesikel verpackt transportiert. Die wichtigsten Vesikeltransportprozesse in Hefe sind die Sekretion (*SEC* Gene, Schekman [1992], Schekman and Orci [1996]), die Endocytose (*END* Gene, Riezman [1993], Munn and Riezman [1994]), die vakuoläre Biogenese (*VPS* Gene, Stack et al. [1995a], Conibear and Stevens [1995]), der Aminopeptidase I Transport (*CVT* Gene) und die Autophagocytose (*AUT*, *APG* und *CVT*-Gene, Harding et al. [1995], Thumm et al. [1994], Tsukada and Ohsumi [1993]).

Die Entdeckung dieser Gene erfolgte aufgrund der Isolierung von Hefemutanten (*sec-*, *end-*, *vps-*, *cvt-*, *aut-*, und *apg-*Mutanten), die einen Defekt in dem jeweiligen Transportprozeß aufweisen. Einige der isolierten Gene werden für mehrere Transportsysteme benötigt.

1.2.2.1 Sekretion Sekretionsproteine werden aufgrund ihrer Signalsequenz in der Regel cotranslational ins ER aufgenommen. Dort wird die Signalsequenz durch eine Signalpeptidase an einer spezifischen Sequenz am N-Terminus gespalten. Innerhalb des *endoplasmatischen Reticulums* werden Cysteinseitenketten zu Disulfidbrücken oxidiert und mit Hilfe einer Protein-Disulfid-Isomerase in die richtige Konformation gebracht. Desweiteren werden die Proteine durch Peptidyl-Prolyl-Isomerasen, Transglycosidasen (N-Glykosylierung) und Glycosidasen modifiziert. Chaperone unterstützen den Faltungsprozeß der Proteine und verhindern gleichzeitig unerwünschte Interaktionen mit anderen Proteinen. Anschließend werden die Proteine in Vesikel verpackt zum Golgi-Apparat transportiert, wo sie weiter enzymatisch modifiziert werden. Sie werden dort phosphoryliert, glykosyliert und für den weiteren Transport sortiert. Ohne weitere Signalsequenzen werden die löslichen Proteine in sekretorischen Vesikeln zur Plasmamembran gebracht, wo sie nach Verschmelzung der Vesikelmembran mit der Plasmamembran in den extrazellulären Raum ausgeschüttet werden (Exocytose). Als Markerprotein für diesen Prozeß wird die Invertase eingesetzt (Schekman [1992], Schekman and Orci [1996]).

1.2.2.2 Endocytose Extrazelluläres Material und Plasmamembranproteine werden mittels Endocytose (adsorptive, rezeptorvermittelte Endocytose oder Pinocytose) von der Zelle aufgenommen. Bei der adsorptiven Endocytose (regulierte

ligandabhängige Endocytose) findet eine Interaktion zwischen dem Liganden, der internalisiert werden soll, und einem Zelloberflächenrezeptor statt. Diese rezeptorabhängige Endocytose kann durch Messung der Aufnahme und des Abbaus von radioaktiv markiertem α -Faktor verfolgt werden (Chvatko et al. [1986], Davis et al. [1993], Schandel and Jenness [1994], Singer and Riezman [1990]). Bei der Pinocytose oder Flüssigphasenendocytose (konstitutive ligandunabhängige Endocytose) bindet der aufzunehmende Stoff nicht an die Zelloberfläche. Die Aufnahme des extrazellulären Materials erfolgt durch Einstülpung der Plasmamembran nach innen und anschließender Abschnürung von Vesikeln. Dieser Prozeß kann in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Lucifer Yellow untersucht werden (Riezman [1985]). Die Einstülpung der Plasmamembran an sogenannten „coated pits“, die auf ihrer cytoplasmatischen Seite von Clathrin umgeben sind, ist der am besten untersuchte endocytotische Mechanismus (Schmid [1997]). Das eingeschlossene Material gelangt über frühe und späte Endosomen zur Vakuole (Singer-Krüger et al. [1993]).

1.2.2.3 Vakuoläre Biogenese In höheren Zellen benötigen lysosomale (vakuoläre) Proteine während des Sortierungsprozesses einen endständigen Mannose-6-phosphat Rest. Ohne dieses Signal würden diese Proteine über den sekretorischen Weg zur Plasmamembran transportiert (Graham and Emr [1991]). Dieser Mannose-6-phosphat Rest bindet an ein Rezeptormolekül, welches mit Hilfe von Clathrin lokal konzentriert wird, in der Membran des Golgi-Apparates. Somit können sich Transportvesikel (Endolysosomen) bilden, die zu primären Lysosomen reifen oder mit der Lysosomenmembran fusionieren können. Der Mannose-6-phosphat-Rezeptor wird noch vor der Verschmelzung mit der Lysosomenmembran abgespalten und wiederverwendet. Als Markerprotein wird zumeist die Carboxypeptidase Y (CPY), eine lösliche vakuoläre Serinproteinase, verwendet. Das Vorläuferprotein der CPY wird von *PRC1* (Wolf and Fink [1975]) kodiert. Im *endoplasmatischen Reticulum* wird das Signalpeptid abgespalten, die pro-CPY „core“ glykosyliert (Johnson et al. [1987]) und korrekt gefaltet (Ramos et al. [1994], Winther and Soerensen [1991], Johnson et al. [1987]). Im Golgi-Apparat wird das Protein weiter modifiziert und zur Vakuole transportiert. Innerhalb der Vakuole wird die pro-CPY mit Hilfe der Proteinasen yscA und yscB (Hirsch et al. [1992b]) durch Abspaltung des Propeptids gereift und somit aktiviert. Vakuoläre Membranproteine gelangen in Hefe, da sie über keine Signalsequenz verfügen, nicht auf diesem Weg zur Vakuole (Roberts et al. [1992], Notwehr and Stevens [1994]).

1.2.2.4 Aminopeptidase I Transport Die Aminopeptidase I (API), eine lösliche vakuoläre Proteinase, wird vom Cytosol (1.2.1) direkt in die Vakuole transportiert (Yoshihisa and Anraku [1990], Klionsky et al. [1992], Harding et al. [1995]). Sie wird durch die Proteinase yscB in der Vakuole durch Abspaltung des N-terminalen Propeptids (proAPI; 61 kDa) gereift und somit aktiviert (mAPI; 50 kDa) (Oda et al. [1996], Klionsky et al. [1992]). Dieser Transportprozeß wird anhand von *cvt*-Mutanten (cytoplasm to vacuole targeting) untersucht, bei denen die API-Reifung blockiert ist (Harding et al. [1995] und Harding et al. [1996]). Die meisten Autophagocytose-Mutanten (*aut*-, *apg*-Mutanten) weisen ebenfalls einen Defekt in der Reifung der proAPI auf und sind teilweise mit den *cvt*-Mutanten allelisch (Harding et al. [1996], Scott et al. [1996]). Dies ist umso überraschender, da die Autophagocytose im Gegensatz zum API-Transport ein unspezifischer Prozeß ist. Der genaue Mechanismus des API-Transports ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist ein rezeptorvermittelter Prozeß (Scott et al. [1996]), bei dem dodekamere proAPI über Vesikel transportiert wird (Kim et al. [1997]), die kein Cytosol enthalten (Cvt-Vesikel). Dabei fungiert das periphere Membranprotein Cvt19p (Scott et al. [2001]) als spezifisches Rezeptormolekül, welches für die Autophagocytose und den Cvt-Weg benötigt wird. Die Aufnahme der API ist limitiert, da bei einer Überexpression der API unter vegetativen Bedingungen proAPI im Cytosol akkumuliert. Auch bei einer Überexpression der α -Mannosidase (Ams1p) (Hutchins and Klionsky [2001]), die ebenfalls rezeptorvermittelt auf dem Cvt-Weg in die Vakuole transportiert wird, akkumuliert proAPI im Cytosol (Klionsky et al. [1992]). Unter Hungerbedingungen ist der API-Transport jedoch nicht mehr limitiert (Scott et al. [1996]). Die Theorie des Vesikeltransportes wird auch von den Tatsachen gestützt, daß es sich hierbei um einen ATP und GTP abhängigen Prozeß handelt, der bei Temperaturabsenkung und durch die Inhibierung einer v-ATPase (Bafilomycin A) blockiert wird (Scott and Klionsky [1995]). Desweiteren reichern sich in *ypt7* Δ -Zellen cvt-Vesikel bzw. Autophagosomen an, bei denen die proAPI vor Proteinase K-Verdau geschützt ist.

1.3 Proteolyse in *Saccharomyces cerevisiae*

Das Überleben der eukaryontischen Zelle hängt unter anderem davon ab, daß sie die Proteinaktivitäten innerhalb der verschiedenen Kompartimente regulieren kann. Nur durch Regulation der einzelnen Aktivitäten kann sie sich an wechselnde Umweltbedingungen anpassen und die unterschiedlichen Programme ihrer Proteine durchführen. Variation der Enzymaktivität und der Affinität der Enzyme zum Substrat stellen einen schnellen Regulationsmechanismus dar. Dies wird durch kovalente Modifikationen, wie z. B. durch Phosphorylierung, und allosteri-

sche Wechselwirkungen erreicht. Mechanismen der langsamen Kontrolle sind die Proteinsynthese, die durch Induktion und Repression auf der Ebene der Gentranskription oder auch durch Kontrolle der Translation greift, sowie der Proteinabbau (Proteolyse).

Unter Proteolyse versteht man die hydrolytische Spaltung der Peptidbindungen von Proteinen. Zum vollständigen Abbau sind jedoch mehrere Enzyme mit unterschiedlichen Aktivitäten notwendig. Sie untergliedern sich in Endopeptidasen (Proteinasen), die Peptidbindungen im Inneren von Proteinen spalten, und Exopeptidasen, die Peptidketten vom Ende her spalten. Auf diesem Weg werden überschüssige, defekte und überalterte Proteine abgebaut und die Spaltprodukte (Aminosäuren) dem Biosyntheseweg wieder zur Verfügung gestellt. Für die Proteolyse stehen der Zelle zwei unterschiedliche Verdauungssysteme zur Verfügung. Der proteolytische Abbau regulatorischer und kurzlebiger Proteine erfolgt spezifisch durch das Proteasom der Zelle, bei Hungerung dagegen hauptsächlich unspezifisch im Lysosom bzw. in der Vakuole. Unter Hungerbedingungen findet der Proteinabbau zu 85% in der Vakuole statt, unter Normalbedingungen nur zu 34-44% (Teichert et al. [1989]). Da die meisten Proteine innerhalb der Vakuole aufgrund der hohen proteolytischen Aktivität der unspezifischen Enzyme sehr schnell degradiert werden, kann die Regulation dieses Abbaus nur über den Transport der abzubauenen Proteine in die Vakuole stattfinden. Dies kann z. B. durch Autophagocytose (Dunn [1990a], Dunn [1990b] und Dunn [1994], Seglen and Bohley [1992]) oder über den in Säugerzellen entdeckten, selektiven KFERQ-Weg (Cuervo and Dice [1996], Dice [1990], Terlecky et al. [1992]) geschehen. Die wichtigsten Proteinase in der Vakuole stellen die Endoproteinase yscA und yscB dar. Mutanten mit einem Defekt dieser Proteinase weisen eine erheblich verminderte Überlebensfähigkeit bei Hungerung auf, und sind nicht mehr in der Lage zu sporulieren (Teichert et al. [1989], Jones et al. [1997]).

1.3.1 Selektive Proteolyse (cytosolisch)

Innerhalb des Cytosols und des Zellkerns der Eukaryontenzelle kann nur eine selektive Proteolyse stattfinden, bei der kurzlebige, regulatorische, überalterte und falsch gefaltete Proteine abgebaut werden (Voges et al. [1999]). Die wichtigsten Vertreter dieser selektiven Proteinase sind die hochkonservierten 26S Proteasomen (Coux et al. [1996], Hilt and Wolf [1995] Hilt and Wolf [1996], Hochstrasser [1996]). Die abzubauenen Proteine werden durch das Ubiquitin-System markiert (Hochstrasser [1996]) und im Inneren des Proteasoms abgebaut. Über die Proteasomenaktivität wird z. B. auch der Zellzyklus (Abbau von Zyklinen; s. 1.6.1) (Seufert et al. [1995], Richter-Ruoff and Wolf [1993]) und die Katabolitinaktivierung ge-

steuert (Schork et al. [1994], Schork et al. [1995]). Zudem wird die cytosolische Proteolyse für die Prozessierung von Antigenen in Säugerzellen benötigt (Tanaka [1995]).

Das 26S Proteasom besteht aus einem zylinderförmigen multimeren 20S-Kern und zwei regulatorischen 19S-Komplexen. Die proteolytische Aktivität befindet sich, getrennt vom Cytosol, im Inneren des 20S-Kerns. Die Öffnungen werden von den zwei 19S-Komplexen verschlossen, die für die Erkennung von Substraten, deren Entfaltung und Transport abzubauen Proteine zuständig sind. Die zum Abbau vorgesehenen Proteine werden durch kovalente Verknüpfung mit Polyubiquitinketten markiert (Abb. 1). Dabei wird das carboxyterminale Glycin des Ubiquitins unter ATP-Verbrauch mit einer Lysin- ϵ -Aminogruppe des Proteins verknüpft. Die Aktivierung des Ubiquitins erfolgt über eine Enzymkaskade, bei der die terminale Carboxylgruppe des Ubiquitins über eine energiereiche Thioestergruppe an einem Cysteinrest eines Ubiquitin-aktivierenden Enzyms E1 (McGrath et al. [1991]) gebunden und anschließend auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 übertragen wird (Jentsch [1992]). Der Transfer des Ubiquitins vom E2-Enzym zum Zielprotein wird durch eine Ubiquitin-Protein-Ligase E3 katalysiert. Das E3-Enzym wird als Rekrutierungsfaktor, der das E2-Enzym an das Zielprotein bindet, oder als Ubiquitinüberträger benötigt. Abzubauen Proteine werden durch mehrere Ubiquitinketten markiert (Varshavsky [1992]). Diese polyubiquitinylierten Proteine werden vom 19S-Komplex erkannt, unter ATP-Verbrauch entfaltet und ins Innere des 20S-Kerns geschoben, wo sie abgebaut werden. Das Ubiquitin selbst wird abgespalten und nach erneuter Aktivierung wiederverwendet. Bei der Ubiquitin abhängigen Proteolyse werden die Proteine unter anderem nach der „N-end“-Regel abgebaut. Diese Regel besagt, daß die Halbwertszeit von Proteinen von der N-terminalen Aminosäure abhängt (artifizielle Substrate). Primär destabilisierte Proteine werden dabei durch das Proteasom abgebaut (Chau et al. [1989], Richter-Ruoff et al. [1994]).

Das in allen eukaryontischen Zellen hochkonservierte Proteasom besteht aus einem hohlzylindrischen vierlagigen $\alpha 7 \beta 7 \beta 7 \alpha 7$ -Kernkomplex mit einer Masse von 700 kDa. Im Inneren des Komplexes liegt entlang der Längsachse ein Hohlraum mit drei Kammern, wobei sich die 3 proteolytisch aktiven Zentren, aminoterminalen Threoninreste, in der zentralen, durch β -Ringe gebildeten Kammer befinden (Zwickl et al. [1992], Löwe et al. [1995], Seemüller et al. [1995], Goll et al. [1997]). Diese Zentren weisen chymotryptische, tryptische und peptidylglutamylpeptid-spaltende Aktivität (Spaltung nach hydrophoben, basischen und sauren Aminosäuren) auf (Rivett [1993]). Die α -Ringe sind proteolytisch inaktiv und werden zur Stabilisierung der β -Ringe und zur Bindung der 19S-Komplexe benötigt.

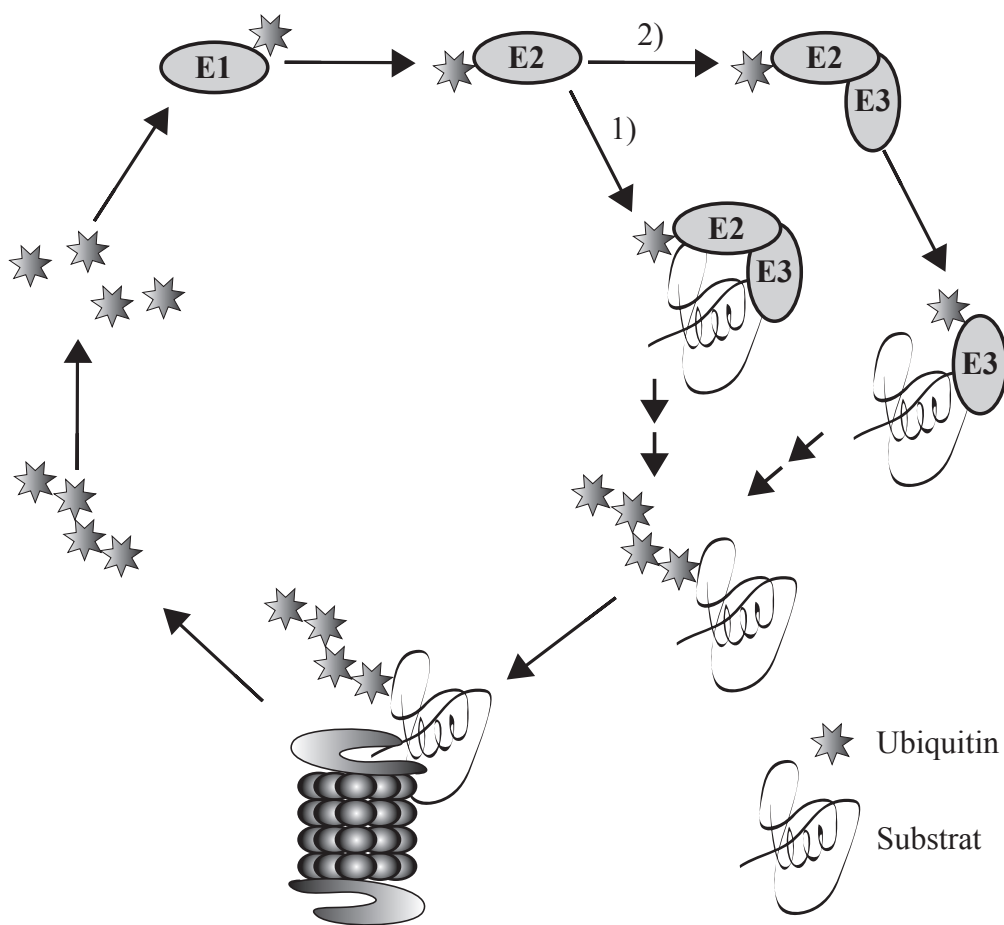


Abbildung 1: Das Ubiquitinsystem. Ubiquitinmoleküle werden kovalent an ein E1-Enzym gekoppelt. Die so aktivierten Ubiquitinmoleküle werden auf das aktive Cystein eines E2-Enzyms übertragen. Zumeist wird für die Ubiquitinierung eines Substrats ein E3-Enzym benötigt, welches als Rekrutierungsfaktor (1) oder als zusätzlicher Überträger (2) von Ubiquitin benötigt wird. Das Substrat wird polyubiquitinyliert und dadurch vom 26S Proteasom als abzubauenendes Substrat erkannt. Das Ubiquitin selbst wird abgespalten und wiederverwendet.

1.3.2 Unselektive Proteolyse (lysosomal)

Die unselektive Proteolyse findet im Lysosom der eukaryontischen Zelle statt. In der Hefe entspricht dieses Kompartiment der Vakuole. Sie ist von einer einfachen Membran umgeben, in der ATP-getriebene Protonenpumpen einen pH-Wert von ca. 6 aufrecht erhalten (Kane and Stevens [1992]). Dies entspricht dem pH-Optimum der vakuolären Enzyme. Bei einem neutralen pH-Wert, wie er im Cytosol vorliegt, sind diese Enzyme ebenfalls teilweise aktiv, jedoch existieren spezifische Inhibitorproteine, die neben der Membran einen weiteren Schutzmechanismus der Zelle vor Selbstverdau darstellen. Abzubauenende Substanzen können über verschiedene Transportsysteme in die Vakuole gelangen, über Endocytose,

Autophagocytose, Phagocytose, Poren oder über den selektiven KFERQ-Weg. Normalerweise besitzt die Vakuole ein Volumen, das 10-20% des gesamten Zellvolumen ausmacht, und dient neben dem Proteinabbau (Thumm and Wolf [1998]) als Speicherorganell für Metabolite, Polyphosphate, Aminosäuren und Ionen, wie z. B. Calciumionen. Zudem ist sie an der Osmoseregulation, der pH-Homeostase und der Sporulation beteiligt (Jones et al. [1997]). Zu den wichtigsten proteolytischen Enzymen der Vakuole, die außer der Aminopeptidase I über den sekretorischen Weg (1.2.1) in die Vakuole gelangen, gehört

1. die durch **PRA1** (**PEP4**) kodierte Proteinase A (yScA), eine Aspartatproteinase (Mechler and Wolf [1981], Ammerer et al. [1986], Woolford et al. [1986]). Diese Proteinase gelangt auf dem sekretorischen Weg als enzymatisch inaktives Vorläuferprotein in die Vakuole. Sie spielt bei der Reifungskaskade der proteolytischen Enzyme eine zentrale Rolle (Hirsch et al. [1992]). Mutanten, denen diese Proteinase fehlt, weisen ungereifte Proteinasen in der Vakuole auf, die somit inaktiv sind (Teichert et al. [1989]). Zunächst entstehen aufgrund autokatalytischer Prozessierung geringe Mengen an aktiver Proteinase A. Diese prozessiert eine ebenfalls geringe Menge an Proteinase B, die dann sich selbst und alle weiteren vakuolären Proteinasen reift (van den Hazel et al. [1996], Hirsch et al. [1992] und Hirsch et al. [1992b], Rupp et al. [1991], Woolford et al. [1986]).
2. die durch **PRB1** kodierte Proteinase B (yScB), eine subtilisinartige Serinproteinase (Moehle et al. [1987]). Eine geringe Menge an Proteinase B wird von der autokatalytisch gereiften Proteinase A prozessiert und ist für die Prozessierung aller weiteren vakuolären Proteinasen zuständig.
3. die durch **PRC1** kodierte Carboxypeptidase Y (yScY), eine Serinproteinase (Wolf and Fink [1975], Wolf and Weiser [1977]). Die Carboxypeptidase Y (1.2.2.3) gelangt ebenfalls auf dem sekretorischen Weg als enzymatisch inaktives Vorläuferprotein in die Vakuole.
4. die durch **CPS1** kodierte Carboxypeptidase S (yScS), eine Zn^{2+} -Exopeptidase (Spormann et al. [1992]). Die Carboxypeptidase S ist ebenfalls eine lösliche Proteinase, die als membranassoziiertes enzymatisch inaktives Vorläuferprotein auf dem sekretorischen Weg in die Vakuole transportiert wird. Dort wird die Proteinase nach der Membrandomäne gespalten und somit aktiviert.
5. und die durch **APE1** kodierte Aminopeptidase I (API), eine Exopeptidase (Chang and Smith [1989], Cueva et al. [1989]). Die Aminopeptidase I wird

unabhängig vom sekretorischen Weg in die Vakuole transportiert und dort gereift (Klionsky et al. [1992]) (s. 1.2.2.4).

1.4 Autophagocytose

Autophagocytose ist die unselektive Aufnahme von abzubauenem Zellmaterial in das Lysosom bzw. in die Vakuole. Aufgrund morphologischer und elektronenmikroskopischer Untersuchungen werden zwei Mechanismen vorgeschlagen.

Bei der **Mikroautophagocytose** werden kleine Mengen an Cytoplasma durch Invagination der Lysosomenmembran eingeschlossen (Seglen and Bohley [1992], Dunn [1994]). Es bilden sich einlagige Vesikel, die im Inneren des Lysosoms lysiert werden. In der methylo-trophen Hefe *Pichia pastoris* konnte sogar die Aufnahme von ganzen Peroxisomen nachgewiesen werden, wenn man die Zellen von Methanol auf glucosehaltiges Medium umsetzte (Tuttle and Dunn [1995]).

In Säugerzellen, durch morphologische Untersuchungen an Rattenleberzellen belegt (Dunn [1990a], Seglen and Bohley [1992], Dunn [1994]), wird bei der **Macroautophagocytose** Cytoplasma und ganze Organellen von ribosomfreien Bereichen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (rER) umschlossen, wobei sich doppel- oder mehrlagige autophagische Vesikel (Autophagosomen) bilden (Takeshige et al. [1992]). Sie verschmelzen nach Erhalt der ATPase und lysosomaler Enzyme, die sie zu einlagigen frühen Autolysosomen (Dunn [1990a], Ueno et al. [1991]) reifen, mit späten Endosomen oder direkt mit dem Lysosom (Dunn [1994], Lawrence and Brown [1992], Tooze et al. [1990], Baba et al. [1994], Punnonen et al. [1993]). Nach der Hydrolyse der Proteine des Autolysosoms wird dieses als „residual body“ bezeichnet. In Hefezellen läuft vermutlich ein ähnlicher Prozeß ab, der jedoch noch genauer untersucht werden muß.

In Säugerzellen werden zudem Proteine mit einer KFERQ ähnlichen Sequenz unter Hungerbedingungen selektiv ins Lysosom transportiert (Dice [1990]). Soweit bekannt ist, sind an diesem Prozeß ein Protein zur Erkennung der Signalsequenz (Prp73) und ein spezifischer Rezeptor (LGP96) beteiligt (Terlecky et al. [1992], Cuervo and Dice [1996]). In Hefezellen ist über einen solchen Prozeß noch nichts bekannt.

Die Autophagocytose in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Sie ist jedoch ebenso ein unspezifischer Transportprozeß wie in Säugerzellen, da die verschiedenen Proteine in enzymatisch aktiver Form mit gleicher Kinetik in die Vakuole transportiert werden (Egner et al. [1993]). Unter Hungerbedingungen reichern sich in Proteinase B defizienten Stämmen Vesikel

(300-900 nm) in der Vakuole an. Die Verwendung eines Proteinase B Inhibitors wie z. B. Phenylmethylsulfonsäurefluorid (PMSF) führt auch in Wildtypzellen zu einer Anreicherung von Vesikeln in der Vakuole. Die Proteinase B lysiert entweder direkt die Vesikel oder prozessiert die für die Lyse notwendige(n) noch unbekannt(e)n Proteine. Diese Vesikel (Autophagosomen) enthalten cytosolische Proteine, Zellorganellen wie Mitochondrien oder auch Ribosomen (Takeshige et al. [1992], Thumm et al. [1994]). Sie konnten in elektronenmikroskopischen Studien im Cytosol hungernder Hefezellen nachgewiesen werden und sind von zwei verschiedenen Membranlagen umgeben, die wie Gefrierbruchanalysen zeigen kaum Membranproteine und Polysaccharide enthalten (Fengsrud et al. [2000], Baba et al. [1994], Baba et al. [1995]). Die äußere Membran fusioniert mit der Vakuolenmembran, so daß ein einlagiges Vesikel („autophagic body“) in die Vakuole entlassen werden kann, dessen Membran im Inneren der Vakuole abgebaut wird.

Um den Mechanismus und die Regulation der Autophagocytose in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* untersuchen zu können, wurden Hefemutanten isoliert, die einen Defekt in den Genen besitzen, die für die Autophagocytose wichtig sind. Für die Isolierung solcher Mutanten wurden zwei verschieden „Screens“ entwickelt (Tsukada and Ohsumi [1993], Thumm et al. [1994]). Die *Apg*-Mutanten wurden anhand eines Phloxin B-Screens isoliert (Tsukada and Ohsumi [1993]), der auf der Überlebensfähigkeit unter Hungerbedingungen beruht, die *Aut*-Mutanten aufgrund eines Defekts im Abbau eines cytosolischen Markerproteins, der Fettsäuresynthase (Thumm et al. [1994]). Die Fettsäuresynthase ist ein dodecamerer Enzymkomplex $\alpha_6\beta_6$, der aus den Untereinheiten α und β besteht (Lynen [1980]) und fast ausschließlich über die Vakuole abgebaut wird (Egner et al. [1993]). Mit Hilfe eines immunologischen Kolonietests (Lyons and Nelson [1984]) konnten bisher sieben Komplementationsgruppen identifiziert werden (*aut1*, *aut2*, *aut3*, *aut4*, *aut5*, *aut6*, *aut9*), die einen Defekt im Abbau der Fettsäuresynthase aufweisen. Autophagocytosemutanten reichern entweder Vesikel innerhalb der Vakuole unter Hungerbedingungen ähnlich den Proteinase B defizienten Stämmen an (die Lysemutanten *aut4* und *aut5*) oder sind selbst bei Zugabe eines Proteinase B Inhibitors nicht in der Lage Vesikel unter Hungerbedingungen in der Vakuole anzureichern. Zudem weisen homozygot diploide Mutantenzellen eine reduzierte Sporulationsfrequenz auf. Dieser Defekt war Grundlage einer Methode mit der die meisten *Aut*-Mutanten kloniert wurden (Schlumpberger et al. [1997], Straub et al. [1997], Lang et al. [1998], Suriapranata et al. [2000]). Interessanterweise sind bisher sieben *cvt*-Mutanten entdeckt worden, die allelisch zu den *apg*- bzw. *aut*-Mutanten sind, was auf einen genetischen Zusammenhang der beiden Wege schließen läßt (Harding et al. [1996], Scott et al. [1996]). Dies könnte erklären,

warum die meisten Cvt- und Autophagocytose Proteine konstitutiv exprimiert werden (Ausnahme: Aut7p/Apg8p). Die *cvt*-Mutanten weisen einen Defekt im spezifischen API-Transport auf, der unter vegetativen Bedingungen erfolgt (Scott et al. [1996], Harding et al. [1996]).

1.4.1 Aut1p/Apg3p

Das Aut1-Protein ist ein lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 36 kDa (Schlumpberger et al. [1997]). Es interagiert als E2 ähnliches Enzym mit Aut7p und vermittelt so die Amidierung des Aut7p mit Phosphatidylethanolamin (Kirisako et al. [2000], Ichimura et al. [2000], Sovarasteanu [2000]). Desweiteren interagiert es mit Aut2p (Schäffeler [1999], Ito et al. [2000], Uetz et al. [2000]) und besitzt ein potentiell KEKE-Motiv, welches für die Zusammensetzung von Proteinen zu größeren Komplexen benötigt wird (Realini et al. [1994]). Es ist, vergleichbar mit dem Aut7p, hungerinduziert (Reiche [2001]).

1.4.2 Apg1p/Aut3p

Das lösliche Apg1p/Aut3p besitzt ein Molekulargewicht von 102 kDa (Straub et al. [1997]), eine N-terminale Serin-/Threoninkinase Domäne und kann sich *in vitro* autophosphorylieren (Matsuura et al. [1997]). Es wird sowohl für den Cvt- Weg als auch für die Autophagocytose benötigt, wobei die Menge an phosphoryliertem Protein bei Hungerung abnimmt. Ein GFP getaggt Protein ist im Cytosol an einem punktförmigen Organell lokalisiert. Die Überexpression des Apg1p/Aut3p in einer *apg13Δ*, *apg13-1* oder *apg17Δ* Mutante komplementiert den autophagischen Defekt dieser Zellen, was ein Interaktion der beiden Proteine nahelegt (Funakoshi et al. [1997]). Apg1p/Aut3p interagiert auch mit den Proteinen Apg12p und Cvt9p und gehört zu einem Kinase-Komplex zusammen mit den Kontrollproteinen Apg13p und Apg17p, der für die Induktion der Autophagocytose notwendig ist (Kamada et al. [2000], Scott et al. [2000]).

1.4.3 Aut2p/Apg4p

Das lösliche Aut2p besitzt ein Molekulargewicht von 56 kDa (Lang et al. [1998]) und ist eine Cysteinprotease (Kirisako et al. [2000]). Das Substrat der Protease ist das Aut7p, welches als ein „low copy“ Suppressor der *aut2-1* Mutante isoliert wurde (1.4.6). Das Aut2p besitzt eine schwache Homologie zur α -Kette des Tubulins in anderen Organismen und interagiert in Hefe mit den Proteinen Tup1p und Tub2p. Das GFP-Aut2p ist innerhalb des Cytosols lokalisiert.

1.4.4 Aut4p

Das Aut4p (Suriapranata et al. [2000]) ist ein 64 kDa Protein mit 10-12 Transmembrandomänen. In einer *aut4*-Mutante reichern sich unter Hungerbedingungen Vesikel innerhalb der Vakuole an, die im Gegensatz zu den bisher bekannten autophagischen Vesikeln (300-900 nm) nur einen Durchmesser von ca. 350 nm besitzen. Die Proteinabbaurate bei Hungerung entspricht in etwa dem der *prb1Δ*-Mutante und ist somit höher als die der meisten anderen Mutanten. Dies kann auch erklären, daß die API im Gegensatz zu den meisten Autophagocytosemutanten gereift wird. Das GFP-Aut4p ist an der Vakuolenmembran lokalisiert, so daß anzunehmen ist, daß das Aut4p für die Lyse autophagischer Vesikel ohne API benötigt wird.

1.4.5 Cvt17p/Aut5p

Das Cvt17p/Aut5p (Teter et al. [2000], Epple et al. [2001]) ist ein glykosiliertes 59 kDa Protein mit einer Transmembrandomäne. Es ist homolog vermutlich zu einer Familie von Triglyceridlipasen und ist für die Lyse von einlagigen 140-160 nm Cvt-Vesikel und 300 nm autophagischen Vesikel innerhalb der Vakuole essentiell ist. Es besitzt enthält ein für die Funktion essentielles Serin (Teter et al. [2000]). In einer Mutante akkumulieren diese Vesikel bei Stickstoffmangel in der Vakuole. Unter vegetativen Bedingungen ist das Cvt17p/Aut5p im *Endoplasmatischen Reticulum* in einer *pep4Δ*-Mutante immer in der Vakuole lokalisiert. Die proAPI ist in einer Mutante vor Proteaseverdau geschützt und befindet sich innerhalb der Vakuole in Vesikeln.

1.4.6 Aut7p/Cvt5p/Apg8p

Das Aut7p ist ein lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von 13,6 kDa. Es interagiert mit dem Aut2p (Lang et al. [1998]), ist allelisch zum Cvt5p und Apg8p (Scott et al. [1996]) und besitzt eine Homologie zu Proteinen mit verschiedenen Funktionen, GATE-16, GABARAP und MAP-LC3. GABARAP bindet den GABA_A-Rezeptor und verstärkt die Bildung von Clustern, die dann an Mikrotubulin binden (Chen et al. [2000]). GATE-16 stimuliert den intra-Golgi Transport *in vitro* und ist innerhalb des Golgi-Komplexes lokalisiert (Sagiv et al. [2000]). Es interagiert mit NSF und dem Golgi v-SNARE GOS-28. Das Aut7p kann GATE-16 *in vitro* substituieren und interagiert physikalisch mit den Hefe v-SNARE Bet1p (ER zu Golgi Transport) und Nyv1p (Vakuolenvererbung) und genetisch mit Sec22p (ER zu Golgi Transport). Daraus folgt, daß das Aut7p mehrere Funktionen in

Hefe ausführt (Legesse-Miller et al. [2000]). MAP-LC3 wird in autophagosomalen Membranen von HeLa Zellen in prozessierter Form angereichert (Kabeya et al. [2000]). Alle drei Aut7p Homologe interagieren physikalisch mit Apg7p, so daß anzunehmen ist, daß sie ebenfalls mit Proteinen oder Lipiden konjugiert werden (Tanida et al. [2001]). Es wurde als „low copy“-Suppressor der *aut2-1* Mutante gefunden und die Interaktion mit dem Aut2p mittels Affinitätschromatographie und durch ein „Two Hybrid“-Experiment (1.5.3.3) bestätigt. Das Aut7p-GFP wurde im Wildtypstamm am preautophagosomalen Kompartiment (PAC) lokalisiert, innerhalb einer *cvt17-/aut5*-Mutante auch in den Vesikeln innerhalb der Vakuole (Kirisako et al. [1999], Huang et al. [2000]). Die Lokalisation ist abhängig von der Apg5p-Apg12p Konjugation und von der Aut1p vermittelten Membranassoziation. Das Aut7p wird vor der Vervollständigung der autophagischen-/cvt-Vesikel benötigt, da in einer Mutante proAPI nicht vor Proteasenverdau geschützt und an eine Membran assoziiert pelletierbar ist (Harding et al. [1995], Kirisako et al. [1999], Thumm et al. [1994]). Es ist ein Ubiquitin ähnliches Protein (vgl. 1.4.11), bei dem das C-terminale Glycin116 nach der proteolytischen Abspaltung des Arginin117 durch die Aut2p/Apg4p Protease kovalent mit der Aminogruppe von Phosphatidylethanolamin (PE) gekoppelt wird. Die Abspaltung des Arginin ist für die Membranassoziation des sonst cytosolischen Proteins von Bedeutung (Kim et al. [2001a]). Die Verknüpfung des Aut7p wird von dem Apg7p (E1) und dem Aut1p/Apg3p (E2) katalysiert (Kirisako et al. [2000], Ichimura et al. [2000]). Die Expression des Aut7p ist hungerinduziert, so daß die Menge an Aut7p um das 10 bis 20-fache zunimmt (Huang et al. [2000]).

1.4.7 Apg9p/Aut9p/Cvt7p

Das Apg9p/Aut9p/Cvt7p ist ein integrales Membranprotein mit einem berechneten Molekulargewicht von 115 kDa (Noda et al. [2000], Lang et al. [2000]). Es ist an einem noch unbekanntem perivakuolären Kompartiment lokalisiert (Suzuki et al. [2001]). Seine Funktion wird vor der Vervollständigung der Cvt- und Autophagocytose Vesikel benötigt, da die Oligomerisierung der pro-API und die Bildung des Cvt-Komplexes zwar analog zum Wildtyp abläuft (Kim et al. [1997]), die pro-API jedoch nicht vor Proteasenverdau geschützt und dem Cytosol zugänglich ist (Noda et al. [2000]).

1.4.8 Apg2p

Das Apg2p ist ein peripheres Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 178 kDa (Wang et al. [2001], Shintani et al. [2001]). Es ist am gleichen periva-

kuolären Kompartiment wie das Apg9p/Aut9p/Cvt7p lokalisiert und interagiert auch mit diesem Protein. Diese Lokalisation ist von der korrekten Funktion des Apg9p, des Apg1p/Aut3p Kinase-Komplexes (1.4.2) und des Phosphatidylinositol-3 Kinase-Komplexes (1.4.10) abhängig. In einer *apg2Δ*-Mutante gelangt das autophagische Markerprotein Aut7p/Cvt5p/Apg8p nicht mehr in die Vakuole und die API ist dem Cytosol zugänglich. Daraus läßt sich schließen, daß das Apg2p vor der Vervollständigung der Vesikel benötigt wird.

1.4.9 Apg1p/Aut3p Kinase-Komplex

Der Apg1p/Aut3p Kinase-Komplex ist für die Induktion der Autophagocytose essentiell (Kamada et al. [2000], Scott et al. [2000]). Die Apg1p/Aut3p Kinase wird durch die Interaktion mit dem teilweise dephosphorylierten Apg13p aktiviert (Abb. 2). Die Dephosphorylierung des Apg13p erfolgt durch die Inhibierung von Tor2p (4.3.8.1), welches die Aktivierung der Proteinphosphatase 2A bewirkt. An diesem Komplex sind auch das Autophagocytose spezifische Apg17p und das Cvt-Weg spezifische Cvt9p beteiligt. Die Apg1p/Aut3p Kinase agiert vermutlich als katalytische Untereinheit mit den Proteinen Vac8p, Apg13p, Cvt9p und Apg17p in verschiedenen Proteinkomplexen, je nachdem, ob die Autophagocytose oder der Cvt-Weg induziert werden muß. Dieser Wechsel in der Funktion der Kinase ist unabhängig von der Neusynthese von Proteinen.

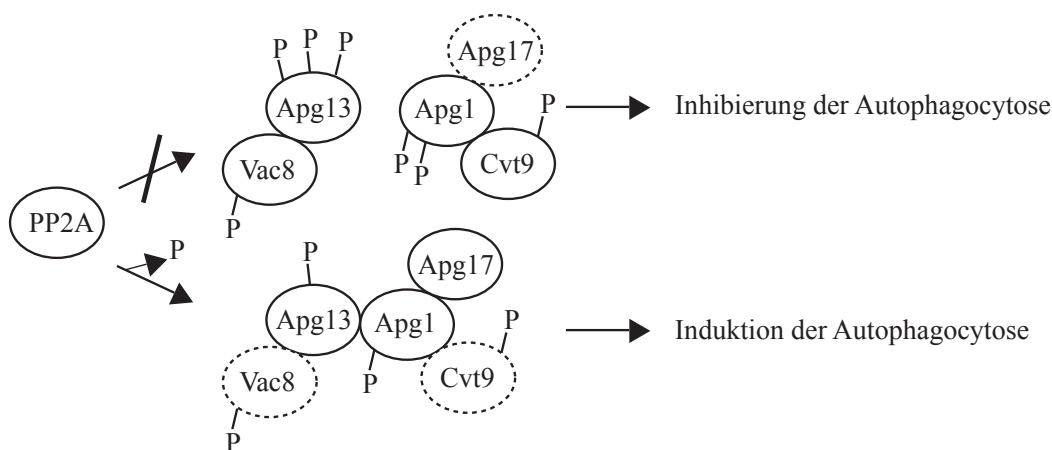


Abbildung 2: Induktion der Autophagocytose. Die aktivierte Proteinphosphatase 2A (PP2A) dephosphoryliert teilweise das Apg13p, welches daraufhin mit dem Apg1-Kinase-Komplex interagieren kann. Diese Interaktion bewirkt eine Aktivierung der Apg1-Kinase, die die Autophagocytose induziert. Proteine, die gestrichelt dargestellt werden, sind für den jeweiligen Prozeß nicht essentiell.

1.4.10 Phosphatidylinositol-3 Kinase Komplex

Vps34p ist die einzige in Hefe bekannte PI 3-Kinase (Phosphatidylinositol-3 Kinase) (Herman and Emr [1990], Schu et al. [1993]). Sie ist homolog zu Typ III PI 3-Kinasen aus Säugerzellen. Ihre Funktion wird durch die Vps15p Kinase geregelt, mit welcher sie einen stabilen membrangebundenen Komplex bildet (Stack et al. [1993], Stack et al. [1995a]). Die Proteine Apg6p/Vps30p und Apg14 kontrollieren den Proteinsubkomplex Vps34p-Vps15p und bilden den Phosphatidylinositol-3 Kinase Komplex (PI-3). Dieser Komplex kontrolliert sowohl die Autophagocytose als auch den Cvt-Weg (Kihara et al. [2001]). Die Membranassoziierte Kinase ist an spezifischen Stellen des *trans*-Golgi lokalisiert und kann von dort die Sortierung von Proteinen in Vesikel für den Transport zum Endosom katalysieren (Stack et al. [1995b]). Vps34p agiert eventuell auch als „second messenger“, der die Interaktion von Vac1p (Pep7p) und von Vps27p mit der endosomalen Membran bewirkt (Burd and Emr [1998], Peterson et al. [1999], Simonsen et al. [1998]).

1.4.11 Ubiquitinähnliche Proteinsysteme

In Hefe sind bisher zwei Ubiquitin ähnliche Proteinsysteme bekannt, die für den Cvt-Weg und für die Autophagocytose essentiell sind. Im ersten System übernimmt das Aut7p die Funktion des Ubiquitins (1.4.6) und wird kovalent mit der Aminogruppe von Phosphatidylethanolamin gekoppelt (Kirisako et al. [2000], Ichimura et al. [2000]) (Abb. 3). Aut7p besitzt keine Homologie zu Ubiquitin, jedoch weist die dreidimensionale Struktur eine Ubiquitin ähnliche Windung auf (Paz et al. [2000]). Das C-terminale Arginin117 des Aut7p wird von der Aut2p Cysteinprotease hydrolysiert (Kirisako et al. [2000]), so daß das nun C-terminale Glycin116 mit dem Apg7p (E1-Homolog zu Uba1p) unter ATP-Verbrauch eine aktivierte Thioesterbindung eingehen kann (Kim et al. [1999], Tanida et al. [1999]). Anschließend wird das aktivierte Aut7p auf einen Cysteinrest des Aut1p („E2“) übertragen, welches dann die Bildung einer Amidbindung mit Phosphatidylethanolamin (PE) katalysiert. Das an eine Membran gebundene Aut7p-PE wird ebenfalls von der Aut2p Cysteinprotease hydrolysiert. Die Hydrolyse des Aut7p ist für den Ablauf der Autophagocytose wichtig, da ein mutiertes Aut7p ohne ein C-terminales Arginin117 die autophagischen Defekte einer *aut2Δ*-Mutante nicht vollständig komplementieren kann. Das freigesetzte Aut7p befindet sich dann innerhalb des Autophagosoms und wird im Inneren der Vakuole abgebaut.

Im zweiten System wird die Rolle des Ubiquitins von Apg12p übernommen, welches kovalent mit dem Lysin149 des Apg5p gekoppelt wird (Mizushima et al. [1998a], Mizushima et al. [1998b]) (Abb. 4). Zuerst wird das Apg12p unter ATP-

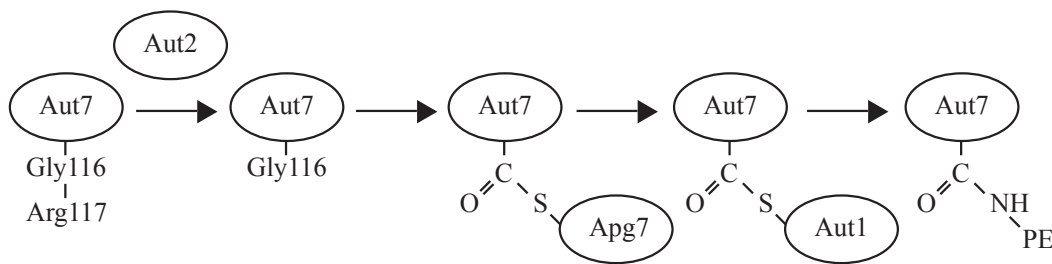


Abbildung 3: Übertragung des Aut7p auf Phosphatidylethanolamin (PE). Das terminale Arginin des Aut7p wird von der Aut2p-Protease hydrolysiert und das Glycin über eine Thioesterbindung zuerst mit dem Apg7p (E1-Homolog) und anschließend mit dem Aut1p („E2“) gekoppelt. Zuletzt wird das Aut7p kovalent mit der Aminogruppe des Phosphatidylethanolamin (PE) verbunden.

Verbrauch über eine Thioesterbindung mit dem Cystein507 des Apg7p (E1-Homolog) aktiviert (Tanida et al. [1999], Kim et al. [1999]) und auf das Apg10p („E2“) (Shintani et al. [1999]) übertragen. Danach wird das Apg12p mit seinem C-terminalen Glycin kovalent über eine Isopeptidbindung an das interne Lysin149 von Apg5p gebunden. Die Menge an konjugiertem und unkonjugiertem Apg12p ist unabhängig von Autophagocytose induzierenden Mitteln (Mizushima et al. [1999]). Der Apg12p-Apg5p Komplex interagiert mit Apg16p, welches dann ein homo-Oligomer mit seiner C-terminalen „coiled-coiled“ Region bildet (Mizushima et al. [1999]). Dieses Konjugationssystem wird sowohl für den Cvt-Weg als auch die Autophagocytose benötigt. Die pro-API wird in Zellen mit defektem Konjugationssystem noch oligomerisiert und an Membranen gebunden, ist jedoch nicht mehr vor Proteasen-Verdau geschützt (George et al. [2000], Kim et al. [1999]). Zusätzlich wird dieser Komplex für die Rekrutierung des Aut7p an die Membran benötigt.

1.5 Protein-Protein Wechselwirkungen

Protein-Protein Wechselwirkungen sind an der Kontrolle vieler zellulärer Regulationsprozesse beteiligt (Phizicky and Fields [1995]). Diese Wechselwirkungen können über eine kleine Proteinregion stattfinden, in der sich die kleine Proteinregion in eine Domäne eines anderen Proteins einfügt wie ein „Schlüssel in sein Schlüsseloch“. Ein Beispiel hierfür ist die SH2-Domäne (*Src* homolog 2), die mit den phosphorylierten Resten von Peptiden interagiert (Felder et al. [1993], Songyuang et al. [1993], Waksman et al. [1992] und Waksman et al. [1993]). Andererseits können Proteine auch über größere Regionen miteinander interagieren, wie z.B. beim Leucin-Zipper, bei dem zwei α -Helices verschiedener Proteinuntereinheiten wie ein „Reißverschluß“ ineinander passen (Alber [1992], Ellenberger

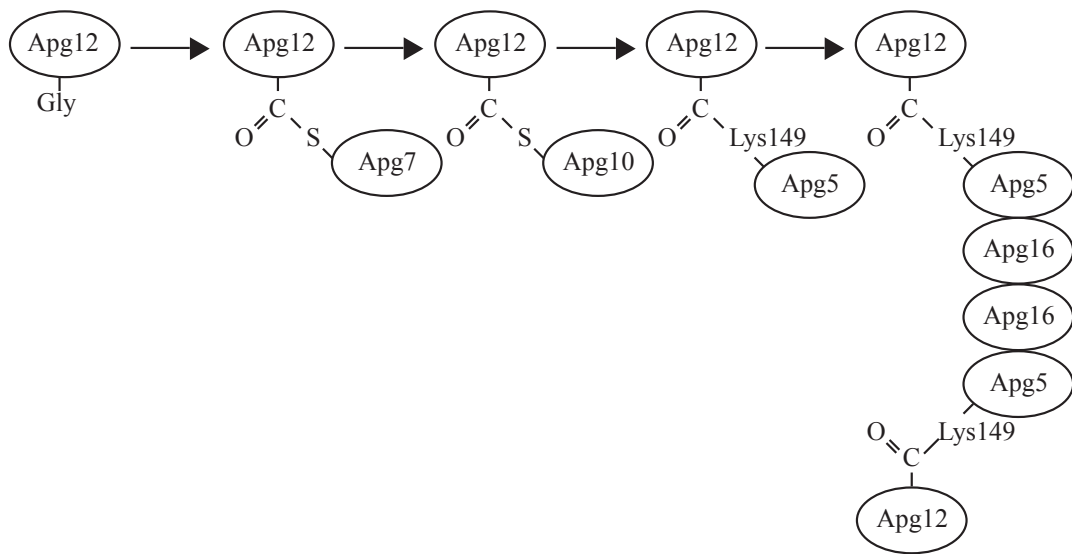


Abbildung 4: Übertragung des Apg12p auf das Apg5p. Das terminale Glycin des Apg12p wird unter ATP-Verbrauch über eine Thioesterbindung zuerst mit dem Apg7p (E1-Homolog) und anschließend mit dem Apg10p („E2“) gekoppelt. Danach wird das Apg12p kovalent mit dem Apg5p verbunden, welches dann mit dem Apg16p interagiert und über dessen „coiled-coiled“ Region ein homo-Oligomer bildet.

et al. [1992]).

Protein-Protein Wechselwirkungen können zu einer Änderung der kinetischen Eigenschaften führen, d. h. zu einer Änderung in der Substratbindung, der Katalyse oder der allosterischen Eigenschaften eines Protein-Komplexes. Desweiteren können sie die Leitung der Substrate an ihren Wirkort („substrate channeling“), die Bildung neuer Bindungsstellen, die (In)aktivierung eines Proteins und die Änderung in der Spezifität von Protein zu Substrat bewirken. Solche Wechselwirkungen können mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden. Es existieren chemische (Cross-Linking), biochemische (Affinitätschromatographie, Affinitätsblotting, Immunpräzipitation) molekularbiologische (Protein-Sonden, Phagen-Display, Two-Hybrid und andere Methoden, die auf einer Genbibliothek basieren) und genetische (Suppressor-Screens, Synthetisch letale Effekte, Überexpressions-Phänotypen und Effekte, die auf einer Akkumulierung nichtkomplementierender Mutationen beruhen) Methoden. Im folgenden Text wird hauptsächlich auf die Methoden näher eingegangen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

1.5.1 Chemische Methoden

1.5.1.1 Cross-Linking Die Bindungspartner werden beim Cross-Linking über Linker kovalent miteinander verknüpft. Dies wird über die Verbindung mit ei-

nem spaltbaren bifunktionellen Reagenz der Art RSSR' ermöglicht, welches durch ein Reduktionsmittel gespalten werden kann (Traut et al. [1989]). Die Architektur von Protein-Komplexen kann somit mit Hilfe einer zwei dimensional SDS-Elektrophorese ermittelt werden, indem man die erste Dimension ohne und die Zweite mit einem Reduktionsmittel durchführt. Diese Methode kann auch in Kombination mit anderen Methoden *in vivo* durchgeführt werden, wenn man Linker verwendet, die die Zellwand durchdringen können. Die Zellen werden nach der Interaktion aufgeschlossen und die Zellbestandteile mittels Immunpräzipitation analysiert. Diese Kombinationsmethode wurde auch zur Detektion eines 60 kDa Proteins verwendet, welches mit dem Ras-Protein interagiert (de Gunzburg et al. [1989]).

1.5.2 Biochemische Methoden

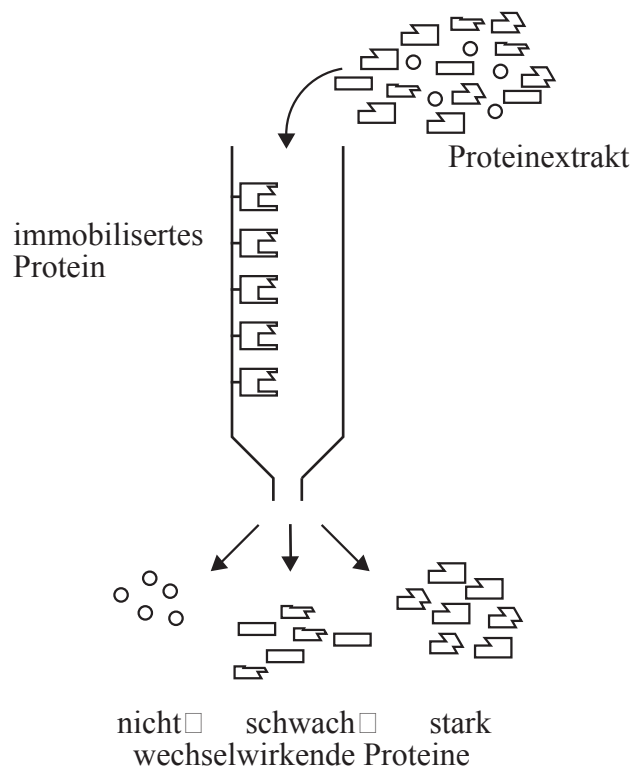


Abbildung 5: Affinitätschromatographie. Ein Proteinrohextrakt wird auf eine Säule gegeben, die das interagierende Protein immobilisiert enthält. Proteine, die nicht interagieren laufen durch die Säule durch, interagierende Proteine werden gebunden. Je nach Elutionsbedingungen werden zuerst schwach und zuletzt stark gebundene Proteine eluiert.

1.5.2.1 Affinitätschromatographie Bei der Affinitätschromatographie wird ein gereinigtes Protein spezifisch und reversibel an einem matrixgekoppelten Bin-

dungspartner adsorbiert (z. B. Antigen an Antikörper oder Enzym an Coenzym). Dieser Bindungspartner wird kovalent an eine Matrix gebunden und dient somit als immobilisierter Ligand. Beispiele für gruppenspezifische Liganden sind die an Sepharose gekoppelten bakteriellen Proteine A und G, welche an die F_c -Region von IgG-Molekülen binden. Die Glutathion S-Transfersase, ein monospezifischer Ligand, ist für die Affinitätschromatographie besonders gut geeignet, da sich mit ihr in *E. coli* exprimierte Fusionsproteine über eine Glutathion-Sepharose Säule reinigen lassen (Smith and Johnson [1998]). Diese Methode wurde zum ersten Mal verwendet, um Proteine zu finden, die mit den verschiedenen Formen der *E. coli* RNA Polymerase interagieren (Ratner [1974]). Der immobilisierte Ligand wird mit einem Proteinextrakt inkubiert, gewaschen und anschließend das gebundene Protein eluiert. Das Protein kann durch kompetitive Verdrängung aus der Bindung (z. B. Verdrängung von Glykoproteinen durch Zucker von einer Lectinsäule) oder durch Konformationswechsel des Proteins (z. B. durch Änderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke, Cofaktoren oder SDS) eluiert werden (Beeckmann and Kanarek [1981], Formosa et al. [1991], Miller et al. [1991]). Die zu bindenden Proteine können vor der Inkubation mit dem Liganden markiert werden, so daß eine höhere Sensitivität erreicht werden kann, da Proteinfragmente und nicht kovalent gebundene Untereinheiten nicht mehr detektiert werden. Die Affinitätschromatographie ist eine Trennmethode mit der größten Sensitivität. Es können Wechselwirkungen mit einer Dissoziationskonstante K_M von bis zu 10^{-5} M (Formosa et al. [1991]) detektiert werden. Dies stellt jedoch auch ein Nachteil dieser Methode dar, da nur Dissoziationskonstanten bis 10^{-3} M biologisch relevant sind. Durch die Verwendung nativer Proteinrohextrakte bleibt die Aktivität der Proteine erhalten, so daß sie nahezu wie in ihrer biologischen Umgebung miteinander um Bindungsstellen konkurrieren. Ein in *E. coli* exprimiertes Protein, welches als immobilisierter Ligand verwendet wird, ist jedoch eventuell biologisch nicht aktiv, da in *E. coli* keine posttranslationalen Modifikationen vorgenommen werden und der N-terminus des Fusionsproteins blockiert ist. Spezifische Interaktionen von Proteindomänen können mittels Mutationen ermittelt werden (Cohen et al. [1993], Truant et al. [1993]). Mit dieser Methode werden jedoch auch Proteine detektiert, die indirekt über andere Proteine interagieren oder *in vivo* aufgrund der verschiedenen Kompartimente in der Zelle niemals aufeinander treffen. Deshalb müssen Interaktionen, die mit dieser Methode gefunden wurden, durch andere Methoden bestätigt werden.

1.5.2.2 Affinitätsblotting Beim Affinitätsblotting wird ein Proteinrohextrakt mittels einer PAGE (**P**oly**a**crylamid-**G**eleelektrophorese) nach dem Molekulargewicht aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Diese Membran wird dann

mit einem Protein, Peptid oder auch anderen Liganden inkubiert. Dies entspricht im wesentlichen dem Western-Blotting oder auch Immunoblotting (3.10.5), bei dem zur Detektion der Proteine Antiserum verwendet wird. Bei der PAGE darf kein SDS (Natriumdodecylsulfat) verwendet werden, da die Proteine sonst denaturiert werden und dadurch ihre biologische Aktivität verlieren. In Ausnahmefällen können die denaturierten Proteine jedoch auch wieder renaturiert werden. Ein großer Vorteil dieser Methode besteht darin, daß selbst unlösliche Membranproteine, wie zum Beispiel Oberflächenrezeptoren der Zelle (Soutar and Wade [1990]) analysiert werden können.

1.5.2.3 Immunpräzipitation Die Immunpräzipitation ist ein Spezialfall der Affinitätschromatographie (1.5.2.1). Ein Antiserum wird hierbei durch Bindung an einen matrixgekoppelten Liganden, z. B. Protein A-Sepharose, präzipitiert. Das Serum wird zumeist zuerst mit einem Proteinextrakt inkubiert, wobei bei der Antigen-Antikörper Reaktion ein unlösliches Aggregat entsteht und ausfällt. Dieses Aggregat kann durch Kopplung des Antikörpers an eine Matrix vom restlichen Proteingemisch abgetrennt und aufgereinigt werden. Durch die Verwendung eines monoklonalen oder aufgereinigten Antikörpers kann sichergestellt werden, daß der reine Antikörper und keine Verunreinigung des Serums in der Lage ist, das Protein zu fällen. Zur Analyse von Protein-Protein Wechselwirkungen wird ein nativer Proteinextrakt verwendet, so daß Proteine, die mit dem Antigen interagieren mit ausgefällt werden (Coimmunopräzipitation).

1.5.3 Molekularbiologische Methoden

1.5.3.1 Protein-Sonden Bei dieser Methode werden Zellkolonien auf Nitrocellulosefiltern herangezogen, lysiert und mit einer markierten Protein-Sonde inkubiert. Anstatt einer Protein-Sonde kann auch ein Antiserum verwendet werden (Young and Davis [1983]). Zumeist wird zur Expression der zu untersuchenden Proteine eine *E. coli* Gen-Bibliothek verwendet, eine Methode, die jedoch auch mehrere Nachteile beinhaltet. Es muß sicher gestellt sein, daß die Proteine in *E. coli* richtig gefaltet werden und man muß berücksichtigen, daß in *E. coli* keine posttranslationalen Modifikationen stattfinden. In einer λ gt11 *E. coli* Bibliothek werden die Proteine mit der β -Galaktisidase fusioniert und durch Induktion des Promotors mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) exprimiert.

