

# **Mechanismus der Katabolitdegradation der Fructose-1,6-bisphosphatase: Die Funktion des Hsp70 Chaperons Ssa1 und weiterer Komponenten**

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

vorgelegt von

**Jeannette Juretschke**

geboren in Backnang

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf

Mitberichter: PD Dr. Wolfgang Hilt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.08.2009

Institut für Biochemie der Universität Stuttgart

2009

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Stuttgart, den 23.06.2009

Jeannette Juretschke

---

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dieter H. Wolf danke ich für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis, die Überlassung des interessanten und vielfältigen Themas, sowie der ständigen Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Mein herzlicher Dank gilt Antje Schäfer und Ruth Menssen-Franz. Durch die tolle Zusammenarbeit, vielfältigen Diskussionen, konstruktive Kritik und Ermutigungen wurde die Arbeit besonders beeinflusst. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Ruth Menssen-Franz und Andrea Spitzner für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen meinen Kollegen möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima am Institut danken. Besonders erwähnen möchte ich Sonja Kohlmann, Antje Schäfer, Ruth Menssen-Franz, Olivier Santt, Andrea Spitzner, Stefanie Besser, Bernhard Braun, Lise Barbin, Frederik Eisele, Sonia Barbosa, Jens Schreiner und Martin Lehmann.

Des weiteren möchte ich mich bei dem ehemaligen Diplomanden Martin Lehmann und den Forschungspraktikanten Anne Wagner, Markus Mühleis, Karsten Sammet und Sebastian Schmidt für die Unterstützung meiner Projekte bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern für ihr Verständnis für meine Arbeit, ihre Unterstützung und ihre Geduld.

---

## Veröffentlichungshinweis

Ein Teil der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurde in folgendem Artikel publiziert:

Santt, O., Pfirrmann, T., Braun, B., Juretschke, J., Kimmig, P., Scheel, H., Hofmann, K., Thumm, M., Wolf, D. H. (2008). The yeast GID complex, a novel ubiquitin ligase (E3) involved in the regulation of carbohydrate metabolism. *Mol. Biol. Cell* 19 (8), 3323-3333.

---

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	8
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>12</b>
<b>2. Abstract</b>	<b>14</b>
<b>3. Einleitung</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Proteinabbau</b>	<b>16</b>
3.1.1 Abbau von Proteinen über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)	16
3.1.2 Abbau von Proteinen über die Vakuole (Lysosom)	23
<b>3.2 Katabolitinaktivierung und -degradation der Fructose-1,6-bisphosphatase</b>	<b>24</b>
3.2.1 Übersicht über den Kohlenhydrat-Stoffwechsel	24
3.2.2 Regulation des Kohlenhydrat-Stoffwechsels	25
3.2.3 Regulation der FBPase	27
<b>3.3 Molekulare Chaperone</b>	<b>32</b>
3.3.1 Die vielfältigen Rollen der molekularen Chaperone	32
3.3.2 Übersicht über die verschiedenen Hsp-Chaperone	33
3.3.3 Hsp70-Chaperone und ihre Aufgaben	34
<b>3.4 Aufgabenstellung</b>	<b>36</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Material und Geräte</b>	<b>37</b>
4.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	37
4.1.2 Geräte	38
4.1.3 Antikörper	39
4.1.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	39
4.1.5 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	41
4.1.6 Plasmide	42
4.1.7 Oligonukleotide	45
<b>4.2 Wachstum von <i>S. cerevisiae</i>- und <i>E. coli</i>-Stämmen</b>	<b>47</b>
4.2.1 Medien	47
4.2.2 Wachstumsbedingungen	49

---

<b>4.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>51</b>
4.3.1	Herstellung von Hefestämmen	51
4.3.2	Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe	53
4.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe („plasmid rescue“)	53
4.3.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	54
4.3.5	Southern Blot Analyse	54
4.3.6	Zelltransformationen	55
4.3.7	PCR	58
4.3.8	DNA-Fällung	60
4.3.9	Agarose-Gelelektrophorese	61
4.3.10	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	61
4.3.11	Ligation von Plasmid-DNA Fragmenten	62
4.3.12	Plasmid-DNA-Sequenzierung	62
<b>4.4</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	<b>63</b>
4.4.1	Alkalische Lyse von Hefezellen	63
4.4.2	Nativer Zellaufschluss	63
4.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	64
4.4.4	Native Gele	65
4.4.5	Färben von SDS-Gelen	66
4.4.6	Western Blot	68
4.4.7	Immunodetektion von Proteinen	69
4.4.8	Immunopräzipitationsexperiment (IP)	69
4.4.9	Polyubiquitinierungsversuch	70
4.4.10	Pulse-Chase Analyse	70
4.4.11	Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	72
4.4.12	Reinigung von TAP-Fusionsproteinen	72
4.4.13	Glycerindichtegradienten-Fraktionierung	74
4.4.14	Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford	75
4.4.15	PonceauS-Färbung	75
<b>5 .</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>76</b>
<b>5.1</b>	<b>Herstellung eines FBPase-Antikörpers</b>	<b>76</b>
<b>5.2</b>	<b>Studien zum Gid-Komplex</b>	<b>77</b>
5.2.1	Stabilität des Gid-Komplexes unter gluconeogenetischen Bedingungen	77
5.2.2	Interaktionsstudien zu FBPase mit dem Gid-Komplex	80

---

<b>5.3</b>	<b>Die Rolle des Hsp70 Chaperons Ssa1 beim FBPase-Abbau</b>	<b>87</b>
5.3.1	FBPase interagiert mit Ssa1	87
5.3.2	Ssa1 ist für den Abbau der FBPase essentiell	91
5.3.3	Untersuchungen zur Löslichkeit der FBPase	95
5.3.4	Analyse der Interaktion von FBPase mit Ssa1 und Gid1/Vid30	97
5.3.5	Interaktion von Gid1/Vid30 mit Ssa-Proteinen	101
5.3.6	Ssa1 ist auch am Abbau von PEPCK beteiligt	102
5.3.7	Einfluss verschiedener Co-Faktoren auf den Abbau der FBPase	103
<b>5.4</b>	<b>Studien zu den Phosphorylierungsstellen der FBPase</b>	<b>107</b>
5.4.1	Potentielle Phosphorylierungsstellen der FBPase	107
5.4.2	Einfluss der Punktmutationen S11A und S281A auf den FBPase-Abbau	111
5.4.3	Studien zu den Phosphorylierungsstellen der FBPase	113
5.4.4	Studien zu den Phosphorylierungsstellen der FBPase mittels nativer Gelelektrophorese	114
5.4.5	Identifikation weiterer Phosphorylierungsstellen in FBPase und FBPase-S11A mittels massenspektrometrischer Analyse	117
<b>5.5</b>	<b>Studien zum N-Terminus der FBPase</b>	<b>122</b>
5.5.1	Einfluss der N-terminalen Punktmutation FBP1-P1S auf den Abbau der FBPase	122
5.5.2	Verhalten von FBPase-P1S im nativen Gel	123
5.5.3	Einfluss der Punktmutation FBPase-P1S auf die Interaktion von FBPase mit dem Gid-Komplex und Ssa1	124
5.5.4	Befindet sich am N-Terminus der FBPase ein Degron?	128
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>133</b>
<b>6.1</b>	<b>FBPase und ihre Phosphorylierungsstellen</b>	<b>133</b>
<b>6.2</b>	<b>Der N-Terminus der FBPase</b>	<b>137</b>
<b>6.3</b>	<b>Studien zum Gid-Komplex und FBPase</b>	<b>139</b>
<b>6.4</b>	<b>Die Funktion des Hsp70 Chaperons Ssa1 beim Abbau der FBPase</b>	<b>140</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>146</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>158</b>

---

## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
A	Alanin
Abb.	Abbildungen
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
Apel	Aminopeptidase1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BAG	engl. „ <u>B</u> cl-2- <u>a</u> ssociated <u>a</u> thanogene“
bp	Basenpaare
BSA	engl. „ <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin“
CHIP	engl. „ <u>c</u> haperone <u>i</u> nteracting <u>p</u> rotein“
CM	engl. „ <u>c</u> omplete <u>m</u> edium“ (synthetisches Vollmedium)
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
CPY	Carboxypeptidase yscY
CPY*	CPY <sup>G255R</sup>
CTG*	CPY*-Transmembrandomäne-GFP
Da	Dalton
ddH <sub>2</sub> O	zweifach deionisiertes Wasser
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat (N = Adenosin, Cytidin, Guanosin, Thymidin)
DTT	1,4-Dithiothreitol
DUB	Deubiquitinierungsenzym
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Protein Ligase
ECL	engl. „ <u>e</u> nhanced <u>c</u> hemol <u>u</u> minescence“
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure



---

ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
g	Erdbeschleunigung
GFP	engl. „green fluorescent protein“
Gid	engl. „glucose induced degradation deficient“
Glc	Glucose
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Haemagglutinin
HECT	engl. „homologous to E6-AP C terminus“
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF	engl. „hypoxia inducible factor“
HOAc	Essigsäure
HOP	engl. „hsp organizing protein“
HRPO	engl. „horse radish peroxidase“
Hsc	engl. „heat shock cognate“ (Hitzeschockprotein-verwandt)
Hsp	engl. „heat shock protein“ (Hitzeschockprotein)
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<i>K. l.</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
LB	Luria-Bertani-Medium
Leu2	cytosolische $\beta$ -Isopropylmalat-Dehydrogenase
LiOAc	Lithiumacetat
MCS	engl. „multiple cloning site“
MDH	Malatdehydrogenase
MeOH	Methanol
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
n	nano
NaOAc	Natriumacetat
NEF	engl. „nucleotide exchange factor“

---

OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm
ODC	Ornithin-Decarboxylase
ODD	engl. „ <u>o</u> xygen- <u>d</u> e <u>p</u> endent <u>d</u> egradation“
ORF	engl. „ <u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame“ (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	engl. „ <u>p</u> hosphate <u>b</u> uffer <u>s</u> aline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PGK	3-Phosphoglyceratkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
RING	engl. „ <u>r</u> eally <u>i</u> nteresting <u>n</u> ew <u>g</u> ene“
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease
S	Serin
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SCF	engl. „ <u>S</u> kp1- <u>C</u> ul- <u>F</u> -box“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SGD	engl. „ <u>S</u> accharomyces <u>g</u> enome <u>d</u> atabase“
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat mit EDTA
TAP	engl. „ <u>t</u> andem <u>a</u> ffinity <u>p</u> urification“
TBS	engl. „ <u>T</u> ris <u>b</u> uffered <u>s</u> aline“
TBS-T	engl. „ <u>T</u> ris <u>b</u> uffered <u>s</u> aline with <u>T</u> ween 20“
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris mit EDTA
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethan-1,2-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
Triton X-100	Polyethylenglycol-[4- (1,1,3,3-tetramethylbutyl) phenyl]-ether
ts	temperatursensitiv
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	Units
Ub	Ubiquitin
UBL	engl. „ <u>u</u> biquitin- <u>l</u> ike domain“
UBP	Ubiquitin-spezifische Protease

---

UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
Vid	engl. „ <u>v</u> acuole <u>i</u> mport and <u>d</u> egradation“
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
YPD	engl. „ <u>y</u> east <u>p</u> eptone <u>d</u> extrose“ (Glucose-Vollmedium)
β-ME	2-Mercaptoethanol
Δss	Deletion der Signalsequenz
μ	Mikro

## 1 . Zusammenfassung

Glucose ist ein wichtiger Nährstoff für die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Sie wird über die Glykolyse in Energie und zelluläre Bausteine umgesetzt. Gleichzeitig ist Glucose ein Signalmolekül. Steht den Zellen keine Glucose zur Verfügung, so wird diese über die Gluconeogenese synthetisiert. Glykolyse und Gluconeogenese sind antagonistische Stoffwechselwege. Sie werden reziprok reguliert, um u.a. die Verschwendung von ATP durch gleichzeitig stattfindende, gegenläufige Prozesse zu vermeiden. Eines der Schlüsselenzyme der Gluconeogenese ist die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), die bei Wachstum der Zellen auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen, wie beispielsweise Ethanol, exprimiert wird. Nach dem Überführen der Zellen in glucosehaltiges Medium wird FBPase nicht mehr benötigt, sie wird inaktiviert und abgebaut. Die sogenannte Katabolitinaktivierung der FBPase beinhaltet die Repression des *FBP1* Gens, die reversible Phosphorylierung am Serinrest 11 der FBPase, die zur Reduktion der Enzymaktivität führt sowie die allosterische Inhibition durch Fructose-2,6-bisphosphat und AMP. Auf die Katabolitinaktivierung folgt die Degradation des Enzyms.

In einem genomweiten Screen und früheren Studien wurden insgesamt 9 *GID* (engl. „glucose induced degradation deficient“) Gene identifiziert, deren Deletion zur Stabilisierung der FBPase nach Überführen von ethanol- zu glucosehaltigem Medium führt. Die Proteine werden als *Gid1* bis *Gid9* bezeichnet. Sechs der neun *Gid*-Proteine bilden den sogenannten *Gid*-Komplex, eine E3 Ligase. Er ist unter glykolytischen wie auch gluconeogenetischen Bedingungen aus den Untereinheiten *Gid1/Vid30*, *Gid2*, *Gid5/Vid28*, *Gid7*, *Gid8* und *Gid9* aufgebaut. Nach Glucosegabe zu Zellen, die unter gluconeogenetischen Bedingungen gewachsen sind, wird das Protein *Gid4/Vid24* exprimiert. Es wird Teil des Komplexes und initiiert die Polyubiquitinierung und damit den Abbau der FBPase. *Gid2* enthält eine degenerierte RING-Finger-Domäne, die für die Ligaseaktivität des Komplexes notwendig ist. Mit Hilfe der Enzymkaskade E1 (*Uba1*), E2 (*Gid3/Ubc8*) und E3 (*Gid*-Komplex) wird FBPase polyubiquitiniert und dann über das 26S-Proteasom abgebaut.

Zur selektiven Detektion der FBPase wurde ein spezifischer Antikörper gewonnen, der dann in den folgenden Experimenten zum Nachweis der FBPase eingesetzt werden konnte. Bei den Studien zum *Gid*-Komplex wurde die Rolle von *Gid7* näher untersucht, da dieses Protein sechs WD40-Domänen (Protein-Protein-Interaktionsdomänen) enthält und eine zentrale Komponente sein könnte, die den *Gid*-Komplex zusammenhält. Mit Hilfe von Glycerindichtegradientenzentrifugations-Experimenten zeigte sich, dass die Deletion von *GID7* nicht zum Zerfall des *Gid*-Komplexes führt, *Gid7* muss eine andere Rolle spielen. Eine direkte Beteiligung des *Gid*-Komplexes am Abbau der FBPase konnte mit Co-Immunopräzipitationsexperimenten (Co-IP) zwischen FBPase und *Gid1*-HA<sub>3</sub> gezeigt werden. Durch

Co-IPs in *gid7Δ* und *gid8Δ* Stämmen zeigte sich, dass Gid7 bzw. Gid8 nicht die direkten Interaktionspartner von FB Pase im Gid-Komplex sind.

Um weitere Interaktionspartner von FB Pase zu identifizieren und den Abbau des Enzyms besser zu verstehen, wurden Proteinreinigungen mit FB Pase-TAP durchgeführt. Hierbei wurde das Hsp70 Chaperon Ssa1 als neuer Interaktionspartner unter gluconeogenetischen Bedingungen wie auch nach Glucosegabe identifiziert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Ssa1 für die Polyubiquitinierung und den daraufhin induzierten Abbau der FB Pase essentiell ist. Ssa1 wird nicht dafür benötigt, FB Pase löslich zu halten. FB Pase interagiert immer mit Ssa1, wobei Ssa1 die Interaktion von FB Pase zur E3 Ligase, dem Gid-Komplex, vermittelt. Im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* ist Ssa1 unter restriktiven Bedingungen (37 °C) inaktiv; dadurch ist nach Glucosegabe die Interaktion von FB Pase zur E3 Ligase gestört und somit keine Polyubiquitinierung von FB Pase mehr möglich. Untersucht man die Situation von der Gid-Komplex Seite aus, dann interagieren Ssa-Proteine unter gluconeogenetischen Bedingungen und wahrscheinlich auch nach Glucosegabe mit dem Gid-Komplex. Ssa1 ist nicht nur am Abbau von FB Pase, sondern auch am Abbau von PEPCK, einem weiteren Schlüsselenzym der Gluconeogenese, beteiligt. Für die ATPase-Funktion von Hsp70 Chaperonen werden Co-Faktoren benötigt. Hier konnte die Beteiligung des NEFs (engl. „nucleotide exchange factor“) Snl1 am katabolitinduzierten Abbau der FB Pase gezeigt werden. Weitere untersuchte Faktoren haben keinen Einfluss.

Nach Glucosezugabe wird FB Pase am Aminosäurerest S11 phosphoryliert. In mehreren Studien wurden weitere Phosphorylierungsstellen postuliert. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe verschiedener Programme potentielle Phosphorylierungsstellen bestimmt und die sehr wahrscheinliche Phosphorylierungsstelle S281 in der FB Pase mutiert. Dies hatte überraschenderweise keinen Einfluss auf den Abbau der FB Pase. Mittels nativer Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass FB Pase als auch das mutierte Protein FB Pase-S11A schon unter gluconeogenetischen Bedingungen in zwei Formen vorliegen, vermutlich einer phosphorylierten und einer unphosphorylierten Form. Durch massenspektrometrische Analyse wurden die Phosphorylierungsstellen von FB Pase und FB Pase-S11A identifiziert.

Die N-terminale Aminosäure Prolin der FB Pase ist essentiell für ihre Polyubiquitinierung und den Abbau über das Proteasom. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in einer mutierten FB Pase-P1S die Interaktion zum Gid-Komplex, der E3 Ligase, und auch zu Ssa1 erhalten bleibt. Die mangelnde Ubiquitinierung von FB Pase-P1S ist nicht auf die fehlenden Interaktionen zurückzuführen. Die Frage, ob sich am N-Terminus der FB Pase ein Degron (Abbausignal) befindet, konnte nicht vollständig geklärt werden. FB Pase ist unter Standardbedingungen kein Substrat des „N-end rule“-Abbauweges, und die Phosphorylierung am Serinrest 11 ist nicht vom N-terminalen Prolinrest abhängig.

## 2 . Abstract

Glucose is the main carbon source of many cells. Its consumption via glycolysis provides energy and generates building blocks for the cellular metabolism. Apart from that glucose acts as a signal molecule. When glucose is lacking, cells are able to regenerate this sugar via gluconeogenesis. Glycolysis and gluconeogenesis are antagonistic pathways and they are reciprocally controlled to prevent an ongoing futile cycle of ATP hydrolysis. One of the key enzymes of gluconeogenesis is fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase). FBPase is expressed when cells grow on a non-fermentable carbon source like ethanol. After addition of glucose FBPase synthesis is repressed, the enzyme is rapidly inactivated, polyubiquitinated and degraded. The so-called catabolite inactivation of FBPase encompasses repression of the *FBP1* gene, decrease of the enzyme activity upon phosphorylation at serine residue 11 and allosteric inhibition by fructose-2,6-bisphosphate and AMP. Subsequently, FBPase undergoes rapid degradation.

In a genome-wide screen and in some earlier studies nine *GID* (glucose induced degradation deficient) genes were identified. Deletion of these genes leads to stabilization of FBPase upon shift to glucose. Under gluconeogenic conditions six Gid proteins (Gid1/Vid30, Gid2, Gid5/Vid28, Gid7, Gid8 and Gid9) form a complex which represents a ubiquitin ligase. Gid2 contains a degenerated RING finger domain and bears ligase activity. Upon glucose addition to gluconeogenic cells a seventh subunit Gid4/Vid24 occurs and initiates FBPase polyubiquitination and its subsequent elimination by the proteasome. Polyubiquitination of FBPase takes place by the classical enzyme cascade E1 (Uba1), E2 (Gid3/Ubc8) and E3 (Gid complex).

In this work a specific FBPase antibody was obtained which was used for immunoprecipitation and immunodetection of FBPase. The role of Gid7 was analyzed because it contains six WD40 domains (protein protein interaction domains) and was expected to be a central component of the Gid complex. Glycerol density gradient fractionation under gluconeogenic conditions revealed that deletion of *GID7* did not result in breakdown of the complex. Gid7 must play another role. An involvement of the Gid complex in the degradation of FBPase was shown by co-immunoprecipitation (Co-IP) experiments between FBPase and Gid proteins. Co-IPs in *gid7Δ* and *gid8Δ* strains showed that Gid7 and Gid8 are not direct interaction partners of FBPase in the Gid complex.

To understand the degradation of FBPase in more detail protein purification using a FBPase-TAP fusion protein was performed under gluconeogenic conditions and after shift to glucose-containing medium. Mass spectrometry analysis identified the Hsp70 chaperone Ssa1 as a

novel interaction partner of FBPase under both conditions. Ssa1 is crucial for polyubiquitination and degradation of FBPase. Ssa1 is not necessary for keeping FBPase in a soluble state. Ssa1 and even inactive Ssa1-45 proteins are stable interaction partners of FBPase. Ssa1 mediates the interaction of FBPase to the Gid complex, the E3 ligase. In *ssa1-45<sup>ts</sup>* cells under restrictive conditions (37 °C) FBPase loses contact to its E3 after shift to glucose-containing medium. Therefore polyubiquitination of FBPase is no longer possible. Additionally a pull-down of the Gid complex showed that Ssa proteins interact with this complex under gluconeogenic conditions and probably after shift to glucose-containing medium. Furthermore Ssa1 is also involved in degradation of PEPCK, another key regulatory enzyme of gluconeogenesis. The specificity and activity of Hsp70 chaperones is often regulated by co-factors. Several Ssa1 co-chaperones were tested but it seems that only the NEF (nucleotide exchange factor) Snl1 is involved in degradation of FBPase.

After addition of glucose to gluconeogenic cells FBPase is phosphorylated at serine residue 11 which leads to decrease of the enzymatic activity. In some studies further phosphorylation sites were postulated. In this work several programs were used to predict phosphorylation sites. The highly potential site S281 was mutated in FBPase but surprisingly, the mutation had no effect on degradation of FBPase. Studies using native gel electrophoresis revealed that FBPase and FBPase-S11A exist in two forms under gluconeogenic conditions, probably in a phosphorylated and a non-phosphorylated form. The phosphorylation sites of FBPase and FBPase-S11A were identified by mass spectrometry analysis.

The N-terminal residue proline of FBPase is crucial for polyubiquitination and degradation by the proteasome. Here it was shown that FBPase-P1S still interacts with the Gid complex, the E3 ligase, and the chaperone Ssa1. The question if FBPase contains an N-degron (degradation signal) could not be answered. This work shows that under growth conditions used here FBPase is not a substrate of the N-end rule degradation pathway and that phosphorylation at serine 11 of FBPase does not depend on the N-terminal proline.

## 3 . Einleitung

### 3.1 Proteinabbau

Die Synthese und der Abbau (Proteolyse) von Proteinen in der Zelle befinden sich in einem dynamischen Gleichgewicht. Dadurch erfolgt die Anpassung der Zelle an sich ständig ändernde Umweltbedingungen, was essentiell für das Überleben ist. Die intrazelluläre Proteolyse ist einerseits ein wichtiger Kontrollmechanismus der Zelle, um gezielt Proteine zu beseitigen, deren biologische Funktion nicht mehr benötigt wird oder die durch Stress-einflüsse funktionsunfähig geworden sind, und andererseits dient sie der Rückgewinnung von Aminosäuren. Da ein unkontrollierter Proteinabbau die Gefahr der Schädigung von Zellfunktionen birgt, muss dieser Prozess streng reguliert und hoch selektiv ablaufen. Der Abbau von Proteinen kann einerseits in der Vakuole (Lysosom) stattfinden, ein Kompartiment das unspezifisch agierende Proteasen enthält, andererseits über das Proteasom. Der Abbau über das Proteasom ist selektiv, er benötigt in der Regel eine Markierung des abzubauenen Proteins mit dem Polypeptid Ubiquitin durch eine Enzym-Kaskade (Hilt and Wolf, 1996; Wolf and Hilt, 2004).

#### 3.1.1 Abbau von Proteinen über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Proteasomen sind Proteinase-Komplexe, die aus vielen Untereinheiten zusammengesetzt sind und polyubiquitinierte Substrate degradieren (Heinemeyer *et al.*, 1991). Sie sind im Cytoplasma (20 %) sowie im Zellkern (80 %) lokalisiert (Enenkel *et al.*, 1998,1999). Das 26S-Proteasom besteht aus dem proteolytisch aktiven 20S-Proteasom, einem zylindrischen Kernpartikel, und zwei regulatorischen 19S-Partikeln, die sich an beiden Enden des Zylinders befinden (Abb. 1). Es hat eine molekulare Masse von 2,4 MDa (Hilt and Wolf, 1996; Pickart and Cohen, 2004; Schmidt *et al.*, 2005). Die Bezeichnungen 19S, 20S und 26S beziehen sich auf die Sedimentationskonstanten der einzelnen Partikel in Svendberg-Einheiten. Proteasomen erfüllen in der Zelle eine Vielzahl essentieller Funktionen. Dazu gehören beispielsweise die Kontrolle des Metabolismus durch Abbau von regulatorischen Enzymen, die Proteolyse falsch gefalteter, lumenaler Proteine des Endoplasmatischen Retikulums (ER) sowie die Beteiligung an der Zellzykluskontrolle (Glutzer *et al.*, 1991; Nasmyth, 1993; Richter-Ruoff and Wolf, 1993; Wolf and Hilt, 2004). Die Proteolyse verläuft schnell und ermöglicht dadurch der Zelle, die Menge eines bestimmten Substrats rasch zu

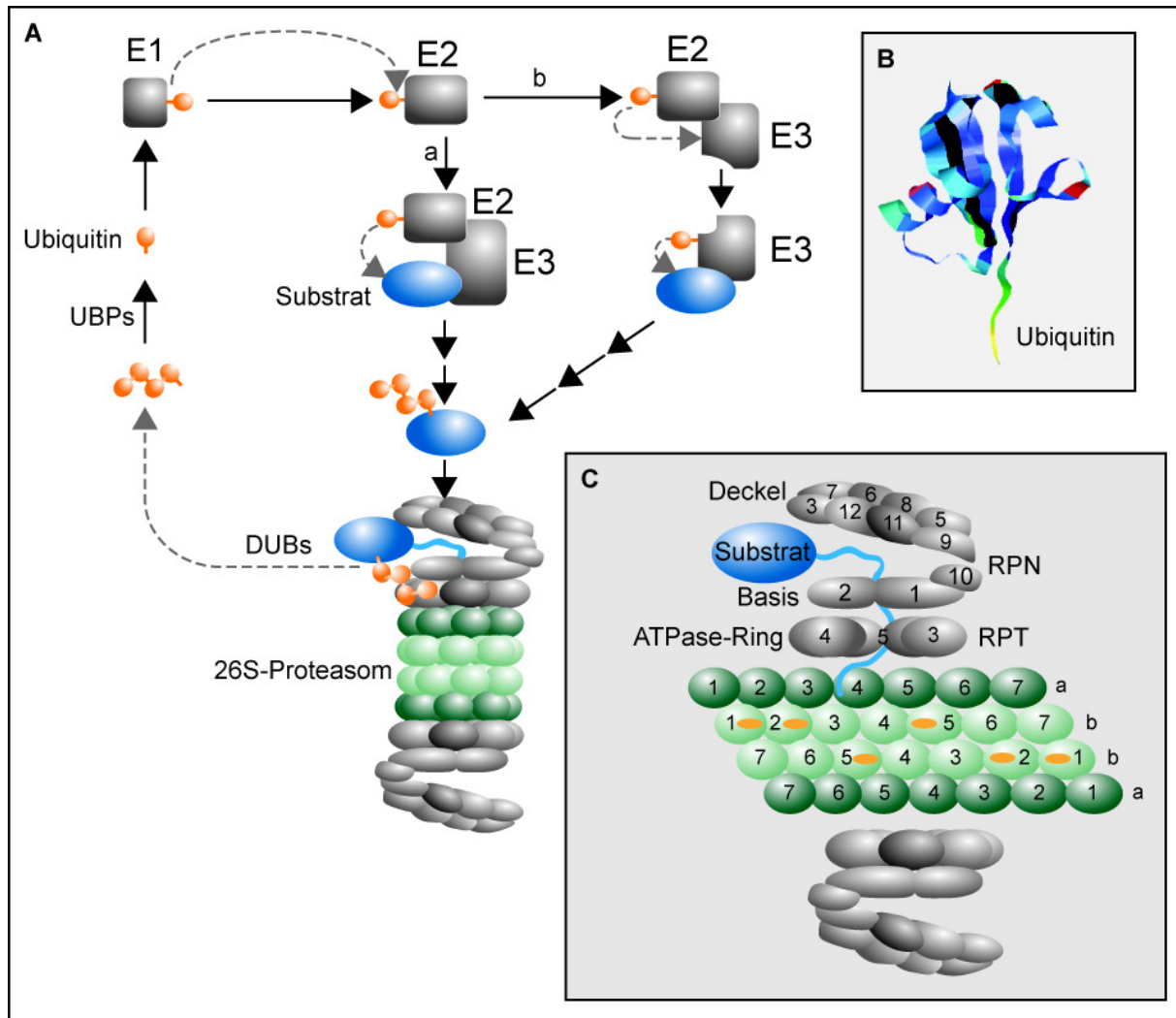


reduzieren. Außerdem ist der Proteinabbau irreversibel, dies führt letztendlich zu einem vollständigen Verlust der Funktion.

### Das 20S-Proteasom

Das 20S-Proteasom wurden in allen bisher untersuchten Eukaryontenzellen gefunden. Es hat eine molekulare Masse von etwa 700 kDa, sein Hohlzylinder besteht aus vier übereinander gestapelten Ringen (schematische Struktur siehe Abb. 1C). Röntgenstrukturanalysen des 20S-Proteasoms der Hefe *S. cerevisiae* haben gezeigt, dass das eukaryontische 20S-Proteasom eine Dimerstruktur aus 2 identischen Subkomplexen mit je 7 verschiedenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten bildet. Die  $\beta$ -Untereinheiten Pup1, Pre2 und Pre3 verleihen dem Proteasom seine katalytische Aktivität (Hilt and Wolf, 1996; Groll *et al.*, 1997; Heinemeyer *et al.*, 1997). Die N-terminalen Reste der  $\alpha$ -Untereinheiten verschließen sozusagen den 20S-Zylinder, sie verhindern den unspezifischen Zutritt von Proteinen (Groll *et al.*, 2000; Bajorek and Glickman, 2004; Wolf and Hilt, 2004). Sämtliche Untereinheiten des 20S-Proteasoms sind für das Überleben der Zelle essentiell. Die Quartärstruktur des im Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* gefundenen 20S-Proteasoms weist eine große Ähnlichkeit zum eukaryontischen 20S-Proteasom auf. Allerdings liegen hier je 7 identische  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten vor. Der Hohlzylinder teilt sich in drei Hohlräume, wobei der innere Hohlraum 14 proteolytisch-aktive Zentren enthält (Löwe *et al.*, 1995).