1.5.3.2 Phagen-Display Phagen können auf ihrer Zelloberfläche Fusionsproteine exprimieren (Smith [1985]). Diese Proteine dürfen jedoch nicht zu groß sein,

da der Phage sonst nicht mehr in der Lage ist, den entsprechenden Wirt zu infizieren. Die Phagen können in ihrem Wirt angereichert werden, so daß große genomische Bibliotheken konstruiert werden können (10^9 - 10^{10}). Zudem lassen sich die Phagen mittels einer Affinitätsreinigung bis zu einer Konzentration von über 10^{13} Phagen pro Milliliter Eluat aufreinigen (Devlin et al. [1990]). Wie bei der Verwendung von Prokaryonten wie *E. coli* kann auch bei dieser Methode nicht sicher gestellt sein, daß die Fusionsproteine richtig gefaltet werden. Posttranslationale Modifikationen finden ebenfalls nicht statt.

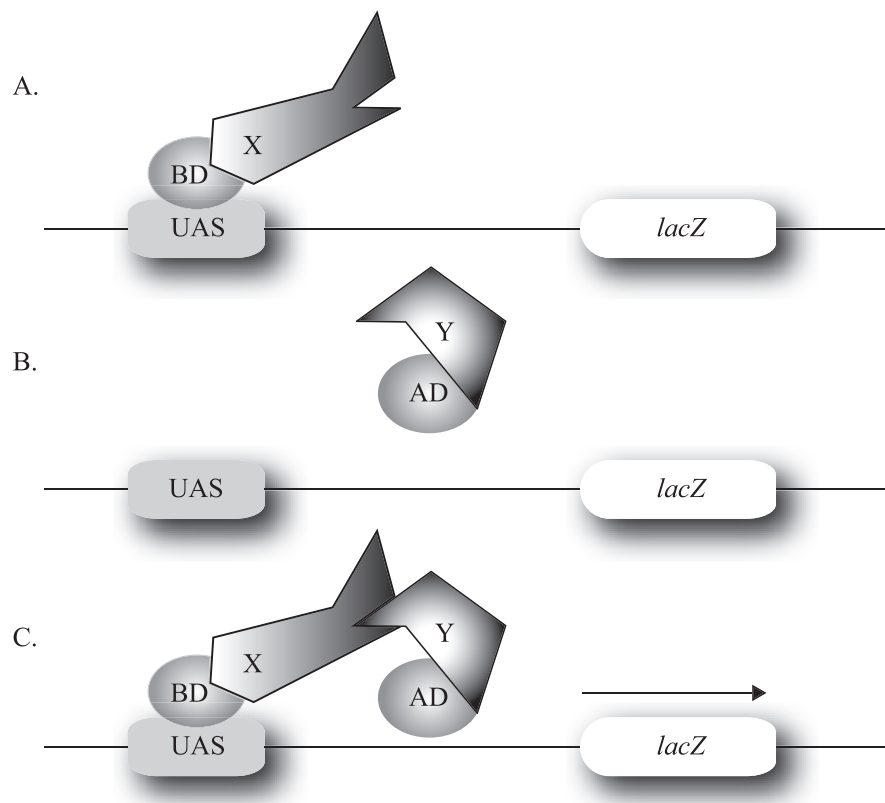


Abbildung 6: Das Two-Hybrid System. (A) Die DNA-Bindedomäne (BD), die mit einem Protein X fusioniert ist, ist nicht in der Lage die Transkription des Reportergens (hier: *lacZ* aus *E. coli*) ohne die Aktivierungsdomäne (AD) zu starten. (B) Die mit einem Protein Y fusionierte Aktivierungsdomäne (AD) kann die Transkription des Reportergens nicht starten, da sie nicht an der entsprechenden Stelle lokalisiert ist. (C) Die Aktivierungsdomäne (AD) und die DNA-Bindedomäne (BD) werden durch die Interaktion der Proteine X und Y an der Up-Stream Aktivatorsequenz (UAS) zusammengeführt, so daß die Transkription des Reportergens gestartet werden kann.

1.5.3.3 Two-Hybrid System Das Two-Hybrid System (Fields and Sternglanz [1994], Chien et al. [1991], Fields and Song [1989]) stellt eine genetische Methode zum Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen *in vivo* dar, es ist jedoch

kein Phänotyp der Zelle wie bei anderen genetischen Systemen erforderlich. Es verwendet eukaryontische Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel das Gal4-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae*, welches aus zwei trennbaren funktionellen Domänen besteht (Durfee et al. [1993], Chien et al. [1991]). Die DNA bindende Domäne (BD) interagiert mit einer spezifischen Up-Stream-Aktivatorsequenz (UAS) und bindet somit das Protein in der Nähe einer Transkriptionseinheit oder eines Promotors, z. B. am mit Galaktose induzierbaren *GAL1*-Promotor (Abb. 6). Zur Funktion des Transkriptionsfaktors ist eine zweite unspezifische Domäne notwendig, die Aktivierungsdomäne (AD), die die Transkription durch Interaktion mit dem basalen Transkriptionsapparat auslöst (Brent and Ptashne [1985], Hope and Struhl [1986], Keegan et al. [1986]). Dabei wird die Expression eines Reportergens gesteuert, welches analytisch meßbar sein muß. Als Reportergen wird zum Beispiel das *lacZ*-Gen aus *E. coli* verwendet, welches für das Enzym β -Galaktosidase kodiert (Fields and Song [1989]). Dieses Enzym katalysiert die Oxidation des farblosen X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-galactopyranosid) zu 5-Brom-4-chlorindigo, einem blauen Farbstoff. Zusätzlich können an das Reportergen Selektionsmarker wie *LEU2*, *HIS3* oder *TRP1* angehängt werden, was das Screenen einer genomischen Bibliothek erheblich erleichtert, da außer einer Farbreaktion auch eine Selektion nach Proliferation stattfindet (Durfee et al. [1993]). Bei der Verwendung des *HIS3* Selektionsmarkers kann der Hintergrund von schwach interagierenden Proteinen zusätzlich durch den kompetitiven Inhibitor 3-Aminotriazol weitgehend unterdrückt werden.

Da für die Funktion des Transkriptionsfaktors keine kovalente Bindung zwischen den beiden Domänen bestehen muß, reicht die Interaktion von Proteinen, die mit den Domänen fusioniert sind, zur Expression des Reportergens aus. Die Fusionsproteine müssen dabei vollständig exprimiert, korrekt gefaltet und in den Kern transportiert werden. Zudem darf die Bindungsstelle, die für die Protein-Protein Wechselwirkungen notwendig ist, nicht vom Transkriptionsfaktor besetzt sein. Das Fusionsprotein einer Domäne darf außerdem nicht in der Lage sein, die Transkription alleine zu aktivieren. Die gefundenen Interaktoren müssen anschließend in heterologen biochemischen oder biologischen Systemen getestet werden, um festzustellen, ob sie auch unter physiologischen Bedingungen interagieren. Zur Feststellung, ob die Interaktoren unter diesen Bedingungen überhaupt in räumlichen Kontakt kommen können, eignet sich besonders die Immunfluoreszenz.

Diese Methode kann theoretisch in allen eukaryontischen Zellen angewendet werden. Hauptsächlich wird sie aber in Hefezellen oder zum Teil auch in Säugerzellen durchgeführt (Dang et al. [1991]). Sie eignet sich zur Analyse der Wechselwirkung zweier bekannter Proteine und zum Screenen einer genomischen Bibliothek.

Hierfür sind fast alle Proteine geeignet, jedoch sind Membranproteine mit diesem System nur schwer erfassbar. Extrazelluläre Proteine und Proteine, die für die Transkription zuständig sind, können mit dieser Methode nicht analysiert werden. Ein bekanntes Beispiel für diese Methode ist das Studium von Onkogenen und Tumorsuppressoren, sowie der Kontrolle des Zellzyklusses. Hiermit konnte die Wechselwirkung zwischen dem Ras-Protein und der Raf-Proteinkinase nachgewiesen werden (Zhang et al. [1993]).

1.5.4 Genetische Methoden

Genetische Methoden können nur dann angewendet werden, wenn ein Phänotyp der Zelle bekannt ist oder ein Phänotyp aufgrund von Protein-Protein Wechselwirkungen erwartet wird.

1.5.4.1 Extrogene Suppressoren Suppressoren sind Proteine, die in der Lage sind den Phänotyp einer Mutante zu komplementieren. Dies kann entweder aufgrund einer unphysiologisch hohen Menge an Suppressorprotein in einer Zelle geschehen, oder aufgrund einer Mutation des Suppressors, welche die Mutation in einem anderem Protein wieder aufhebt. Ein Beispiel für den ersten Fall ist das Aut7-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae*, welches den Defekt in der Autophagocytose der *aut2-1* Mutation komplementiert (Lang et al. [1998]).

Da Mutationen in einem Suppressor-Gen nicht zwangsläufig zu einem Phänotyp führen, werden oft Temperatur-sensitive Mutanten verwendet (Jarvik and Botstein [1975]). Mit dieser Methode wurden Kälte sensitive Zellteilungszyklus-Mutanten (*cdc^{ts}*) aus *Saccharomyces cerevisiae* isoliert, um Temperatur sensitive Revertanten zu isolieren (Moir et al. [1982]).

1.5.4.2 Synthetisch-letal Screen Beim synthetisch-letal Screen werden mutierte Proteine mit Hilfe einer genomischen Bibliothek in einer nicht letalen Mutante exprimiert. Dies führt meist zum Absterben der Zelle, wenn beide Proteine für die gleiche essentielle Funktion benötigt werden. Zumeist werden diese Screens mit der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Hierfür gibt es einen „colony-sectoring Assay“, bei dem Zellen, die ein bestimmtes Plasmid tragen rot und die Zellen ohne Plasmid weiß erscheinen (Hieter et al. [1985], Koshland et al. [1985]). Eine Kolonie, die ein nicht essentielles Gen auf einem Plasmid trägt, erscheint rot und weiß, da die Zelle das Plasmid ohne Schaden verlieren kann. Ist dieses Plasmid für das Überleben der Zelle essentiell, so erscheint die Kolonie vollständig rot.

1.6 Zellzyklus

Proliferierende Zellen durchlaufen einen Teilungszyklus (Zellzyklus), der bei Säugern 10-24 Stunden, bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ca. 90 Minuten dauert. Der Zellzyklus beginnt mit dem Übergang der Zelle von der G₁-Phase (GAP1) in die S-Phase (Synthese der DNA), wo die DNA dupliziert wird. Während dieser Phase bilden sich in *Saccharomyces cerevisiae* Tochterknospen aus. In der G₁-Phase wächst die Zelle durch Synthese von RNA, Proteinen und anderen Zellbestandteilen. Die Dauer dieser G₁-Phase ist variabel und kann von einer G₀-Phase unterbrochen werden. Ausdifferenzierte Zellen, die nicht mehr wachsen, gehen in die G₀-Phase über, wo sie auf zunächst Dauer verbleiben. Nur Mitose auslösende Signale (z. B. Wachstumsfaktoren oder Tumurviren) können einen erneuten Übergang in die G₁-Phase auslösen und nach Überschreitung eines Restriktionspunktes („point of no return“) tritt die Zelle in die S-Phase ein. An die S-Phase schließt sich eine G₂-Phase (Ruhephase) an, in der sich die Zelle auf die Mitose vorbereitet. Die G_x-Phasen sind sogenannte Interphasen.

Die Mitose ist in mehrere Abschnitte unterteilt. Nach der Interphase geht die Zelle in die Prophase über, in der die Chromosomen kondensieren und die Centriolenpärchen in entgegengesetzte Richtung wandern und somit die Pole der Teilungsspindel festlegen. Die Kernmembran löst sich aufgrund der Phosphorylierung des Lamins auf. Zudem findet eine Verdoppelung der Centrosomen und deren Transport zu den gegenüberliegenden Kernpolen statt. Die Schwesterchromatidenpärchen werden an von gegenüberliegenden Spindelpolen ausgehenden Mikrotubuli angeheftet. In der Metaphase werden die Chromosomen in die Äquatorialebene angeordnet. Die Chromosomen teilen sich in der Anaphase und je ein Chromatid wandert zum entgegengesetzten Pol. In der Telophase bildet sich aufgrund der Dephosphorylierung des Lamins wieder eine Kernmembran, so daß sich zwei neue Kerne ausbilden können. Anschließend teilt sich während der Cytokinese auch das Cytosol und zwei neue Zellen entstehen.

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* läuft dieser Zellzyklus etwas modifiziert ab. Die Ruhephase ist in *Saccharomyces cerevisiae* im Gegensatz zu anderen Eukaryontenzellen zytologisch nicht klar unterscheidbar und biochemisch kaum definiert. Zellteilungsschritte, die in anderen Eukaryonten nur in der G₂-Phase oder in der Mitose ablaufen, wie z. B. die Verdoppelung der Spindelpolkörper, der Aufbau der mitotischen Spindel und die Aktivierung B-Typ Zyklin abhängiger Kinasekomplexe werden in *Saccharomyces cerevisiae* während der S-Phase ausgeführt (Deshaies [1995]). Außerdem bleibt die Kernhülle in Hefezellen während der Mitose erhalten.

1.6.1 Kontrolle des Zellzyklus

Der Zellzyklus wird durch Interkonversionen reguliert. Interkonversion von Enzymen stellt eine schnellere Kontrolle als die Transkription dar. Hierbei ist ein Schlüsselenzym bereits an seinem Zielort vorhanden und wird aufgrund eines Signals unter Verwendung von „second messengern“ (z. B. cAMP) von einem aktivierenden Enzym aktiviert und mittels eines inaktivierenden Enzyms in seine inaktive Ruheform zurück versetzt. Dies wird zumeist über eine ATP-abhängige Phosphorylierung (z. B. Interkonversion der Glycogen-Phosphorylase) der Enzyme durch Proteinkinasen und Dephosphorylierung durch Phosphatasen erreicht. Die Regulation des Zellzyklus muß einer strengen Kontrolle unterliegen, da Fehler zu einem Absterben der Zelle oder zur Ausbildung schwerer Krankheiten wie die Bildung maligner Tumore führen können (Nowell [1993]). Aufgrund von Kontrollmechanismen ist die Zelle in der Lage auftretende Fehler zu erkennen und nachfolgende Prozesse so lange zu blockieren, bis diese repariert sind (Russell [1998]). Zu diesen Kontrollmechanismen gehört auch die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse mit Hilfe des Proteasoms (Mann and Hilt [2000]).

Der Übergang von der G₂-Phase in die Mitose wird über die spezifische Serin/Threonin-Proteinkinase MPF („**m**aturation **p**romoting **f**actor“) vermittelt. Der MPF phosphoryliert an der Mitose beteiligte Proteine wie z.B. Bestandteile des Chromatins wie das Histon H1, Komponenten des Cytoskeletts wie die Lamine der Kernmembran, Transkriptionsfaktoren, Proteine der Mitosespindel und einige Enzyme. Nach der Beendigung der Mitose wird die Phosphorylierung durch den MPF dadurch beendet, daß seine regulatorische Komponente, das Zyklin, ubiquitinyliert und im Proteasom abgebaut wird (1.3.1)(Glutzer et al. [1991]).

Der MPF ist ein Heterodimeres Enzym bestehend aus einer katalytischen Untereinheit, des Zyklin-abhängigen Kinasekomplexes CDK („**c**yclin **d**eependent **k**inase“ oder p34^{cdc2}), und einer regulatorischen Untereinheit, dem Zyklin, welches phasenspezifisch erscheint und verschwindet (Mendenhall and Hodge [1998]). Der MPF wird erst nach Anlagerung des Zyklins an das CDK aktiv. Die Aktivität wird zusätzlich durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen kontrolliert. Es existieren mehrere unterschiedliche Zykline und Zyklin-abhängige Kinasen (in Hefe nur Cdc28p), die durch unterschiedliche Kombinationen auch den Beginn der Transkription in der G₁-Phase, Überschreiten des G₁-Restriktionspunktes, den Beginn der DNA-Replikation in der S-Phase und andere kinetische Übergänge kontrollieren.

1.7 *Laccaria bicolor*

Pilze: Pilze gehören zu den Eukaryonten und besitzen wie die Pflanzen eine Zellwand, zellsaftgefüllte Vakuolen und sind weitgehend bewegungsunfähig. Sie besitzen jedoch keine photosynthetischen Pigmente, sind chemoorganoheterotroph (C-heterotroph) und besitzen im Gegensatz zu Pflanzen nur einen geringen Grad an morphologischer Differenzierung. Sie wachsen unter aeroben Bedingungen und erhalten ihre Energie aus der Oxidation organischer Substanzen. Mehrzellige Pilze bilden eine Hyphenmasse (Myzel), die apikal wächst. Sie können sich sowohl sexuell als auch asexuell vermehren.



Abbildung 7: Der Pilz *Laccaria bicolor* ist an der oberen Seite des Hutes rot, an der unteren Seite, wo sich die Lamellen befinden, violett gefärbt.

Laccaria bicolor ist ein Vertreter der sogenannten Hutpilze und bildet mit den Wurzeln verschiedener Baumarten, z. B. *Pinus resinosa*, ein Ectomycorrhiza (Harley and Smith [1983], Richter and Bruhn [1998], Richter and Bruhn [1990]). Unter Mycorrhiza versteht man die Symbiose von Baumwurzeln mit Pilzen. Dabei dringen die Pilze in die Wurzeln der Bäume ein und bewirken dort ein verstärktes Wurzelwachstum. Dies ist an bläschen- und bäumchenförmigen Verzweigungen (vesikuläre bzw. arbuskuläre Mycorrhiza) der Wurzeln erkennbar. Der Pilz erhält durch diese Symbiose Assimilationsprodukte der Pflanze und ermöglicht ihr wiederum eine effektivere Absorption von Wasser und Ionen, vor allem gebundenen Stickstoff und Phosphat (Smith et al. [1994]). Zudem erhält sie durch den Pilz Schutz vor Pathogenen und Schwermetallen (Colpaert and Assche [1992], Galli et al. [1994]). Interessant ist diese Symbiose für den Menschen vor allem bei der Anpflanzung von Setzlingen in der Waldpflege und in der Holzwirtschaft (Peterson et al. [1984]). Setzlinge sind aufgrund der Symbiose in der Lage, sich auch auf qualitativ schlechteren Böden anzusiedeln (Boyle and Hellenbrand [1990], Smith and Read [1997]), wobei das Ausmaß der Symbiose von der Art der Symbionten



Abbildung 8: Der Pilz *Laccaria bicolor* geht mit einem Setzling des *Pinus resinosa* eine Symbiose ein.

und ihrer Umgebung abhängig ist (Kropp [1990], Kropp et al. [1987], Wong et al. [1990]).

Der Mechanismus der Interaktion der Symbionten ist noch nicht aufgeklärt und muß noch genauer untersucht werden. Während der Interaktion müssen eine Vielzahl von Genen der Pflanze und des Pilzes an- und abgeschaltet werden (Burgess et al. [1995], Gianinazzi-Pearson and Gianinazzi [1989]). Hierzu gehören zum Beispiel auch jene Gene, die für die Abstoßung eingedrungener Fremdkörper essentiell sind.

2 Themenstellung

Zur Aufklärung der Mechanismen und der Regulation autophagischer Prozesse sind Studien von Protein-Proteinwechselwirkungen notwendig. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit Interaktionspartner der Proteine Aut2p, Aut7p und Aut9p ermittelt werden. Hierfür sollte die Affinitätschromatographie, Coimmunopräzipitation, Überexpression eines Proteins und das Two-Hybrid System verwendet werden.

Zunächst sollte ein GST-Aut7p in *E. coli* exprimiert, mit Hilfe einer Sepharosematrix isoliert und über FPLC aufgereinigt werden. Das gereinigte Aut7-Protein sollte dann zur Ermittlung der 3D-NMR-Struktur verwendet werden. Außerdem sollte das homologe LB-Aut7p aus *Laccaria bicolor* in einen *aut7* Δ -Stamm transformiert und auf Komplementation getestet werden.

Desweiteren sollte ein Antikörper gegen das Aut2-Protein hergestellt und getestet werden. Die Interaktion des Aut2-Proteins mit den Proteinen Aut1p (Schäffeler [1999], Ito et al. [2000], Uetz et al. [2000]) und Aut7p (Lang et al. [1998]) wurde in früheren Arbeiten nachgewiesen und sollte im Rahmen dieser Arbeit mit Aut2-Proteinfragmenten zur Ermittlung interagierender Domänen mit Hilfe des Two-Hybrid Systems weiter untersucht werden. Noch unbekannte Interaktionspartner des Aut2-Proteins sollten mit Hilfe eines Two-Hybrid Screens ermittelt werden.

Interaktionspartner des Aut9-Proteins sollten ebenfalls mit Hilfe eines Two-Hybrid Screens ermittelt und auf Autophagocytosephänotypen hin untersucht werden.

Die *sai2* Δ -Mutante (früher: *aip1* Δ Schäffeler [1999]) sollte auf Wachstum und das überexprimierte Sai2-Protein auf Wachstumsphänotypen in *Aut*-Mutanten hin untersucht werden.

Das zu Syntaxin (t-SNARE) homologe Vam3-Protein, ein integrales Membranprotein, das an der Vakuolenmembran lokalisiert ist, sollte auf eine mögliche Interaktion mit Tubulin hin untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Abkürzungsverzeichnis

BSA	Rinderserumalbumin
bp, kb	(kilo-) Basenpaare
Da, kDa	(kilo-) Dalton
DAPI	4', 6-Diamino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
KAN	Kanamycin
LB	Luria-Broth-Medium für <i>E. coli</i>
M, mM	(milli-)molar
NP-40	Nonidet P-40
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
ONPG	2-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid
ORF	offener Leserahmen
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PGK	Phosphoglyceratkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonsäurefluorid
RNA	Ribonukleinsäure
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylen-diamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
Upm	Umdrehungen pro Minute
xg	x-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl- β -D-galaktosid

3.2 Material

3.2.1 Chemikalien und Bezugsquellen

Soweit nicht anders vermerkt wurden alle Chemikalien in mindestens analysenreiner Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma

(Deisenhofen) bezogen.

Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH	ECL-Detection Kit, Hybond-N ⁺ Membran
Biorad München	PVDF Membran
Boehringer Mannheim	Enzyme zur DNA-Manipulation
MWG-Biotech	synthetische Oligonukleotide
Pharmacia, Freiburg	Glutathion-Sepharose © 4B, pGEX-Vektoren
Qiagen, Hilden	Qiagen DNA und RNA Purification Kits, Qiaex Gel Extraction Kit, One Step RT-PCR Kit
Seikagaku Kyogo, Tokio, Japan	Zymolyase 100-T

3.2.2 Antikörper

anti-AminopeptidaseI, Hase polyklonal	Eurogentec
anti-AUT1, Huhn polyklonal	E. Schäffeler
anti-AUT2, Hase polyklonal	diese Arbeit
anti-HA, Maus monoklonal (12CA5)	BabCo
anti-CarboxypeptidaseY, Maus monoklonal	Molecular Probes
anti-GFP für Western, Hase polyklonal	Molecular Probes
anti-GFP für IF, Hase polyklonal	Clontech
anti-GFP für Western, Maus monoklonal	Clontech
anti-PGK, Maus monoklonal	Molecular Probes
anti-Rindertubulin, Maus monoklonal	BoehringerMannheim
anti- α -tubulin, Maus monoklonal	Sigma
goat-anti-mouse IgG, Cy3 konjugiert	Sigma
goat-anti-mouse IgG, Peroxidase konjugiert	Boehringer Mannheim
goat-anti-rabbit IgG Peroxidase konjugiert	Medac
goat-anti-chicken IgY, Peroxidase konjugiert	Biogenes

3.2.3 Medien

Alle Medien wurden mit deionisiertem Wasser (Millipor) angesetzt und durch 20-minütiges Autoklavieren bei 120°C sterilisiert. Der pH-Wert wurde auf 5,5 (*S. cerevisiae*) bzw. auf 7,5 (*E. coli*) eingestellt. Agarplatten wurden durch Beimischung von 4%-igem Bacto-Agar dem entsprechenden Flüssigmedium zugefügt, so daß sich ein Endgehalt von 2% an Bacto-Agar ergab.

3.2.3.1 Medien für Hefekulturen

YPD (Vollmedium): 1% Yeast Extract
 2% Bacto-Pepton
 2% D-Glucose

Zur Selektion auf Kanamycin wurden YPD-Platten vor dem Ausgießen 200 mg/l Genitacin (Sigma) zugesetzt.

CM : 0,67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids
(synthetisches Medium) 0,4% Dropout Powder
 2% D-Glucose

Dropout Powder: je 1 g Alanin, Arginin, Aspartat, Cystein, Glutamin, Glutamat, Glycin, Isoleucin, Methionin, Prolin, Phenylalanin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin, Myo-Inositol, sowie 0,1 g p-Aminobenzoesäure

MV (Minimalmedium): 0,67% Yeast Nitrogen Base w/o amino acids
 2% D-Glucose

CM- und MV-Medien wurden je nach benötigten Selektionsbedingungen zusätzlich mit 0,3 mM Adenin, 0,3 mM Histidin, 1,7 mM Leucin, 1 mM Lysin, 0,4 mM Tryptophan und 0,2 mM Uracil supplementiert.

YPA (Präsporulationsmedium): 2% Kaliumacetat
 2% Pepton
 1% Yeast Extract

3.2.3.2 Medien für E. coli

LB (Vollmedium): 0,5% Yeast Extract
 1% Bacto-Trypton
 0,5% Natriumchlorid

Zur Selektion auf Plasmide wurde dem fertigen Medium 50 mg/l Ampicillin zugesetzt.

YTG (Vollmedium): 1% Yeast Extract
 1,5% Bacto-Trypton
 0,5% Natriumchlorid
 2% D-Glucose

Zur Selektion auf Plasmide wurde dem fertigen Medium 50 mg/l Ampicillin zugesetzt.

3.3 Dauerkulturen

Für Hefedauerkulturen wurde eine streichholzkopfgroße Hefemenge von einer Agarplatte genommen, in 1 ml sterilem 15%-igem Glycerin suspendiert und bei -80°C aufbewahrt.

E. coli Dauerkulturen wurden durch Mischen von 0,5 ml einer *E. coli* Flüssigkultur mit 0,5 ml 30%-igem Glycerin hergestellt und ebenfalls bei -80°C aufbewahrt.

3.4 Wachstumsbedingungen

Soweit nicht anders vermerkt, erfolgte die Kultivierung von *S. cerevisiae* und *E. coli* nach Standardmethoden (Ausubel et al. 1997, Guthrie und Fink 1991).

Die Bestimmung der erreichten Zelldichte bei Hefekulturen und bei *E. coli* Kulturen erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm gegen reines Medium. Ein OD = 1 entspricht bei Hefezellen ca. einer Zelldichte von $2 \cdot 10^7$ Zellen/ml (abhängig vom jeweiligen Hefestamm).

3.5 Stämme

3.5.1 *E. coli* Stämme

BL21	F ⁻ ompT[lon] hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻)
DH5α	F'/endA1 hsdR17(r _k ⁻ m _k ⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal ^r) relA1 Δ(lacZYA-argF)U169 deoR (Φ80dlacΔ(lacZ)M15)

3.5.2 Hefestämme

WCG4	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 (W. Heinemeyer, Stuttgart)
YMTA	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 pra1Δ::HIS3 (M. Thumm, Stuttgart)
YMS6	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 ade2 Δaut1Δ::ADE2 (M. Schlumpberger, Stuttgart)
YTL9	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut2Δ::KAN (T. Lang, Stuttgart)
YTL10	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut2Δ::KAN

	(T. Lang, Stuttgart)
YMS31	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut3 Δ ::KAN (M. Straub, Stuttgart)
YIS3	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut4 Δ ::KAN (I. Suriapranata, Stuttgart)
YIS4	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut5 Δ ::KAN (I. Suriapranata, Stuttgart)
YTL11	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut7 Δ ::KAN (T. Lang, Stuttgart)
YTL12	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut7 Δ ::KAN (T. Lang, Stuttgart)
YSR3	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut9 Δ ::KAN (S. Reiche, Stuttgart)
YES5	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 sai2 Δ ::KAN (E.Schäffeler, Stuttgart)
PJ69-4 α	Mata trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4 Δ gal80 Δ GAL2-ADE2 Lys2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ (P. James, Madison USA)
Y190a	Mata gal4 gal80 his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3,-112 URA3::GAL \rightarrow lacZ, LYS2::GAL(UAS) \rightarrow HIS3 cyh ^r (S. J. Elledge, Houston USA)
YDB1	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 sai1 Δ ::KAN (diese Arbeit)
YDB2	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 sai1 Δ ::KAN (diese Arbeit)
YDB3	Mata / Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 sai1 Δ ::KAN (diese Arbeit)
YDB4	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 ade2 aut1 Δ ::ADE2 sai1 Δ ::KAN (diese Arbeit)
YDB5	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 ade2 aut1 Δ ::ADE2 sai1 Δ ::KAN (diese Arbeit)
YDB6	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut2 Δ ::KAN sai1 Δ ::KAN (diese Arbeit)
YDB7	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut2 Δ ::KAN sai1 Δ ::KAN (diese Arbeit)
YDB8	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut3 Δ ::KAN sai1 Δ ::KAN (diese Arbeit)
YDB9	Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut9 Δ ::KAN sai1 Δ ::KAN (diese Arbeit)

- YDB10 Mata α his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 sai2 Δ ::KAN sai1 Δ ::KAN
(diese Arbeit)
- YDB11 Mata α his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 ade2 aut1 Δ ::ADE2 sai2 Δ ::KAN
(diese Arbeit)
- YDB12 Mata α his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aip1 Δ ::KAN aut3 Δ ::KAN
(diese Arbeit)
- YDB13 Mata α his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB14 Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB15 Mata α / Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB16 Mata α his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 SAI2::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB17 Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 SAI2::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB18 Mata α his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 ade2 aut1 Δ ::ADE2
SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB19 Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 ade2 aut1 Δ ::ADE2
SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB20 Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut2 Δ ::KAN
SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB21 Mata α his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut2 Δ ::KAN
SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB22 Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut3 Δ ::KAN
SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB23 Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut3 Δ ::KAN
SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB24 Mata α his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut4 Δ ::KAN
SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)

- YDB25 Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut4 Δ ::KAN
SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB26 Mat α his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut5 Δ ::KAN
SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB27 Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut5 Δ ::KAN
SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB28 Mat α his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut7 Δ ::KAN
SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB29 Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut7 Δ ::KAN
SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB30 Mat α his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut9 Δ ::KAN
SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- YDB31 Mata his3-11, 15 leu2-3,112 ura3 aut9 Δ ::KAN
SAI1::HA₃::HIS5(*S. pombe*)
(diese Arbeit)
- SEY6210 Mat α leu2-3,112 ura3-52 his3- Δ 200 trp1- Δ 901
lys2-801 suc2- Δ 9 Gal
(Robinson et al. 1988)

3.6 Oligonukleotide

- AUT9-2H/8-Del1 TCG AGG TTA AGG TGT TAC ACT ACG CTG
TCA TTG AGG AAG TAG CAG CTG AAG CTT
CGT ACG C
(zur Deletion von *SAI1*)
- AUT9-2H/8-Del2 TCT CAT TAC GTG CTA TGC TGC CAC CTC
AAA AGC GTT AGC ATA GGC CAC TAG TGA
ATC TG
(zur Deletion von *SAI1*)

AUT9-2H/8-1	AAG TAG GAA TTC ATG AAT AAA CTT GTT GAT GCC (<i>SAI1</i> mit <i>EcoRI</i> -Schnittstelle)
AUT9-2H/8-2	AGC GTT GTC GAC CTT GAT AAA TTT CTG AAA GTT (<i>SAI1</i> mit <i>SalI</i> -Schnittstelle)
8-Sot	GCT CGT CCA GAT GCT CC (zur Überprüfung der <i>sai1</i> Δ:: <i>KAN</i> Deletion mittels PCR)
Kan P3	GGT TCT GTT AAA GTA GGA CC (zur Überprüfung der <i>sai1</i> Δ:: <i>KAN</i> Deletion mittels PCR)
8-1/ <i>SpeI</i>	AAG TAG ACT AGT ATG AAT AAA CTT GTT GAT GCC (<i>SAI1</i> mit <i>SpeI</i> -Schnittstelle)
8-2/ <i>HindIII</i>	AGC GTT AAG CTT CTT GAT AAA TTT CTG AAA GTT (<i>SAI1</i> mit <i>HindIII</i> -Schnittstelle)
8-2/ <i>XhoI</i>	AGC GTT CTC GAG TCA CTT GAT AAA TTT CTG (<i>SAI1</i> mit <i>XhoI</i> -Schnittstelle)
8/Prom+Term1	ATT GAG GTT GCC CGT GGT TAT TAG TCT GTG G (<i>SAI1</i> mit Promotor und Terminator)
8/Prom+Term2	TAC TAC TCA GTA TAT ACC TAT CCT TCG ATT TGC (<i>SAI1</i> mit Promotor und Terminator)
8-HA-1	TGC GCT TTG CGT GTA TAC GAA AAC TTT CAG AAA TTT ATC AAG GGA GCA GGG GCG GGT GC (zur chromosomalen Integration des <i>SAI1-HA₃</i>)
8-HA-2	ATC TCA TTA CAG TGC TAT GCT GCC ACC TCA AAA GCG TT GAG GTC GAC GGT ATC GAT AAG (zur chromosomalen Integration des <i>SAI1-HA₃</i>)
BI-HA-1	GAC GGC AAT AGA TGC GCT AGA TGT GGA TAT CTG TCG TCA AAA GGA GCA GGG GCG CGT GC (zur chromosomalen Integration des <i>SAI2-HA₃</i>)

BI-HA-2	TCT CCA GTC CTT CCA GCA ACA TGC ACG CCT TGC AAA TGG AGG TCG ACG GTA TCG ATA AG (zur chromosomalen Integration des <i>SAI2-HA₃</i>)
AIP1/Prom+Term1	ATT AAT GAG TTA CTA TCC GGG TTA CAA ATC C (<i>AIP1</i> mit Promotor und Terminator)
AIP1/Prom+Term2	GGA AAA CAA TAT GCT TGG TTC GCT CTT TAT CAC C (<i>SAI2</i> mit Promotor und Terminator)
AIP1-HA-1	GCG CCG TTT GAA AAT GGC GGC AAA CTA AAA GAA GTT GAC AAA GGA GCA GGG GCG GGT GC (zur chromosomalen Integration des <i>SAI2-HA₃</i>)
AIP1-HA-2	ATG TTG AAT AAT GCA CAT TCT GTG CTA AAA TAT ATA CT GAG GTC GAC GGT ATC GAT AAG (zur chromosomalen Integration des <i>SAI2-HA₃</i>)
AUT1-1	ATT ATC GGA TCC ATG ATT AGA TCT ACA CTA AGT (<i>AUT1</i>)
AUT1-2	TTA CTC GAG CCA ACC TTC CAT GGT ATA GTC (<i>AUT1</i>)
AUT1-1 prom	TTT TTA CTC GAT TGT CGC CGA ATT CGT TGG TAG AG (<i>AUT1</i> Promotor)
Tef-prom	CCA TTT TTC TTT CTC TCT TTC TAA TAT ATA AAT TC (<i>TEF</i> Promotor)
API-1	AAA AGA CCC GGG ATG GAG GAA CAA CGT GAA ATA (<i>API</i> mit <i>SmaI</i> -Schnittstelle)
API-2	AAA ATC GCG GCC GCA CAA CTC GCC GAA TTC ATC GT (<i>API</i> mit <i>NotI</i> -Schnittstelle)
GStant2	AGT AGA GGA TCC ATG GAC GAC TTC TTA TCA CGT (<i>AUT2</i> mit <i>BamHI</i> -Schnittstelle)

GST*ant2	TTC CTT CTC GAG GCA TTT TTC ATG AAT AGG ACT (<i>AUT2</i> mit <i>XhoI</i> -Schnittstelle)
Vam3k-1	TTC CCC GAA TTC ATG TCC TTT TTC G (<i>VAM3</i> mit <i>EcoRI</i> -Schnittstelle)
Vam3k-2	TCC CCC AGA TCT ATC ATG TAA ATG (<i>VAM3</i> mit <i>BglIII</i> -Schnittstelle, ohne Membran- domäne)
ACT1-1	ATG GAT TCT GGT ATG TTC TAG CGC TTG CAC C (0,75 kb DNA-Fragment des <i>ACT1</i> -Gens)
ACT1-2	CTA CCG GAA GAG TAC AAG GAC AAA ACG GC

3.7 Vektoren, Plasmide und Genbanken

3.7.1 pRS315 und pRS425

Die pRSXX5 Shuttle-Vektoren (Sikorski and Hieter [1989] Christianson et al. [1992]) enthalten das Ampizillinresistenzgen (*amp*) und den Selektionsmarker *LEU2*. Innerhalb des *lacZ*-Gens befindet sich der Polylinker, so daß die Insertion von DNA mittels eines Blau-Weiß-Screens detektierbar ist. pRS315 ist ein bis zweimal pro Zelle vorhanden, da neben der *ARSH4*-Sequenz die zur Stabilisierung notwendige *CEN6*-Sequenz enthalten ist. pRS425 ist in hoher Kopienzahl (10-30 Kopien) vorhanden, da er die *2μ*-Sequenz enthält. Mit beiden Vektoren kann auf LEU selektioniert werden.

3.7.1.1 pDB1 und pDB2 Die Plasmide pDB1 und pDB2 enthalten das vollständige *SAI1* Gen mit Promotor und Terminator. Das 1,55 kb große DNA-Fragment wurde in die *SmaI* Schnittstelle der Vektoren pRS315 bzw. pRS425 eingefügt.

3.7.1.2 pDB3 und pDB4 Die Plasmide pDB3 und pDB4 enthalten das vollständige *SAI2* Gen mit Promotor und Terminator. Das 1,4 kb große DNA-Fragment wurde in die *SmaI* Schnittstelle der Vektoren pRS315 bzw. pRS425 eingefügt.

3.7.1.3 pDB5 und pDB6 Die Plasmide pDB5 und pDB6 enthalten das vollständige *SAI1* Gen mit Promotor, Terminator, HA-tag und dem *HIS5* Gen aus *S. pombe*. Das 3,2 kb große DNA-Fragment wurde mittels PCR aus chromosomaler DNA des Hefestammes YDB4 amplifiziert und in die *SmaI* Schnittstelle der Vektoren pRS315 bzw. pRS425 eingefügt.

3.7.1.4 pRS426/AUT2 Der Vektor pRS426 entspricht im wesentlichen dem Vektor pRS425. Die Selektion erfolgt jedoch auf URA. Das vollständige *AUT2*-Gen wurde in die *BclI/SacI* Schnittstelle des Vektors pRS426 eingefügt (Lang [1998]).

3.7.2 pGAD-C1, pGAD-C2 und pGAD-C3

Die Vektoren basieren auf dem 6,6 kb großen 2μ -Plasmid pGAD424 (Bartel [1993]), welches den Replikationsursprung (*ori*), das Ampizillinresistenzgen (*amp*) und den Selektionsmarker *LEU2* enthält. Unmittelbar vor dem Polylinker befindet sich eine *GAL4*_(768–881)-Aktivator-domäne unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors. Der *ADH1*-Terminator beendet die Transkription. Mittels PCR wurde die *ClaI* Schnittstelle im *LEU2*-Gen entfernt und eine *ClaI* Schnittstelle im Polylinker eingefügt (James et al. [1996]). Die verschiedenen Leseraster wurden durch Insertion von zwei einzelnen Basenpaaren in die *SmaI* Schnittstelle erzeugt. *EcoRI* ist somit im Polylinker in einem, *SmaI* in zwei und alle anderen Schnittstellen in drei Leseraster vorhanden.

3.7.2.1 pDB10 Das vollständige 1511 bp große *AUT2* Gen wurde im Leseraster in die *EcoRI/SalI*-Schnittstelle des Vektors pGAD-C1 ligiert. Das *AUT2* Gen wurde mittels PCR chromosomaler DNA des Hefestammes WCG4 α erhalten.

3.7.2.2 pDB11 Ein 442 bp großes *AUT2* DNA-Fragment (Fragment 2) wurde im Leseraster in die *BamHI/SalI*-Schnittstelle des Vektors pGAD-C1 ligiert. Das Fragment entstand durch Restriktionsverdau von Fragment 5 (s. pDB14) mit *BamHI/XhoI*.

3.7.2.3 pDB12 Ein 745 bp großes *AUT2* DNA-Fragment (Fragment 3) wurde im Leseraster in die *BamHI/ClaI*-Schnittstelle des Vektors pGAD-C1 ligiert. Das Fragment entstand durch Restriktionsverdau des *AUT2* Gens mit *BamHI/ClaI*.

3.7.2.4 pDB13 Ein 324 bp großes *AUT2* DNA-Fragment (Fragment 4) wurde im Leseraster in die *ClaI/BglII*-Schnittstelle des Vektors pGAD-C1 ligiert. Das Fragment entstand durch Restriktionsverdau des *AUT2* Gens mit *ClaI/BamHI*.

3.7.2.5 pDB14 Ein 766 bp großes *AUT2* DNA-Fragment (Fragment 5) wurde im Leseraster in die *ClaI/SalI*-Schnittstelle des Vektors pGAD-C1 ligiert. Das Fragment entstand durch Restriktionsverdau des *AUT2* Gens mit *ClaI/XhoI*.

3.7.2.6 pDB15 Ein 641 bp großes *AUT2* DNA-Fragment (Fragment 6) wurde im Leseraster in die *BamHI/PstI*-Schnittstelle des Vektors pGAD-C1 ligiert. Das Fragment entstand durch Restriktionsverdau von Fragment 3 (s. pDB12) mit *PstI*.

3.7.2.7 pDB19 Ein 0,75 kb großes *VAM3* DNA-Fragment wurde im Leseraster in die *EcoRI/BglII*-Schnittstelle des Vektors pGAD-C1 ligiert. Das Fragment entstand mittels PCR chromosomaler DNA des Hefestammes WCG4 α . Die Transmembrandomäne am Ende des *VAM3* Gens wurde nicht mit amplifiziert.

3.7.2.8 pDB21 Das Plasmid pDB21 basiert auf dem Vektor pGAD-C1, in den ein 1,1 kb großes Genbankfragment eingefügt ist (3.7.11). Dieses Fragment enthält das *SAI1* Gen ab der Base 34.

3.7.2.9 pDB22 Das vollständige *SAI1* Gen wurde im Leseraster in die *EcoRI/SalI*-Schnittstelle des Vektors pGAD-C1 ligiert. Das *SAI1* Gen wurde mittels PCR chromosomaler DNA des Hefestammes WCG4 α erhalten.

3.7.2.10 pGAD-C3/AUT1 Zur Expression des GAL4AD/Aut1p wurde das Plasmid pGAD-C3/*AUT1* verwendet (Schäffeler [1999]), welches das vollständige *AUT1* Gen enthält.

3.7.2.11 pGAD-C1/AUT7 Zur Expression des GAL4AD/Aut7p wurde das Plasmid pGAD-C1/*AUT7* verwendet (Lang [1998]), welches das vollständige *AUT7* Gen enthält.

3.7.2.12 pGAD-C1/TUB1, pGAD-C1/TUB2 und pGAD-C1/TUB3
Zur Expression der GAL4AD/Tubxp wurden die Plasmide pGAD-C1/*TUBX* verwendet (Lang [1998]), welche die vollständigen *TUB* Gene enthalten.

3.7.3 pGBD-C1, pGBD-C2 und pGBD-C3

Die Vektoren basieren auf dem 5,9 kb großen 2μ -Plasmid pGB-CX (Bartel et al. 1993), welches den Replikationsursprung (*ori*), das Ampizillinresistenzgen (*amp*) und den Selektionsmarker *TRP1* enthält. Unmittelbar vor dem Polylinker befindet sich eine *GAL4*₍₁₋₁₄₇₎-Bindedomäne unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors. Der *ADH1*-Terminator beendet die Transkription. Die verschiedenen Leseraster wurden durch Insertion von zwei einzelnen Basenpaaren in die *SmaI* Schnittstelle erzeugt. *EcoRI* ist somit im Polylinker in einem, *SmaI* in zwei und alle anderen Schnittstellen in drei Leserahmen vorhanden.

3.7.3.1 pDB20 Ein 0,75 kb großes *VAM3* DNA-Fragment wurde im Leseraster in die *EcoRI*-/*BglII*-Schnittstelle des Vektors pGBD-C1 ligiert. Das Fragment entstand mittels PCR chromosomaler DNA des Hefestammes WCG4 α . Die Transmembrandomäne am Ende des *VAM3* Gens wurde nicht mit amplifiziert.

3.7.3.2 pGBD-C1/*TUB2* Zur Expression des GAL4BD/Tub2p wurde das Plasmid pGBD-C1/*TUB2* verwendet (Schäffeler [1999]), welches das vollständige *TUB2* Gen enthält.

3.7.3.3 pGBD-C1/*TUB3* Zur Expression des GAL4BD/Tub3p wurde das Plasmid pGBD-C1/*TUB3* verwendet (Schäffeler [1999]), welches das vollständige *TUB3* Gen enthält.

3.7.4 pAS1-CYH2

Der Vektor pAS1-CYH2 ist ein 8,5 kb großes 2μ -Plasmid (S. J. Elledge) welches den Replikationsursprung (*ori*), das Ampizillinresistenzgen (*amp*), den Selektionsmarker *TRP1* und das *CYH2*-Gen enthält. Hefestämme, die das *CYH2*-Gen enthalten können nicht mehr auf Cycloheximid haltigen Selektionsplatten wachsen. Zudem besitzt der Vektor vor dem Polylinker eine Sequenz, die für das HA-Epitop kodiert, sowie eine *GAL4*₍₁₋₁₄₇₎-DNA Bindedomäne unter der Kontrolle des *ADH1*-Promotors.

3.7.4.1 pAS1-CYH2/*AUT1* Zur Expression des GAL4BD/Aut1p wurde das Plasmid pAS1-CYH2/*AUT1* verwendet (Schäffeler [1999]), welches das vollständige *AUT1* Gen enthält.

3.7.4.2 pAS1-CYH2/AUT2 Zur Expression des GAL4BD/Aut2p wurde das Plasmid pAS1-CYH2/AUT2 verwendet (Lang [1998]), welches das vollständige AUT2 Gen enthält.

3.7.4.3 pAS1-CYH2/AUT7 Zur Expression des GAL4BD/Aut7p wurde das Plasmid pAS1-CYH2/AUT7 verwendet (Lang [1998]), welches das vollständige AUT7 Gen enthält.

3.7.4.4 pAS1-CYH2/AUT9 Zur Expression des GAL4BD/Aut9p wurde das Plasmid pAS1-CYH2/AUT9 verwendet (Lang [1998]), welches das vollständige AUT9 Gen enthält.

3.7.5 pGEX-Vektoren

Die pGEX-Vektoren wurden zur Herstellung von *E. coli* Fusionsproteinen mit der Glutathion-S-transferase (GST) aus *Schistosoma japonicum* erzeugt. Somit können in *E. coli* Fusionsproteine in hohem Maße exprimiert und mit Hilfe der Glutathion-Sepharose 4B aufgereinigt werden. Sie enthalten außer der *amp*-, *ori*- und *lacI^q*-Sequenz den *tac*-Promotor, der unter der Kontrolle von IPTG induzierbar ist. Unmittelbar vor dem Polylinker besitzen die Vektoren eine Thrombin- oder Faktor Xa-Schnittstelle.

3.7.5.1 pDB9 Das vollständige *SAI1* Gen wurde in die *EcoRI/XhoI*-Schnittstelle des Vektors pGEX-4T-1 ligiert. Das *SAI1* Gen wurde mittels PCR chromosomaler DNA des Hefestammes WCG4 α erhalten.

3.7.5.2 pGEX-4T-3/AUT2 Zur Expression des GST-Aut2p wurde das Plasmid pGEX-4T-3/AUT2 verwendet (Lang [1998]), welches das vollständige AUT2 Gen enthält.

3.7.5.3 pGEX-4T-3/AUT7 Zur Expression des GST-Aut7p wurde das Plasmid pGEX-4T-3/AUT7 verwendet (Lang [1998]), welches das vollständige AUT7 Gen enthält.

3.7.5.4 pGEX-4T-3/VAM3 Zur Expression des GST-Vam3p wurde das Plasmid pGEX-4T-3/VAM3 verwendet (Schäffeler [1999]), welches das vollständige VAM3 Gen enthält.

3.7.6 pRN295 und pRN369

Die Vektoren pRN295 und pRN369 (J. Hegemann, Gießen) ermöglichen die Erzeugung aminoterminaler (pRN295) und carboxyterminaler (pRN369) Fusionsproteine mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Sie beinhalten neben dem Strukturgen *GFP*, welches unter der Kontrolle des MET25-Promotors steht, das Ampicillinresistenzgen (*amp*), als Selektionsmarker das *URA3* Gen und das *CEN6/ARSH4* Element. Ein Polylinker vor bzw. nach dem *GFP*-Gen ermöglicht die Fusion mit beliebigen Genen.

3.7.6.1 pDB7 und pDB8 Das vollständige *SAI1* Gen wurde im Leseraster in die *SpeI/HindIII*-Schnittstelle der Vektoren pRN369 bzw. pRN295 ligiert. Das *SAI1* Gen wurde mittels PCR chromosomaler DNA des Hefestammes WCG4 α erhalten.

3.7.6.2 pGFP-N/AUT2 und pGFP-C/AUT2 Zur Expression der GFP-Aut2p wurden die Plasmide pGFP-N/AUT2 und pGFP-C/AUT2 (Lang [1998]) verwendet, die das vollständige *AUT2*-Gen enthalten.

3.7.6.3 pGFP-N/AUT7 und pGFP-C/AUT7 Zur Expression der GFP-Aut7p wurden die Plasmide pGFP-N/AUT7 und pGFP-C/AUT7 (Lang [1998]) verwendet, die das vollständige *AUT7*-Gen enthalten.

3.7.6.4 pGFP-N/AUT9 und pGFP-C/AUT9 Zur Expression der GFP-Aut9p wurden die Plasmide pGFP-N/AUT9 und pGFP-C/AUT9 (Lang [1998]) verwendet, die das vollständige *AUT9*-Gen enthalten.

3.7.7 pT7Blue

Der Vektor pT7Blue enthält neben dem Ampicillinresistenzgen (*amp*), den Replikationsursprung (*ori*), das *lacZ*-Gen und den *T7*-Promotor.

3.7.7.1 pF6.3 Das vollständige 0,65 kb große *LB-AUT7* Gen aus *Laccaria bicolor* wurde in die *EcoRV*-Schnittstelle des Vektors pT7Blue ligiert, wobei diese Schnittstelle zerstört wurde.

3.7.8 pBR401, pBR402 und pBR422

Die Vektoren pBR401, pBR402 und pBR422 basieren auf dem modifizierten pRS 416 Vektor (Mumberg et al. [1995]) und werden zur kontrollierten Expression von Proteinen verwendet. Sie enthalten neben dem Ampizillinresistenzgen (*amp*) den Selektionsmarker *URA3*. pBR401 steht unter der Kontrolle des *ADH*-Promotors, pBR402 unter der Kontrolle des *TEF*-Promotors und pBR422 unter der Kontrolle des *CYC1*-Promotors. Diese Promotoren weisen eine relative niedrige Aktivität auf. Der *CYC1*-Terminator beendet die Transkription in allen drei Vektoren.

3.7.8.1 pDB16, pDB17 und pDB18 Das vollständige 0,65 kb große *LB-AUT7* Gen aus *Laccaria bicolor* wurde in die *EcoRI/XhoI*-Schnittstelle der Vektoren pBR401 und pBR422, sowie in die *EcoRI/SpeI*-Schnittstelle des Vektors pBR402 ligiert. Das *LB-AUT7* Gen wurde durch Restriktionsverdau des Plasmids pF6.3 (3.7.7.1) mit *EcoRI/XhoI* erhalten.

3.7.9 pUG6

Der Vektor pUG6 (Güldener et al. [1996]) wurde zur Herstellung des *SAI1* Deletionskonstruktes mittels der *loxP-KAN^R-loxP*-Kassette verwendet. Er enthält einen Replikationsursprung (*ori*) und das Kanamycinresistenzgen *KAN* unter der Kontrolle von Promotor und Terminator des *TEF*-Gens aus *Ashbya gossypii* (Wach et al. [1994]). Als Selektionsmarker in *E. coli* dient das zusätzlich im Vektor enthaltene Ampicillinresistenzgen (*amp*). Das Kanamycingen wird von den Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase (*LoxP*) flankiert. Die so hergestellte Deletionskassette kann dann durch homologe Rekombination chromosomal in das Genom integriert.

3.7.10 p3XHA-HIS5

Der 4,3 kb große Vektor p3XHA-HIS5 (S. Munro, Cambridge, GB) basiert auf dem Vektor pBluescript II SK. In die *EcoRI/HindIII*-Schnittstelle wurde das dreifach HA-(Haemagglutinin-)Epitop des Influenzavirus, sowie das *HIS5*-Gen aus *S. pompe* als Selektionsmarker eingefügt. Dieses Plasmid dient zur Herstellung HA-Epitop markierter Gene, indem das gewünschte Gen mittels PCR vor die HA-Sequenz eingefügt wird. Die so hergestellte Integrationskassette kann dann durch homologe Rekombination chromosomal in das Genom integriert. Zur Selektion der transformierten DNA in Hefe wird das *HIS5*-Gen mitamplifiziert.

3.7.11 YL2H-Genbank

Genomische Hefe-DNA aus dem Stamm YM706 wurde mit fünf verschiedenen Enzymen (*AciI*, *HinPI*, *MaeII*, *MspI* und *TaqI*) verdaut und in die *ClaI* Schnittstelle der Vektoren pGAD-C1, pGAD-C2 und pGAD-C3 eingefügt (P. James). Die Genbank wurde in *E. coli* DH10B amplifiziert.

Qualitätsdaten der Genbank:

Durchschnittliche Insertgröße	0,5 - 3kb
Prozentualer Anteil der Kolonien mit angegebener Insertgröße	90%
Zahl unabhängiger Klone	$2,3 \cdot 10^6$

Die in dieser Arbeit eingesetzte Genbank-DNA wurde in *E. coli* DH5 α amplifiziert.

3.8 Molekularbiologische Methoden

3.8.1 Vorbehandlung von Glasperlen

200 ml Glasperlen (0,5 mm Durchmesser) wurden über Nacht in 10 M Salzsäure gerührt, mit 0,1 M Tris/HCl-Lösung auf pH 7,5 äquilibriert, mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet.

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

Zur Isolierung großer Mengen an DNA aus *E. coli* und kleinerer Mengen, die zur DNA-Sequenzierung benötigt wurden, wurden die Purification Kits der Firma QIAGEN nach dem entsprechenden Protokoll verwendet

Zur Isolierung kleiner Mengen an DNA mit geringerer Reinheit wurde die alkalische Lyse durchgeführt. Hierzu wurden 1,5 ml einer stationären Zellkultur geerntet, in 150 μ l kalter Lösung I resuspendiert und mit 300 μ l Lösung II 2 Minuten lysiert. Danach wurde die Reaktion mit 450 μ l Lösung III gestoppt und die Suspension 10 Minuten auf Eis gehalten. Anschließend wurde die Suspension 10 Minuten mit 14 000 Upm zentrifugiert und der Überstand zur Fällung der DNA zu 500 μ l Isopropanol gegeben. Nach 5-minütiger Fällung bei Raumtemperatur wurde erneut 5 Minuten mit 14 000 Upm zentrifugiert, die pelletierte DNA mit 400 μ l 70%-igem Ethanol gewaschen und in 50 μ l Wasser oder TE-Puffer aufgenommen.

Lösung I: 25 mM Tris pH 8	Lösung II: 0,2 M NaOH
50 mM Glucose	1% SDS
10 mM EDTA	

Lösung III: 5 M KOAc/HOAc pH 4,8

TE-Puffer: 1 mM EDTA
10 mM Tris/HCl pH 8

3.8.3 Isolierung von Plasmid DNA aus Hefe (Plasmid-rescue)

1,5 ml einer stationären Hefekultur wurden geerntet, mit 500 μ l kaltem Wasser gewaschen und in 200 μ l "Breaking-buffer" resuspendiert. Zur Suspension wurden 200 μ l Glasperlen (0,5 mm Durchmesser 3.8.1), 200 μ l einer Phenol/Chloroformlösung gegeben und 2 Minuten auf dem Vortexer geschüttelt. Anschließend wurde 5 Minuten mit 14 000 Upm zentrifugiert und der wäßrige Überstand in einem neuen Gefäß mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetatlösung und 2,5-fachem Ethanol Volumen versetzt. Die DNA wurde 15 Minuten bei -80°C gefällt, mit 70%-igem kaltem Ethanol gewaschen und in 25 μ l Wasser oder TE-Puffer (3.8.2) aufgenommen.

"Breaking-buffer": 100 mM NaCl
10 mM Tris/HCl pH 8
1m M EDTA
2% Triton X-100
1% SDS

3.8.4 Isolierung von RNA aus Hefe

$5 \cdot 10^7$ Zellen ($OD_{600} = 2,5$) wurden pelletiert, mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen und in 100 μ l PBS-Puffer resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden sofort 1 ml RNAlater hinzugegeben und min 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen dürfen nicht eingefroren werden, da sie sonst nicht mehr sphäroblastiert werden können. Vor dem Aufschluß wurden die Zellen 5 Minuten mit 3000 g zentrifugiert (RNAlater besitzt eine hohe Dichte) und der Überstand vollständig entfernt. Desweiteren wurde der RNAeasy Mini Kit der Firma QIAGEN verwendet.

Zur Verwendung der RNA für eine RT-PCR wurde die DNA mit RNA-freier DNase verdaut, ebenfalls nach dem Protokoll der Firma QIAGEN.

PBS-Puffer: 53 mM Dinatriumhydrogenphosphat
13 mM Natriumdihydrogenphosphat
75 mM Natriumchlorid

3.8.5 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe

Die Isolierung chromosomaler DNA erfolgte nach einem ähnlichen Protokoll wie der „Plasmid rescue“ (3.8.3).

2 ml einer stationären Hefekultur wurden geerntet, mit 500 μ l kaltem Wasser gewaschen und in 200 μ l "Breaking-buffer" (3.8.3) resuspendiert. Zur Suspension wurden 300 μ l Glasperlen (0,5 mm Durchmesser 3.8.1) und 200 μ l einer Phenol/Chloroformlösung gegeben und 3-4 Minuten auf dem Vortexer geschüttelt. Danach wurden 200 μ l Wasser zugegeben und 5 Minuten mit 14 000 Upm zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde in einem neuen Gefäß mit 1 ml kaltem Ethanol versetzt und die DNA 15 Minuten bei -80°C gefällt. Die pelletierte DNA wurde 2 Minuten abzentrifugiert, in 400 μ l TE-Puffer (3.8.2) resuspendiert und mit 30 μ g RNase versetzt. Nach 5 minütigem Verdau bei 37°C wurde die DNA erneut durch Zugabe von 1 ml Ethanol und 10 μ l 7,5 M Natriumacetatlösung gefällt. Anschließend wurde die DNA mit 70%-igem kaltem Ethanol gewaschen und in 50 μ l Wasser bzw. TE-Puffer aufgenommen.

3.8.6 Restriktionsverdau von DNA

Sequenzspezifische Restriktionsenzyme dienen zur Identifizierung und Analyse von DNA-Sequenzen. Die so gespaltene DNA kann zudem spezifisch mit kompatiblen DNA-Enden ligiert werden.

In einer Standardreaktion wurden 1 μ l DNA (ca. 1 μ g) mit 2-5 U der jeweiligen Restriktionsendonuklease(n) (New England Biolabs bzw. Boehringer Mannheim), 1 μ l 10-fach Restriktionspuffer versetzt und auf 10 μ l mit Wasser aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch wurde 1-2 Stunden bei der empfohlenen Temperatur inkubiert.

3.8.7 Agarose-Gelelektrophorese

Einzelne DNA-Fragmente können durch Anlegen eines elektrischen Feldes in Agarosegelen aufgetrennt werden. Hierfür wurden DNA-Proben mit 10 \times Probenpuffer versetzt und in einer Flachbett-Elektrophoresekammer in 0,8-2%-igen Agarosegelen aufgetrennt, welche mit 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt waren. Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 80-100 V. Als Längenstandard wurde die x-kb-Leiter bzw. mit *BstEII* verdaute λ -Phagen DNA verwendet, die DNA unter UV-Licht detektiert und zur Dokumentation fotografiert.

10 \times Probenpuffer: 30% Glycerin
 0,1% EDTA
 0,05% Bromphenolblau
 0,05% Xylencyanol

TAE-Puffer: 1 mM EDTA
 40 mM Tris/HOAc pH 8

3.8.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden zunächst mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (3.8.7), unter UV-Licht detektiert und aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des Qiaex Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN aus dem Gel herausgelöst und aufgereinigt. Sie konnten anschließend ohne weitere Aufarbeitung für molekularbiologische Arbeiten verwendet werden.

3.8.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4-DNA-Ligase eignet sich zur Ligation überhängender Enden (“sticky-ends”) und glatter Enden (“blunt-ends”). Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden im Verhältnis 1:3 bzw. 1:10 in Bezug auf Vektor-DNA zu Insert-DNA dem Reaktionsgemisch zugesetzt. “Sticky-end”-Ligationen erfolgten bei Raumtemperatur, “blunt-end”-Ligationen bei 18°C.

Ligationspuffer: 20 mM Tris/HCl
10 mM Magnesiumchlorid
10 mM Dithiothreitol
0,5 mM ATP

3.8.10 Transformation von *E. coli*

3.8.10.1 Herstellung kompetenter Zellen 1 l LB-Medium wurde mit einer frischen *E. coli* Kultur 1:100 angeimpft und solange bei 37°C inkubiert, bis eine Zelldichte (OD_{600}) von 0,1-0,8 erreicht war. Die Zellen wurden geerntet und 15 - 30 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C 15 Minuten mit 4000 Upm zentrifugiert, das Pellet in 1 l kaltem Wasser resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 20 ml kaltem 10 %-igem Glycerin gewaschen, erneut zentrifugiert und in 2-3 ml kaltem 10 %-igem Glycerin aufgenommen. Die Suspension wurde in Aliquots von 50 μ l aufgeteilt und bei -80°C bis zu 6 Monate aufbewahrt.

3.8.10.2 Transformation durch Elektroporation Die Transformation von *E. coli* wurde ausschließlich mittels Elektroporation (Chassy et al. [1988]) durchgeführt. Mit dieser Methode kann eine Transformationsrate von bis zu 10^{12} Transformanden pro μ g DNA erreicht werden.

Ein Aliquot (50 μ l) kompetenter *E. coli* Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 1 μ l eines Ligationsansatzes oder 0,1 μ l Plasmid DNA versetzt und 1 Minuten auf Eis

in einer Elektroporationsküvette gekühlt. Die Transformation wurde bei $400 \Omega / 25 \mu\text{F} / 2,5 \text{ kV}$ durchgeführt und die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Plasmide, bei denen ein DNA-Insert in das *lacZ*-Gen eines Vektors kloniert wurde, konnten mittels eines β -Galactosidase Tests detektiert werden. Als Substrat für das Enzym wurden zusätzlich pro LB-Ampicillin-Platte $30 \mu\text{l}$ X-Gal (2% in Dimethylformamid) ausplattiert. Zellen, die eine β -Galaktosidase Aktivität besitzen färben sich durch die Bildung eines Indigofarbstoffes blau, während Zellen ohne β -Galaktosidase Aktivität weiß bleiben.

3.8.11 Transformation in Hefe

Hefezellen wurden mit Lithiumacetat kompetent gemacht, da der Eintritt von DNA in die Zelle aufgrund der osmotischen Wirkung der Lithium-Ionen erleichtert wird.

3.8.11.1 “Rapid”-Transformation für Plasmide Eine stecknadelkopfgroße Menge von Hefezellen wurde in $100 \mu\text{l}$ Wasser gewaschen, zentrifugiert und in $50 \mu\text{l}$ Lösung I resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden $5 \mu\text{l}$ ($5 \mu\text{g}$) Carrier-DNA, $1 \mu\text{l}$ Plasmid-DNA und $300 \mu\text{l}$ Lösung II gegeben. Die Suspension wurde mittels pipettieren durchmischt und 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem 30 minütigem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, pelletiert, in $100 \mu\text{l}$ Wasser resuspendiert und auf Selektionsplatten ausplattiert.

10 x Lithiumacetat-Puffer: 1 M LiOAc/HAOAc pH 7,5

Lösung I: 10 x TE-Puffer (3.8.2) und 10 x Lithiumacetat-Puffer mit Wasser verdünnt

Lösung II: 10 x TE-Puffer und 10 x Lithiumacetat-Puffer mit 50 % PEG 4000 verdünnt

Carrier-DNA: ultraschallbehandelte Heringssperma-DNA, einzelsträngig

3.8.11.2 Transformation von DNA-Fragmenten ins Genom 20 ml einer Zellkultur ($\text{OD}_{600} = 0,7-0,8$) wurden pelletiert und mit 1 ml Wasser gewaschen. Die Suspension wurde in $50 \mu\text{l}$ Lösung I (3.8.11.1) resuspendiert und 1 Stunde bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden $5 \mu\text{l}$ Carrier-DNA (3.8.11.1) und $5 \mu\text{l}$ DNA zugegeben, 30 Minuten bei 30°C inkubiert, mit $250 \mu\text{l}$ Lösung II (3.8.11.1)

durchmischt und weitere 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem 30-45 minütigem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, pelletiert, 2 mal mit 125 μ l TE-Puffer (3.8.2) gewaschen und in 2,5 ml YPD resuspendiert. Die Zellen wurden 3-5 Stunden in diesem Medium bei 30°C inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen erneut pelletiert, 2 mal mit 125 μ l TE-Puffer gewaschen, in 100 μ l Wasser aufgenommen und auf 1-5 Selektionsplatten ausplattiert.

3.8.11.3 Genbanktransformation Zur Transformation der „Two Hybrid“-Genbank (P. James) wurde der Stamm Y190 (Elledge) verwendet der das Plasmid pAS1-CYH2/*AUT2* bzw. pAS1-CYH2/*AUT9* enthielt.

In Selektionsmedium stationär gewachsene Zellen wurden so in 500 ml YPD-Medium überimpft, daß in ca. 2 Generationen (3-4 Stunden) die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,5 - 0,8 erreicht wurde. Die Zellen wurden geerntet, mit 100 ml Wasser gewaschen und in 50 ml LiSORB-Puffer 15-30 Minuten bei 30°C inkubiert. Danach wurde erneut zentrifugiert, die Zellen in 625 μ l LiSORB-Puffer resuspendiert und in 100 μ l Aliquots aufgeteilt. Zu jedem Aliquot wurden 100 μ l DNA-Mix zugegeben, die Zellen 30 Minuten bei 30°C inkubiert, mit 900 μ l Lösung II (3.8.11.1) versetzt und weitere 30 Minuten bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einem 10-15 minütigem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, pelletiert, und 5 μ l zur Bestimmung der Transformationsrate auf Selektionsmedium (CM-Trp⁻, Leu⁻) ausplattiert.

Die restlichen Zellen wurden pelletiert, vereint und in 100 ml flüssigem Selektionsmedium (CM-His⁻, Trp⁻, Leu⁻) 1-3 Stunden bei 30°C inkubiert. In dieser Zeit wurde die Transkription des *HIS3* Reportergens aktiviert. Zuletzt wurde erneut zentrifugiert, die Zellen in 6 ml Selektionsmedium (CM-His⁻, Trp⁻, Leu⁻) resuspendiert und je 100 μ l auf Selektionsplatten (CM-His⁻, Trp⁻, Leu⁻ + 23 mM 3-Aminotriazol) ausplattiert.

DNA-Mix: 200 μ l Carrier-DNA (3.8.11.1) wurden 7-10 Minuten bei 95°C inkubiert, mit 800 μ l LiSORB-Puffer versetzt, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit 40 μ l (40 μ g) Genbank-DNA versetzt.

LiSORB-Puffer: 100 mM Lithiumacetat
 10 mM Tris pH 8
 1 mM EDTA
 1000 mM Sorbitol

3.8.12 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion ist es möglich, DNA gezielt zu amplifizieren und zu modifizieren. Synthetische Oligonukleotide (Primer) binden spezifisch an die beiden Enden der zu amplifizierenden DNA. Bis zu einem gewissen Grad können an den 5'-Enden zusätzliche Basenpaare angehängt und somit Schnittstellen eingefügt werden. Ebenso können durch die Auswahl der Primer Mutationen in die DNA-Sequenz eingefügt werden.

Die Bedingungen für eine PCR müssen auf das jeweilige DNA-Fragment abgestimmt werden. Hauptkriterien sind hierfür die Schmelztemperatur und Basenlänge der Primer, sowie die Reinheit und Konzentration des "templates".

Ein typischer PCR-Ansatz sah wie folgt aus:

0,5 μ l	50 ng	„template“-DNA	
1 μ l	100 pmol	Primer	
10 μ l	2 mM	dNTPs	
2 μ l		DMSO	
2 μ l	50 mM	Magnesiumsulfat	
5 μ l		10 \times Puffer	
1 μ l	1 U	Vent-Polymerase	

Der Reaktionsansatz wurde mit Wasser auf 50 μ l aufgefüllt und mit 50 μ l Mineralöl überschichtet.

Ein typisches PCR-Programm für ein 1 kb DNA-Fragment sah am Robocycler der Firma Stratagene wie folgt aus:

95°C	5 min	„hot start“	
<hr/>			
94°C	45 sec	Denaturierung	
55-63°C	45 sec	Annealing	25-40 Zyklen
72°C	2 min	Extension	
<hr/>			
72°C	6 min	final Elongation	

3.8.13 Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR)

Mit Hilfe der RT-PCR kann RNA spezifisch in ihre cDNA transkribiert und amplifiziert werden. Zur Quantifizierung der RNA kann ein äußerer Standard, kompetitive (RT-PCR), mit bekannter Konzentration zugegeben werden. In dieser Arbeit wurde nur ein innerer endogener Standard, das *ACT1*-Gen mit amplifiziert, welches in jeder Wachstumsphase der Zelle in gleichem Ausmaß exprimiert wird.

Mit dem One Step RT-PCR Kit der Firma QIAGEN konnte die Transkription und die Amplifizierung in einem Schritt erfolgen.

Volumen	Komponente	Endkonzentration
10 μl	5 \times Puffer	
2 μl	dNTPs	400 μM
0,5-1 μl	Primer target	0,5-1 μM
0,1-0,5 μl	Primer control	0,1-0,5 μM
2 μl	Enzyme	
1 μl	template-RNA	0,3 μg
2 μl	RNase Inhibitor	5-10 U
10 μl	Q-solution	

Der Reaktionsansatz wurde mit RNase freiem Wasser auf 50 μl aufgefüllt und mit 50 μl Mineralöl überschichtet.

50°C	30 min	Reverse Transkription	
95°C	15 min	Inaktivierung der Reversen Transkription und Aktivierung der Polymerase	
94°C	45 sec	Denaturierung	
60°C	45 sec	Annealing	35-37 Zyklen
72°C	2 min	Extension	
72°C	10 min	final Elongation	

3.8.14 Southern Blot

Die Identifizierung chromosomaler DNA-Fragmente mittels Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden wurde nach dem Southern Blot Verfahren (Southern 1975) durchgeführt. Hierbei wurde chromosomale DNA mit Restriktionsendonukleasen verdaut, die DNA-Fragmente durch Gelelektrophorese (3.8.7) aufgetrennt, auf eine Membran geblottet und mit spezifischen Sonden detektiert.

3.8.14.1 Herstellung markierter Sonden Die DNA-Sonden wurden mittels des „Gene Images random prime labelling module“ der Firma Amersham nach dem Protokoll hergestellt. Hierzu wurden ca. 20 μg eines DNA-Fragments (200-1000 bp) in einem Gesamtvolumen von 50 μl 4 Stunden bei 37°C mit Fluorescein-11-dUTP, Zufallsprimern (synthetisch Hexanukleotide) und Klenow Enzym inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μl 0,5 M EDTA-Lösung gestoppt.

3.8.14.2 Transfer der DNA Chromosomale DNA (ca. 20 g) wurde mit 10 U einer oder mehrerer Restriktionsendonukleasen in einem Gesamtvolumen von 50 μ l verdaut, nach Ethanol-fällung in 10 μ l Probenpuffer aufgenommen und mittels Gelelektrophorese (3.8.7) aufgetrennt. Das Agarosegel wurde 20 Minuten in 0,4 M Natronlauge denaturiert und anschließend mit Hilfe des VacuGene Blotting Systems der Firma Pharmacia auf eine Hybond N⁺-Nylonmembran (Membran muß nicht befeuchtet werden) transferiert. Der Transfer erfolgte 90 Minuten ebenfalls in 0,4 M Natronlauge als Transferpuffer. Die Membran wurde nach dem Transfer in 2 \times SSC-Puffer gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur an Luft getrocknet. Bei der Verwendung einer positiv geladenen Membran muß die DNA nicht mehr fixiert werden.

20 \times SSC-Puffer: 3 M Natriumchlorid
 0,3 M Natriumcitrat pH 7

3.8.14.3 Hybridisierung und Detektion Hybridisierung und Detektion der Membran wurde nach der Vorschrift des "Gene Images random prime labelling module" der Firma Amersham durchgeführt. Die Membran wurde 30 Minuten bei 60°C prehybridisiert und anschließend mit der DNA-Sonde über Nacht bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran bei 60°C gewaschen und die DNA mittels des "Gene Images CDP-Star detection module" der Firma Amersham detektiert.

Hybridisierungspuffer: 5 \times SSC-Puffer
 0,1% SDS
 5% Dextransulfat
 5% Liquid Block

3.9 Zellbiologische und biochemische Methoden

3.9.1 Kreuzung haploider Hefestämme

In haploide Hefestämme unterschiedlichen Paarungstyps wurden Plasmide mit unterschiedlichen Selektionsmarkern transformiert. Die frisch transformierten Stämme unterschiedlichen Matingtypes wurden auf Selektionsplatten zusammen ausgestrichen und zwei Tage bei 30°C inkubiert. Nur diploide Stämme, die beide Plasmide enthielten konnten auf den Selektionsplatten wachsen.

3.9.2 Sporulation und Tetradendisektion

Diploide Hefestämme wurden in YPD-Medium angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. 1 ml der stationären Kultur wurden pelletiert, zweimal mit YPA-

Medium gewaschen und in 3 ml YPA-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden 2-7 Tage bei Raumtemperatur inkubiert, bis 5-20% der Zellen Asci gebildet hatten.

50-100 μ l der sporulierten Zellkultur wurden pelletiert und dreimal mit 100 μ l Wasser gewaschen. Danach wurden die Zellen in 50 μ l Wasser aufgenommen, mit 1 μ l Glusulase-Lösung (DuPont de Nemours) versetzt und die Asci-Zellwand 3-5 Minuten bei 30°C verdaut. Die Reaktion wurde mit 1 ml Wasser gestoppt und die Suspension über Nacht bei 4°C inkubiert.

10-20 μ l der Suspension wurden auf eine YPD-Platte aufgetragen und 10-30 Minuten getrocknet. Die Sporen wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators (Lawrence Instruments) dissektiert und anschließend 2 Tage bei 30°C inkubiert. Die Segregation wurde durch Bestimmung des Paarungstyps und der Auxotrophiemarker überprüft.

3.9.3 Bestimmung des Paarungstyps von *S. cerevisiae* (Matingtest)

Zur Bestimmung des Paarungstyps wurden die zu untersuchenden Hefestämme mit den Testerstämmen 17/14 (Mat α his 1-123) und 17/17 (Mat a his 1-123) zusammen auf MV-Platten ausgestrichen. Nur gematete Stämme konnten auf diesen Platten wachsen, da der Testerstamm die *his1-123* Mutation als alleinigen Auxotrophiemarker besitzt.

3.9.4 Vesikeltest (Test auf Akkumulation autophagischer Vesikel)

Autophagocytosemutanten reichern in ihrer Vakuole unter Hungerbedingungen Vesikel in ihrem Inneren in Anwesenheit eines Proteinase yscB Inhibitors an. Als Inhibitor wurde zumeist PMSF eingesetzt, welches jedoch nach 3-5 Stunden in wässrigem Medium hydrolysiert. Die Vesikel können mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Normarskiptik) nachgewiesen werden. Lysemutanten reichern diese Vesikel auch ohne Verwendung eines Inhibitors an.

1 ml einer Übernachtskultur wurde pelletiert und zweimal mit 1 ml 1%-iger Kaliumacetatlösung gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml 1%-iger Kaliumacetatlösung aufgenommen und mit 1 μ l 100 mM PMSF-Lösung in Ethanol versetzt. Die autophagischen Vesikel bildeten sich bei 30°C innerhalb von 3-5 Stunden.

3.9.5 Untersuchung auf Überlebensfähigkeit unter Hungerbedingungen

Die zu testenden Hefestämme wurden aus einer Vorkultur in Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. 0,5 OD₆₀₀-Units wurden in 1%-iger Kaliumacetatlösung gewaschen und in 10 ml 1%-iger Kaliumacetatlösung aufgenommen. Die Kulturen wurden bei 30°C inkubiert und nach 2-5 Stunden die erste Probe gezogen. Hierzu wurde die Flüssigkultur 1:1 000 bzw 1:10 000 verdünnt und ausplattiert. Weitere Proben wurden nach jeweils 24 Stunden gezogen. Die auf den Platten gewachsenen Kolonien konnten nach 2 Tagen ausgezählt werden. Da die Ergebnisse stark streuen, mußte dieses Experiment mindestens dreimal durchgeführt werden.

3.9.6 Kernfärbung lebender Hefezellen

Die DNA im Kern und auch in den Mitochondrien der Hefezellen können mit Farbstoffen (DAPI bzw. Hoechst 33342-Trihydrochlorid-Trihydrat) angefärbt und im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

100 µl einer Zellkultur wurden pelletiert, mit 100 µl HEPES-Puffer gewaschen und in 100 µl HEPES-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden mit 1 µl Hoechst 33342-Trihydrochlorid-Trihydrat (1 mg/ml in HEPES-Puffer) versetzt und 12-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die überschüssige Farbe durch zweimaliges Waschen mit 100 µl HEPES-Puffer entfernt und die Zellen in 100 µl HEPES-Puffer resuspendiert.

HEPES-Puffer: 10 mM HEPES pH 7,4
 140 mM Natriumchlorid
 2,5 mM Calciumchlorid

3.9.7 Two Hybrid Screen

3.9.7.1 Genbanktransformation Die Genbanktransformation wurde nach dem in 3.8.11.3 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

3.9.7.2 β-Galactosidase-Filter-Test Frisch transformierte Hefekolonien wurden auf mit sterilen Rundfiltern ausgelegten Selektionsplatten replikaplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die mit Hefe bewachsenen Rundfilter wurden ca. 10 Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht, so daß alle Hefekolonien eingefroren waren. Die gefrorenen Filter wurden auf mit 2,5 ml Z-Puffer/XGal-Lösung

getränktes Filterpapier gelegt und bei 30°C 1-5 Stunden inkubiert. In dieser Zeit wurden die meisten lysierten Kolonien blau. Inkubationszeiten über mehr als 8 Stunden führen zu falsch Positiven.

Z-Puffer: 16,1 g/l Na₂HPO₄·7 H₂O
 5,5 g/l NaH₂PO₄·H₂O
 0,75 g/l KCl
 0,25 g/l MgSO₄·7 H₂O
 pH 7, autoklaviert

Z-Puffer/ 100 ml Z-Puffer
 XGal-Lösung 1,67 ml 2%-igem XGal in Dimethylformamid
 0,27 ml β-Mercaptoethanol

3.9.7.3 β-Galactosidase-Flüssig-Test Der β-Galactosidase Flüssig Test erwies sich zumeist zuverlässiger als der β-Galactosidase Filter Test was die Detektion falsch positiver Hefekolonien anging. Er wurde zur Kontrolle mit vorher positiv getesteten Stämmen durchgeführt. Hierzu wurden die Plasmide in den Hefestamm PJ69 4α transformiert.

Die zu testenden Hefekolonien wurden in 500 μl Selektionsmedium (CM-Ade⁻, His⁻, Trp⁻, Leu⁻) in Mikrotitern angeimpft und über Nacht bei 30°C inkubiert. Zu den stationär gewachsenen Kulturen wurden je 140 μl Lysemix zugegeben und die Suspension 20-30 Minuten bei -80°C eingefroren. Die lysierten Zellen wurden 1-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Bei deutlich erkennbarer Gelbfärbung der Positivkontrolle wurde die Reaktion durch Zugabe von 420 μl 1 M Natriumcarbonatlösung gestoppt. Die Gelbfärbung kann mit einem Photometer bei 405 nm gemessen werden.

Lysemix: 124 μl/ml 5% Triton X-100
 776 μl/ml ONPG (c = 10 mg/ml)
 23,3 μl/ml β-Mercaptoethanol
 77,5 μl/ml 2 M Tris pH 7,5

3.9.7.4 Plasmidverlust Bei einem klassischen Plasmidverlust wurden Hefekolonien in Vollmedium (bzw. Selektionsmedium, falls noch weitere Plasmide, die im Hefestamm vorhanden sind, nicht verloren werden sollen) angeimpft und 2 Tage bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Kulturen verdünnt auf YPD- oder Selektions-Platten ausplattiert und nach weitem 2 Tagen auf Selektionsplatten replikaplattiert. Kolonien, die das Plasmid verloren hatten, konnten auf diesen Platten nicht mehr wachsen.

3.9.7.5 Test auf “falsch Positive” Falsch positiv werden solche pGAD-Plasmide genannt, die unspezifisch in der Lage sind mit jedem weiteren pGBD-Plasmid die Reportergene zu aktivieren. Deshalb wurden die haploiden Plasmid tragenden Hefestämme mit drei Testerstämmen gekreuzt und einem weiteren β -Galactosidase-Flüssig-Test unterzogen. Die Kolonien, die wiederum eine Blaufärbung aufwiesen, waren falsch positiv. Als Testerstamm wurde Y187 verwendet, der die Plasmide pAS1-X (X = *lamin*, *CDK2*, *SNF1*) enthält.

3.10 Proteinchemische Methoden

3.10.1 Herstellung von Proteinrohextrakten

3.10.1.1 Aufschluß unter nativen Bedingungen 5 OD₆₀₀-Units Zellen wurden mit 1 ml kaltem Wasser gewaschen und in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7 resuspendiert, so daß eine ca. 30%-ige Zellsuspension entstand (ca. 700 μ l). Die Zellsuspension wurde mit einem Inhibitorgemisch und 300 μ l Glasperlen (3.8.1) versetzt und 30 Minuten bei 4°C auf einem Vortexer geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension 5 Minuten mit 14 000 Upm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C eingefroren.

Inhibitormix: 10 μ l einer 100 mM PMSF-Lösung in Ethanol + 40 μ l des Complete-Inhibitormixes (Boehringer Mannheim) 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7

3.10.1.2 Denaturierende alkalische Lyse 3 OD₆₀₀-Units Zellen wurden mit 1 ml kaltem Wasser gewaschen und in 1 ml Wasser resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 150 μ l Lyselösung versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden mit 80 μ l 110%-iger Trichloressigsäure gefällt, wiederum 10 Minuten auf Eis inkubiert und das Lysat 10 Minuten mit 14 000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 400 μ l Aceton gewaschen, an Luft getrocknet und mit 50 μ l Probenpuffer versetzt. Die Proteine wurden durch Schütteln auf einem Vortexer bei 37°C gelöst.

Lyselösung: 2 ml 1,85 M Natronlauge
150 l β -Mercaptoethanol

Probenpuffer: 1 ml Harnstoffpuffer
100 μ l Tris/HCl pH 9
10 μ l β -Mercaptoethanol

Harnstoffpuffer:	8 M	Harnstoff
	200 mM	Tris/HCl pH 6,8
	100 mM	EDTA
	5 %	SDS
	0,03 %	Bromphenolblau

3.10.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt nativer Rohextrakte (3.10.1.1) wurde nach der Methode von Bradford bestimmt. 100 μ l eines Proteinextraktes wurden mit 1 ml Bradfordlösung gemischt und 5-10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen und der Gehalt an Protein mit Hilfe einer Eichgeraden ermittelt. Die Eichgerade wurde mit einer BSA-lösung der Konzentration 10 μ g/ml erstellt, die in 10 Schritten auf 1 μ g/ml verdünnt wurde.

Bradfordlösung: 100 μ g Coomassie Brilliant Blue G 250 wurden in 50 ml 95%-igem Ethanol über Nacht unter Rühren gelöst, mit 100 ml 85%-iger Phosphorsäure versetzt und mit Wasser auf 1 l aufgefüllt.

3.10.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-PAGE wurde nach der Methode von Lämmli (Lämmli [1970]) in einer Mini-Protean II Elektrophoresekammer (BioRad) durchgeführt. Als Molekulargewichtsmarker wurde der HMW-SDS-Blue Kit (Sigma) eingesetzt.

10-50 μ g eines Proteinextraktes wurden in 10-20 μ l Gesamtvolumen in die Taschen eines Sammelgels gegeben. Native Proteinrohextrakte wurden mit Lämmli-Puffer gemischt, Extrakte aus der alkalischen Lyse direkt in die Taschen eingebracht. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V bis die Lauffront (Bromphenolblaubande) aus dem Gel herausgelaufen war. Danach wurde das Gel aus seiner Halterung entnommen und das Sammelgel entfernt. Die Proteine wurden mittels Western Blotting (3.10.5), Silver Stain (3.10.4.2) oder Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue G 250 (3.10.4.1) detektiert.

6×Lämmli-Puffer:	0,35 M	Tris/HCl pH 6,8
	10,28 %	SDS
	36 %	Glycerin
	0,012 %	Bromphenolblau
	5 %	β -Mercaptoethanol

10×Elektrophoresepuffer: 30 g/l Tris
 144 g/l Glycin
 10 g/l SDS

3.10.4 Anfärbung von Proteinen auf SDS-Gelen

Proteine, die mittels der SDS-PAGE aufgetrennt wurden, wurden durch Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G 250 oder Silver Stain sichtbar gemacht. Die Silberfärbung ist wesentlich empfindlicher und eignet sich deshalb besonders zur Reinheitsüberprüfung von Extrakten mit nur wenigen verschiedenen Proteinen.

3.10.4.1 Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G 250 Polyacrylamidgelen aus der SDS-PAGE (3.10.3) wurden 30 Minuten mit Coomassielösung bei Raumtemperatur auf einem Schüttler angefärbt. Die überschüssige Farbe wurde durch mehrmaliges Waschen mit Entfärberlösung entfärbt und zuletzt mit Wasser neutralisiert.

Coomassielösung: 0,3 g Coomassie Brilliant Blue G 250 wurden in 1 l 10 %-iger Essigsäure gelöst.

Entfärberlösung: 45 % Wasser
 45 % Methanol
 10 % Essigsäure

3.10.4.2 Silver Stain Polyacrylamidgelen aus der SDS-PAGE (3.10.3) wurden nacheinander auf dem Schüttler mit folgenden Lösungen inkubiert:

5 min	Fixierlösung	Essigsäure : Methanol : Wasser (1 : 4 : 5)
5 min	Waschlösung I	Wasser
7,5 min	Sensibilisator	25 % Glutardialdehyd in Wasser
2×5 min	Waschlösung I	Wasser
7,5 min	Waschlösung II	Ethanol : Wasser (2 : 8)
7,5 min	Färbelösung	1 ml 20 % Silbernitratlösung 1 ml 25 % Ammoniaklösung 5 ml 4 % Natronlauge 93 ml 20 % Ethanol
2×5 min	Waschlösung II	Ethanol : Wasser (2 : 8)
3-6 min	Entwickler	100 ml 20 % Ethanol 100 µl 37 % Formaldehyd 25 µl 2,3 M Zitronensäure
5 min	Stabilisator	Glycerin : Essigsäure : Wasser (5 : 10 : 85)

3.10.5 Western Blot

Proteine auf einem Polyacrylamidgel wurden mit Hilfe einer Semitrockenblotapparatur (Fröbel) nach der Methode von Towbin et al. [1979] entweder auf eine PVDF-Membran (PVDF-Protein Sequencing Membrane, BioRad) oder auf Nitrocellulose (Schleicher & Schüll, pH 7,5) transferiert. Filterpapier, Polyacrylamidgel, Membran und wiederum Filterpapier wurden in Blottingpuffer getränkt auf der Blotapparatur übereinandergelegt, die Apparatur verschlossen und mit einem Gewicht fixiert. PVDF-Membranen mußten zuvor in Methanol befeuchtet werden. Die Proteine wurden bei 75 mA pro Gel in 90 Minuten auf die Membran geblottet.

Blottingpuffer: 1,12 g/l Tris
14,4 g/l Glycin
160 ml/l Methanol

3.10.6 Detektion von Proteinen auf Membranen

3.10.6.1 Anfärbung der Proteine mit Ponceau S Proteine, die auf eine Nitrocellulose Membran transferiert wurden, konnten mit Ponceau S-Lösung angefärbt werden. Überschüssige Farbe wurde durch mehrmaliges Waschen mit Wasser entfernt. Die getrockneten Membranen können bei -20°C gelagert werden.

Ponceau S-Lösung: 1% Ponceau S in 1%-iger Essigsäure

3.10.6.2 Anfärbung mit Coomassie Brilliant Blue R 250 Proteine, die auf eine PVDF-Membran transferiert wurden, wurden 5 Minuten in einer Coomassielösung gefärbt. Überschüssige Farbe wurde durch 10-15 minütiges Waschen mit 50%-igem Methanol entfernt. Die getrockneten Membranen können bei -20°C gelagert werden.

Coomassielösung: 0,025% Coomassie Brilliant Blue R 250 in 40%-igem Methanol

3.10.6.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen Proteinhaltige Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen wurden über Nacht in Blocking-Puffer bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit Puffer (PBST- oder TBST-Puffer) 10 Minuten gewaschen und 1-16 Stunden mit dem ersten in Puffer verdünntem Antikörper inkubiert. Danach wurde der überschüssige Antikörper durch dreimaliges 5 minütiges Waschen entfernt und die Membran mit dem zweiten Peroxidase-konjugiertem Antikörper 1 Stunde inkubiert. Die Membran wurde weitere 5 mal gewaschen (1×15 Minuten und 4×5 Minuten) und die Antikörperbanden

mittels des ECLTM-Detektionssystems der Firma Amersham detektiert. Die Detektion erfolgte genau nach dem Protokoll der Herstellerfirma des Kits.

PBST-Puffer: 100 mM Natriumchlorid
 80 mM Kaliumphosphat pH 7,4
 0,1 % Tween 20

TBST-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,6
 137 mM Natriumchlorid
 0,1 % Tween 20

Blockingpuffer: 10 % Magermilchpulver in PBST- oder TBST-Puffer.

3.10.7 Isolierung und von GST-Fusionsproteinen

GST-Fusionsproteine wurden nach dem Protokoll des GST-Gene Fusion System der Firma Pharmacia exprimiert, isoliert und gereinigt.

E. coli Kulturen des Stammes BL21, die ein pGEX-Plasmid enthielten, wurden in 100 ml YTG-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die stationären Kulturen wurden pelletiert und in 1 l frischem vorgewärmtem YTG-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden wiederum bei 37°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 1-2 erreicht war. Dann wurde 1 ml 100 mM IPTG zugegeben und die Zellen weitere 2-6 Stunden bei 25-37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 4°C 10 Minuten mit 8 000 Upm zentrifugiert und das Pellet auf Eis in 50 ml kaltem PBS-Puffer resuspendiert und die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen. Die Suspension wurde mit 2,5 ml 20%-igem Triton X-100 versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden mit 10 000 Upm 10 Minuten abzentrifugiert und der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zum Lysat wurde 1 ml der 50%-igen Glutathione Sepharose 4B in PBS-Puffer gegeben und das Gemisch 30 Minuten bei Raumtemperatur sanft geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension 5 Minuten mit 500 g sedimentiert und dreimal mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen. Die beladene Glutathione Sepharose 4B Säule konnte als 50%-ige Suspension in PBS-Puffer bei 4°C gelagert werden.

Die Fusionsproteine wurden entweder

→ zur Affinitätschromatographie verwendet (3.10.9),

→ mittels einer SDS-PAGE weiter aufgereinigt, geblottet, die Bande auf der Nitrocellulose ausgeschnitten und zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet,

→ oder das Fusionsprotein mit Thrombin auf der Glutathion Sepharose 4B Säule verdaut und das Protein mittels einer FPLC weiter aufgereinigt (3.10.8).

PBS-Puffer: 140 mM Natriumchlorid
2,7 mM Kaliumchlorid
10 mM Dinatriumhydrogenphosphat
1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat pH 7,3

3.10.8 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

2,5 mg GST-Fusionsprotein (maximale Ausbeute bei der Verwendung von 1 ml 50%-iger Glutathion Sepharose 4B Suspension) wurden auf der Säule mit 50 μ l Thrombinlösung in 950 μ l PBS-Puffer über Nacht bei Raumtemperatur verdaut. Die Suspension wurde mit 500 g sedimentiert und der Überstand über eine FPLC-Säule (Superose 12, 30 cm) weiter aufgereinigt.

Laufpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7
100 mM Natriumchlorid

3.10.9 Affinitätschromatographie

20 OD₆₀₀ Units Zellen eines Hefestammes wurden unter nativen Bedingungen aufgeschlossen und 2-4 Stunden bei 4°C mit einer beladenen Glutathione Sepharose 4B Säule unter sanftem schütteln inkubiert. Die Suspension wurden 2 Minuten mit 500 g sedimentiert und mit PBS-Puffer (3.10.7) mit ansteigender Natriumchloridkonzentration (16 mM, 32 mM, 64 mM, 125 mM, 250 mM und 500 mM an Natriumchlorid) gewaschen. Die noch gebunden Proteine wurden auf der Säule mit 50 μ l Lämmli-Puffer (3.10.3) eluiert und je 10 μ l mittels SDS-PAGE und Western Blotting analysiert.

3.10.10 Affinitätschromatographie mit Rindertubulin

Die Affinitätschromatographie mit Rindertubulin wurde analog nach dem Protokoll der Affinitätschromatographie (3.10.9) durchgeführt. Statt eines nativen Proteinrohextraktes wurden 30 μ g Rindertubulin (Sigma) in 80 μ l PEM-Puffer mit 0,5 μ l 10 mM Taxol 10 Minuten bei 37°C mit der Säule inkubiert. Die Säule wurde gewaschen, das gebundene Protein mit Lämmli-Puffer eluiert und analysiert.

PEM-Puffer: 100 mM PIPES-NaOH pH 6,6
1 mM EGTA
1 mM Magnesiumsulfat
100 mM GTP

3.10.11 Immunfluoreszenz

Alle Lösungen und Medien wurden vor der Verwendung sterilfiltriert, um die Bildung von fluoreszierenden Maillard-Verbindungen zu verhindern. Die Immunfluoreszenz wurde in Anlehnung an das von Pringle et al. [1989] vorgestellte Verfahren durchgeführt. Die Objektträger wurden während der gesamten Prozedur in einer feuchten Kammer aufbewahrt, nach Zugabe des zweiten Antikörpers im Dunkeln.

1 ml einer Zellkultur wurden durch Zugabe von 125 μ l 1 M Kaliumphosphatpuffer und 140 μ l 30%-iger Formaldehydlösung 2 Stunden bei Raumtemperatur und unter vorsichtigem Schütteln fixiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert, dreimal mit 500 μ l SP-Puffer gewaschen und in 1 ml SP β -Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden mit 15 μ l Zymolyase T100-Lösung versetzt und 30 Minuten bei 30°C sphäroblastiert. Danach wurden die Zellen erneut pelletiert, dreimal mit 1 ml SP-Puffer gewaschen und in 1 ml SP-Puffer resuspendiert. Die Sphäroblasten können ca. eine Woche bei 4°C aufbewahrt werden.

20 μ l Sphäroblastensuspension wurden auf mit poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgetropft und die nach 30 Minuten gebundenen Zellen dreimal mit 20 μ l PBS-Puffer gewaschen. Danach wurden die Zellen 5 Minuten mit 20 μ l PBT-Puffer und 2 Stunden mit 15 μ l des ersten Antikörpers (1:100 bis 1:1 000 in PBT) inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch achtmaliges Waschen mit 20 μ l PBT-Puffer entfernt und die Zellen mit 15 μ l des zweiten Antikörpers (1:200 bis 1:1 000 in PBT) 1,5 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden erneut einmal mit 20 μ l PBT-Puffer und achtmal mit 20 μ l PBS-Puffer gewaschen. Zuletzt wurden die Zellen mit 4 μ l Citifluorlösung und einem Deckglas bedeckt, welches mit Nagellack abgedichtet wurde. Die so präparierten Zellen können ca. eine Woche aufbewahrt und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops analysiert werden.

Kaliumphosphatpuffer: 81,1 g/l Dikaliumhydrogenphosphat
172,7 g/l Kaliumdihydrogenphosphat pH 6,5

SP-Puffer: 1,2 M Sorbitol
0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,5

SP β -Puffer: SP-Puffer
20 mM β -Mercaptoethanol

PBS-Puffer: 53 mM Dinatriumhydrogenphosphat
13 mM Natriumdihydrogenphosphat
75 mM Natriumchlorid

PBT-Puffer: PBS-Puffer
 1 % BSA
 250 μ l/l Nonidet P40

Citifluorlösung: 40 μ l/ml DAPI (c = 1 μ g/ml)
 Citifluor

3.10.12 Immunpräzipitation

20-50 OD₆₀₀-Units Zellen wurden pelletiert, mit 1 ml kaltem Wasser gewaschen und in 400 μ l Lysepuffer resuspendiert. Die Zellen wurden nach Zugabe von 20 μ l Inhibitormix (3.10.1.1) und 100 μ l Glasperlen (3.8.1) 30 Minuten bei 4°C auf einem Vortexer lysiert. Das Lysat wurde durch 5 minütiges zentrifugieren bei 4°C mit 13 000 Upm von den Zelltrümmern abgetrennt, mit weiteren 400 μ l Lysepuffer versetzt und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 3-8 μ l Antikörperserum 2-16 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wurden 50 μ l 5 %-ige Protein A Sepharose in Lysepuffer zugegeben und die Suspension weiter 1,5 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die beladene Protein A Sepharose sedimentiert, fünfmal mit 500 μ l Lysepuffer gewaschen und in 50-100 μ l Harnstoffpuffer (3.10.1.2) aufgenommen.

Lysepuffer: 50 mM HEPES pH 7
 50 mM Kaliumacetat
 5 mM Magnesiumacetat
 100 mM Sorbitol

4 Ergebnisse

4.1 Das Aut7-Protein

4.1.1 Isolierung des Aut7p zur 3D-Strukturermittlung

Das Aut7-Protein sollte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des GST-Gene Fusion System (3.10.7) isoliert werden, um mit dem gereinigten Protein eine 3D-Strukturermittlung mittels NMR durchführen zu lassen. Das GST-Aut7p konnte erfolgreich im *E. coli* Stamm BL21, einem Proteasen defizienten Stamm, exprimiert werden und nach der Bindung an eine Glutathion Sepharose 4B Säule das Aut7-Protein durch Thrombinverdau abgespalten werden. Das isolierte Protein wurde mit PBS-Puffer dialysiert und auf einer FPLC-Säule (3.10.8) weiter aufgereinigt. Der Peak des Aut7p liegt bei einer Superose12-Säule mit 30 cm und einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min bei einem Eluierungsvolumen von 16,3 ml. Die Reinheit dieses Proteins wurde durch eine Silberfärbung (3.10.4.2) eines SDS-PAGels überprüft (Abb. 9).

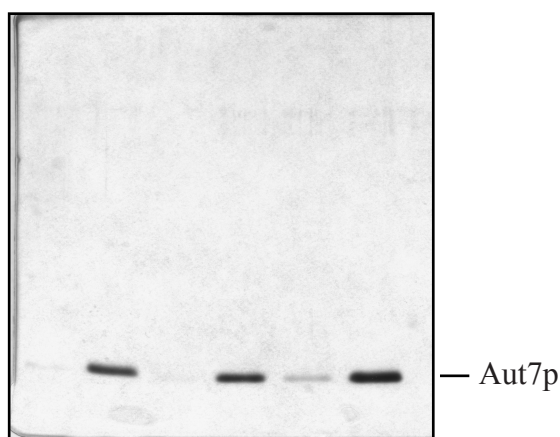


Abbildung 9: Silverstain. Verschiedene Fraktionen des FPLC gereinigten Aut7-Proteins wurden mittels SDS-Page aufgetrennt und das Gel mit Silber angefärbt. Die verschiedenen Proben weisen keine Verunreinigungen mehr auf.

Mit dieser Methode wurden ca. 5,4 mg Aut7-Protein hergestellt und zur Analyse gegeben. Leider konnte kein Spektrum des Proteins aufgenommen werden, da es nach einiger Zeit in dem verwendeten Puffer ausfiel. Die Kristallstruktur des in Säuger homologen GATE-16 ist inzwischen (Paz et al. [2000]) veröffentlicht.

4.1.2 *Laccaria bicolor*

Der das Aut7-Protein kodierende ORF in *Saccharomyces cerevisiae* besitzt Homologien zu verschiedenen bekannten Spezies. Das Aut7p ist zu 77% identisch

mit dem LB-Aut7p des Hutpilzes *Laccaria bicolor*, der z. B. mit den Wurzeln des *Pinus resinosa* ein Ectomycorrhiza bildet (1.7). Das Gen, welches für das Protein LB-Aut7 kodiert, wird wenige Stunden nach Beginn der Interaktion zwischen Pilz und Wurzel angeschaltet (Kim et al. [1999a], Kim et al. [1999b]). Kim et al. untersuchten mittels eines *in vitro* Systems die unterschiedlichen mRNA-Level des freien Pilzes und des Pilz-Pflanze-Symbionten. Sechs Stunden nach Beginn der Interaktion wurde die poly(A⁺) RNA des Pilzes isoliert und mit ihr eine cDNA-Bank, basierend auf dem Phagen Vektor lambdaZAP, hergestellt. Diese Genbank wurde mit einem cDNA-Fragment, welches mittels einer DDRT-PCR („differenziell display reverse transcriptase PCR“) vervielfältigt wurde, untersucht. Dabei konnten drei unterschiedliche Plasmide, PF6.1, PF6.2 und PF6.3, isoliert werden. Das Plasmid PF6.3 enthält den vollständigen ORF, der für ein Protein mit 197 Aminosäuren kodiert, eine vorrausichtliche Molekülmasse von 22,8 kDa und einen pI von 8,2 besitzt. Im Gegensatz zu dem löslichen Aut7p aus *Saccharomyces cerevisiae*, besitzt das LB-Aut7p vielleicht eine Membrandomäne, die bei der Aminosäure 175 beginnt.

Zusätzlich wurde eine „Northern Blot“- und eine „Southern Blot“-Analyse des freien Pilzes, der freien Wurzel des *Pinus resinosa* und des Ectomycorrhiza durchgeführt, wobei als Sonde der PF6.3 Klon verwendet wurde. Die *LB-AUT7* kodierende RNA konnte nur in Symbiontenzellen nachgewiesen werden, was die Beteiligung dieses Genproduktes an der frühen Interaktion zwischen *Laccaria bicolor* und *Pinus resinosa* bestätigte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktionalität des *LB-AUT7*-Gens aus *Laccaria bicolor* in Bezug auf das *AUT7*-Gen aus *Saccharomyces cerevisiae* untersucht. Das *LB-AUT7*-Gen wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI/XhoI* aus dem Plasmid PF6.3 ausgeschnitten, in drei verschiedene centromere Vektoren unterschiedlicher Promotoraktivität (*CYC1*, *ADH* und *TEF*; Promotoraktivität 0,9:3,0:47,9) kloniert (pDB18, pDB16 und pDB17) und in die Hefestämme *aut7Δ* und *aut2-1* transformiert. Die Vektoren (Mumberg et al. [1995]) pRS416-CYC1 und pRS416-ADH wurden ebenfalls mit *EcoRI/XbaI* und pRS416-TEF mit *EcoRI/SpeI* verdaut. Die transformierten Zellen wurden auf ihre Überlebensfähigkeit bei Hungerung, Reifung der Aminopeptidase I und auf Akkumulation von Vesikeln unter Hungerbedingungen in Anwesenheit des Proteinase B Inhibitors PMSF getestet. Diese *Aut*-Phänotypen werden in einer *aut7Δ* und einer *aut2-1* Mutanten durch Expression des Aut7p auf centromeren- und 2μ-Plasmiden komplementiert (Lang et al. [1998]).

4.1.2.1 Überleben bei Hungerung Alle *Aut*-Mutanten und Proteinase A defizienten Stämme in *Saccharomyces cerevisiae* weisen gegenüber dem Wildtyp eine verminderte Fähigkeit auf, bei Hungerung zu überleben (Straub et al. [1997], Schlumpberger et al. [1997]). Nach sechstägiger Hungerung in einer 1%-igen Kaliumacetatlösung (3.9.5) überleben unter den beschriebenen Bedingungen ca. 70% der Wildtypzellen und 5% der Zellen des *aut7Δ*- und *pep4Δ*-Deletionsstammes. Das LB-*Aut7p*, welches unter der Kontrolle des *TEF*-Promotors auf dem Plasmid pDB17 exprimiert wird, verbessert die Überlebensrate des *aut7Δ*-Deletionsstammes auf das Niveau, welches durch Expression des *Aut7p*-GFP in diesen Stamm erreicht wird (Abb. 10). Dies entspricht mit ca. 60% nahezu der Überlebensrate des Wildtypstammes. Um eine Beteiligung des leeren *CEN*-Plasmids an diesem Effekt ausschließen zu können, wurde die Überlebensrate des *aut7Δ*-Deletionsstammes mit diesem Plasmid ebenfalls bestimmt. Es konnte hierbei keine Abweichung der Überlebensrate im Vergleich zur *aut7Δ*-Mutante festgestellt werden.

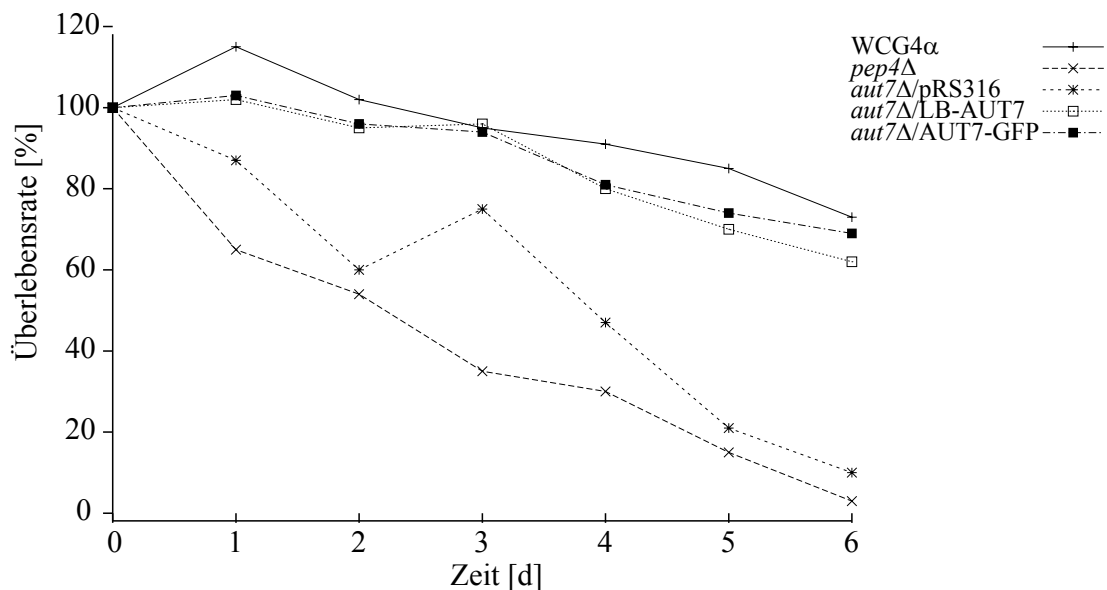


Abbildung 10: Überlebensrate. Das Plasmid pDB17 (*aut7Δ/TEF::LB-AUT7*) kann den Defekt des *aut7Δ*-Deletionsstammes in Bezug auf seine Überlebensrate bei Hungerung komplementieren.

4.1.2.2 Reifung der Aminopeptidase I Die Aminopeptidase I (API) ist eine vakuoläre Proteinase, die unabhängig vom sekretorischen Weg in die Vakuole transportiert und dort gereift wird (1.2.2.4). Alle *Aut*-Mutanten außer den *aut6Δ*- und *aut4Δ*-Deletionsstämmen sind nicht mehr in der Lage diese Proteinase zu reifen. Die Reifung der API ist an ihrem verminderten Molekulargewicht, 45 kDa (mAPI: 50 kDa im SDS-Gel) statt 57 kDa (pAPI: 61 kDa im SDS-Gel) erkennbar.

Stationäre und frühstationäre Zellen der Stämme WCG4 α , *aut7* Δ und *aut2-1*, die das leere *CEN*-Plasmid bzw. die *LB-AUT7* tragenden Plasmide pDB18, pDB16 und pDB17 enthalten, wurden mittels alkalischer Lyse (3.10.1.2) aufgeschlossen und die Proteine durch SDS-PAGE (3.10.3) aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet (3.10.5) und die API mit einem polyklonalen Peptidantikörper detektiert.

Das LB-Aut7p ist unter der Kontrolle des *TEF*-Promotors nahezu vollständig in der Lage den Defekt in der Reifung der API in stationären und frühstationären Zellen des *aut7* Δ -Deletionsstammes zu komplementieren (Abb.11). Die Promotoren *CYC1* und *ADH* sind hierfür zu schwach. In der *aut2-1* Mutante wird dieser Defekt nur teilweise aufgehoben. Da auch der untransformierte *aut2-1* Stamm diesen Befund gelegentlich aufweist (Lang [1998]), lassen sich hieraus keine eindeutigen Schlüsse ziehen. In stationären Zellen wird im Gegensatz zu den frühstationären Zellen die API teilweise auch durch die Expression des LB-Aut7p unter der Kontrolle der Promotoren *CYC1* und *ADH* gereift, jeweils entsprechend ihrer Promotoraktivität (Kim et al. [1999b]).

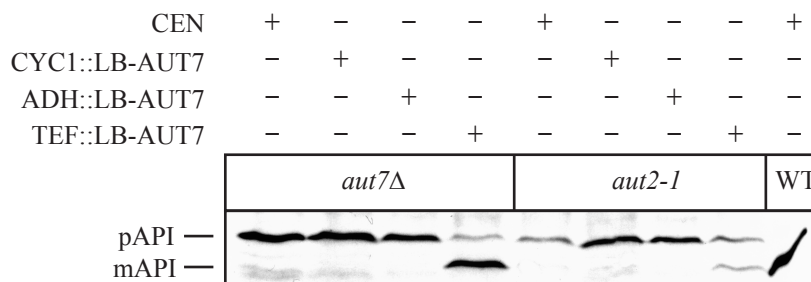


Abbildung 11: Reifung der Aminopeptidase (API). Das LB-Aut7p ist unter der Kontrolle des relativ starken *TEF*-Promotors in der Lage den Defekt in der Reifung der API des *aut7* Δ -Deletionsstammes in stationären Zellen zu komplementieren. Die Komplementation der *aut2-1* Mutante ist nur unvollständig.

4.1.2.3 Akkumulierung autophagischer Vesikel in der Vakuole In der Gegenwart der Proteinase B Inhibitors PMSF reichern sich in Wildtypzellen unter Hungerbedingungen autophagische Vesikel innerhalb der Vakuole an. Alle *Aut*-Mutanten außer den Lysemutanten *aut5* Δ (Teter et al. [2000], Epple et al. [2001]) und *aut4* Δ (Suriapranata et al. [2000]), weisen in ihrer Vakuole unter diesen Bedingungen keine Vesikel auf, da sie nicht mehr in der Lage sind Vesikel zu bilden oder zu transportieren. Stationäre Zellen der Stämme WCG4 α , *aut7* Δ /GFP-N/*AUT7* und *aut7* Δ /*TEF::LB-AUT7* (pDB18) wurden mit 1%-Kaliumacetatlösung gewaschen und vier Stunden in 1%-iger Kaliumacetatlösung, die 1mM PMSF enthielt,

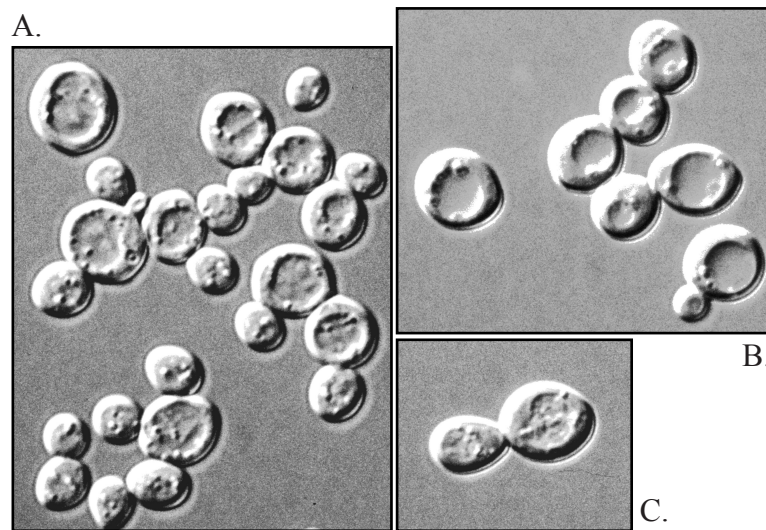


Abbildung 12: Vesikeltest. Das LB-Aut7p ist unter der Kontrolle des relativ starken *TEF*-Promotors (C) in gleicher Weise wie das GFP-Aut7p unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors (A) in der Lage den Defekt im Vesikeltransport zu komplementieren. (B) *aut7Δ*.

bei 30°C inkubiert (3.9.4). Danach wurden die Zellen unter dem Mikroskop mit der Nomarskiptik betrachtet.

Der Defekt in der Vesikelbildung bzw. im Vesikeltransport kann in der *aut7Δ*-Mutante durch die Expression eines GFP-Aut7p unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors und des chromosomalen Aut7p unter der Kontrolle des nativen Promotors (Lang [1998]) komplementiert werden. Das LB-Aut7p unter der Kontrolle des *TEF*-Promotors ist ebenfalls in der Lage diesen Defekt zu beheben (Abb.12).

4.2 Das Aut2-Protein

4.2.1 Überleben bei Hungerung

Die Überlebensrate des *aut2Δ*-Deletionsstammes unter Hungerbedingungen wurde nach dem gleichen Protokoll wie bei 4.1.2.1 beschrieben ermittelt. Da der Zeitraum, indem die Zellen absterben, aufgrund minimaler Umgebungs- und Analysenbedingungen abweicht, wurde als relative Kontrolle die Überlebensrate des *aut7Δ*- und des *pep4Δ*-Deletionsstammes neben der des Wildtypstamms WCG4α bestimmt. Der *aut2Δ*-Deletionsstamm weist wie alle *Aut*-Mutanten und Proteinase A defizienten Stämme in *Saccharomyces cerevisiae* gegenüber dem Wildtyp eine verminderte Fähigkeit auf, bei Hungerung zu überleben (Abb. 13).

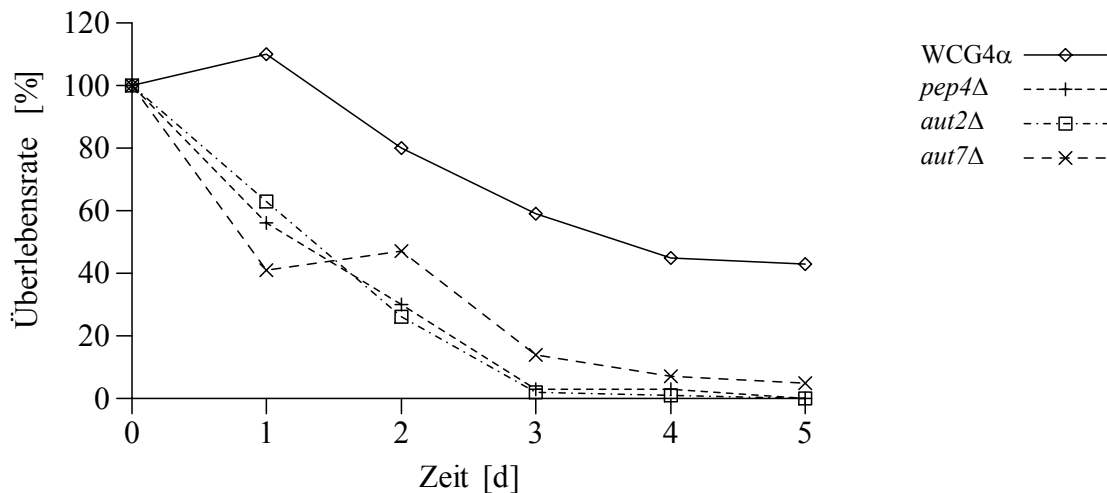


Abbildung 13: Überlebensrate. Der *aut2Δ*-Deletionsstamm weist unter Hungerbedingungen eine verminderte Fähigkeit zu überleben auf.

4.2.2 Herstellung polyklonaler Antikörper gegen das Aut2-Protein

Polyklonale Antikörper lassen sich durch die Immunisierung von Tieren mit dem gewünschten Antigen herstellen. Mit Hilfe dieser Antikörper können Proteine innerhalb der Zelle mittels Immunfluoreszenz lokalisiert und ihre Expression durch „Western-Blotting“ (3.10.5) analysiert werden. Im Falle des Aut2p-Antikörpers wurde ein Kaninchen mit einem GST-Aut2p auf Nitrocellulose immunisiert, welches mit Hilfe des GST-Gene Fusion System (3.10.7) hergestellt wurde. Das GST-Aut2p wurde in *E. coli* des Stammes Bl21 exprimiert, welche das rekombinante Plasmid pGEX-4T-3/*AUT2* (Lang [1998]) enthielten. Die Expression des löslichen Proteins erfolgte bei 25°C unter der Kontrolle des *tac*-Promotors, welcher durch das Lactose ähnliche Isopropyl- β -D-thiogalaktosid (IPTG) induziert wird. Die Isolierung eines annähernd reinen Proteins erfolgte durch Bindung an eine Glutathion Sepharose Säule. Das an die Sepharose gebundene Glutathion besitzt eine zur Glutathion S-Transferase (GST) komplementäre Bindungsstelle und ist somit geeignet GST oder auch GST-Fusionsproteine spezifisch zu binden. Da das Aut2p mehrere Thrombinschnittstellen aufweist, konnte des GST vom isolierten Fusionsprotein nicht abverdaut werden. Zur weiteren Aufreinigung des Proteins wurden die von der Säule eluierten Proteinbestandteile mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Proteine auf der Membran wurden mit Ponceau S angefärbt und die dickste Bande, die das GST-Aut2p enthielt und bei den erwarteten 83 kDa lag, ausgeschnitten. Das Aut2p besitzt ein Molekulargewicht von 57 kDa, das GST ein Molekulargewicht von 26 kDa.

Das zweite „large bleeding“ des immunisierten Kaninchens enthielt ausreichend

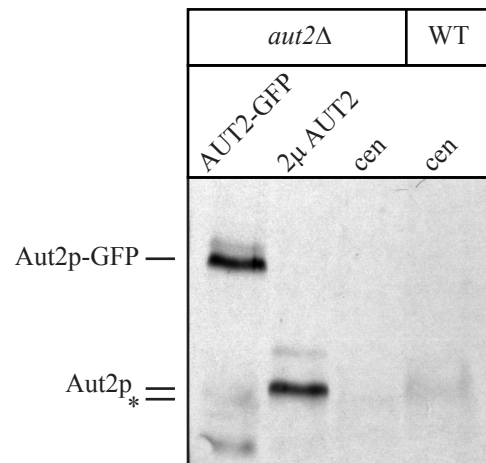


Abbildung 14: Western Blot. Der polyklonale Antikörper gegen das Aut2-Protein ist in der Lage das überexprimierte Aut2p und das Aut2p-GFP zu detektieren. Die mit * gekennzeichnete Bande ist eine Kreuzreaktion, die sich fast auf der gleichen Höhe befindet wie die Bande des Aut2-Proteins.

Antikörper gegen das GST-Aut2p, um das Aut2p durch „Western Blot“ Analysen detektierbar zu machen. Dazu wurden native und alkalische Rohextrakte von Wildtypzellen und Zellen des *aut2Δ*-Deletionsstammes, die die verschiedenen Plasmide enthielten, hergestellt. In den *aut2Δ*-Deletionsstämmen wurde das Aut2p auf einem 2μ-Plasmid (pRS426/*AUT2*) und das Aut2p-GFP auf einem *CEN*-Plasmid unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors (pRN369/*AUT2*) exprimiert. Das Aut2p läuft in einem SDS-PAGE-Gel mit ca. 65 kDa etwas höher als das berechnete Molekulargewicht von 57 kDa, das Aut2p-GFP mit 100 kDa ebenfalls höher als das berechnete Molekulargewicht von 84 kDa (Abb.14). Das im Wildtyp exprimierte Protein ist nur schwach erkennbar, zudem läuft knapp unterhalb der Aut2p-Bande die Bande einer Kreuzreaktion.

4.2.3 Interaktionen des Aut2-Proteins

Die Funktion eines Proteins ist oft einfacher aufzuklären, wenn Interaktionspartner bekannt sind. Solche Protein-Protein Interaktionen können mittels verschiedener Methoden nachgewiesen werden (1.5). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Interaktoren mit dem Aut2-Protein mittels der Affinitätschromatographie (1.5.2.1) und des Two-Hybrid-Systems (1.5.3.3) untersucht.