Das 20S-Proteasom gehört zu den Threonin-Proteasen. Der N-terminale Threoninrest der  $\beta$ -Untereinheiten katalysiert als Nucleophil die Hydrolyse von Peptidbindungen (Heinemeyer *et al.*, 2004). Die zylindrische Struktur enthält je zwei Kopien drei verschiedener katalytischer Untereinheiten, die unterschiedliche peptidspaltende Aktivitäten aufweisen. Sie spalten an der Carboxylseite saurer (Peptidylglutamyl-peptid-hydrolysierende Aktivität), basischer (tryptische Aktivität) und hydrophober Aminosäuren (chymotryptische Aktivität). Weiterhin schneiden sie an verzweigten und kleinen hydrophoben Aminosäuren (Wilk und Orłowski, 1983; Kisselev *et al.*, 2006). *In vivo* können 20S-Proteasomen alleine nur den ATP-unabhängigen Abbau bestimmter denaturierter und oxidierter Proteine katalysieren (Orłowski und Wilk, 2000).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Polyubiquitinierung eines Substrats, die zum Abbau über das Proteasom führt.** (A) Das Substrat wird mittels der Enzyme E1, E2 und E3 mit Ubiquitinketten markiert. Zunächst wird Ubiquitin über eine Thioesterbindung mit dem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1) verknüpft, dann wird das aktivierte Ubiquitin über eine Thioesterbindung an das E2 gebunden. Im nächsten Schritt erfolgt die Markierung des Substrats mit Ubiquitin über eine Isopeptidbindung. Im Weg (a) wird das Ubiquitin direkt vom E2 Enzym auf das Substrat übertragen, die RING-Ligase (E3) vermittelt und katalysiert diesen Schritt. Bei Weg (b) erfolgt die Ubiquitinierung direkt über eine HECT-Ligase (E3), der Ubiquitinrest wird vom E2 Enzym auf die E3 Ligase und dann auf das Substrat übertragen. Sogenannte DUBs (Deubiquitinierungsenzyme) spalten die Polyubiquitinkette der polyubiquitinierten Proteine am Proteasom ab, UBPs (Ubiquitin-spezifische Proteasen) zerlegen die Kette in die einzelnen, wieder verwertbaren Ubiquitinmoleküle. (B) Kristallstruktur von Ubiquitin. (C) Das 26S-Proteasom besteht aus je einem Deckel, einer Basis sowie einem ATPase-Ring auf beiden Seiten des Zylinders und einem zylinderförmigen Hauptteil (grün markiert). Die katalytischen Zentren sind orange markiert. Rpt: „regulatory particle triple A protein“; Rpn: engl. „regulatory particle non-ATPase“. Modifizierte Abbildung aus Wolf und Hilt (2004).

## Der regulatorische 19S-Komplex und das 26S-Proteasom

Die *in vivo*-Substrate der 26S-Proteasomen sind in der Regel gefaltete sowie fehlgefaltete Proteine, die vorher durch Polyubiquitinketten markiert wurden. Zu den bekannten Substraten in Hefe gehören unter anderem die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), der Mat $\alpha$ 2 Repressor, eine fehlgefaltete Form der Carboxypeptidase (CPY\*) und verschiedene Zellzyklusregulatoren (Wolf and Hilt, 2004).

Die an beiden Seiten des 20S-Kernpartikels assoziierten 19S-Partikel übernehmen die Erkennung, Bindung und Entfaltung der markierten Substratproteine. Das 19S-Partikel mit ca. 1 MDa besteht aus 20 Untereinheiten, es besteht aus einem Deckel und einer Basis (Abb. 1C). Die Basis enthält 6 funktionelle ATPase Untereinheiten, Rpt1-Rpt6 (Rpt: engl. „regulatory particle triple A protein“) und die Proteine Rpn1, Rpn2 und Rpn13 (Rpn: engl. „regulatory particle non-ATPase“). Die 6 ATPasen bilden einen Ring über der Öffnung des 20S-Proteasoms und katalysieren über ATP-Hydrolyse die Entfaltung der Substrate und ihre Translokation in das 20S-Proteasom. Die Untereinheit Rpn10 verknüpft die Basis mit dem Deckel, der die Proteine Rpn3-Rpn9, Rpn11, Rpn12 und Rpn15 enthält (Glickman *et al.*, 1998; Glickman *et al.*, 2000; Glickman and Ciechanover, 2002; Schmidt *et al.*, 2005; Hanna and Finley, 2007). Die verschiedenen Untereinheiten haben vielfältige Aufgaben, sie binden polyubiquitinierte Substrate, spalten Ubiquitinketten ab, entfalten die Proteine und bringen sie in das 20S-Proteasom zu den katalytischen Zentren, wo die Substrate zu Peptiden abgebaut werden. Beispielsweise binden Rpn1 und Rpn10 Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnliche Proteine (Elsasser, 2002; Elsasser *et al.*, 2004; Verma *et al.*, 2004). Rpn13 bindet ebenfalls Ubiquitin durch seine „Pleckstrin“-homologe Domäne (Husnjak *et al.*, 2008; Schreiner *et al.*, 2008). Rpn11 deubiquitiniert Proteine vor ihrem Abbau über das Proteasom (Verma *et al.*, 2002; Guterman and Glickman, 2004). Rpt2 ist an der Öffnung der  $\alpha$ -Ring-Pore beteiligt und Rpt5 ist für die Erkennung und wahrscheinlich auch für die Bindung der Polyubiquitinketten an Proteinen zuständig (Glickman *et al.*, 2000; Kohler *et al.*, 2001; Lam *et al.*, 2002; Pickart *et al.*, 2004; Wolf and Hilt, 2004; Raasi and Wolf, 2007). Auch die meisten Untereinheiten des 19S-Komplexes sind essentiell (Wolf and Hilt, 2004).

Der Abbau von einigen wenigen Substraten über das 26S-Proteasom kann aber auch ohne vorherige Polyubiquitinierung stattfinden. Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist die Ornithin-Decarboxylase (ODC) (Hoyt and Coffino, 2004). ODC besitzt verschiedene Erkennungsstellen für das Proteasom. Durch den Faktor „Antizyme 1“ wird die Affinität von ODC zum Proteasom um das Achtfache erhöht. Der Abbau wird durch einen negativen „Feedback-Loop“ der Reaktionsprodukte der ODC reguliert (Zhang *et al.*, 2003; Hoyt and Coffino, 2004).

## **Signale, die zum Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System führen**

Bevor ein Substrat für den Abbau über das Proteasom mit Ubiquitinketten markiert werden kann, muss es zunächst erkannt werden. Der Abbau eines Proteins wird über sogenannte Degrons (Abbausignale) vermittelt. Als Degron wird die Peptidsequenz bezeichnet, die mindestens notwendig ist, um von einer Proteolyse-Maschinerie erkannt zu werden. Eine bedeutende Eigenschaft der Degrons ist, dass sie übertragbar sind. Die Aktivität eines Degrons wird durch post-translationale Modifikationen wie Phosphorylierungen, Hydroxylierungen und proteolytische Abspaltung eines Proteinfragments oder auch strukturelle Eigenschaften bestimmt (Übersicht in Ravid and Hochstrasser, 2008).

Im Ubiquitin-abhängigen „N-end rule“-Abbauweg wird die Lebensdauer eines Proteins von seiner N-terminalen Aminosäure bestimmt (Bachmair *et al.*, 1986). Die Aminosäuren werden in solche unterteilt, die einem Protein Lang- oder Kurzlebigkeit vermitteln. Ein N-Degron, ein N-terminales Degron, besteht aus einem destabilisierenden aminoterminalen Rest und einem internen Lysin-Rest für die Polyubiquitinierung (Varshavsky, 1997). Phospho-Degrons werden durch die Phosphorylierung an spezifischen Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Resten aktiviert, wodurch sie von E3 Ligasen erkannt werden.

Es gibt auch Sauerstoff-abhängige Degrons. Die meisten Eukaryontenzellen passen sich kontinuierlich an schwankende Sauerstoffkonzentrationen an. In Säuger- und Hefezellen wurden Transkriptionsfaktoren identifiziert, die für das Wachstum und das Überleben der Zellen bei reduziertem Sauerstoffgehalt nötig sind (Emerling and Chandel, 2005). Beispielsweise ist in Säugerzellen bei Hypoxie (Sauerstoffmangel im Gewebe) ein Komplex aus mehreren HIF-Proteinen (HIF: engl. „hypoxia inducible factor“) an der Transkription benötigter Gene beteiligt. Steht den Zellen wieder ausreichend Sauerstoff zur Verfügung, so werden die HIF-1 $\alpha$ -Untereinheiten des Komplexes an einem oder zwei Prolin-Resten hydroxyliert und an einem Lysin-Rest acetyliert. Diese Reste befinden sich in der ODD-Domäne (ODD: engl. „oxygen-dependent degradation“). Die Prolin-Hydroxylierung erzeugt eine Bindungsstelle für die E3 Ligase. Für die Substraterkennung ist das von Hippel-Lindau (VHL)-Tumor-Suppressor-Protein als Teil des Ligase-Komplexes zuständig (Semenza, 2001; Kaelin, 2002; Lee *et al.*, 2004; Kaelin, 2005).

Degrons werden auch von Chaperonen erkannt. Zum Beispiel werden unstrukturierte Bereiche eines Proteins durch Hsp70 und Hsp90 erkannt, die Ligase CHIP führt dann zur Polyubiquitinierung des Proteins (siehe Kap. 3.3). Fehlgefaltete Proteine des sekretorischen Weges enthalten ebenfalls strukturelle Abbausignale. Des weiteren enthalten kurzlebige Proteine häufig sogenannte PEST-Degrons, dies sind hydrophile Sequenzen mit mindestens 12 Aminosäuren in der Länge, die reich an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und

Threonin (T) sind (Rogers *et al.*, 1986; Rechsteiner and Rogers, 1996; Pal *et al.*, 2007). Sogenannte „destruction boxes“ sind ein weiteres Abbausignal das in Cyclinen vorkommt (Glutzer *et al.*, 1991).

### **Das Ubiquitin-System**

Das zur Zeit am besten untersuchte Signalvermittlungssystem für den Protein-Abbau über das Proteasom ist das Ubiquitin-System. Ubiquitin ist ein Polypeptid, das aus 76 Aminosäuren besteht. Es kommt in allen Eukaryontenzellen vor. In Prokaryonten, wie z.B. in *E. coli*, konnte es nicht nachgewiesen werden. Die Aminosäuresequenz des Ubiquitins ist hoch konserviert, das humane Ubiquitin unterscheidet sich von dem der Hefe *S. cerevisiae* in lediglich 3 der 76 Aminosäuren. Ubiquitin ist an grundlegenden zellulären Vorgängen, wie der Steuerung des Zellzyklus, der Reparatur der DNA, der Stressantwort, der Biogenese bestimmter Zellorganellen und der Regulation des Metabolismus beteiligt (Hershko and Ciechanover, 1998; Hershko, 2005). Dem entsprechend führt ein Defekt im Ubiquitin-System zu schweren Störungen in der Zelle.

Ist nun ein Degron erkannt worden, dann wird das abzubauen Protein durch Anhängen von Ubiquitinketten unter ATP-Verbrauch für den Abbau über das 26S-Proteasom markiert. Katalysiert wird dieser Vorgang durch ein komplexes Enzym-System. Dies besteht aus einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1), einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) und einer Substrat-spezifischen Ubiquitin-Ligase (E3) (Glickman and Ciechanover, 2002) (Übersicht siehe Abb. 1A).

Im ersten Schritt wird Ubiquitin adenyliert und dann über seinen C-terminalen Glycin-Rest mit Hilfe des E1 Enzyms über eine energiereiche Thioesterbindung verknüpft. Dann wird das aktivierte Ubiquitin auf einen Cysteinrest des Ubiquitin-konjugierenden Enzyms übertragen und ebenfalls über eine Thioesterbindung verknüpft. Anschließend wird das abzubauen Protein durch Ausbildung einer isopeptidischen Bindung zwischen der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrestes und der aktivierten Carboxylgruppe des Ubiquitins markiert. Für diesen Markierungsvorgang ist in vielen Fällen noch eine Ubiquitin-Protein-Ligase als Substraterkennungsprotein (E3) erforderlich (Hersko and Ciechanover, 1998; Glickman and Ciechanover, 2002).

Für den proteasomalen Abbau ist eine Monoubiquitinierung nicht ausreichend, sondern es ist eine Polyubiquitinierung in Form einer Kettenbildung nötig (Chau *et al.*, 1989). Hierbei werden nacheinander mindestens drei weitere Ubiquitinmoleküle (Ub) an jeweils Lys<sup>48</sup>-Reste gebundener Ubiquitineinheiten angehängt. Die Affinität einer Ub<sub>4</sub>-Kette zum Proteasom ist mehr als 100fach höher als die einer Ub<sub>2</sub>-Kette, wohingegen die Affinität einer Ub<sub>12</sub>-Kette nur 10fach höher ist als die einer Ub<sub>4</sub>-Kette (Chau *et al.*, 1989; Pickart, 2000; Thrower *et al.*,

2000). Inzwischen ist bekannt, dass auch sogenannte E4 Enzyme an der Ausbildung und Verlängerung von Ubiquitinketten beteiligt sein können (Koegl *et al.*, 1999). E4s können für das Überleben der Zelle unter Stressbedingungen essentiell sein. Das markierte Protein wird vom 26S-Proteasom erkannt, entfaltet und im Inneren des 20S-Zylinders abgebaut. Die Polyubiquitinkette wird vor dem Abbau des Substrats durch DUBs (Deubiquitinierungsenzyme) abgespalten und dann durch UBPs (Ubiquitin-spezifische Proteasen) in einzelne Ubiquitinmoleküle zerlegt, die somit für einen weiteren Abbauzyklus zur Verfügung stehen (Amerik und Hochstrasser, 2004).

In der Hefe *S. cerevisiae* gibt es nur ein E1, das Protein Uba1, und 13 E2 Enzyme (McGrath *et al.*, 1991; Glickman and Ciechanover, 2002). Sie erlauben der Zelle in Verbindung mit den E3 Enzymen eine exakte Feinregulierung der Ubiquitinierung und eine hohe Variabilität der Substraterkennung. Das Ubiquitin-System kann dadurch den Abbau einer Vielzahl von Proteinen vermitteln.

Die E3 Ligasen wählen ihr Substrat durch eine Interaktion mit dem Degron aus, es bilden sich E2-E3-Substrat-Komplexe (Finley and Chau, 1991; Glickman and Ciechanover, 2002). Die bisher bekannten E3 Enzyme enthalten entweder eine HECT-Domäne (HECT: engl. „homologous to E6-AP C terminus“), ein RING-Finger-Motiv (RING: engl. „really interesting new gene“) oder eine U-Box und bilden u.a. zusammen mit weiteren Proteinen E3 Ligase-Komplexe. Die HECT-Domäne besteht aus ca. 350 Aminosäuren und sie wurde erstmals im humanen E6-Protein gefunden. In Hefe sind nur 5 E3s mit HECT-Domänen bekannt. Diese Enzyme bilden zunächst selbst Thioester-Bindungen zu Ubiquitinmolekülen aus und übertragen diese anschließend auf das Substrat (Pickart *et al.*, 2001) (Abb. 1C). Die RING-E3-Proteine zeichnen sich durch einen sogenannten RING-Finger aus, eine Domäne die aus 6 Cystein- und 2 Histidinresten (RING-H2) oder 7 Cystein- und einem Histidinrest (RING-HC) besteht. Diese Aminosäurereste komplexieren 2 Zinkionen. In Hefe wurden bislang fast 40 E3 Enzyme mit einer RING-Domäne identifiziert. RING-E3s bilden keine Thioester-Bindung zu Ubiquitin aus, sondern vermitteln die Übertragung des Ubiquitins vom E2 Enzym direkt auf das Substrat (Jackson *et al.*, 2000; Joazeiro and Weissman, 2000). Die U-Box-E3s sind eine neue Klasse von E3 Ligasen, sie sind ähnlich wie RING E3s aufgebaut, enthalten aber keine konservierten Cystein- und Histidinreste.

Ubiquitin-Ligase-Komplexe wie beispielsweise der SCF-Komplex (SCF: engl. „Skp1-Cul-F-box“) bestehen aus mehreren Untereinheiten, von denen einige austauschbar sind. Dadurch entstehen noch weitere, vielfältige Möglichkeiten der Substraterkennung. Jeder Ligase-Komplex interagiert mit einem Set von Adaptorproteinen, die über ihre WD40- und Leucinreichen Sequenzen verschiedene Bindungspartner durch spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen rekrutieren und das Substratprotein dann polyubiquitinieren (Tyers and Willems, 1999; Willems *et al.*, 2004).

### **3.1.2 Abbau von Proteinen über die Vakuole (Lysosom)**

Ein Teil der intrazellulären Proteolyse entfällt in der Hefe *S. cerevisiae* auf die Vakuole, die dem Lysosom in höheren Eukaryonten entspricht. Die Vakuole ist ein membranumschlossenes Kompartiment, das eine wichtige Rolle bei der Sporulation, der Osmoregulation und der pH-Homöostase spielt (Klionsky *et al.*, 1990). Sie ist auch ein Speicher für Aminosäuren und zahlreiche Ionen. In der Vakuole sind eine Vielzahl unspezifisch agierender Proteasen enthalten (Teichert *et al.*, 1989). Der Abbau über die Vakuole findet vor allem unter Hungerungsbedingungen statt, unter normalen Wachstumsbedingungen finden hier ca. 40 % des Abbaus statt (Teichert *et al.*, 1989; Nair and Klionsky, 2005). Zu den Substraten des vakuolären Abbaus gehören Proteine, makromolekulare Komponenten (Polysaccharide, Lipide) sowie ganze Organellen (Mitochondrien, Ribosomen) (Klionsky, 1997). Der Import cytosolischer Proteine in die Vakuole erfolgt über die Makroautophagozytose. Die Substrate werden von Vesikeln, sogenannten Autophagosomen, mit einer Doppelmembran umschlossen, zur Vakuole transportiert, die äußere Vesikelmembran fusioniert mit der Membran der Vakuole und die innere Vesikelmembran wird entfernt, so dass die Substrate in die Vakuole gelangen können. In der Vakuole erfolgt dann der unspezifische Abbau (Nair and Klionsky, 2005). Der Abbau über die Vakuole kann aber in wenigen Fällen auch spezifisch erfolgen wie z.B. bei Peroxisomen nach Glucosegabe (Klionsky, 1997; Nair and Klionsky, 2005).

## 3.2 Katabolitinaktivierung und -degradation der Fructose-1,6-bisphosphatase

### 3.2.1 Übersicht über den Kohlenhydrat-Stoffwechsel

Glucose ist ein essentieller Nährstoff. Der Abbau von Glucose zu Wasser und  $\text{CO}_2$  ist die wichtigste Möglichkeit einer Zelle, um ATP zu gewinnen. Am Anfang dieses Prozesses steht die Glykolyse, die im Cytoplasma stattfindet. Sie kommt in fast allen Organismen vor - unabhängig davon, ob sie aerob oder anaerob leben. Die Glykolyse baut den  $\text{C}_6$ -Zucker Glucose zu zwei  $\text{C}_3$ -Einheiten Pyruvat ab; dabei entstehen 2 Moleküle ATP (Übersicht siehe Abb. 2). Unter aeroben Bedingungen gelangt Pyruvat in die Mitochondrien, wird zu Acetyl-CoA (Acetyl-Coenzym A) umgesetzt und dann im Citratzyklus und der Atmungskette zu  $\text{CO}_2$  oxidiert. Dabei entsteht der Großteil an ATP des Stoffwechsels (ca. 28 weitere Moleküle ATP pro 1 Molekül Glucose). Unter anaeroben Bedingungen bzw. bei reduziertem Sauerstoffangebot, z.B. beim Sport in einem kontrahierenden Muskel, wird Pyruvat in Lactat überführt. In fakultativ anaeroben Organismen wie der Hefe *S. cerevisiae* wird Pyruvat in Ethanol umgewandelt. Dies wird als alkoholische Gärung bezeichnet (Stryer, 1999). Die Glykolyse ist nicht nur ein wichtiger metabolischer Prozess für die ATP-Synthese, sie liefert auch Vorstufen für verschiedene Biosynthesewege. Beispielsweise ist Glucose für die Synthese von Dihydroxyacetonphosphat essentiell, das für die Bildung von Lipiden und Fetten benötigt wird. Ferner entsteht aus Glucose über den Pentosephosphatweg Ribose für die Nucleotidsynthese. Glucose muss also für den Organismus ständig verfügbar sein. Daher führt Glucose-Mangel zur Neusynthese von Glucose über die Gluconeogenese. Hierfür können Acetat, Aminosäuren, Lactat und Glycerin als Ausgangsstoffe verwendet werden (Stryer, 1999).

Glykolyse und Gluconeogenese sind antagonistische Stoffwechselwege. Sie werden reziprok reguliert, um u.a. die Verschwendung von ATP durch gleichzeitig stattfindende gegenläufige Prozesse zu vermeiden (Purwin *et al.*, 1982). Die meisten Enzyme der Glykolyse und Gluconeogenese katalysieren jeweils die Hin- und Rückreaktion eines Schrittes. Aus thermodynamischen Gründen gibt es aber drei irreversible Schritte, die unterschiedliche Enzyme benötigen (Abb. 2). Die Phosphorylierung von Glucose findet durch die Hexokinase statt, die Umkehrreaktion benötigt die Glucose-6-Phosphatase. Die Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat wird durch Phosphofruktokinase katalysiert, die Dephosphorylierung aber von Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase). Die Pyruvatkinase katalysiert die Reaktion von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat. Die Bildung von Phosphoenolpyruvat aus Pyruvat findet dagegen über mehrere Schritte statt. Für die



Gluconeogenese muss zunächst Pyruvat aus den Mitochondrien ins Cytoplasma transportiert werden, hierzu wird es in Malat überführt. Die Pyruvat-Carboxylase katalysiert in den Mitochondrien die Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat, das dann durch die mitochondriale Malatdehydrogenase (mMDH) zu Malat reduziert wird. Malat wird ins Cytoplasma transportiert und durch die cytosolische Malatdehydrogenase (cMDH) zu Oxalacetat oxidiert, das dann durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) in Phosphoenolpyruvat umgewandelt wird (Stryer, 1999).

Bei einem Wechsel von gluconeogenetischen zu glykolytischen Wachstumsbedingungen werden die spezifischen gluconeogenetischen Enzyme nicht mehr benötigt. Ihre Transkription wird unterdrückt und die vorhandenen Enzyme werden inaktiviert und dann abgebaut (Gancedo, 1971; Molano and Gancedo, 1974; Holzer and Purwin, 1986; Holzer, 1989). Diesem Prozess unterliegen in der Hefe *S. cerevisiae* die Enzyme MDH2 (cytosolische Malatdehydrogenase), PEPCK und FBPase (Witt *et al.*, 1966; Ferguson *et al.*, 1967; Gancedo *et al.*, 1971; Funayama *et al.*, 1980). Die korrekte Regulation des Kohlenhydrat-Stoffwechsels ist sehr wichtig für die Zelle, Fehler in der Glucose-Regulation können beispielsweise bei Menschen zu Diabetes II führen (Wahren and Ekberg, 2007).

### 3.2.2 Regulation des Kohlenhydrat-Stoffwechsels

Für das Überleben einer Zelle ist es essentiell, die vorhandenen Umweltbedingungen zu bestimmen, und sich durch Regulation des Kohlenhydrat-Stoffwechsel daran anzupassen. Glucose ist nicht nur für die Energiegewinnung und die Biosynthese anderer Moleküle in der Zelle notwendig, sie ist auch ein Signalmolekül (Rolland *et al.*, 2002). An der kontinuierlichen Bestimmung der vorhandenen Glucose-Konzentration in ihrer Umgebung sind in der Hefe *S. cerevisiae* verschiedenste Mechanismen beteiligt. Der Hxk2-Mig1 Weg ist beispielsweise zentral an der Glucose-abhängigen Repression gluconeogenetischer Gene beteiligt. Der Snf3-Rgt2 Signalweg dagegen ist in der Glucose-abhängigen Expression involviert. Des weiteren sind noch der cAMP-Weg und der TOR-Signalweg an der Glucose-induzierten Regulation beteiligt (Rolland *et al.*, 2002; Belinchon and Gancedo, 2007). Die Anpassungen an die vorherrschenden Umweltbedingungen geschehen durch modifizierte Enzymaktivitäten durch Aktivierung und Inhibierung von Metaboliten, durch posttranslationale Modifikationen, durch Aktivierung und Repression von Genen oder Enzym-Abbau (Rolland *et al.*, 2002).

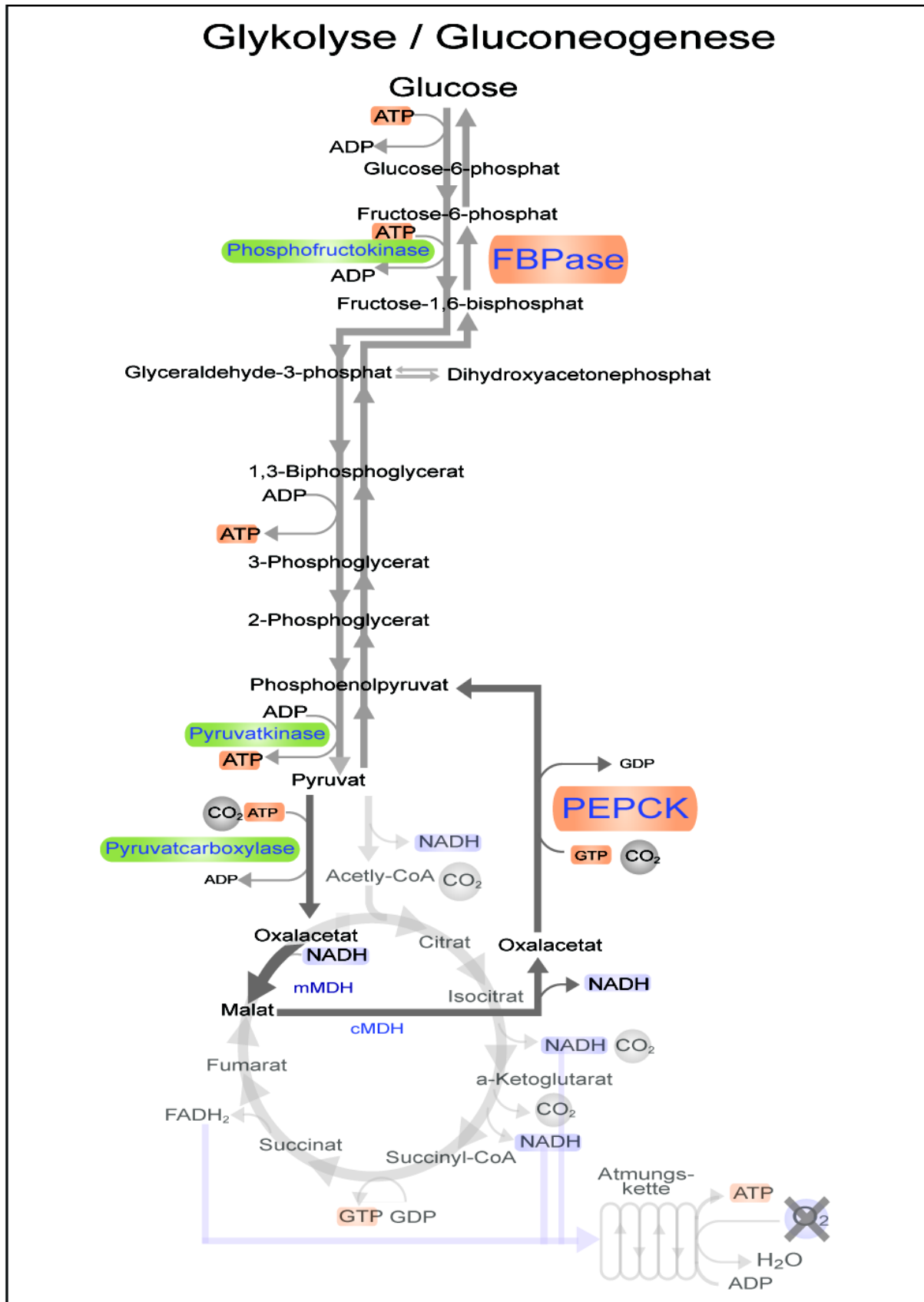


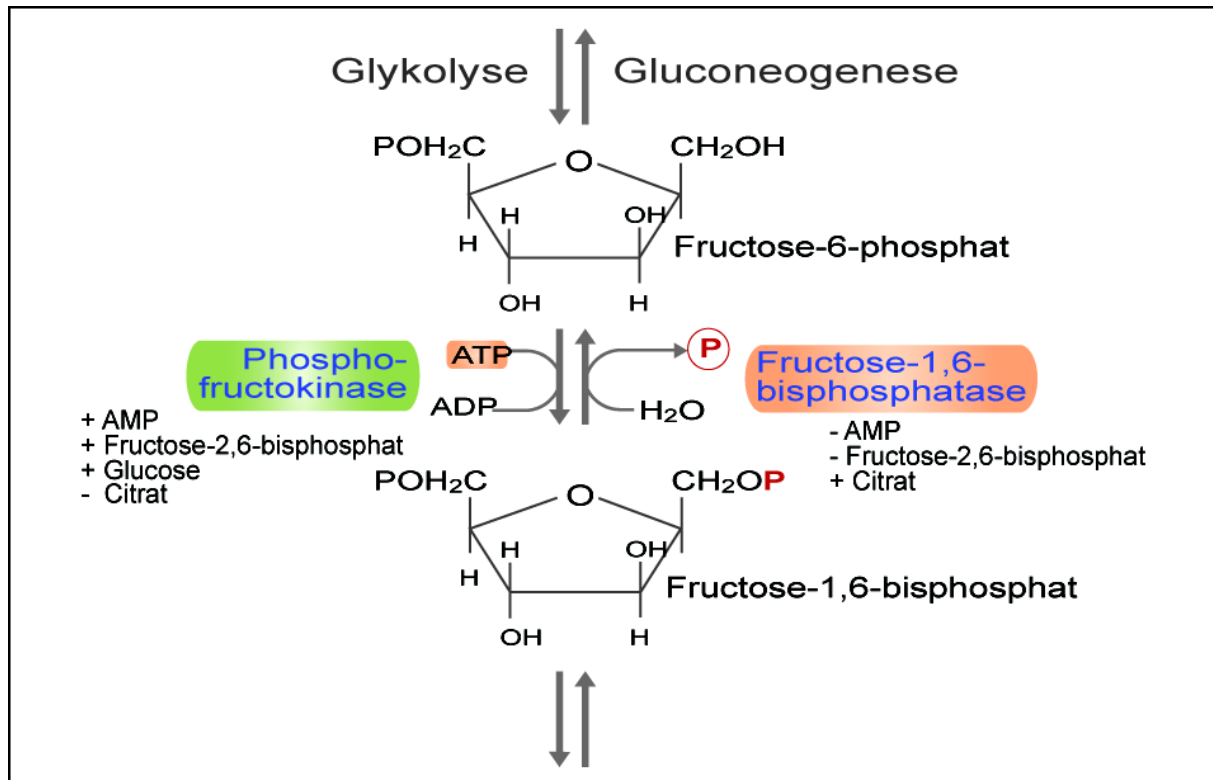
Abbildung 2: Übersicht über den Kohlenhydrat-Stoffwechsel. Details siehe Text. (Die Vorlage der Abbildung stammt von W. Hilt.)