4.2.3.1 Interaktion des Aut2-Proteins mit dem Aut9-Protein Die Interaktion des Aut2-Proteins mit dem Aut9-Protein wurde in Rahmen dieser Arbeit mit zwei verschiedenen Methoden untersucht, der Affinitätschromatographie und

dem Two-Hybrid Systems (1.5). Die Affinitätschromatographie (1.5.2.1) wurde mit Hilfe einer Glutathion-Sepharose 4B-Matrix durchgeführt, an die der monospezifische Ligand Glutathion S-Transferase bindet. Mit dieser Methode lassen sich Proteine, die am Carboxyterminus mit der Glutathion S-Transferase fusioniert sind, in *E. coli* exprimieren und aufreinigen. Das Two-Hybrid-System (1.5.3.3), welches bei dieser Arbeit verwendet wurde, beruht auf der Interaktion von Proteinen, die zum einem mit der DNA-Bindedomäne von *GAL4* (pGBD) und zum anderen mit der *GAL4* Aktivierungsdomäne (pGAD) fusioniert sind. Interagierende Proteine können somit die Transkription des Reportergens *lacZ* aus *E. coli* starten, dessen Proteinprodukt, die β -Galactosidase, in einer Farbreaktion mit X-Gal (blau 3.9.7.2) oder ONPG (gelb 3.9.7.3) nachgewiesen werden kann. Zusätzlich sind an das Reportergen die Selektionsmarker *HIS3* und *ADE2* angehängt. Der Nachweis der Interaktion wurde im Hefestamm Y190a mit X-Gal, im Hefestamm PJ69-4 α mit ONPG durchgeführt. Der Nachweis mit ONPG war zuverlässiger und wurde in allen Two-Hybrid Experimenten außer den Two-Hybrid Screens verwendet.

Das GST-Aut2-Protein (4.2.2) und das reine GST-Protein wurde mit Hilfe des GST-Gene Fusion System in *E. coli* hergestellt, an eine Glutathion-Sepharosematrix gebunden und mit einem nativen Rohextrakt des Stammes *aut9* Δ /pGFP-N/*AUT9* vier Stunden bei 4°C inkubiert (3.10.7 und 3.10.9). Das GFP-Aut9p ist biologisch aktiv und kann das Wildtypprotein vollständig ersetzen (Noda et al. [2000], Lang et al. [2000]). Das an GFP fusionierte Aut9p ist im Gegensatz zum reinen Aut9p teilweise löslich und befindet sich in der löslichen Fraktion des nativen Rohextraktes. Die Matrix mit den gebundenen Proteinen wurden gewaschen und so die nicht bindenden Proteine von der Säule eluiert. Schwach gebundenen Proteine wurden mit PBS-Puffern ansteigender Natriumchloridkonzentratione (3.10.9) von der Säule gewaschen. Zuletzt wurde die Säule in Lämmli-Puffer inkubiert und alle noch gebundenen Proteine einschließlich des GST-Aut2-Proteins bzw. des GST-Proteins eluiert. Die verschiedenen Fraktionen (Überstand (S), Waschungen (W) und Eluat (E)) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und das GFP-Aut9p mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das GFP detektiert. Das GFP-Aut9p wurde nur an die GST-Aut2p-Säule und nicht an die reine GST-Säule gebunden (Abb.15).

Da die Lokalisation des Aut7-Proteins von der Existenz des Aut9-Proteins abhängt (Suzuki et al. [2001], Kim et al. [2001b]), wurde auch dieses Protein auf eine mögliche Interaktion mittels einer Affinitätschromatographie untersucht. Dazu wurde ein GST-Aut7-Protein an eine Glutathion-Sepharosematrix gebunden und mit einem nativen Proteinrohextrakt des Stammes *aut9* Δ /pGFP-N/*AUT9* inku-

biert. Dabei konnte das GFP-Aut9p im Eluat der GST-Aut7p-Säule nachgewiesen werden.

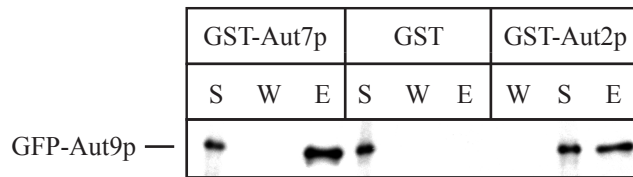


Abbildung 15: Affinitätschromatographie des GFP-Aut9p mit dem GST-Aut2p und dem GST-Aut7p. Das GST-Aut2p und das GST-Aut7p binden im Gegensatz zum GST das GFP-Aut9p. Das GFP-Aut9p ist im Überstand (S) der Säulen und im Eluat (E) der GST-Aut2p-Säule und GST-Aut7p-Säule nachweisbar. Die Säulen wurden so oft gewaschen, daß in der letzten Waschfraktion (W) kein GFP-Aut9p mehr nachweisbar war.

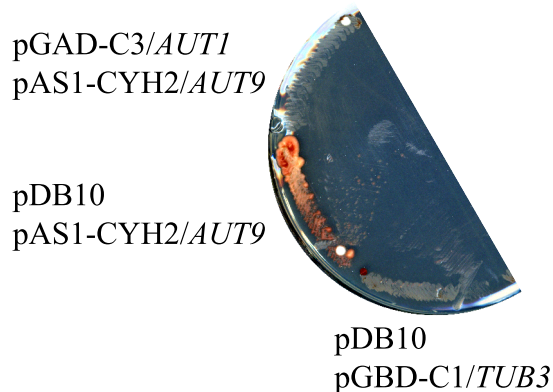


Abbildung 16: Two-Hybrid. Wachstum der verschiedenen Two-Hybrid-Stämme auf CM-Ade⁻-Selektionsplatten. Nur die Proteine Aut2p (pDB10) und Aut9p (pAS1-CYH2/AUT9) interagieren stark genug miteinander, so daß die Hefezellen unter diesen Bedingungen wachsen können.

Die Plasmide pAS-CYH2/AUT9 (Lang [1998]) und pDB10, welches das AUT2-Gen auf dem Vektor pGAD-C1 (3.7.2) enthält, wurden in den Hefestamm PJ69-4 α cotransformiert und auf CM-Leu⁻, Trp⁻-Selektionsplatten ausplattiert. Die Kolonien wurden auf CM-Ade⁻-Selektionsplatten ausgestrichen. Der transformierte Stamm konnte auf den CM-Ade⁻-Selektionsplatten wachsen (Abb.16), was nur aufgrund der Interaktion der zusätzlich exprimierten Proteine möglich sein sollte. Zur Kontrolle wurde das Plasmid pAS-CYH2/AUT9 mit anderen Plasmiden cotransformiert, deren exprimierte Proteine nicht mit dem Aut9p interagieren, wie z. B. das Aut1-Protein. Diese Stämme konnten auf den CM-Ade⁻-Selektionsplatten nicht wachsen. Das Plasmid pDB10 wurde ebenfalls mit anderen Plasmiden cotransformiert, z. B. dem Plasmid pGBD-C1/TUB3 (Lang [1998]), wobei diese Zellen in diesem Medium nicht wachsen konnten. Zusätzlich wurden

die cotransformierten Stämme einem β -Galactosidase-Flüssig-Test (3.9.7.3) unterzogen, der nur im Falle der Plasmidkombination pAS-CYH2/*AUT9* und pDB10 eine Gelbfärbung aufwies.

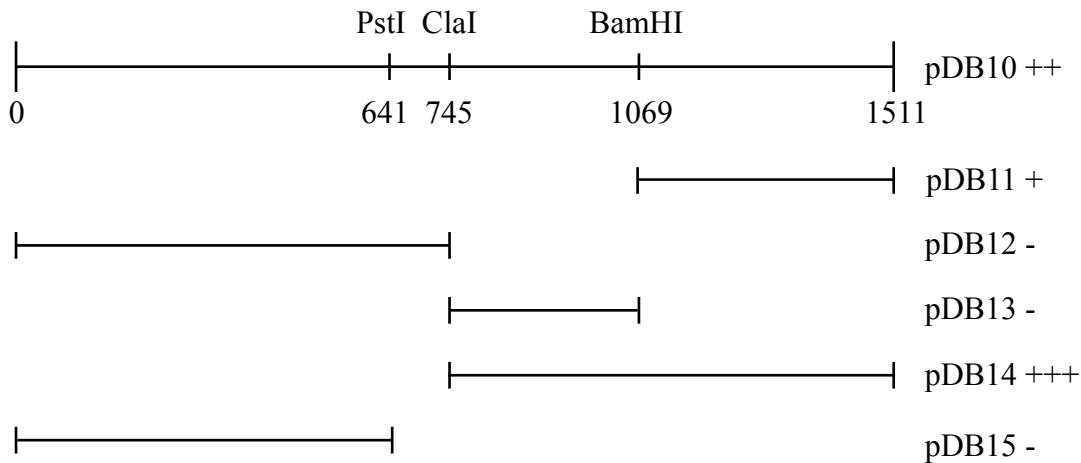


Abbildung 17: Two-Hybrid. Nachweis der Interaktion des Aut2p und der Aut2p-Fragmente mit dem Aut1p. Das *AUT2* Gen ist vollständig von Base 1 bis 1511 dargestellt. - keine, +++ starke, ++ schwache und + sehr schwache Interaktion.

4.2.3.2 Interaktion des Aut2-Proteins mit dem Aut1-Protein Die Interaktion des Aut2-Proteins mit dem Aut1-Protein ist in den Dissertationen von Elke Schöffeler (Schöffeler [1999]) (Coimmunopräzipitation) und Thomas Lang (Lang [1998]) (Two-Hybrid) dargestellt worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden *AUT2*-DNA-Fragmente sowie das vollständige *AUT2* Gen hergestellt und im Leseraster in den Vektor pGAD-C1 ligiert (3.7.2). Diese Plasmide wurden dann je mit dem Plasmid pAS1-CYH2/*AUT1* (Schöffeler [1999]) in den Hefestamm PJ69-4 α cotransformiert. Die Selektion erfolgte auf CM-Leu⁻, Trp⁻, so daß alle Zellen, die beide Plasmide erhalten hatten, auf diesem Medium unabhängig von der Wechselwirkung der zusätzlich exprimierten Proteine wachsen konnten. Zellen, die interagierende Proteine exprimieren, sollten in der Lage sein auf CM-His⁻, Leu⁻, Trp⁻-Selektionsplatten zu wachsen, was bei allen erfolgreich transformierten Zellen der Fall war. Dies legt eine Interaktion aller Aut2p-Fragmente mit dem Aut1p nahe. Zusätzlich wurden die Zellen viermal mit einem β -Galactosidase-Flüssig-Test analysiert und die Gelbfärbung mit einer Negativ-Kontrolle verglichen (3.9.7.3). Die Extinktion der Gelbfärbung der verschiedenen Fragmente wurde mit einem Photometer bei 405 nm bestimmt. Hierbei war ein Unterschied in der Interaktion der verschiedenen Proteinfragmente feststellbar, der auf eine stärkere Wechselwirkung des carboxyterminalen Bereichs des Aut2p mit dem Aut1p schließen läßt (Abb.17). Da selbst das intakte Aut2p nicht stark genug mit dem Aut1p wech-

selwirkt, um auf CM-Ade⁻-Selektionsplatten zu wachsen, war dieser stringentere Nachweis der Interaktion der Proteine nicht möglich.

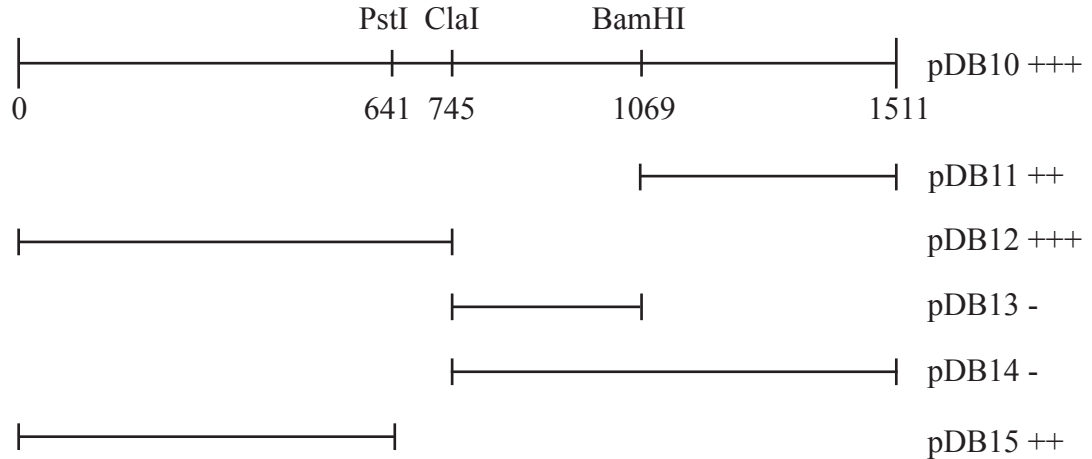


Abbildung 18: Two-Hybrid. Nachweis der Interaktion des Aut2p und der Aut2p-Fragmente mit dem Aut7p. Das *AUT2* Gen ist vollständig von Base 1 bis 1511 dargestellt. - keine, +++ starke, ++ schwache und + sehr schwache Interaktion.

4.2.3.3 Interaktion des Aut2-Proteins mit dem Aut7-Protein Die Interaktion des Aut2-Proteins mit dem Aut7-Protein ist in den Dissertationen von Elke Schöffeler (Schöffeler [1999]) (Affinitätschromatographie) und Thomas Lang (Lang [1998]) (Two-Hybrid) dargestellt worden. Das Aut7p wurde gleichfalls wie das Aut1p (4.2.3.2) auf Interaktion mit Aut2-Proteinfragmenten getestet. Alle transformierten Zellen waren auch hier in der Lage auf CM-His⁻, Leu⁻, Trp⁻-Selektionsplatten zu wachsen, jedoch nicht auf CM-Ade⁻-Selektionsplatten. Die Extinktion der Gelbfärbung der Zellen aufgrund des β -Galactosidase-Flüssig-Tests deutet zwar auf eine stärkere Wechselwirkung des aminoterminalen Bereichs des Aut2p mit dem Aut7p hin, da jedoch auch ein carboxyterminales Fragment eine Farbreaktion aufweist, ist eine Zuordnung einer potentiell interagierenden Domäne nicht möglich (Abb.18).

4.2.3.4 Two-Hybrid-Screen mit dem Aut2-Protein Mit Hilfe eines Two-Hybrid Screens wurden weitere mögliche Interaktionspartner des Aut2-Proteins gesucht (1.5.3.3). Bei diesem Screen wurde das Gal4-Protein als Transkriptionsfaktor verwendet. Die Bindedomäne befindet sich auf dem Plasmid pAS-CYH2 (3.7.4), die Aktivator-domäne auf den Plasmiden pGAD-CX (X = 1, 2, 3) (3.7.2). Das getestete Plasmid pAS-CYH2/*AUT2* (Lang [1998]), welches das vollständige *AUT2* Gen im Leseraster des Vektors pAS-CYH2 enthält, wurde in den Hefestamm Y190a transformiert. Die transformierten Zellen wurden nach Vorschrift

(3.8.11.3) kompetent gemacht, mit 40 μg DNA der Genbank von P. James (James et al. [1996]) nach der Lithiumacetatmethode (Methode von S. J. Elledge s. 3.8.11.3) transformiert und auf CM-His⁻, Leu⁻, Trp⁻-Selektionsplatten ausplattiert. Zu den Selektionsplatten wurde der kompetitive Histidin-Inhibitor 3-Aminotriazol mit einer Konzentration von 30 mM gegeben, um den Hintergrund an falsch positiven Klonen, die die Transkription des Reportergens HIS3 allein aktivieren können, auf den Platten niedrig zu halten. Die Transformationsrate betrug $2,8 \cdot 10^4$ Transformanden pro μg Genbank-DNA und lag knapp unterhalb den von S. J. Elledge angegebenen Werten ($5 \cdot 10^4 - 10^5$ Transformanden pro μg Genbank-DNA). Bei einem Einsatz von 40 μg DNA wurden somit $1,12 \cdot 10^6$ Klone transformiert. Dies entspricht einer Abdeckung aller möglichen Plasmide von ca. 95% des gesamten Hefegenoms. Die Hefekolonien wurden fünf Tage bei 30°C inkubiert, anschließend auf Nitrocellulosefilter replikaplattiert und nach 16 Stunden Wachstum bei 30°C einem β -Galaktosidase-Filter-Test (3.9.7.2) unterzogen. Die Kolonien, die aufgrund der Interaktion der zusätzlich exprimierten Proteine die Expression des β -Galaktosidase-Proteins aktivieren konnten, wurden bei diesem Test blau. Die positiv getesteten Kolonien wurden für einen Plasmidverlust auf CM-Leu⁻-Selektionsplatten ausgestrichen und die gewachsenen Kolonien auf CM-Trp⁻-Selektionsplatten replikaplattiert. Die Kolonien, die nicht auf den CM-Trp⁻-Selektionsplatten wachsen konnten, hatten ihr „Köderplasmid“, das pAS-CYH2/AUT2, verloren und wurden erneut einem β -Galaktosidase-Filter-Test unterzogen. Diesmal durften die Kolonien keine Blaufärbung aufweisen, da der Interaktoren nicht in der Lage sein dürfen, das *lacZ*-Reportergen alleine zu aktivieren. Die Kolonien wurden mit drei verschiedenen Kontrollstämmen des Y187 α mittels Mating weiter getestet, um unspezifische Interaktionen ausschließen zu können. Die Stämme enthielten jeweils die Plasmide pAS1-X ($X = \textit{lamin}, \textit{CDK2}, \textit{SNF1}$). Die diploiden Stämme wurden wiederum einem β -Galaktosidase-Filter-Test unterzogen und nur die Kolonien weiter verwendet, die nicht mit den Testproteinen interagierten.

Nach diesen Kontrollen blieben 54 Klone übrig. Aus diesen Stämmen wurden die Plasmide isoliert und mittels eines Restriktionsverdau mit *SphI* auf die Größe der genomischen Inserts hin untersucht. Nur 20 Plasmide wiesen ein Insert mit einer Größe von über 100 Basenpaaren auf und wurden einer Sequenzanalyse unterzogen.

Plasmide	Chromosom	Insertgröße in kb
20	16	1,1
21	4	0,6

22	12	1,3
23	12	1,1
26	5	2,6
27	7	1,6
28	5	0,9
31	11	1,4
33	5	0,6
34	5	0,3
35	13	0,8
39	12	1,2
41	12	1,3
44	14	0,6
47	6	2,6
49	12	0,6
51	4	0,7
52	10	0,6
53	2/13	1,0
54	9	1,1

Die Übersetzung der DNA in Aminosäuren ergab nur in zwei Fällen eine Übereinstimmung mit der Proteinsequenz des jeweiligen ORF's. Plasmid Nr.39, enthält eine DNA-Sequenz des ORF's YLR121c (Nucleotidsequenz 318-10 sequenziert), der für das Protein Yps3p kodiert. Das Yps3-Protein kodiert für eine Aspartat-Protease, die unter anderem homolog zur Proteinase A und vermutlich an der Plasmamembran lokalisiert ist (Olsen et al. [1999]). Das Plasmid Nr.52 enthält eine DNA-Sequenz des ORF's YJL036w (Nucleotidsequenz 72-597 sequenziert), der für das Protein Snx4p kodiert. Dieses Protein ist vermutlich am intrazellulären Proteintransport vom *Endoplasmatischen Reticulum* zum Golgi-Apparat beteiligt (Haft et al. [1998]), und somit in räumlicher Nähe zum cytosolischen Aut2p. Es sind mehrere Proteine (Aut1p, Aut7p, Tub1p und Tub2p) bekannt, die mit dem Aut2-Protein interagieren (Lang [1998]). Daß diese Proteine in diesem Screen nicht detektiert wurden, liegt möglicherweise daran, daß zum einen mit der Anzahl der transformierten Zellen nicht das ganze Genom abgedeckt wurde oder was wahrscheinlicher ist, daß der N-Terminus der Proteine durch die Fusion mit dem Transkriptionsaktivator blockiert ist und damit mögliche Interaktionsbereiche nicht mehr zur Verfügung stehen.

4.3 Das Sai1-Protein

4.3.1 Two-Hybrid-Screen mit dem Aut9-Protein

Der Two-Hybrid Screen mit dem Aut9-Protein (1.4.7) wurde nach der gleichen Vorschrift und mit dem gleichen Two-Hybrid System wie der Screen mit dem Aut2-Protein durchgeführt (4.2.3.4). Als „Köderplasmid“ wurde das getestete Plasmid pAS-CYH2/*AUT9* (Lang [1998]) verwendet, welches das vollständige *AUT9* Gen im Leseraster des Vektors pAS-CYH2 enthält. Die Transformationsrate betrug $3,3 \cdot 10^4$ Transformanden pro μg Genbank-DNA und lag knapp unterhalb den von S. J. Elledge angegebenen Werten ($5 \cdot 10^4$ - 10^5 Transformanden pro μg Genbank-DNA). Bei einem Einsatz von $40 \mu\text{g}$ DNA wurden somit $1,32 \cdot 10^6$ Klone transformiert. Dies entspricht einer Abdeckung aller möglichen Plasmide von ca. 95% des gesamten Hefegenoms. Nach allen Kontrollen blieben neun Plasmide übrig, von denen jedoch nur drei ein genomisches Insert mit einer Größe von über 100 Basenpaaren aufwiesen.

Plasmide	Chromosom	Insertgröße in kb
8	13	1,1
72	7	0,4
74	14	1,5

Die Übersetzung der DNA-Inserts in Aminosäuren ergab nur im Fall des Plasmids Nr. 8 eine Übereinstimmung mit der Proteinsequenz des jeweiligen ORF's. Die DNA-Sequenz des Inserts von Plasmid Nr.8 beginnt mit der Base 34 des ORF's YMR262w und ist bis zur Base 450 sequenziert. Da das Insert ca. 1,1 kb groß ist, ist vermutlich der gesamte Rest des 945 bp großen ORF's auf dem Plasmid enthalten. Der ORF YMR262w erhielt die Bezeichnung *SAI1*, das Proteinprodukt Sai1p (starvation induced Aut9p interacting protein). Die Interaktion des Aut9-Proteins mit dem Sai1-Protein wurde noch mit anderen Experimenten (Affinitätschromatographie 4.3.5 und Co-Immunopräzipitation 4.3.8.2) überprüft, da eine Interaktion aufgrund methodenspezifischer Verhältnisse vorgetäuscht sein könnten oder die Detektion verhindert werden kann. Bei einem Two-Hybrid können aminotermiale Bindungstellen blockiert sein und zudem ist die räumliche Auftrennung der Proteine in verschiedene Kompartimente der Zelle nicht mehr gegeben. Bei der Affinitätschromatographie wurde ein in *E. coli* exprimiertes GST-Fusionsprotein verwendet, bei dem die carboxyterminale Bindungsstelle blockiert ist. Zudem werden Proteine in *E. coli* posttranslational nicht mehr modifiziert. Eine Co-Immunopräzipitation ist mit Membranproteinen manchmal nur schwer durchführbar und vom verwendeten Antikörper abhängig.

4.3.2 Das Sai1-Protein

```

1/1                                     31/11
ATG AAT AAA CTT GTT GAT GCC CAC TGT CAT GTT ATA ACC GAC CCA GAC AAC ACA TTC TGC
M  N  K  L  V  D  A  H  C  H  V  I  T  D  P  D  N  T  F  C
61/21                                     91/31
GGT GAT GAT GGA GGG TCC CAG GGT ACG TTG CGT TGC GTT ATG TCA TCA AAC CCA TAT GAC
G  D  D  G  G  S  Q  G  T  L  R  C  V  M  S  S  N  P  Y  D
121/41                                    151/51
TGG AAC AAT TTG AAA AAA TTG GCT GGC AGA AGC ACA AGT AAA AAC GAT ATA TGC GTG GGA
W  N  N  L  K  K  L  A  G  R  S  T  S  K  N  D  I  C  V  G
181/61                                    211/71
TTT GGT GTG CAT CCT TGG TAC AGC CAC TTA TTT TAT GTG GGA AGT CGG CGC GAC AAG GTT
F  G  V  H  P  W  Y  S  H  L  F  Y  V  G  S  R  R  D  K  V
241/81                                    271/91
TCT CAC TAT CAA GAT GTA CTG GAG TAT AAG AAT GAA GAA CAG TTC GAC AGT TTG GTT CAG
S  H  Y  Q  D  V  L  E  Y  K  N  E  E  Q  F  D  S  L  V  Q
301/101                                    331/111
GTG CTT CCC GAA CCT CTA GAT CTT GAA GAG TAT ATA AAA AGA GAG TTT AAC GAC ACT TTG
V  L  P  E  P  L  D  L  E  E  Y  I  K  R  E  F  N  D  T  L
361/121                                    391/131
GTT AGT GTG ATT GGA GAA ATC GGT CTT GAT AAG CTC TTC AGA CTT CCT GCA AAT GGT TTC
V  S  V  I  G  E  I  G  L  D  K  L  F  R  L  P  A  N  G  F
421/141                                    451/151
TAC ATG CAG AAC GAG AAG GCA AGG CTT ACG ACA GTG AAG GTC AAA CTA TCG CAT CAA GAA
Y  M  Q  N  E  K  A  R  L  T  T  V  K  V  K  L  S  H  Q  E
481/161                                    511/171
ACA GTA TTC AGG CGA TTT TGC CGA CTG GCA AGG CAC ACA AGC AAG CCC ATC TCT ATA CAC
T  V  F  R  R  F  C  R  L  A  R  H  T  S  K  P  I  S  I  H
541/181                                    571/191
GAT GTA AAG TGC CAC GGG AAA CTA AAC GAT ATC TGC AAT GAA GAG CTC TTG ACG TAT CAC
D  V  K  C  H  G  K  L  N  D  I  C  N  E  E  L  L  T  Y  H
601/201                                    631/211
TCT GTC AAG ATA TGT TTA CAT TCG TAC ACA GGC TCC AAG GAA ACG CTT CTG GGC CAA TGG
S  V  K  I  C  L  H  S  Y  T  G  S  K  E  T  L  L  G  Q  W
661/221                                    691/231
CTC AAG AAG TTT CCC CCG GAT CGT ATT TTT GTG AGC CTA TCC AAA TGG ATT AAT TTT AAG
L  K  K  F  P  P  D  R  I  F  V  S  L  S  K  W  I  N  F  K
721/241                                    751/251
GAC CCA GAA GAG GGA GAT GCC CTG GTC AGG AGC TTG CCC TCA ACT TGC ATA CTT ACT GAA
D  P  E  E  G  D  A  L  V  R  S  L  P  S  T  C  I  L  T  E
781/261                                    811/271
ACC GAC TAT CCT ATT GAC AAT CCA GAT CCG TCA TAC CAA AAG GCC CTT ACA GAG CAG CTG
T  D  Y  P  I  D  N  P  D  P  S  Y  Q  K  A  L  T  E  Q  L
841/281                                    871/291
CAG TAT TTG AAT GCA CAA ATC GCA CGA GCA TGG GAC GAG ACA CTG GAT GCC TCA CAA GCC
Q  Y  L  N  A  Q  I  A  R  A  W  D  E  T  L  D  A  S  Q  A
901/301                                    931/311
GCT TTG CGT GTA TAC GAA AAC TTT CAG AAA TTT ATC AAG TGA
A  L  R  V  Y  E  N  F  Q  K  F  I  K  *

```

Abbildung 19: Nucleotid- und Aminosäuresequenz des *Sai1*-Gens (YMR262w). Die Base 511, C, ist in der Datenbank des SGD (**S**accharomyces **G**enome **D**atabase) als G aufgeführt, was zu einem Austausch der Aminosäure Cystein zu Tryptophan führen würde.

Der ORF YMR262w (Chromosom XIII) besitzt eine Länge von 945 Basen und kodiert für ein lösliches Protein mit 313 Aminosäuren (Abb. 19). Somit besitzt das Protein ein Molekulargewicht von 36,1 kDa, der berechnete isoelektrische Punkt liegt bei 6,72. Am C-terminalen Ende des Proteins (Aminosäure 230-270)

sind „coiled-coiled“-Regionen erkennbar, die auf Protein-Protein Wechselwirkungen hin deuten (Abb. 20). Der ORF YMR262w kodiert für ein unbekanntes Protein mit einer Homologie zu dem Scn1-Protein aus *S. pombe*, dem humanen Proteinprodukt des Gens KIAA0218 und dem bovinen Proteinprodukt des Gens *MAP1B*. Die Sequenzierung des vollständigen ORF's (4.3.7) ergab bei der Aminosäure 167 einen Austausch der Aminosäure Tryptophan (W) gegen Cystein (C), aufgrund eines Basenaustausches der Base 511, C statt G, im Vergleich zu der Datenbank des SGD (**S**accharomyces **G**enome **D**atabase). In der Datenbank des Swiss-Prot ist die Sequenz des ORF's jedoch identisch mit der, die in dieser Arbeit ermittelt wurde. Dieser Basenaustausch kann mit einem Sequenzierfehler in der SGD, oder aufgrund der Unterschiede der verschiedenen Hefestämme erklärt werden. Der ORF YMR262w erhielt die Bezeichnung *SAI1*, sein Proteinprodukt Sai1p (starvation induced **A**ut9p interacting protein).

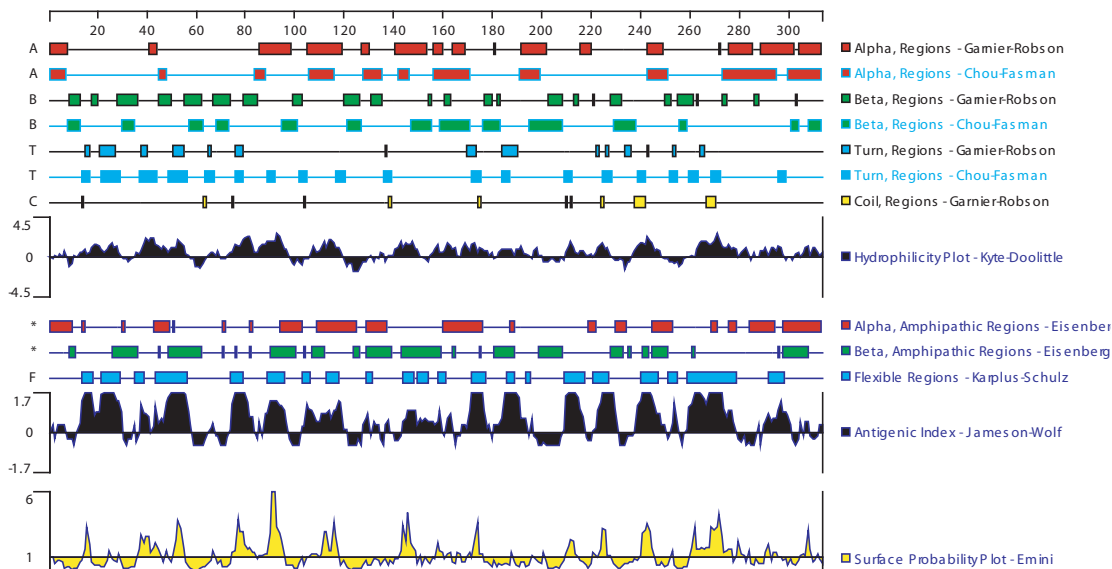


Abbildung 20: Strukturvorhersage für das Sai1-Protein nach verschiedenen Algorithmen. Am C-Terminus des Proteins sind „coiled-coiled“-Regionen erkennbar, die auf Protein-Protein Wechselwirkungen hin deuten.

Das Sai1-Protein ist über die aminoterminalen Region zu 29% identisch und zu 44% homolog zu dem Scn1-Protein aus *S. pombe*. Eine Mutante des Scn1-Proteins ist ein „high copy“ Suppressor des Cut9-Proteins (Samejima and Yanagida [1994]) aus *S. pombe*, welches zu 37% identisch ist zu dem Cdc16-Protein aus *S. cerevisiae* ist. Das Cdc16-Protein ist ein Bestandteil des „anaphase promoting“ Komplexes (APC), der die Ubiquitinierung während der Mitose als E3-Protein kontrolliert (King et al. [1996]). Dieser APC besteht aus mindestens zwölf Komplexen (Massenspektrometrie: Zachariae et al. [1998], Zachariae et al. [1996]), wobei die Proteine Cdc16p und Cdc23p Tetratricopeptid-Wiederholungsmotive (TPR) besitzen,

die an Protein-Protein Wechselwirkungen beteiligt sind (Lamb et al. [1994]). Mutanten des Cdc16p und des Cdc23p arretierten bei restriktiver Temperatur in der Metaphase mit ungetrenntem Kern, replizierter DNA und kurzer Spindel (Irniger et al. [1995], Lamb et al. [1994]). Daher wurde ein GFP getaggtetes Fusionsprotein des Sai1-Proteins unter der Kontrolle des *MET25* Promotors in eine Temperatur sensitive *cdc16-123* Mutante transformiert und die Zellen bei 37°C inkubiert. Das Fusionsprotein war nicht in der Lage die Temperatursensitivität der *cdc16-123* Mutante zu komplementieren. Dies kann unter anderem auch daran liegen, daß auch in *S. pombe* nur die Kälte sensitive *scn1*-Mutante und nicht das Wildtypprotein diesen Defekt komplementieren kann.

```

1   MNKLVDAHCHVITDPDNTFCGDDGGSQGLRRCVMSSNPYDWNNLKLAGRSTSKNDICVG 60
   M ++DAHCH TD S G L VM + P D +++LA K +
1   MESIIDAHCHP-TDAPQELHLVANLSVGKL-IVMGRPTDQKYVEQLAKEYPGK--VIPS 56

61  FGVHPWYSHLFYVGSRRD-----KVSHYQDVLEYKNEEQFDSLQVLPEPLDLEEYI- 112
   FG+HPW+S+ Y +D K HY+ +L +E F + LP P+ + E++
57  FGIHPWFSYLYDDLDKDLQSSETRKKKKHYEKILTPIPEDEF---INALPNPVPISEFLE 113

113 --KREFNDTLVSVIGEIGLDKLFRLPANGFYMQNE--KARLTTVKVKLSHQETVFRRFWR 168
   +R ++IGEIGLDK FRLP + ++ + L+ VK+ HQ VF R
114 DARRHLKQYPNALIGEIGLDKPFRLPVGPPYDARSSLPQGPLSPFYVKMEHQCKVFEAQVR 173

169 LARHTSKPISIHDKVCHG-----KLNDICNEEL-----LTYHSV 202
   LA + +S+H V+ + K+ + EE ++
174 LAAEFQRAVSVHCVQTYALLYSSLAKFWGDRWIPSKTKIRKMKKEEYENSLAEERKHYP 233

203 KICLHSYTGSKETLLGQWLKFFPPDRIFVLSLKWINKDPEEGDALVRSPLSTCILTETD 262
   KICLHSY+GS E + Q+ P + S S IN + L + +P +L E+D
234 KICLHSYSGSIEQ-ISQFSAHKVPTEFYYSFSGINSRYKNFIQTL-KGVPDDKLLAESD 291

263 Y 263
   +
292 H 292

```

Abbildung 21: Homologie des Sai1-Proteins (oben) zum Scn1-Protein (unten) aus *S. pombe*.

Das humane Proteinprodukt von KIAA0218, welches aus 761 Aminosäuren besteht, besitzt über 144 Aminosäuren (Aminosäure 159-303 des Sai1-Proteins und Aminosäure 609-752 des humanen Proteins) eine Identität von 29% und eine Homologie von 44% zu dem Sai1-Protein (Abb. 22). Die homologen Bereiche sind teilweise identisch mit denen des Scn1-Proteins aus *S. pombe*.

Das MAP1B-Protein aus *bos taurus*, welches aus 120 Aminosäuren besteht, ist ein an Mikrotubulin assoziiertes Protein. Es besitzt über 90 Aminosäuren (Aminosäure 166-256 des Sai1-Proteins und Aminosäure 25-113 des bovinen Proteins) eine Identität von 30% und eine Homologie von 42% zu dem Sai1-Protein (Abb. 23).

```

54  KNDICVG-FGVHPWYSHLFYVGSRRDKVSHYQDVLEYKNEEQFDSLQVLPPEPLDLEEYI 112
    K D+  G FG HP ++                Y +E Q  +L+Q L  P  +
553  KEDLVWGAFGCHPHFA-----RYYSESQERNLLQALRHPKAV---- 589

113  KREFNDTLVSVIGEIGLDKLFRLPANGFYMQNEKARLTTVKVKLSHQETVFRFRWRLARH 172
    GE+GLD  +                + TT  +  Q  VF R  +LA
590  -----AFGEMGLDYSY-----KCTT---PVPEQHKVFERQLQLAVS 622

173  TSKPISIHDKVCHGKLNLDICNEELLTYHSVKICLHSHYTGSKETLLGQWLKKFPPDRIFVS 232
    KP+ IH  +  L +I  +                KI  H +TGS  ++  LK FP  + V
623  LKKPLVIHCREADEDLLEIMKK--FVPPDYKIHRHCFTGS-YPVIEPLLKYFP--NMSVG 677

233  LSKWINFKDPEEGDALVRSPLSTCILTETDYPI----DNPDPYSYQKALTEQLQYLNAQIA 288
    +  +  +  E  +R +P  I+ ETD P                P  Q  A  +  +IA
678  FTAVLTYSSAWEAREALRQIPLERIIVETDAPYFLPRQVPKSLCQYAHPLALHTVREIA 737

289  RAWDETLDASQAALR 303
    R  D+ L  + AALR
738  RVKDQPLSLTLAALR 752

```

Abbildung 22: Homologie des humanen Proteinprodukts des Gens KIAA0218 (unten) zum Sai1-Protein (oben).

```

166  FWRLARHTSKPISIHDKVCHGKLNLDICNEELLTYHSV---KIC-LHSHYTGSKETLLGQWL 221
    FW+L RH  +  SI                L  I ++ L  +S+  KI  L                T  W+
25   FWKLIRHLDRVDSI-----LLTHIGDDNLPGINSMLQRKIAELEEESQSGSTTNSDWM 77

222  KKF-PPDRIFVSLSKWINFKDPEEGDALVRSPLSTC 256
    K  PD  V L+  N K+PE  + RS+  C
78   KNLISPDLGVVFLNVPENLKNPEPNIKMKRSIEEAC 113

```

Abbildung 23: Homologie des MAP1B aus *bos taurus* zum Sai1-Protein.

4.3.3 Two-Hybrid mit den Proteinen Aut1p, Aut2p, Aut7p und Aut9p

Eine Interaktion des Sai1-Proteins mit dem Aut9-Protein legt nahe, daß dieses Protein auch mit anderen Autophagocytoseproteinen interagieren könnte. Daher wurde ein Two-Hybrid Experiment dieser Proteine mit dem vollständigen Sai1-Protein (pDB22) und dem Proteinfragment (pDB21) aus der Genbank (4.3.1) durchgeführt. Die Plasmide pDB21 bzw. pDB22 wurden je mit den Plasmiden pASCYH2/AUT1, pASCYH2/AUT2, pASCYH2/AUT7 und pASCYH2/AUT9 in den Hefestamm pJ69-4 α cotransformiert und auf CM-Trp⁻Leu⁻-Selektionsplatten ausplattiert. Die transformierten Stämme wurden dann auf CM-Ade⁻- und CM-His⁻-Selektionsplatten ausgestrichen, sowie einem β -Galactosidase-Flüssig-Test (3.9.7.3) unterzogen. Auf CM-Ade⁻- und CM-His⁻-Selektionsplatten konnten nur die Stämme wachsen, die das Plasmid pASCYH2/AUT9 in der Kombination mit den Plasmiden pDB21 (pGAD-C1/SAI1 Fragment) und pDB22 (pGAD-C1/SAI1) enthielten (Abb. 24). Dies bestätigt wiederum die Interaktion der Pro-

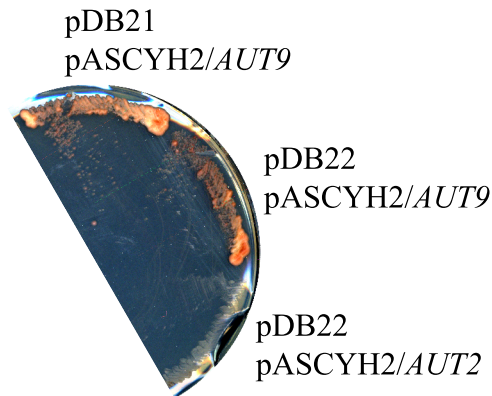


Abbildung 24: Two-Hybrid. Wachstum der Two-Hybrid-Stämme auf CM-Ade⁻-Selektionsplatten. Nur die Stämme, die das Plasmid pASCYH2/AUT9 in der Kombination mit den Plasmiden pDB21 (pGAD/SAI1 Fragment) und pDB22 (pGAD/SAI1) enthalten, sind in der Lage auf CM-Ade⁻-Selektionsplatten zu wachsen.

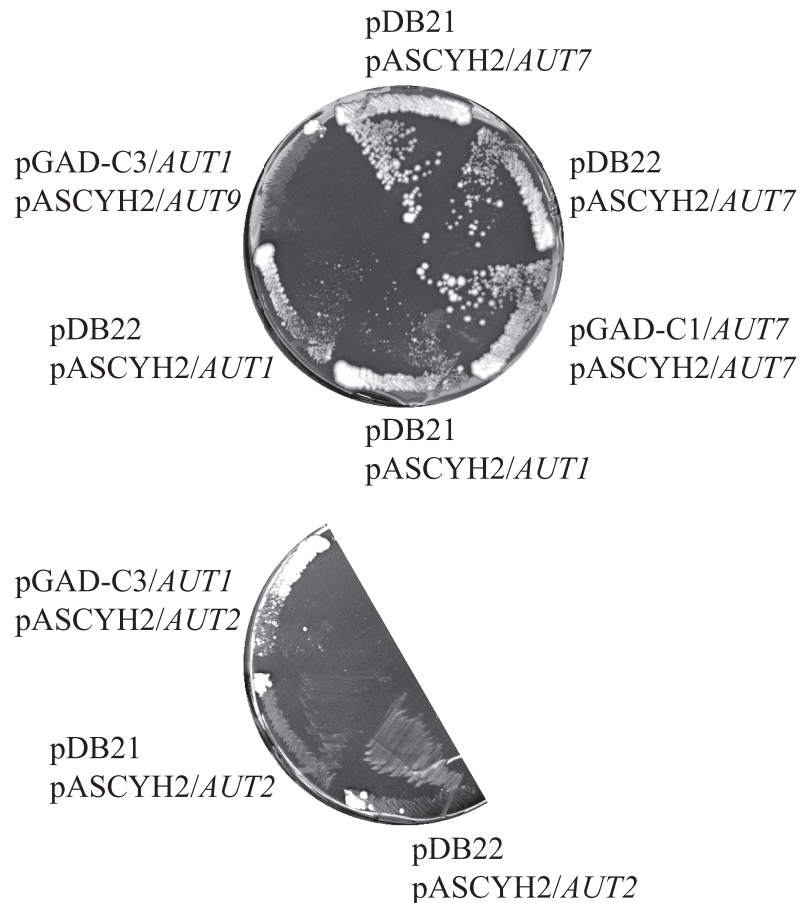


Abbildung 25: Two-Hybrid. Wachstum der Two-Hybrid-Stämme auf CM-His⁻-Selektionsplatten.

teine Sai1p und Aut9p. Auf CM-His⁻-Selektionsplatten konnten die Plasmide wachsen, die die Plasmide pDB21 bzw. pDB22 in Kombination mit den Plasmidi-

den pASCYH2/*AUT1*, pASCYH2/*AUT7* und pASCYH2/*AUT9* enthielten (Abb. 25). Der β -Galactosidase-Flüssig-Test führte zu dem gleichen Ergebnis, wobei die Stärke der Gelbfärbung vom jeweils transformierten Plasmid abhängt und somit keine Rückschlüsse auf die Stärke der Interaktion zuläßt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß das Sai1-Protein eventuell auch mit den Proteinen Aut1p und Aut7p interagiert. Da mit dieser Methode keine Interaktion mit dem Aut2p nachgewiesen werden konnte, spricht dies gegen eine unspezifische Interaktion des Sai1-Proteins und des Sai1-Proteinfragments mit diesen Proteinen.

4.3.4 Die *sai1* Δ -Mutante

Der ORF YMR262w (*SAI1*-Gen) wurde mittels der *loxP-KAN^R-loxP* Kasette deletiert und durch das Kanamycinresistenzgen ersetzt (3.7.9) (Güldener et al. [1996], Wach et al. [1994]). Die Deletionskasette wurde mit Hilfe von Primern (*AUT9-2H/8-Del1*, *AUT9-2H/8-Del2*) vervielfältigt, die homologe Bereiche vor und nach dem *SAI1*-Gen, sowie homologe Bereiche der Anfangs- und Endsequenz der Kasette enthielten. Dadurch entstand ein DNA-Fragment, welches das Kanamycinresistenzgen flankiert von den homologen Bereichen vor und nach dem zu deletierenden ORF enthielt. Dieses Deletionskonstrukt wurde in den Wildtypstamm WCG4 α transformiert und die Zellen auf YPD-Platten mit 0,2% Geneticin selektioniert. Nur die Zellen sollten auf diesem Medium wachsen, die das Deletionskonstrukt durch homologe Rekombination erhalten hatten. Zuerst wurde die genomische DNA der erhaltenen Klone durch PCR auf Integration der Kanamycinkasette hin untersucht. Von zwölf untersuchten Klonen enthielten drei das Kanamycinresistenzgen an der richtigen Stelle. Da das Konstrukt aber auch mehrfach im Genom integriert werden kann, wurden die drei Klone mittels eines Southern-Blots weiter untersucht (3.8.14). Die genomische DNA der neuen „Nullmutatenstämme“ *sai1* Δ -x und die des Wildtypstammes wurde mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* über Nacht verdaut, mittels einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die entsprechenden Banden wurden mit einer Fluorescein markierten Kanamycinsonde bzw. einer *SAI1*-Sonde detektiert (Abb. 26 und Abb. 27). Die Kanamycinsonde bestand aus einem 0,4 kb *ClaI/HindIII*-Fragment des Vektors pUG6, die *SAI1*-Sonde aus einem 0,6 kb *EcoRV*-Fragment eines PCR-Produktes, welches das ganze *SAI1*-Gen enthielt. Die Kanamycinsonde konnte wie erwartet nur eine Bande in den deletierten Stämmen detektieren. In den Stämmen *sai1* Δ -8 und *sai1* Δ -11 wurden Banden bei 3,9 kb detektiert, was einer korrekten Integration am *SAI1*-Locus entspricht. Das *SAI1*-Gen ist in allen drei *sai1* Δ -Stämmen deletiert, da die *SAI1*-Sonde nur im Wildtypstamm eine Bande bei 3,0 kb detektieren konnte. Im Falle des *sai1* Δ -6 Stammes wurde die Kanamycinkas-

sette vermutlich mehrmals integriert. In den weiteren Analysen der *sai1* Δ -Mutante wurde nur noch der Stamm *sai1* Δ -11 verwendet und als *sai1* Δ (YDB1) benannt. Die *sai1* Δ -Mutante weist keinen Wachstumsphänotyp bei 18°C, 30°C und 37°C auf.

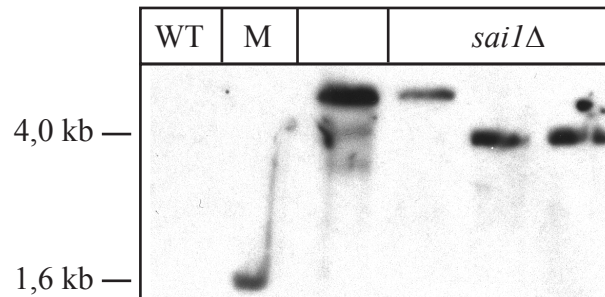


Abbildung 26: Southern Blot Analyse der *sai1* Δ -Stämme (Spur 4-6) mit der Kanamycinsonde. Die detektierten Banden lagen bei den Stämmen *sai1* Δ -8 (Spur 5) und *sai1* Δ -11 (Spur 6) bei 3,9 kb, was der erwarteten Größe entspricht. Der Wildtypstamm (Spur 1) weist wie erwartet keine Bande auf, der Marker (Spur 2) eine Kreuzreaktion bei 1,6 kb auf.

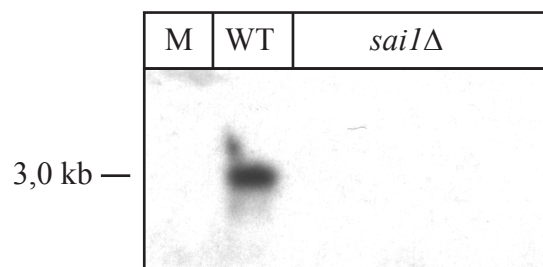


Abbildung 27: Southern Blot Analyse der *sai1* Δ -Stämme (Spur 3-5) mit der *SAI1*-Sonde. Eine Bande bei 3,0 kb konnte nur beim Wildtypstamm (Spur 2) detektiert werden. Der Marker (Spur 1) und die Deletionstämme besitzen kein *SAI1*-Gen.

Haploide und homozygote diploide Zellen der *sai1* Δ -Mutante wurden in YPD-Flüssigmedium angezogen und bei einer Zelldichte (OD_{600}) von ca. 5 unter einem Lichtmikroskop mit der Nomarskiptik betrachtet. Die stationären haploiden Zellen wurden zudem in 1% Kaliumacetat transferiert und nach vier Stunden ebenfalls unter dem Mikroskop betrachtet. Stationäre und gehungerte Zellen dieser Mutante weisen keine ungewöhnliche Morphologie auf (Abb. 28 und Abb. 29). Alle mikroskopische Bilder, außer der Immunfluoreszenz (4.3.8.3), in dieser Dissertation wurden im gleichen Maßstab dargestellt, der Balken in der Abbildung 28 entspricht 10 μ m.

Da das Sai1-Protein mit Hilfe eines Two-Hybrid Screens mit dem Autophagocytoseprotein Aut9p detektiert wurde, lag es nahe, daß auch dieses Protein ein

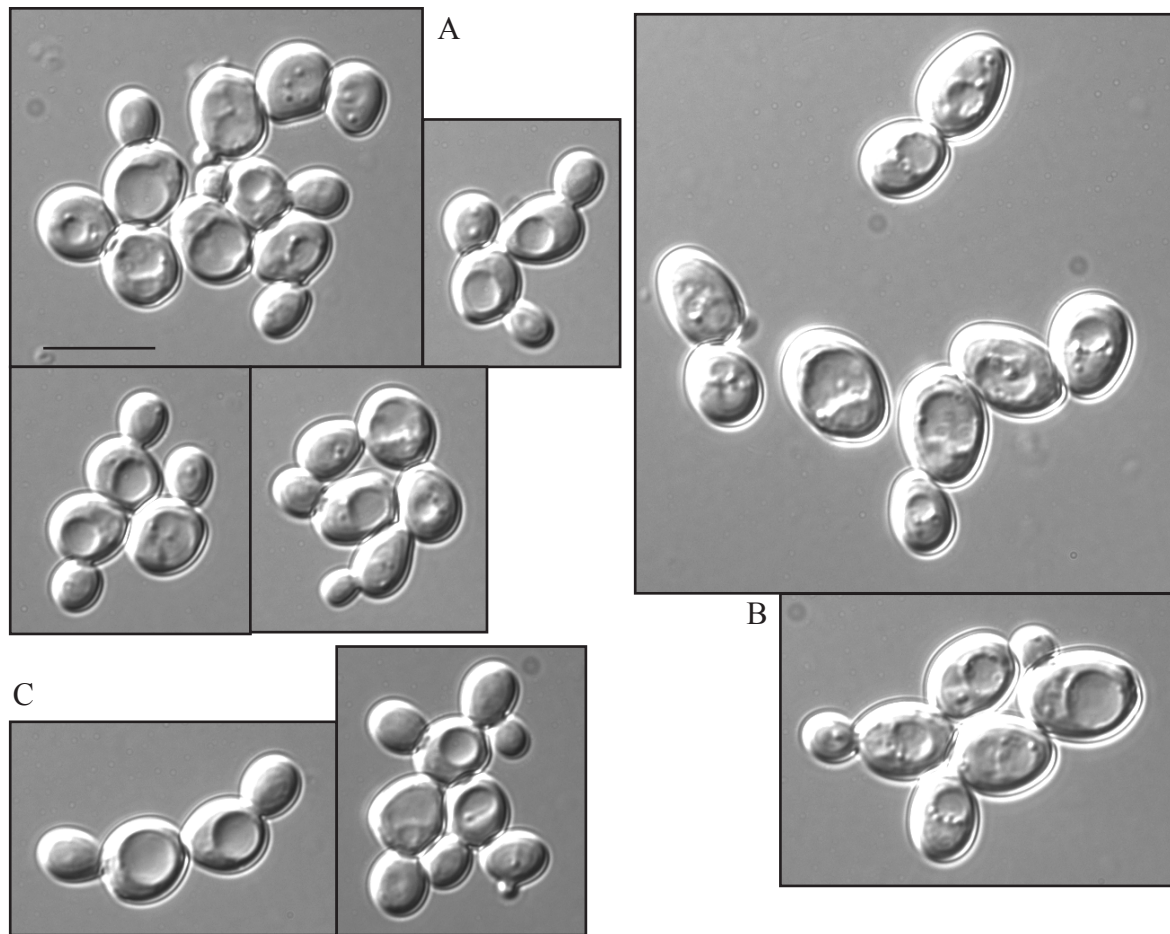


Abbildung 28: Stationäre Zellen der Stämme *sai1Δ* (A), WCG4 α (C) und des homozygot diploiden Stammes *sai1Δ* (B). Der Balken entspricht 10 μm .

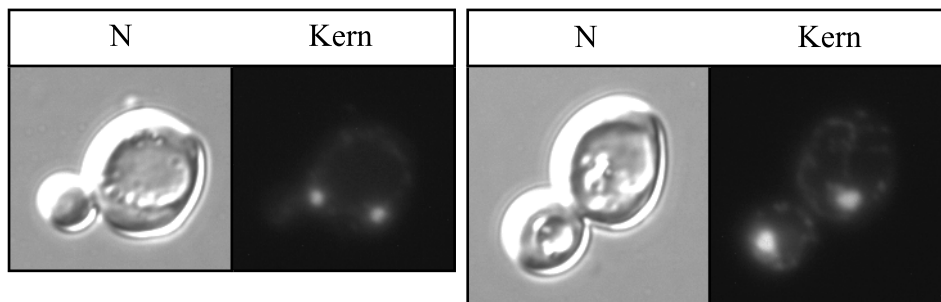


Abbildung 29: In 1% Kaliumacetat gehungerte Zellen des Stammes *sai1Δ*. Die Morphologie der Zellen ist normal, Zellkerne sind in Mutter- und Tochterzelle vorhanden.

Autophagocytoseprotein sein könnte. Deshalb wurde die *sai1Δ*-Mutante auf Autophagocytosephänotypen hin untersucht. Die Expression des nativen Proteins wurde auf Transkriptionsebene mittels einer RT-PCR untersucht. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in 4.3.8 dargestellt.

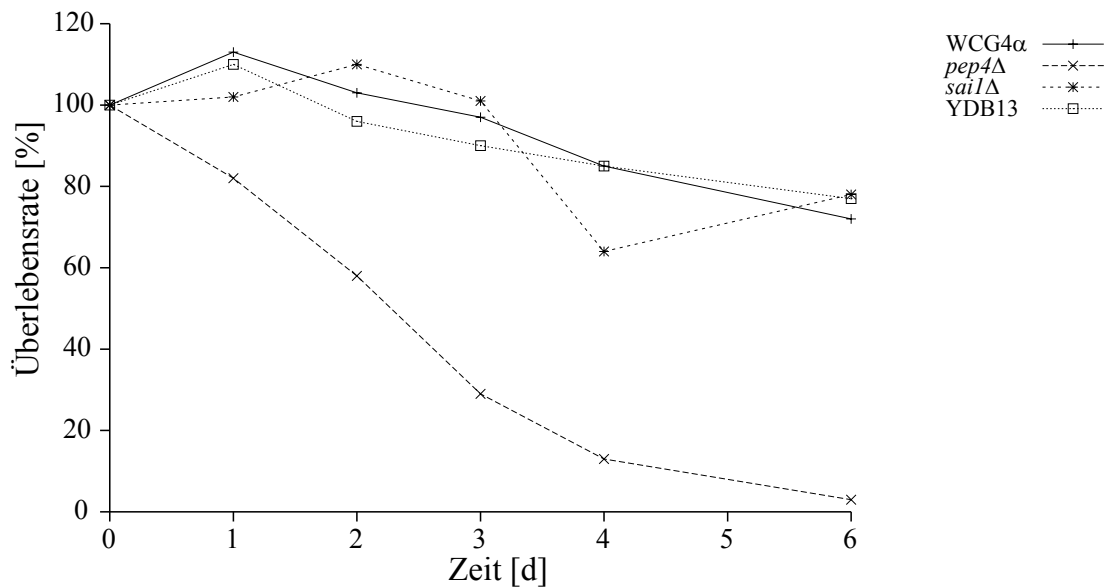


Abbildung 30: Überlebensrate. Die Fähigkeit bei Hungerung zu überleben, ist beim *sai1Δ*-Deletionsstamm nicht vermindert.

4.3.4.1 Überleben bei Hungerung Die Überlebensrate des *sai1Δ*-Deletionsstammes und des Stammes YDB13, der das dreifach HA getaggte Sail-Protein enthält (4.3.8), unter Hungerbedingungen wurde nach dem gleichen Protokoll wie in 4.1.2.1 beschrieben ermittelt. Als relative Kontrolle wurde auch die Überlebensrate des *pep4Δ*-Deletionsstammes und des Wildtypstammes WCG4α bestimmt. Der *sai1Δ*-Deletionsstamm und der Stamm YDB13 weist im Gegensatz zu den *Aut*-Mutanten und dem Proteinase A defizienten Stamm in *Saccharomyces cerevisiae* gegenüber dem Wildtyp keine verminderte Fähigkeit auf, bei Hungerung zu überleben (Abb. 30). Nach sechs Tagen in 1%-iger Kaliumacetatlösung überleben ca. 80% der Zellen des Wildtypstammes, der *sai1Δ*-Mutante und des Stammes YDB13 (WCG4αSAI1:HA₃, 4.3.8)

4.3.4.2 Reifung der Aminopeptidase I Die Reifung der Aminopeptidase I (API) wurde nach dem selben Verfahren wie in 4.1.2.2 beschrieben durchgeführt. Diese Analyse wurde mit Hefestämmen durchgeführt, die bei 30°C und 37°C logarithmisch, stationär und vier Stunden gehungert gewachsen sind. Die Zellen wurden zusätzlich bei 37°C inkubiert, da die *aut1Δ*- und die *aut9Δ*-Mutante, die das Sailp überexprimieren, einen Wachstumsphänotyp aufweisen (4.3.6 und 4.3.7). Die *sai1Δ*-Mutante reift die API in nahezu gleichem Ausmaß wie der Wildtypstamm WCG4α (Abb.31). In logarithmisch gewachsenen Zellen wird die API nur teilweise gereift, da sie dann nur auf dem cytoplasmatischen/Cvt Weg (1.2.2.4) in die Vakuole transportiert wird. Bei erhöhter Temperatur ist sie in stationären

Zellen ebenfalls zu einem geringeren Prozentsatz gereift, da dies für die Zellen eine Stresssituation darstellt. Bei 37°C ist die API Reifung in stationären Zellen der *sai1Δ*-Mutante etwas geringer als die der Zellen des Wildtypstammes. Mit dieser Methode kann aus diesem Unterschied jedoch kein Befund abgeleitet werden, da sie zu ungenau ist. Die API wird in der *sai1Δ*-Mutante entsprechend dem Wildtyp gereift. Die Carboxypeptidase C (CPY) (1.2.2.3) wird unter den beschriebenen Bedingungen ebenfalls gereift.

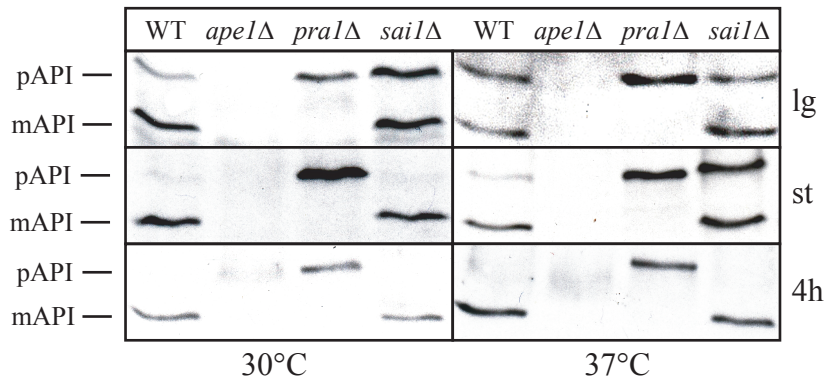


Abbildung 31: Aminopeptidase I (API) Reifung bei verschiedenen Temperaturen und Wachstumsphasen. Es ist kein deutlicher Unterschied in der Reifung der proAPI des Wildtypstammes (WT) und der *sai1Δ*-Mutante erkennbar.

4.3.4.3 Akkumulierung autophagischer Vesikel in der Vakuole Die Akkumulierung autophagischer Vesikel in der Vakuole unter Hungerbedingungen (1%-Kaliumacetatlösung) in Anwesenheit des Proteinase B Inhibitors PMSF wurde nach dem gleichen Verfahren wie in 4.1.2.3 beschrieben mikroskopisch untersucht. Als Vergleichsstämme wurden der *aut2Δ*- und der Wildtypstamm WCG4α unter dem Lichtmikroskop parallel mit untersucht (Abb. 32). Die *sai1Δ*-Mutante reichert unter den beschriebenen Bedingungen autophagischen Vesikel in der Vakuole an. Sie verhält sich in diesem Fall wie der Wildtypstamm.

4.3.4.4 Sporulation Die homozygot diploide *sai1Δ*-Mutante (YDB1 x YDB2) wurde auf einen Defekt in der Sporulation hin untersucht (3.9.2). Alle Autophagocytosemutanten weisen eine verminderte Fähigkeit auf zu sporulieren, homozygot Diploide sind teilweise überhaupt nicht mehr in der Lage zu sporulieren. Die *sai1Δ*-Mutante wurde parallel zum *aut2Δ*- und Wildtypstamm WCG4α auf ihre Sporulationsfrequenz hin untersucht. Der Wildtypstamm und die *sai1Δ*-Mutante wiesen nach dem verwendeten Verfahren nach zwei Tagen ca. 40% sporulierte Zellen auf. Die homozygot diploide *sai1Δ*-Mutante hat somit keinen Defekt in der Sporulation.

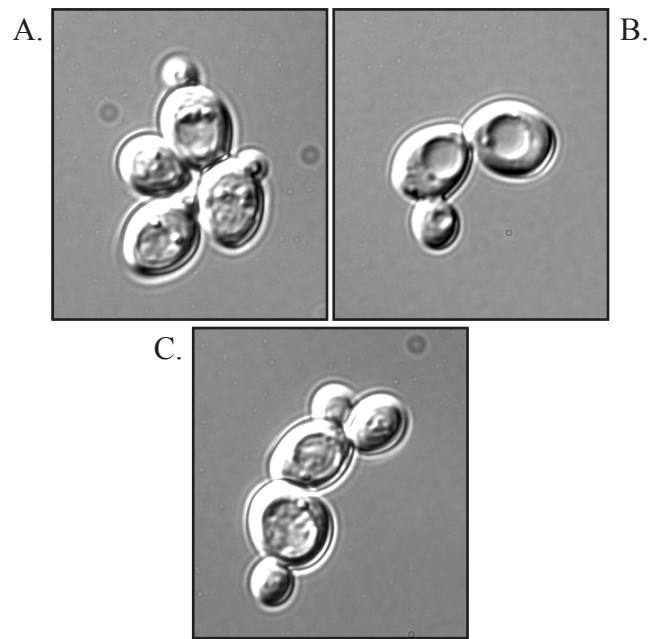


Abbildung 32: Vesikeltest. Die *sai1Δ*-Mutante (C) ist entsprechend dem Wildtyp (A) in der Lage, autophagische Vesikel in die Vakuole zu transportieren. Die *aut2Δ*-Mutante (B) ist hierzu nicht mehr in der Lage.

4.3.4.5 Proteinabbaurate In allen Autophagocytosemutanten ist der hungerinduzierte Proteinabbau geringer als im Wildtypstamm WCG4 α , da abzubauen Proteine nicht mehr in die Vakuole transportiert werden können. Die *aut4Δ*-Mutante und die *prb1Δ*-Mutante bauen nur noch 50-60% soviel Proteine im Vergleich zum Wildtypstamm ab, andere *Aut*-Mutanten (z. B. *aut1Δ*, *aut2Δ*) nur noch zu ca. 10-20%. Katja Sovarasteanu hat die Abbaurate der *sai1Δ*-Mutante nach der in ihrer Dissertation beschriebenen Methode ermittelt (Sovarasteanu [2000]), wobei sich kein Unterschied zu der Abbaurate des Wildtypstammes ergab (Abb. 33).

4.3.5 Affinitätschromatographie mit dem GST-Sai1-Protein

Die Interaktion des Aut9p und des Sai1p sollte mittels der Affinitätschromatographie bestätigt werden. Das GST-Sai1p und das reine GST-Protein wurden mittels des GST-Gene Fusion System in *E. coli* hergestellt, an eine Glutathion-Sepharosematrix gebunden (3.10.7) und mit einem nativen Proteinrohextrakt des Stammes *aut9Δ/pGFP-N/AUT9* über vier Stunden bei 4°C inkubiert. Die Aufarbeitung erfolgte nach der gleichen Methode wie in 4.2.3.1 beschrieben. Das GFP-Aut9p wurde nur im Eluat der GST-Sai1p-Säule detektiert und nicht im Eluat der reinen GST-Säule, was eine Interaktion des Sai1p mit dem Aut9p weiter bestätigt (Abb.34).

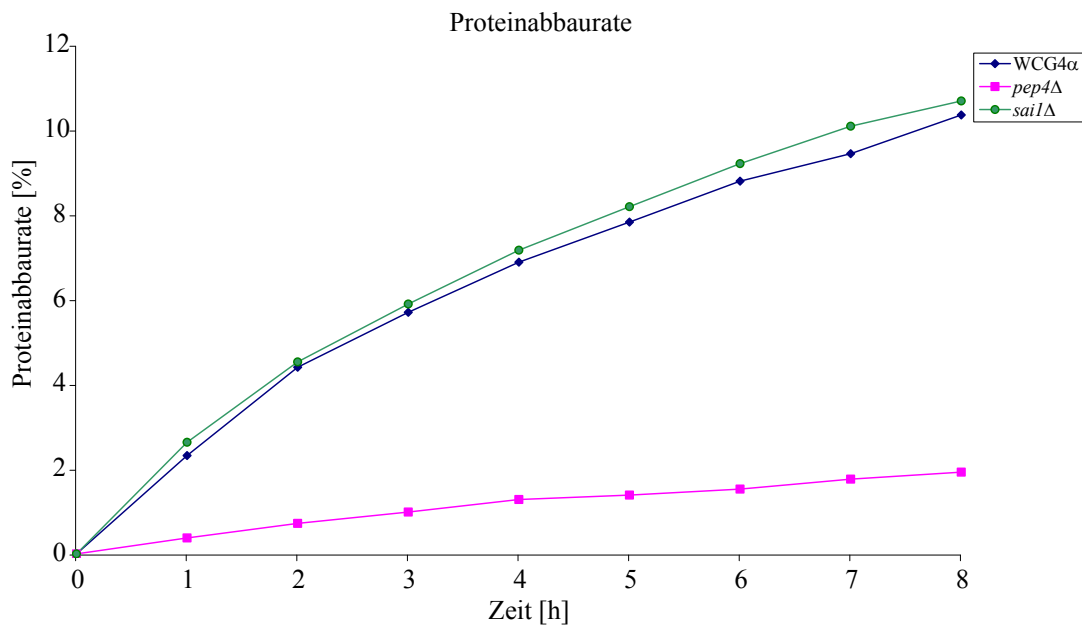


Abbildung 33: Proteinabbaurate. Die Proteinabbaurate der *sai1Δ*-Mutante entspricht der des Wildtypstammes WCG4α.

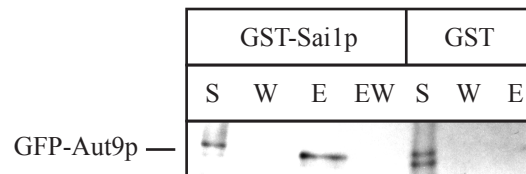


Abbildung 34: Affinitätschromatographie. Die GST- und die GST-Sai1p-Säule wurden mit einem Rohextrakt (S) inkubiert, der das GFP-Aut9p enthielt. Das GFP-Aut9p war nur im Eluat (E) der GST-Sai1p-Säule nachweisbar. W - letzter Waschschrift, EW - unbeladene GST-Sai1p-Säule.

Desweiteren sollte eine mögliche Interaktion des Sai1-Proteins mit weiteren Autophagocytoseproteinen, Aut2p und Aut7p durchgeführt werden. Diese Affinitätschromatographien wurden mit der gleichen Methode durchgeführt und hierzu native Proteinrohextrakte der Stämme *aut2Δ/pGFP-C/AUT2* und *aut7Δ/pGFP-N/AUT7* verwendet. Die jeweiligen Proteine konnten im Eluat der GST-Sai1p-Säule und nicht im Eluat der GST-Säule detektiert werden. Da die Banden im Vergleich zum Überstand nur schwach detektierbar waren, läßt dies auf eine schwache Interaktion schließen oder auf die Konkurrenz des nativen Sai1p, welches in den Rohextrakten enthalten war. Bei der Verwendung des *aut7Δ/pGFP-N/AUT7* Proteinrohextraktes wurden zwei Banden mit dem GFP-Antikörper detektiert, die eventuell dem GFP-Aut7p (obere Bande) und dem mit Phosphatidylethanolamin (PE) gekoppelten GFP-Aut7p-PE (untere Bande) entsprechen (Kirisako et al. [2000], Ichimura et al. [2000]) könnten. Der größere Unterschied im Molekularge-

wicht könnte auch an einer Laufanomalie aufgrund des angehängten GFP liegen.

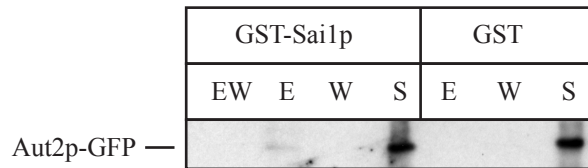


Abbildung 35: Affinitätschromatographie. Die GST- und die GST-Sai1p-Säule wurden mit einem Rohextrakt (S) inkubiert, der das Aut2p-GFP enthielt. Das Aut2p-GFP war nur im Eluat (E) der GST-Sai1p-Säule nachweisbar. Im letzten Waschschrift (W) wurde kein Aut2p-GFP mehr eluiert. EW - unbeladene GST-Sai1p-Säule.

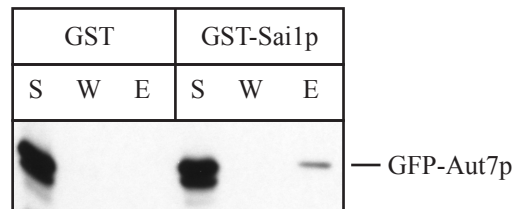


Abbildung 36: Affinitätschromatographie. Die GST- und die GST-Sai1p-Säule wurden mit einem Rohextrakt (S) inkubiert, der das GFP-Aut7p enthielt. Das GFP-Aut7p war nur im Eluat (E) der GST-Sai1p-Säule nachweisbar. Im letzten Waschschrift (W) wurde kein GFP-Aut7p mehr eluiert.

4.3.6 Das GFP-Sai1-Protein und das Sai1-GFP-Protein

Die Interaktion des Aut9p mit dem Sai1p läßt vermuten, das die Proteine innerhalb der Zelle zumindest zeitweise an der gleichen Stelle lokalisiert sind.

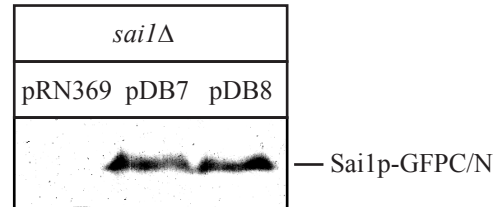


Abbildung 37: Expression der Sai1-GFP-Fusionproteine. Das C- und das N-terminalen GFP-Fusionsproteine werden in gleichem Ausmaße exprimiert und laufen in einem SDS-PAGE-Gel mit ca. 63 kDa entsprechend ihrem berechneten Molekulargewicht.

Die Lokalisation des Sai1-Proteins wurde zunächst mit GFP-getaggtten Proteinen analysiert. Das „grün fluoreszierende Protein“ aus der Qualle *Aequorea victoria* absorbiert Licht der Wellenlängen 470 nm (blau) und 395 nm (UV) und besitzt eine intrinsische Fluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei 508 nm (grün). Es hat sich als leicht nachzuweisendes Protein zur Lokalisation und Expression von GFP-Fusionsproteinen etabliert (Cubitt et al. [1995], Stearns [1995]). Zu untersuchende Gene können C- und N-terminal mit dem GFP fusioniert werden (Niedenthal et al. [1996]). Das Plasmid pDB7 enthält das *SAI1-GFP*-Gen, das Plasmid pDB8 das *GFP-SAI1*-Gen unter der Kontrolle des induzierbaren *MET25* Promotors (3.7.6). Die Plasmide pDB7 und pDB8 wurden in den Wildtypstamm WCG4 α , die *sai1Δ*-Mutante und in verschiedene *Aut*-Nullmutanten transformiert (*aut1Δ*, *aut2Δ*, *aut4Δ*, *aut5Δ*, *aut7Δ* und *aut9Δ*). Da das Sai1-Protein vermutlich mit einem oder mehreren Autophagocytoseproteinen interagiert, sollte hiermit geprüft werden, ob das Fehlen eines dieser Proteine die Lokalisation des Sai1-Proteins beeinflusst. Zuerst wurde die korrekte Expression der GFP-Fusionsproteine mittels Western-Blottings überprüft (Abb. 37). Stationäre Zellen der Stämme WCG4 α /pRN369, *sai1Δ*/pDB7 und *sai1Δ*/pDB8 wurden in methioninfreiem CM-Medium zur Induktion des *MET25*-Promotors angezogen. Die Zellen wurden durch alkalische Lyse aufgeschlossen, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die GFP-Proteine wurden mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen das GFP-Protein detektiert. Beide GFP-Fusionsproteine wurden mit einem Molekulargewicht von 63 kDa (Sai1p: 36,1 kDa, GFP: 27 kDa) detektiert, was dem berechneten Molekulargewicht entspricht.

Die intrazelluläre Lokalisation der Sai1p-GFP-Fusionproteine wurde mit Hilfe ei-

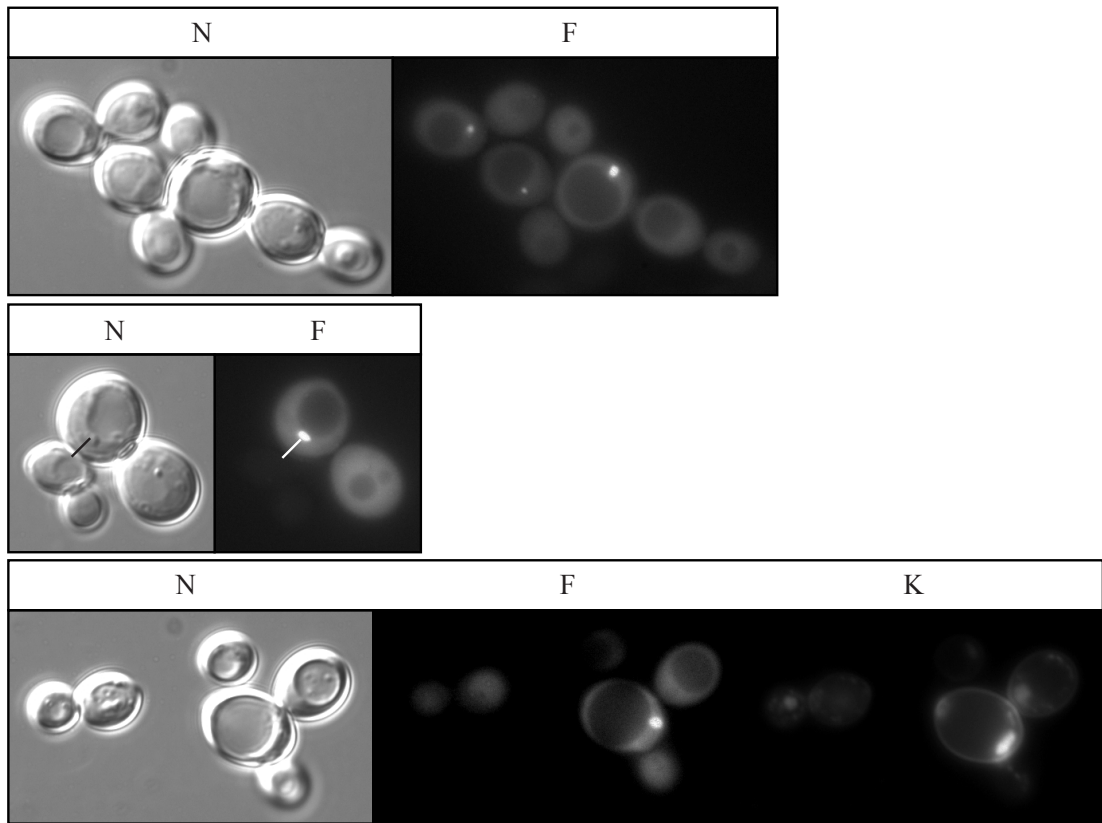


Abbildung 38: Lokalisierung des C-terminalen Sai1p-GFP-Proteins in *sai1Δ*-Zellen. Das Protein ist an Vesikeln im Cytosol und im Cytosol selbst lokalisiert (F). Die fluoreszierenden Vesikel sind auch in der Nomarski-Optik (N) erkennbar. Die Färbung des Kerns (K) zeigt, daß das Protein nicht im Kern lokalisiert ist.

nes Fluoreszenzmikroskopes analysiert. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{600} von ca. 2 in CM-Ura⁻, Met⁻-Selektionsmedium angezogen und unter dem Mikroskop betrachtet. Im Original erscheint die Fluoreszenz (F) des GFP-Proteins grün, sie wurde aber nur Schwarz/Weiß fotografiert und später teilweise eingefärbt. Das gleiche gilt für die blaue Lebendfärbung der Kerne mit Hoechst 33342-Trihydrochlorid-Trihydrat (3.9.6). Sowohl das C-terminale als auch das N-terminale Fusionsprotein ist in dieser Wachstumsphase im Cytosol lokalisiert, teilweise (bei ca. 30% der Zellen) auch an Vesikeln innerhalb des Cytosols, die nicht mit dem Kern identisch sind (Abb. 38 und Abb. 39). Das N-terminale Fusionsprotein wird im Cytosol stärker exprimiert als das C-terminale Fusionsprotein. Bei den Vesikeln könnte es sich um das perivakuoläre Kompartiment (auch preautophagosomale Kompartiment PAC) (Suzuki et al. [2001]) handeln. Diese Vesikel sind auch in der Nomarski Optik (N) erkennbar. Mehrere *Aut*-Mutanten, die das C-terminale Fusionsprotein exprimieren, weisen eine veränderte Zellmorphologie gegenüber dem Wildtyp und den Stämmen *sai1Δ*/pDB7 bzw. *sai1Δ*/pDB8 auf, ähnlich der, die in 4.3.7 beschrieben wird. Dieser Überexpressionsphänotyp tritt in gehungerten

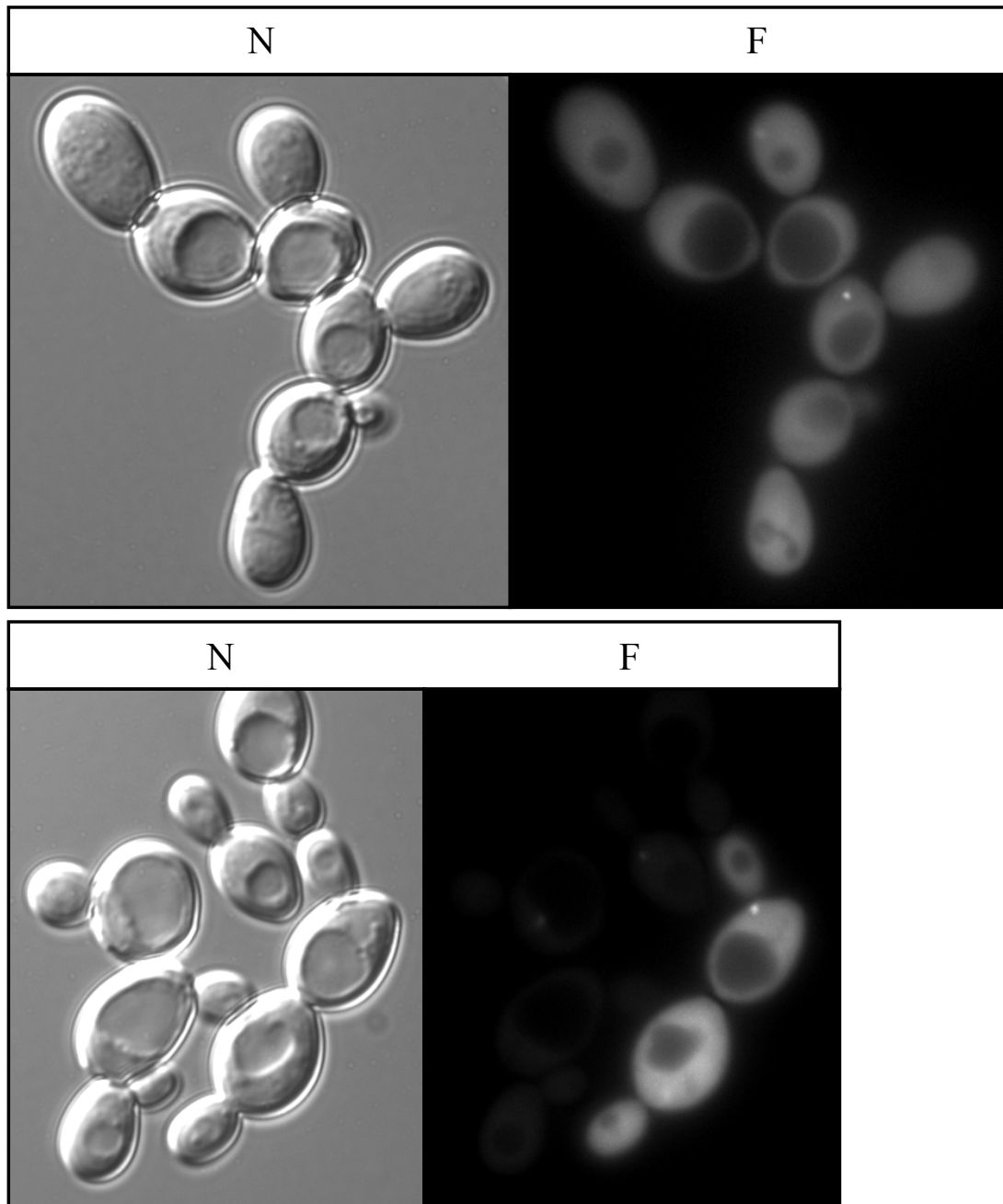


Abbildung 39: Lokalisierung des N-terminalen Sai1p-GFP-Proteins in *sai1Δ*-Zellen. Das Fusionsprotein ist ebenfalls im Cytosol und an Vesikeln im Cytosol (F) lokalisiert.

Zellen verstärkt auf. Die Zellen der Mutanten *aut1Δ/pDB7* und *aut2Δ/pDB7* weisen eine in die Länge gezogene Zellstruktur auf und einige Tochterzellen sind über eine schlauchförmige Verbindung mit der Mutterzelle verbunden (Abb. 41 und Abb. 43). Dies gilt auch für gehungerte Zellen des Stammes *aut9Δ/pDB7*. In den Mutanten *aut4Δ*, *aut7Δ* und *aut9Δ* sind im Cytosol verstärkt Vesikel in der Nomarski Optik (N) zu sehen, was jedoch auch auf das Selektionsmedium

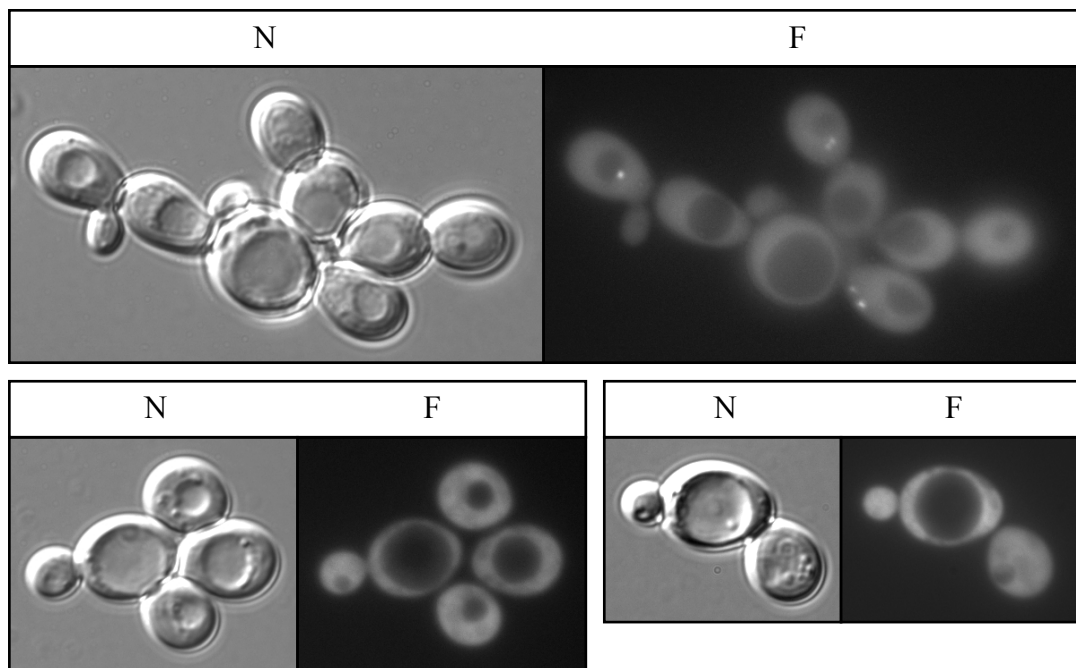


Abbildung 40: Lokalisierung des C-terminalen Sai1p-GFP-Proteins in Wildtyp-Zellen. Das Fusionsprotein ist an der gleichen Stelle wie in der *sai1Δ*-Mutante lokalisiert.

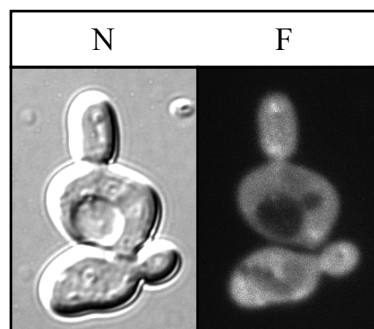


Abbildung 41: Lokalisierung des C-terminalen Sai1p-GFP-Proteins in *aut1Δ*-Zellen. Die Morphologie der Zellen ist gegenüber Wildtypzellen verändert. Das Protein ist an Vesikeln innerhalb des Cytosols und im Cytosol selbst lokalisiert.

zurückzuführen sein könnte (Abb. 44, Abb. 46 und Abb. 47). Die Vakuolen in der *aut5Δ*-Mutante erscheinen normal und es sind auch nur wenige Vesikel in der Nomarski-Optik erkennbar (Abb. 45). Dies liegt vermutlich daran, daß das Aut5-Protein unter diesen Bedingungen innerhalb der Vakuole lokalisiert ist und somit nicht mit dem Sai1p-GFP in Kontakt kommen kann. Das Aut4-Protein befindet sich an der Vakuolenmembran und könnte sich in räumlicher Nähe des Sai1p-GFP befinden. Die Überexpression des Sai1p-GFP in diesem Stamm bewirkt jedoch keine Veränderung in der Zellmorphologie. Die Proteine Aut7p, Apg2p und Aut9p sind an einer vesikelartigen Struktur (Noda et al. [2000], Shintani et al. [2001], Su-

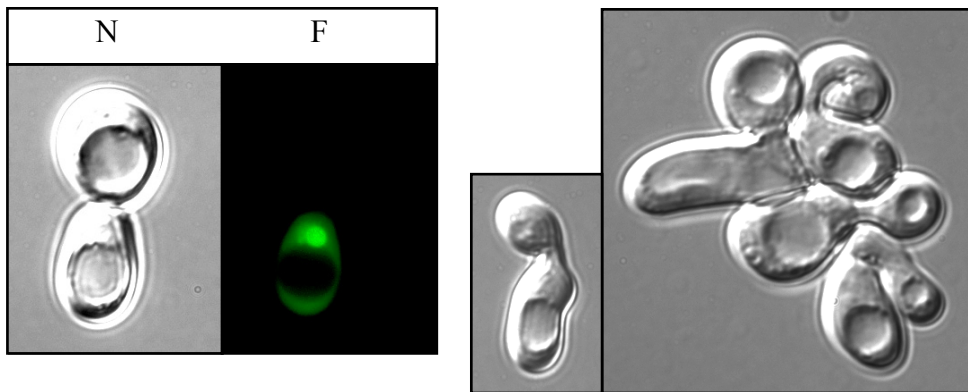


Abbildung 42: Lokalisierung des N-terminalen Sai1p-GFP-Proteins in *aut1Δ*-Zellen. Das Protein ist an Vesikeln innerhalb des Cytosols und im Cytosol selbst lokalisiert. Die Zellen weisen die gleiche Morphologie wie in 41 und 43

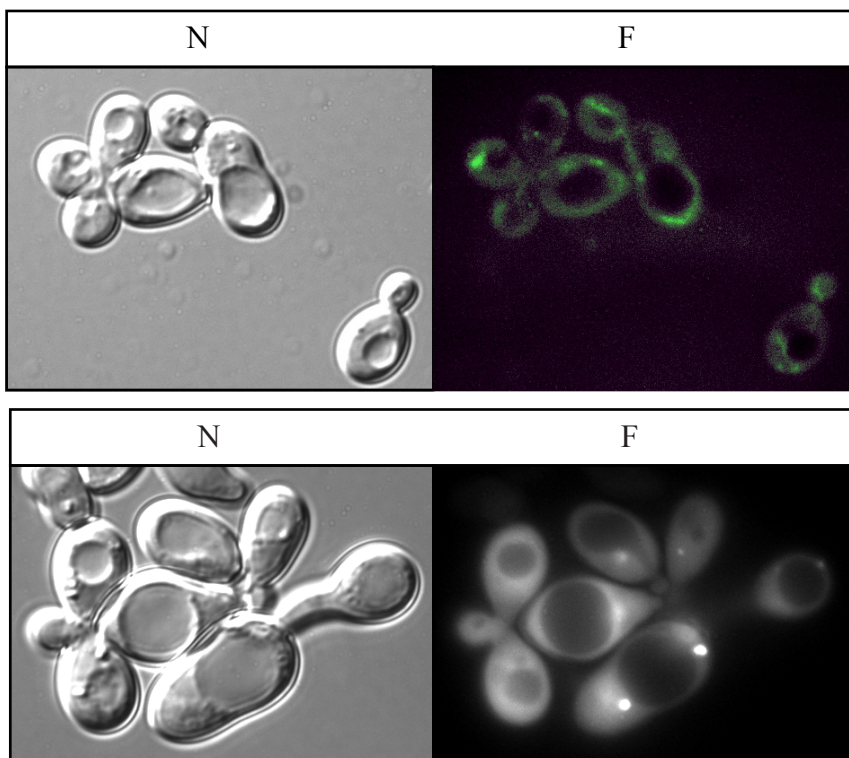


Abbildung 43: Lokalisierung des C-terminalen Sai1p-GFP-Proteins in *aut2Δ*-Zellen. Das Fusionsprotein am gleichen Kompartiment wie in der *sai1Δ*-Mutante lokalisiert, die Zellen weisen jedoch eine ungewöhnliche Morphologie auf.

zuki et al. [2001]) lokalisiert, dem perivakuolären Kompartiment. Eine Interaktion der Proteine Aut7p und Aut9p wurde noch nicht veröffentlicht, jedoch wird die Lokalisation des Aut7p vom Vorhandensein des Aut9p beeinflusst. Wildtypzellen sowie Zellen der *sai1Δ*-Mutante, der *aut4Δ*-Mutante und der *aut5Δ*-Mutante, die das Sai1p-GFP exprimieren, weisen keine veränderte Zellmorphologie auf.

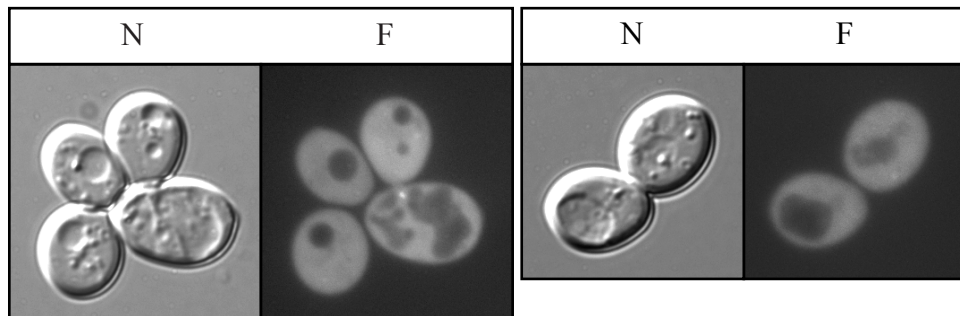


Abbildung 44: Lokalisierung des C-terminalen Sai1p-GFP-Proteins in *aut4Δ*-Zellen. Das Fusionsprotein ist im Cytosol lokalisiert.

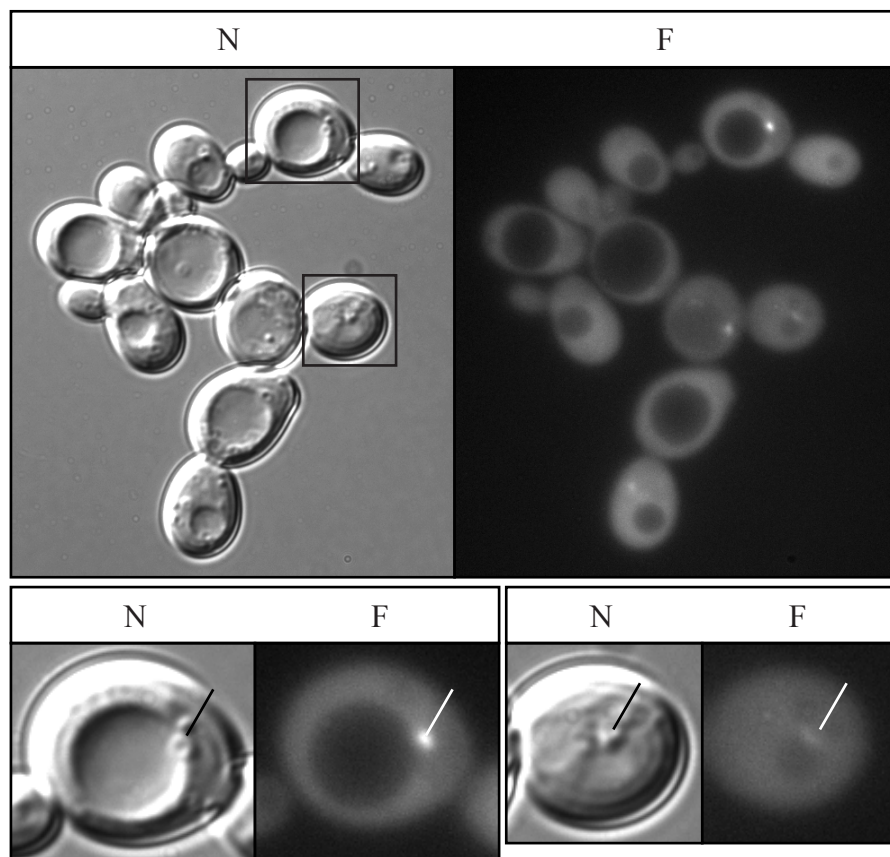


Abbildung 45: Lokalisierung des C-terminalen Sai1p-GFP-Proteins in *aut5Δ*-Zellen. Das Fusionsprotein ist an der gleichen Stelle wie in den *sai1Δ*-Zellen lokalisiert, die Zellen weisen keine ungewöhnliche Morphologie auf.

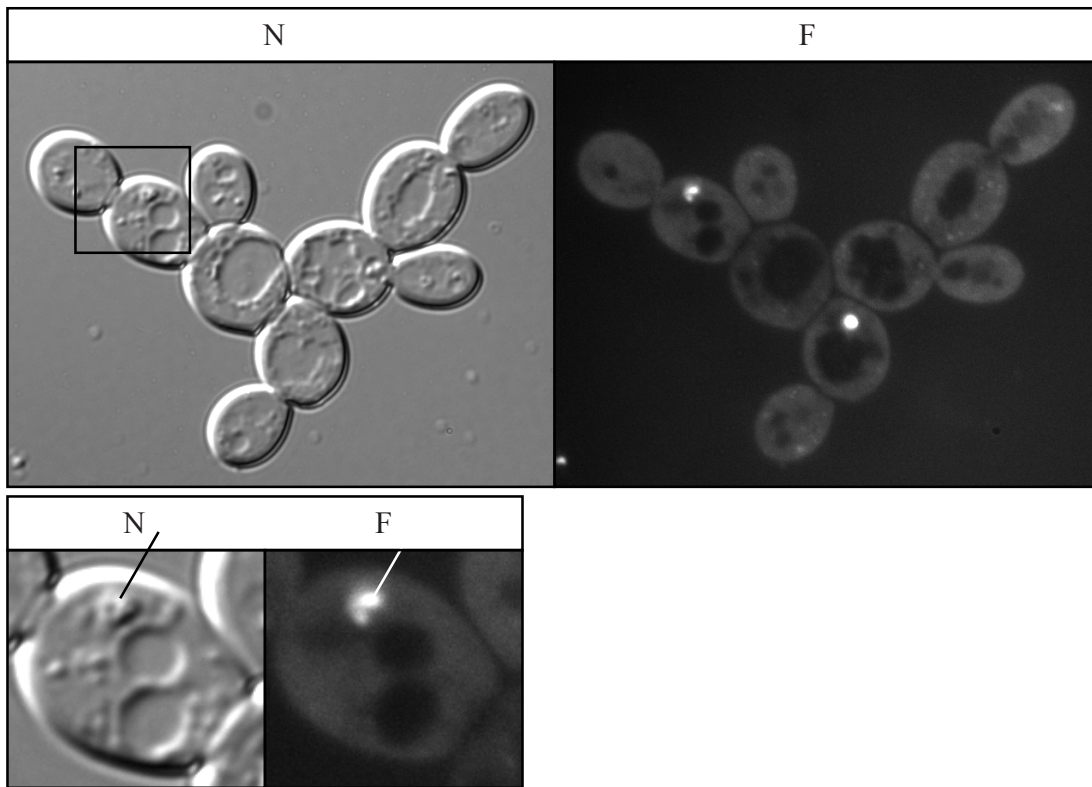


Abbildung 46: Lokalisierung des C-terminalen Sai1p-GFP-Proteins in *aut7Δ*-Zellen. Das Fusionsprotein ist an der gleichen Stelle wie in den *sai1Δ*-Zellen lokalisiert.

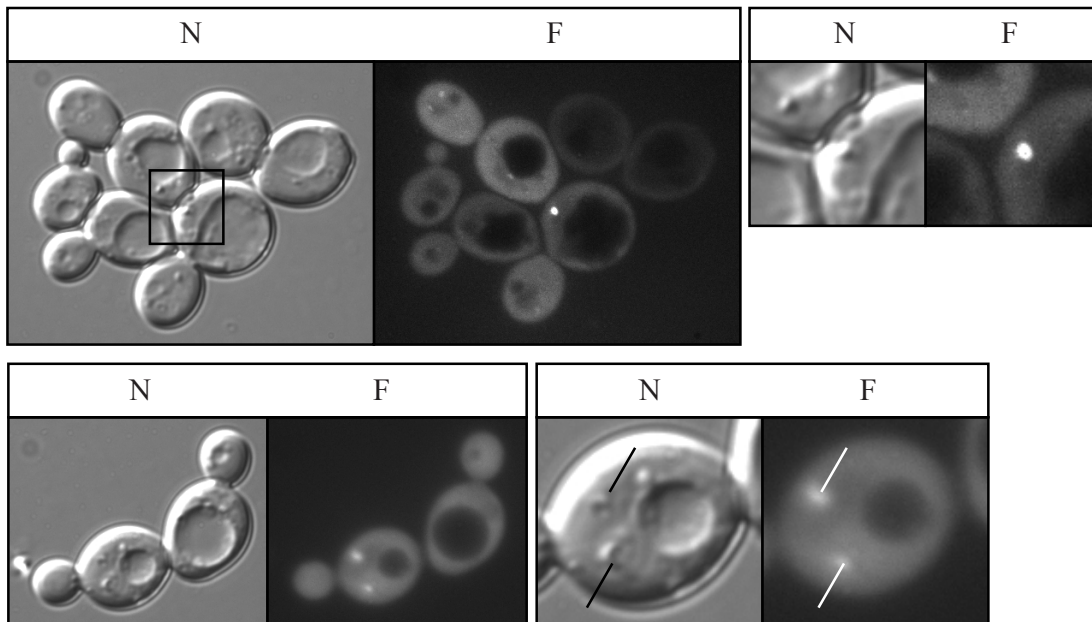


Abbildung 47: Lokalisierung des C-terminalen Sai1p-GFP-Proteins in *aut9Δ*-Zellen. Das Fusionsprotein ist an der gleichen Stelle wie in den *sai1Δ*-Zellen lokalisiert.

4.3.7 Überexpression des Sai1-Proteins

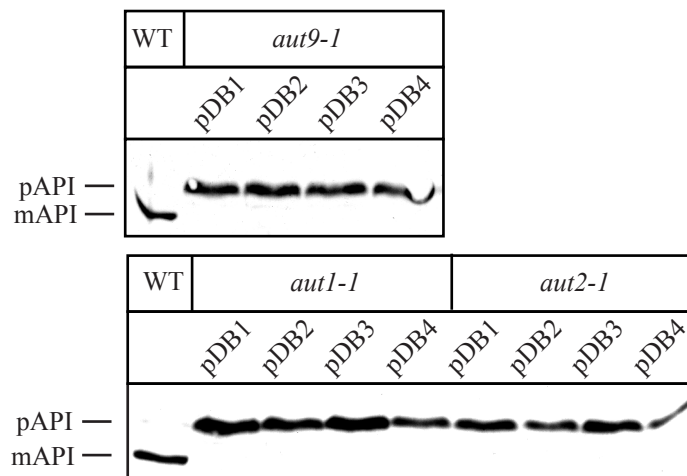


Abbildung 48: Reifung der Aminopeptidase I (API) der Autophagocytosemutanten *aut1-1*, *aut2-1* und *aut9-1*, die das Sai1-Protein (pDB1 und pDB2) und das Sai2-Protein (4.4) (pDB3 und pDB4) auf einem Überexpressionsplasmid exprimieren. Im Gegensatz zum Wildtyp (WT) ist die API in allen Stämmen ungerift.

Die *sai1* Δ -Mutante weist keinen *Aut*-Phänotyp auf und ist somit in der Lage die Aminopeptidase I (API) zu reifen. Da das Sai1-Protein mit Hilfe eines Two-Hybrid Screens mit dem Aut9-Protein gefunden wurde, sollte noch untersucht werden, ob die Überexpression des nativen Sai1-Proteins den Defekt in der API-Reifung der Punktmutanten *aut1-1*, *aut2-1* und *aut9-1* komplementiert. Das *SAI1*-Gen wurde als PCR-Produkt mit nativem Promotor und Terminator in die *SmaI* Schnittstelle der Überexpressionsplasmide pRS315 (pDB1), ein centromeres Plasmid, und pRS425 (pDB2), ein 2μ -Plasmid, kloniert (3.7.1). Die DNA-Sequenz der so klonierten Plasmide wurde analysiert und mit der aus verschiedenen Genbanken verglichen (4.3.2). Die ermittelten Sequenzen entsprachen denen der Genbanken. Stationäre Zellen der *aut1-1*, *aut2-1* und *aut9-1* Mutanten, die das Sai1-Protein auf einem centromeren bzw. 2μ -Plasmid exprimierten (pDB1 und pDB2), wurden durch alkalische Lyse aufgeschlossen, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die API wurde mit einem polyklonalen Peptidantikörper gegen die API detektiert. Die API bleibt auch bei der Überexpression des Sai1-Proteins auf einem centromeren oder 2μ -Plasmid in diesen *Aut*-Mutanten ungerift (Abb. 48). Das Sai1-Protein ist somit kein „high copy“ Suppressor der Autophagocytosemutanten *aut1-1*, *aut2-1* und *aut9-1*.

Zudem weisen einige *Aut*-Mutanten, die Sai1-GFP-Proteine exprimieren, eine ungewöhnliche Zellmorphologie auf (4.3.6). Um sicher zu gehen, daß dies kein Effekt des GFP-Proteins bzw. eines nicht funktionellen Sai1p-GFP-Fusionsproteins

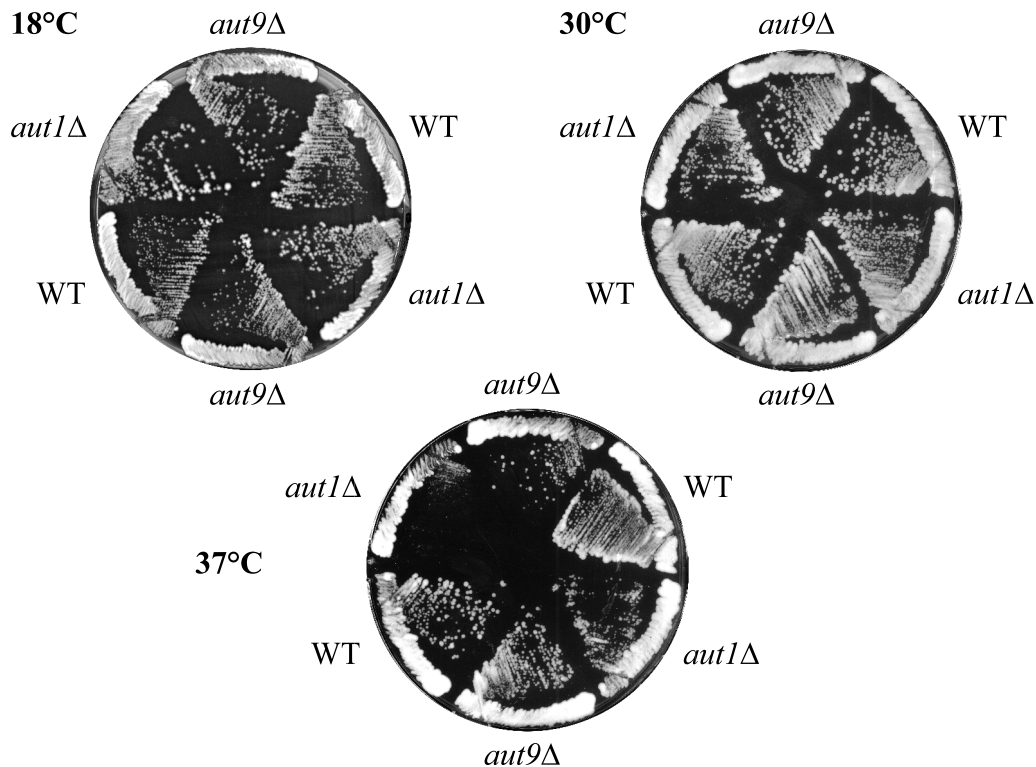


Abbildung 49: Wachstumstest der Stämme, in die das Plasmid pDB1 (obere Hälfte der Platten) und pRS315 (untere Hälfte der Platten) transformiert wurde. Nur bei der *aut1Δ*-Mutante, die das Plasmid pDB1 enthält ist ein verlangsamtetes Wachstum der Zellen bei 37°C erkennbar.

ist, wurden die Plasmide pRS315, pRS425, pDB1 und pDB2 in den Wildtypstamm WCG4 α , in die *sai1Δ*-Mutante und in die Autophagocytosestämmen *aut1Δ*, *aut2Δ*, *aut3Δ*, *aut7Δ* und *aut9Δ* transformiert. Diese Stämme wurden auf CM-Leu⁻-Selektionsplatten auf Einzelzellen ausgestrichen und bei 18°C, 30°C und 37°C inkubiert. Nur die transformierten Zellen der *aut1Δ*- und der *aut9Δ*-Mutante zeigten einen Wachstumsphänotyp (Abb. 49 und Abb. 50). Die Zellen der *aut1Δ*-Mutante, die das Sai1p auf dem centromeren Plasmid pDB1 exprimieren, wachsen bei 37°C deutlich schlechter als der Wildtypstamm und die *aut1Δ*-Mutante mit dem Plasmid pRS315. Zellen, die das Sai1p auf dem 2 μ Plasmid pDB2 exprimieren, wachsen bei 30°C und bei 37°C schlechter als der Wildtypstamm, aber besser als die *aut1Δ*-Mutante mit dem centromeren Plasmid bei 37°C. Die Zellen der *aut9Δ*-Mutante wachsen bei 30°C und 37°C mit dem „leeren“ Plasmid pRS425 schlechter als Wildtypzellen. Die Expression des Sai1p auf dem Plasmid pDB2 hebt diesen Defekt wieder auf, bei 37°C wachsen die Zellen sogar schneller als die Wildtypzellen. Die Plasmide pRS315 und pDB1 bewirken in der *aut9Δ*-Mutante keinen erkennbaren Wachstumsphänotyp.

Außerdem wurden Zellen, die das Sai1-Protein überexprimieren, in CM-Leu⁻-

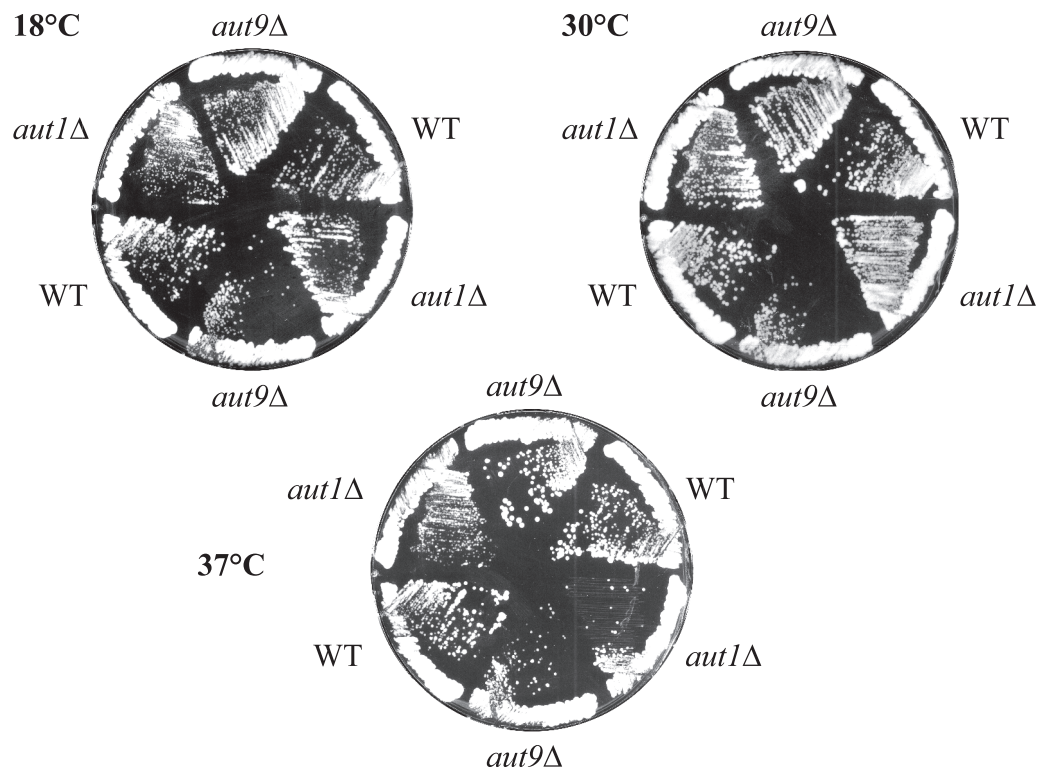


Abbildung 50: Wachstumstest der Stämme, in die das Plasmid pDB2 (obere Hälfte der Platten) und pRS425 (untere Hälfte der Platten) transformiert wurde. Die *aut9Δ*-Mutante wächst bei 30°C und bei 37°C mit dem „leeren“ Plasmid pRS425 schlechter als der Wildtypstamm. Dieser Defekt wird anscheinend durch das Plasmid pDB2 wieder behoben, bei 37°C wächst dieser Stamm mit dem Plasmid pDB2 sogar noch schneller als der Wildtypstamm. Die *aut1Δ*-Mutante wächst bei 37°C mit dem Plasmid pDB2 langsamer als der Wildtypstamm.

Selektionsmedium bei 30°C über Nacht angezogen und bei einer Zelldichte von (OD_{600}) ca. 2 unter dem Lichtmikroskop mit der Nomarskioptik betrachtet. Die *aut1Δ*-Mutante, die mit dem centromere Plasmid pDB1, sowie die Mutanten *aut2Δ*, *aut7Δ* und *aut9Δ*, die mit dem Plasmid pDB2 transformiert wurden, wurde mit dieser Methode untersucht. Zellen der *aut9Δ*-Mutante, die das „leere“ Plasmid pRS425 enthielten, wurden auch unter dem Mikroskop betrachtet, da dieses Plasmid allein einen Wachstumsdefekt in dieser Mutante erzeugt. Die Zellen der *aut1Δ*-Mutante, die das Sai1p auf dem centromeren Plasmid pDB1 exprimieren, weisen eine länglich Form auf gleich der Zellen, die das Sai1p-GFP exprimieren (Abb. 55). Die Kerne von Mutter- und Tochterzellen sind normal verteilt. Die Morphologie der Zellen der *aut2Δ*-Mutante ist weitgehend normal, nur wenige Tochterzellen weisen eine abnorme Verlängerung zur Mutterzelle hin auf (Abb. 54). Dies stellt ein Unterschied zu den Ergebnissen aus 4.3.6 dar, was jedoch auch aufgrund der verschiedenen Wachstumsmedien und den verschieden starken Promotoren erklärbar ist. Die Zellen der *aut7Δ*-Mutante erscheinen völlig normal,

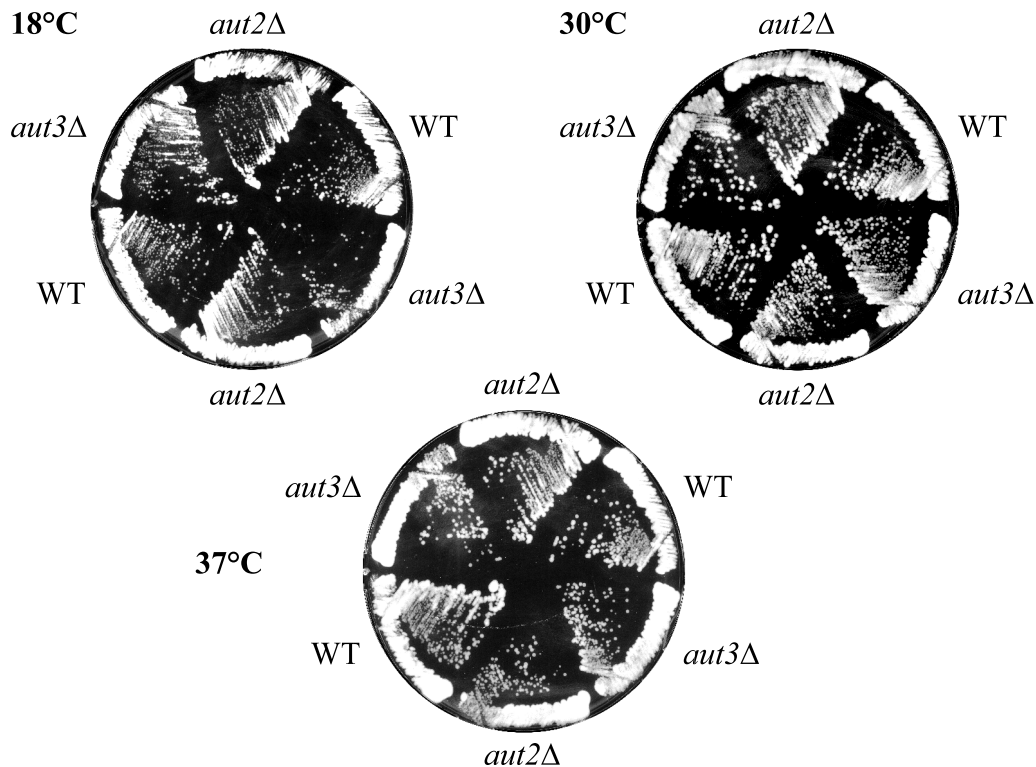


Abbildung 51: Wachstumstest der Stämme, in die das Plasmid pDB1 (obere Hälfte der Platten) und pRS315 (untere Hälfte der Platten) transformiert wurde. Das Wachstum der Zellen wird von den transformierten Plasmiden unter diesen Bedingungen nicht beeinträchtigt.

entsprechend der Zellen, die das Sai1p-GFP exprimieren (Abb. 54). Die Tochterzellen der *aut9Δ*-Mutante, die das Sai1p auf dem Plasmid pDB2 überexprimieren, weisen eine abnorme Verlängerung zur Mutterzelle hin auf (Abb. 54). Die Zellen, die das „leere“ Plasmid pRS425 enthalten weisen eine unveränderte Zellmorphologie auf (Abb. 56). Dies entspricht wiederum den Ergebnissen aus 4.3.6. Da der Wachstumsphänotyp der *aut1Δ*- und der *aut9Δ*-Mutante, die diese Plasmide enthalten, hauptsächlich bei 37°C auftritt, wurden diese Zellen in Flüssigmedium bei 37°C inkubiert und unter dem Mikroskop betrachtet. Es ergab sich jedoch das Problem, das unter diesen Bedingungen auch die Wildtypzellen in ihrer Morphologie leicht verändert waren. Daher wurden auch die Mutanten betrachtet, die die Plasmide pRS315 bzw. pRS425 enthielten. Die *aut1Δ*-Mutante, die das Sai1-Protein auf einem centromeren Plasmid überexprimiert, weist bei 37°C die gleiche morphologische Besonderheit auf wie bei 30°C. Die *aut1Δ*-Mutante, die das Plasmid pRS315 enthält, weist diesen Phänotyp nicht auf (Abb. 55).

Da Zellen der *aut1Δ*-Mutante, die das Sai1-Protein auf einem centromeren bzw. 2μ Plasmid exprimieren, Wachstumsdefekte aufweisen, wurde diese Mutante für einem Funktionalitätstest eines HA-getaggtgen Sai1-Proteins verwendet (4.3.8). Da-

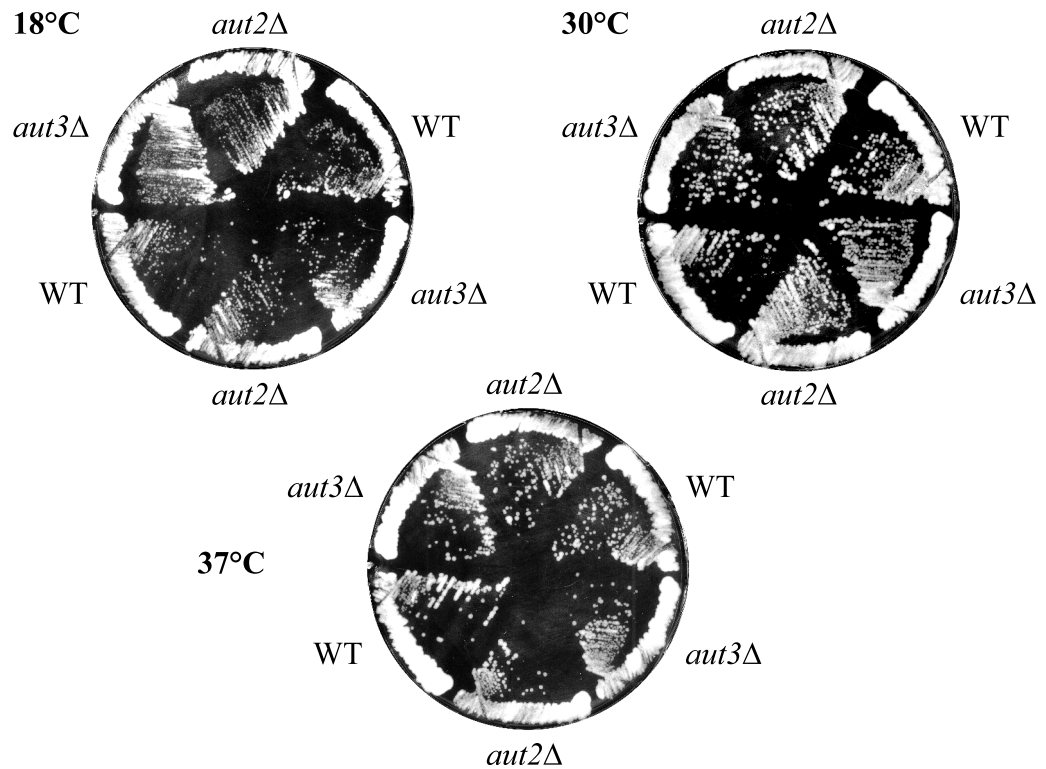


Abbildung 52: Wachstumstest der Stämme, in die das Plasmid pDB2 (obere Hälfte der Platten) und pRS425 (untere Hälfte der Platten) transformiert wurde. Das Wachstum der Zellen wird von den transformierten Plasmiden unter diesen Bedingungen nicht beeinträchtigt.

zu wurden die Plasmide pDB5 und pDB6 (3.7.1), die das *SAI1-HA₃* Gen mit nativem Promotor und Terminator enthielten, in den Stamm *aut1Δ* transformiert und die Zellen einem Wachstumstest unterzogen. Es konnte im Gegensatz zum GFP-getagten Protein (4.3.6) kein Unterschied im Wachstum der Zellen zum nativen Protein festgestellt werden.