### 3.2.3 Regulation der FBPase

#### FBPase-Inaktivierung

Wachsen Hefezellen auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Ethanol oder Acetat, dann wird das gluconeogenetische Enzym FBPase exprimiert. Unter diesen Bedingungen ist es ein langlebiges Protein, die Halbwertszeit beträgt ungefähr 90 Stunden (Funayama *et al.*, 1980). Nach Glucosezugabe wird FBPase sehr schnell inaktiviert und abgebaut; hierzu reichen schon sehr kleine Glucosemengen aus (Gancedo, 1998). Die Katabolitinaktivierung beinhaltet die Repression des *FBP1* Gens durch Mig1, die reversible Phosphorylierung der FBPase und die allosterische Inhibition durch AMP und Fructose-2,6-bisphosphat (Gancedo *et al.*, 1971; Holzer 1976; Funayama *et al.*, 1980, Müller and Holzer, 1981; Mazon *et al.*, 1982; von Herrath and Holzer, 1988; Rolland *et al.*, 2002). Fructose-2,6-bisphosphat ist ein Nebenprodukt von Fructose-6-phosphat in der Glykolyse. Der Hemmung von FBPase durch AMP und Fructose-2,6-bisphosphat steht die Aktivierung der Phosphofruktokinase der Glykolyse gegenüber (Abb. 3). Nach Glucosegabe zu Zellen, die nur über Nacht unter gluconeogenetischen Bedingungen inkubiert wurden, folgt auf die Katabolitinaktivierung die Polyubiquitinierung und der Abbau der FBPase über das Proteasom (Schork *et al.*, 1994a,b, 1995; Santt *et al.*, 2008). Dies führt zu einer drastischen Verkürzung der Halbwertszeit auf 20 bis 30 min (Schork *et al.*, 1995). Der FBPase-Abbau nach längerem Wachstum unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen (> 48 h) findet dagegen in der Vakuole statt (siehe FBPase-Abbau über die Vakuole).

Die Phosphorylierung der FBPase nach Glucosegabe ist Proteinkinase A-abhängig und findet reversibel am Serinrest 11 statt (Rittenhouse *et al.*, 1984, 1986, 1987). Dabei wird das benötigte pH-Optimum von FBPase von einem neutralen pH-Wert in den alkalischen Bereich verschoben, die Enzymaktivität wird dabei um ca. 50 % verringert (Funayama, 1980; Pohlig and Holzer, 1985; Holzer and Purwin, 1986; Rittenhouse *et al.*, 1987). Es wurde vermutet, dass die Phosphorylierung am Serinrest 11 außerdem der Schalter für den Abbau des Enzyms ist (Mazon *et al.*, 1982; Müller und Holzer, 1981). In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass dies nicht der Fall ist. FBPase-S11A (der Aminosäurerest Serin 11 wurde durch Alanin ersetzt) wird nach Glucosegabe nicht mehr phosphoryliert, aber immer noch polyubiquitiniert und abgebaut (Hämmerle *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung an S11 scheint nur für die schnelle Inaktivierung von FBPase essentiell zu sein, aber nicht für den FBPase-Abbau. In weiteren Arbeiten zum Abbau der FBPase wurde gezeigt, dass der N-Terminus des Enzyms welcher ein Prolin trägt, essentiell für die Polyubiquitinierung und den Abbau ist. Die genaue Rolle des N-Terminus ist bislang unklar (Hämmerle *et al.*, 1998).



**Abbildung 3: Übersicht über die Rolle der Enzyme Phosphofruktokinase und Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase).** Die Phosphofruktokinase katalysiert die Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat, sie wird durch AMP, Fructose-2,6-bisphosphat und Glucose aktiviert und durch Citrat inhibiert. Die reziproke Dephosphorylierung wird durch FBPase katalysiert, sie wird durch Citrat aktiviert und durch AMP und Fructose-2,6-bisphosphat inhibiert.

Das Enzym FBPase ist ein Homotetramer mit einer molekularen Masse von 152 kDa, welches unter SDS-Gelelektrophorese-Bedingungen in Monomere mit der molekularen Masse von 38 kDa zerfällt (Rittenhouse *et al.*, 1984).

### FBPase-Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System

Mit Hilfe proteasomaler Mutanten und verschiedener Stämme, die Defekte in der Verlängerung der Ubiquitin-Ketten aufweisen, konnte gezeigt werden, dass der FBPase-Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System stattfindet. Ebenso konnte eine Beteiligung der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc1, Ubc4 und Ubc5 am Abbau der FBPase nachgewiesen werden (Schork *et al.*, 1994a,b, 1995). In weiteren Studien wurden 3 Gene identifiziert, deren Mutation zu einer Stabilisierung von FBPase nach Glucosezugabe führt. Diese Gene wurden mit *GID1*, *GID2* und *GID3* bezeichnet (Gid: engl. „glucose induced degradation deficient“) (Hämmerle *et al.*, 1998). *Gid3* ist identisch mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym Ubc8, es ist essentiell für die Polyubiquitinierung und den Abbau der

FBPase (Schüle *et al.*, 2000). Gid1 wird auch als Vid30 bezeichnet und ist des weiteren am vakuolären FBPase-Abbau beteiligt sowie an der Regulation des Stickstoff-Metabolismus (van der Merwe *et al.*, 2001). Gid2 ist ebenfalls essentiell für die Polyubiquitinierung von FBPase. Des weiteren konnte mittels Glycerindichtegradientenzentrifugations-Experimenten gezeigt werden, dass Gid2, identifiziert mit Hilfe einer HA-Fusion, nach dem Überführen der Zellen von gluconeogenetischen zu glykolytischen Bedingungen (25 min nach Glucosegabe) in einem höhermolekularen Komplex vorliegt. Das Protein Gid2-HA<sub>3</sub> mit einer molekularen Masse von 49 kDa cofraktioniert hierbei mit Aminopeptidase I (Apel) mit einer molekularen Masse von 600 kDa (Regelmann *et al.*, 2003). In einem anschließend durchgeführten genomweiten Screen wurden 8 Gid-Proteine identifiziert, die essentiell für den FBPase-Abbau sind. Die Proteine wurden als Gid1, Gid2 und Gid4-Gid9 bezeichnet (Regelmann *et al.*, 2003). Gid6 ist identisch mit Ubp14, einer Ubiquitin-spezifischen Protease. Die Deletion von *GID6* führt zur Akkumulation von Poly- und Oligoubiquitinketten in der Zelle, die zu Proteolyse-Defekten führen können (Amerik *et al.*, 1997; Amerik and Hochstrasser, 2004; Eisele *et al.*, 2006).

Parallel dazu wurde in einer systematischen Protein-massenspektrometrischen Analyse Gid7/Moh2 als Teil eines höhermolekularen Komplexes identifiziert (Ho *et al.*, 2002). Gid7 interagiert mit den Proteinen Gid1, Gid2, Gid4, Gid5, Gid8, Gid9, Cft19, Hxt7, Moh1, Shs1, Ume1 und Vma1. Des weiteren konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass Gid5-HA<sub>3</sub>, Gid8-HA<sub>3</sub> und Gid9-HA<sub>3</sub> ebenfalls mit Apel cofraktionieren. Gid1-HA<sub>3</sub> und Myc<sub>9</sub>-Gid4 wiesen ein teilweise abweichendes Sedimentationsprofil auf, beide Proteine traten in niedermolekularen sowie den höhermolekularen Fraktionen auf (T. Pfirrmann, 2006; O. Santt, 2009). Mit Hilfe von Immunopräzipitationsexperimenten unter gluconeogenetischen Bedingungen wie auch nach Überführen der Zellen in glucosehaltiges Medium konnten Interaktionen verschiedener Gid-Proteine gezeigt werden (T. Pfirrmann, 2006). Weitere Arbeiten zeigten, dass bis auf Gid4/Vid24 alle Gid-Proteine unter glykolytischen wie auch unter gluconeogenetischen Bedingungen ständig exprimiert werden. Gid1/Vid30, Gid2, Gid4/Vid24 und Gid7 sind essentiell für die Polyubiquitinierung von FBPase (T. Pfirrmann, 2006; Santt *et al.*, 2008; O. Santt, 2009). Gid4/Vid24 hingegen wird erst nach Glucosezugabe zu gluconeogenetisch-aktiven Zellen exprimiert; nach dem Erreichen eines Expressionsmaximums nach 30 min wird es über das Proteasom abgebaut (Santt *et al.*, 2008).

In einer proteomweit durchgeführten Reinigung von Proteinen zur Identifikation von Proteinkomplexen mittels TAP-Reinigungen (TAP: engl. „tandem affinity purification“) wurde Gid1/Vid30 als Teil eines Komplexes isoliert, der als Vid30c-Komplex bezeichnet wurde (Puig *et al.*, 2001; Krogan *et al.*, 2006). Als Interaktionspartner von Gid1-TAP/Vid30-TAP wurden Gid2, Gid4/Vid24, Gid5/Vid28, Gid7, Gid8 und Gid9 sowie das uncharakterisierte Protein

Ydl176w identifiziert. Diese TAP-Proteinreinigungen wurden unter glykolytischen Bedingungen durchgeführt. In einer weiteren Arbeit wurde aufgrund von Computer-basierten Protein-Protein-Interaktionsvorhersagen der Vid30c-Komplex näher charakterisiert (Pitre *et al.*, 2006). Hierzu wurden Proteinreinigungen mit Gid1-TAP/Vid30-TAP in einem *gid2Δ* und einem *gid8Δ* Stamm durchgeführt. Die Interaktionsstudien unter glykolytischen Bedingungen zeigten, dass Gid1/Vid30, Gid5/Vid28, Gid8 und Ydl176w in einem sogenannten Kernkomplex vorliegen.

Weitere Studien in unserem Labor zeigten, dass Gid2 eine degenerierte RING-Domäne enthält. RING-Domänen sind meistens Teile von Ligase-Komplexen (Joazeiro and Weissman, 2000). Eine Mutation des konservierten Gid2-Restes Cystein379, der für die Komplexbildung eines  $Zn^{2+}$ -Ions essentiell ist, zu Serin führte zu einem stark verlangsamten FBPase-Abbau bzw. verhinderte die Polyubiquitinierung von FBPase. Dies sprach dafür, dass Gid2 eine Ligase-Funktion besitzt. Durch einen *in vitro*-Polyubiquitinierungsversuch mit bakteriell-exprimiertem Gid2 und Gid2-C379S wurde dies bestätigt (Santt *et al.*, 2008).

Gid4/Vid24 konnte als Schalter für die Polyubiquitinierung und den Abbau der FBPase identifiziert werden. Die induzierte „artifizielle“ Expression von Gid4/Vid24 unter gluconeogenetischen Bedingungen führt zum FBPase-Abbau. Gid4/Vid24 wird danach auch über das Proteasom abgebaut und benötigt hierfür Gid2 und Gid3/Ubc8 (Santt *et al.*, 2008).

Die Gid-Proteine enthalten viele verschiedene Domänen. So enthalten Gid1/Vid30, Gid2, Gid8 und Gid9 eine CTLH-Domäne, deren Funktion noch unbekannt ist. Alle Gid-Proteine haben homologe Proteine in Säugerzellen und bilden dort den sogenannten CTLH-Komplex (Kobayashi *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2008). Eine Funktion des CTLH-Komplexes wurde noch nicht beschrieben, die Beteiligung einer Untereinheit am proteasomalen Abbau des Substrats  $\alpha$ -Catenin konnte aber gezeigt werden (Suzuki *et al.*, 2008). Dies weist darauf hin, dass der CTLH-Komplex analog zum Gid-Komplex eine E3 Ligase-Aktivität aufweist.

Zusammenfassend wurde für den Abbau der FBPase folgendes Bild erhalten: Nach dem Überführen von gluconeogenetisch-aktiven Zellen in glucosehaltiges Medium wird FBPase polyubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut. Für die Markierung mit Ubiquitin werden die Enzyme E1, E2 und E3 benötigt. Uba1 ist das E1 Enzym, Gid3/Ubc8 das überwiegend katalytische E2 Enzym und der Gid-Komplex bildet die E3 Ligase.

Der Gid-Komplex wird aus sechs der neun Gid-Proteine gebildet. Er ist unter glykolytischen wie auch gluconeogenetischen Bedingungen aus den Untereinheiten Gid1/Vid30, Gid2, Gid5/Vid28, Gid7, Gid8 und Gid9 aufgebaut und interagiert mit FBPase (siehe Kap. 5.2). Die Enzyme Gid3/Ubc8 sowie Gid6/Ubp14 sind nicht Teil des Komplexes. Nach Glucosezugabe zu dereprimierten Zellen wird das Protein Gid4/Vid24 exprimiert, es wird Teil des Gid-Komplexes und vermittelt die Ubiquitinierung und den Abbau der FBPase über das

Proteasom (Ho *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2006, Pitre *et al.*, 2006; Santt *et al.*, 2008). Der Gid-Komplex ist auch am Abbau des Enzyms PEPCK beteiligt, einem weiteren regulatorischen Schlüsselenzym der Gluconeogenese (Santt *et al.*, 2008).

### **FBPase-Abbau über die Vakuole**

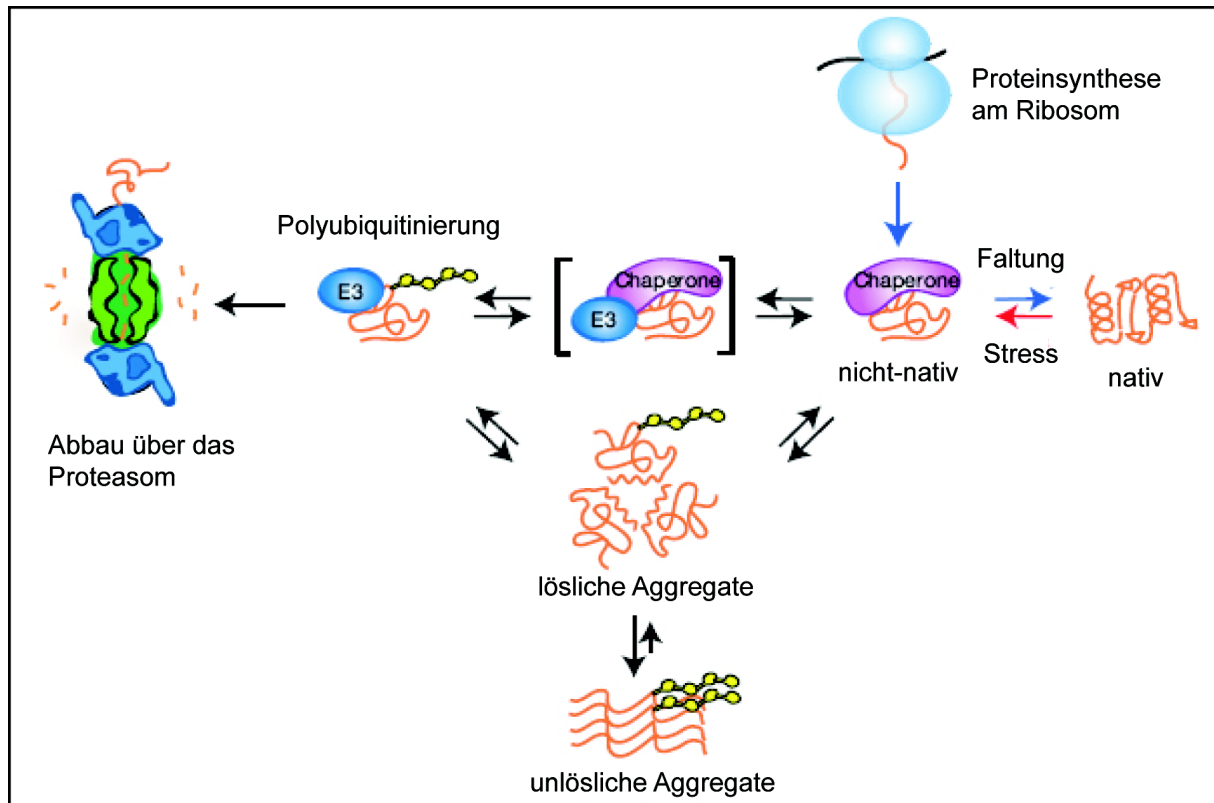
Der Abbau der FBPase über das Proteasom findet nur statt, wenn die Zellen kurze Zeit (bis 24 h) in nicht-fermentierbarem Medium inkubiert wurden. Ein Wachstum unter gluconeogenetischen Bedingungen über längere Zeit (> 48 h) führt zum FBPase-Abbau in der Vakuole (Hung *et al.*, 2004). Hierzu wird die FBPase in sogenannte Vid-Vesikel (Vid: engl. „*v*acuole *i*mport and *d*egradation“) verpackt, zur Vakuole transportiert, importiert und dann in der Vakuole unspezifisch abgebaut (Hoffman and Chiang, 1996; Chiang and Chiang, 1998). Die Proteine Gid1/Vid30, Gid2, Gid4/Vid24, Gid5/Vid28 und Gid8 sind an beiden Abbauwegen der FBPase beteiligt, ihre genaue Funktion im vakuolären Abbauweg ist aber unklar (Hung *et al.*, 2004).

## 3.3 Molekulare Chaperone

### 3.3.1 Die vielfältigen Rollen der molekularen Chaperone

Neu synthetisierte Proteine liegen zunächst in einer nicht-nativen Konformation vor. Um ihre Funktion erfüllen zu können, müssen sie sich korrekt in ihre dreidimensionale Struktur falten. Nur kleine Proteine mit einer einzigen Domäne falten sich spontan. Größere Proteine mit mehreren Domänen falten sich von alleine oft nur teilweise, sie bilden Intermediate, die fehlgefaltete Bereiche enthalten und dadurch zur Aggregatbildung neigen (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Aus diesem Grund sind an größere neu synthetisierte Proteine molekulare Chaperone gebunden, welche die Faltung in die native Konformation erleichtern (siehe Abb. 4, blauer Pfeil). Chaperone binden ebenfalls an nicht-native Proteine, die durch stressinduzierte Denaturierung entstanden sind (siehe Abb.4, roter Pfeil). Sie werden auch als Faltungshelfer oder „Anstandsdamen“ bezeichnet. Die Zelle kann nur überleben, wenn nicht-native Proteine neu gefaltet oder bei Weiterbestehen der Fehlfaltung über das Ubiquitin-Proteasom-System eliminiert werden. Bevor Proteine über das Proteasom abgebaut werden können, müssen sie mit Hilfe von E3 Ligasen polyubiquitiniert werden. Diese E3-Enzyme können durch Chaperone, die an das Substrat gebunden sind, rekrutiert werden. Funktioniert diese sogenannte Qualitätskontrolle nicht, werden lösliche Aggregate gebildet. Wenn diese Aggregate nicht abgebaut werden können, bilden sich unlösliche Amyloid-Aggregate, die in Säugerzellen zahlreiche Krankheiten hervorrufen können. Hierzu gehören die Alzheimer und Parkinson Krankheit bei Menschen, die durch fehlerhaft-gefaltete  $\beta$ -Amyloid-Peptide hervorgerufen werden; aber auch Prionen-Krankheiten wie die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit bei Menschen oder BSE (Bovine spongiforme Enzephalopathie) bei Rindern (Esser *et al.*, 2004; McClellan *et al.*, 2005).





**Abbildung 4: Die Rolle molekularer Chaperone in der Proteinfaltung, dem Proteinabbau und bei der Aggregatbildung.** Details siehe Text. Abbildung aus McClellan *et al.* (2005) übernommen.

### 3.3.2 Übersicht über die verschiedenen Hsp-Chaperone

Es gibt verschiedene Klassen von Chaperonen, die unterschiedlichste Aufgaben erfüllen (Übersicht siehe Esser *et al.*, 2004). Viele Chaperone unterliegen einer „normalen“ Expression, sie werden als Hsc-Proteine bezeichnet (Hsc: engl. „heat shock cognate“). Die eigentlichen Hitzeschockproteine werden als Hsp-Proteine bezeichnet (Hsp: engl. „heat shock protein“), sie werden bei Stressbedingungen, wie Hitzestress oder Stress durch Umwelteinflüsse, vermehrt exprimiert. Die Chaperone werden nach ihrer molekularen Masse in verschiedene Klassen eingeteilt. Es gibt die kleinen Hitzeschockproteine wie Hsp10, Hsp26 und Hsp40 mit einer molekularen Masse von 12 bis 42 kDa. Diese Proteine werden vor allem unter Stresseinflüssen induziert. Sie binden an nicht-native Substrate, um deren Aggregation zu verhindern. Die Hsp60-Chaperone werden auch als Chaperonine bezeichnet und kommen in Mitochondrien und Chloroplasten vor, als GroEL in Bakterien sowie als TriC/CCT-Komplex im Cytosol eukaryotischer Zellen. Diese Proteine bilden ring- bzw. „tonnenförmige“ Strukturen, die an der Proteinfaltung und der Assemblierung beteiligt sind. Am häufigsten kommen die Hsp90-Chaperone vor, sie stellen 1-2 % der Gesamtprotein-

menge der Zellen dar. Hsp90-Chaperone enthalten eine ATPase-Domäne (Wandinger *et al.*, 2008). Sie bilden hauptsächlich Dimere und sind an der Proteinfaltung und -aktivierung beteiligt. Bei der Suche nach neuen Wirkstoffen in der Krebstherapie gewinnen Inhibitoren von Hsp90 zunehmend an Bedeutung (Caplan *et al.*, 2006; Taldone *et al.*, 2009). Außerdem gibt es noch weitere Untergruppen wie beispielsweise die Hsp70-Chaperone auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

### 3.3.3 Hsp70-Chaperone und ihre Aufgaben

Die Hsp70-Chaperone kommen in Eukaryonten und vielen Bakterien vor. Sie liegen als Monomere vor und sind an der Faltung und Assemblierung neusynthetisierter Proteine, am Proteintransport über Membranen hinweg, Proteinabbau und der Regulation von anderen Hsp-Proteinen beteiligt; weiterhin verhindern sie die Aggregation von Substraten (Esser *et al.*, 2004). Es existieren 9 cytosolische Hsp70-Proteine, die als Ssa1-4, Ssb1/2, Sse1/2 und Ssz1 bezeichnet werden, sowie weitere Formen im ER und in den Mitochondrien.

Hsp70-Proteine besitzen eine N-terminale ATPase-Domäne, eine Peptid-Bindedomäne und am C-Terminus eine Domäne, die einen sogenannten „Deckel“ bildet. Für die Regulation von Hsp70-Proteinen werden Co-Faktoren benötigt. Zu diesen Co-Faktoren gehören Hsp40-Proteine und NEFs (engl. „nucleotide exchange factor“).

In der ATP-gebundenen Form bindet Hsp70 nicht fest an das Substrat, da die Peptidbindungstasche offen ist. Dies führt zu einer schnellen Bindung der Substrate, aber auch zu einer schnellen Freisetzung (geringe Affinität). Dagegen ist nach ATP-Hydrolyse zu ADP und Phosphat der C-terminale „Deckel“ von Hsp70 geschlossen und das Substrat sitzt fest in der Bindungstasche (hohe Affinität) (Becker *et al.*, 1996; Esser *et al.*, 2004; Arndt *et al.*, 2007). Die ATP-Hydrolyse wird durch Hsp40-Proteine stimuliert. Hsp40-Proteine mit einer J-Domäne können z.B. hydrophobe Peptidbereiche des Substrats erkennen und vermitteln den Transfer des Substrats zum Hsp70-Protein. Sie katalysieren die ATP-Hydrolyse am Hsp70, die dazu benötigt wird das Substrat in das aktive Zentrum von Hsp70 zu bringen, wo es dann z.B. gefaltet wird. Die nicht essentiellen BAG-Proteine (BAG: engl. „Bcl-2-associated athanogene“) wirken als NEFs, sie katalysieren die Substratloslösung von Hsp70-Proteinen sowie das Recycling der Chaperone. Viele BAG-Proteine haben eine UBL-Domäne (UBL: engl. „ubiquitin-like domain“), die direkt mit dem Proteasom interagiert. Diese Proteine dienen somit als Bindeglied zwischen dem Chaperon Hsp70 und dem Proteasom (McClellan

*et al.*, 2005; Mayer and Bukau, 2005).

In Säugerzellen sind Hsp70-Chaperone in Kooperation mit Hsp90-Chaperonen und weiteren Co-Faktoren an der Reifung von Kinasen, Steroidhormon-Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren beteiligt (Young *et al.*, 2004). Die Proteine Hsp70 und Hsp90 werden dabei durch das Co-Chaperon Hop (engl.: „Hsp organizing protein“) verknüpft. Es werden Substrate, die an Chaperone gebunden sind, mithilfe der Ubiquitinligase CHIP (engl. „C-terminus of Hsp70-interacting protein“) polyubiquitiniert und dann über das Proteasom abgebaut. CHIP ist am Abbau fehlgefalteter Proteine (Proteinqualitätskontrolle) und an der Reifung verschiedener Rezeptorproteine beteiligt. Bislang ist noch keine CHIP-homologe E3 Ligase in *S. cerevisiae* bekannt (Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Young *et al.*, 2004; Arndt *et al.*, 2007).

Zur Familie der Hsp70-Chaperone in *S. cerevisiae* gehören die Proteine Ssa1-4. Ssa1 und Ssa2 werden konstitutiv exprimiert, die Expression von Ssa3 und Ssa4 sowie auch Ssa1 wird durch Stress induziert (Slater and Craig, 1987; Werner-Washburne *et al.*, 1987, Becker *et al.*, 1996). Ssa-Proteine haben sehr homologe Aminosäuresequenzen und überlappende Funktionen. Die Expression von mindestens einem Ssa-Protein ist ausreichend für das Überleben der Zelle. Das Protein Ssa1 hat vielfältige Aufgaben, wie z.B. Proteinfaltung, Proteinimport in den Kern, Vermeidung von Substrataggregation und Proteinabbau fehlgefalteter Substrate (Shulga *et al.*, 1999; Satyanarayana *et al.*, 2000; McClellan *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007). Das Hitzeschockprotein Ssa2 ist ebenfalls an der Proteinfaltung beteiligt und am Import in die Vakuole (Satyanarayana *et al.*, 2000). Es wird für den Import von FBPase in Vid-Vesikel unter „Hungerungsbedingungen“ (> 48 h unter gluconeogenetischen Bedingungen mit Acetat als Kohlenstoffquelle) benötigt (Brown *et al.*, 2000).

Eine Beteiligung von Chaperonen am FBPase-Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System oder beim Abbau anderer metabolischer Enzyme wurde bislang nicht beschrieben.

### 3.4 Aufgabenstellung

Die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) ist ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese. Nach Glucosegabe zu Zellen, die in ethanolhaltigem Medium gewachsen sind, wird sie durch Inhibition und Phosphorylierung teilweise inaktiviert und dann über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Bisher wurden neun Gid-Proteine gefunden (Gid: engl. „glucose induced degradation deficient“), die für den FBPase-Abbau essentiell sind. Sechs bzw. sieben der neun Gid-Proteine bilden den sogenannten Gid-Komplex, der als E3 Ligase am Abbau der FBPase beteiligt ist.

Zum Nachweis der FBPase in Hefezelllysaten bei verschiedenen Studien zum katabolitinduzierten Abbau der FBPase wird ein spezifischer FBPase-Antikörper benötigt, der im Rahmen dieser Arbeit gewonnen werden sollte.

Da vermutet wurde, dass Gid7 eine zentrale Komponente des Gid-Komplexes ist, sollten Studien zur Stabilität des Gid-Komplexes in einem *GID7* Deletionsstamm unter gluconeogenetischen Bedingungen durchgeführt werden. Des Weiteren sollten Interaktionsstudien von FBPase mit dem Gid-Komplex vorgenommen werden, um die mit FBPase interagierende Untereinheit des Komplexes zu bestimmen.

Mittels Proteinreinigungen von FBPase sollten weitere am Abbau beteiligte Komponenten identifiziert und charakterisiert werden, um den Mechanismus des Abbaus der FBPase noch besser zu verstehen.

Es war bekannt, dass FBPase nach Glucosezugabe am Aminosäurerest S11 phosphoryliert wird. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden zusätzliche Phosphorylierungsstellen postuliert. Im Rahmen dieser Arbeit sollten weitere Phosphorylierungsstellen der FBPase identifiziert und der Reihe nach mutiert werden, um dann ihren Einfluss auf den FBPase-Abbau zu untersuchen. Wenn es neue Phosphorylierungsstellen geben sollte, dann sollten diese mit einer massenspektrometrischen Analyse bestätigt werden können.

Die N-terminale Aminosäure Prolin der FBPase ist essentiell für ihre Polyubiquitinierung und den Abbau über das Proteasom. Die Aufgabe des N-terminalen Restes ist bislang aber unklar. Seine Rolle sollte mittels Interaktionsstudien der punktmutierten FBPase-P1S mit dem Gid-Komplex untersucht werden. Weiterhin sollte FBPase auf ein mögliches N-Degron hin getestet werden.

## 4 . Material und Methoden

### 4.1 Material und Geräte

#### 4.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Firma	Chemikalien, Materialien
<b>Amersham Biosciences</b> , Little Chalfont, UK	AlkPhos Direct™ Labelling and Detection System CDP-Star™ Detection Reagent Glutathion Sepharose™ 4B High Molecular Weight Calibration Kit for native electrophoresis Hybond™-N+ Membran Hyperfilm ECL™ IgG Sepharose™ 6 Fast Flow Protein A Sepharose™ CL-4B
<b>Bioline</b> , London, UK	Velocity™ DNA Polymerase
<b>Bio-RAD</b> , Hercules, USA	Precision Plus Protein™ All Blue Standards
<b>Difco</b> , Detroit, USA	„Bestandteile“ der Medien
<b>Eurofins MWG Operon</b> , Ebersberg	Oligonukleotide
<b>Fermentas</b> , Ontario, Kanada	Gene Jet™ Plasmid Miniprep Kit PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus Restriktionsendonukleasen, Enzyme allg.
<b>Finnzymes</b> , Espoo, Finnland	Phusion™ DNA Polymerase
<b>Genaxxon Bioscience</b> , Stafflangen	Oligonukleotide Taq DNA Polymerase
<b>Hartman Analytic GmbH</b> , Braunschweig	<sup>35</sup> S-Methionin
<b>Millipore</b> , Billerica, USA	MF-Millipore™ Membrane Filters
<b>New England Biolabs</b> , Ipswich, USA	1 kb DNA Ladder λ-Proteinphosphatase Restriktionsendonukleasen Vent DNA Polymerase
<b>Pierce</b> , Rockford, USA	ECL Western Blotting Substrate
<b>Qiagen</b> , Hilden	QIAprep® Gel Extraction Kit QIAquick® PCR Purification Kit

## Material und Methoden

	QIAprep® Spin Miniprep Kit
<b>Roche</b> , Mannheim	Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tabletten Restriktionsendonukleasen T4 DNA-Ligase
<b>Roth</b> , Karlsruhe	DNA-Marker 1 kb Leiter
<b>Schleicher und Schuell</b> , Dassel	Blottingpapier
<b>Sigma-Aldrich</b> , Steinheim	Kodak® BioMax™ MR Film Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2

Alle weiteren sowie die aufgelisteten Chemikalien wurden von den Herstellern in höchstmöglicher Reinheit bezogen.

### 4.1.2 Geräte

<b>Firma</b>	<b>Geräte</b>
<b>Amersham Biosciences</b> , Little Chalfont, UK	Spektrometer
<b>Beckmann</b> , Fullerton, USA	Optima™ TLX Ultrazentrifuge
<b>Bio-RAD</b> , Hercules, USA	DNA-Gelelektrophoresekammer Mini-PROTEAN 3 Cell Mini-PROTEAN Tetra Cell Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell
<b>Eppendorf</b> , Hamburg	Tischzentrifugen
<b>Heraeus</b> , Hanau	Tischzentrifugen
<b>Kontron</b> , München	Kühlzentrifugen
<b>Molecular Probes</b>	PhosphorImager
<b>Pharmacia</b> , Uppsala, Schweden	Spektrometer

### 4.1.3 Antikörper

Antikörper	Verdünnung für Immunodetektion	Quelle
Affe $\alpha$ -Ziege, HRPO-konjugiert	1:5000, 1 % BSA	Santa Cruz
Kaninchen $\alpha$ -AP1, polyklonal	1:5000	Klionsky <i>et al.</i> , 1992
Kaninchen $\alpha$ -CPY, monoklonal	1:10000	Rockland
Kaninchen $\alpha$ -FAS, polyklonal	1:10000	Egner <i>et al.</i> , 1993
Kaninchen $\alpha$ -FBPase, polyklonal	1:5000	K.D. Entian
Kaninchen $\alpha$ -FBPase, polyklonal	1:5000	diese Arbeit
Kaninchen $\alpha$ -GST, polyklonal	1:5000, 2 % Milch	T. Lang
Kaninchen $\alpha$ -PEPCK, polyklonal	1:10000	unbekannt
Kaninchen $\alpha$ -Ssa1, polyklonal	1:2000	E. Craig
Kaninchen $\alpha$ -TAP, polyklonal	1:5000	Open Biosystems
Maus $\alpha$ -HA (Klon 16B12), monoklonal	1:5000	Covance
Maus $\alpha$ -Kaninchen, HRPO-konjugiert	1:20000, 1 % Milch	Sigma-Aldrich
Maus $\alpha$ -myc (Klon 9E10), monoklonal	1:5000	Sigma-Aldrich
Maus $\alpha$ -PGK (Klon 22C5), monoklonal	1:10000	Molecular Probes
Maus $\alpha$ -Ub (Klon P4G7), monoklonal	1:2000	Covance
Ziege $\alpha$ -Kaninchen, HRPO-konjugiert	1:5000, 1 % Milch	Invitrogen
Ziege $\alpha$ -Kaninchen, HRPO-konjugiert	1:5000, 1 % Milch	Caltag Laboratories
Ziege $\alpha$ -Maus, HRPO-konjugiert	1:5000, 1 % Milch	Dianova
Ziege $\alpha$ -Ssa1, polyklonal	1:2000	Santa Cruz

### 4.1.4 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Name	Genotyp	Herkunft
BY4743	<i>MATa<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0/LYS2 MET15/met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0</i>	EUROSCARF
FBPase-TAP	W303-1B <i>FBP1-TAP::TRP1<sup>K.I.</sup></i>	T. Pfirrmann
MTY818	W303-1B <i>cns1<math>\Delta</math>::cns1-1<sup>ts</sup></i>	Tesic <i>et al.</i> , 2003
W303-1B	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	H.L. Chiang
W303-1BKO	W303-1B <i>fbp1<math>\Delta</math>::LEU2</i>	H.L. Chiang

Material und Methoden

W303-1C	MAT $\alpha$ <i>ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 prc1-1 trp1-1 ura3-1</i>	Knop <i>et al.</i> , 1996
Y30184	BY4743 <i>yer049w<math>\Delta</math>::KANMX4/yer049w<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y30403	BY4743 <i>ssa1<math>\Delta</math>::KANMX4/ssa1<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y31409	BY4743 <i>snl1<math>\Delta</math>::KANMX4/snl1<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y31512	BY4743 <i>ssa2<math>\Delta</math>::KANMX4/ssa2<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y31579	BY4743 <i>ubr2<math>\Delta</math>::KANMX4/ubr2<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y31803	BY4743 <i>sti1<math>\Delta</math>::KANMX4/sti1<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y32146	BY4743 <i>sse1<math>\Delta</math>::KANMX4/sse1<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33240	BY4743 <i>fes1<math>\Delta</math>::KANMX4/fes1<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33446	BY4743 <i>gid7<math>\Delta</math>::KANMX4/gid7<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33614	BY4743 <i>gid2<math>\Delta</math>::KANMX4/gid2<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y34508	BY4743 <i>hul5<math>\Delta</math>::KANMX4/hul5<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y34814	BY4743 <i>ubr1<math>\Delta</math>::KANMX4/ubr1<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y36577	BY4743 <i>gid3<math>\Delta</math>::KANMX4/gid3<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y37167	BY4743 <i>sse2<math>\Delta</math>::KANMX4/sse2<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	EUROSCARF
YBB1	W303-1B <i>GID6-HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S.pombe</sup></i>	B. Braun
YJJ01	W303-1BKO <i>GID7-HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S.pombe</sup></i>	diese Arbeit
YJJ02	YTS3 <i>fbp1<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	diese Arbeit
YJJ08	W303-1B <i>fbp1<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	diese Arbeit
YJJ09	YJR12 <i>fbp1<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	diese Arbeit
YJJ11	YTP11 <i>fbp1<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	diese Arbeit
YJJ15	W303-1B <i>trp1<math>\Delta</math>::HIS5<sup>S.pombe</sup></i>	diese Arbeit
YJJ16	W303-1B <i>trp1<math>\Delta</math>::HIS5<sup>S.pombe</sup> GID1-TAP::TRP1<sup>K.I.</sup></i>	diese Arbeit
YJJ18	YPD22 <i>GID1-HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S.pombe</sup></i>	diese Arbeit
YJJ19	YPD21 <i>GID6-HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S.pombe</sup></i>	diese Arbeit
YJJ20	YPD21 <i>GID1-HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S.pombe</sup></i>	diese Arbeit
YJJ21	W303-1B <i>snl1<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	diese Arbeit
YJJ22	YPD21 <i>snl1<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	diese Arbeit
YJJ24	YJR12 <i>gid8<math>\Delta</math>::URA3</i>	diese Arbeit
YJR12	W303-1B <i>GID1-HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S.pombe</sup></i>	J. Regelmann
YLB27	FBPase-TAP <i>gid2<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	L. Barbin
YML10	YJR12 <i>gid7<math>\Delta</math>::LEU2<sup>K.I.</sup></i>	M. Lehmann
YPD01	MAT $\alpha$ <i>his3-11,15 leu2-3,112 lys2 prc1-1 trp1-<math>\Delta</math>1 ura3-52</i>	Nelson <i>et al.</i> , 1992
YPD03	YPD01 <i>ssa1<math>\Delta</math>::HIS3 ssa2<math>\Delta</math>::LEU2</i>	P. Deak
YPD05	W303-1C <i>ydj1-2::HIS3 LEU2::ydj1-151</i>	Taxis <i>et al.</i> , 2003



YPD21	<i>MAT<math>\alpha</math> his3-11,15 leu2-3,112 lys2 prc1-1 trp1-<math>\Delta</math>1 ura3-52 ssa2::LEU2 ssa3::TRP1 ssa4::LYS2</i>	Taxis <i>et al.</i> , 2003
YPD22	YPD21 <i>ssa1-45<sup>ts</sup></i>	Taxis <i>et al.</i> , 2003
YRH023	W303-1C <i>hsp104<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	Taxis <i>et al.</i> , 2003
YRH050	W303-1C <i>hsc82<math>\Delta</math>::KANMX4 hsp82<sup>G170D</sup></i>	Taxis <i>et al.</i> , 2003
YTP10	W303-1B <i>GID7-HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S.pombe</sup></i>	T. Pfirrmann
YTP11	W303-1B <i>GID5-HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S.pombe</sup></i>	T. Pfirrmann
YTS1	W303-1B <i>gid2<math>\Delta</math>::KANMX4</i>	T. Schüle
YTS3	W303-1B <i>GID2-HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S.pombe</sup></i>	T. Schüle

#### 4.1.5 *Escherichia coli*-Stämme

<b><i>E. coli</i>-Stamm</b>	<b>Genotyp und Beschreibung</b>	<b>Herkunft</b>
BL21	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal <math>\lambda</math>(DE3) <i>endA</i> Hte Verwendet zur Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen, proteasedefizienter Stamm</i>	Stratagene
BMH 71-18 <i>mutS</i>	<i>Thi, supE, <math>\Delta</math>(lac-proAB), [mutS::Tn10], [F'proAB lac<sup>q</sup>Z<math>\Delta</math>M15]</i> Verwendet zur Einführung von Punktmutationen in Plasmid-DNA	Clontech
DH5 $\alpha$	F- f80lacZDM15 D(lacZYA-argF)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk-) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 l-</i> Verwendet zur Amplifikation von Plasmid-DNA	Hanahan, 1983
XL10-Gold <sup>®</sup>	Tet <sup>r</sup> $\Delta$ ( <i>mcrA</i> )183 $\Delta$ ( <i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i> )173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F'proAB lac<sup>q</sup>Z<math>\Delta</math>M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>) Amy Cam<sup>r</sup>]</i> Verwendet zur Amplifikation von mutierter Plasmid-DNA	Stratagene

### 4.1.6 Plasmide

Name	Beschreibung	Verwendete Primer	Herkunft
pBS1479	Vektor zur Amplifizierung der Integrationskassette <i>TAP::TRP1<sup>K.I.</sup></i>	-	Puig <i>et al.</i> , 2001
pBS1539	Vektor zur Amplifizierung der Integrationskassette <i>TAP::URA3<sup>K.I.</sup></i>	-	Puig <i>et al.</i> , 2001
pFA6a-3HA-His3MX6	Vektor zur Amplifizierung der Integrationskassette <i>HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S. pombe</sup></i>	-	Longtine <i>et al.</i> , 1998
pFBPase	Plasmid zur Expression von FB Pase in Hefe. Das von der chromosomalen DNA amplifizierte <i>FBP1</i> Gen wurde mit dem nativen Promotor in die <i>SpeI/ClaI</i> -Schnittstellen des Vektors pRS316 kloniert.	P FBP1 forw P FBP1 reverse	diese Arbeit
pFBPaseLeu2myc	Plasmid zur Expression von FB Pase-Leu2myc in Hefe. In den Vektor pLeu2myc* wurde mittels der <i>NotI/XbaI</i> -Schnittstellen das amplifizierte <i>FBP1</i> Gen mit nativem Promotor kloniert.	PD3 forw PD5 rev	diese Arbeit
pFBPase-P1S	Plasmid zur Expression von FB Pase-P1S in Hefe. Das vom Vektor pKD10S amplifizierte <i>FBP1-P1S</i> Gen wurde in die <i>SpeI/ClaI</i> -Schnittstellen des Vektors pRS316 kloniert.	P FBP1 forward P FBP1 reverse	diese Arbeit
pFBPase-P1S-TAP	Vektor zur Expression von FB Pase-P1S-TAP in Hefe. In das Plasmid pFBPase-P1S wurde mittels homologer Rekombination die Kassette <i>TAP::TRP1<sup>K.I.</sup></i> eingeführt.	P FBP-TAP forw P FBP-TAP rev	diese Arbeit
pFBPase-S11A	Plasmid zur Expression von FB Pase-S11A in Hefe. Das vom Vektor pKD-10 Ser11Ala amplifizierte <i>FBP1-S11A</i> Gen wurde in die <i>SpeI/ClaI</i> -Schnittstellen des Vektors pRS316 kloniert.	P FBP1 forw P FBP1 reverse	diese Arbeit

Material und Methoden

pFBPase-S11A-S281A	Plasmid zur Expression von FBPase-S11A-S281A in Hefe. In das <i>FBP1-S11A</i> Gen des Vektors pFBPase-S11A wurde zusätzlich die Punktmutation S281A eingeführt.	P1 FBP-S281A forw PRS Swal Pmel rev	diese Arbeit
pFBPase-S11A-TAP	Vektor zur Expression von FBPase-S11A-TAP in Hefe. In das Plasmid pFBP-S11A wurde mittels homologer Rekombination die Kasette <i>TAP::TRP1<sup>K.L.</sup></i> eingeführt.	P FBP-TAP forw P FBP-TAP rev	diese Arbeit
pFBPase-TAP	Vektor zur Expression von FBPase-TAP in Hefe. In das Plasmid pFBPase wurde mittels homologer Rekombination die Kasette <i>TAP::TRP1<sup>K.L.</sup></i> eingeführt.	P FBP-TAP forward P FBP-TAP rev	diese Arbeit
pFBPase(1-20)Leu2myc	Plasmid zur Expression von FBPase(1-20)Leu2myc in Hefe. In den Vektor pLeu2myc* wurde mittels der <i>NotI/XbaI</i> -Schnittstellen die ersten 20 Aminosäuren des <i>FBP1</i> Gens mit nativem Promotor kloniert.	PD3 forw PD4 rev	diese Arbeit
pJR13	Plasmid zur Expression von GST-FBPase in <i>E. coli</i> . Das amplifizierte <i>FBP1</i> Gen wurde in die <i>Sall/NotI</i> -Schnittstellen des Vektors pGEX-4T-3 kloniert.	-	J. Regelmann
pKD-10	„high copy (2 $\mu$ ) Shuttle“ Vektor zur Expression von FBPase in Hefe. Das <i>FBP1</i> Gen mit nativem Promotor wurde in das Plasmid pRS426 kloniert.	-	K.D. Entian
pKD-10 Ser11Ala	Plasmid zur Expression von FBPase-S11A in Hefe. Ausgehend vom Vektor pKD-10 wurde die Punktmutation S11A in das <i>FBP1</i> Gen eingebracht.	S12A-FP S12A-RP	diese Arbeit

Material und Methoden

pKD10S	Plasmid zur Expression von FBPase-P1S in Hefe. Vektor basiert auf pKD-10.	-	K.D. Entian
pLeu2myc	Plasmid zur Expression von Leu2myc. In den Vektor pLeu2myc* wurde mittels der <i>NotI/XbaI</i> -Schnittstellen der amplifizierte native FBPase-Promotor kloniert.	PD3 forw PD6 rev	diese Arbeit
pLeu2myc*	Das <i>LEU2MYC</i> Fragment des Plasmids pSK7 (ohne Promotor) wurde mittels der <i>Sall/XbaI</i> -Schnittstellen in den Vektor pRS316 kloniert	PD1 forw PD2 rev	diese Arbeit
pRS316	„Shuttle“ Vektor zur Replikation in <i>E. coli</i> und Hefe mit <i>URA3</i> Marker und <i>CEN</i> Abschnitt.	-	Sikorski and Hieter, 1989
pSK7	Vektor zur Expression von CTL*myc (CPY*-Transmembrandomäne-Leu2myc) in Hefe. Ausgangsvektor ist pRS316, CTL*myc ist unter dem <i>GAL4</i> -Promotor.	-	S. Kohlmann
pUG6	Integratives Plasmid zur Amplifizierung der Deletionskassette <i>loxP-KANMX4-loxP</i>	-	Güldener <i>et al.</i> , 1996
pUG27	Integratives Plasmid zur Amplifizierung der Deletionskassette <i>loxP-HIS5-loxP</i>	-	Güldener <i>et al.</i> , 1996
pUG72	Integratives Plasmid zur Amplifizierung der Deletionskassette <i>loxP-URA3-loxP</i>	-	Güldener <i>et al.</i> , 1996

### 4.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind in 5´ - 3´Richtung angegeben. Unterstrichene Bereiche kennzeichnen Basenpaare, die zur DNA-Matrize homolog sind.

Name	Basenabfolge 5´ - 3´
as9	AGCACGTGAGTATACGTGATTAAGCACACAAAGGCAAAGGCAGC TTGGAGT <u>CAGCTAAAGCTTCGTACGC</u>
as10	GCAAGTGCACAAACAATACTTAAATAAATACTCAGTAATAAC <u>GCGAT</u> <u>AGGCCACTAGTGGATCTG</u>
as11	GCTTGTACCTTACGTACAATCTTG
fbpΔ control forw	GTAAAGAACTCCTCATAGGGG
P1 fbpΔ forw	TAACAGTGCGAACATATAAGAAACATCCCTCATACTACCACACAT <u>C</u> <u>AGCTGAAGCTTCGTACGC</u>
P2 fbpΔ rev	TAAAGTACAGAACAAAGAAAATAAGAAAAGAAGGCGATCATTGAA <u>GCATAGGCCACTAGTGGATCTG</u>
Gid6 pfa6a HA fwd	GCATTGAAGATATGAAAAAAATGGTTATATTTATTTCTATACAAGA TGCCGGATCCCCGGGTTAATTAA
Gid6 pfa6a HA rev	ATATATATATATATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAAACGTT CTTGAATT <u>CGAGCTCGTTTAAAC</u>
Gid7-ha fwd	CTTCTGGCGGTGATGACGGTAAGATAAAAATCTGGAAAATTTCAA GAAATCATCATCATCATCAT <u>CGGATCCCCGGGTTAATTAA</u>
Gid7-ha rev	TTTTTTTTGTTACATAAACTTTGCTTACGTATATATATAAGGTGGA GTAGAATT <u>CGAGCTCGTTTAAAC</u>
Gid8 forward	ATATCAGCCGGATGAAGATATATTTGTGTGTGGTAACAAATAGA <u>AC</u> <u>AGCTGAAGCTTCGTACGC</u>
Gid8 Kontrolle forw	GGGGACGCAAGGAAGTAAAAG
Gid8 reverse	ACACGCACACACACATATATAAATATATACGTACTATGTATGT <u>CAGC</u> <u>ATAGGCCACTAGTGGATCTG</u>
KAN-control rev	GAGGCATAAATTCGTCAGCC
KAN-Sonde forw	CCGCGATTAAATCCAACAT
KAN-Sonde rev	CGACAGCAGTATAGCGACCA
P FBP-TAP forw	CAGGTGAAATTGACAAATTTTAGACCATATTGGCAAGTCACAG <u>I</u> <u>CCATGGAAAAGAGAAG</u>
P FBP-TAP rev	CTAAAGTACAGAACAAAGAAAATAAGAAAAGAAGGCGATCATTGA ATACGACTCACTATAGGG
P FBP1 forward	GACTAGTTAGCCACACCCCTCCC
P FBP1 reverse	GGATCGATTCCCATTCCATTGCTAC

Material und Methoden

P1 FBP-S281A forw	CGACAAGAAGGCCCCCAACGG
PRS Swal-Pmel rev	TATATATTTATATTA AAAAGTTTAAACTATAATTATTTTTATAGC
P1 FBP1 forward	GACTAGTTAGCCACACCCCTCCC
P2 FBP1 reverse	GGATCGATTCCCATTCCATTGCTAC
P3 FBP1 forward	CTTGTGGCATCTTCCCC
P4 FBP1 reverse	TGGGTAGTTGAGGTAGTG
P1 GID1-HA3 forw	AGATATTACAAAGCTATTA <u>ACTTCGACGAAGATGTGTTGAATTTAC</u> <u>GGATCCCCGGGTTAATTAA</u>
P2 GID1-HA3 rev	GACTGATATCACATGGCTTTGTTGTTTGAAGGTGCTTGTTTTATGC <u>GAATTGAGCTCGTTTAAAC</u>
P3 GID1-HA3 control forw	GACAATTGAGTAATGTCTCTGC
P4 GID1-HA3 control rev	GCCTGCATGTTTAGCCAGTG
PD1 forw	<u>CCGTCTAGACGGTCTGCCCTAAGAAGATC</u>
PD2 rev	<u>GCGTCGACGCGAATTCAGTAGTATTG</u>
PD3 forw	<u>GAGCGGCCGCGCATTAGCCACACCCCTC</u>
PD4 rev	<u>CGTCTAGAGATGATATCGGTATCAAACCC</u>
PD5 rev	<u>CGTCTAGACTGTGACTTGCCAATATGGT</u>
PD6 rev	<u>CGTCTAGACATATGTGTGGTAGTATGAGG</u>
PGid1-TAP control	GTTTATAGATGGAAAGC
PGid1-TAP forw	CCAAGATATTACAAAGCTATTA <u>ACTTCGACGAAGATGTGTTGAATT</u> <u>TATCCATGGAAAAGAGAAG</u>
PGid1-TAP rev	ATGACTGATATCACATGGCTTTGTTGTTTGAAGGTGCTTGTTTTAT <u>GCTACGACTCACTATAGGG</u>
Psn1 control forw	CAGGAAAAGTCAAGTTTCCG
Psn1 forw	GTTGGTGAAAAAATAGCACCAGAAGGGCAATTGTACGTTTCCGTA <u>CAGCTGAAGCTTCGTACGC</u>
Psn1 rev	TATGAATTCGGCAAGAGCCGTTATCTATAAACTAAAAATACAAACG <u>CATAGGCCACTAGTGGATCTG</u>
S12A-FP	AATGGACCAAGAAGAGACGCAACCGAAGGGTTTGATACC
S12A-RP	GGTATCAAACCCTTCGGTTGCGTCTCTTCTTGGTCCATT
TAP-Sonde forw	GGAAAAGAGAAGATGG
TAP-Sonde rev	TCAGGTTGACTTCCC

## 4.2 Wachstum von *S. cerevisiae*- und *E. coli*-Stämmen

### 4.2.1 Medien

Für die Kultivierung von *S. cerevisiae*- und *E. coli*-Stämmen wurden Standardmedien verwendet (Sambrook *et al.*, 1989; Guthrie und Fink, 1991; Ausubel *et al.*, 1992). Alle Medien wurden mit zweifach deionisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt. Der gewünschte pH-Wert wurde mit NaOH bzw. HCl eingestellt und die Medien wurden zur Sterilisation autoklaviert (20 min bei 121 °C). Alle prozentualen Angaben beziehen sich auf Gewicht/Volumen (w/v). Zur Herstellung von Agarplatten enthielten die Medien 2 % Bacto™ Agar. Synthetische Vollmedien und Mineralmedien wurden je nach Bedarf der Stämme mit Aminosäuren und Nukleinbasen supplementiert.

Medien für Hefekulturen	Zusammensetzung
CM / CMEtOH (synthetisches Vollmedium)	0,67 % Yeast-Nitrogen Base w/o Aminoacids 2 % D-Glucose oder Ethanol je 0,0117 % L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure, L-Cystein, L-Glutamin, L-Glutaminsäure, L-Glycin, L-Isoleucin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Threonin, L-Tyrosin, L-Valin, myo-Inosit 0,00117 % p-Aminobenzoesäure Je nach Selektionsbedingungen wurden folgende Supplemente zugefügt: 0,3 mM L-Histidin 1,7 mM L-Leucin 1 mM L-Lysin 0,4 mM L-Tryptophan 0,3 mM Adenin 0,2 mM Uracil pH 5,6
YPD / YPEtOH (Vollmedium)	1 % Hefeextrakt 2 % Bacto™ Pepton 2 % D-Glucose oder Ethanol pH 5,5
YPD-G418	YPD-Medium mit 200-300 mg/l Geneticin

Material und Methoden

„Labeling“ Medium	0,17 % 2 % je 0,002 % je 0,003 % 0,005 % 0,01 % 0,015 % 0,02 % 0,04 % pH 5,6	Yeast-Nitrogen Base w/o Aminoacids D-Glucose oder Ethanol L-Adenin, Uracil, L-Tryptophan, L-Histidin L-Arginin, L-Tyrosin, L-Lysin, L-Leucin L-Phenylalanin L-Glutaminsäure, L-Asparaginsäure L-Valin L-Threonin L-Serin
„Chase“ Medium	Entspricht dem „Labeling“ Medium + 0,6 % Methionin + 0,2 % BSA	
<b>Medien für <i>E. coli</i>-Kulturen</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
LB (Vollmedium)	0,5 % Hefeextrakt 1 % Bacto™ Trypton 0,5 % NaCl pH 7,5	
LB <sub>Amp</sub>	LB-Medium mit 100 mg/l Ampicillin	
SOC	0,5 % Hefeextrakt 2 % Bacto™ Trypton 0,4 % D-Glucose 10 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub> 2,5 mM KCl pH 7,4	
2x YTAG	1 % Hefeextrakt 1,6 % Bacto™ Trypton 0,5 % NaCl 2 % D-Glucose 100 mg/l Ampicillin pH 7,0	



## 4.2.2 Wachstumsbedingungen

### Wachstumsbedingungen der Hefe *S. cerevisiae*

*S. cerevisiae*-Stämme ohne Plasmid wurden als Flüssigkultur in YPD-Medium oder auf YPD-Agarplatten bei 30 °C kultiviert. Die Gegenwart eines Plasmids wurde durch Wachstum in CM-Selektionsmedium oder auf CM-Agarplatten ohne Zugabe des benötigten Marker-Supplements sichergestellt. Stämme auf Agarplatten wurden 2-3 Tage bei 30 °C im Wärmeschrank kultiviert. Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben angezogen, deren Gefäßvolumen dem fünffachen Flüssigkeitsvolumen entsprach. Die Inkubation erfolgte auf einem Rundschtüttler bei 220 Upm (Umdrehungen pro Minute) und 30 °C. Das Zellwachstum der Flüssigkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte von 1:10 (v/v) verdünnten Kulturen bei 600 nm verfolgt. Eine OD<sub>600</sub> von 1,0 entspricht ca. einer Menge von  $2 \cdot 10^7$  Zellen/ml. Die Hefestämme auf den Agarplatten wurden bei 4 °C aufbewahrt und nach mehreren Wochen wieder neu ausgestrichen. Dauerkulturen mit Hefezellen von Agarplatten wurden in sterilem Glycerin mit einer Endkonzentration von 15 % (v/v) angefertigt und bei -80 °C aufbewahrt.

### Wachstumsbedingungen zur Induktion der Katabolitdegradation der FB Pase (Standard-Katabolitaktivierungsexperiment)

Wachsen Hefezellen auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie z.B. Ethanol, so wird die Expression gluconeogenetischer Enzyme, wie der FB Pase, induziert. Dies ist nötig, um die zum Wachstum benötigte Glucose aus nicht-Kohlenhydratvorstufen zu synthetisieren. Steht diesen Zellen dann wieder Glucose zur Verfügung, dann werden die gluconeogenetisch aktiven Enzyme inaktiviert. In der sogenannten Katabolitdegradation werden die Schlüsselenzyme der Gluconeogenese dann abgebaut. Um diesen Prozess mittels Western Blot Analyse verfolgen zu können, wurde zunächst eine Vorkultur in 2 ml glucosehaltigem Flüssigmedium (YPD oder CM Medium) angeimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden 1:12,5 verdünnt und weitere 7 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,25 (ungefähr Faktor 1:17) in ethanolhaltigem Medium angeimpft (YPEtOH oder CMEtOH) und bei 30 °C inkubiert. Nach 16 Stunden wurden 1,5 OD Zellen als Nullprobe geerntet. 15 OD Zellen wurden zentrifugiert (900 x g, 5 min) und dann zur Induktion der Katabolitdegradation der FB Pase in 10 ml glucosehaltigem Medium resuspendiert und bei 30 °C inkubiert. Jeweils 1,5 OD Zellen wurden anschließend nach 30, 60, 90 und 120 min geerntet. Alle Proben wurden zentrifugiert (11000 x g, 1 min), mit 1 ml

Wasser inklusive 20 mM  $\text{NaN}_3$  gewaschen und bis zur alkalischen Lyse bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren.

### **Wachstumsbedingungen der *E. coli***

*E. coli*-Stämme wurden als Flüssigkultur in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  über Nacht kultiviert. Als Selektionsmarker wurde Ampicillin in einer Konzentration von 50-100  $\mu\text{g/ml}$  zugegeben. Dadurch können nur Klone wachsen, die ein Ampicillin-Resistenzgen auf einem Plasmid enthalten. Bei Bedarf kann das Wachstum der Zellen ebenfalls durch Messung der optischen Dichte (siehe Wachstumsbedingungen der Hefe) verfolgt werden. Dauerkulturen wurden mit Zellen von Flüssigkulturen in sterilem Glycerin mit einer Endkonzentration von 30 % (v/v) angelegt und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

## 4.3 Molekularbiologische Methoden

### 4.3.1 Herstellung von Hefestämmen

Die Deletion der Gene *FBP1* und *SNL1* erfolgte nach der Methode von Güldener *et al.* (1996). Vom Plasmid pUG6 wurde mit den Oligonukleotiden P1 *fbpΔ* forw und P2 *fbpΔ* rev bzw. Psn11 *forw* und Psn11 *rev* ein 1,6 kb großes DNA-Fragment amplifiziert, das eine *KANMX4* Kasette enthielt. Die PCR-Produkte wurden in den Stamm mit dem gewünschten genetischen Hintergrund transformiert, es wurde nach Kanamycinresistenz auf YPD-G418 Agarplatten selektioniert. Die korrekte Integration der Deletionskassetten wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden *fbpΔ* control forw / Psn11 control forw und KAN-control rev sowie mit einer Southernblot Analyse überprüft. Bei der Southernblot Analyse wurde eine KAN-Sonde eingesetzt, die mit den Primern KAN-Sonde forw und KAN-Sonde rev amplifiziert wurde. Hieraus resultierten die *FBP1*-Deletionsstämme *GID2-HA<sub>3</sub> fbp1Δ* (YJJ02), *W303-1B fbp1Δ* (YJJ08), *GID1-HA<sub>3</sub> fbp1Δ* (YJJ09) und *GID5-HA<sub>3</sub> fbp1Δ* (YJJ11) sowie die *SNL1*-Deletionsstämme *W303-1B snl1Δ* (YJJ21) und *SSA1 ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ snl1Δ* (YJJ22).