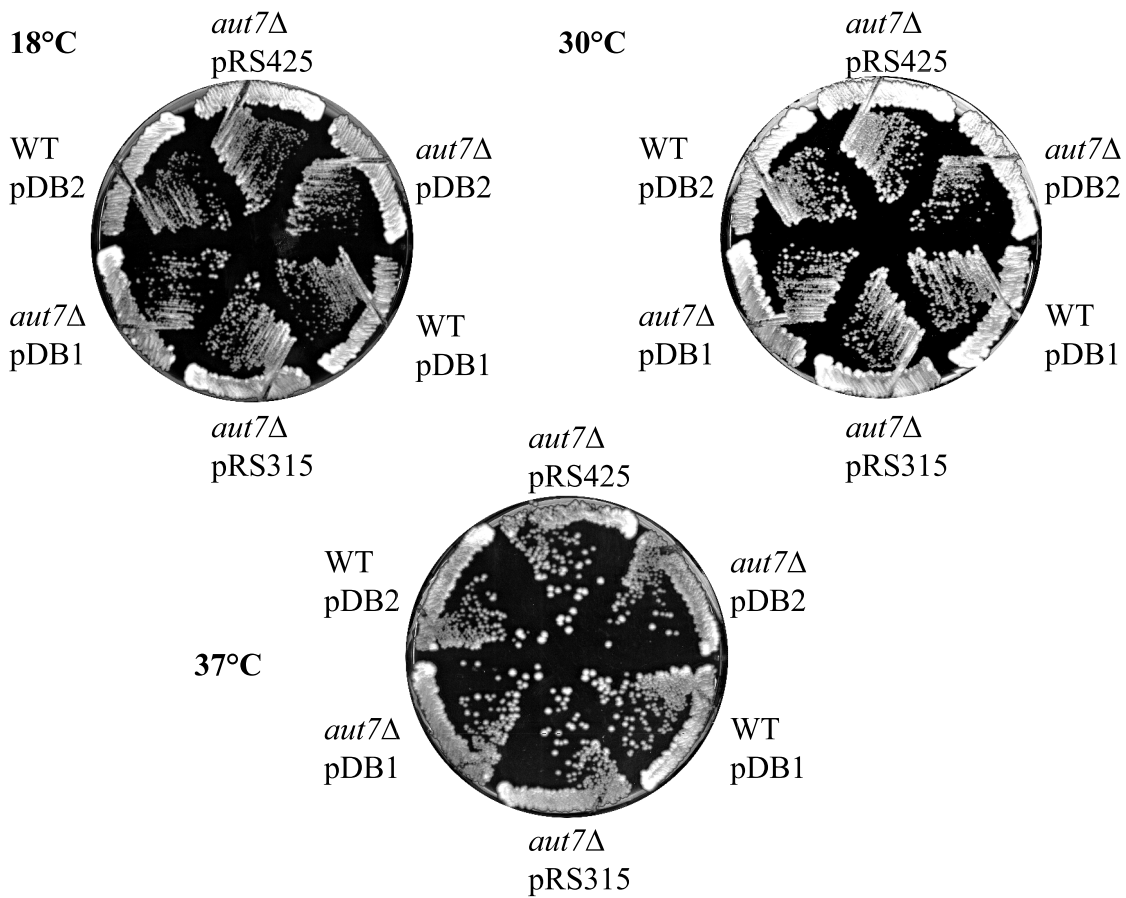


Abbildung 53: Wachstumstest der Stämme, in die das Plasmid pDB1, pDB2, pRS315 und pRS425 transformiert wurde. Das Wachstum der Zellen wird von den transformierten Plasmiden unter diesen Bedingungen nicht beeinträchtigt.

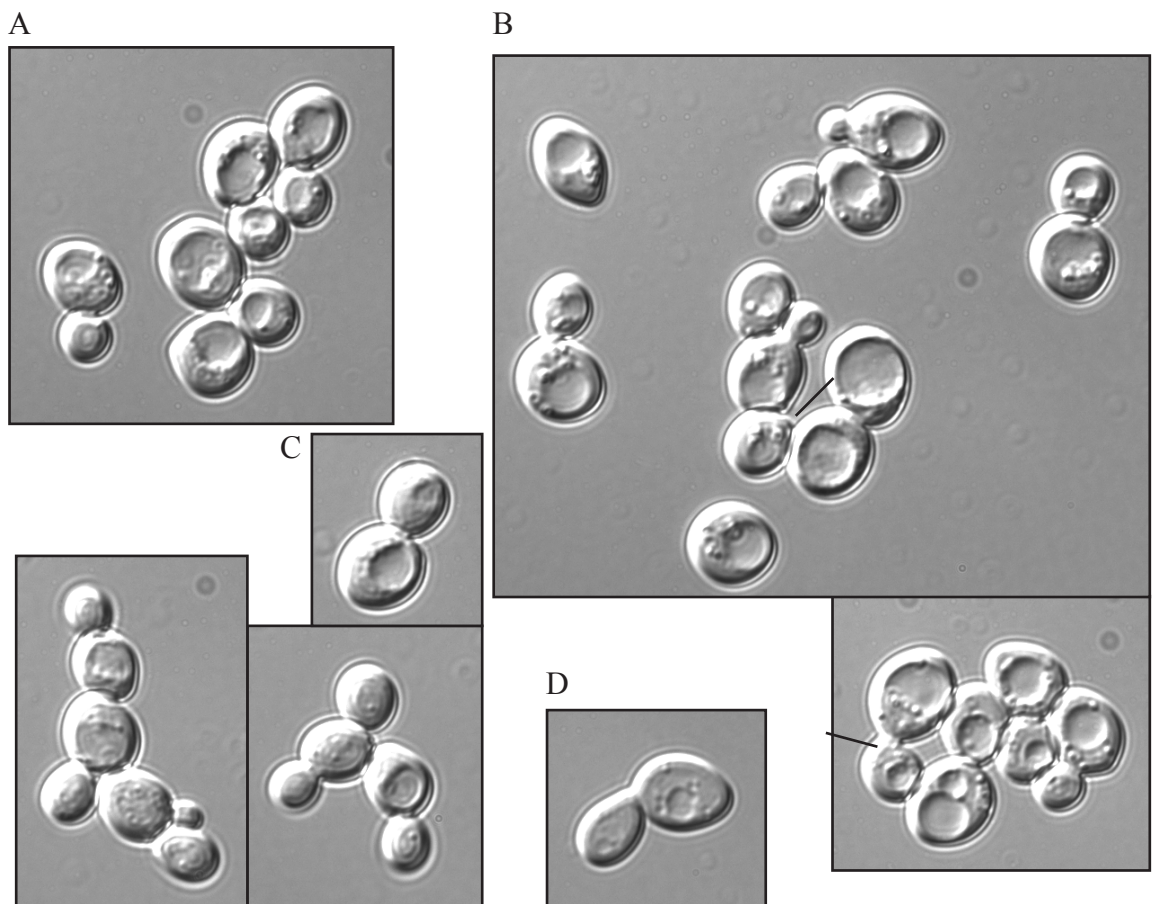


Abbildung 54: Stationäre Zellen der Stämme WCG4 α (A), *aut2* Δ (B), *aut7* Δ (C) und *aut9* Δ (D), die das Sai1-Protein auf einem 2 μ -Plasmid (pDB2) exprimieren. Die Morphologie der Zellen des *aut2* Δ -Stammes ist weitgehend normal, nur wenige Tochterzelle weisen eine abnorme Verlängerung zur Mutterzelle hin auf. Die Morphologie der Zellen des *aut7* Δ -Stammes ist weitgehend normal. Die Zellen des *aut9* Δ -Stammes können sich nicht mehr normal von ihren Tochterzellen trennen. Die Buds weisen eine ungewöhnliche verlängerte Verbindung zur Mutterzelle auf.

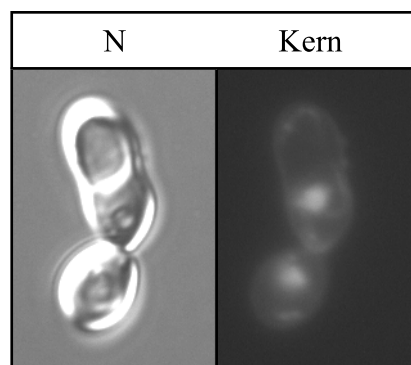


Abbildung 55: Stationäre Zellen des *aut1* Δ -Stammes, die das Sai1-Protein auf einem *CEN*-Plasmid (pDB1) exprimieren. Die Kerne sind normal verteilt, die Zellen weisen zum Teil jedoch eine längliche Form auf.

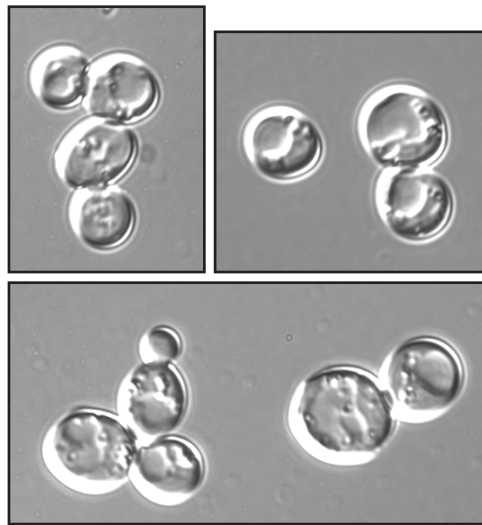


Abbildung 56: Stationäre Zellen des *aut9Δ*-Stammes, die das 2μ -Plasmid pRS425 enthalten.

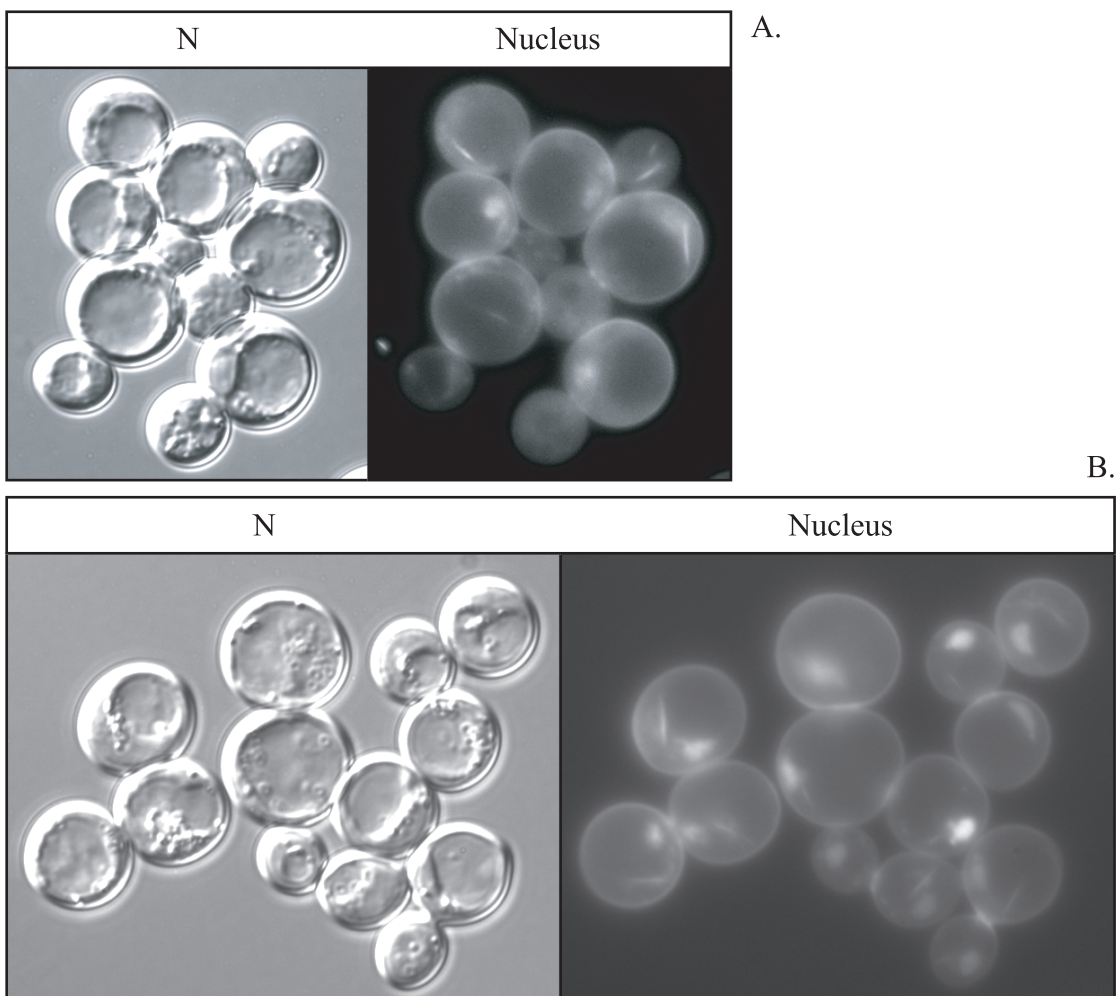


Abbildung 57: Stationäre Zellen des Wildtypstammes WCG4 α , die bei 37°C angezogen wurden. (A.) mit dem Plasmid pRS425 und (B.) mit dem Plasmid pDB2.

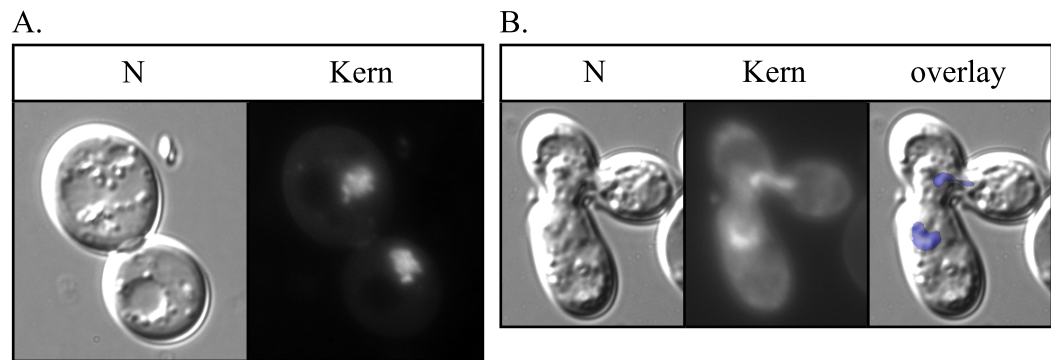


Abbildung 58: Stationäre Zellen des *aut1Δ*-Stammes, die bei 37°C angezogen wurden. (A.) mit dem Plasmid pRS315 und (B.) mit dem Plasmid pDB1.

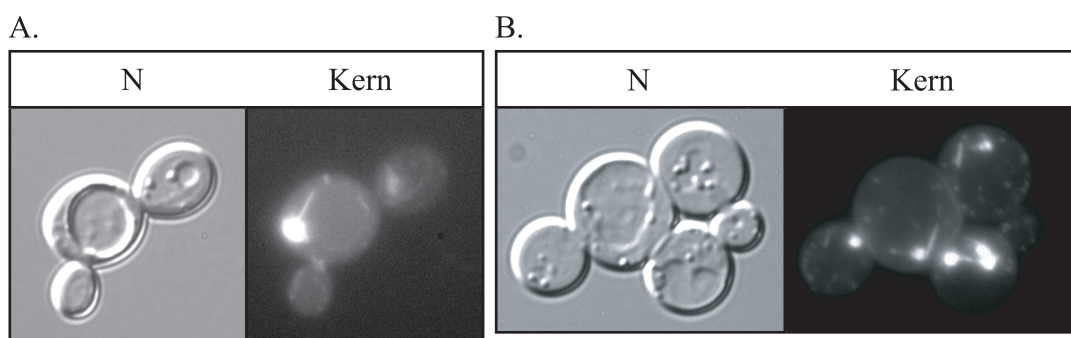


Abbildung 59: Stationäre Zellen des *aut9Δ*-Stammes, die bei 37°C angezogen wurden. (A.) mit dem Plasmid pRS425 und (B.) mit dem Plasmid pDB2.

4.3.8 Das Sai1-HA₃Protein

Zum direkten Nachweis des Sai1p wurde ein DNA-Fragment chromosomal an den Carboxyterminus des ORF's YMR262w integriert (3.8.11.2), welches das HA- (Haemagglutinin-)Epitop dreimal sowie das *HIS5*-Gen aus *S. pompe* enthielt. Mittels PCR wurde das Fragment mit den Primern 8HA-1 und 8HA-2 (Terminatorregion des *SAI1*-Gens ohne Stoppcodon) sowie dem Vektor p3XHA-HIS5 (3.7.10) als template hergestellt. Das *HIS5*-Gen aus *S. pompe* entspricht dem *HIS3*-Gen aus *S. cerevisiae* und eignet sich daher zur Selektion transformierter Zellen auf histidinfreiem Medium, die eine Mutation in der Imidazolglycerolphosphat-(IP)-Dehydratase (*his3-11*) besitzen. Die transformierten Wildtypzellen wurden auf CM-His⁻-Platten selektioniert und die Integration des DNA-Fragmentes mittels eines Southern-Blots analysiert (3.8.14). Die chromosomale DNA des Wildtypstammes und die der neu transformierten Stämme wurde mit den Enzymen *XbaI* über Nacht verdaut. Die chromosomale DNA des transformierten Stammes wurde zusätzlich mit *BamHI* verdaut. Als Sonde wurde ein Fluorescein-markiertes *HIS5*-Fragment (Epple [2000]) verwendet. In der DNA des Wildtypstammes konnte wie erwartet keine Bande, in der DNA des transformierten Stammes die erwarteten Banden bei 1,3 kb (*XbaI*) und 3,7 kb (*BamHI*) detektiert werden (Abb.60). Das DNA-Fragment konnte integriert und somit das Sai1p mit einem HA-Epitop versehen werden.

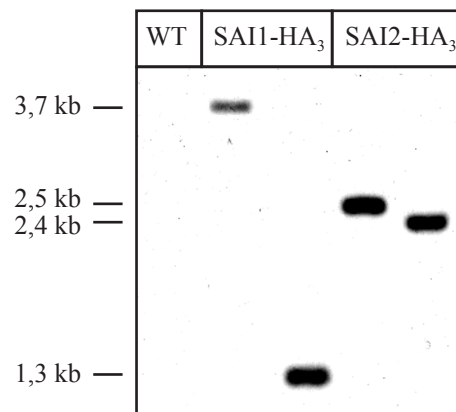


Abbildung 60: Southern-Blot der HA-Epitop markierten Stämme YDB13 (WCG4 α SAI1:HA₃) und YDB16 (WCG4 α SAI2:HA₃) (4.4.2). Spur 1, 3 und 5 *XbaI*-Verdau, Spur2 *BamHI*-Verdau und Spur 4 *PstI*-Verdau.

Die Expression des Sai1-HA₃ Proteins wurde mittels Western-Blottings überprüft (3.10.5). Stationäre Zellen der Stämme WCG4 α und YDB13 (WCG4 α SAI1:HA₃) wurden durch alkalischer Lyse aufgeschlossen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die HA-getaggten Proteine wurden mit Hilfe eines monoklonalen Antikörper gegen das HA-Protein detektiert (Abb. 61). Die Größe

des exprimierten Proteins entspricht in etwa dem errechneten Molekulargewicht von 41 kDa. Im Wildtyp sind wie erwartet keine Banden detektierbar.

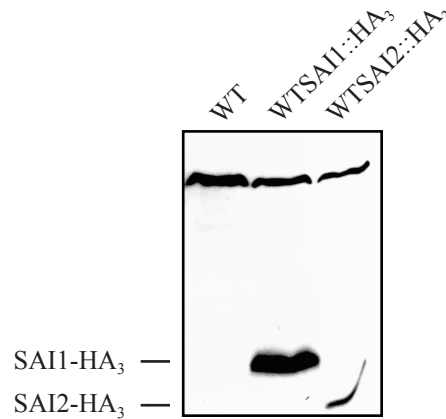


Abbildung 61: Expression der HA-getaggten Proteine Sai1-HA₃p und Sai2-HA₃p (4.4.2).

Da die *sai1*Δ-Mutante keinen Wachstumsphänotyp aufweist, kann die Funktionalität des getaggten Sai1-Proteins mit Hilfe eines Wachstumstests nicht überprüft werden. Sollte bei einem Wachstumstest des getaggten Stammes ein Phänotyp nachweisbar sein, so ist das Protein mit Sicherheit nicht funktionell. Sollte sich kein unterschiedlicher Befund zur *sai1*Δ-Mutante ergeben, so hat dies in Bezug auf die Funktionalität des Proteins keine Aussagekraft. Das Wachstum der Zellen wird in 4.4.2 abgebildet. Der Stamm YDB13 weist unter diesen Bedingungen keinen Wachstumsphänotyp auf, so daß die Funktionalität des getaggten Proteins weiter ungeklärt ist. Ein Phänotyp ist nur bei der Überexpression des nativen Proteins in einigen *Aut*-Mutanten erkennbar. Daher wurde das getaggte Gen mit dem *HIS5*-Gen aus *S. pombe* in die zwei Plasmide pRS315 (*CEN*-Plasmid) und pRS425 (2μ-Plasmid)(3.7.1) kloniert. Diese Plasmide, pDB5 und pDB6, wurden in die *aut1*Δ-Mutante transformiert und das Wachstum der Zellen bei 18°C, 30°C und 37°C untersucht (Abb. 62). Der Stamm mit dem getaggten Sai1-Protein wies den gleichen Phänotyp wie der Stamm mit dem nativen Protein auf. Die Zellen der *aut1*Δ-Mutante, die das centromere Plasmid enthalten, wachsen bei 37°C schlechter als die Wildtypzellen (Abb.62). Leider sind die Einzelkolonien auf der Abbildung schlecht erkennbar. Bei Vergrößerung der Bilder und auf den Originalplatten ist dies jedoch gut erkennbar und legt nahe, daß das getaggte Protein zumindest funktionell sein könnte.

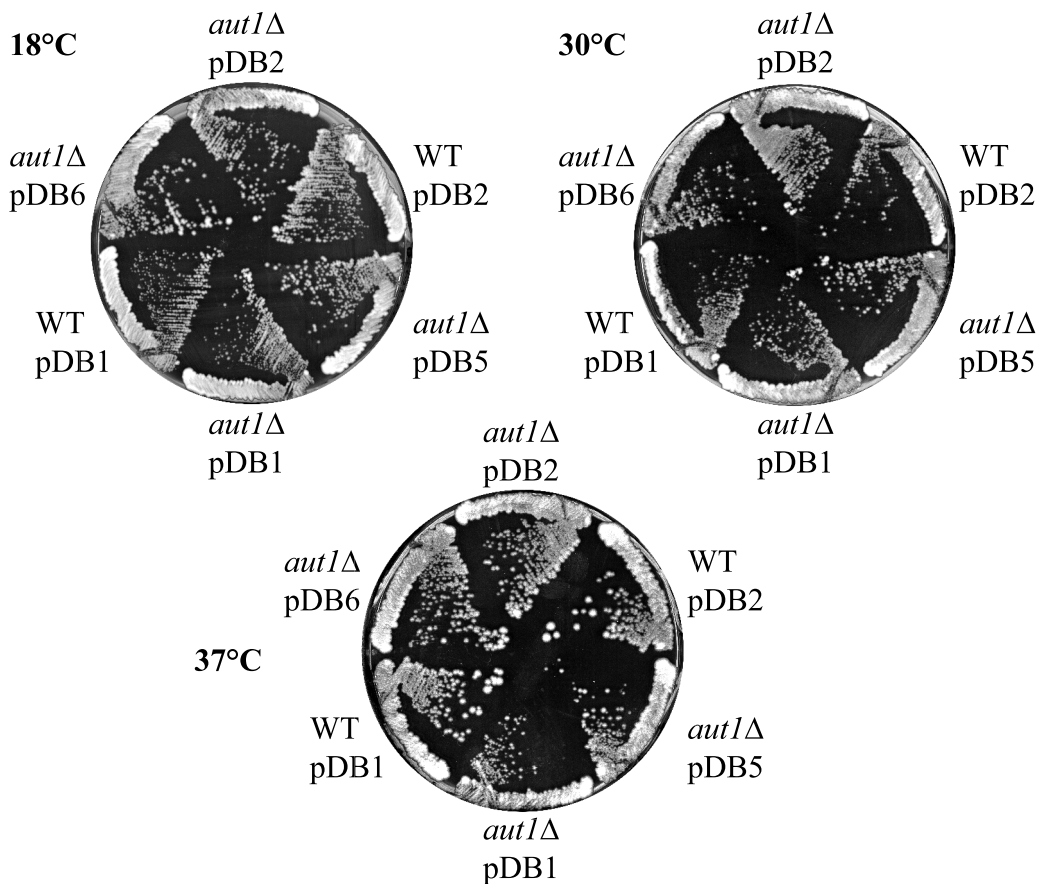


Abbildung 62: Wachstumstest der *aut1Δ*-Stämme, die das Sai1p auf einem centromeren Plasmid und auf einem 2μ -Plasmid exprimieren bei 18°C, 30°C und 37°C. pDB1 (*CEN*) und pDB2 (2μ) enthalten das native Gen, pDB5 (*CEN*) und pDB6 (2μ) das dreifach HA getaggte Gen. Es ist kein Unterschied zwischen dem nativen und getaggten Protein erkennbar.

4.3.8.1 Hungerinduktion Da das Sai1-Protein vermutlich mit einem oder mehreren Autophagocytoseproteinen interagiert, wurde vermutet, daß auch die Expression des Sai1-Proteins unter Hungerbedingungen in der Zelle verstärkt induziert wird. Daher wurde die Expression des nativen Sai1-Proteins auf Transkriptionsebene mittels einer RT-PCR (**R**everse **T**ranskriptions **P**CR) (3.8.13) und das Sai1-HA₃-Protein auf Proteinebene analysiert. Die Autophagocytose wurde in den Zellen zum einen durch Inkubation in 1%-iger Kaliumacetatlösung und zum anderen durch Zugabe des Tor2p Inhibitors Rapamycin induziert. Tor ist eine Phosphatidylinositol-3-Kinase (TOR1 und TOR2), die die Autophagocytose negativ reguliert (1.4.9), (Noda and Ohsumi [1998]). Das Tor2p phosphoryliert Tap42p, welches dann mit der Proteinphosphatase 2A (PP2A) interagiert und so deren Aktivität hemmt (Beck and Hall [1999]). Wird das Tor2p inhibiert, so erfolgt die Induktion der Autophagocytose.

Die RT-PCR wurde zur Kontrolle unter den gleichen Bedingungen auch mit dem

AUT1-Gen durchgeführt, dessen Hungerinduktion auf Proteinebene schon früher belegt wurde (Reiche [2001]). Bei diesem Experiment wurde die RNA des Wildtypstammes in verschiedenen Wachstumsphasen mit dem RNAeasy Mini Kit der Firma QIAGEN (3.8.4) isoliert. Zur Analyse wurden jeweils die gleiche OD-Menge an Zellen in logarithmischer, stationärer und gehungelter Wachstumsphase entnommen. Stationäre Zellen wurden in 1% Kaliumacetat gewaschen und in 1%-iger Kaliumacetatlösung eine bzw. fünf Stunden gehungert. Alle Zellkulturen wurden bis zur Aufarbeitung in RNAlater bei 0°C aufbewahrt (3.8.4) und die RNA aus ihren Sphäroblasten gleichzeitig isoliert. Zur Kontrolle des zu untersuchenden PCR-Produktes wurde auch die RNA stationärer Zellen der Deletionsstämme *sai1*Δ und *aut1*Δ isoliert. Die RNA wurde in einem Schritt mit dem One Step RT-PCR Kit der Firma QIAGEN bei 50°C in ihre cDNA übersetzt und amplifiziert. Die PCR wurde in vorangehenden Versuchen so optimiert, daß kein Plateau-Effekt bei der verwendeten Anzahl von Zyklen auftreten konnte. Als innerer endogener Standard wurde bei der PCR ein 0,75 kb DNA-Fragment des konstitutiv exprimierten *ACT1*-Gens mitamplifiziert (3.6). Das *ACT1*-Gen wurde nur als Fragment amplifiziert, da es eine ähnliche Größe wie die zu untersuchenden Gene aufweist und somit auf einem DNA-Gel nur eine ungenügend verschiedene Laufgeschwindigkeit aufweist. Da die verschiedenen Gene in verschiedenem großen Ausmaß in ihre RNA übersetzt werden, mußte die Konzentration der Primer ebenfalls zuvor optimiert werden, damit ein relativer Vergleich der Transkription auf einem DNA-Gel ermittelt werden konnte. Im Fall der Amplifizierung der RNA mit den *SAI1*-Primern und den *ACT1*-Primern wurde ein Primerverhältnis von 3 : 1 (0,3 μM : 0,1 μM), im Fall der Primer für das *AUT1*-Gen ein Verhältnis von 8 : 1 (0,8 μM : 0,1 μM) verwendet. Dieser Unterschied in der Primerkonzentration, die nach ca. 32 Zyklen zu einer vergleichbaren DNA-Konzentration führt, legt nahe, daß das *SAI1*-Gen in geringerem Ausmaß als das *ACT1*-Gen und in höherem Ausmaß als das *AUT1*-Gen transkribiert werden könnte. In logarithmisch gewachsenen Zellen ist nur wenig RNA der Gene *AUT1* und *SAI1* nachweisbar. In stationären Zellen nimmt die Transkription der RNA zu und entspricht dem Gehalt der Zellen, die fünf Stunden gehungert wurden. Die Hauptmenge an RNA wird nach einer einstündigen Hungerperiode in Kaliumacetat gebildet (Abb.63 und Abb.64). Eine genauere Quantifizierung ist mit dieser Methode nicht möglich.

Die Expression des Sai1-Proteins auf Proteinebene wurde im Wildtypstamm und in den Autophagocytosestämmen *aut1*Δ, *aut2*Δ, *aut3*Δ, *aut4*Δ, *aut5*Δ, *aut7*Δ und *aut9*Δ untersucht. Alle Stämme enthielten das *SAI1-HA₃*-Gen durch Kreuzung und anschließender Tetradendissektion chromosomal integriert (3.5.2). Die jeweils gleiche Menge an OD-Zellen verschiedener Wachstumsphasen (logarith-

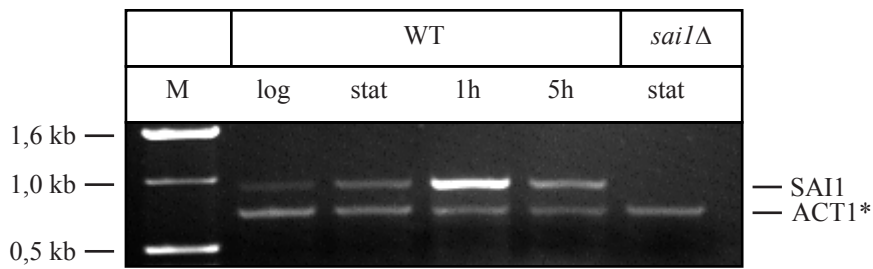


Abbildung 63: RT-PCR Analyse des *SAI1*-Gens. Die größte Menge an RNA wird nach einer einstündigen Hungerperiode in 1% Kaliumacetat transkribiert.

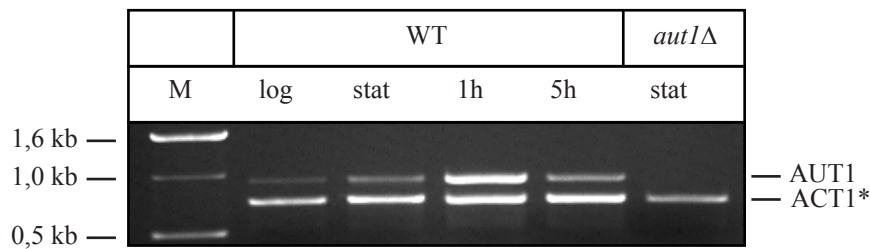


Abbildung 64: RT-PCR Analyse des *AUT1*-Gens. Die größte Menge an RNA wird ebenfalls nach einer einstündigen Hungerperiode in 1% Kaliumacetat transkribiert.

misch, stationär und fünf Stunden Hungerung in 1% Kaliumacetatlösung) wurden durch alkalischer Lyse (3.10.1.2) aufgeschlossen und mittels Western Blotting (3.10.5) analysiert. Als Ladekontrolle wurden die Blots zusätzlich mit dem Antiserum der Phosphoglyceratkinase (PGK) analysiert, die konstitutiv exprimiert wird. Als Vergleich wurden die Blots zusätzlich mit dem Antiserum gegen die hungerinduzierte Carboxypeptidase Y (CPY) analysiert. Das Sai1-HA₃-Protein wird in allen untersuchten Stämmen in stationären Zellen stärker exprimiert als in logarithmisch gewachsenen Zellen (Abb. 65). Dies entspricht den Ergebnissen der RT-PCR. In einigen Stämmen ist sogar der Rückgang der Expression nach fünfständiger Hungerung erkennbar. Die Unterschiede der Expression stationärer und gehungerter Zellen ist jedoch zu gering, um weitere Schlüsse daraus ziehen zu können. Ein nennenswerter Unterschied in der Expression des Proteins in den verschiedenen Autophagocytosestämmen ist ebenfalls nicht feststellbar. Die Lebensdauer des Sai1-Proteins wurde in einem „cycloheximid-chase“ Experiment untersucht, der jedoch kein Abbau des Proteins nach acht Stunden erkennen ließ. Dies könnte jedoch auch darauf zurückzuführen sein, daß bei diesem Experiment die Abbaukomponenten des Proteins inaktiviert worden sind. Ein sicheres Ergebnis läßt sich nur mit einem „pulse-chase“-Experiment erzielen.

In wachsenden Hefezellen kann Hungerung durch Zugabe von Rapamycin induziert werden. Diese Substanz ist ein Inhibitor der Tor-Proteine Tor1p und Tor2p

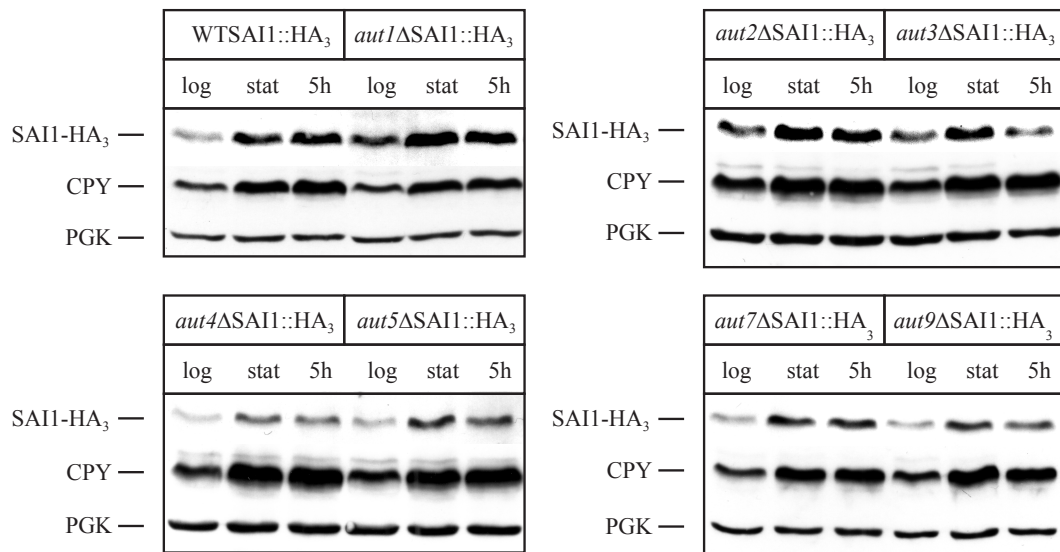


Abbildung 65: Expression des Sai1-HA₃-Proteins im Wildtypstamm und in verschiedenen Autophagocytosestämmen. Die Proteine logarithmisch (log) und stationär (stat) gewachsener sowie fünf Stunden gehungerter (5h) Zellen wurden mittels Western Blottings mit den Antisera gegen das HA-Protein, die CPY und gegen die PGK untersucht.

(1.4.9). Sie sind an der Kontrolle der Autophagocytose, an der Organisation des Aktin Cytoskellets in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beteiligt (Noda and Ohsumi [1998]) und sind homolog zu der Phosphatidylinositol-3-Kinase. Die Inaktivierung dieser Proteine führt zu einer Arretierung der Zellen in der G₁-Phase (1.6). Wildtypzellen des Stammes YDB13, die das Sai1-HA₃-Protein exprimieren, wurden in logarithmischer Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 0,4) mit Rapamycin (0,2 μg/ml Medium) versetzt und Proben nach 0, 15, 30, 60 und 120 Minuten gezogen. Die Proben wurden sofort mit einer Natriumazidlösung versetzt, um jede weitere Reaktion im Inneren der Zelle zu verhindern. Die Zellen wurden dann durch alkalische Lyse aufgeschlossen, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Das Sai1-HA-Protein wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HA-Protein detektiert (Abb.66). Als Ladekontrolle wurde wiederum das Antiserum gegen die PGK verwendet.

Die Ergebnisse dieser drei Experimente weisen auf eine Induktion des Sai1-HA₃-Proteins bei Hungerung hin.

4.3.8.2 Coimmunopräzipitation mit dem Sai1-HA₃-Protein Die Wechselwirkung des Sai1-Proteins mit dem Aut9-Protein sollte noch mittels einer Coimmunopräzipitation (1.5.2.3 und 3.10.12) gesichert werden. Dieses Experiment wurde mit Stämmen durchgeführt, die das Sai1-HA₃-Protein und das GFP-Aut9-

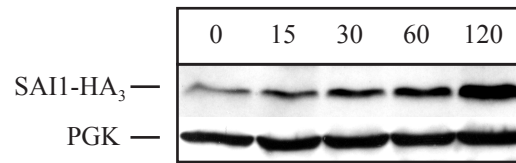


Abbildung 66: Expression des Sai1-HA₃-Proteins im Wildtypstamm YDB13. Nach Zugabe des TOR Inhibitors Rapamycin wird die Expression des Proteins in logarithmischen Zellen schon nach 15 Minuten verstärkt induziert.

Protein enthielten. Aufgrund der Ergebnisse, die sich aus 4.3.7 ergeben haben, wurde auch eine Coimmunopräzipitation des Sai1-HA₃-Proteins mit dem Aut1-Protein durchgeführt.

Native Rohextrakte der Stämme YDB30/GFP-*AUT9* (*aut9Δ* SAI1::HA₃/GFP-*AUT9*), YDB30 (*aut9Δ* SAI1::HA₃) und YSR3/GFP-*AUT9* (*aut9Δ*/GFP-*AUT9*) wurden mit einem monoklonalen Antiserum gegen das HA-Protein inkubiert und der Antikörper anschließend an Protein A-Sepharose gebunden. Die Sepharosematrix wurde präzipitiert und die gebundenen Proteine mit Harnstoffpuffer (3.10.1.2) eluiert, mittels SDS-PAGE die Proteine aufgetrennt und auf eine Membran geblotet. Das GFP-Aut9p wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen das GFP-Protein detektiert, das HA-Protein mit einem monoklonalen Antiserum gegen das HA-Protein.

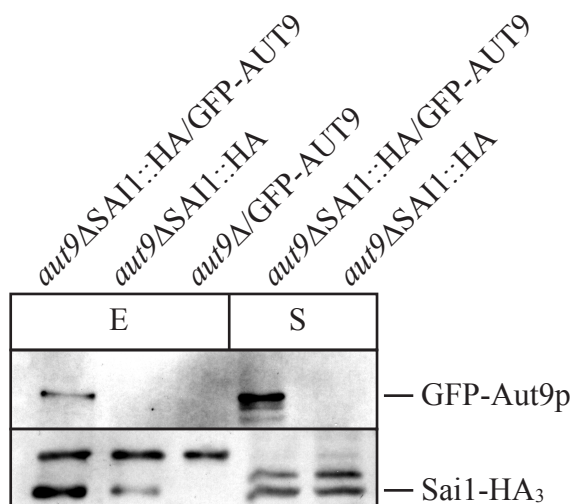


Abbildung 67: Coimmunopräzipitation des Sai1-HA₃-Proteins mit dem GFP-Aut9-Protein. Das Sai1-HA₃-Protein ist in der Lage das GFP-Aut9-Protein mit zu fällen (Spur1). Die Sai1-HA₃p Bande ist keine Kreuzreaktion des Antikörpers (Spur2) und keine unspezifische Reaktion des HA-Proteins mit dem GFP-Aut9-Protein (Spur 3). Spur 4 und Spur 5 zeigen die GFP-Aut9p- und Sai1-HA₃-Banden im reinen Rohextrakt. Eluat (E), Überstand (S).

Native Proteinrohextrakte der Hefestämme YDB13 (WCG4 α Sai1::HA₃), YDB18 (*aut1* Δ Sai1::HA₃), YDB20 (*aut2* Δ Sai1::HA₃) und YDB30 (*aut9* Δ Sai1::HA₃) wurden mit dem monoklonalen Antiserum gegen das HA-Protein inkubiert und der Antikörper anschließend an Protein A-Sepharose gebunden. Die Sepharosematrix wurde präzipitiert, die gebundenen Proteine mit Harnstoffpuffer (3.10.1.2) eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Das Aut1-Protein wurde mit einem polyklonalen Antiserum gegen das Aut1-Protein aus Huhn detektiert.

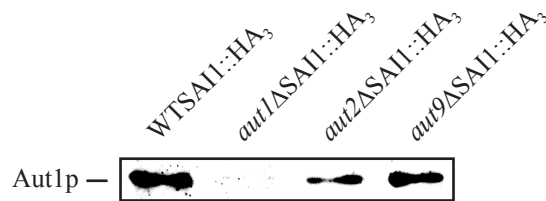


Abbildung 68: Coimmunopräzipitation des Sai1-HA₃-Proteins mit dem Aut1-Protein. Das Aut1p fällt in allen Hefestämmen mit dem Sai1-HA₃-Protein. Im Kontrollstamm *aut1* Δ Sai1::HA₃ ist wie erwartet keine Bande zu sehen.

Die Ergebnisse der Coimmunopräzipitation des Sai1-HA₃-Proteins mit dem GFP-Aut9-Protein und dem Aut1-Protein bestärken die Interaktion dieser Proteine miteinander.

4.3.8.3 Immunfluoreszenz Die intrazelluläre Lokalisation des Sai1-HA₃-Proteins wurde durch indirekte Immunfluoreszenz (3.10.11) mit Hilfe des monoklonalen HA-Antikörpers untersucht. Die Fluoreszenz des chromosomal integrierten Proteins war gegenüber dem Hintergrund zu schwach, so daß Hefestämme verwendet wurden, die das Sai1-HA₃-Protein auf einem Überexpressionsplasmid trugen. Das Plasmid pDB6 basiert auf dem Vektor pRS425, der eine 2 μ -Sequenz und das *Sai1-HA₃*-Gen unter der Kontrolle des nativen Promotors und Terminators enthält. Fixierte stationäre Zellen der Stämme WCG4 α und *sai1* Δ /pDB6 wurden mit einem monoklonalen HA-Antikörper und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten (Cy3) Antikörper gegen Maus inkubiert (Pringle et al. [1989]). Der Kern wurde mit DAPI angefärbt. Die Zellen wurden gegenüber anderen Mikroskopbildern um 33% vergrößert.

Das Sai1-HA₃-Protein ist in stationären Zellen an Vesikeln innerhalb des Cytosols und im Cytosol selbst lokalisiert. Innerhalb einer Zelle befindet sich normalerweise ein, selten auch bis zu drei Vesikel, bei denen es sich nicht um den Kern handelt. Dies entspricht im wesentlichen den Ergebnissen, die sich aus der Experimenten mit GFP-getaggten Stämmen ergab (4.3.6).

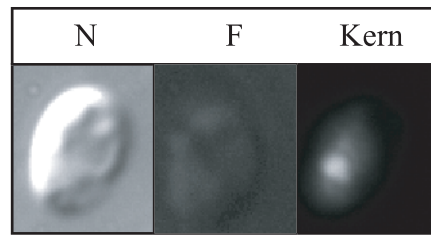


Abbildung 69: Immunfluoreszenz des Wildtypstammes WCG4 α unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers gegen das HA-Protein. Wie erwartet ist kein Signal detektierbar.

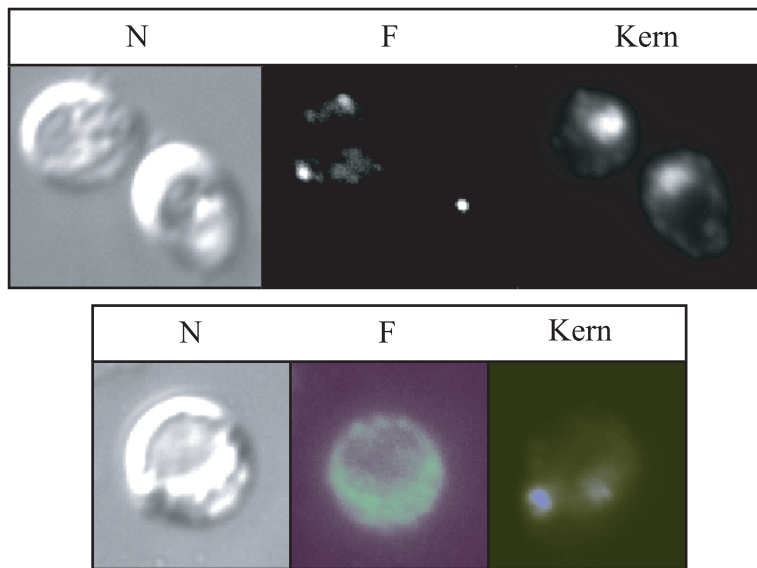


Abbildung 70: Immunfluoreszenz des Stammes *sai1* Δ /pDB6 unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers gegen das HA-Protein. Das Signal befindet sich an Vesikeln innerhalb des Cytosols und im Cytosol selbst. Diese Vesikel sind nicht mit dem Kern identisch.

4.3.9 Wachstum und Morphologie von *autx* Δ *sai1* Δ -Doppelmutanten

Aufgrund der bisher dargestellten Ergebnisse, kann davon ausgegangen werden, daß das Sai1-Protein mit dem Aut9-Protein und mit dem Aut1-Protein interagiert. Da die *sai1* Δ -Mutante bisher keinen Phänotyp aufweist, wurden *autx* Δ *sai1* Δ -Doppelmutanten durch Kreuzung hergestellt. Diese Doppelmutanten *aut1* Δ *sai1* Δ , *aut2* Δ *sai1* Δ , *aut3* Δ *sai1* Δ und *aut9* Δ *sai1* Δ wurden auf ihr Wachstum bei 18°C, 30°C und 37°C sowie auf ihre Zellmorphologie hin untersucht. Dazu wurden die Zellen in absteigender Konzentration (OD₆₀₀) auf YPD-Platten aufgetropft und bei den verschiedenen Temperaturen inkubiert (Abb. 71). Der Stamm *aut3* Δ *sai1* Δ wurde nicht aufgetropft, sondern auf Einzelkolonien ausgestrichen und bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert (Abb. 76). Die Doppelmutanten wuchsen genauso gut wie der Wildtyp WCG4 α unter diesen Bedingungen. Zur Untersu-

chung der Zellmorphologie wurden die Zellen bei 30°C in YPD-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 5 inkubiert. Unter diesen Bedingungen war kein Unterschied in der Zellmorphologie im Vergleich zum Wildtyp erkennbar.

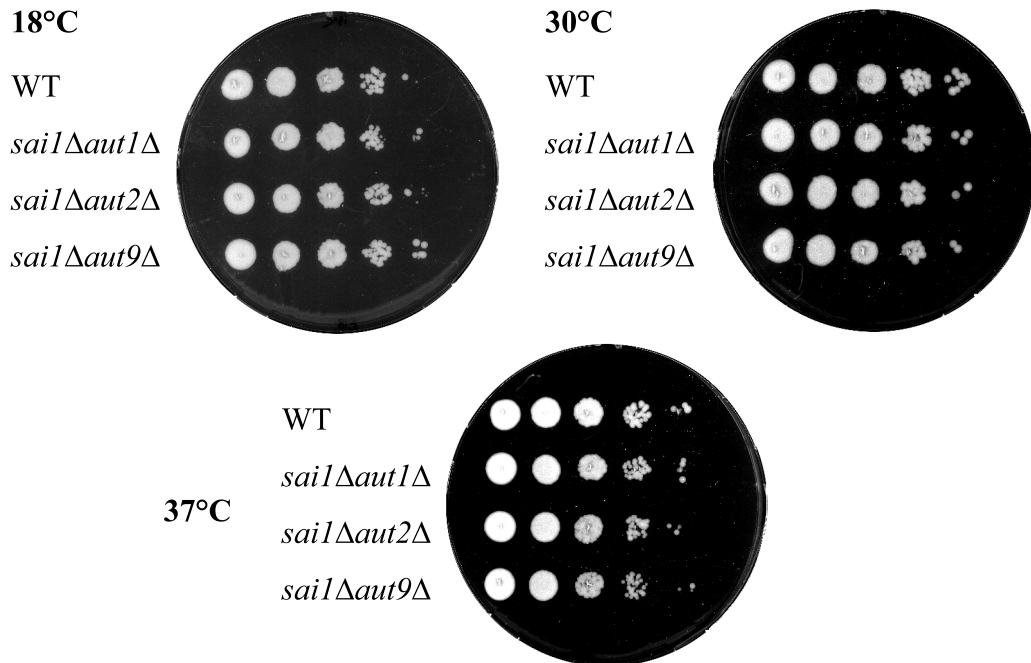


Abbildung 71: Wachstumstest der Doppelmutanten. Das Wachstum der Mutanten unterscheidet sich nicht von dem des Wildtyp.

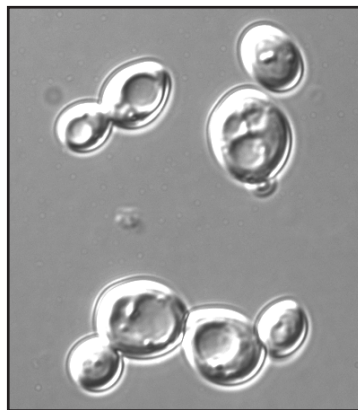
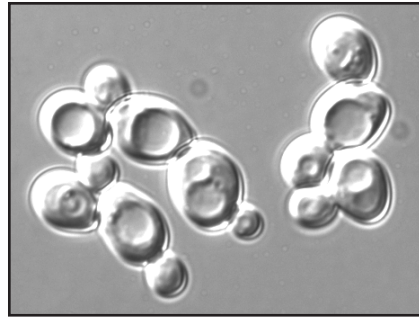
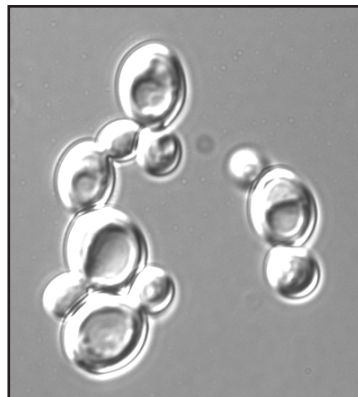
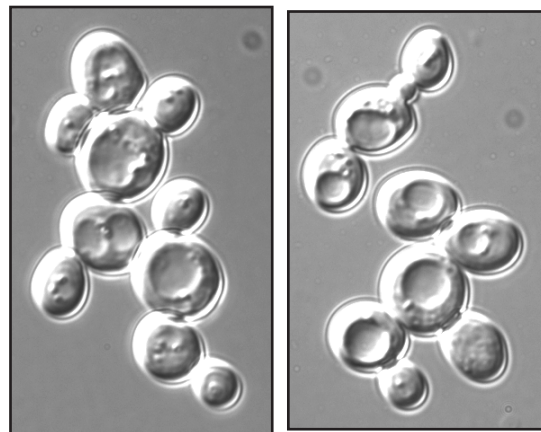


Abbildung 72: Zellen des Stammes YDB4 (*aut1Δsai1Δ*).

4.4 Das Sai2-Protein

Das Sai2-Protein (früher: Aip1p; YGL211w) wurde in einem Two-Hybrid Screen mit dem Aut1-Protein gefunden (Schäffeler [1999]). Die *sai2Δ*-Mutante wurde

Abbildung 73: Zellen des Stammes YDB6 ($aut2\Delta sai1\Delta$).Abbildung 74: Zellen des Stammes YDB8 ($aut3\Delta sai1\Delta$).Abbildung 75: Zellen des Stammes YDB9 ($aut9\Delta sai1\Delta$).

von E. Schäffeler in ihrer Doktorarbeit hergestellt und erhielt damals die Bezeichnung *aip1* Δ (**A**UT1 interagierendes **P**rotein 1). Da diese Bezeichnung schon an ein anderes Protein vergeben ist, wurde das Protein in Sai2p umbenannt (slow growing **A**ut1p interacting protein). Das GFP-Sai2p, welches unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors exprimiert wird, wurde von E. Schäffeler kloniert und in die Stämme *sai2* Δ und *aut1* Δ transformiert. Das Protein wurde anhand der

Fluoreszenz des GFP in der *sai2Δ*-Mutante und der *aut1Δ*-Mutante innerhalb des Cytosols an vesikelartigen Strukturen lokalisiert. Die Morphologie dieser Zellen erschien weitgehend normal, allerdings waren relativ viele Zellen mit kleinem Bud zu erkennen. Die gehungerten Zellen des Stammes *aut1Δ*, die das GFP-Sai2p exprimierten, bildeten schlauchförmige Zellen mit mehreren Vakuolen.

4.4.1 Die *sai2Δ*-Mutante

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Doppelmutanten *sai1Δsai2Δ*, *aut1Δsai2Δ* und *aut3Δsai2Δ* hergestellt und zusammen mit der *sai2Δ*-Mutante auf ihr Wachstum und ihre Zellmorphologie hin untersucht. Die Zellen wurden auf YPD-Platten auf Einzelkolonien ausgestrichen und bei den Temperaturen 18°C, 30°C und 37°C inkubiert. Zudem wurden die Zellen in einer YPD-Flüssigkultur bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 5 inkubiert und dann im Mikroskop betrachtet. Die *sai2Δ*-Mutante wächst bei 30°C und bei 37°C langsamer als der Wildtyp WCG4α, bei 18°C normal. Zudem neigt die Mutante aufgrund des Selektionsdrucks zu weiteren Mutationen, die ein normales Wachstum bewirken. Sie läßt sich daher nur schlecht untersuchen, da immer geprüft werden muß, ob es sich bei den untersuchten Zellen um die Originalmutante handelt. Die Zellen dieser Mutante weisen auch eine veränderte Morphologie ihrer Zellen auf. Die Zellen sind nicht mehr in der Lage sich normal zu teilen. Die Buds sind mißgebildet und krümmen sich von der Mutterzelle weg. Dieser Befund gilt auch für alle *sai2Δ*-Doppelmutanten. Diese Zellmorphologie der *sai2Δ*-Mutante ähnelt der Zellen, die das Sai1p-GFP in den Mutanten *aut1Δ*, *aut2Δ* und *aut9Δ* überexprimieren (4.3.6 und 4.3.7). Die Morphologie gehungelter Zellen des *aut1Δ*-Stammes, die das GFP-Sai2p (Schäffeler [1999]) exprimieren ähneln den stationären Zellen des *aut1Δ*-Stammes, die das Sai1-Protein auf einem centromeren Plasmid (4.3.7) exprimieren. Die Ausbildung der schlauchförmigen Zellen ist bei der Expression des Sai1-Proteins jedoch geringer. Dies kann auch an der verschiedenen Promotoraktivität liegen, oder daran, daß die in dieser Arbeit abgebildeten Zellen des Stammes *aut1Δ* nicht gehungert sind. Dieser Zellphänotyp ist in gehungerten Zellen generell stärker ausgeprägt, im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht dokumentiert.

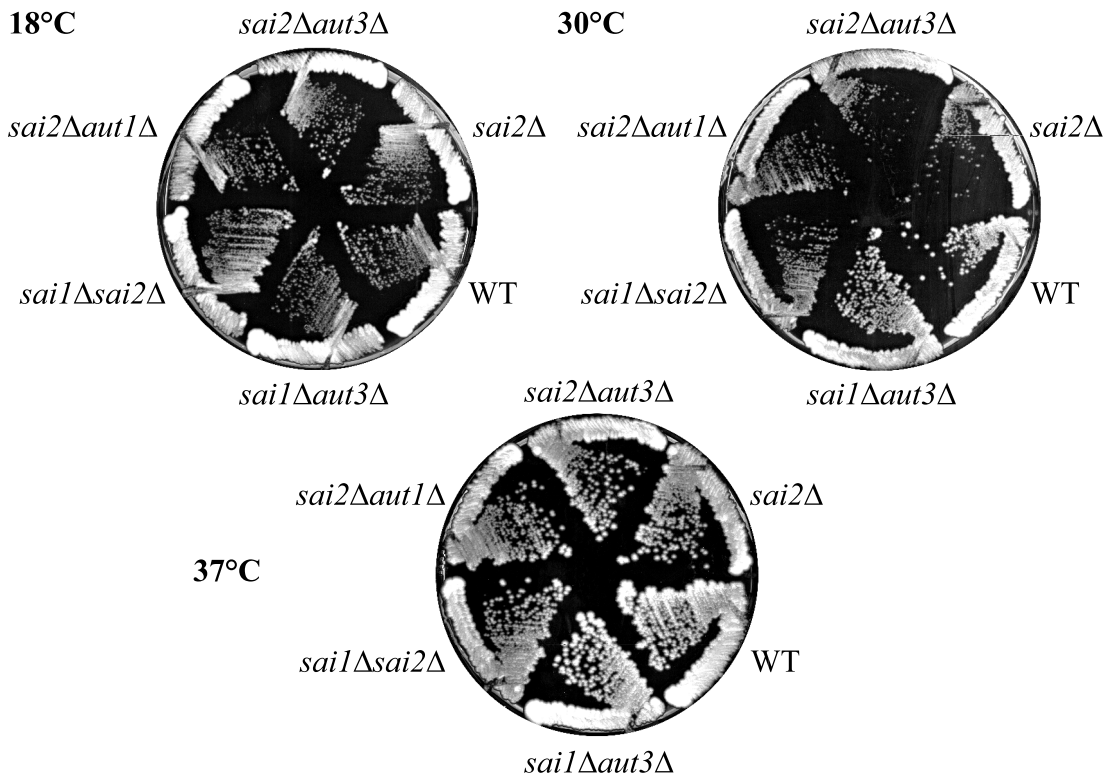


Abbildung 76: Wachstumstest der Doppelmutanten. Alle Stämme, bei denen das *SAI2*-Gen deletiert ist, wachsen bei 30°C und 37°C langsamer als der Wildtypstamm (WT). Bei 18°C ist das Wachstum der Zellen normal.

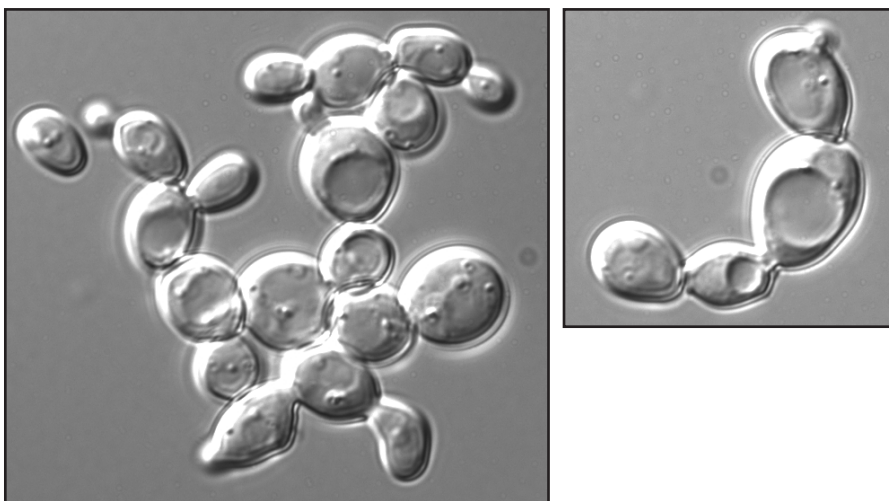


Abbildung 77: Stationäre Zellen des Stammes *sai2Δ*.

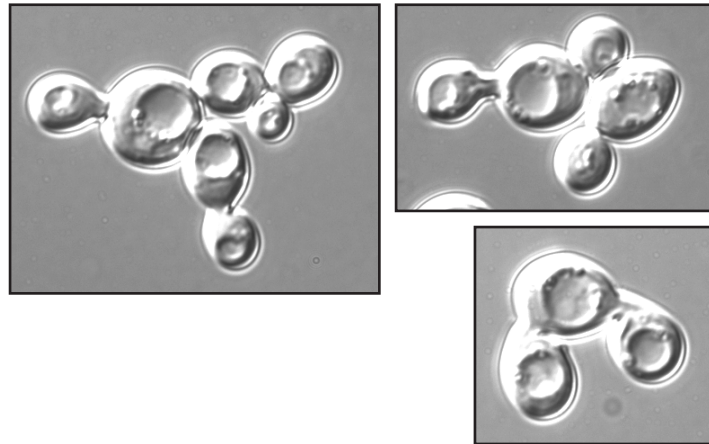


Abbildung 78: Stationäre Zellen des Stammes *sai1Δsai2Δ*.

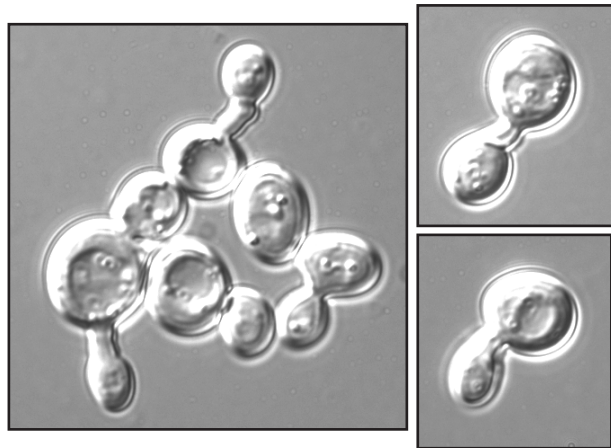


Abbildung 79: Stationäre Zellen des Stammes *aut1Δsai2Δ*.