Die Gene *GID1* und *GID6* wurden nach der Methode von Longtine *et al.* (1998) mit einem HA<sub>3</sub>-Epitop versehen. Vom Plasmid pFA6a-3HA-His3MX6 wurde mit den Oligonukleotiden P1 *GID1-HA3* forw und P2 *GID1-HA3* rev sowie *Gid6 pfa6a HA fwd* und *Gid6 pfa6a HA rev* 1,7 kb große DNA-Fragmente amplifiziert, die eine *HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S. pombe</sup>* Integrationskasette enthielten. Die PCR-Produkte wurden nach dem Transformationsprotokoll von Güldener *et al.* (1996) in den Stamm mit dem gewünschten genetischen Hintergrund transformiert, es wurde auf CM<sup>-</sup>HIS Agarplatten selektioniert. Die korrekte Integration der Kasette wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden P3 *GID1-HA3* control forw und P4 *GID1-HA3* control rev überprüft. Des Weiteren wurde überprüft, ob das gewünschte Protein mit HA<sub>3</sub>-Epitop exprimiert wird und ob davon der Abbau der FBPase beeinflusst wird. Hiermit wurden die Stämme *ssa1-45<sup>ts</sup> ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ *GID1-HA<sub>3</sub>** (YJJ18), *SSA1 ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ *GID1-HA<sub>3</sub>** (YJJ19) und *SSA1 ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ *GID6-HA<sub>3</sub>** (YJJ20) erhalten.

Für den Stamm *Gid1-TAP* (YJJ16) wurde zunächst im Stamm *W303-1B* der *trp1* Marker mit einer *HIS5*-Kasette deletiert und dann die *TAP*-Kasette eingeführt. Vom Plasmid pUG27 wurde mit den Primern as9 und as10 ein 1,5 kb großes DNA-Fragment amplifiziert, das eine *trp1Δ::HIS5<sup>S. pombe</sup>* Deletionskasette enthielt. Das PCR-Produkt wurde nach dem Transformationsprotokoll von Güldener *et al.* (1996) in den *W303-1B*-Stamm transformiert

und es wurde anschließend auf CM<sup>-</sup>HIS Agarplatten selektioniert. Die korrekte Integration der Kasette wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden as10 und as11 sowie mit einer Southern Blot Analyse überprüft. Hierbei wurde die Deletionskasette als Sonde eingesetzt. Es wurde der Stamm W303-1B *trp1Δ* (YJJ15) erhalten. Dann wurde vom Plasmid pBS1479 mit den Primern PGid1-TAP forw und PGid1-TAP rev ein 1,7 kb großes DNA-Fragment amplifiziert, das eine *TAP::TRP1<sup>K.L</sup>* Integrationskasette enthielt. Das PCR-Produkt wurde in den Stamm YJJ15 nach dem Protokoll von Güldener *et al.* (1996) transformiert, es wurde auf CM<sup>-</sup>TRP Agarplatten selektioniert. Die korrekte Integration wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden PGid1-TAP forw und TAP-Sonde rev sowie einer Southernblot Analyse überprüft. Bei dieser Analyse wurde eine TAP-Sonde eingesetzt, die mit den Primern TAP-Sonde forw und TAP-Sonde rev amplifiziert wurde. Zusätzlich wurde überprüft, ob das gewünschte Protein mit TAP-Epitop exprimiert wird, hieraus resultierte der Stamm Gid1-TAP (YJJ16).

Die Deletion des *GID8* Gens erfolgte nach der Methode von Güldener *et al.* (1996). Vom Plasmid pUG72 wurde mit den Oligonukleotiden Gid8 forward und Gid8 reverse ein 1,6 kb großes DNA-Fragment amplifiziert, das eine *URA3*-Deletionskasette enthielt. Das PCR-Produkt wurde in den Stamm mit dem gewünschten genetischen Hintergrund transformiert, es wurde auf CM<sup>-</sup>URA Agarplatten selektioniert. Die korrekte Integration der Deletionskasette wurde mittels PCR mit den Oligonukleotiden Gid8 Kontrolle forw und Gid8 reverse überprüft. Hieraus resultierte der Stamm *GID1-HA<sub>3</sub> gid8Δ* (YJJ24).

Das Gen *GID7* wurde nach der Methode von Longtine *et al.* (1998) mit einem HA<sub>3</sub>-Epitop versehen. Vom Plasmid pFA6a-3HA-His3MX6 wurde mit den Oligonukleotiden Gid7-Ha fwd und Gid7-Ha rev ein 1,7 kb großes DNA-Fragment amplifiziert, das eine *HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S. pombe</sup>* Integrationskasette enthielt. Die PCR-Produkte wurden nach dem Transformationsprotokoll von Güldener *et al.* (1996) in den Stamm mit dem gewünschten genetischen Hintergrund transformiert, es wurde auf CM<sup>-</sup>HIS<sup>-</sup>LEU Agarplatten selektioniert. Es wurde überprüft, ob das gewünschte Protein mit HA<sub>3</sub>-Epitop exprimiert wird. Hieraus resultierte der Stamm *fbp1Δ GID7-HA<sub>3</sub>* (YJJ01).

### 4.3.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe

2 ml einer YPD-Übernachtskultur wurden zentrifugiert (4 min, 600 x g), die Zellen wurden mit 1 ml Wasser gewaschen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Zu diesen Zellen wurden 200 µl Lysepuffer („breaking buffer“), 200 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) und 200 µl Glasperlen gegeben. Die Zellen wurden 10 min auf einem Multivortexer bei 4 °C aufgeschlossen, dann wurden 200 µl Wasser zugegeben und es wurde 10 min bei 11000 x g zentrifugiert. Ungefähr 300 µl der wässrigen Phase wurden abgenommen, mit 1 ml kaltem 100 %igen Ethanol versetzt und 20 min bei -80 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 11000 x g und bei 4 °C wurde das DNA-Pellet in 400 µl Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 3 µl einer RNase-Lösung (10 mg/ml) wurde 5 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 10 µl 3 M Ammoniumacetat-Lösung und 1 ml kalter 100 %iger Ethanol zugegeben. Nach einer Inkubation von 15 min bei -80 °C wurde zentrifugiert (10 min, 11000 x g), das Pellet wurde mit 1 ml kaltem 70 %igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl Wasser aufgenommen.

Lysepuffer:	2 %	Triton X-100 (v/v)
	1 %	SDS (w/v)
	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	1 mM	EDTA pH 8,0

### 4.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe („plasmid rescue“)

Eine stationäre Hefevorkultur in 2,5 ml YPD oder eine streichholzkopfgroße Menge Hefezellen von einer Agarplatte (in 500 µl Wasser resuspendiert) wurden 4 min bei 600 x g zentrifugiert und dann mit 1 ml Wasser gewaschen. Dazu wurden 200 µl Lysepuffer (siehe Isolierung chromosomaler DNA), 200 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) und 200 µl Glasperlen gegeben. Die Zellen wurden am Vortexer 2 min lang aufgeschlossen, dann wurde zentrifugiert (5 min, 11000 x g). Vom Überstand wurden 100 µl abgenommen und mit 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung und 280 µl kaltem 100 %igem Ethanol versetzt. Die DNA wurde 5 min bei -80 °C gefällt, danach wurde 5 min bei 11000 x g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 1 ml kaltem 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Wasser resuspendiert.

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Protokoll der Hersteller mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit oder dem GenJET™ Plasmid Miniprep Kit.

#### 4.3.5 Southern Blot Analyse

Chromosomale DNA (30 µg) wurde in einem 20 µl Standardansatz mit geeigneten Restriktionsenzymen (20 Units) über Nacht bei 37 °C verdaut. Es wurden 5 Units Enzym nachgelegt und weitere 2 Stunden inkubiert. Die Proben wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, anschließend wurde die DNA auf eine Hybond™-N+ Membran transferiert. Dafür wurde das Agarose-Gel jeweils 10 min mit Denaturierungs- und Neutralisierungspuffer behandelt, mit 20x SSC-Puffer überschichtet und die DNA dann über einen Zeitraum von 1 h mittels angelegtem Vakuum auf die Nylonmembran übertragen. Danach wurde die DNA durch fünfminütiges Bestrahlen mit UV-Licht auf der Membran fixiert. Die Präparation der Sonde sowie die Detektion erfolgte nach Angaben des Herstellers (Amersham, AlkPhos Direct™ Labeling and Detections Systems). Die Sonde wurde aus einem PCR-Fragment, homolog zur chromosomal integrierten DNA, hergestellt. Für die Sonde wurden 100 ng DNA eingesetzt.

Denaturierungspuffer:	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH
Neutralisierungspuffer:	0,5 M Tris/HCl pH 7,0 3,0 M NaCl
20fach SSC-Puffer:	3,0 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0

### 4.3.6 Zelltransformationen

#### Transformation von Hefezellen nach der Lithiumacetat-Methode

Es wurde zunächst eine Übernachtvorkultur der Hefezellen in 3 ml YPD angeimpft, nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase wurden 20 ml YPD auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 angeimpft. Nachdem eine OD<sub>600</sub> von 0,8 erreicht war (nach ungefähr 3 Stunden) wurden 8 OD Zellen zentrifugiert (5 min, 900 x g), mit 1 ml Wasser und mit 1 ml Li-Sorbitol gewaschen und in 500 µl Li-Sorbitol resuspendiert. Aliquots mit 50 µl Zellsuspension wurden mindestens 15 min bei 30 °C inkubiert. Je Ansatz wurden 5 µl Heringssperma-DNA (ssDNA; 10 mg/ml), 5 µl Plasmid-DNA, 300 µl 40 % PEG (frisch zubereitet) und 37,5 µl DMSO zugegeben und durchmischt. Es wurde 30 min bei 30 °C, dann 15 min bei 42 °C inkubiert und anschließend 5 min bei 600 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 µl Wasser aufgenommen und auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert.

Li-Sorbitol:	30 ml	10x LiOAc
	30 ml	10x TE
	54,69 g	Sorbitol
	mit Wasser auf 300 ml auffüllen	
40 % PEG:	240 µl	50 % PEG (w/v)
	30 µl	10x LiOAc
	30 µl	10x TE
10x LiOAc:	1 M	LiOAc
10x TE:	100 mM	Tris/HCl pH 7,5
	10 mM	EDTA pH 7,5

#### Transformation von Hefezellen nach Güldener

Die Transformation von Deletions- oder Integrationskassetten wurde nach Güldener *et al.* (1996) durchgeführt. Es wurde zunächst eine Übernachtvorkultur der Hefezellen in 3 ml YPD angeimpft, nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase wurden die Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,2 in 50 ml YPD-Medium angeimpft. Nachdem eine OD<sub>600</sub> von 0,8 erreicht war (nach ungefähr 3 Stunden) wurden die Zellen 5 min bei 900 x g zentrifugiert, mit 10 ml

Wasser, dann mit 1 ml Wasser gewaschen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1 ml TE/LiOAc-Puffer wurde das Zellpellet in 200 µl TE/LiOAc-Puffer resuspendiert. Je 50 µl Zellsuspension, 9 µg DNA (Deletions- oder Integrationskassette), 5 µl ssDNA (10 mg/ml) und 300 µl 40 % PEG versetzt. Die Proben wurden 30 min bei 30 °C und 15 min bei 42 °C inkubiert. Es wurden 800 µl steriles Wasser zugegeben, zentrifugiert (10 s, 11000 x g) und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1 ml YPD resuspendiert und 2 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurde zentrifugiert (3 min, 600 x g) und die Zellen wurden auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert.

TE/LiOAc:	100 mM	LiOA
	10 mM	Tris/HCl pH 7,5
	1 mM	EDTA pH 7,5

### **Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für Elektrottransformationen**

*DH5α*-Zellen wurden in 20 ml LB-Medium bei 37 °C über Nacht inkubiert. Von dieser Vorkultur wurde eine Hauptkultur mit 1 l LB-Medium (Verdünnung 1:100) angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1 herangezogen. Die folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden 15-30 min auf Eis gestellt und dann 10 min bei 3350 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 1 l kaltem Wasser, dann 500 ml Wasser und abschließend mit 20 ml 10 % Glycerin (v/v) gewaschen. Die Zellen wurden dann in 2-3 ml 10 %igem Glycerin (v/v) resuspendiert, es wurden Aliquots à 40 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

### **Elektrottransformation von *E. coli*-Zellen**

Kompetente *E. colis* wurden auf Eis aufgetaut. Je 40 µl Zellsuspension wurde mit 1 µl DNA (DNA einer Ligation oder Plasmid-DNA) versetzt und 1 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz in eine kalte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektrottransformation wurde mit Hilfe des *Gene Pulser*<sup>®</sup> (BioRad) durchgeführt. Es wurden folgende Geräteeinstellungen gewählt: 25 µF, 200 Ω und 2,5 V. Danach wurde sofort 1 ml SOC-Medium zugegeben und die Zellsuspension wurde in einem Eppendorfgefäß 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Es wurde 1 min bei 11000 x g zentrifugiert, die Zellen wurden in 50 µl Wasser resuspendiert und auf LB<sub>Amp</sub>-Platten ausplattiert. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht.

Um die Ausbeute der Transformation zu erhöhen, wurde die DNA vor der Transformation entsalzt. Auf eine Nitrocellulosemembran in einer Petrischale mit ddH<sub>2</sub>O wurden 1-5 µl



Plasmid-DNA gegeben. Nach 30 min wurde die Dialyse beendet und die DNA wurde transformiert.

### Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für Hitzeschocktransformationen

*DH5 $\alpha$* -Zellen wurden in 20 ml LB-Medium bei 37 °C über Nacht inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 2,5 ml in 500 ml LB-Medium angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 herangezogen. Die folgenden Schritte wurden an der Sterilbank und auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden gekühlt und dann 15 min bei 3350 x g und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 100 ml kaltem TFB1 Puffer gewaschen und dann in 20 ml kaltem TFB2 Puffer aufgenommen. Es wurden Aliquots à 500  $\mu$ l bei –80 °C eingefroren.

TFB1 Puffer:	30 mM	KOAc
	50 mM	MnCl <sub>2</sub>
	100 mM	KCl
	10 mM	CaCl <sub>2</sub>
	15 %	Glycerin (v/v)

TFB2 Puffer:	10 mM	MOPS pH 7,0
	75 mM	CaCl <sub>2</sub>
	10 mM	KCl
	15 %	Glycerin (v/v)

### Transformation von *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock

Aliquots mit kompetenten *E. colis* wurden auf Eis aufgetaut. Es wurden 100  $\mu$ l *E. colis* mit 20  $\mu$ l DNA eines Ligationsansatzes oder 3  $\mu$ l Plasmid-DNA versetzt und 35 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein Hitzeschock, eine Inkubation von 90 s bei 42 °C, danach wurde wieder 20 min auf Eis inkubiert. Der Transformations-Mix wurde in ein steriles Eppendorfgefäß mit 1 ml SOC-Medium gegeben, nach einer Inkubation von 60 min bei 37 °C auf dem Schüttler wurde 5 min bei 600 x g zentrifugiert. Es wurden 900  $\mu$ l Überstand abgenommen, das Pellet wurde im restlichen SOC-Medium resuspendiert und auf LB<sub>Amp</sub>-Platten ausplattiert. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C über Nacht.

### 4.3.7 PCR

#### Standardprotokoll einer PCR

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) können beliebige DNA-Fragmente amplifiziert werden. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem *RoboCycler<sup>®</sup> Gradient 40* (Stratagene) oder *T-Personal Thermal Cycler* (Biometra) mit entsprechenden Temperaturprogrammen. Ein 50 µl-Standardansatz enthielt 1 µl einer Lösung mit der Zielsequenz (aus analytischen Präparationen), je 2 µl der Primer (flankierende Sequenzen, 1:5 verdünnt), 1 µl eines Gemisches aller vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (Endkonzentration 10 mM), 10 µl Puffer (5x konzentriert) und 0,5 µl Phusion DNA-Polymerase. Mit sterilem Wasser wurde das Volumen auf 50 µl aufgefüllt. Die DNA-Polymerase wurde nach dem ersten Denaturierungsschritt zupipettiert („hot start“). Der Ablauf der PCR setzte sich aus 3 Schritten zusammen: Denaturierung der Matrizen-DNA bei 98 °C für 5 min und dann 30 Zyklen von je 30 s Dauer Denaturierung bei 98 °C, 30 s Hybridisierung der Oligonukleotide bei der Hybridisierungstemperatur und Elongation der Oligonukleotide durch die DNA-Polymerase bei 72 °C. Die Elongationszeit war von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes abhängig. Für die Synthese von 1000 Nukleotiden wurde eine Zeitdauer von 30 s angesetzt. Die Hybridisierungstemperatur der jeweiligen Reaktion wurde 2 °C unter der niedrigsten Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonukleotide (Primer) gewählt. Die Schmelztemperatur wurde wie folgt berechnet:

$$T_m = 4 \cdot (G+C) + 2 \cdot (A+T)$$

#### Mutagenese-PCR (Stratagene)

Diese Mutagenese-PCR wurde nach dem Protokoll des Herstellers Stratagene mit dem *QuikChange<sup>®</sup> XL Site-Directed Mutagenesis Kit* durchgeführt. Hierfür wurden zwei Primer konstruiert, welche die gewünschte Mutation in der Sequenz enthalten. Es wurde 10 ng Plasmid-DNA, je 2 µl der Primer (1:5 verdünnt), 1 µl dNTP Mix (siehe Standardprotokoll einer PCR), 5 µl 10x Reaktionspuffer, 3 µl QuikSolution und 1 µl *PfuTurbo* DNA-Polymerase mit Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Die PCR erfolgte mit folgendem Temperaturprogramm:

1x	95 °C, 1 min
18x	95 °C, 50 sec
	60 °C, 50 sec
	68 °C, 10 min
1x	68 °C, 7 min

Danach wurde zu den PCR-Ansätzen 1 ml *DpnI*-Enzym gegeben, um die methylierte, ursprüngliche Plasmid-DNA zu verdauen. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37 °C wurde die DNA in XL10-Gold ultrakompetente Zellen transformiert. Hierzu wurden 2 ml des Verdauansatzes mit 47 ml Zellen und 2 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock von 30 sec bei 42 °C und eine Inkubation von 2 min auf Eis. Zu den Zellen wurde 0,5 ml vorgewärmtes SOC-Medium gegeben, sie wurden 60 min bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert, auf Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Von verschiedenen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert.

### **Mutagenese-PCR (Clontech)**

Die Mutagenese-PCR wurde nach dem Protokoll des Herstellers Clontech mit dem *Transformer<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit* durchgeführt. Hierfür wurden zwei Primer konstruiert: ein Primer enthält die Sequenz mit der gewünschte Mutation im Gen (Mutationsprimer) und die Sequenz des anderen Primers ist homolog zum „Backbone“ des Plasmids und trägt eine Mutation, die dazu führt dass eine vorhandene Restriktionsschnittstelle verloren geht (Selektionsprimer). Die Primer wurden so ausgewählt, dass die Mutationssequenz in der Mitte der Primersequenz liegt mit ungefähr 15 Basenpaaren Überlappung auf jeder Seite und dass die Hybridisierungstemperaturen der beiden Primer ungefähr gleich sind.

Zunächst mussten die Primer phosphoryliert werden. Hierzu wurde je 1  $\mu$ l Primer in einem Eppendorfgefäß mit 2  $\mu$ l 10 mM ATP (Roche), 1  $\mu$ l T4 Polynukleotidkinase (NEB), 14  $\mu$ l Wasser und 2  $\mu$ l Kinasepuffer versetzt und 60 min bei 37 °C sowie 10 min 65 °C inkubiert. Die phosphorylierten Primer wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Es wurden 300 ng Plasmid-DNA, 2  $\mu$ l 10x Annealingpuffer und je 4  $\mu$ l der beiden phosphorylierten Primer vereint, das Volumen wurde mit Wasser auf 20  $\mu$ l aufgefüllt. Die verschiedenen Ansätze wurden in einem kochenden Wasserbad 6,5, 8 oder 9 min inkubiert und danach sofort 5 min auf Eis gestellt. Nach diesem Hybridisierungsschritt erfolgte nun die Synthese des DNA-Doppelstrangs. Hierfür wurden zu jedem Ansatz 3  $\mu$ l 10x Synthesepuffer, 1  $\mu$ l T4 DNA-Polymerase (NEB), 1  $\mu$ l T4 DNA-Ligase (Invitrogen), 1  $\mu$ l 100 mM ATP, 3  $\mu$ l BSA (1 mg/ml) und 1  $\mu$ l Wasser gegeben und 1-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Synthesereaktionen wurden gestoppt, indem die Proben 5 min auf 70°C erhitzt wurden.

Um das Ausgangsplasmid zu entfernen, welches keine Mutation trägt, wurden alle Proben mit dem Restriktionsenzym verdaut, welches keine Restriktionsschnittstelle mehr in der

mutierten Plasmid-DNA enthielt. Hierfür wurden zu jedem Ansatz 1 µl Restriktionsenzym, 4 µl des benötigten 10x Puffers und 5 µl Wasser zugegeben und 1-2 Stunden bei der benötigten Temperatur inkubiert. Dann wurden 7 µl jeder Probe in den *E. coli*-Stamm *BMH 71-18 mutS* nach dem Protokoll des Herstellers transformiert und in einem 15 ml-Reaktionsgefäß in LB<sub>Amp</sub>-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde dann isoliert und erneut verdaut. Es wurden 10 µl Plasmid-DNA, 0,5 µl Restriktionsenzym (Enzym zur Selektion), 2 µl Restriktionspuffer, 2 µl BSA (1 mg/ml) und 5 µl Wasser 1-2 Stunden bei der benötigten Restriktionstemperatur inkubiert. Danach wurden 1-2 µl des Verdauansatzes in den *E. coli*-Stamm *DH5α* mittels Hitzeschockverfahren transformiert, auf LB<sub>Amp</sub>-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von verschiedenen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und mittels Restriktionsverdau auf die vorhandene Mutation überprüft. Von positiven Klonen wurde die DNA sequenziert.

T4 Kinasepuffer:	500 mM	Tris/HCl pH 7,5
	100 mM	MgCl <sub>2</sub>
	50 mM	DTT
	10 mM	ATP
10x Annealingpuffer:	200 mM	Tris/HCl pH 7,5
	100 mM	MgCl <sub>2</sub>
	500 mM	NaCl
10x Synthesepuffer:	100 mM	Tris/HCl pH 7,5
	5 mM	dNTPs
	10 mM	ATP
	20 mM	DTT

#### 4.3.8 DNA-Fällung

Für eine Fällung wurde die DNA (Plasmid-DNA oder PCR-Produkt) mit dem 0,1x Volumen an 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,0 und dem 2,5x Volumen an kaltem 100 %igem Ethanol versetzt und mindestens 30 min bei -20 °C oder -80 °C inkubiert. Danach wurden die Proben 30 min bei 11000 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 30 bis 60 min bei Zimmertemperatur getrocknet. Die DNA wurde in 20-30 µl Wasser resuspendiert.

### 4.3.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Diese wurde in einer Flachbett-Elektrophoresekammer mit 0,8 %igen Agarose-Gelen in TAE-Puffer durchgeführt. Es wurden 3-10 µl der DNA-Proben mit 2 µl DNA-Probenpuffer versetzt, die Fragmente wurden bei 120 V aufgetrennt. Als Längenstandard diente 1 kb DNA-Leiter. Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele mit dem Dokumentationssystem der Firma MWG Biotech unter UV-Licht (302 nm) dokumentiert. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde das QIAquick® Gel Extraction Kit verwendet. Die Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

TAE Puffer:	40 mM	Tris/HOAc, pH 7,0
	1 mM	EDTA
0,8 %iges Agarose-Gel:	0,8 %	Agarose (w/v) in TAE Puffer
	0,5 µg/ml	Ethidiumbromid
DNA-Probenpuffer:	50 %	Glycerin (v/v) in 10x TAE Puffer
	0,1 %	Bromphenolblau (w/v)

### 4.3.10 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

In einer Standardreaktion wurden 3 µl der in Wasser gelösten Plasmid-DNA mit 0,3 µl des Enzyms und 1 µl des entsprechenden Puffers in einem Volumen von 10 µl bei der für das Enzym erforderlichen Temperatur 2 h inkubiert. Als Puffer wurden die mit dem Enzym mitgelieferten, 10x konzentrierten Inkubationspuffer eingesetzt. Das benötigte Puffersystem wurde anhand einer von der Herstellerfirma mitgelieferten Tabelle ermittelt. Doppelverdaus wurden bei den für beide Restriktionsenzymen optimalen Pufferbedingungen durchgeführt.

#### **4.3.11 Ligation von Plasmid-DNA Fragmenten**

In einem 20 µl Ansatz wurde das geschnittene Plasmid und das DNA-Fragment im Verhältnis 1:3 bis 1:5 eingesetzt. Nach Zugabe von 2 µl 10x Ligasepuffer und 1 µl 5x T4 DNA-Ligase wurde der Reaktionsansatz mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt und über Nacht bei 18 °C ligiert. Es wurden dann nochmals 0,5 µl 5x T4 DNA-Ligase zugegeben, und mehrere Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Die DNA wurde dann in *E. coli*-Zellen transformiert (siehe Transformationen).

#### **4.3.12 Plasmid-DNA-Sequenzierung**

Aus einer *E. coli*-Übernachtskultur wurde die Plasmid-DNA mittels QIAprep® Spin Miniprep Kit oder dem Gene Jet™ Plasmid Miniprep Kit nach Firmenvorschrift in hoher Reinheit isoliert. Die eluierte DNA wurde zur Sequenzierung an die Firma MWG Biotech geschickt, welche auch die benötigten Primer synthetisierte oder es wurden Primer in der Konzentration 10 pmol/µl mitgeschickt.

## 4.4 Proteinchemische Methoden

### 4.4.1 Alkalische Lyse von Hefezellen

Die alkalische Lyse ist ein denaturierender Zellaufschluss und eignet sich z.B. für Western Blot Analysen. Die Zellen wurden bis zur gewünschten OD<sub>600</sub> angezogen, es wurde ein Volumen entnommen welches einer OD<sub>600</sub> von 1,5 entsprach. Danach wurde 1 min bei 11000 x g zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl Lyse-Lösung erfolgte eine Inkubation von 10 min auf Eis. Zum Präzipitieren der Proteine wurde anschließend 150 µl 50% ige TCA (w/v) zugesetzt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden 10 min bei 11000 x g zentrifugiert, danach wurde der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit 500 µl kaltem Aceton gewaschen, getrocknet und durch eine Inkubation von 30 min bei 37 °C oder 10 min bei 96°C unter Schütteln in 50 µl Harnstoffprobenpuffer gelöst.

Lyse-Lösung:	1,85 M	NaOH
	7,5 %	β-Mercaptoethanol
Harnstoffprobenpuffer:	200 mM	Tris/HCl pH 6,8
	8 M	Harnstoff
	0,1 M	EDTA
	5 %	SDS (w/v)
	1 %	β-Mercaptoethanol (v/v)
	0,05 %	Bromphenolblau (w/v)

### 4.4.2 Nativer Zellaufschluss

Es wurden zu den gewünschten Zeitpunkten 30-50 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet, mit 1 ml 20 mM NaN<sub>3</sub> in Wasser gewaschen und in 600 µl PBS-Puffer mit Inhibitoren (Complete™; 1,1 mM PMSF; je 1 µg/ml Antipain, Pepstatin A, Chymostatin, Leupeptin) resuspendiert. Die Zellen wurden bei 4 °C mit 300 µl Glasperlen 20 min auf einem Multivortexer aufgeschlossen. Nach dem Zentrifugieren (11000 x g, 10 min) wurden 500 µl des Überstands in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dieses Zelllysate wurde entweder mit Probenpuffer versetzt und auf native Gele aufgetragen oder in Immunopräzipitationsexperimenten weiter bearbeitet.

PBS-Puffer:	137 mM	NaCl
	9 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	3 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

#### 4.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in SDS-Laufpuffer durchgeführt (Lämmli, 1970). Es wurden hauptsächlich 7,5 %ige und 10 %ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Zunächst wurde das Trenngel gegossen, mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet und 30 min polymerisiert. Dann wurde das Sammelgel gegossen und mindestens 20 min polymerisiert. Pro Bahn wurden 10-20 µl Proteinlösung in Harnstoff- oder Lämmli-Puffer aufgetragen. Als Größenstandard wurde ein Proteinmarker aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80-150 V.

SDS-Laufpuffer:	25 mM	Tris
	200 mM	Glycin
	1 %	SDS (w/v)

Komponenten	7,5 %iges Trenngel	10 %iges Trenngel	12 %iges Trenngel	Sammelgel
ddH <sub>2</sub> O	4,85 ml	4,02 ml	3,35 ml	6,1 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
0,5 M Tris pH 6,8	-	-	-	2,5 ml
10 % SDS (w/v)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Acrylamidlösung (30 %)	2,5 ml	3,33 ml	4,0 ml	1,3 ml
10 % APS (w/v)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	10 µl



#### 4.4.4 Native Gele

##### **Nativer Zellaufschluss und Verdau mit $\lambda$ -Proteinphosphatase**

Es wurden Zellen unter Katabolitinaktivierungsbedingungen angezogen, zu den gewünschten Zeitpunkten wurden 30 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet, mit 1 ml Wasser gewaschen und in 200  $\mu$ l PBS-Puffer mit Inhibitoren (Complete<sup>TM</sup>; 1,1 mM PMSF; je 1  $\mu$ g/ml Antipain, Pepstatin A, Chymostatin, Leupeptin, je 1/100 Volumen Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2) resuspendiert. Die Zellen wurden bei 4 °C mit 200  $\mu$ l Glasperlen 20 min auf einem Multivortexer aufgeschlossen. Nach dem Zentrifugieren (11000 x g, 10 min) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfggefäß überführt und auf Eis aufbewahrt. 50  $\mu$ l der Proben wurden mit 10  $\mu$ l 5x Probenpuffer versetzt, alle Proben wurden auf Eis aufbewahrt.

Für einen Verdau wurden 45  $\mu$ l Lysat mit 5  $\mu$ l 10x Proteinphosphatasepuffer und 1  $\mu$ l  $\lambda$ -Proteinphosphatase versetzt und 1,5 h bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Proben mit 10,2  $\mu$ l 5x Probenpuffer versetzt und bis zur Gelelektrophorese auf Eis aufbewahrt.

##### **Native Gelelektrophorese und Western Blot**

Zur Auftrennung von nativen Proteinen wurde eine kontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem 1x Tris/Glycin-Elektrophoresepuffer durchgeführt (Ausubel *et al.*, 1992; Betts *et al.*, 1999). Es wurden 7,5 %ige kontinuierliche native Polyacrylamid-Gele verwendet. Aufgrund der Isoelektrischen Punkte von FBPase und den Gid Proteine wurden die Puffer auf pH 8,8 eingestellt.

Es wurden 10-20  $\mu$ l eines nativen Proteinmarkers, der in 100  $\mu$ l PBS Puffer gelöst und mit 20  $\mu$ l 5x Probenpuffer versetzt wurde, aufgetragen. Die nativen Proteinproben wurden 1 min bei 4 °C vorgetext. Von den Lysatproben wurden 13,3  $\mu$ l und von den mit  $\lambda$ -Proteinphosphatase verdauten Proben wurden 15  $\mu$ l auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Stromstärke von 15 mA pro Gel und bei 4 °C. Nach der Gelelektrophorese wurde das Gel 10 min in Transferpuffer mit 0,1 % SDS (w/v) geschwenkt, danach erfolgte ein Western Blot (Nassblot-Verfahren).

## Material und Methoden

---

Polyacrylamid-Gel pH 8,8:	19,78 ml	ddH <sub>2</sub> O
	10 ml	4x Tris-Gelpuffer pH 8,8
	10 ml	Acrylamidlösung (30 %)
	200 µl	10 % APS (w/v)
	20 µl	TEMED
4x Tris-Gelpuffer:	200 mM	Tris/HCl pH 8,8
1x Tris/Glycin-Elektrophoresepuffer:	25 mM	Tris
	200 mM	Glycin
5x Probenpuffer:	32 mM	Tris/HCl pH 8,8
	50 %	Glycerin (v/v)
	0,25 %	Bromphenolblau (w/v)
10x Proteinphosphatasepuffer:	500 mM	Tris/HCl pH 7,5
	1 M	NaCl
	1 mM	EGTA
	0,1 %	Triton X-100 (v/v)
	20 mM	DTT
	20 mM	MnCl <sub>2</sub>

### 4.4.5 Färben von SDS-Gelen

#### Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Färbung ist dazu geeignet, Proteine der Konzentration von 50-400 ng (in Abhängigkeit der gewählten Methode) im SDS-Gel anzufärben. Nach der SDS-PAGE wurde ein SDS-Gel in einer Glaswanne mit ca. 50 ml Coomassie-Lösung versetzt, vorsichtig in der Mikrowelle erwärmt und 10 min auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Färbelösung wieder abgegossen und das Gel solange mit Coomassie-Entfärbelösung gewaschen, bis diskrete Proteinbanden sichtbar waren. Anschließend wurde das Gel auf einem Filterpapier im Gelrockner bei 60 °C mit angeschlossener Vakuumpumpe mindestens 90 min lang getrocknet.

## Material und Methoden

---

Coomassie-Lösung:	0,02 %	Coomassie Brilliant Blue G250 (w/v)
	25 %	EtOH (v/v)
	8 %	HOAc (v/v)
Coomassie-Entfärberlösung:	40 %	MeOH (v/v)
	10 %	HOAc (v/v)

### Silberfärbung

Die Silberfärbung nach Shevchenko *et al.* (1996) färbt Proteine in einer Konzentration von 1-20 ng im SDS-Gel an und ist besonders für nachfolgende massenspektroskopische Untersuchungen der Proteine geeignet. Um Proteinkontaminationen zu vermeiden, wurden alle Arbeitsschritte mit Handschuhen, frischen Lösungen und sauberen Gefäßen durchgeführt. Alle Schritte erfolgten unter Schütteln des Gels.

Nach der SDS-PAGE wurde das SDS-Gel in einer Glaswanne mit Fixierlösung überschichtet und 20 min inkubiert. Dann wurde das Gel 10 min mit 50 %igem Methanol (v/v) und 10 min mit Wasser gewaschen. Das Gel wurde 1 min mit 0,02 %iger Natriumthiosulfat-Lösung inkubiert und zweimal 1 min mit Wasser gewaschen. Danach wurde kalte 0,1 %ige Silbernitratlösung zugegeben und 20 min bei 4 °C inkubiert. Das Gel wurde zweimal 1 min mit Wasser gewaschen und dann mit Färbelösung überschichtet. Nachdem die gewünschte Farbintensität der Proteinbanden erreicht war, wurde die Färbereaktion mit 5 %iger Essigsäure gestoppt. Bis zur Auswertung wurde das mit 1 %iger Essigsäure überschichtete Gel bei 4 °C aufbewahrt.

Fixierlösung:	50 %	MeOH (v/v)
	5 %	HOAc (v/v)
Färbelösung:	0,04 %	Formaldehyd (v/v)
	2 %	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (w/v)

## 4.4.6 Western Blot

### „Semi-dry blot“-Verfahren

Man unterzieht die Proben zunächst einer SDS-PAGE. Die aufgetrennten Proteine wurden dann in einer „Semi-dry blot“-Apparatur auf eine Polymerschicht (Nitrocellulose) überführt. Dazu wurden pro Polyacrylamid-Gel 6 Blatt Filterpapier und 1 Blatt Nitrocellulosemembran in Blotting-Puffer getränkt und zu einem „Sandwich“ aufgebaut. Es wurde 90 min lang eine Spannung von 20 V (bei maximal 75 mA pro Gel) angelegt, um die Proteine vom Gel auf die Nitrocellulosemembran zu transferieren. Danach wurde die Membran über Nacht in Coating-Lösung (siehe Immunodetektion) inkubiert.

Blotting-Puffer:	11 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	16 %	MeOH (v/v)

### Nassblot-Verfahren

Für den Transfer von Proteinen mit höherer molekularer Masse oder auch polyubiquitinierten Proteinen, wurde das Nassblot-Verfahren („Wet-Tank-Blotting“) angewendet. Das SDS-Gel mit den aufgetrennten Proteinen, Filterpapiere und eine Nitrocellulose-Membran wurden zu einem „Sandwich“ in einer speziellen Halterung aufgebaut. Die Halterungen wurden in einer *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* mit Transfer-Puffer überschichtet, die Apparatur wurde mit Eis gekühlt. Der Transfer wurde für 2 h bei 300 mA durchgeführt.

Transfer-Puffer:	25 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	0,02 %	SDS (w/v)
	20 %	MeOH (v/v)

#### 4.4.7 Immunodetektion von Proteinen

Die durch Western Blotting erhaltene Nitrocellulosemembran wurde zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen zunächst über Nacht oder 1 h bei Raumtemperatur in Coating-Lösung (10 % Milchpulver in TBS-T Puffer) auf einem Tischschüttler inkubiert und anschließend zweimal 10 min mit TBS-T Puffer gewaschen. Danach wurde die Membran mit einem Primärantikörper (Verdünnungen siehe Antikörper) in 25 ml TBS-T Puffer 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min mit TBS-T Puffer gewaschen. Es erfolgte dann die Zugabe eines mit HRPO-markierten sekundären Antikörpers in 5-25 ml TBS-T Puffer. Nach einer Inkubation von 1 h wurde einmal 10 min und dreimal 5 min mit TBS-T Puffer gewaschen. Es wurden auf die Nitrocellulosemembran 500 µl bis 1 ml ECL-Lösung aufgetragen, 1 min inkubiert und im Anschluss sofort ein lichtempfindlicher ECL-Film aufgelegt und entwickelt.

TBS-T Puffer:	137 mM	NaCl
	0,1 %	Tween-20 (v/v)
	20 mM	Tris/HCl pH 7,6

#### 4.4.8 Immunopräzipitationsexperiment (IP)

Die Zellen für Co-Immunopräzipitationsexperimente (Co-IP) wurden wie bei Katabolitinaktivierungsexperimenten in glucosehaltigem Medium angezogen, auf eine Zelldichte von OD<sub>600</sub> 0,25 angeimpft und dann 16 h in ethanolhaltigem Medium inkubiert. Es wurden zu den gewünschten Zeitpunkten, vor und nach Glucosezugabe, 30-50 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet, mit 1 ml 20 mM NaN<sub>3</sub> in Wasser gewaschen und in 600 µl PBS-Puffer mit Inhibitoren aufgenommen und nativ aufgeschlossen (siehe Nativer Zellaufschluss). Danach wurden 500 µl des Überstands in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dazu wurden je 3 µl FBPase-Antikörper gegeben und die Proben wurden 2 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Um die Immunopräzipitate zu sammeln, wurden 50 µl 5 %ige Protein A Sepharose™ CL-4B (w/v) zugegeben. Die Sepharose wurde vorher 1 h lang oder über Nacht mit 10 %iger BSA-Lösung (w/v) geblockt. Nach einer weiteren Inkubation von 1,5 h bei 4 °C wurden die „Beads“ zentrifugiert (1 min, 400 x g) und fünfmal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen. Je nach Experiment wurde dem Waschpuffer bis zu 1 % Triton X-100 (v/v) zugesetzt. Um die Proteine von der Sepharose zu lösen, wurde 50 µl Harnstoffpuffer (siehe Alkalische Lyse) zu den Proben gegeben und es wurde 30 min bei 37 °C inkubiert, danach

wurde eine SDS-PAGE durchgeführt.

#### **4.4.9 Polyubiquitinierungsversuch**

Die Stämme wurden wie bei einem Katabolitinaktivierungsexperiment angezogen. Es wurden zu den Zeitpunkten 0 und 25 min nach Glucosezugabe 30 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet, 4 min bei 500 x g und 4 °C zentrifugiert, mit 1 ml Wasser inklusive Inhibitoren (10 mM NEM, 20 mM NaN<sub>3</sub>, 1 mM PMSF) gewaschen und in 600 µl eiskaltem PBS pH 7,4 mit Protease-Inhibitoren (Complete™; 1,1 mM PMSF; je 1 µg/ml Antipain, Pepstatin A, Chymostatin, Leupeptin) aufgenommen. Nach Zugabe von 300 µl Glasperlen wurden die Zellen 20 min bei 4 °C auf einem Multivortexer aufgeschlossen. Nach dem Zentrifugieren von 10 min bei 11000 x g und 4 °C wurde der Überstand mit 80 µl 50 %iger IgG Sepharose (w/v) in PBS Puffer versetzt und 3 h bei 4 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose „Beads“ wurden viermal mit 1 ml PBS Puffer mit zusätzlich 150 mM NaCl und 1 % Triton X-100 (v/v) und einmal mit 1 ml PBS Puffer gewaschen. Danach wurden die „Beads“ mit 50 µl Harnstoffpuffer (siehe Alkalische Lyse) versetzt, 30 min bei 37 °C inkubiert und für eine SDS-PAGE eingesetzt. Nachdem die Proteine mittels des Nassblot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran transferiert waren, wurde diese im Tischautoklaven autoklaviert und mit 20 %igem hitzeinaktiviertem BSA (w/v) in TBS-T Puffer 1 h lang geblockt. Die Hitzeinaktivierung der BSA-Lösung erfolgte durch eine Inkubation von 30 min bei 65 °C. Danach erfolgte die Immunodetektion mit monoklonalen Ubiquitin-Antikörpern.

#### **4.4.10 Pulse-Chase Analyse**

Von einer stationäre Vorkultur wurde eine Kultur in „Labeling“ Medium mit Glucose auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und über Nacht inkubiert. Von jedem Hefestamm wurden 20 OD<sub>600</sub> Zellen entnommen, zentrifugiert (3 min, 900 x g) und mit Wasser gewaschen. Diese Zellen wurden in 10 ml „Labeling“ Medium mit Ethanol resuspendiert und in einem Wasserbad bei 25 °C 2,5 h inkubiert. Dann wurden 25 µl <sup>35</sup>S-Methionin zugegeben und es wurde weitere 2,5 h bei 25 °C und 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen 5 min bei 400 x g zentrifugiert und in 6,5 ml „Chase“ Medium mit Glucose resuspendiert und bei 37 °C inkubiert. Es wurde sofort sowie dann alle 30 min eine Probe mit 1 ml entnommen, mit 100 µl

110 %iger TCA (w/v) versetzt und bei -80 °C aufbewahrt.

Die Proben wurden aufgetaut und 15 min bei 11000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 100 µl Aceton gewaschen und getrocknet. Danach wurde das Zellpellet in 100 µl BB1 Puffer resuspendiert, es wurden 100 µl Glasperlen zugegeben. Die Zellen wurden dreimal je 5 min gevortext und 1 min bei 95 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 min auf Eis inkubiert und es wurde 900 µl IP Puffer inklusive Inhibitoren (1 mM PMSF, Complete™) zugegeben. Die Proben wurden 10 min bei 11000 x g zentrifugiert, 850 µl des Überstands wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 3 µl FBPase-Antikörper zugegeben. Es wurde 2 h bei Zimmertemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert, danach wurde 50 µl 5 %ige Protein A Sepharose™ CL-4B (w/v) im IP Puffer zugegeben. Es folgte eine weitere Inkubation von 1 h auf dem Überkopfschüttler bei Zimmertemperatur. Die Proben wurden 2 min bei 600 x g zentrifugiert und der Überstand wurde entfernt. Die „Beads“ wurden dreimal mit IP-Puffer gewaschen, dann wurde 50 µl Harnstoffprobenpuffer zugegeben. Die Proben wurden 10 min bei 95 °C inkubiert und dann auf ein SDS-Gel aufgetragen. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel getrocknet und in einer Filmkassette fixiert, es wurde ein PhosphorImager Film für 2-3 Tage aufgelegt. Die radioaktiven Signale wurden mit einem PhosphorImager (Storm 860) gescannt und mit Hilfe der Software ImageQuaNT 5.2 (Molecular Dynamics) ausgewertet.

BB1-Puffer:	50 mM	Tris/HCl pH 7,5
	6 M	Harnstoff
	1 %	SDS (w/v)
	1 mM	EDTA
IP-Puffer:	50 mM	Tris/HCl pH 7,5
	190 mM	NaCl
	1,25 %	Triton X-100 (v/v)
	6 mM	EDTA

#### 4.4.11 Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Zunächst wurde eine Vorkultur des benötigten Stammes in 3 ml 2x YTAG angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Dann wurden 2 ml der Vorkultur in 200 ml vorgewärmten 2x YTAG (Verdünnung 1:100) angeimpft und 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Um das Fusionsprotein zu exprimieren, wurden zu der Hauptkultur 0,5 ml 100 mM IPTG gegeben und 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Dann wurde die Kultur 10 min bei 11000 x g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 10 ml kaltem PBS resuspendiert. Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen, hierzu wurde die Zellsuspension fünfmal 10 s sonifiziert (Stufe 2), dazwischen wurde je 1 min auf Eis inkubiert. Es wurde mit dem Mikroskop der Aufschluss der Zellen kontrolliert. Danach wurden 0,5 ml 20 %iges Triton X-100 (v/v) zugegeben, es folgte eine Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur auf dem Überkopfschüttler, anschließend wurde bei 4 °C zentrifugiert (10 min, 12000 x g). Zum Überstand wurden 0,9 ml 50 % Glutathion Sepharose™ 4B gegeben, es wurde 30 min bei Zimmertemperatur auf einem Überkopfschüttler inkubiert, danach wurde 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Das Sepharose-Pellet wurde fünfmal mit 1 ml PBS gewaschen, dann wurde 375 µl PBS Puffer und 25 µl Thrombin zugegeben. Der Verdau wurde 4 h auf einem Überkopfschüttler bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurde 5 min bei 400 x g zentrifugiert, der Überstand wurde mit 4x Lämmli-Puffer versetzt und eine SDS-PAGE durchgeführt.

4x Lämmli-Puffer:	400 mM	Tris/HCl pH 6,8
	10 %	SDS (w/v)
	40 %	Glycerin (v/v)
	0,1 %	Bromphenolblau (w/v)
	1 %	β-Mercaptoethanol (v/v)

#### 4.4.12 Reinigung von TAP-Fusionsproteinen

Die Reinigung von TAP-Fusionsproteinen wurde nach Puig *et al.* (2001) durchgeführt. Die Zellen wurden unter Katabolitinaktivierungsbedingungen angezogen (siehe IP), zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 400 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet, mit 20 mM NaN<sub>3</sub> in Wasser gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Diese Proteinreinigungen wurden im Kühlraum durchgeführt, alle Puffer wurden eiskalt



verwendet, die Zentrifugationsschritte erfolgten alle bei 4 °C.

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 3 Volumen kaltem Puffer A inklusive Inhibitoren (Complete™; 1,1 mM PMSF; je 1 µg/ml Antipain, Pepstatin A, Chymostatin, Leupeptin, je 1/100 Volumen Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2) versetzt, das Pellet wurde durch Vortexen gelöst. Nach Zugabe von 4 Volumen Glasperlen wurden die Proben durch fünfzehnminütiges Vortexen lysiert, es wurde 1/9 Volumen 2 M KCl-Lösung zugegeben und dann bei 1600 x g 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in dickwandige Zentrifugationsröhrchen überführt (Beckman, Centrifuge Tubes, Polycarbonate Thick Wall 13x56 mm) und in der Ultrazentrifuge bei 25000 x g 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 100000 x g 60 min zentrifugiert. Die mittlere Phase wurde entnommen, mit 100-150 µl 50 %iger IgG Sepharose (w/v) versetzt und 2 h auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Zur Vorbereitung wurde die IgG Sepharose einmal mit IPP150 Puffer gewaschen, 1 h mit 10 %iger BSA Lösung (w/v) in IPP10 Puffer geblockt und dann dreimal mit IPP150 Puffer gewaschen. Das Sepharose Pellet wurde in Zentrifugationssäulen (MoBiTec, Mobicol) überführt und viermal mit 500 µl IPP150 Puffer und einmal mit 500 µl kaltem TEV Cleavage Puffer gewaschen. Die Bodenöffnungen der Zentrifugationssäulen wurden nach dem Waschen mit einem Stopfen verschlossen. Die IgG Sepharose wurde mit 500 µl TEV „Cleavage“ Puffer und 20 Units AcTEV™ Protease (Invitrogen) versetzt und 2 h bei 18 °C unter inkubiert. Nach dem Zentrifugieren (400 x g, 1 min) wurde der Durchfluss in Zentrifugationssäulen (mit Stopfen im Ausfluss) mit 100 µl 50 %igen Calmodulin "Beads" (w/v) (Stratagene) versetzt, die vorher dreimal mit IPP150 Calmodulin Bindepuffer gewaschen wurden. Zusätzlich wurden 3 µl 1 M Calciumchlorid und 300 µl IPP150 Calmodulin Bindepuffer zugegeben. Nach einer Inkubation von 1 h auf einem Überkopfschüttler wurden die "Beads" fünfmal mit 500 µl IPP150 Calmodulin Bindepuffer gewaschen. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 200 µl IPP150 Calmodulin Elutionspuffer, einer Inkubation von 5 min, dann wurde 1 min bei 400 x g zentrifugiert. Diese Elution wurde noch viermal wiederholt. Die vereinigten Eluate wurden mit 100 µl 110 %iger TCA (w/v) versetzt und über Nacht bei -80 °C gefällt. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 11000 x g wurde das Pellet mit Aceton gewaschen, getrocknet, mit 50 µl Harnstoffpuffer versetzt und 30 min bei 37 °C auf einem Thermoschüttler inkubiert.

Puffer A:	10 mM	K-HEPES pH 7,9
	10 mM	KCl
	1,5 mM	MgCl <sub>2</sub>
	0,5 mM	DTT

## Material und Methoden

---

IPP150 Puffer:	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	150 mM	NaCl
	0,1 %	NP40 (v/v)
TEV „Cleavage“ Puffer:	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	150 mM	NaCl
	0,1 %	NP40 (v/v)
	0,5 mM	EDTA
	1 mM	DTT
IPP150 Calmodulin Bindepuffer:	10 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol
	10 mM	Tris/HCl pH 8,0
	150 mM	NaCl
	1 mM	MgOAc
	1 mM	Imidazol
	2 mM	CaCl <sub>2</sub>
	0,1 %	NP40 (v/v)
IPP150 Elutionspuffer:	siehe IPP150 Calmodulin Bindepuffer statt 2 mM CaCl <sub>2</sub> wurde 2 mM EGTA eingesetzt	

### 4.4.13 Glycerindichtegradienten-Fraktionierung

Die Glycerindichtegradienten-Fraktionierung wurde nach Regelman *et al.* (2003) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen unter Katabolitinaktivierungsbedingungen angezogen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 25 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet, mit Wasser gewaschen und in 543  $\mu$ l kaltem 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer pH 7,0 inklusive Inhibitoren (Complete™; 1,1 mM PMSF; je 1  $\mu$ g/ml Antipain, Pepstatin A, Chymostatin, Leupeptin) resuspendiert. Die Proben wurden mit 300  $\mu$ l Glasperlen versetzt und 20 min lang auf einem Multivortexer bei 4 °C aufgeschlossen. Nach dem Zentrifugieren von 15 min bei 11000 x g und 4 °C wurden vom Überstand 200  $\mu$ l abgenommen und vorsichtig auf einen Glyceringradienten (je 450  $\mu$ l 50 %, 40 %, 30 %, 20 % und 10 %iges Glycerin in sterilem 20 mM PIPES-Puffer pH 7,0) geladen. Es wurde 4 h bei 130000 x g und 15 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Danach wurden von oben nach unten 10 gleichgroße Fraktionen abgenommen, die Proteine wurden mit 1/10

Volumen 110 %iger TCA (w/v) gefällt. Die Proben wurden 10 min auf Eis inkubiert, 10 min bei 11000 x g zentrifugiert und das Pellet wurde mit kaltem Aceton gewaschen. Nach dem Trocknen wurde das Proteinpellet in 50 µl Harnstoffpuffer gelöst und dann eine SDS-PAGE durchgeführt.

#### 4.4.14 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford

Zum Herstellen der Bradford-Lösung wurden 0,01 % Coomassie Brilliant Blue G250 (w/v) über Nacht unter Rühren in 2 % (v/v) 95 %igem Ethanol gelöst. Zu dieser Lösung wurde 10 % (v/v) 85 %ige Phosphorsäure geben und mit Wasser aufgefüllt. Zum Erstellen einer Kalibriergeraden vor jeder Bestimmung wurde zunächst eine BSA-Stammlösung mit der Proteinkonzentration 1 mg/ml 1:10 verdünnt und nach folgendem Pipettierschema eingesetzt:

BSA-Lösung (1:10 verdünnt) [µl]	0	10	20	40	60	80	100
Wasser [µl]	100	90	80	60	40	20	0

Es wurden je 100 µl Proteinlösung und 1 ml Bradford-Stammlösung zusammenpipettiert, gemischt und 10 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt. In einem Diagramm wurde die Extinktion gegen die Proteinkonzentration aufgetragen.

#### 4.4.15 PonceauS-Färbung

Um Proteine auf einer Nitrocellulosemembran anzufärben, wurde die Membran nach dem Western Blot in einer Glaswanne mit ca. 50 ml PonceauS-Lösung versetzt und 5 min auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Färbelösung wieder abgegossen und das Gel solange mit TBS-T Puffer gewaschen, bis diskrete Proteinbanden sichtbar waren.

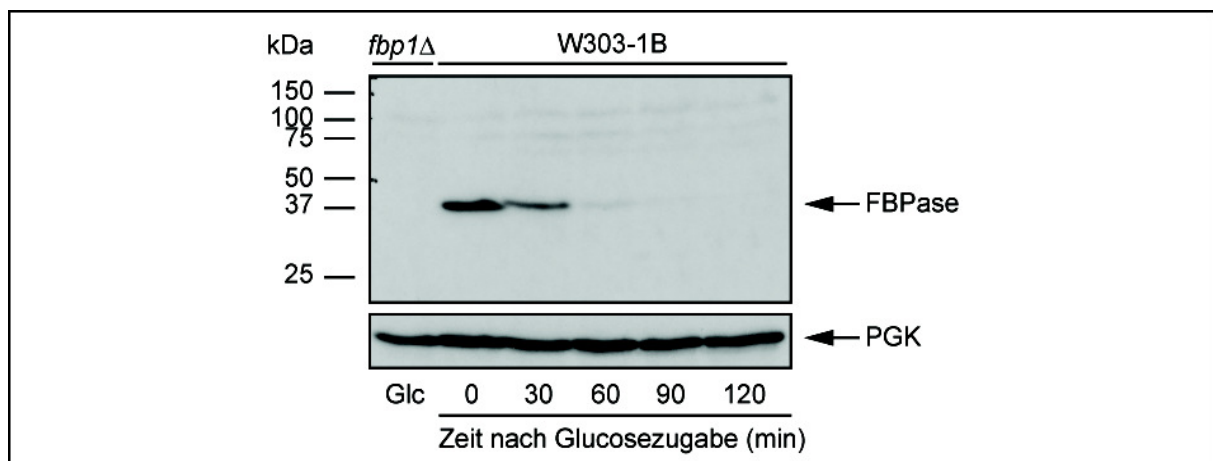
PonceauS-Lösung:            0,1 %-0,2 %    PonceauS (w/v)  
    5 %                    HOAc (v/v)

## 5 . Ergebnisse

### 5.1 Herstellung eines FBPase-Antikörpers

Für Untersuchungen des katabolitinduzierten Abbaus der FBPase in verschiedenen Stämmen der Hefe *S. cerevisiae* wird ein spezifischer FBPase-Antikörper benötigt. Es sollte ein Antiserum gegen FBPase gewonnen werden.

Die Isolierung des FBPase-Antigens erfolgte aus *E. coli*-Zellen des Stammes BL21, der mit dem GST-FBPase-Expressionsplasmid pJR13 (J. Regelman, 2005) transformiert wurde. Nach dem Aufschluss der Zellen wurde GST-FBPase an einer GSH-Affinitätssäule angereichert (siehe Material & Methoden). Durch einen Verdau mit der Protease Thrombin wurde FBPase vom GST-Rest befreit und das gereinigte FBPase-Antigen wurde zur Immunisierung von zwei Kaninchen zu der Firma EUROGENTEC (Belgien) geschickt. Um die Qualität des erhaltenen Serums zu testen, wurden Proben eines Katabolitaktivierungsexperiments der Stämme W303-1B und *fbp1Δ* (W303-1BKO) auf ein SDS-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Western Blot erfolgte die Immunodetektion mit anti-FBPase Serum und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle). Wie in Abbildung 5 zu sehen ist, kann das anti-FBPase Serum in der Konzentration 1:5000 in Western Blot Analysen eingesetzt werden, die FBPase-Proteinbanden im Stamm W303-1B sind deutlich zu erkennen und es treten kaum Kreuzreaktionen auf. Es zeigte sich später, dass der erhaltene Antikörper auch in Immunopräzipitationsexperimenten eingesetzt werden konnte.



**Abbildung 5: Überprüfung des erhaltenen FBPase-Antiserums.** Es wurde ein Katabolit-inaktivierungsexperiment der FBPase im Stamm W303-1B durchgeführt. Die Zellen wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen und dann in glucosehaltiges Medium (0, 30, 60, 90, 120) überführt, Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen. Zellen des Stammes *fbp1Δ* (W303-1BKO) wurden zur Kontrolle unter glykolytischen Bedingungen (Glc) angezogen. Nach einer alkalischen Lyse wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran überführt, die Immunodetektion erfolgte mit anti-FBPase Serum und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle).

## 5.2 Studien zum Gid-Komplex

Bisher wurden neun sogenannte *GID* (engl. „glucose induced degradation deficient“) Gene gefunden, die für den Abbau der FBPase essentiell sind (Hämmerle *et al.*, 1998; Schüle *et al.*, 2000; Regelman *et al.*, 2003). Die Proteine werden als Gid1 bis Gid9 bezeichnet. Sechs der neun Gid-Proteine bilden den Gid-Komplex (Ho *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2006, Pitre *et al.*, 2006; Santt *et al.*, 2008). Der Komplex ist eine E3 Ligase, die für die Polyubiquitinierung von FBPase essentiell ist (Schüle *et al.*, 2000; Regelman *et al.*, 2003; Santt *et al.*, 2008). Er ist unter glykolytischen wie auch gluconeogenetischen Bedingungen aus den Untereinheiten Gid1/Vid30, Gid2, Gid5/Vid28, Gid7, Gid8 und Gid9 aufgebaut (Ho *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2006, Pitre *et al.*, 2006; Santt *et al.*, 2008). Nach Glucosezugabe zu Zellen, die unter gluconeogenetischen Bedingungen gewachsen sind, wird das Protein Gid4/Vid24 exprimiert, es wird Teil des Komplexes und induziert die Ubiquitinierung und den Abbau der FBPase. Die stöchiometrische Zusammensetzung des Komplexes unter verschiedenen Wachstumsbedingungen bzw. seine Struktur sind bislang nicht bekannt.