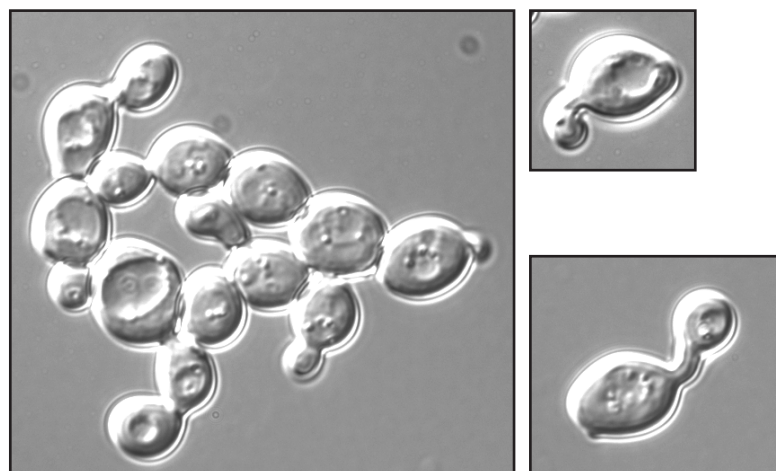


Abbildung 80: Stationäre Zellen des Stammes *aut3Δsai2Δ*.

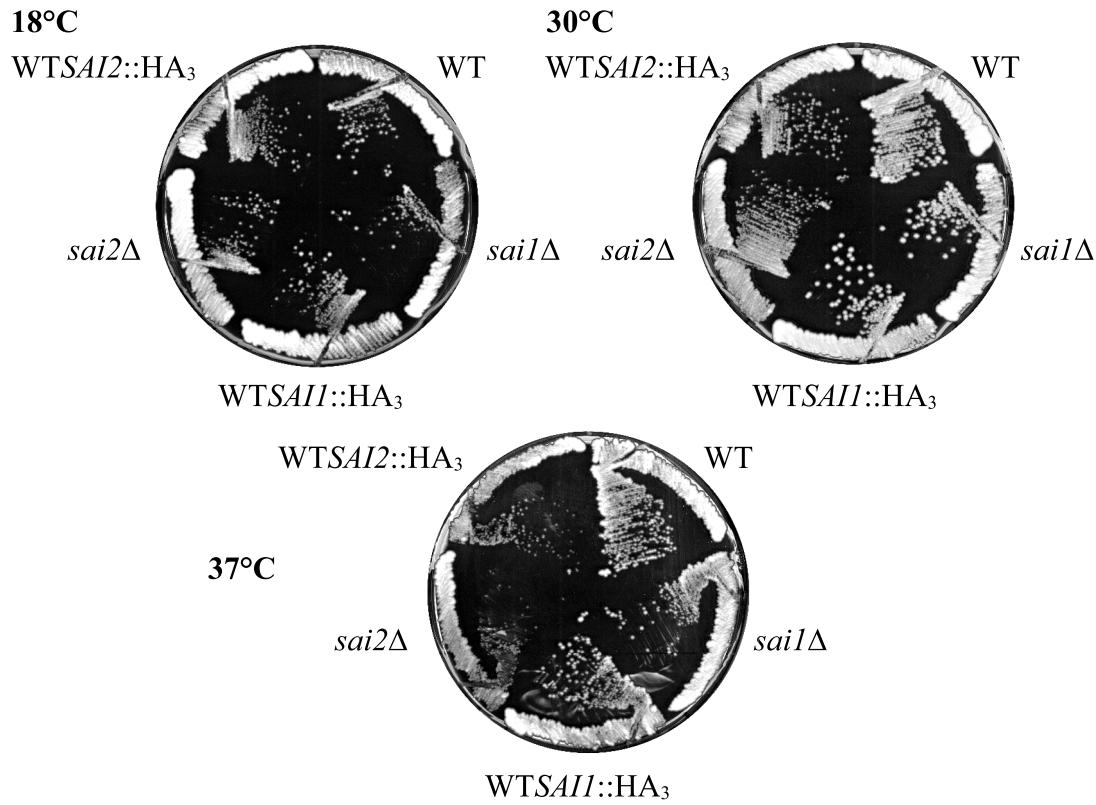
4.4.2 Das Sai2-HA₃Protein

Abbildung 81: Wachstumstest zur Überprüfung der Funktionalität der HA getaggten Proteine Sai1p und Sai2p. Der Stamm YDB16 (WCG4 α SAI2:HA₃) weist den gleichen Wachstumsphänotyp wie der *sai2* Δ -Stamm auf.

Da gegen das Sai2-Protein kein Antikörper existiert, wurde das Protein mit einem C-terminalen tag versehen, welcher das HA-(Haemagglutinin-)Epitop dreimal sowie das *HIS5*-Gen aus *S. pombe* enthielt. Dieser tag wurde über die Transformation eines DNA-Fragmentes chromosomal in das Genom des Wildtypstammes WCG4 α integriert. Das DNA-Fragment wurde mittels einer PCR hergestellt, bei der als template der Vektor p3XHA-HIS5 (3.7.10) und die Primer B1-HA-1 und B1-HA-2 verwendet wurden. Die transformierten Zellen wurden auf CM-His⁻-Platten selektiert und die so erhaltenen Klone mit einer Southern Blot Analyse auf korrekte Integration des Inserts hin untersucht. Die isolierte chromosomale DNA eines Klons wurde mit den Restriktionsenzymen *XbaI* und *PstI* verdaut und die DNA-Fragmente mit einer *HIS5*-Sonde (Epple [2000]) aus *S. pombe* detektiert. Der Southern Blot ist in Abb. 60 (4.3.8) dokumentiert. Beide DNA-Fragmente hatten die richtige Größe, 2,5 kb (*PstI*-Verdau) und 2,4 kb (*XbaI*-Verdau), so daß anzunehmen ist, daß das PCR-Produkt an der korrekten Stelle ins Genom einmal integriert wurde.

Die korrekte Expression des getaggten Proteins wurde mit Hilfe eines Western

Blots untersucht (3.10.5). Stationäre Zellen der Stämme WCG4 α und YDB16 (WCG4 α SAI2:HA₃) wurden durch alkalischer Lyse aufgeschlossen, die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Das HA-getaggte Protein wurde mit Hilfe eines monoklonalen Antikörper gegen das HA-Protein detektiert. Die Größe des exprimierten Proteins entspricht nicht dem erwarteten Molekulargewicht von 41 kDa. Das geschätzte Molekulargewicht im SDS-Gel beträgt ca. 35 kDa. Dieses Molekulargewicht liegt selbst unterhalb des berechneten Molekulargewichts des ungetaggtten Proteins. Dies legt nahe, daß das Protein entweder einer Laufanomalie in einem SDS-Gel aufweist, oder daß das Protein posttranslational modifiziert wird. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht weiter untersucht. Die Abbildung des Western Blots ist ebenfalls in 4.3.8 zu sehen.

Zur Überprüfung der Funktionalität des getaggtten Proteins wurde der Stamm YDB16 (WCG4 α SAI2:HA₃) auf Einzelkolonien ausgestrichen und die Zellen bei verschiedenen Temperaturen inkubiert. Die *sai2* Δ -Mutante weist einen slg-Phänotyp (**s**low **g**rowing) auf, der bei dem neuen Stamm nicht mehr auftreten dürfte. Die Zellen wurden bei 18°C, 30°C und 37°C inkubiert. Die *sai2* Δ -Mutante und der getaggte YDB16 Stamm weisen bei 30°C und 37°C den gleichen Phänotyp auf. Daher kann angenommen werden, daß das getaggte Sai2-Protein nicht funktionell ist.

4.4.3 Überexpression des Sai2-Proteins

Die *sai2* Δ -Mutante weist keinen *Aut*-Phänotyp auf und ist somit in der Lage die Aminopeptidase I (API) zu reifen. Da das Sai2-Protein in einem Two-Hybrid Screen mit dem Aut1-Protein gefunden wurde, sollte zuerst untersucht werden, ob es ein „low copy“ oder „high copy“ Suppressor der Mutanten *aut1-1*, *aut2-1* und *aut9-1* ist. Dazu wurde das *SAI2*-Gen als PCR-Produkt mit nativem Promotor und Terminator in die *SmaI* Schnittstelle der Überexpressionsplasmide pRS315 (pDB3) und pRS425 (pDB4) (3.7.1). Die DNA-Sequenz der so klonierten Plasmide wurde analysiert und mit der Datenbank des SGD (**S**accharomyces **G**enome **D**atabase) verglichen. Die Sequenz der Inserts entsprach der der Datenbank. Diese Plasmide wurden in die Punktmutanten transformiert und die Zellen auf ihre Aminopeptidase I Reifung hin untersucht (Abb. 48). Das Sai2-Protein ist kein Suppressor der Mutanten *aut1-1*, *aut2-1* und *aut9-1*. Desweiteren wurde das Sai2-Protein in den Mutaten *aut1* Δ , *aut2* Δ , *aut3* Δ , *aut9* Δ , *sai1* Δ und *sai2* Δ sowie dem Wildtypstamm WCG4 α auf den gleichen Plasmiden überexprimiert und die Stämme auf einen Wachstumsphänotyp hin untersucht. Alle transformierten Stämme wurden auf CM-Leu⁻-Selektionsplatten auf Einzelzellen ausgestrichen

und bei 18°C, 30°C und 37°C inkubiert. Das Wachstum der verschiedenen Stämme entsprach der des Wildtypstamms.

4.5 Interaktion des Vam3p mit Tubulin

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* existieren zwei verschiedene Tubulinbausteine, das α -Tubulin und das β -Tubulin. Das *TUB2*-Gen (Neff et al. [1983], Water and Kleinsmith [1976]) kodiert für das essentielle β -Tubulin, die Gene *TUB1* (essentiell) und *TUB3* (nicht essentiell) für das α -Tubulin (Schatz et al. [1986a], Schatz et al. [1986b]). Diese monomeren Tubulinbausteine assoziieren miteinander zu Mikrotubuli. Das Autophagocytoseprotein Aut2p interagiert mit den Proteinprodukten der Tubulingene *TUB1* und *TUB2* und ist somit zumindest zeitweise an Mikrotubuli assoziiert (Lang et al. [1998]).

Das Protein Vam3p ist ein zu Syntaxin (t-SNARE) homologes integrales Membranprotein, das an der Vakuolenmembran lokalisiert ist. Syntaxin wird zur Fusion synaptischer Transportvesikel mit der Plasmamembran in Nervenzellen benötigt. Das Vam3-Protein ist essentiell für den Transport der vakuolären Hydrolasen CPY (Carboxypeptidase Y), ALP (Alkalische Phosphatase), Proteinase A und CPS (Carboxypeptidase S). Es interagiert mit den Proteinen Vam7p, einem Mitglied der SNAP25 (synapse-associated protein of 25 kDa) Familie (Sato et al. [1998]), und dem Vps33p, einem Sec1-Protein (Darsow et al. [1997], Seals et al. [2000]). Es wird unabhängig vom Transportweg des PtdIns(3)P (Phosphatidylinositol 3-Phosphat), der alpha-Faktor Rezeptor-Ligand Komplexe und vakuolären Hydrolasen transportiert. Zudem ist es an der Fusion der Autophagosomen mit der Vakuole beteiligt. Es lag daher nahe, daß das Vam3-Protein mit dem Aut9-Protein, einem Membranprotein am periautophagosomalen Kompartiment (PAC), welches sich in der Autophagosomenmembran befindet, interagieren könnte. Eine Interaktion des Vam3-Protein mit dem Aut9-Protein wurde im Rahmen der Dissertation von T. Lang (Lang [1998]) auf genetischen Weg (Two-Hybrid) ausgeschlossen. Da die autophagischen Vesikel wahrscheinlich an Mikrotubuli entlang zur Vakuole transportiert werden könnten (Lang et al. [1998]), lag es ebenfalls nahe, daß das Vam3-Protein auch mit den Mikrotubuli interagieren könnte. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit das Vam3-Protein auf eine Interaktion mit Tubulin hin untersucht werden. Diese Interaktion wurde mit Hilfe der Affinitätschromatographie (3.10.10), der Coimmunpräzipitation (3.10.12) und mit dem Two-Hybrid System (3.9.7) untersucht. Das GST-Vam3p (Schäffeler [1999]) und das reine GST wurden mit Hilfe des GST-Gene Fusion System hergestellt (3.10.7) und gereinigt. Die Proteine, die an die Sepharose 4B-Matrix gekoppelt waren, wurden mit Rin-

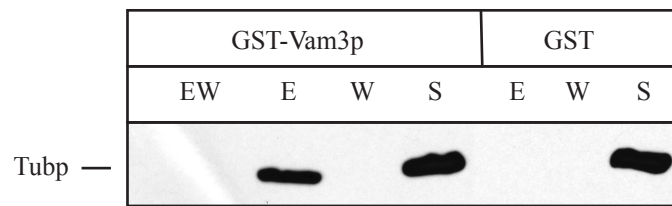


Abbildung 82: Affinitätschromatographie. Das Tubulin wurde im Überstand (S) beider Säulen detektiert, aber nur im Eluat (E) der GST-Vam3p-Säule. Die unbeladene GST-Vam3p-Säule (EW) weist keine Kreuzreaktion mit dem Tubulinantikörper auf.

dertubulin zehn Minuten bei 37°C inkubiert, gewaschen und mit Lämmli-puffer eluiert. Die Proteine der verschiedenen Fraktionen, Eluat (E), Überstand (S) und letzter Waschschrift (W), wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. Das Tubulin wurde mit einem monoklonalen anti-Rindertubulin Antikörper detektiert. Nur das GST-Vam3p konnte das Tubulin auf der Säule binden, nicht aber das GST. Native Rohextrakte der Stämme SEY6210,

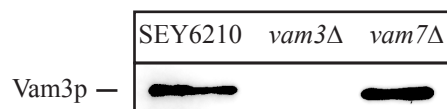


Abbildung 83: Coimmunopräzipitation des Vam3-Proteins mit Rindertubulin. Das Vam3p präzipitiert zusammen mit dem Tubulin auch in Abwesenheit des Vam7p.

vam3Δ und *vam7Δ* wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen das α -Tubulin 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und der Antikörper anschließend an Protein A-Sepharose gebunden (3.10.12). Die gebundenen Proteine wurden nach dem Waschen mit Harnstoffpuffer (3.10.1.2) eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Das Vam3-Protein wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen das Vam3p detektiert. Das Vam3p präzipitiert im Wildtypstamm SEY6210 und in der *vam7Δ*-Mutante mit dem Tubulin.

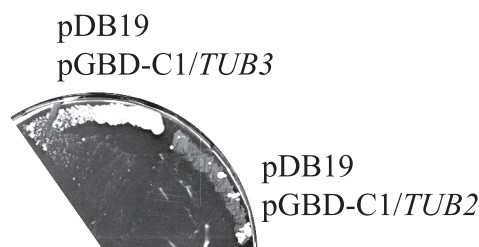


Abbildung 84: Two-Hybrid. Wachstum der verschiedenen Two-Hybrid-Stämme auf CM-His⁻-Selektionsplatten. Nur die Proteine Vam3p und Tub3p interagieren stark genug miteinander, so daß die Hefezellen unter diesen Bedingungen wachsen können.

Zuletzt wurde noch ein Two-Hybrid des Vam3p und dem nichtessentiellen α -Tubulin Tub3p sowie dem essentiellen β -Tubulin Tub2p durchgeführt. Dazu wurde ein verkürztes 750 bp großes *VAM3*-Fragment in die *EcoRI*/*BglIII*-Schnittstelle des Vektors pGAD-C1 ligiert. Die C-terminale Membrandomäne wurde entfernt, da sie die Lokalisation des Fusionsproteins beeinflussen könnte. Diese Plasmid (pDB19) wurde mit den Plasmiden pGBD-C1/*TUB2* und pGBD-C1/*TUB3* in den Hefestamm pJ69 α cotransformiert und die Zellen auf CM-Leu⁻, Trp⁻-Selektionsplatten ausplattiert. Die Klone wurden anschließend auf CM-His⁻-Selektionsplatten und CM-Ade⁻-Selektionsplatten auf Einzelkolonien ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Nur der Stamm, der die Plasmide pDB19 und pGBD-C1/*TUB3* enthielt konnte auf den CM-His⁻-Selektionsplatten jedoch nicht auf CM-Ade⁻-Selektionsplatten wachsen. Die Stämme wurden zudem einem β -Galactosidase-Flüssig-Test (3.9.7.3) unterzogen. Wiederum ergab sich nur für die Plasmidkombination pDB19 und pGBD-C1/*TUB3* ein positives Ergebnis.

Anhand der Ergebnisse der drei Experimente ist eine Interaktion des Vam3p mit dem Tubulin sehr wahrscheinlich. Der Two-Hybrid Versuch läßt auf eine Interaktion des Vam3p mit dem nichtessentiellen α -Tub3p schließen.

5 Diskussion

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eignet sich als eukaryontischer Modellorganismus für die Aufklärung intrazellulärer Vorgänge, deren Erkenntnisse sich dann teilweise auch auf Säugerzellen übertragen lassen. Einer dieser intrazellulären Vorgänge ist die Autophagocytose, die für den unspezifischen Abbau von Makromolekülen und Organellen (Thumm et al. [1994]) zuständig ist. Die Autophagocytose wird durch den Mangel an Nahrungsressourcen, v. a. Stickstoff- und Kohlenstoffmangel, induziert. Dabei wird cytoplasmatisches Material zur Vakuole transportiert und dort abgebaut. Die Abbauprodukte, z. B. Aminosäuren, können dann der Zelle für die Synthese von essentiellen Stoffwechselprodukten wieder zur Verfügung gestellt werden. Vier an diesem Regulationsprozeß beteiligte Proteine sind die Proteine Aut1p (Schlumpberger et al. [1997]), Aut2p, Aut7p (Lang et al. [1998]) und das Aut9-Protein (Lang et al. [2000], Noda et al. [2000]). Zellen, die eine Mutation in den Genen *AUT2*, *AUT7* und *AUT9* aufweisen, besitzen die für Autophagocytosemutanten spezifischen Phänotypen. Die hungerinduzierte Aufnahme des cytosolischen Markerproteins Fettsäuresynthase in die Vakuole (Thumm et al. [1994]) und die Reifung der Aminopeptidase I sind blockiert, die Überlebensrate bei Stickstoffmangel, die Sporulationsfrequenz sowie der Proteinabbau sind drastisch reduziert. Desweiteren können diese Mutanten unter Hungerbedingungen in Anwesenheit des Proteinase B Inhibitors PMSF keine Vesikel innerhalb der Vakuole anreichern.

5.1 Das Aut7-Protein

Das Aut7-Protein, ein „low copy“ Suppressor der *aut2-1* Mutante, ist ein lösliches und hungerinduziertes (Kirisako et al. [1999], Huang et al. [2000]) 13,6 kDa Protein (Lang et al. [1998]), das als Ubiquitin ähnliches Protein mit Phosphatidylethanolamin kovalent verknüpft wird (Kirisako et al. [2000], Ichimura et al. [2000]). Diese Verbindung ist für die Vervollständigung von Autophagosomen und Cvt-Vesikel essentiell. Die Lokalisation an einem perivakuolären/preautophagosomalen Kompartiment (PAC) (Suzuki et al. [2001], Kim et al. [2001b]) ist abhängig vom Apg9p/Aut9p. Nach der Abspaltung des Phosphatidylethanolamins ist es an den Autophagosomen und Cvt-Vesikeln lokalisiert, deren Membranen vermutlich vom perivakuolären Kompartiment stammen (Kim et al. [2001b]). Diese Lokalisation entspricht im wesentlichen der des homologen LC3-Proteins (**L**ight **C**hain **3**) aus Säugerzellen, welches an autophagischen Membranen lokalisiert ist (Kabeya et al. [2000], Mizushima et al. [2001]).

Das Aut7-Protein wurde mit Hilfe des GST-Gene-Fusion Systems isoliert und aufgereinigt. Die dreidimensionale Struktur des gereinigten Proteins sollte mit Hilfe einer 2D-NMR aufgeklärt werden, was jedoch aufgrund einer Aggregatbildung des Aut7-Proteins nicht möglich war. Dieses Problem der Aggregation konnte bei der Ermittlung der Kristallstruktur des in Säugern homologen GATE-16 durch Zugabe von Natriumchlorid behoben werden (Paz et al. [2000]).

Die Interaktion des GST-Aut7p mit dem GFP-Aut9p konnte mittels einer Affinitätschromatographie nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis widerspricht zunächst den Ergebnissen eines Two-Hybrid Experiments von T. Lang (Lang [1998]), der keine Interaktion feststellen konnte. Zieht man jedoch in Betracht, daß das GST-Aut7p in *E. coli* exprimiert wurde und somit nicht mit Phosphatidylethanolamin (PE) gekoppelt wird, besteht durchaus die Wahrscheinlichkeit, daß das Aut9-Protein nur mit dem ungekoppelten Aut7p interagieren könnte. Diese selektive Interaktion des Aut7p konnte auch in einem anderen Experiment mit dem Sai1p nachgewiesen werden (5.3). Das ungekoppelte Aut7p könnte in einem Two-Hybrid Experiment in wesentlich geringerer Konzentration vorliegen und somit nicht mehr nachweisbar sein. Zudem wird eine mögliche Interaktion durch die Aussage gestützt, daß die Lokalisation des Aut7-Proteins von einem intakten Aut9-Protein abhängig ist (Suzuki et al. [2001], Kim et al. [2001b]).

Das LB-Aut7-Protein aus *Laccaria bicolor* ist zu 77% identisch mit dem Aut7-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* (Kim et al. [1999b]) und wurde in Bezug auf seine Fähigkeit zur Komplementation der autophagischen Defekte des *aut7Δ*-Stammes hin untersucht (Kim et al. [1999b]). Das vollständige *LB-AUT7* Gen aus *Laccaria bicolor* wurde in drei Vektoren unterschiedlicher Promotoraktivität kloniert und in den *aut7Δ*-Stamm transformiert. Die Expression des LB-Aut7-Proteins unter der Kontrolle des stärksten Promotors, *TEF*, bewirkt die Komplementation einiger Phänotypen der *aut7Δ*-Mutante. Die Amipeptidase I wird unter vegetativen und unter Hungerbedingungen gereift, die Überlebensrate entspricht annähernd der des Wildtypstammes und unter Hungerbedingungen werden in Anwesenheit des Proteinase B Inhibitors PMSF Vesikel innerhalb der Vakuole angereichert. Der Defekt in der Reifung der Aminopeptidase I in einer *aut2-1* Mutante wird im Gegensatz zur Überexpression eines Aut7-Proteins in diesem Stamm (Lang et al. [1998]) nur teilweise behoben. Diese Befunde deuten auf eine ähnliche Funktion der Gene *AUT7* und *LB-AUT7* hin, jedoch sind außer der potentiellen Membrandomäne des LB-Aut7-Proteins auch weitere Unterschiede vorhanden. Das LB-Aut7-Protein ist unter der Kontrolle des nativen Promotors aus *Laccaria bicolor* kein Suppressor der *aut2-1* Mutante und die Komplementation der Phänotypen des *aut7Δ*-Stammes ist nur durch eine Überexpression des

LB-Aut7-Proteins möglich.

5.2 Das Aut2-Protein

Das lösliche Aut2-Protein ist eine Cystein-Proteinase (Kirisako et al. [2000]) und besitzt ein Molekulargewicht von 57 kDa (Lang et al. [1998]). Es ist für die Abspaltung des C-terminalen Arginin-117 des Aut7-Proteins zuständig, welches als Ubiquitin ähnliches Protein in Folge kovalent mit Phosphatidylethanolamin (PE) verknüpft wird (Kirisako et al. [2000], Ichimura et al. [2000]). Die für die Autophagocytose notwendige Abspaltung des Phosphatidylethanolamins vom Aut7-Protein wird ebenfalls von der Aut2p-Protease bewirkt (Kirisako et al. [2000]).

Die intrazelluläre Lokalisation des Aut2-Proteins wurde mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen ein GST-Aut2-Protein untersucht. Der Antikörper konnte in einer Western Blot Analyse das auf einem 2μ -Plasmid überexprimierte Aut2-Protein und das Aut2p-GFP detektieren. Das Signal des Wildtypgens war gegenüber dem Hintergrund nur schwach erkennbar. Eine weitere Aufreinigung des Antikörpers, die zur Reduzierung des Hintergrundsignals führt, könnte diesen Mangel eventuell beheben. In einer indirekte Immunfluoreszenz mit diesem Antikörper konnte das nativ exprimierte Protein nicht detektiert werden.

Das Aut2-Protein interagiert mit den Proteinen Aut7p, Tub1p, Tub2p (Lang et al. [1998]) und mit dem Aut1-Protein (Schäffeler [1999]). Um die potentiell interagierende Domäne des Aut2-Proteins mit dem Aut1-Protein und dem Aut7-Protein zu ermitteln, wurde ein Two-Hybrid Experiment mit verschiedenen Aut2-Proteinfragmenten und den vollständigen Proteinen Aut1p und Aut7p durchgeführt. Die Interaktion wurde aufgrund des Wachstums der cotransformierten Zellen auf His⁻-Selektionsplatten und durch einen β -Galaktosidase-Flüssigkeitest nachgewiesen. Interagierende Proteine sollten auch das Wachstum der cotransformierten Zellen auf Ade⁻-Selektionsplatten ermöglichen, jedoch wuchsen auch Zellen mit nachweislich interagierenden Fusionproteinen, wie z. B. Aut1p/Aut2p, nicht auf diesem Medium. Im Falle der Interaktion mit dem Aut1-Protein deuten die Ergebnisse auf eine Wechselwirkung des carboxyterminalen Bereichs hin, im Fall des Aut7-Proteins war jedoch kein eindeutiges Ergebniss erkennbar, auch wenn der aminoternale Bereich des Aut2-Proteins stärker mit dem Aut7-Protein zu interagieren scheint. Dieser uneindeutige Befund ist jedoch nicht ungewöhnlich, da bei der Verwendung von Fusionsproteinen die korrekte Faltung der Proteine und ihre intrazelluläre Lokalisation nicht mehr gewährleistet werden kann. Das gleiche gilt für Proteinfragmente. Aus diesen Gründen muß die Interaktion einzelner Proteindomänen mit Hilfe weiterer Experimente belegt werden.

Desweiteren wurde das Aut2-Protein auf eine Interaktion mit dem Aut9-Protein mit einer biochemischen (Affinitätschromatographie) und einer genetische Methode (Two-Hybrid) hin getestet. Mit beiden Methoden ließ sich eine eindeutige Wechselwirkung der beiden Proteine feststellen. Dieses Ergebnis ist nicht verwunderlich, da die Aut2p-Cysteinproteinase für die Abspaltung des Aut7-Proteins von Phosphatidylethanolamin (PE) zur Vervollständigung der autophagischen Vesikel zuständig ist (Kim et al. [2001a]). Dieses Aut7p-PE befindet sich am gleichen Kompartiment wie das Aut9-Protein, welches dann in Kontakt mit dem Aut2-Protein gelangen könnte (Suzuki et al. [2001], Kim et al. [2001b]).

Um weitere potentielle Interaktoren des Aut2-Proteins aufzuspüren, wurde ein Two-Hybrid Screen mit dem Aut2-Protein durchgeführt. Die bisher bekannten Interaktoren konnten hierbei nicht detektiert werden, was zum einen an der niedrigen Transformationsrate und zum anderen an der N-terminalen Modifikation der Proteine durch die Fusion mit den Domänen des Gal4-Proteins liegen könnte. Es wurden jedoch zwei weitere mögliche, noch unbekannte Interaktoren detektiert. Das lösliche Yps3-Protein, eine zur Proteinase A homologe Aspartat-Protease, welche vermutlich zumindest zeitweise an der Plasmamembran lokalisiert ist (Olsen et al. [1999]). Desweiteren das Snx4-Protein, welches vermutlich am intrazellulären Proteintransport vom *endoplasmatischen Reticulum* zum Golgi-Apparat benötigt wird (Haft et al. [1998]), und sich somit in räumlicher Nähe zum cytosolischen Aut2-Protein befindet, welches für den Transport autophagischer Vesikel zur Vakuole essentiell ist (Lang et al. [1998]).

5.3 Das Sai1-Protein

Das Sai1-Protein (YMR262w) wurde in einem Two-Hybrid Screen mit dem Aut9-Protein detektiert. Das Aut9-Protein (Noda et al. [2000], Lang et al. [2000]) ist ein integrales Membranprotein und an einem perivakuolären Kompartiment lokalisiert (Suzuki et al. [2001]). Das Sai1-Protein besitzt eine Homologie zum Scn1-Protein aus *S. pombe*, dem Proteinprodukt des humanen Gens KIAA0218 und dem MAP1B aus *Bos taurus*. Das nicht essentielle Sai1-Protein ist kein Autophagocytoseprotein, da die Mutante *sai1* Δ keinen autophagischen Phänotyp aufweist. Somit weist die Mutante keinen Defekt in der Überlebensrate unter Hungerbedingungen, der Sporulation, der Aminopeptidase I Reifung und dem Proteinabbau auf. Auch werden unter Hungerbedingungen in Anwesenheit eines Proteinase B Inhibitors Vesikel innerhalb der Vakuole angereichert. Die Zellen der *sai1* Δ -Mutante weisen auch keinen Wachstumsphänotyp oder eine Veränderung ihrer Zellmorphologie auf. Ob es sich bei diesem Protein um ein am Zellzyklus beteiligtes Protein

handelt bleibt ungeklärt. Das homologe Scn1-Protein aus *S. pombe* ist als Punktmutante ein „high copy“ Suppressor des mutierten Cut9-Proteins (Samejima and Yanagida [1994]), ein Cdc16p Homolog aus *S. cerevisiae*. Daher wurde ein Sai1-GFP in einer *cdc16-123* Mutante überexprimiert, um zu sehen, ob dies die Temperatur Sensitivität einer *cdc16-123* Mutante komplementieren kann, was jedoch wie vermutet nicht der Fall war, da auch das native Scn1-Protein kein Suppressor des mutierten Cut9-Proteins ist. Die Homologie des Sai1-Proteins zu MAB1B aus *Bos taurus* ist in sofern interessant, da das Aut7-Protein aus *S. cerevisiae*, welches eventuell mit dem Sai1-Protein interagiert, eine Homologie zu dem LC3-Protein aus Ratte aufweist. Das LC3-Protein ist zusammen mit den Proteinen LC1 und LC2 eine kleine Untereinheit der mit Mikrotubulin assoziierten Proteine MAP1A und MAP1B (Mann and Hammarback [1994], Mann and Hammarback [1996], Kuznetsov and Gelfand [1987]).

Obwohl es sich bei dem Sai1-Protein nicht um ein Autophagocytoseprotein handelt, wurde im Rahmen dieser Arbeit dieses Protein auf weitere mögliche Interaktionen mit Autophagocytoseproteinen hin untersucht. Zuerst wurde die Aminopeptidase I Reifung in den Mutanten *aut1-1*, *aut2-1* und *aut9-1* untersucht, die das Sai1-Protein auf einem centromeren und einem 2μ -Plasmid exprimieren. Das Sai1-Protein war nicht in der Lage den Defekt in der proAminopeptidase I Reifung zu komplementieren und ist somit auch kein Suppressor dieser Mutanten. In verschiedenen Interaktionsstudien konnte eine Interaktion des Sai1-Proteins mit den Proteinen Aut1p, Aut2p, Aut7p und Aut9p nachgewiesen werden. In einem Two-Hybrid Experiment konnte die Interaktion des Sai1-Proteins mit den Proteinen Aut1p, Aut7p und Aut9p, jedoch nicht mit dem Aut2p detektiert werden. Die Interaktion der Proteine Aut2p, Aut7p und Aut9p mit dem Sai1p wurde noch mit einer Affinitätschromatographie nachgewiesen, die des Aut1-Proteins und des Aut9-Proteins mit einer Coimmunopräzipitation. Da diese Ergebnisse jedoch nur mit Fusionsproteinen (Gal4p, GST, GFP und HA) erzielt wurden, mußte eine Interaktion mit dem Wildtypprotein nachgewiesen werden. Dazu wurde das Wildtypgen mit Promotor- und Terminatorregion auf einem *CEN*- und einem 2μ -Plasmid in verschiedene *Aut*-Mutanten transformiert (*aut1* Δ , *aut2* Δ , *aut3* Δ , *aut7* Δ , *aut9* Δ) und diese auf Wachstumsphänotypen bei 18°C, 30°C und 37°C, sowie auf ihre Zellmorphologie hin untersucht. Diese Versuche wurden auch mit *Aut*-Mutanten (*aut1* Δ , *aut2* Δ , *aut4* Δ , *aut5* Δ , *aut7* Δ , *aut9* Δ), die das Sai1-GFP auf einem Überexpressionplasmid trugen, durchgeführt. Einen deutlichen slg-Wachstumsphänotyp zeigte nur die *aut1* Δ -Mutante, die das Sai1-Protein auf dem *CEN*-Plasmid exprimiert bei 37°C und die *aut1* Δ -Mutante, die das Sai1-Protein auf dem 2μ -Plasmid exprimiert bei 30°C. Die *aut9* Δ -Mutante wächst

mit dem „leeren“ 2μ -Plasmid pRS425 bei 30°C und bei 37°C schlechter als der Wildtypstamm, mit dem Sai1p tragenden 2μ -Plasmid jedoch gleich gut bzw. sogar noch besser. Die Zellen der *aut9Δ*-Mutante, die das 2μ -Plasmid pRS425 mit einem Leucin-Selektionsmarker tragen neigen jedoch zur Aggregatbildung, so daß ein Wachstumsphänotyp auf Selektionsplatten nur schwer aufzuzeigen ist. Betrachtet man die transformierten Zellen unter dem Mikroskop, so ist ein Überexpressionsphänotyp des nativen Sai1-Proteins in der *aut1Δ*-, *aut2Δ*-, und *aut9Δ*-Mutante erkennbar, nicht aber in der *aut7Δ*-Mutante. Zellen der *aut1Δ*-Mutante, die das Sai1-Protein auf dem *CEN*-Plasmid exprimieren und Zellen der *aut2Δ*- und der *aut9Δ*-Mutante, die das Sai1-Protein auf dem 2μ -Plasmid exprimieren, weisen eine schlauchförmige Verbindung der Tochterzelle zu der Mutterzelle auf. Die Zellkerne sind in Mutter- und Tochterzelle jedoch normal verteilt. Dieser Phänotyp, der auf einen Defekt im Zellzyklus schließen läßt, ist in diesen Zellen nicht so stark ausgeprägt wie in Zellen, die das Sai1-GFP auf einem Überexpressionplasmid unter der Kontrolle des *MET25* Promotors exprimieren. Dies mag daran liegen, daß dieser Promotor stärker als der native Promotor des Sai1-Proteins ist. Desweiteren wird dieser Phänotyp durch Hungerung der Zellen in Kaliumacetat noch verstärkt, in einer *aut9Δ*-Mutante bei der Überexpression des Sai1-GFP sogar erst bei Hungerung erkennbar. Da die *aut1Δ*- und die *aut9Δ*-Mutante, die das Sai1-Protein auf einem centromeren (*aut1Δ*) bzw 2μ -Plasmid (*aut9Δ*) exprimieren, bei 37°C einen Wachstumsphänotyp aufweisen, wurden diese Zellen, sowie der Wildtypstamm, bei dieser Temperatur inkubiert und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Die Zellen weisen bei 37°C die gleiche ungewöhnliche Zellmorphologie wie bei 30°C auf, unabhängig von der Veränderung der Morphologie aufgrund der Temperaturerhöhung. Interessanterweise ist die Morphologie der Zellen der *aut9Δ*-Mutante, die das „leere“ 2μ -Plasmid pRS425 tragen, normal, obwohl sie ein schlechtes Wachstum aufweisen. Eine Interaktion des Sai1-Proteins mit den Autophagocytoseproteinen Aut3p, Aut4p und Aut5p war mit den verwendeten Methoden nicht nachweisbar.

	Aut1p	Aut2p	Aut7p	Aut9p
Two-Hybrid	+	-	+	+
Affinitätschromatographie	/	+	+	+
Coimmunopräzipitation	+	/	/	+
Wachstum	+	-	-	+
Zellmorphologie	+	+	-	+

Ergebnisse der Interaktionsstudien des Sai1-Proteins mit den Autophagocytoseproteinen Aut1p, Aut2p, Aut7p und Aut9p. (+) Interaktion, (-) keine Interaktion, (/) Experiment nicht durchgeführt

Der Wachstumsphänotyp der *aut1* Δ -Mutante, die das native Sai1-Protein auf einem Plasmid überexprimiert, wurde zu einem Funktionalitätstest des HA-getaggen Proteins herangezogen. Dazu wurde das getaggte Sai1-Protein mit nativer Promotor- und Terminatorregion in die Überexpressionsplasmide pRS315 und pRS425 kloniert, in die *aut1* Δ -Mutante transformiert und die Zellen bei 18°C, 30°C und 37°C inkubiert. Hierbei konnte kein Unterschied im Wachstum der Zellen im Vergleich zum ungetaggen Protein festgestellt werden, so daß durchaus die Möglichkeit besteht, daß das getaggte Protein seine natürliche Funktion in der Zelle ausüben kann. Die Funktionalität des Proteins kann jedoch nur durch die Komplementation eines noch unbekanntem Phänotyps der Nullmutante überprüft werden.

Die Gesamtheit dieser Ergebnisse läßt auf eine Interaktion des Sai1-Proteins mit dem Aut1-Protein und dem Aut9-Protein schließen, die Interaktion mit den Proteinen Aut2p und Aut7p ist durchaus wahrscheinlich. Die Proteine Aut1p und Aut9p interagieren nicht miteinander (Lang [1998]). Die Interaktion des Aut1-Proteins mit dem Sai1-Protein ist durchaus nicht überraschend, wenn man als Vergleich das homologe Scn1-Protein aus *S. pombe* heranzieht. Dieses Protein interagiert mit dem Cut9-Protein (Samejima and Yanagida [1994]), welches homolog zu dem Cdc16-Protein aus *S. cerevisiae* ist. Das Cdc16-Protein ist ein Bestandteil des „anaphase promoting“ Komplexes (APC), der als E3-Enzym die Ubiquitinierung während der Mitose reguliert (King et al. [1996]). Das Aut1-Protein aus *S. cerevisiae* wiederum übernimmt die Funktion eines E2-Enzyms bei der Übertragung des Aut7-Proteins auf Phosphatidylethanolamin (1.4.11), auch wenn es zu den E2-Enzymen nicht homolog ist. Die Interaktion mit dem Aut7-Protein erfolgt wahrscheinlich nur an dem nichtgekoppelten Aut7-Protein, da bei der Western Blot Analyse der Affinitätschromatographie nur eine statt zwei Banden im Eluat der Affinitätssäule detektierbar war. Eine Interaktion mit dem Aut2-Protein erfolgt vermutlich nur, wenn der N-Terminus des Aut2-Proteins wie im Fall eines Two-Hybrid Experiments nicht blockiert ist. Die Interaktion des Aut9-Proteins mit den Proteinen Aut2p und Aut7p bestärkt die Beziehung der Autophagocytoseproteine Aut1p, Aut2p, Aut7p und Aut9p untereinander und untersteicht die Interaktion des Sai1-Proteins mit diesen Proteinen. Desweiteren wird diese Aussage von der Tatsache gestützt, daß das Aut2-Protein als Cysteinprotease mit dem Aut7-Protein interagiert (Kirisako et al. [2000]) bevor und nachdem es an dem gleichen perivakuolären/preautophagosomalen Kompartiment PAC) wie das Aut9-Protein lokalisiert ist (Suzuki et al. [2001]). Da die Überexpression des Sai1-Proteins in einer *aut7* Δ -Mutante keinen Phänotyp in Bezug auf Wachstum und Zellmorphologie erzeugt, in dieser Mutante aber die Autophagocytose blockiert

ist, kann die Wechselwirkung der interagierenden Proteine mit dem Sai1-Protein nicht nur auf dem Abbau des überschüssigen Proteins beruhen.

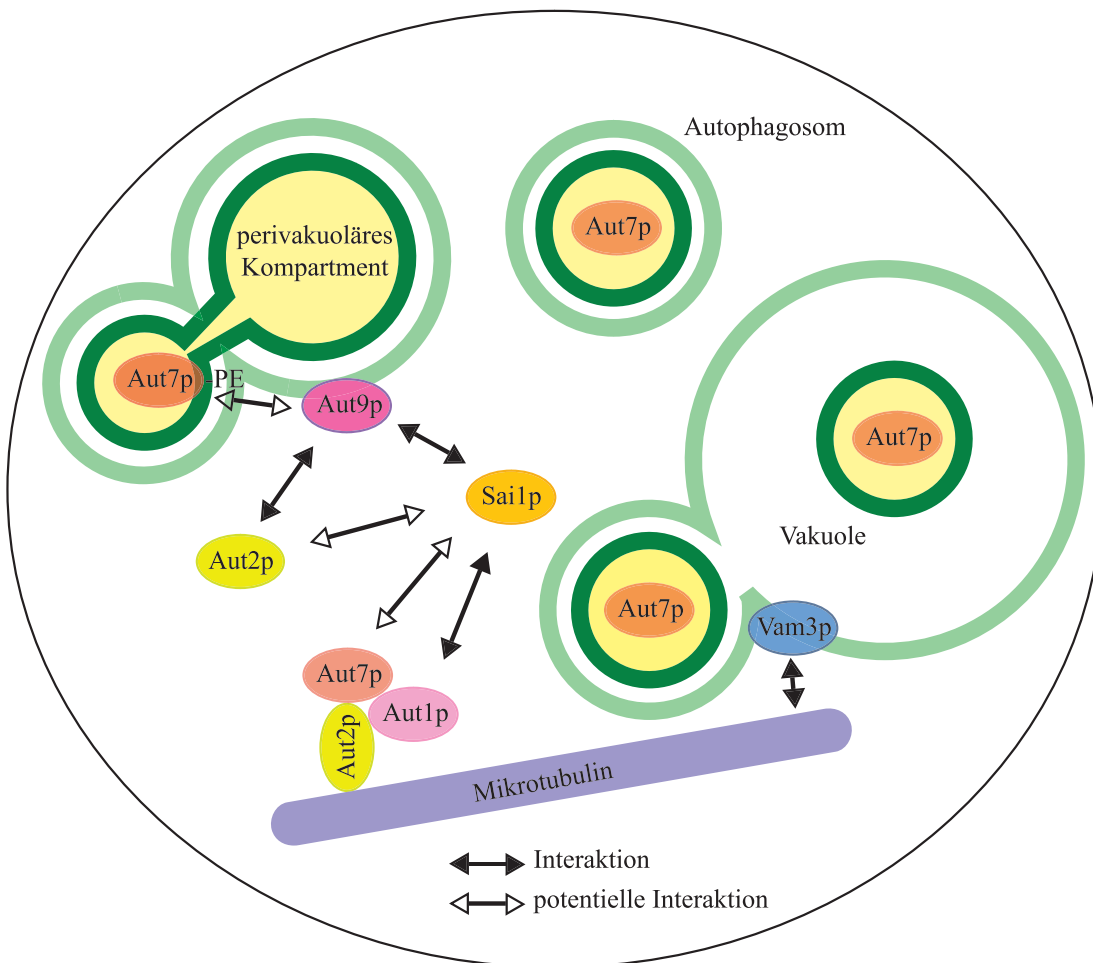


Abbildung 85: Modell der in dieser Arbeit nachgewiesenen Interaktionen des Sai1-Proteins mit den Autophagocytoseproteinen Aut1p, Aut2p, Aut7p und Aut9p und des Vam3-Proteins mit Tubulin in einer Hefezelle.

Da die Nullmutante *sai1Δ* keinen bisher bekannten Phänotyp aufweist, wurden *sai1Δ autxΔ*-Doppelmutanten hergestellt (x= 1,2,3,9). Die Zellen dieser Mutanten wurden bei 18°C, 30°C und 37°C inkubiert und ihrer Zellmorphologie unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Diese Mutanten wiesen jedoch ebenfalls keinen Wachstumsphänotyp auf und die Zellmorphologie erscheint normal.

Die Lokalisation des Sai1-Proteins erfolgte über die Fluoreszenz eines überexprimierten Sai1-GFP in lebenden Zellen und über die indirekte Immunfluoreszenz des überexprimierten HA-getaggtten Proteins in fixierten Sphäroblasten. Das Sai1-Protein ist im Cytosol und an ein bis maximal drei Vesikeln innerhalb des Cytosols lokalisiert, bei denen es sich eindeutig nicht um den Zellkern handelt. Diese Vesikel sind auch in der Nomarski-optik deutlich erkennbar und könnten dem perivakuolären Kompartiment entsprechen (Suzuki et al. [2001]), an welchem sich unter

anderem auch die Proteine Aut7p und Aut9p befinden. Da in den Nullmutanten *aut7* Δ und *aut9* Δ das Sai1-GFP ebenfalls an diesem Kompartiment lokalisiert ist, können die Proteine Aut7p und Aut9p nicht der Membrananker dieses Proteins sein. Zur Überprüfung dieser Theorie wäre eine indirekte Coimmunofluoreszenz der Proteine Aut9p und Sai1p notwendig, möglichst mit den ungetaggten Wildtypproteinen.

Interessanterweise wird die Expression eines mit einem HA-(Haemagglutinin-)Epitop versehenen Proteins durch Hungerung oder durch Zugabe des Tor Inhibitors Rapamycin verstärkt induziert. Dieser Befund konnte auch auf Transkriptionsebene des Wildtypgens mittels einer RT-PCR belegt werden. Da es sich hierbei um ein auf diesem Gebiet noch kaum publiziertes Experiment handelt, wurde die Transkription des *AUT1* Gens mit dem gleichen Experiment untersucht. Die Hungerinduktion des Aut1-Proteins auf Proteinebene wurde schon früher belegt (Reiche [2001]). Nach den Ergebnissen dieses Experiments zufolge werden die Proteine Sai1p und Aut1p hauptsächlich nach einer einstündigen Hungerperiode in 1%-Kaliumacetat transkribiert. Nach einer fünfstündigen Hungerperiode geht die Transkription der Proteine wieder zurück. Dieser Befund unterstützt die Aussage, daß das Sai1-Protein mit der Autophagocytose in Zusammenhang zu bringen ist, eventuell auch über die Regulierung des Zellzyklusses in Stresssituationen, da es eine signifikante Homologie zu dem am Zellzyklus beteiligten Scn1-Protein aus *S. pombe* aufweist.

5.4 Das Sai2-Protein

Das Sai2-Protein (früher Aip1-Protein) wurde in einem Two-Hybrid Screen mit dem Aut1-Protein detektiert (Schäffeler [1999]). Die *sai2* Δ -Mutante weist ein schlechtes Wachstum bei 30°C und bei 37°C auf. Das GFP-Sai2p ist in einer *sai2* Δ - und einer *aut1* Δ -Mutante an vielen punktförmigen Gebilden innerhalb des Cytosols lokalisiert (Schäffeler [1999]), die aber nicht denen eines Sai1p-GFP entsprechen, da diese nur ein- bis maximal dreimal pro Zelle auftreten. Die Überexpression des GFP-Sai2p in den gehungerten Zellen einer *aut1* Δ -Mutante bewirkt eine ähnliche, wenn auch stärkere Veränderung der Zellmorphologie wie das Sai1p-GFP. Die Zellen knospen sich nicht voneinander ab und bilden längliche zusammenhängende Schläuche. In dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob die Überexpression des Sai2-Proteins unter der Kontrolle des nativem Promotors in den *Aut*-Mutanten *aut1* Δ , *aut2* Δ , *aut3* Δ , *aut9* Δ , sowie der *sai1* Δ -Mutante einen Wachstumsphänotyp erzeugt. Alle transformierten Zellen wuchsen in gleichem Maße wie der Wildtypstamm, es war kein Phänotyp erkennbar. Das überexprimier-

te Sai2p ist kein Suppressor der *aut1-1*, *aut2-1* und *aut9-1* Mutante in Bezug auf die Reifung der Aminopeptidase I.

Desweiteren wurden *sai2ΔautxΔ*-Doppelmutanten ($x=1,3$) bzw. eine *sai1Δsai2Δ*-Doppelmutante hergestellt, auf ihr Wachstum bei 18°C, 30°C und 37°C hin untersucht und ihre Zellmorphologie unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Die Doppelmutanten wiesen das gleiche schlechte Wachstum und auch die gleiche Zellmorphologie wie die *sai2Δ*-Mutante auf. Diese Zellen sind nicht mehr in der Lage die Tochterzellen abzuknospen und weisen schlauchförmige Verbindungen untereinander auf.

Zu weiteren Untersuchungen wurde dieses Proteins mit einem HA-(Haemagglutinin)-Epitop versehenen, welches jedoch nicht funktionell war, da die Zellen, die dieses Fusionsprotein exprimieren, das gleiche schlechte Wachstum wie die *sai2Δ*-Mutante aufwiesen.

5.5 Das Vam3-Protein

Das Vam3-Protein ist ein zu Syntaxin (t-SNARE) homologes integrales Membranprotein, das an der Vakuolenmembran lokalisiert ist. Es ist an der Fusion von Vesikeln mit der Vakuolenmembran beteiligt (Darsow et al. [1997]). Da die Frage aufgeworfen wurde (Lang et al. [1998]), ob autophagische Vesikel in *S. cerevisiae*, entsprechend dem Transport sekretorischer Vesikel mit Hilfe von Mikrotubuli entlang den Axonen von Neuronen (Allen et al. [1985]), entlang von Tubulinsträngen zur Vakuole transportiert werden, stellte sich die Frage, ob auch das Vam3-Protein mit Tubulinproteinen interagiert. Die Interaktion des Vam3-Proteins mit Tubulin wurde mit drei verschiedenen Methoden nachgewiesen. Die Affinitätschromatographie mit einem GST-Vam3p und eine Coimmunopräzipitation des nativen Vam3-Proteins wurde mit Rindertubulin durchgeführt, das Two-Hybrid Experiment eines verkürzten Vam3p mit den Tubulinproteinen Tub2p und Tub3p. Das Two-Hybrid Experiment wies nur im Fall des nicht essentiellen α -Tubulin Tub3p ein positives Ergebnis auf. Diese Experimente belegen eine Interaktion des Vam3-Proteins mit Tubulin, was wiederum die Theorie vom Transport autophagischer Vesikel entlang von Tubulinsträngen unterstützt.

6 Zusammenfassung

Protein-Protein Wechselwirkungen können für die Aufklärung der Mechanismen und der Regulation intrazellulärer Vorgänge von zentraler Bedeutung sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher Interaktionsstudien mit Autophagocytoseproteinen durchgeführt, die neue Erkenntnisse bringen sollten.

Die Expression des LB-Aut7-Proteins aus *Laccaria bicolor* unter der Kontrolle des relativ starken *TEF*-Promotors in der Lage die autophagischen Defekte einer *aut7Δ*-Mutante in Bezug auf Reifung der Aminopeptidase I, Überleben unter Hungerbedingungen und die Anreicherung autophagischer Vesikel innerhalb der Vakuole unter Hungerbedingungen in Anwesenheit eines Proteinase B Inhibitors zu komplementieren (Kim et al. [1999b]).

Das Aut2-Protein ist für das Überleben der Zelle unter Hungerbedingungen essentiell und interagiert außer mit den Proteinen Aut1p (Ito et al. [2000], Uetz et al. [2000], Schäffeler [1999]) und Aut7p (Lang et al. [1998]) mit dem Aut9-Protein. Die potentiell interagierenden Domänen des Aut2-Proteins mit dem Aut1-Protein und dem Aut7-Protein wurden in einem Two-Hybrid Experiment mit Hilfe von Aut2-Proteinfragmenten untersucht. Der C-Terminus des Aut2-Proteins scheint hierbei mit dem Aut1-Protein zu interagieren und der N-Terminus mit dem Aut7-Protein. In einem Two-Hybrid Screen wurden zwei potentiell interagierende Proteine detektiert, das lösliche Yps3-Protein, eine zur Proteinase A homologe Aspartat-Protease (Olsen et al. [1999]) und das Snx4-Protein, welches vermutlich am intrazellulären Proteintransport vom *endoplasmatischen Reticulum* zum Golgi-Apparat benötigt wird (Haft et al. [1998]).

In einem Two-Hybrid Screen wurde das Sai1-Protein als möglicher Interaktionspartner des Aut9-Proteins detektiert. In weiteren Interaktionsstudien, Affinitätschromatographie, Coimmunopräzipitation und die Überexpression eines Sai1-Proteins in einer *aut9Δ*-Mutante konnte diese Interaktion bestätigt werden. Ein weiterer Interaktionspartner ist das Aut1-Protein, der Nachweis erfolgte über ein Two-Hybrid Experiment, eine Coimmunopäzipitation und über die Überexpression eines Sai1-Proteins in einer *aut1Δ*-Mutante. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß das Sai1-Protein noch mit den Proteinen Aut2p und Aut7p interagiert. Die Interaktion dieser Proteine mit dem Sai1-Protein war mittels Affinitätschromatographie nachweisbar. Die Überexpression eines Sai1-Proteins in einer *aut2Δ*-Mutante führt zudem ebenfalls zu einer Veränderung der Zellmorphologie und in einem Two-Hybrid Experiment konnte die Interaktion des Aut7-Proteins mit dem Sai1-Protein nachgewiesen werden.

Das Sai1-Protein ist ein lösliches 36,1 kDa Protein mit einem annähernd neutra-

len isoelektrischen Punkt von 6,72 und einer C-terminalen „coiled-coiled“ Region, die auf Protein-Protein Wechselwirkungen hin deutet. Die *sai1* Δ -Mutante weist keinen Autophagocytose- oder Wachstumsphänotyp auf, die Zellmorphologie erscheint normal. Das Sai1-Protein ist unter anderem Homolog zum Scn1-Protein aus *S. pombe*, dessen Mutante ein „high copy“ Suppressor des mutierten Cut9-Proteins (Samejima and Yanagida [1994]) ist. Das Cut9-Protein ist wiederum zu dem Cdc16-Protein aus *S. cerevisiae* homolog, welches eine Untereinheit des „anaphase promoting“ Komplexes (APC) ist, der als E3-Enzym die Ubiquitinierung während der Mitose reguliert (King et al. [1996]). Da das homologe Scn1-Protein mit einem E3-Enzym interagiert, ist eine Interaktion des Sai1-Proteins mit dem Aut1-Protein, welches als E2 ähnliches Protein (Kirisako et al. [2000], Ichimura et al. [2000]) die Übertragung des Aut7-Proteins auf Phosphatidylethanolamin katalysiert, sehr wahrscheinlich.

Die Überexpression des nativen und des mit GFP getaggtten Sai1-Proteins in den Mutanten *aut1* Δ , *aut2* Δ und *aut9* Δ führt zu einer Veränderung der Zellmorphologie, die unter Hungerbedingungen verstärkt sichtbar wird. Die Tochterzellen sind nicht mehr in der Lage sich normal von der Mutterzelle abzuknospen und bleiben über eine schlauchförmige Verbindung mit ihr verbunden. Dieser Phänotyp ähnelt der einer *sai2* Δ -Mutante. Desweiteren wachsen die mit dem *CEN*-Plasmid transformierten *aut1* Δ -Zellen bei 30°C und bei 37°C langsamer als der Wildtypstamm. Die Überexpression des Proteins in den *Aut*-Mutanten *aut3* Δ , *aut4* Δ und *aut5* Δ verändert das Wachstum der Zellen und ihre Morphologie nicht. Die Überexpression des nativen Sai1-Proteins in den Mutanten *aut1-1*, *aut2-1* und *aut9-1* bewirkt keine Komplementation des Defekts in der Aminopeptidase I Reifung.

Die Lokalisation des Sai1-Proteins erfolge über eine direkte Immunfluoreszenz eines Sai1-GFP und über die indirekte Immunfluoreszenz eines HA-getaggtten Proteins. Hierbei konnte das Protein an ein bis drei vesikelartigen Strukturen innerhalb des Cytosols und im Cytosol selbst detektiert werden. Bei diesen Vesikeln handelt es sich nicht um den Zellkern, eventuell aber um das perivakuoläre Kompartiment (Suzuki et al. [2001]). Die Funktionalität des HA-getaggtten Proteins konnte über den Wachstumsphänotyp in einer *aut1* Δ -Mutante nachgewiesen werden.

Die Expression eines HA-getaggtten Sai1-Proteins wird im Wildtyp und den *Aut*-Mutanten *aut1* Δ , *aut2* Δ , *aut3* Δ , *aut4* Δ , *aut5* Δ , *aut7* Δ und *aut9* Δ in stationären und gehungerten Zellen sowie durch Inhibierung des Tor2-Proteins verstärkt induziert. Auf Transkriptionsebene erfolgt die Induktion hauptsächlich nach einer einstündigen Hungerperiode in Kaliumacetat und nimmt nach fünfstündiger Hungerperiode wieder ab.

Die Überexpression eines Sai2-Proteins, welches in einem Two-Hybrid Screen

mit dem Aut1-Protein gefunden wurde (Schäffeler [1999]), in den *Aut*-Mutanten *aut1* Δ , *aut2* Δ , *aut3* Δ und *aut9* Δ , sowie der *sai1* Δ -Mutante erzeugt kein verändertes Wachstum gegenüber der *sai2* Δ -Mutante, die allein ein schlechtes Wachstum aufweist. Das Sai2-Protein ist auch kein Suppressor der *aut1-1*, *aut2-1* und *aut9-1* Mutante. Ein C-terminaler HA-Tag erwies sich als nicht funktionell, so daß weitere Versuche auf Proteinebene ohne Antikörper nicht möglich waren.

Das Vam3-Protein, ein zu Syntaxin (t-SNARE) homologes integrales Membranprotein, ist für die Fusion von Vesikeln mit der Vakuolenmembran essentiell (Darsow et al. [1997]). Interaktionsstudien mittels Affinitätschromatographie, Coimmunopräzipitation und Two-Hybrid belegen die Interaktion dieses Proteins mit Rindertubulin bzw. dem nicht essentiellen α -Tubulin Tub3p. Dieses Ergebnis bestärkt die Theorie, daß autophagische Vesikel entlang von Mikrotubuli zur Vakuole transportiert werden (Lang et al. [1998]).

Abstract

Protein-protein interactions are involved in the control of many cellular regulation mechanisms. Regulation of autophagy, an unspecific degradation process, is essential for the survival of cells under starvation conditions. Three proteins, which are necessary for the formation of autophagosomes, Aut2p, Aut7p and Aut9p were selected for protein-protein interaction studies. Aut2p, a cysteine protease, interacts with Aut9p. Its C-terminus interacts with Aut1p and its N-terminus interacts particularly with Aut7p. LB-Aut7p from *Laccaria bicolor*, a Aut7p homologue, is capable to complement the autophagic phenotypes of an *aut7Δ* mutant. Sailp, which was found in a two-hybrid screen with Aut9p also interacts with Aut1p, Aut2p, and Aut7p. Its expression is starvation induced and a tagged protein is localized to the cytoplasm, especially in a vesicle-like compartment. In addition to these results Vam3p, a syntaxin homologue, essential for the vesicle fusion with the vacuole, interacts with the non-essential α -tubulin Tub3p.

The Aut7-protein

Aut7p, a low copy suppressor of an *aut2-1* mutant with 13,6 kDa, is soluble and starvation induced (Kirisako et al. [1999], Huang et al. [2000]). In a ubiquitin-like system it is covalently linked with phosphatidylethanolamin (PE) (Kirisako et al. [2000], Ichimura et al. [2000]). This conjugation is essential for completion of autophagosomes and cvt-vesicles. Its localization at the perivacuolar compartment depends on Aut9p (Suzuki et al. [2001] Kim et al. [2001b]). After cleavage of the Aut7p-PE bond through the action of Aut2p, Aut7p is localized on autophagosomes and on cvt-vesicles. The origin of the vesicular membranes are thought to be the perivacuolar compartment (Kim et al. [2001b]). This localization is equivalent to the localization of the LC3 homologue from mammalian cells (Kabeya et al. [2000], Mizushima et al. [2001]). A pure Aut7p was produced by means of a GST gene fusion system. The GST was removed from the fusion protein through the action of thrombin. Then the protein was purified by FPLC. The three dimensional structure of Aut7p should have been analysed by 3D-NMR, but the protein precipitated while analysis. This problem was solved during the three dimensional analysis of GATE-16, a mammalian homologue, by the addition of sodium chloride to the protein solution (Paz et al. [2000]).

A GST-Aut7p interacts with a GFP-Aut9p in an affinity chromatography experiment. This result is contradictory of those from T. Lang (Lang [1998]), who was not able to detect an interaction in a two-hybrid experiment. But Interaction

of Aut7p with Aut9p is plausible according to the dependence on Aut9p for localization of Aut7p on the perivacuolar compartment (Suzuki et al. [2001]Kim et al. [2001b]).