### 5.2.1 Stabilität des Gid-Komplexes unter gluconeogenetischen Bedingungen

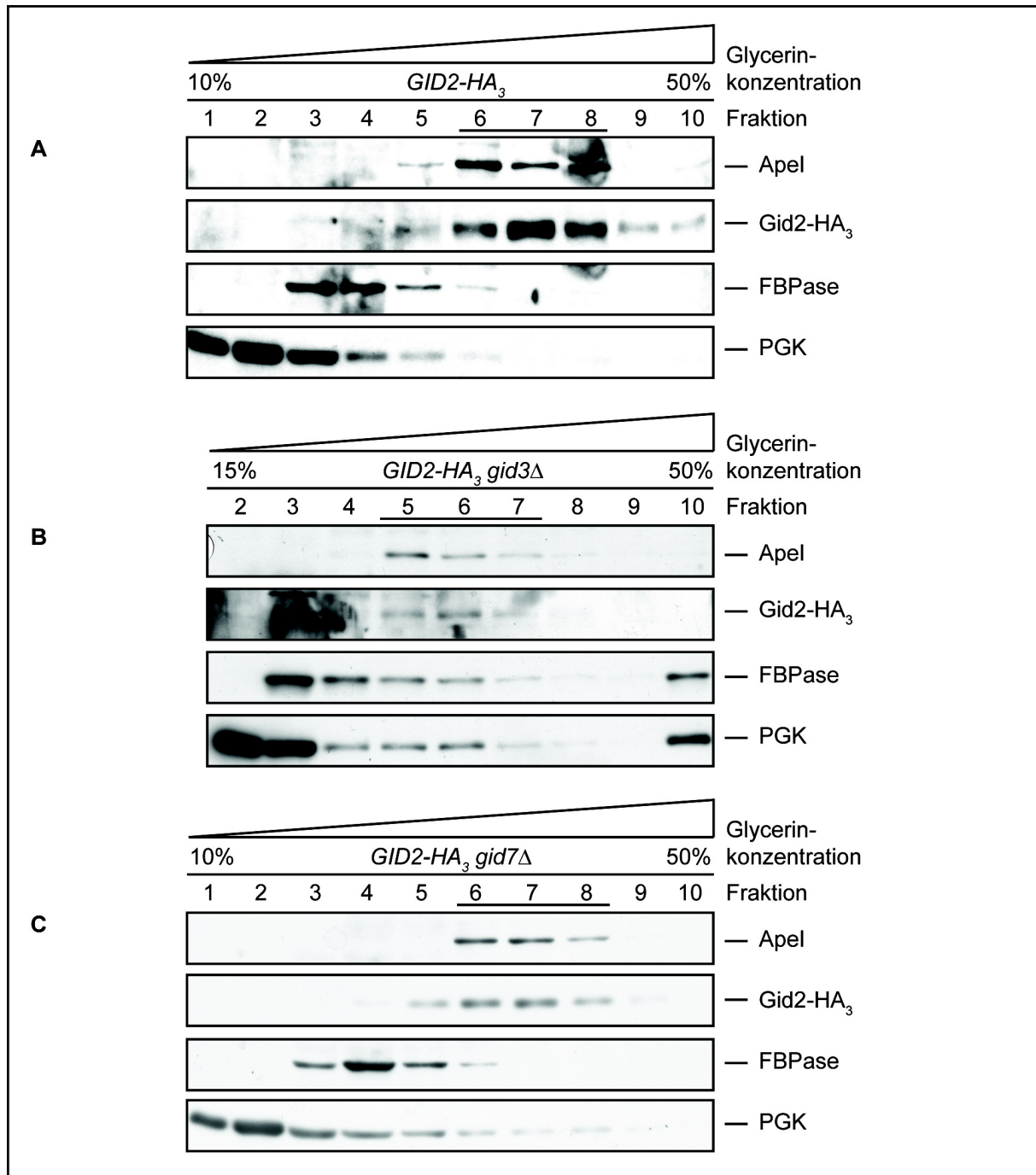
Es wurde mittels Glycerindichtegradientenzentrifugations-Experimenten gezeigt, dass Gid2-HA<sub>3</sub> nach dem Überführen der Zellen von gluconeogenetischen zu glykolytischen Bedingungen in einem höhermolekularen Komplex vorliegt, die Probennahme erfolgte hier 20 min nach Glucosezugabe (Regelman *et al.*, 2003). In diesem Experiment cofraktionierte Gid2-HA<sub>3</sub>, welches selbst eine molekulare Masse von 49 kDa hat, mit Aminopeptidase I (Apel) bei 600 kDa. In weiteren Studien unter den selben Bedingungen konnte gezeigt werden, dass Gid5-HA<sub>3</sub>, Gid8-HA<sub>3</sub> und Gid9-HA<sub>3</sub> ebenfalls mit Apel cofraktionieren. Gid1-HA<sub>3</sub> und Myc<sub>9</sub>-Gid4 wiesen ein abweichendes Sedimentationsprofil auf, beide Proteine traten in nieder- sowie höhermolekularen Fraktionen auf (T. Pfirrmann, 2006). Des Weiteren wurde zusätzlich am Beispiel von Gid1-HA<sub>3</sub> und Gid7-HA<sub>3</sub> gezeigt, dass diese Proteine unter verschiedenen Wachstumsbedingungen, unter gluconeogenetischen Bedingungen und auch 20 min nach Überführen der Zellen in glucosehaltiges Medium, in dem höhermolekularen Komplex um 600 kD vorliegen (Santt *et al.*, 2008).

Das Protein Gid7 enthält sechs sogenannte WD40-Domänen, die zur Klasse der Protein-Protein-Interaktionsdomänen gehören. WD40-Domänen bilden  $\beta$ -Propeller-Strukturen aus. Diese Strukturen dienen dazu Protein-Komplexe zusammenzufügen, wobei die WD40-

Domänen selbst als „Plattform“ für Proteininteraktionen dienen (Smith *et al.*, 1999). Würde dieses Modell auf *Gid7* zutreffen, dann sollte die Deletion von *GID7* zu einem Zerfall des *Gid*-Komplexes führen. Dies sollte hier mittels Glycerindichtegradientenzentrifugations-Experimenten unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen untersucht werden. Als Negativkontrolle wurde das Experiment zusätzlich mit einem *GID3* Deletionsstamm durchgeführt. *Gid3/Ubc8* gehört zu den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen (E2) und ist nicht Teil des *Gid*-Komplexes (Ho *et al.*, 2002; Regelman *et al.*, 2003; Krogan *et al.*, 2006). Daher sollte die *GID3* Deletion keinen Einfluss auf die Stabilität des Komplexes haben.

Die Zellen der Stämme *gid2Δ* (Y33614), *gid3Δ* (Y36577) und *gid7Δ* (Y33446) wurden mit dem *Gid2*-HA<sub>3</sub>-Expressionsplasmid pJJ20 transformiert und unter gluconeogenetischen Bedingungen inkubiert. Nach dem Ernten und Aufschluss der Zellen wurden die Zelllysate auf einen Glyceringradienten aufgetragen und zentrifugiert. Danach wurden 10 gleich große Fraktionen entnommen und die Proteine wurden mit TCA präzipitiert. Die gelösten Proben wurden einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen, die Immunodetektion erfolgte mit Apel-, HA-, FBPase- und PGK-Antikörpern. Im Kontrollstamm *gid2Δ* pJJ20 ist *Gid2*-HA<sub>3</sub> ebenso wie Apel in den Fraktionen 6 bis 8 detektierbar (markierte Fraktionen in Abb. 6A). Im Stamm *gid3Δ* sowie *gid7Δ* liegen *Gid2*-HA<sub>3</sub> und Apel ebenfalls in den selben Fraktionen vor, Fraktion 5 bis 7 bzw. Fraktion 6 bis 8 (Abb. 6B und Abb. 6C). Die geringen Abweichungen der Fraktionen in welchen Apel vorliegt, sind vermutlich auf die Schwankungsbreite des Experiments zurückzuführen.

Die Deletion von *GID3* bzw. *GID7* hat unter gluconeogenetischen Bedingungen keinen Einfluss auf die Stabilität des *Gid*-Komplexes. Offensichtlich hält *Gid7* doch nicht den Komplex zusammen und/oder die gewählte Methode ist zu ungenau, um geringe Änderungen der molekularen Masse des *Gid*-Komplexes nachzuweisen.



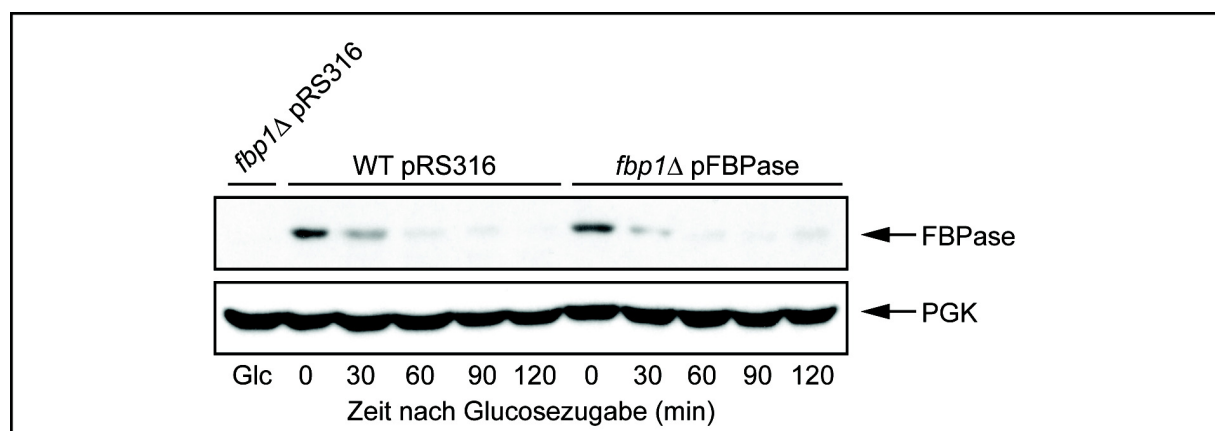
**Abbildung 6: Gid2-HA<sub>3</sub> liegt schon unter gluconeogenetischen Bedingungen in einem höhermolekularen Komplex vor. Die Deletionen von *GID3* und *GID7* haben keinen Einfluss auf die Stabilität des Komplexes.** Es wurden Zellen in ethanolhaltigem Medium inkubiert und geerntet. Nach dem Aufschluss wurden die Zelllysate auf einen Glyceringradienten aufgetragen und zentrifugiert. Danach wurden 10 gleichgroße Fraktionen entnommen und die Proteine wurden mit TCA präzipitiert. Die gelösten Proben wurden einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen, die Immunodetektion erfolgte mit Apel-, HA-, FBPase- und PGK-Antikörpern. Die Experimente wurden mit folgenden Stämmen durchgeführt (A) *gid2Δ* (Y33614) pJJ20, (B) *gid3Δ* (Y36577) pJJ20, (C) *gid7Δ* (Y33446) pJJ20.

## 5.2.2 Interaktionsstudien zu FB Pase mit dem Gid-Komplex

Die Gid-Proteine bzw. der Gid-Komplex sind für den Abbau der FB Pase essentiell (Schüle *et al.*, 2000; Regelman *et al.*, 2003; Santt *et al.*, 2008). Voraussetzung für eine direkte Beteiligung des Gid-Komplexes an diesem Prozess ist eine Interaktion des Komplexes mit FB Pase. Dies sollte mit Co-Immunopräzipitationsexperimenten untersucht werden. Als Substrate sollten plasmidcodierte FB Pase und die mit dem TAP-tag fusionierte FB Pase-TAP eingesetzt werden.

### Funktionalität der Vektoren pFB Pase und pFB Pase-TAP

Zunächst wurden Plasmide zur Expression von FB Pase und FB Pase-TAP kloniert. Für das Plasmid pFB Pase wurde das *FBP1* Gen mit nativem Promotor und Terminator mit den Primern P FBP1 forward und P FBP1 reverse amplifiziert, hierbei wurden eine *Clal*- und eine *SpeI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt, über welche dann die Klonierung in den Vektor pRS316 stattfand. Das Plasmid wurde sequenziert und in den Stamm *fbp1Δ* (YJJ08) transformiert. Der Stamm *fbp1Δ* pFB Pase kann in ethanolhaltigem Medium wachsen; dies ist nur möglich, wenn der Expressionsvektor funktionell ist. Des weiteren wurde ein Katabolitinaktivierungsexperiment mit den Stämmen W303-1B (WT) und *fbp1Δ* (YJJ08), die mit den Vektoren pRS316 und pFB Pase transformiert wurden, durchgeführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen (siehe Abb. 7), aufgeschlossen und einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterworfen. Die Immunodetektion erfolgte mit FB Pase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle). Im Stamm *fbp1Δ* pRS316 ist unter glykolytischen Bedingungen (Glc; Kontrolle) wie erwartet keine FB Pase zu sehen. FB Pase wird im *FBP1* Deletionsstamm, der mit dem Plasmid pFB Pase komplementiert wird, wildtypmäßig abgebaut.



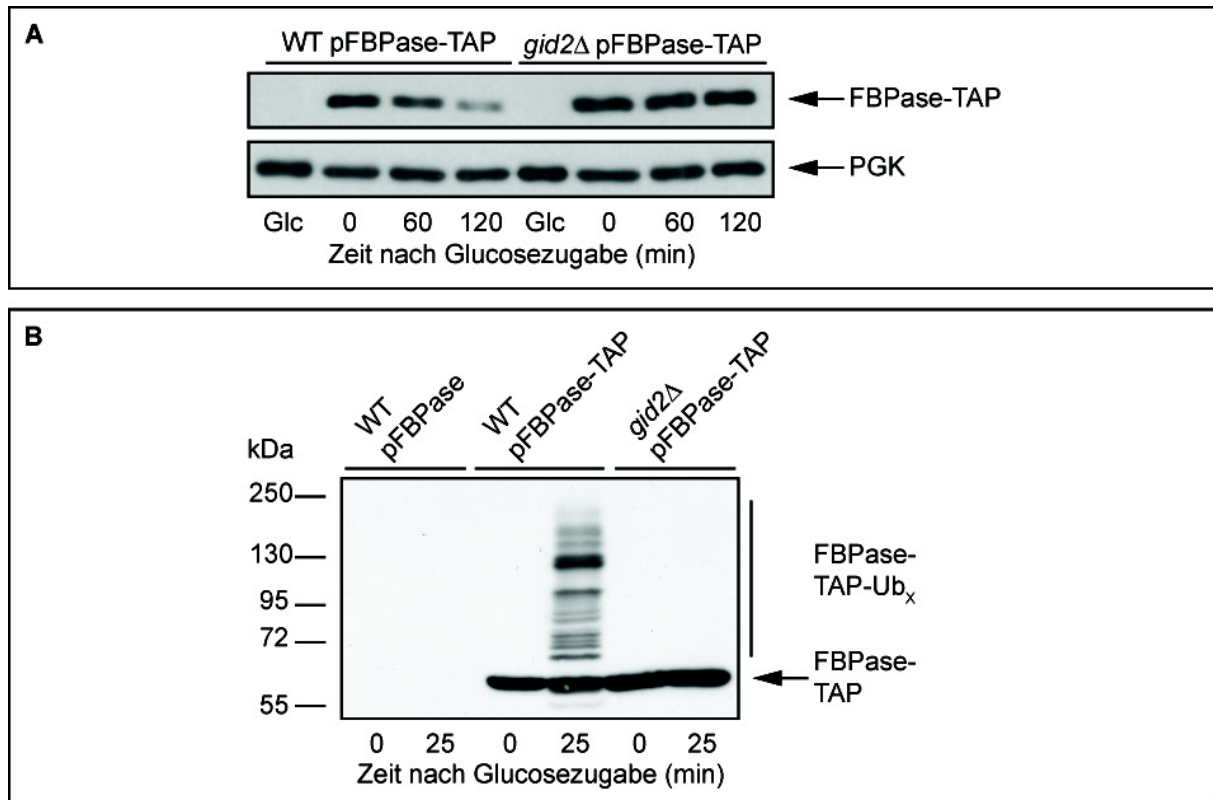
**Abbildung 7: Funktionalität des Vektors pFB Pase.** Katabolitinaktivierungsexperiment der FB Pase in den Stämmen *fbp1Δ* (YJJ08) pRS316, W303-1B (WT) pRS316 und *fbp1Δ* pFB Pase. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen und standardmäßig behandelt. Die Immunodetektion erfolgte mit FB Pase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle).



Für das FBPase-TAP Expressionsplasmid wurde die Kasette *TAP::TRP1<sup>K.L.</sup>* des Vektors pBS1479 mit den Primern P FBP-TAP forw und P FBP-TAP rev amplifiziert und mittels homologer Rekombination in das Plasmid pFBPase transformiert. Das entstandene Plasmid pFBPase-TAP wurde in den Stamm *fbp1Δ* (YJJ08) transformiert, durch Wachstum in ethanolhaltigem Medium wurde auch hier die Funktionalität des Vektors bestätigt. Es wurde ein Katabolitinaktivierungsexperiment mit Zellen der Stämme W303-1B (WT) und *gid2Δ* (YTS1), die mit dem Plasmid pFBPase-TAP transformiert wurden, durchgeführt. Es wurden Proben unter glykolytischen (Glc) und gluconeogenetischen (0) Wachstumsbedingungen sowie nach Glucosezugabe gezogen. Nach dem Zellaufschluss wurde eine Western Blot Analyse mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle) durchgeführt. Während FBPase-TAP im Kontrollstamm abgebaut wird, wird FBPase-TAP im Deletionsstamm *gid2Δ* wie erwartet nicht mehr abgebaut (Abb. 8A).

Um zu testen, ob plasmidcodierte FBPase-TAP ebenso wie FBPase das Protein Gid2 bzw. die Gid-Komplex-Maschinerie für die Polyubiquitinierung braucht, wurde ein Polyubiquitinierungsexperiment mit den Stämmen W303-1B (WT) und *gid2Δ* (YTS1) durchgeführt, die zuvor mit den Plasmiden pFBPase und pFBPase-TAP transformiert wurden. Die Zellen wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen (0 min) sowie 25 min nach dem Überführen in glucosehaltiges Medium geerntet. Nach dem Zellaufschluss wurde eine Immunopräzipitation mit IgG-Sepharose durchgeführt. Die eluierten Proteine wurden einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen, die Immunodetektion erfolgte mit Ubiquitin-Antikörpern. Im Wildtyp, transformiert mit dem Expressionsplasmid pFBPase-TAP, ist nach Induktion der Katabolitinaktivierung polyubiquitinierte FBPase-TAP detektierbar, im Deletionsstamm *gid2Δ* pFBPase-TAP findet nach Glucosezugabe keine Polyubiquitinierung von FBPase-TAP statt (Abb. 8B). Im Kontrollstamm W303-1B pFBPase ist, wie erwartet, keine polyubiquitinierte FBPase-TAP zu erkennen.

Diese Experimente zeigen, dass das plasmidcodierte FBPase-TAP-Fusionsprotein funktionell ist und dass Gid2 für die Polyubiquitinierung und den Abbau von FBPase-TAP benötigt wird. Es ist daher anzunehmen, dass FBPase-TAP über den gleichen Weg abgebaut wird wie FBPase.

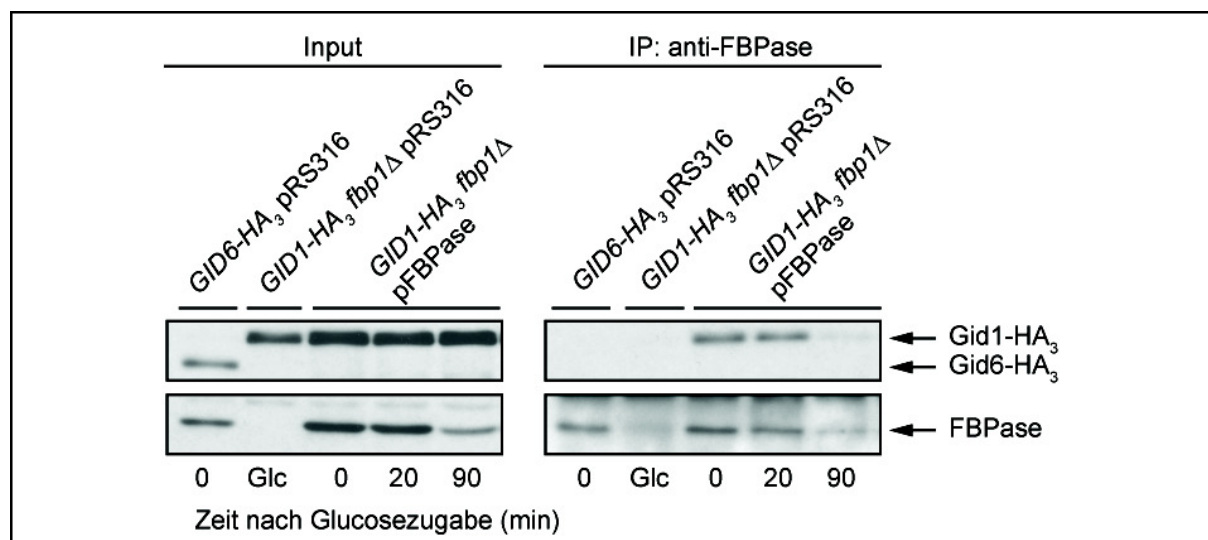


**Abbildung 8: Der Abbau sowie die Polyubiquitinierung von plasmidcodiertem FBPase-TAP-Fusionsprotein ist von Gid2 abhängig.** (A) Es wurde ein Katabolitinaktivierungsexperiment der FBPase in den Stämmen W303-1B (WT) pFBPase-TAP und *gid2Δ* (YTS1) pFBPase-TAP durchgeführt. Die Proben wurden unter glykolytischen (Glc) und gluconeogenetischen Bedingungen, sowie nach Glucosezugabe gezogen. Nach einer SDS-PAGE und einem Western Blot wurde die Immunodetektion mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle) durchgeführt. (B) Mit Zellen der Stämme W303-1B (WT) pFBPase, W303-1B pFBPase-TAP und *gid2Δ* (YTS1) pFBPase-TAP wurde eine Immunopräzipitation mit IgG-Sepharose durchgeführt. Die Immunodetektion der polyubiquitinierten FBPase-TAP erfolgte mit Ubiquitin-Antikörpern.

### Interaktion von FBPase mit Gid1/Vid30

Es wurde nun die Interaktion von FBPase mit Gid1-HA<sub>3</sub>, einer Untereinheit des Gid-Komplexes, untersucht. Als Negativkontrolle für die Interaktion von FBPase mit dem Komplex wurde Gid6-HA<sub>3</sub> eingesetzt. Gid6/Ubp14 ist nicht Teil des Gid-Komplexes (Ho *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2006; Pitre *et al.*, 2006; Santt *et al.*, 2008). Für dieses Interaktionsexperiment wurden die Stämme *GID6-HA<sub>3</sub>* (YBB1) und *GID1-HA<sub>3</sub> fbp1Δ* (YJJ09) mit dem Plasmid pFBPase bzw. dem entsprechenden Vektor pRS316 transformiert. Die Zellen wurden zuerst in glucosehaltigem (Glc) und dann in ethanolhaltigem Medium (0 min) angezogen sowie in glucosehaltiges Medium (20, 90 min) überführt. Die Zellen des Stammes *GID1-HA<sub>3</sub> fbp1Δ* pRS316 wurden unter glykolytischen Bedingungen (Glc) geerntet, da dieser Deletionsstamm wegen des Fehlens der FBPase unter gluconeogenetischen Bedingungen nicht wachsen kann. Nach der Lyse der Zellen erfolgte die Immunopräzipitation mit FBPase-

Antikörpern. Es wurden Proben des Lysats (Input) und der Immunopräzipitation (IP) einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen, die Immunodetektion wurde mit HA- und FBPase-Antikörpern vorgenommen.

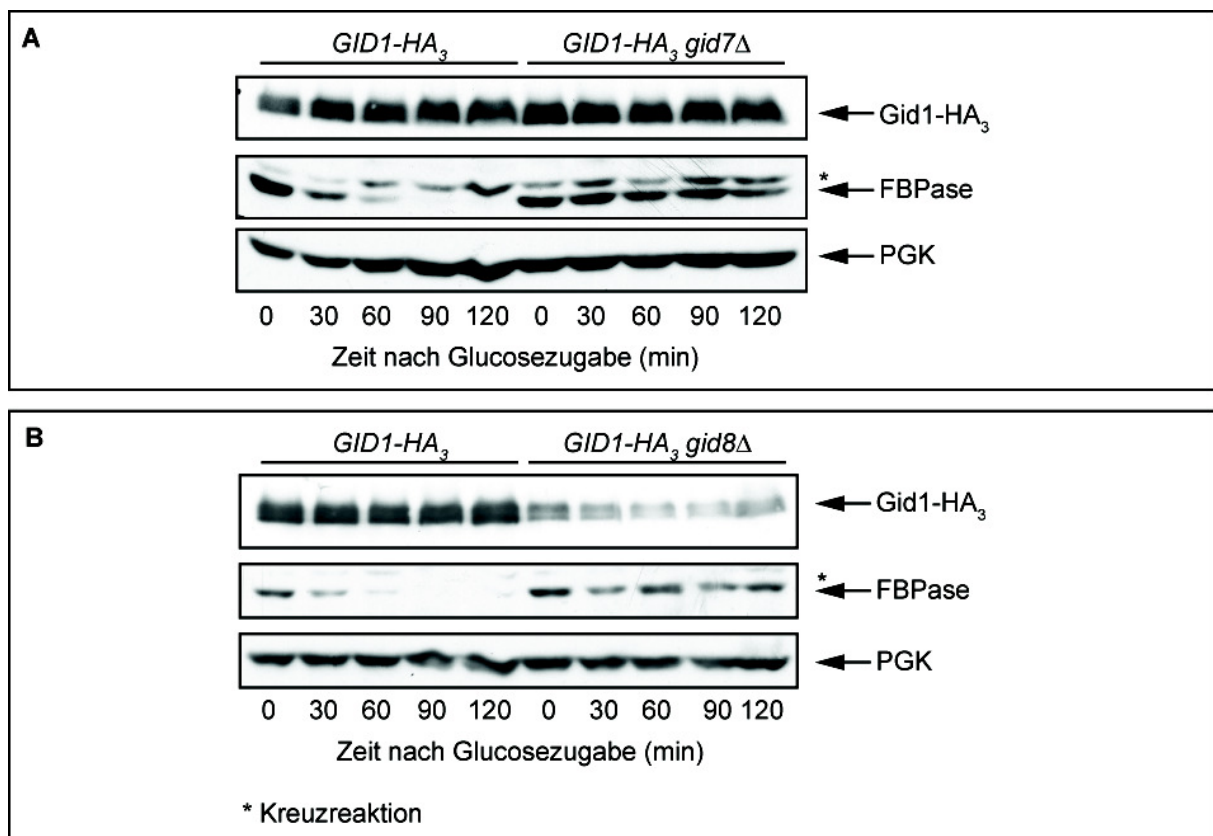


**Abbildung 9: Interaktion von FBPase mit der Untereinheit Gid1/Vid30 des Gid-Komplexes.** Die Stämme *GID6-HA<sub>3</sub>* (YBB1) und *GID1-HA<sub>3</sub> fbp1Δ* (YJJ09) wurden mit dem Plasmid pFBPase bzw. dem Vektor pRS316 transformiert. Die Zellen wurden unter glykolytischen Bedingungen (Glc), dann unter gluconeogenetischen Bedingungen (0 min) angezogen und in glucosehaltiges Medium (20, 90 min) überführt. Nach der Lyse erfolgte die Immunopräzipitation mit FBPase-Antikörpern. Die Immunodetektion wurde mit HA- und FBPase-Antikörpern vorgenommen.

Wie in Abbildung 9 zu sehen ist, interagiert FBPase mit Gid1-HA<sub>3</sub> unter gluconeogenetischen Bedingungen (0 min) und auch 20 min nach Überführen der Zellen in glucosehaltiges Medium. Nach 90 min ist FBPase weitestgehend abgebaut. Es konnte keine Interaktion von FBPase mit Gid6-HA<sub>3</sub> gezeigt werden. Dies bedeutet, dass keine unspezifische Interaktion von FBPase und dem HA<sub>3</sub>-Tag auftrat. Ebenso konnte im *FBP1* Deletionsstamm Gid1-HA<sub>3</sub> nicht präzipitiert werden. Der FBPase-Antikörper bindet also nicht unspezifisch an Gid1-HA<sub>3</sub>. Diese Ergebnisse wurden in Santt *et al.* (2008) publiziert.

### Interaktion von FBPase mit Gid1/Vid30 bei Deletion von *GID7* und *GID8*

Der Gid-Komplex interagiert bereits unter gluconeogenetischen Bedingungen sowie nach Überführen der Zellen in glucosehaltiges Medium mit FBPase. Es ist aber noch die Frage offen, welche Gid-Komplex-Untereinheit direkt mit dem Substrat FBPase in Verbindung steht. Fehlt dieses eine Protein bzw. diese „Linkerprotein“, dann sollte eine Interaktion des Gid-Komplexes mit der FBPase nicht mehr möglich sein. FBPase kann dann nicht mehr polyubiquitiniert und abgebaut werden. Betrachtet man die Gid-Proteine, dann könnte Gid7 mit seinen sechs WD40-Domänen der wahrscheinlichste Kandidat für diese Aufgabe sein. So rekrutieren im SCF-Komplex (SCF: engl. „Skp1-Cullin-E-Box“), einer E3 Ligase, F-Box-Proteine das Substrat. Diese F-Box-Proteine enthalten WD40-Domänen (Patton *et al.*, 1998), dies sind Protein-Protein-Interaktionsdomänen.



**Abbildung 10: Expression von Gid1-HA<sub>3</sub> im *GID7* und *GID8* Deletionsstamm.** Die Stämme *GID1-HA<sub>3</sub>* (YJR12), *GID1-HA<sub>3</sub> gid7Δ* (YML10) (A) und *GID1-HA<sub>3</sub> gid8Δ* (YJJ24) (B) wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen und dann in glucosehaltiges Medium überführt, Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen. Nach einer alkalischen Lyse wurden die Proben einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen, danach erfolgte die Immunodetektion mit HA-, FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle).

Für diese Interaktionsstudien wurden verschiedene Deletionen im Stamm *GID1-HA<sub>3</sub>* (YJR12) hergestellt. Nach Überprüfen der Stämme mit Kontroll-PCR und Southern Blot-Analyse

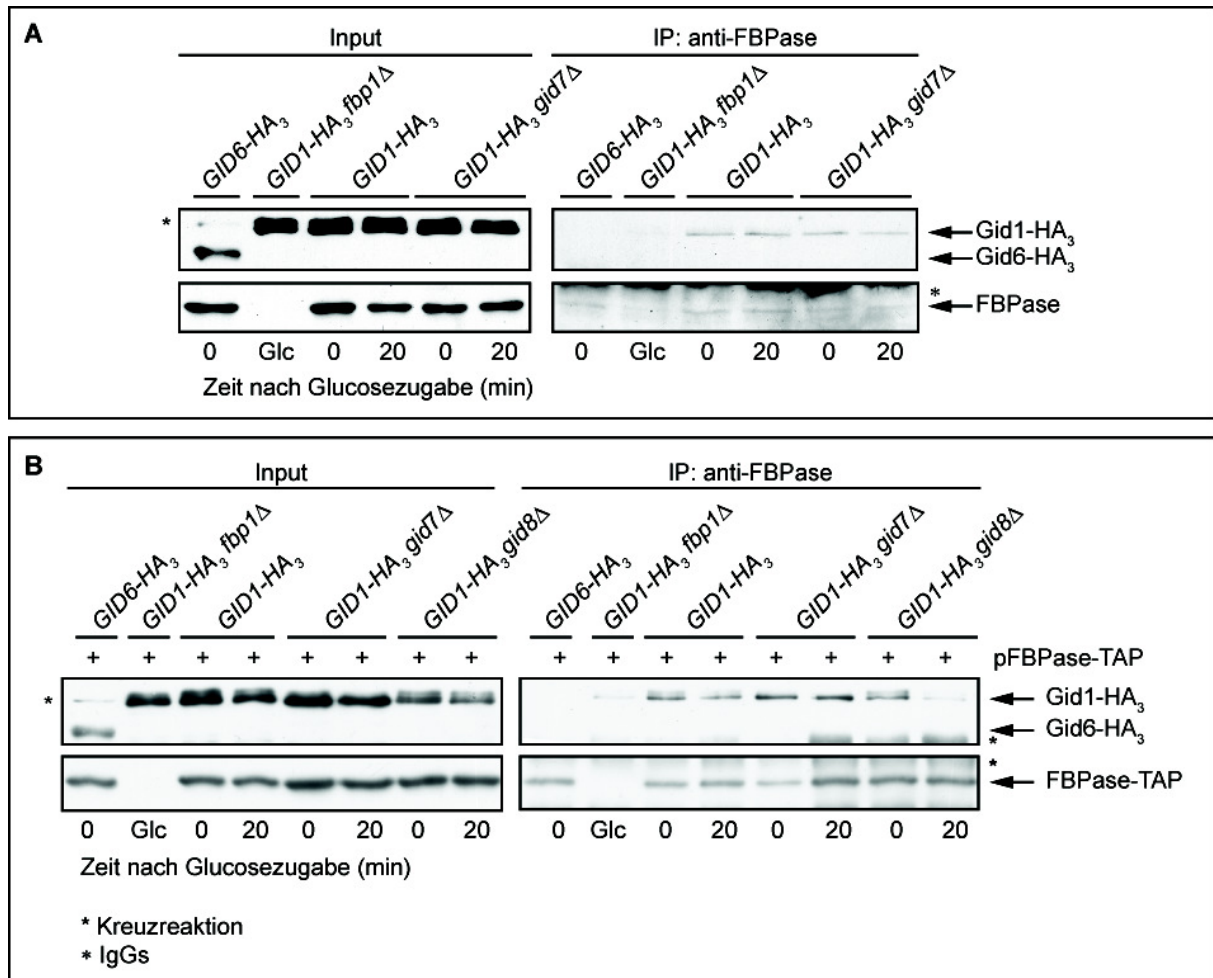
wurden Katabolitinaktivierungsexperimente durchgeführt. Hierfür wurden die Stämme *GID1-HA<sub>3</sub>* (YJR12), *GID1-HA<sub>3</sub> gid7Δ* (YML10) und *GID1-HA<sub>3</sub> gid8Δ* (YJJ24) unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen und dann in glucosehaltiges Medium überführt, Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen (Abb. 10). Nach einer alkalischen Lyse wurden die Proben einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen, danach erfolgte die Immunodetektion mit HA-, FBPase- und PGK-Antikörpern.