LB-Aut7p from *Laccaria bicolor* has a 77% identity to Aut7p from *Saccharomyces cerevisiae* (Kim et al. [1999b]). It was analysed for complementation of autophagic defects in an *aut7* Δ mutant (Kim et al. [1999b]). The complete LB-AUT7 gene was cloned into three vectors of different promotor activity. Expression of LB-Aut7p under the control of the strongest promotor *TEF*, resulted in complementation of autophagic defects of an *aut7* Δ mutant. Aminopeptidase I is matured, the survival of transformed cells is wild-type like and vesicles accumulate under starvation conditions inside the vacuole in the presence of a proteinase b inhibitor. The maturation of aminopeptidase I is mostly blocked in a transformed *aut2-1* mutant, almost like the mutant itself (Lang [1998]). This is contradictory to the evidence, that Aut7p is a low copy suppressor of an *aut2-1* mutant (Lang [1998]). In addition to the difference in the function of the two proteins, LB-Aut7p has a potential membrane domain.

The Aut2-protein

Aut2p is a soluble cystein proteinase (Kirisako et al. [2000]) with a molecular mass of 57 kDa (Lang et al. [1998]). It is responsible for removing the C-terminal Arg-117. Consequently, Aut7p is covalently linked with phosphatidylethanolamin (PE) (Kirisako et al. [2000], Ichimura et al. [2000]). For formation of autophagosomes this bond also has to be cleaved by Aut2p (Kirisako et al. [2000]). The intracellular localization of Aut2p was analysed with an antibody raised against GST-Aut2p. The antibody was able to detect Aut2p overexpressed on a 2μ plasmid and Aut2p-GFP in western blot analysis, but the signal of the native protein was too weak compared with the background. The antibody also was not able to detect the native protein during indirect immunofluorescence.

Aut2p interacts with Aut7p, Tub1p, Tub2p (Lang et al. [1998]) and with Aut1p (Schäffeler [1999]). Detection of a potential interacting domain of Aut2p was done in a two-hybrid experiment with different Aut2p-fragments. Interactions between Aut1p or Aut7p with Aut2p-fragments were detected by growing the transformed cells on his⁻-plates and by a β -galactosidase liquid assay. Interacting proteins should allow cells to be able to grow on ade⁻-plates, too, but even cells bearing Aut1p and the complete Aut2p failed this test. The C-terminal region of Aut2p seems to interact stronger with Aut1p than the N-terminal region. In the case of Aut7p the N-terminal region shows a stronger interaction with Aut2p, but

this result is not indisputable. Such disputable results are not unusual, as folding and localization of fusion proteins are not guaranteed. Results, found in a two-hybrid screen, must therefore be examined in further experiments. A possible interaction of Aut2p with Aut9p was examined with a biochemical (affinity chromatography) and a genetic (two-hybrid) method. Both methods showed results suggesting interaction of those proteins with each other. This result is not very surprising, remembering that the Aut2p-proteinase is responsible for the cleavage of the Aut7p-PE bond, which is necessary for completion of autophagosomes. Aut7p-PE is localized, depending on the presence of Aut9p, on the perivacuolar compartment (Suzuki et al. [2001], Kim et al. [2001b]). Detection of additional proteins interacting with Aut2p was done with a two-hybrid screen. The only proteins detected in this screen were Yps3p and Snx4p. Yps3 is a soluble aspartate-protease and a proteinase a homologue. It localizes partially at the plasma membrane (Olsen et al. [1999]). Snx4p is probably responsible for the intracellular transport of proteins from the *endoplasmatic Reticulum* to the Golgi (Haft et al. [1998]). It is in vicinity to the soluble Aut2p where it is necessary for the transport of autophagic vesicles to the vacuole (Lang et al. [1998]).

The Sai1-protein

Sai1p was detected in a two-hybrid screen with Aut9p. Aut9p is an integral membrane protein (Noda et al. [2000]Lang et al. [2000]) located on a perivacuolar compartment (Suzuki et al. [2001]). Sai1p shares homology with Scn1p from *S. pombe*, with the gene product of human KIAA0218 and with MAP1B from *B. taurus*. It is a non essential protein with no autophagic phenotypes. Therefore a *sai1* Δ mutant is not reduced in sporulation frequency, protein turnover, maturation of aminopeptidase I and has no reduced ability to survive starvation. As well a *sai1* Δ mutant shows vesicles inside the vacuole under starvation conditions in the presence of the proteinase B inhibitor PMSF. Also it shows no growth phenotype or change in cell morphology. It is still unknown if it is involved in cell cycle control. A mutant of Scn1p from *S. pombe* is a high copy suppressor of a *cut9* mutant (Samejima and Yanagida [1994]), a Cdc16p homologue from *S. cerevisiae*. For this reason a Sai1-GFP was transformed into a *cdc16-123* mutant, to see if it was able to complement the temperature sensitivity of this mutant. It was not surprising that there was no change in temperature sensitivity, because of the inability of the native Scn1p to complement this defect in a *cut9* mutant. Homology to MAP1B from *B. taurus* is interesting in so far as Aut7p, maybe interacting with Sai1p, is a mammalian homologue of LC3. LC3, combined with LC1 and LC2, is a small subunit of the microtubule associated proteins MAP1A and MAP1B

(Mann and Hammarback [1994], Mann and Hammarback [1996], Kuznetsov and Gelfand [1987]).

Though Sai1p is not an autophagic related protein, there were some interaction studies done with Aut-proteins. In the beginning Sai1p was tested to be a high or low copy suppressor of *aut1-1*, *aut2-1* and *aut9-1*. This test was done by western blot analysis, showing if the loss of aminopeptidase I maturation was complemented. The results showed, that Sai1p is not a suppressor of *aut1-1*, *aut2-1* or *aut9-1*. Interaction studies of Sai1p with Aut1p, Aut2p, Aut7p and Aut9p were done using several methods. Except for Aut2p all proteins showed interaction with Sai1p during a two-hybrid experiment, growing on his⁻-plates and passing a β -galactosidase liquid assay. Experiments by means of affinity chromatography were done with a GST-Sai1p bound on a sepharose matrix and native protein extracts bearing Aut2p-GFP, GFP-Aut7p or GFP-Aut9p on plasmids. All proteins were bound to the matrix showing interactions with Sai1p. Additional to this there were done coimmunoprecipitations with a triple HA-tagged Sai1p with the native Aut1p and GFP-Aut9p also showing interaction with Sai1p. But these results were all achieved with fusion proteins (Gal4p, GST, GFP and HA), so experiments with the wild-type protein had to be preformed. For this reason the wild-type gene *SAI1* was cloned into a centromeric- and a 2 μ -vector with its native promotor and terminator region. These plasmids were transformed into several *Aut*-mutants (*aut1* Δ , *aut2* Δ , *aut3* Δ , *aut7* Δ and *aut9* Δ) and the cells examined for growth phenotypes and changes in cell morphology. These experiments were also done with cells transformed with a plasmid bearing GFP-Sai1p and Sai1p-GFP (*aut1* Δ , *aut2* Δ , *aut4* Δ , *aut5* Δ , *aut7* Δ and *aut9* Δ). A noticeable slg-phenotype (slow growing) was only shown in an *aut1* Δ mutant bearing Sai1p on a centromeric plasmid at 37°C and on a 2 μ plasmid at 30°C. An *aut9* Δ mutant bearing just the 2 μ plasmid itself grows slower than the wild-type at 30°C and at 37°C, maybe a little bit faster. This phenotype is badly seen on plates, because of aggregation of *aut9* Δ cells transformed with a plasmid bearing a leucin marker like pRS315 and pRS425. This overexpression phenotype can also be seen under the light microscope in *aut1* Δ , *aut2* Δ and *aut9* Δ mutants. Cells of an *aut1* Δ mutant bearing Sai1p on the centromeric plasmid and cells of an *aut2* Δ and an *aut9* Δ mutant bearing Sai1p on the 2 μ plasmid show an unusual tube-like connection between mother- and daughter-cell. The nuclei are distributed normally in mother and daughter cells. This phenotype, suggesting a defect in cell cycle control, is more prominent in cells bearing a plasmid overexpressing Sai1p-GFP under the control of the *MET25* promotor. The difference in promotor activity could be the reason for this fact. This phenotype is observed better in starved cells. Because of

the growth phenotype seen at 37°C cells were grown at this temperature in liquid media and analysed by light microscopy. These cells showed the same unusual cell morphology as at 30°C independent from change in morphology caused by the shift in temperature. Cells of an *aut9*Δ mutant bearing just a 2μ plasmid itself, growing slower than wildtype cells, looked quite normal under the light microscope. Interactions of Sai1p with Aut3p, Aut4p and Aut5p were not seen using the described methods.

	Aut1p	Aut2p	Aut7p	Aut9p
Two-Hybrid	+	-	+	+
Affinity chromatography	/	+	+	+
Coimmunoprecipitation	+	/	/	+
Growth	+	-	-	+
Cell morphology	+	+	-	+

Results of interaction studies of Sai1p with Aut1p, Aut2p, Aut7p and Aut9p. (+) interaction, (-) no interaction, (/) experiment not done.

The growth phenotype of an *aut1*Δ mutant bearing Sai1p on a centromeric- or 2μ plasmid was used for a functionality test of a HA-tagged Sai1p. Plasmids with the HA-tagged *Sai1* containing native promoter- and terminator-region were transformed in an *aut1*Δ mutant. These cells were grown at 18°C, 30°C and 37°C showing no difference in cell growth compared to those bearing the native Sai1p in the same vectors. For this reason the tagged protein was considered functional.

All these results suggest an interaction of Sai1p with Aut1p, Aut2p, Aut7p and Aut9p. Aut1p and Aut9p don't interact with each other (Lang [1998]). Interaction of Sai1p with Aut1p is not surprising, remembering the function of the Scn1p from *S. pombe*. This protein interacts with Cut9p (Samejima and Yanagida [1994]), a Cdc16p homologue from *S. cerevisiae*. Cdc16p is a subunit of the anaphase promoting complex (APC), an E3 enzyme regulating ubiquitination during mitosis (King et al. [1996]). On the other hand Aut1p from *S. cerevisiae* acts as an E2-like enzyme in the transfer of the ubiquitin-like Aut7p to phosphatidylethanolamin. Interaction of Sai1p with Aut7p was only seen with the unlinked protein. Aut2p interacts only when its N-terminus is not blocked, for example in a two-hybrid experiment. Interaction of Aut9p with Aut2p and Aut7p strengthens the relationship of the autophagic proteins Aut1p, Aut2p, Aut7p and Aut9p to each other and emphasizes an interaction of these proteins with Sai1p. Overexpression of Sai1p in an *aut7*Δ mutant shows no growth phenotype or change in cell morphology, though autophagy is blocked, suggesting a specific interaction of Sai1p with Aut-proteins different from its degradation.

A *sai1*Δ lacks a phenotype showing if the tagged Sai1p is functional. For this

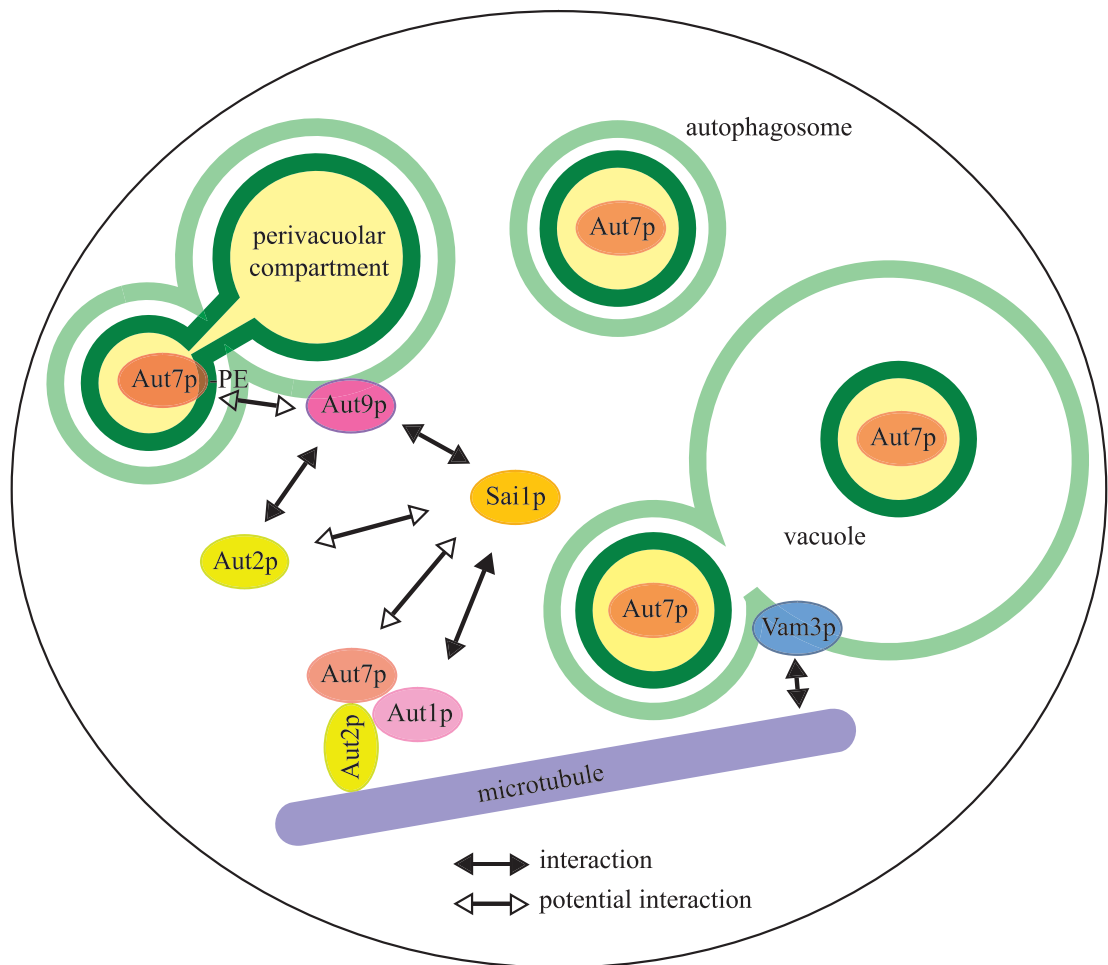


Abbildung 86: Model for interaction of Sai1p with the proteins Aut1p, Aut2p, Aut7p and Aut9p and for interaction of Vam3p with tubulin.

reason double mutants $sai1\Delta autx\Delta$ ($x = 1, 2, 3, 9$) were made by mating and subsequent tetrad dissection. But these mutants also showed no growth phenotype or change in cell morphology.

The Sai1p was localized by the fluorescence of a Sai1p-GFP in living cells and by indirect immunofluorescence of an overexpressed HA-tagged Sai1p in spheroblasts. The protein was localized on a compartment inside the cytoplasm and inside the cytoplasm itself. This compartment seems to be the same as the perivacuolar compartment described by Suzuki et al. [2001]. Aut7p and Aut9p are localized on this compartment, too. This theory could be confirmed by indirect co-immunofluorescence of Sai1p and Aut9p, especially with the native proteins.

Expression of a triple HA-tagged Sai1p increases during starvation or by addition of the Tor-protein inhibitor rapamycin. This result was also seen on transcription level of the native *SAI1* gene by means of a RT-PCR. As a control transcription of the *AUT1* gene was analysed with the same method, as RT-PCR is hardly

published in the field of autophagocytosis. The starvation induced expression of Aut1p was demonstrated earlier (Reiche [2001]). As a result of this experiment Aut1p and Sai1p are mainly transcribed after a starvation period of one hour incubated in 1%-potassiumacetate. After five hours in this media the transcription of the proteins decreases. These results emphasizes the theorie that Sai1p is related to autophagocytosis, maybe through regulation of the cell cycle under stress conditions. This link to cell cycle control is evidence for homology of the Sai1p to Scn1p from *S. pombe*.

The Sai2-protein

Sai2p (earlier named Aip1p) was detected in a two-hybrid screen with Aut1p (Schäffeler [1999]). A *sai2* Δ mutant has a slg-phenotype at 30°C and 37°C. A GFP-Sai2p expressed in an *aut1* Δ mutant is localized at many punctured structures inside the cytoplasm (Schäffeler [1999]). These are not equivalent to those of a Sai1p-GFP which exists a maximal number of three times in the same cell. Overexpression of a GFP-Sai2p in starved cells of an *aut1* Δ mutant showed a similiar but stronger change in cell morphology than cells overexpressing Sai1p-GFP. Mother and daughter cells do not divide correctly and show long tube-like connections between each other. For this reason overexpression of Sai2p under the control of the native promotor was analysed in this work in the *Aut*-mutants *aut1* Δ , *aut2* Δ , *aut3* Δ , *aut9* Δ and the *sai1* Δ mutant. Growth of the transformed cells were examined at 18°C, 30°C and 37°C showing no difference in growth to the transformed wildtype cells.

In addition to this double mutants *sai2* Δ *autx* Δ (x = 1, 3) and a *sai1* Δ *sai2* Δ mutant were made by mating and subsequent tetrad dissection. These mutants were analyzed for growth at 18°C, 30°C and 37°C and for change in cell morphology under the light microscope. All double mutants showed the same slg-phenotype as a *sai2* Δ mutant and the same cell morphology. All cells are unable to divide mother and daughter cells correctly and show a long tube-like connection between each other similiar to those of some *Aut*-mutants overexpressing Sai1p.

Further experiments should be done with a triple HA-tagged Sai2p. But his protein was not functional as cells of a *sai2* Δ mutant expressing the tagged Sai2p showed the same slg-phenotype as the *sai2* Δ mutant itself.

The Vam3-protein

Vam3p, a syntaxin homologue (t-SNARE), is an integral membrane protein localized at the vacuolar membrane. It is involved in the fusion of autophagic vesicles with the vacuolar membrane (Darsow et al. [1997]). If autophagic vesicles are transported to the vacuole via microtubules (Lang et al. [1998]) like secretory vesicles via the axons of neurons (Allen et al. [1985]) there is a possibility that Vam3p interacts with microtubules, too. For this reason interactions studies of a Vam3p with tubulin were done with three different methods. Affinity chromatography was performed with GST-Vam3p bound to a sepharose matrix with tubulin from *B. taurus*. With the same tubulin a co-immunoprecipitation was performed with the native Vam3p. A two-hybrid experiment was performed with a Vam3p without its membrane domain and the proteins Tub2p and Tub3p. Only the non-essential α -Tub3p showed an interaction with Vam3p. These results confirm the theorie of the transport of autophagic vesicles via microtubules.

Publikationsliste

T. Lang, E. Schäffeler, D. Bernreuther, D. H. Wolf und M. Thumm. Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO J.*, 17(13):3597-3607, 1998

S. J. Kim, D. Bernreuther, M. Thumm und G. K. Podila. *LB-AUT7*, a novel symbiosis-regulated gene from ectomycorrhizal fungus, *Laccaria bicolor*, is functionally related to vesicular transport and autophagocytosis. *J. Bact.*, 181(6):1963-1967, 1999

I. Suriapranata, U. Epple, D. Bernreuther, M. Bredschneider, K. Sovarasteanu und M. Thumm. The breakdown of autophagic vesicles inside the vacuole depends on Aut4p. *J. Cell. Sci.*, 113:4025-4033, 2000

Literatur

- T. Alber. Structure of the leucine zipper. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2:205–210, 1992.
- R. D. Allen, D. G. Weiss, J. H. Hayden, D. T. Brown, H. Fujiwake, and M. Simpson. Gliding movement of and bidirectional transport along single native microtubules in cytoplasmic transport. *J. Cell Biol.*, 100:1736–1752, 1985.
- G. Ammerer, C. P. Hunter, J. H. Rothman, G. C. Saari, L. A. Valls, and T. H. Stevens. PEP4, gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. *Mol. Cell. Biol.*, 6:2490–2499, 1986.
- F. M. Ausubel, R. Brent F. M., R. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, General Hospital, Harvard Medical School, Massachusetts, 1997.
- M. Baba, M. Ohsumi, and Y. Ohsumi. Analysis of the membrane structures involved in autophagy in yeast by freeze-replica method. *Cell Struct.*, 20:465–471, 1995.
- M. Baba, K. Takeshige, N. Baba, and Y. Ohsumi. Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J. Cell Biol.*, 124:903–913, 1994.
- P. L. Bartel. *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*, pages 153–179. Oxford University Press, Oxford, 1993.
- T. Beck and M. N. Hall. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*, 402(6762):689–692, 1999.
- S. Beeckmann and L. Kanarek. Demonstration of physical interactions between consecutive enzymes of the citric acid cycle and of the aspartate-malate shuttle. *Eur. J. Biochem.*, 117:527–535, 1981.
- M. K. Bennett and R. H. Scheller. The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2559–2563, 1993.
- C. D. Boyle and K. E. Hellenbrand. Assessment of the effect of mycorrhizal fungi on drought tolerance of conifer seedlings. *Can. J. Bot.*, 69:1764–1771, 1990.
- R. Brent and M. Ptashne. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specific of a procaryotic repressor. *Cell*, 43:729–763, 1985.

- C. G. Burd and S. D. Emr. Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol. Cell*, 2:157–162, 1998.
- T. Burgess, P. Laurent, B. Dell, N. Malajczuk, and F. Martin. Effect of the fungal isolate aggressivity on the biosynthesis of symbiosis-related polypeptides in differentiating eucalypt ectomycorrhiza. *Planta*, 195:408–417, 1995.
- Y. H. Chang and J. A. Smith. Molecular cloning and sequencing of genomic DNA encoding aminopeptidase I from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 264: 6979–6983, 1989.
- B. Chassy, A. Mercenier, and J. Flickinger. Transformation of bacteria by electroporation. *TIBTECH*, 6:303–309, 1988.
- V. Chau, J. W. Tobias, A. Bachmair, D. Marriott, D. J. Ecker, D. K. Gonda, and A. Varshavsky. A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science*, 243:1567–1583, 1989.
- L. Chen, H. B. Wang, S. Vicini, and R. W. Olsen. The γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) receptor-associated protein (GABARAP) promotes GABA_A receptor clustering and modulates the channel kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 11557–11562, 2000.
- C.-T. Chien, P. L. Bartel, R. Sternglanz, and S. Fields. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578–9582, 1991.
- T. W. Christianson, R. S. Sikorski, M. Dante, J. H. Shero, and P. Hieter. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene*, 110:119–122, 1992.
- Y. Chvatko, I. Howald, and H. Riezman. Two yeast mutants defective in endocytosis are defective in pheromone response. *Cell*, 46:355–364, 1986.
- B. D. Cohen, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. The conserved C-terminal domain of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein can associate with an α -adaptin-like molecule: a possible link between growth factor receptors and viral transformation. *Mol. Cell Biol.*, 13:6462–6468, 1993.
- J. V. Colpaert and J. A. V. Assche. Zinc toxicity in ectomycorrhizal *Pinussylvestris*. *Plant Soil*, 143:201–211, 1992.
- E. Conibear and T. H. Stevens. Vacuolar biogenesis in yeast: sorting out the sorting proteins. *Cell*, 83:513–516, 1995.

- O. Coux, K. Tanaka, and A. L. Goldberg. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.*, 65:801–847, 1996.
- A. B. Cubitt, R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross, and R. Y. Tsien. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 20:448–455, 1995.
- A. M. Cuervo and J. F. Dice. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, 173:501–503, 1996.
- R. Cueva, A. N. Garcia, and R. P. Suarez. Yeast vacuolar aminopeptidase yscI. Isolation and regulation of the APE1 (LAP4) structural gene. *FEBS Lett.*, 259:125–129, 1989.
- C. V. Dang, J. Barrett, M. Villa-Garcia, L. M. S. Resar, G. J. Kato, and E. R. Fearon. Intracellular leucine zipper interactions suggest c-Myc heterooligomerization. *Mol. Cell Biol.*, 11:954–962, 1991.
- T. Darsow, S. E. Rieder, and S. D. Emr. A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole. *J. Cell Biol.*, 138:517–529, 1997.
- N. G. Davis, J. L. Horecka, and G. F. Jr. Sprague. Cis- and trans- acting functions required for endocytosis of the yeast pheromone receptors. *J. Cell Biol.*, 122:53–65, 1993.
- J. de Gunzberg, R. Riehl, and R. A. Weinberg. Identification of a protein associated with p21-ras by chemical cross-linking. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 81:4007–4011, 1989.
- R. J. Deshaies. Make it or break it: the role of the ubiquitin-dependent proteolysis in cellular regulation. *Trends in Cell Biol.*, 5:428–434, 1995.
- J. J. Devlin, L. C. Panganiban, and P. E. Devlin. Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules. *Science*, 249:404–406, 1990.
- J. F. Dice. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem.*, 15:305–309, 1990.
- W. J. Dunn. Studies on the mechanisms of autophagy: Formation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.*, 110:1923–1933, 1990a.
- W. J. Dunn. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J. Cell Biol.*, 110:1935–1945, 1990b.

- W. J. Dunn. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.*, 4:139–143, 1994.
- T. Durfee, K. Becherer, R. L. Chen, S. H. Yeh, Y. Yang, A. E. Kilburn, W. H. Lee, and S. J. Elledge. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type I catalytic subunit. *Genes Dev.*, 7:555–569, 1993.
- R. Egner, M. Thumm, M. Straub, A. Simeon, H. J. Schüller, and D. H. Wolf. Tracing intracellular proteolytic pathways. Proteolysis of fatty acid synthase and other cytoplasmic proteins in the yeast. *J. Biol. Chem.*, 268:27269–27276, 1993.
- T. E. Ellenberger, C. J. Brandl, K. Struhl, and S. C. Harrison. The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell*, 71:1226–1237, 1992.
- U. Epple. Mündliche Mitteilung. 2000.
- U. D. Epple, I. Suriapranata, E. L. Eskelinen, and M. Thumm. Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *J. Bact.*, 183(20):5942–5955, 2001.
- S. Felder, M. Zhou, P. Hu, J. Urena, A. Ullrich, M. Chaudhuri, S. E. Shoelson, and J. Schlessinger. SH2 domains exhibit high-affinity binding to tyrosine-phosphorylated peptides yet also exhibit rapid dissociation and exchange. *Mol. Cell. Biol.*, 13:1449–1455, 1993.
- M. Fengsrud, E. S. Erichsen, T. O. Berg, and P. O. Seglen. Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes, and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy. *Eur. J. Cell Biol.*, 79:871–882, 2000.
- S. Ferro-Novick and R. Jahn. Vesicle fusion from yeast to man. *Nature*, 370:191–193, 1994.
- S. Fields and O.-K. Song. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature (London)*, 340:245–246, 1989.
- S. Fields and R. Sternglanz. The two-hybrid system: An assay for protein-protein interactions. *Trends Genet.*, 10:245–246, 1994.
- T. Formosa, J. Barry, B. M. Alberts, and J. Greenblatt. Using protein affinity chromatography to probe structure of protein machines. *Methods Enzymol.*, 208:24–45, 1991.

- T. Funakoshi, A. Matsuura, T. Noda, and Y. Ohsumi. Analysis of the *APG13* gene involved in autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 192:207–213, 1997.
- V. Galli, H. Schuepp, and C. Brunold. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologica Plantarum*, 92:364–368, 1994.
- M. D. George, M. Baba, S. V. Scott, N. Mizushima, B. S. Garrison, Y. Ohsumi, and D. J. Klionsky. Apg5p functions in the sequestration step in the cytoplasm-to-vacuole targeting and macroautophagy pathways. *Mol. Biol. Cell*, 11:969–982, 2000.
- V. Gianinazzi-Pearson and S. Gianinazzi. Cellular and genetical aspects of interactions between hosts and fungal symbionts in mycorrhizae. *Genome*, 31:336–341, 1989.
- M. Glotzer, A. W. Murray, and M. W. Kirschner. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, 349:132–138, 1991.
- A. Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galiber, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnson, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Phillipsen, H. Tettelin, and S. G. Oliver. Life with 6 000 genes. *Science*, 274:546, 1996.
- M. Goll, L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H. D. Bartunik, and R. Huber. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, 386(6624):463–471, 1997.
- T. R. Graham and S. D. Emr. Compartmental organization of Golgi-specific protein modification and vacuolar protein sorting events defined in a yeast *sec18* (*nsf*) mutant. *J. Cell Biol.*, 114:207–218, 1991.
- U. Güldener, S. Heck, T. Fielder, J. Beinhauer, and J. H. Hegemann. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, 24:2519–2534, 1996.
- C. Guthrie and G. R. Fink. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. *Methods in Enzymology*, 194, 1991.
- C. R. Renfrew Haft, M. Luz Sierra, V. A. Barr, D. H. Haft, and S. I. Taylor. Identification of a family of sorting nexin molecules and characterization of their association with receptors. *Mol. Cell. Biol.*, 18(12):7278–7287, 1998.

- T. M. Harding, A. Hefner-Gravink, M. Thumm, and D. J. Klionsky. Genetic and phenotypic overlap between autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Biol. Chem.*, 271:17621–17624, 1996.
- T. M. Harding, K. A. Morano, S. V. Scott, and D. J. Klionsky. Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.*, 131:591–602, 1995.
- J. L. Harley and S. E. Smith. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, London, United Kingdom, 1983.
- P. K. Herman and S. D. Emr. Characterization of VPS34, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 10:6742–6754, 1990.
- I. Herskowitz. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.*, 52:536–553, 1988.
- D. E. Basset und D. Valle Hieter, P. The yeast genome - a common currency. *Nature Genet.*, 13:253–255, 1996.
- P. Hieter, C. Mann, M. Snyder, and R. W. Davis. Mitotic stability of yeast chromosomes: a colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss. *Cell*, 40:381–392, 1985.
- W. Hilt and D. H. Wolf. Proteasomes of the yeast *S. cerevisiae*: genes, structure and functions. *Mol. Biol. Rep.*, 21:3–10, 1995.
- W. Hilt and D. H. Wolf. Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem.*, 21:96–101, 1996.
- H. H. Hirsch, H. H. Schiffer, and D. H. Wolf. Biogenesis of the yeast vacuole (lysosome). Mutation in the active site of the vacuolar serine proteinase yscB abolishes proteolytic maturation of its 73-kDa precursor to the 41.5 kDa proenzyme and a newly detected 41-kDa peptide. *Eur. J. Biochem.*, 203:641–653, 1992.
- H. H. Hirsch, H. H. Schiffer, and D. H. Wolf. Biogenesis of the yeast vacuole (lysosome). Proteinase yscB contributes molecularly and kinetically to vacuolar hydrolase-precursor maturation. *Eur. J. Biochem.*, 207:867–876, 1992b.
- M. Hochstrasser. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.*, 30:405–439, 1996.

- I. A. Hope and K. Struhl. Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell*, 46:885–894, 1986.
- W. P. Huang, S. V. Scott, J. Kim, and D. J. Klionsky. The itinerary of a vesicle component, Aut7p/Cvt5p, terminates in the yeast vacuole via the autophagy/Cvt pathways. *J. Biol. Chem.*, 275(5845–5851), 2000.
- M. U. Hutchins and D. J. Klionsky. Vacuolar localization of oligomeric α -mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting and autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 276:20491–204918, 2001.
- Y. Ichimura, T. Kirisako, T. Takao, Y. Satomi, Y. Shimonishi, N. Ishihara, N. Mizushima, I. Tanida, E. Kominami, M. Ohsumi, and Y. Ohsumi. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408:488–492, 2000.
- S. Irniger, S. Piatti, C. Michaelis, and K. Nasmyth. Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell*, 81:269–278, 1995.
- T. Ito, K. Tashiro, S. Muta, R. Ozawa, T. Chiba, M. Nishizawa, K. Yamamoto, S. Kuhara, and Y. Sakaki. Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: a comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:1143–1147, 2000.
- P. James, J. Halladay, and E. A. Craig. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, 144:1425–1436, 1996.
- Jarvik and Botstein. Conditional-lethal mutations that suppress genetic defects in morphogenesis by altering structural proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72:2738–2742, 1975.
- S. Jentsch. The ubiquitin-conjugating system. *Annu. Rev. Genet.*, 26:179–207, 1992.
- L. M. Johnson, V. A. Bankaitis, and S. D. Emr. Distinct sequence determinants direct intracellular sorting and modification of a yeast vacuolar protease. *Cell*, 48:875–885, 1987.
- E. W. Jones, G. C. Webb, and M. A. Hiller. *Molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae*, chapter Vol III, pages 363–469. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N. Y., 1997.

- Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Komiyama, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori. LC3, a mammalian homolog of yeast Apg8, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.*, 19:5720–5728, 2000.
- Y. Kamada, T. Funakoshi, T. Shintani, K. Nagano, M. Ohsumi, and Y. Ohsumi. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.*, 150:1507–1513, 2000.
- P. M. Kane and T. H. Stevens. Subunit composition, biosynthesis, and assembly of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 24:383–393, 1992.
- L. Keegan, G. Gill, and M. Ptashne. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science*, 231:699–704, 1986.
- A. Kihara, T. Noda, N. Ishihara, and Y. Ohsumi. Two distinct Vps34 PtdIns 3-kinase complexes function in autophagy and CPY sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, 152:519–530, 2001.
- J. Kim, V. M. Dalton, K. P. Eggerton, S. V. Scott, and D. J. Klionsky. Apg7p/Cvt2p is required for the cytoplasm-to-vacuole targeting, macroautophagy, and peroxisome degradation pathways. *Mol. Biol. Cell*, 10:1337–1351, 1999.
- J. Kim, W. P. Huang, and D. J. Klionsky. Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p and the autophagy conjugation complex. *J. Cell Biol.*, 152(1):51–64, 2001a.
- J. Kim, W. P. Huang, P. E. Stromhaug, and D. J. Klionsky. Convergence of multiple autophagy and cvt- components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *J. Biol. Chem.*, October 2001b. in Press.
- J. Kim, S. V. Scott, M. N. Oda, and D. J. Klionsky. Transport of a large oligomeric protein by the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J. Cell Biol.*, 137:609–618, 1997.
- S. J. Kim, D. Bernreuther, M. Thumm, and G. K. Podila. LB-AUT7, a novel symbiosis-regulated gene from an ectomycorrhizal fungus, *Laccaria bicolor*, is functionally related to vesicular transport and autophagocytosis. *J. Bact.*, 181(6):1963–1967, 1999b.

- S. J. Kim, S. T. Hiremath, and G. K. Podila. Cloning and identification of symbiosis-regulated genes from ectomycorrhizal fungus *Laccariabicolor*. *Mycol. Res.*, 103:168–172, 1999a.
- R. W. King, R. J. Deshaies, J. M. Peters, and M. W. Kirschner. How proteolysis drives the cell cycle. *Science*, 274:1652–1659, 1996.
- T. Kirisako, M. Baba, N. Ishihara, K. Miyazawa, M. Ohsumi, T. Yoshimori, T. Noda, and Y. Ohsumi. Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J. Cell Biol.*, 147:435–446, 1999.
- T. Kirisako, Y. Ichimura, H. Okada, Y. Kabeya, N. Mizushima, Y. Yoshimori, M. Ohsumi, T. Takao, T. Noda, and Y. Ohsumi. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.*, 151:263–276, 2000.
- D. J. Klionsky, R. Cueva, and D. S. Xaver. Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J. Cell Biol.*, 119:287–299, 1992.
- D. Koshland, J. C. Kent, and L. H. Hartwell. Genetic analysis of the mitotic transmission of minochromosomes. *Cell*, 40:393–403, 1985.
- B. R. Kropp. Variable interactions between non-Mycorrhizal and ectomycorrhizal strains of the basidiomycete *Laccariabicolor*. *Mycol. Res.*, 94:412–415, 1990.
- B. R. Kropp, B. J. McAfee, and J. A. Fortin. Variable loss of ectomycorrhizal ability in monokaryotic and dikaryotic cultures of *Laccariabicolor*. *Can. J. Bot.*, 64:1224–1226, 1987.
- S. A. Kuznetsov and V. I. Gelfand. 18 kDA microtubule-associated protein: identification as a new light chain (LC-3) of microtubule-associated protein 1 (MAP-1). *FEBS Lett.*, 212:145–148, 1987.
- J. R. Lamb, W. A. Michaud, R. S. Sikorski, and P. A. Hieter. Cdc16p, CDC23p and Cdc27p form a complex essential for mitosis. *EMBO J.*, 13:4321–4328, 1994.
- U. K. Lämmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685, 1970.
- T. Lang. *Autophagocytose in der Hefe Saccharomyces cerevisiae: Klonierung und Charakterisierung der Gene AUT2, AUT7 und AUT9*. PhD thesis, Universität Stuttgart, 1998.

- T. Lang, S. Reiche, M. Straub, M. Bredschneider, and M. Thumm. Autophagy and the cvt pathway both depend on AUT9. *J. Bacteriol.*, 182(8):2125–2133, 2000.
- T. Lang, E. Schäffeler, D. Bernreuther, D. H. Wolf, and M. Thumm. Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO J.*, 17(13):3597–3607, 1998.
- B. P. Lawrence and W. J. Brown. Autophagic vacuoles rapidly fuse with preexisting lysosomes in cultured hepatocytes. *J. Cell Sci.*, 102:515–526, 1992.
- A. Legesse-Miller, Y. Sagiv, R. Gluzman, and Z. Elazar. Aut7p a soluble autophagic factor, participates in multiple membrane trafficking processes. *J. Biol. Chem.*, 275:32966–32973, 2000.
- J. Löwe, D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, and R. Huber. Crystal structure of the 20S proteasome from archeon *T. acidophilum* at 3.4 Ångström resolution. *Science*, 268:533–539, 1995.
- F. Lynen. On the structure of fatty acid synthetase of yeast. *Eur. J. Biochem.*, 112:431–442, 1980.
- S. Lyons and N. Nelson. An immunological method for detecting gene expression in yeast colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:7426–7430, 1984.
- C. Mann and W. Hilt. *The ubiquitin proteasome system in cell cycle control*, volume Proteasomes: The world of regulatory proteolysis of *In Molecular Biology Intelligence Series*. A. G. Landes Bioscience, Georgetown, Texas. USA, 2000.
- S. S. Mann and J. A. Hammarback. Molecular characterization of light chain3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J. Biol. Chem.*, 269(11492–11497), 1994.
- S. S. Mann and J. A. Hammarback. Gene localization and developmental expression of light chain3: a common subunit of microtubule-associated protein 1A (MAP1A) and MAP1B. *J. Neurosci. Res.*, 43:535–544, 1996.
- A. Matsuura, M. Tsukada, Y. Wada, and Y. Ohsumi. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 192:245–250, 1997.
- J. P. McGrath, S. Jentsch, and A. Varshavsky. Uba1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *EMBO J.*, 10:227–236, 1991.

- B. Mechler and D. H. Wolf. Analysis of proteinase A function in yeast. *Eur. J. Biochem.*, 121:47–52, 1981.
- M. D. Mendenhall and A. E. Hodge. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(4):1191–1243, 1998.
- K. G. Miller, C. M. Field, B. M. Alberts, and D. R. Kellogg. Use of actin filament and microtubule affinity chromatography to identify proteins that bind to the cytoskeleton. *Methods Enzymol.*, 196:303–319, 1991.
- N. Mizushima, T. Noda, and Y. Ohsumi. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO*, 18:3888–3896, 1999.
- N. Mizushima, T. Noda, T. Yoshimori, Y. Tanaka, T. Ishii, M. D. George, D. J. Klionsky, M. Ohsumi, and Y. Ohsumi. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*, 395:395–398, 1998a.
- N. Mizushima, H. Sugita, T. Yoshimori, and Y. Ohsumi. A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J. Biol. Cell*, 273:33889–33892, 1998b.
- N. Mizushima, A. Yamamoto, M. Hatano, Y. Kobayashi, Y. Kabeya, K. Suzuki, T. Tokuhiisa, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.*, 152:657–667, 2001.
- C. M. Moehle, R. Tizard, S. K. Lemmon, J. Smart, and E. W. Jones. Protease B of the lysosomelike vacuole of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is homologous to the subtilisin family of serine proteases. *Mol. Cell Biol.*, 7:4390–4399, 1987.
- D. Moir, S. E. Stewart, B. C. Osmond, and D. Botstein. Cold-sensitive cell-division-cycle mutants of yeast: isolation, properties and pseudoreversion studies. *Genetics*, 100:547–563, 1982.
- D. Mumberg, R. Müller, and M. Funk. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins on different genetic backgrounds. *Gene*, 156:119–122, 1995.
- A. L. Munn and H. Riezman. Endocytosis is required for the growth of vacuolar H(+)-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes. *J. Cell Biol.*, 127:373–386, 1994.

- N. Neff, J. H. Thomas, P. Grisafi, and D. Botstein. Isolation of the β -tubulin gene from yeast and demonstration of its essential function in vivo. *Cell*, 33:211–219, 1983.
- R. K. Niedenthal, L. Riles, M. Johnston, and J. H. Hegemann. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast*, 12:773–786, 1996.
- T. Noda, J. Kim, W. P. Huang, M. Baba, C. Tokunaga, Y. Ohsumi, and D. J. Klionsky. Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the cvt and autophagy pathways. *J. Cell Biol.*, 148:465–480, 2000.
- T. Noda and Y. Ohsumi. Tor, a phosphatidylinositolkinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.*, 273:3963–3966, 1998.
- S. F. Notwehr and T. H. Stevens. Sorting of membrane proteins in the yeast secretory pathway. *J. Biol. Chem.*, 269:10185–10188, 1994.
- P. C. Nowell. Foundations in cancer research. Chromosomes and cancer: the evolution of an idea. *Adv. Cancer Res.*, 62:1–17, 1993.
- M. N. Oda, S. V. Scott, A. Hefner-Gravink, A. D. Caffarelli, and D. J. Klionsky. Identification of a cytoplasm to vacuole targeting determinant in aminopeptidase I. *J. Cell Biol.*, 132:990–1010, 1996.
- V. Olsen, N. X. Cawley, J. Brandt, M. Egel-Mitani, and Y. Peng Loh. Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* yapsin 3, a new member of the yapsin family of aspartic proteases encoded by the YPS3 gene. *Biochem. J.*, 339:407–411, 1999.
- T. Orr-Weaver, J. Szostak, and R. J. Rothstein. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:6354–6358, 1981.
- Y. Paz, Z. Elazar, and D. Fass. Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p. *J. Biol. Chem.*, 275(33):25445–25450, 2000.
- M. R. Peterson, C. G. Burd, and S. D. Emr. Vac1p coordinates Rab and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in Vps45p-dependent vesicle docking/fusion at the vacuole. *Curr. Biol.*, 11:159–162, 1999.

- R. L. Peterson, Y. Piche, and C. Plenchette. Mycorrhizae and their potential use in the agricultural and forestry industries. *Biotechnol. Adv.*, 2:101–120, 1984.
- E. M. Phizicky and S. Fields. Protein-protein interactions: Methods for detection and analyses. *Microbiological Reviews*, 59(1):94–123, 1995.
- J. R. Pringle, R. A. Preston, A. E. M. Adams, T. Stearns, D. G. Drubin, B. K. Haarer, and E. W. Jones. Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol.*, 31:357–435, 1989.
- E. L. Punnonen, S. Autio, H. Kaija, and H. Reunanen. Autophagic vacuoles fuse with the prelysosomal compartment in cultured rat fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.*, 61:54–66, 1993.
- C. Ramos, J. R. Winther, and M. C. Kielland-Brandt. Requirement of the propeptide for in vivo formation of active yeast carboxypeptidase Y. *J. Biol. Chem.*, 269:7006–7012, 1994.
- D. Ratner. The interaction of bacterial and phage proteins with immobilized *Escherichiacoli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, 88:373–383, 1974.
- C. Realini, S. W. Rogers, and M. Rechsteiner. KEKE-motifs- proposed roles in protein-protein association and presentation of peptides by MHC class I receptors. *FEBS Lett.*, 348:109–113, 1994.
- S. Reiche. *Charakterisierung der Autophagocytosegene AUT9 und AUT1 in der Hefe Saccharomyces cerevisiae*. PhD thesis, Universität Stuttgart, 2001.
- D. L. Richter and J. N. Bruhn. Pinus resinosa ectomycorrhizae: seven host-fungus combinations synthesized in pure culture. *Symbiosis*, 7:211–228, 1990.
- D. L. Richter and J. N. Bruhn. Field survival of containerized red and jack pine seedlings inoculated with mycelial slurries of ectomycorrhizal fungi. *New For.*, 3:247–258, 1998.
- B. Richter-Ruoff and D. H. Wolf. Proteasome and cell cycle. Evidence for a regulatory role of the proteasome on mitotic cyclins in yeast. *FEBS Lett.*, 336: 34–36, 1993.
- B. Richter-Ruoff, D. H. Wolf, and M. Hochstrasser. Degradation of the yeast MAT α 2 transcriptional regulator is mediated by the proteasome. *FEBS Lett.*, 354:50–52, 1994.
- H. Riezman. Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis. *Cell*, 40:100–1009, 1985.

- H. Riezman. Yeast endocytosis. *Trends Cell Biol.*, 3:2773–2777, 1993.
- A. J. Rivett. Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem. J.*, 262: 10114–10119, 1993.
- C. J. Roberts, S. F. Nothwehr, and T. H. Stevens. Membrane protein sorting in the yeast secretory pathway: evidence that the vacuole may be the default compartment. *J. Cell Biol.*, 119:69–83, 1992.
- S. Rupp, H. H. Hirsch, and D. H. Wolf. Biogenesis of the yeast vacuole (lysosome). Active site mutation in the vacuolar aspartate proteinase yscA blocks maturation of vacuolar proteinases. *FEBS Lett.*, 293:62–66, 1991.
- P. Russell. Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem. Sci.*, 23(10): 399–402, 1998.
- Y. Sagiv, A. Legesse-Miller, A. Porat, and Z. Elazar. GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28. *EMBO J.*, 19:1494–1504, 2000.
- J. Sambrook, E. Fritsch, and T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Plainville, NY, 1989.
- I. Samejima and M. Yanagida. Bypassing anaphase by fission yeast cut9 mutation: requirement of cut9+ to initiate anaphase. *J. Cell Biol.*, 127(6 Pt 1):1655–1670, 1994.
- T. K. Sato, T. Darsow, and S. D. Emr. Vam7p, a SNAP-25-like molecule, and Vam3p, a syntaxin homolog, function together in yeast vacuolar protein trafficking. *Mol. Cell Biol.*, 18:5308–5319, 1998.
- E. Schäffeler. *Aufklärung der intrazellulären Funktion des Aut1 Proteins bei der Autophagocytose in der Hefe Saccharomyces cerevisiae*. PhD thesis, Universität Stuttgart, 1999.
- K. A. Schandel and D. D. Jenness. Direct evidence for ligand-induced internalisation of the yeast a-factor pheromone receptor. *Mol. Cell Biol.*, 14:7245–7255, 1994.
- P. J. Schatz, L. Pillus, F. Grisafi, F. Solomon, and D. Botstein. Two functional α -tubulin genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* encode divergent proteins. *Mol. Cell Biol.*, 6:3711–3721, 1986a.

- P. J. Schatz, F. Solomon, and D. Botstein. Genetically essential and nonessential α -tubulin genes specify functionally interchangeable proteins. *Mol. Cell Biol.*, 6:3722–3733, 1986b.
- R. Schekman. Genetic and biochemical analysis of vesicular traffic in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 4:587–592, 1992.
- R. Schekman and L. Orci. Coat proteins and vesicle budding. *Science*, 271:1526–1533, 1996.
- M. Schlumpberger, E. Schäffeler, M. Straub, M. Bredschneider, D. H. Wolf, and M. Thumm. *AUT1*, a gene essential for autophagocytosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 179:1068–1076, 1997.
- S. L. Schmid. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting. an intergrated process. *Annu. Rev. Biochem.*, 66:511–548, 1997.
- S. Schork, M. Thumm, and D. H. Wolf. Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Degradation occurs via the ubiquitin pathway. *J. Biol. Chem.*, 270:26446–26450, 1995.
- S. M. Schork, G. Bee, M. Thumm, and D. H. Wolf. Site of catabolite inactivation. *Nature*, 369:283–284, 1994.
- P. V. Schu, K. Takegawa, M. J. Fry, J. H. Stack, M. D. Waterfield, and S. D. Emr. Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast *VPS34* gene essential for protein sorting. *Science*, 260:88–91, 1993.
- S. V. Scott, J. Guan, M. U. Hutchins, J. Kim, and D. J. Klionsky. Cvt19 is a receptor for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway. *Mol. Cell*, 7:1131–1141, 2001.
- S. V. Scott, A. Hefner-Gravink, K. A. Morano, T. Noda, Y. Ohsumi, and D. J. Klionsky. Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:12304–12308, 1996.
- S. V. Scott and D. J. Klionsky. In vitro reconstitution of cytoplasm to vacuole protein targeting in yeast. *J. Cell Biol.*, 131(6 Pt 2):1727–1735, 1995.
- S. V. Scott, D. C. 3rd Nice, J. J. Nau, L. S. Weismann, Y. Kamada, I. Keizer-Gunnink, T. Funakoshi, M. Veenhuis, and D. J. Klionsky. Apg13p and Vac8p are part of a complex of phosphoproteins that are required for cytoplasm to vacuole targeting. *J. Biol. Chem.*, 275(33):25840–25849, 2000.

- D. F. Seals, G. Eitzen, N. Margolis, W. T. Wickner, and A. Price. A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:9402–9407, 2000.
- E. Seemüller, A. Lupas, D. Stock, J. Löwe, R. Huber, and W. Baumeister. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: A threonine protease. *Science*, 268:579–582, 1995.
- P. O. Seglen and P. Bohley. Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia*, 48:158–172, 1992.
- W. Seufert, B. Futcher, and S. Jentsch. Role of a ubiquitin-conjugating enzyme in degradation of s- and m-phase cyclins. *Nature*, 373:78–81, 1995.
- T. Shintani, N. Mizushima, Y. Ogawa, A. Matsuura, T. Noda, and Y. Ohsumi. Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J.*, 18:5234–5241, 1999.
- T. Shintani, K. Suzuki, Y. Kamada, T. Noda, and Y. Ohsumi. Apg2p functions in autophagosome formation on the perivacuolar structure. *J. Biol. Chem.*, 276:30452–30460, 2001.
- R. S. Sikorski and P. Hieter. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122:19–27, 1989.
- A. Simonsen, R. Lippe, S. Christoforidis, J. M. Gaullier, A. Brech, J. Callaghan, B. H. Toh, C. Murphy, M. Zerial, and H. Stenmark. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature*, 394:494–498, 1998.
- B. Singer and H. Riezman. Detection of an intermediate compartment involved in transport of α -factor from the plasma membrane to the vacuole in the yeast. *J. Cell Biol.*, 110:1991–1922, 1990.
- B. Singer-Krüger, R. Frank, F. Crausaz, and H. Riezman. Partial purification and characterization of early and late endosomes from yeast. Identification of four novel proteins. *J. Biol. Chem.*, 268:14376–14386, 1993.
- D. B. Smith and K. S. Johnson. Single-step purification of polypeptides expressed in *E. coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67:31–40, 1998.
- G. P. Smith. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228:1315–1317, 1985.

- S. E. Smith, V. Gianinazzi-Pearson, R. Koide, and J. W. G. Cairney. Nutrient transport in mycorrhizas: structure, physiology and consequences for efficiency of the symbiosis. *Plant Soil*, 159:103–113, 1994.
- S. E. Smith and D. J. Read. *Mycorrhizal symbiosis*. 2nd ed. Academic Press, London, United Kingdom, 1997.
- Z. Songyuang, S. E. Shoelson, M. Chaudhuri, G. Gish, T. Pawson, W. G. Haser, F. King, T. Robertys, S. Ratnofsky, R. J. Lechleider, B. G. Neel, R. B. Birge, J. E. Fajardo, M. M. Chou, H. Hanafusa, B. Schaffhausen, and L. C. Cantley. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell*, 72:767–778, 1993.
- A. K. Soutar and D. P. Wade. *Protein function: a practical approach. Ligand blotting. S. 55-76*. Number 55–76. IRL Press, Oxford, 1990.
- K. Sovarasteanu. *Autophagocytose in der Hefe Saccharomyces cerevisiae: Klonierung und Charakterisierung des AUT6 Gens*. PhD thesis, Unibersität Stuttgart, 2000.
- D. O. Spormann, J. Heim, and D. H. Wolf. Carboxypeptidase yscS: gene structure and function of the vacuolar enzyme. *Eur. J. Biochem.*, 197:399–405, 1992.
- J. H. Stack, W. D. De, K. Takegawa, and S. D. Emr. Vesicle mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34 Ptdlns 3-kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. *J. Cell Biol.*, 129:321–334, 1995a.
- J. H. Stack, P. K. Herman, P. V. Schu, and S. D. Emr. A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *EMBO J.*, 12: 2795–2204, 1993.
- J. H. Stack, B. Horazdowsky, and S. D. Emr. Receptor mediated protein sorting to the vacuole in yeast: roles for a protein kinase, a lipid kinase, and GTP binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 11:1–33, 1995b.
- T. Stearns. Green fluorescent protein. The green revolution. *Curr. Biol.*, 5:262–264, 1995.
- M. Straub, M. Bredschneider, and M. Thumm. *AUT3*, a serine/threonine kinase gene, is essential for autophagocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 179:3875–3883, 1997.

- L. Stryer. *Biochemie*. Spektrum Akad. Verlag, 1994.
- I. Suriapranata, U. Epple, D. Bernreuther, M. Bredschneider, K. Sovarasteanu, and M. Thumm. The breakdown of autophagic vesicles inside the vacuole depends on Aut4p. *J. Cell Sci.*, 113:4025–4033, 2000.
- K.. Suzuki, T. Kirisako, Y. Kamada, N. Mizushima, T. Noda, and Y. Ohsumi. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.*, 20(21):5971–5981, 2001.
- K. Takeshige, M. Baba, S. Tsuboi, and Y. Ohsumi. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.*, 119:301–311, 1992.
- K. Tanaka. Molecular biology of proteasomes. *Mol. Biol. Rep.*, 21:21–26, 1995.
- I. Tanida, N. Mizushima, M. Kiyooka, M. Ohsumi, T. Ueno, Y. Ohsumi, and E. Kominami. Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol. Biol. Cell*, 10:1367–1379, 1999.
- I. Tanida, E. Tanida-Miyake T. Ueno, and E. Kominami. The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J. Biol. Chem.*, 276:1701–1706, 2001.
- U. Teichert, B. Mechler, H. Müller, and D. H. Wolf. Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation and cell survival. *J. Biol. Chem.*, 264:16037–16045, 1989.
- S. R. Terlecky, H. L. Chiang, T. S. Olson, and J. F. Dice. Protein and peptide binding and stimulation of in vitro lysosomal proteolysis by the 73-kDa heat shock cognate protein. *J. Biol. Chem.*, 267:9202–9209, 1992.
- S. A. Teter, K. P. Eggerton, S. V. Scott, J. Kim, A. M. Fischer, and D. J. Klionsky. Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase. *J. Biol. Chem.*, 276:2083–2087, 2000.
- M. Thumm, R. Egner, B. Koch, M. Schlumpberger, M. Veenhuis, and D. H. Wolf. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 349:275–280, 1994.
- M. Thumm and D. H. Wolf. *Adv. Mol. Cell Biol.*, chapter From Proteasome to Lysosome: Studies on Yeast Demonstrate the Principles of Protein Degradation in the Eukaryote Cell, pages 41–67. Jai Press, Greenwich, 1998.

- J. Tooze, M. Hollinshead, T. Ludwig, K. Howell, B. Hoflack, and H. Kern. In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome. *J. Cell Biol.*, 111: 329–345, 1990.
- H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4350–4354, 1979.
- R. R. Traut, C. Casiano, and N. Zecherle. *Protein function: a practical approach*. Crosslinking of protein subunits and ligands by the introduction of disulphide bonds. p.101–103. IRL Press, Oxford, 1989.
- R. Truant, H. Xiao, C. J. Ingles, and J. Greenblatt. Direct interaction between the transcriptional activation domain of human p53 and the TATA box-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 268:2284–2287, 1993.
- M. Tsukada and Y. Ohsumi. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 333:169–174, 1993.
- D. L. Tuttle and W. J. Dunn. Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Cell Sci.*, 108:25–35, 1995.
- T. Ueno, D. Muno, and E. Kominami. Membrane markers of endoplasmic reticulum preserved in autophagic vacuolar membranes isolated from leupeptin-administered rat liver. *J. Biol. Chem.*, 266:18995–18999, 1991.
- P. Uetz, L. Giot, G. Cagney, T. A. Mansfield, R. S. Judson, J. R. Knight, D. Lockshon, V. Narayan, M. Srinivasan, and P. Pochart. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 403:623–627, 2000.
- H. B. van den Hazel, M. C. Kielland-Brandt, and J. R. Winther. Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast*, 12:1–16, 1996.
- A. Varshavsky. The N-end rule. *Cell*, 69:725–735, 1992.
- D. Voges, P. Zwickl, and W. Baumeister. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.*, 68:1015–1068, 1999.
- A. Wach, A. Brachat, R. Pohlmann, and P. Philippsen. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10:1793–1808, 1994.

- G. Waksman, D. Kominos, S. C. Robertson, N. Pant, D. Baltimore, D. Cowburn, R. B. Birge, H. Hanafusa, J. B. Mayer, M. Overduin, M. D. Resh, C. B. Rios, L. Silverman, and J. Kuriyan. Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of V-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature*, 358:646–653, 1992.
- G. Waksman, S. E. Shoelson, N. Pant, D. Cowburn, and J. Kuriyan. Binding of high affinity phosphotyrosyl peptide to the Src SH2 domain: crystal structures of the complexed and peptide-free forms. *Cell*, 72:779–790, 1993.
- C. W. Wang, J. Kim, W. P. Huang, H. Abeliovich, and P. E. Stromhaug. Apg2p is a novel protein required for the cytoplasm to vacuole targeting, autophagy, and pexophagy pathways. *J. Biol. Chem.*, 276:30442–30451, 2001.
- R. D. Water and L. D. Kleinsmith. Identification of alpha and beta tubulin in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 70:704–708, 1976.
- L. Winther and P. Soerensen. Propeptide of a carboxypeptidase Y provides a chaperon-like function as well as inhibition of the enzyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9330–9334, 1991.
- D. H. Wolf and G. R. Fink. Proteinase C (carboxypeptidase y) mutant of yeast. *J. Bacteriol.*, 123:1150–1156, 1975.
- D. H. Wolf and W. Weiser. Studies on a carboxypeptidase Y mutant of yeast and evidence for a second carboxypeptidase activity. *Eur. J. Biochem.*, 73:553–556, 1977.
- K. K. Wong, Y. Piche, and J. A. Fortin. Differential development of root colonization among four closely related genotypes of ectomycorrhizal *Laccariabicolor*. *Mycol. Res.*, 94:876–884, 1990.
- C. A. Woolford, L. B. Daniels, F. J. Park, E. W. Jones, A. J. Van, and M. A. Innis. The PEP4 gene encodes an aspartyl protease implicated in the posttranslational regulation of *Saccharomycescerevisiae* vacuolar hydrolases. *Mol. Cell Biol.*, 6: 2500–2510, 1986.
- T. Yoshihisa and Y. Anraku. A novel pathway of import of α -mannosidase, a marker enzyme of vacuolar membrane in *Saccharomycescerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 265:22418–22425, 1990.
- R. Young and R. Davis. Yeast RNA polymerase II genes: Isolation with antibody probes. *Science*, 222:778–782, 1983.

- W. Zachariae, M. Schwab, K. Nasmyth, and W. Seufert. Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science*, 282:1721–1724, 1998.
- W. Zachariae, A. Shevchenko, P. D. Andrews, R. Ciosk, M. Galova, M. J. Stark, M. Mann, and K. Nasmyth. Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins. *Science*, 274:1201–2104, 1996.
- X. F. Zhang, J. Settleman, J. M. Kyriakis, E. Takeuchi, Suzuki, S. J. Elledge, M. S. Marshall, J. T. Bruder, U. R. Rapp, and J. Avruch. Normal and oncogenic p21-ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-raf1. *Nature*, 364:303–313, 1993.
- P. Zwickl, A. Grziwa, G. Puhler, B. Dahlmann, F. Lottspeich, and W. Baumeister. Primary structure of the Thermoplasma proteasome and its implications for the structure function and evolution of the multicatalytic proteinease. *Biochemistry*, 31:964–972, 1992.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Daniela Bernreuther, geb. Schmid
Geburtsdatum: 5. Mai 1969 in Spaichingen
Eltern: Karl und Herta Schmid, geb. Zalger
verheiratet, 1 Kind

Schulbildung

1975 – 1979 Grundschule Wurmlingen
1979 – 1988 Otto-Hahn-Gymnasium Tuttlingen
1988 Abitur (Leistungskurse Mathematik und Chemie)

Ausbildung

1988 – 1990 Chemisches Institut Dr. Flad
1990 Abschluss: Chemisch Technische Assistentin (CTA)

Studium

10/1990 – 4/1997 Studium des Chemie an der Universität Stuttgart
8/1996 Diplomhauptprüfung
9/1996 – 4/1997 Diplomarbeit am Institut für Biochemie an der Universität Stuttgart. „Untersuchungen an Vesikellysemutanten der Autophagocytose.“
Abschluss: Diplom-Chemikerin
6/1997 – 6/2001 Promotion am Institut für Biochemie an der Universität Stuttgart.