Wie in Abbildung 10 zu erkennen ist, ist FBPase in beiden Deletionsstämmen stabilisiert. Dies entspricht dem erwarteten Ergebnis. Da die *GID* Gene für den FBPase-Abbau essentiell sind, führt eine *GID* Deletion in Katabolitinaktivierungsexperimenten zur Stabilisierung von FBPase (Regelmann *et al.*, 2003). Im *gid8Δ* Stamm wird *Gid1-HA<sub>3</sub>* weniger stark exprimiert als im Kontrollstamm, die Expression von *Gid1-HA<sub>3</sub>* ist offensichtlich von *Gid8* abhängig. Die Deletion von *GID7* hat keinen Einfluss auf die Expression von *Gid1-HA<sub>3</sub>*.

Es wurden nun Immunopräzipitationsexperimente durchgeführt. Die Stämme *GID6-HA<sub>3</sub>* (YBB1), *GID1-HA<sub>3</sub> fbp1Δ* (YJJ09), *GID1-HA<sub>3</sub>* (YJR12) und *GID1-HA<sub>3</sub> gid7Δ* (YML10) wurden in ethanolhaltigem Medium angezogen und dann in glucosehaltiges Medium überführt, Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (siehe Abb. 11A). Nach der Lyse der Zellen erfolgte die Immunopräzipitation mit FBPase-Antikörpern. Es wurden Proben des Lysats (Input) und der Immunopräzipitation (IP) einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen, die Immunodetektion wurde mit HA- und FBPase-Antikörpern vorgenommen. Es konnte keine Interaktion von FBPase mit *Gid6-HA<sub>3</sub>* nachgewiesen werden, dies zeigt, dass keine unspezifische Interaktion von FBPase und dem HA<sub>3</sub>-Tag auftrat (Abb. 11A). Ebenso konnte im Kontrollstamm *GID1-HA<sub>3</sub> fbp1Δ* das Protein *Gid1-HA<sub>3</sub>* nicht präzipitiert werden, der FBPase-Antikörper bindet also nicht unspezifisch an *Gid1-HA<sub>3</sub>*. FBPase interagiert unter gluconeogenetischen Bedingungen (0 min) und 20 min nach dem Überführen in glucosehaltiges Medium immer mit *Gid1-HA<sub>3</sub>*. Die Deletion von *GID7* hat keinen Einfluss auf die Interaktion von FBPase mit *Gid1-HA<sub>3</sub>*. Da in den Proben der IP das FBPase-Signal sehr schwer zu erkennen ist, wurde die IP mit FBPase-TAP (58 kDa, im Vergleich zu FBPase mit 38 kDa) als Substrat wiederholt.

Zellen der Stämme *GID6-HA<sub>3</sub>* (YBB1), *GID1-HA<sub>3</sub> fbp1Δ* (YJJ09), *GID1-HA<sub>3</sub>* (YJR12), *GID1-HA<sub>3</sub> gid7Δ* (YML10) und *GID1-HA<sub>3</sub> gid8Δ* (YJJ24) wurden mit dem Plasmid pFBPase-TAP transformiert und unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen und dann in glucosehaltiges Medium überführt, Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (siehe Abb. 11B), nach der Lyse der Zellen erfolgte die Immunopräzipitation mit FBPase-Antikörpern. Es wurden Proben des Lysats (Input) und der Immunopräzipitation (IP) einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen, die Immunodetektion wurde mit HA-

und FBPase-Antikörpern vorgenommen. Wie in Abb. 11B zu erkennen ist, interagiert FBPase unter gluconeogenetischen Bedingungen (0 min) und 20 min nach dem Überführen der Zellen in glucosehaltiges Medium immer mit Gid1-HA<sub>3</sub>. Die Deletion von *GID7* oder *GID8* hat keinen Einfluss auf die Interaktion von FBPase mit Gid1-HA<sub>3</sub>.



**Abbildung 11: Interaktion von FBPase mit Gid1/Vid30 in Abhängigkeit von der *GID7* und *GID8* Deletion.** Die Stämme wurden unter glykolytischen Bedingungen (Glc), dann unter gluconeogenetischen Bedingungen (0 min) angezogen und in glucosehaltiges Medium überführt. Nach der Lyse erfolgte die Immunopräzipitation mit FBPase-Antikörpern. Die Western Blot Analyse erfolgte mit HA- und FBPase-Antikörpern. Die Versuche wurden mit folgenden Stämmen durchgeführt (A) *GID6-HA<sub>3</sub>* (YBB1), *GID1-HA<sub>3</sub> fbp1*Δ (YJJ09), *GID1-HA<sub>3</sub>* (YJR12) und *GID1-HA<sub>3</sub> gid7*Δ (YML10), (B) *GID6-HA<sub>3</sub>* (YBB1), *GID1-HA<sub>3</sub> fbp1*Δ (YJJ09), *GID1-HA<sub>3</sub>* (YJR12), *GID1-HA<sub>3</sub> gid7*Δ (YML10) und *GID1-HA<sub>3</sub> gid8*Δ (YJJ24) jeweils transformiert mit dem Plasmid pFBPase-TAP.

Gid7 mit seinen sechs WD40-Domänen und auch Gid8 sind offenbar nicht essentiell für die Rekrutierung des Substrates FBPase an den Gid-Komplex. Es ist natürlich möglich, dass FBPase gleichzeitig mit mehreren Gid-Proteinen interagiert. Die Interaktion könnte auch über einen bisher unbekanntem Faktor erfolgen. Hierzu sind weitere Studien nötig (siehe auch Kapitel 5.3).

## 5.3 Die Rolle des Hsp70 Chaperons Ssa1 beim FBPase-Abbau

Bisher wurden neun sogenannte *GID* (engl. „glucose induced degradation deficient“) Gene gefunden, die für den Abbau der FBPase essentiell sind (Hämmerle *et al.*, 1998; Schüle *et al.*, 2000; Regelman *et al.*, 2003). Sechs der neun *Gid*-Proteine bilden den *Gid*-Komplex, der für die Polyubiquitinierung und den Abbau der FBPase notwendig ist (Ho *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2006, Pitre *et al.*, 2006; Santt *et al.*, 2008), eine siebte Untereinheit (*Gid4/Vid24*) induziert den Abbau (Santt *et al.*, 2008). Im Rahmen dieser Arbeit sollten weitere Komponenten des FBPase-Abbaus identifiziert und charakterisiert werden.

### 5.3.1 FBPase interagiert mit Ssa1

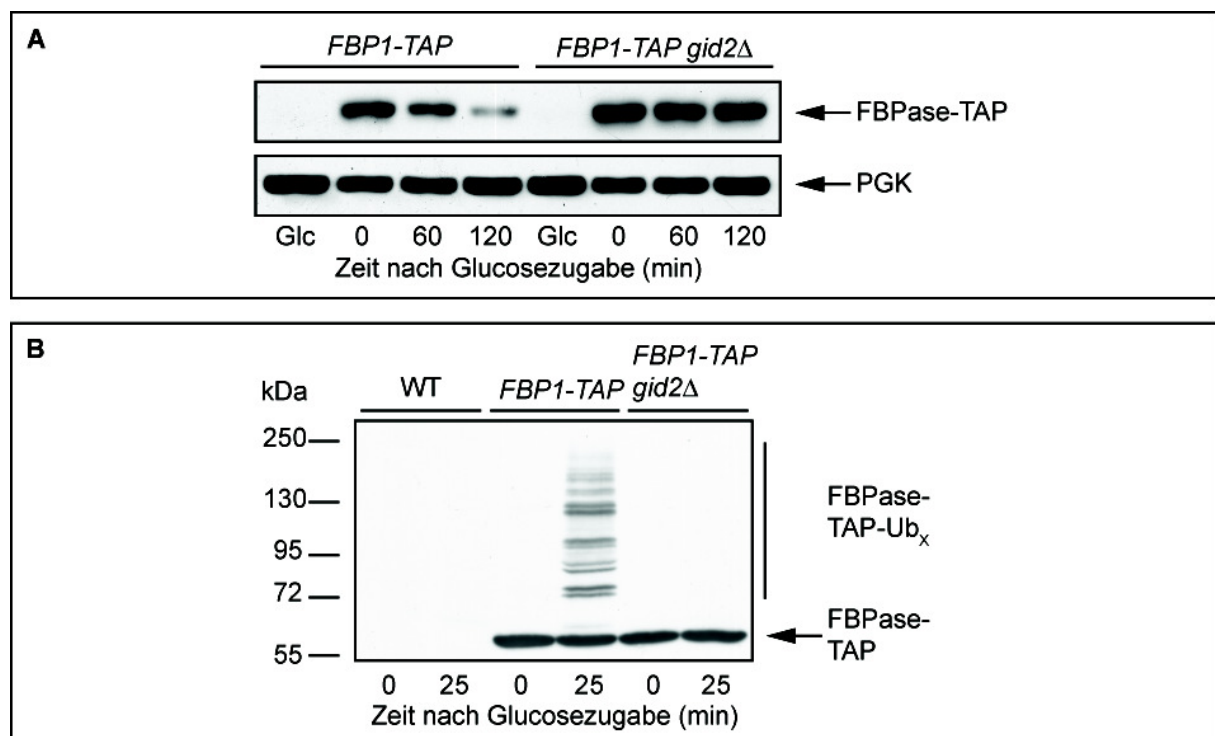
Um die Regulation der FBPase besser verstehen zu können, wurden neue Interaktionspartner der FBPase unter gluconeogenetischen Bedingungen sowie nach Induktion der Katabolitdegradation gesucht. Hierzu wurde eine Proteinreinigung mit TAP-fusionierter FBPase durchgeführt (TAP: engl. „tandem affinity purification“) (Puig *et al.*, 2001). Diese TAP-Proteinreinigung mit zwei Affinitätsreinigungsschritten ist besonders gut geeignet, Proteinkomplexe zu isolieren. Der TAP-Tag besteht aus 3 Teilen, einem N-terminalen Calmodulin Bindepeptid (CBP), einer TEV-Schnittstelle und einer Protein A Domäne. Die Klonierung des FBPase-TAP-Konstrukts erfolgte über homologe Rekombination der Kasette *TAP::TRP1<sup>K.L.</sup>* in die chromosomale DNA (T. Pfirrmann, 2006). C-terminal TAP-markierte FBPase wurde von ihrem nativen Promotor exprimiert. Das FBPase-TAP-Konstrukt ist funktionell, wie das Wachstum der Zellen in ethanolhaltigem Medium zeigt. Nach der Lyse erfolgte eine erste Affinitätsreinigung mit IgG-Sepharose, danach ein Verdau mit TEV-Protease, gefolgt von einer zweiten Affinitätsreinigung mit Calmodulin „Beads“ und einer Elution.

### Abbauverhalten von FBPase-TAP

Es wurde ein Katabolitinaktivierungsexperiment mit Zellen der Stämme FBPase-TAP und FBPase-TAP *gid2Δ* (YLB27) durchgeführt, um zu überprüfen ob FBPase-TAP ebenso wie FBPase das Protein *Gid2* für den Abbau benötigt, vgl. Abb. 8 Überprüfung plasmid-codierter

FBPase-TAP. Es wurden Proben unter glykolytischen (Glc) und gluconeogenetischen (0 min) Wachstumsbedingungen sowie nach „Glucoseshift“ der Zellen gezogen. Nach dem Zellaufschluss wurde eine Western Blot Analyse mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle) durchgeführt. Im *GID2* Deletionsstamm wird FBPase-TAP im Gegensatz zum Kontrollstamm nicht mehr abgebaut (Abb. 12A).

Zusätzlich wurde ein Polyubiquitinierungsexperiment mit den Stämmen W303-1B (Wildtyp, WT), FBPase-TAP und FBPase-TAP *gid2Δ* (YLB27) durchgeführt. Zellen wurden unter gluconeogenetischen (0 min) Bedingungen sowie 25 min nach dem Überführen in glucosehaltiges Medium geerntet. Nach dem Zellaufschluss wurde eine Immunopräzipitation mit IgG-Sepharose durchgeführt. Die eluierten Proteine wurden einer Western Blot Analyse mit Ubiquitin-Antikörpern unterzogen. Im FBPase-TAP Stamm ist nach Induktion der Katabolitinaktivierung (25 min) polyubiquitinierte FBPase-TAP detektierbar, im *GID2* Deletionsstamm findet nach Glucoseshift keine Polyubiquitinierung von FBPase-TAP statt (Abb. 12B). Im Kontrollstamm W303-1B (ohne FBPase-TAP) ist, wie erwartet, keine polyubiquitinierte FBPase-TAP zu erkennen. Die Protein A Domäne des TAP-Tags bindet jeden beliebigen Antikörper, dadurch ist in Abbildung 12B auch nicht-polyubiquitinierte FBPase-TAP zu sehen.



**Abbildung 12: Der Abbau sowie die Polyubiquitinierung von FBPase-TAP ist von Gid2 abhängig.** (A) Es wurde ein Katabolitinaktivierungsexperiment der FBPase in den Stämmen FBPase-TAP und FBPase-TAP *gid2Δ* (YLB27) durchgeführt. Die Proben wurden unter glykolytischen (Glc) und gluconeogenetischen (0 min) Bedingungen, sowie nach Glucosezugabe gezogen. Nach einer SDS-PAGE erfolgte die Western Blot Analyse mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle). (B) Mit Zellen der Stämme W303-1B (Wildtyp, WT), FBPase-TAP und FBPase-TAP *gid2Δ* (YLB27) wurde eine Immunopräzipitation mit IgG-Sepharose durchgeführt. Nach einer SDS-PAGE erfolgte die Western Blot Analyse mit Ubiquitin-Antikörpern.



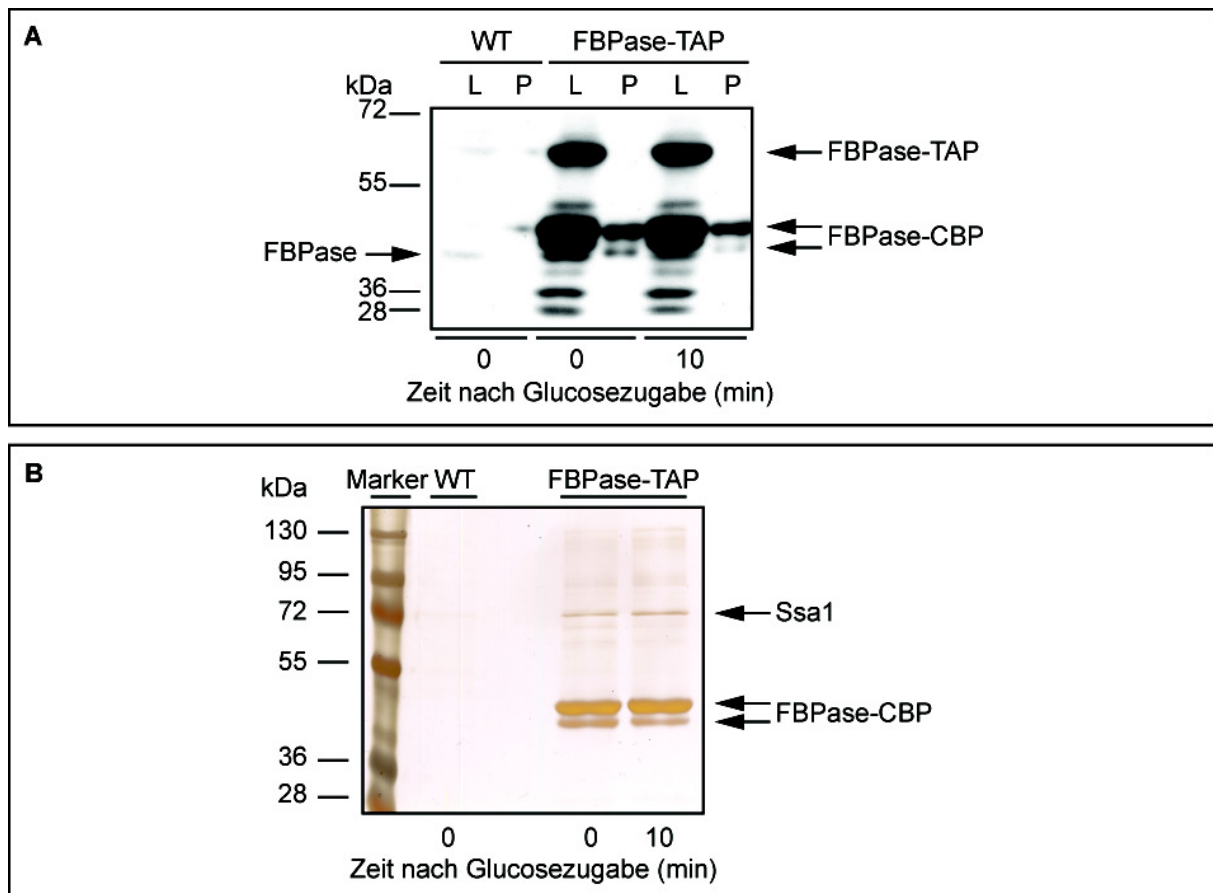
Dies zeigt, dass Gid2 für die Polyubiquitinierung und den Abbau von chromosomal exprimierter FBPase-TAP, wie auch von FBPase (Schüle *et al.*, 2000), benötigt wird. Gid2 enthält eine für RING-Proteine typische E3 Ligase-Aktivität (Santt *et al.*, 2008). Damit ist anzunehmen, dass FBPase-TAP über den gleichen Weg abgebaut wird wie FBPase.

### **Proteinreinigung von FBPase-TAP**

Die Hefestämme W303-1B (WT) und FBPase-TAP wurden unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen angezogen und dann in glucosehaltiges Medium überführt, die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (siehe Abb. 13). Nach dem Zellaufschluss wurde FBPase-TAP mit IgG-Sepharose präzipitiert, es folgte ein Verdau mit TEV-Protease, dabei wurde die Protein A Domäne abgespalten und FBPase-CBP freigesetzt. FBPase-CBP wurde dann an Calmodulin "Beads" gebunden, mit EGTA-Lösung eluiert und mit TCA präzipitiert. Die Proben wurden zunächst einer Western Blot Analyse mit FBPase-Antikörpern unterzogen (Abb. 13A). Es wurden jeweils Proben des Lysats (L) und der Proteinreinigung (P) nebeneinander aufgetragen. Im Lysat (L) ist FBPase-TAP (58 kDa) sowie FBPase mit einer geringeren molekularen Masse detektierbar, hierbei handelt es sich um Abbauprodukte von FBPase-TAP. Nach der Proteinreinigung (P) sind 2 FBPase-Banden erkennbar. Da das Calmodulin Bindepeptid (CBP) an die FBPase gebunden bleibt, führt dies zu einer molekularen Masse von ca. 42 kDa im Vergleich zur molekularen Masse von FBPase mit 38 kDa. In den Proben des Wildtyps ist wie erwartet nur im Lysat (L) FBPase detektierbar.

Die Proben der Proteinreinigung wurden auf ein weiteres SDS-Gel aufgetragen und nach der Auftrennung mit Silber gefärbt (Abb. 13B). In den FBPase-TAP Proben sind im Vergleich zur Negativkontrolle (WT) mehrere Banden zu erkennen. Es wurden die intensivsten Banden ausgeschnitten und zu Dr. A. Sickmann (Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg) geschickt, der dann die Proteinidentifikation mittels Massenspektrometrie vornahm. Die Doppelbande bei ca. 42 kDa wurde als FBPase-CBP identifiziert. Die Proteinbanden der beiden Proben (0, 10 min) bei ungefähr 72 kDa wurden als das Hsp70 Chaperon Ssa1 identifiziert. Da es keinen Unterschied in den Proben (0, 10 min) gab, folgt daraus, dass FBPase sowohl unter gluconeogenetischen Bedingungen (0 min) als auch nach Glucosegabe zu den Zellen mit Ssa1 interagiert.

Die gereinigte FBPase-CBP weist 2 Banden im silbergefärbten SDS-Gel auf. Ein Unterschied der molekularen Masse von FBPase könnte darauf zurückzuführen sein, dass FBPase in unterschiedlichen Modifikationen vorliegt (siehe Ergebnisteil 5.4) oder aufgrund eines FBPase-TAP Artefakts. Weitere höhermolekulare, schwächere Proteinbanden wurden mittels Massenspektrometrie als FBPase bestimmt, es konnten keine weiteren interagierenden Proteine identifiziert werden. Überraschenderweise wurde kein Gid-Protein oder gar der ganze Gid-Komplex als Interaktionspartner von FBPase unter den gewählten experimentellen Bedingungen gefunden.

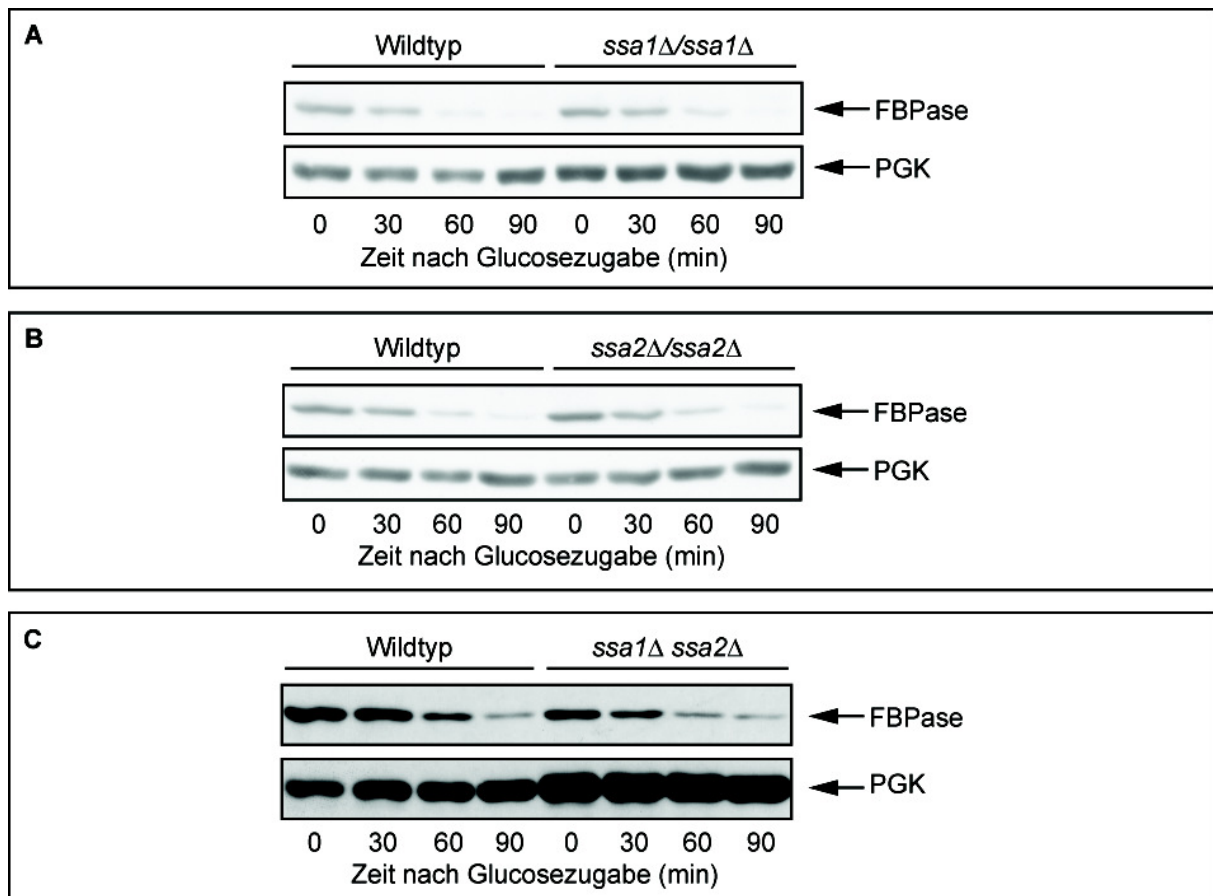


**Abbildung 13: Proteinreinigung von FBPase-TAP.** Zellen der Stämme W303-1B (WT) und FBPase-TAP wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen und dann in glucosehaltiges Medium überführt, Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Im Anschluss wurde eine TAP-Proteinreinigung nach Puig *et al.* (2001) durchgeführt. (A) Western Blot Analyse, es wurden Lysat-Proben (L) und Proben der Proteinreinigung (P) aufgetragen, die Immunodetektion erfolgte mit FBPase-Antikörpern. (B) Silbergefärbtes SDS-Gel mit Proben der Proteinreinigung. Banden wurden ausgeschnitten und angegebene Proteine mittels Massenspektrometrie (Dr. A. Sickmann, Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg) identifiziert.

### 5.3.2 Ssa1 ist für den Abbau der FBPase essentiell

#### Ssa1 wird für den Abbau der FBPase benötigt

Da Ssa1 mit FBPase unter verschiedenen Bedingungen interagiert, stellte sich nun die Frage, ob Ssa1 auch am katabolitinduzierten Abbau der FBPase beteiligt ist. Um dies zu überprüfen, wurden Zellen des Wildtypstamms (BY4743) und des *ssa1Δ/ssa1Δ* Stamms (Y30403) unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen angezogen und dann in glucosehaltiges Medium überführt, die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (siehe Abb. 14A). Nach der alkalischen Lyse wurden die Proben einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen. Die Immunodetektion erfolgte mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle).



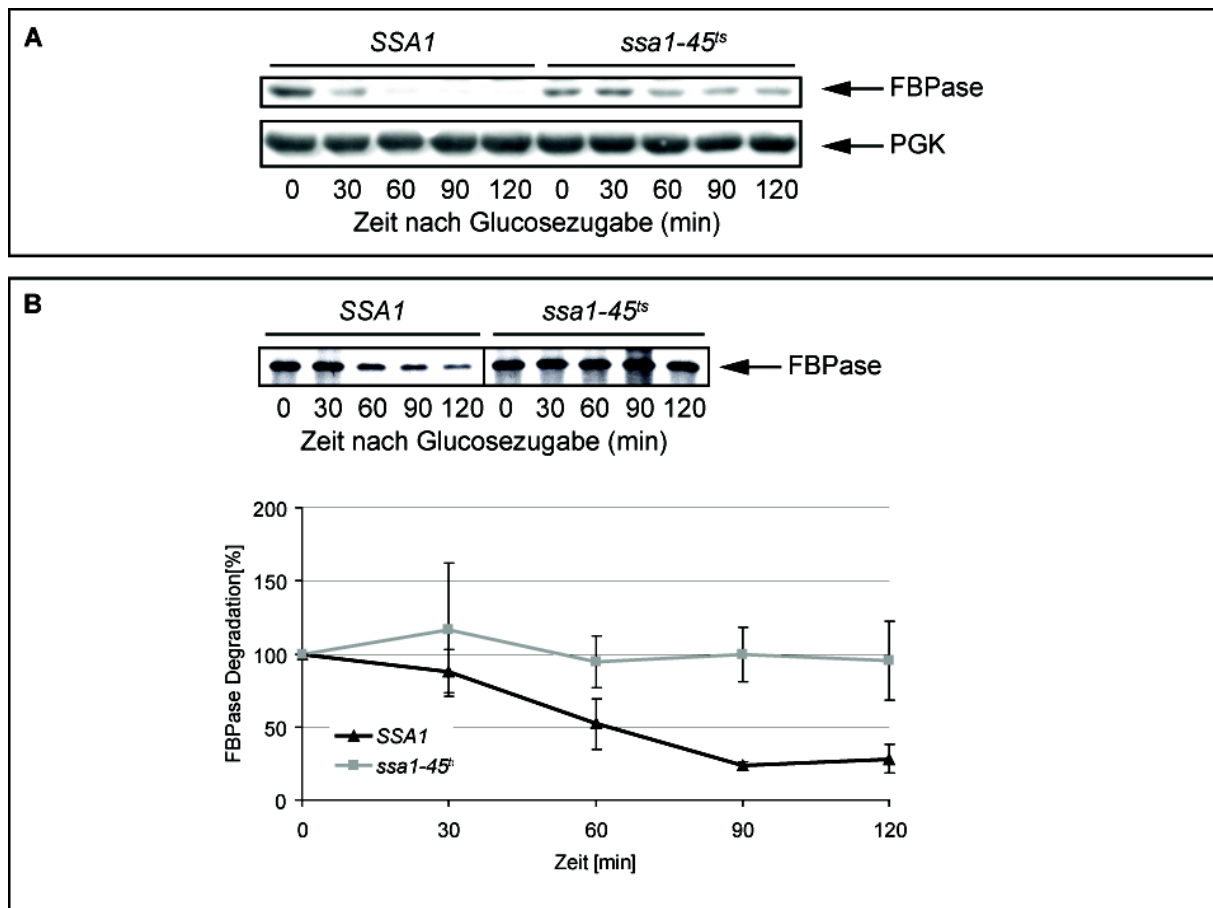
**Abbildung 14: Katabolitaktivierungsexperiment der FBPase in SSA Deletionsstämmen.** Zellen wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen, in glucosehaltiges Medium überführt und Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen, aufgeschlossen, einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen. Die Immunodetektion erfolgte mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle). Experimente wurden mit folgenden Stämmen durchgeführt (A) Wildtyp (BY4743) und *ssa1Δ/ssa1Δ* (Y30403) (B) Wildtyp (BY4743) und *ssa2Δ/ssa2Δ* (Y31512) (C) Wildtyp (YPD01) und *ssa1Δ ssa2Δ* (YPD03).

Wie in Abbildung 14A zu sehen ist, wird FBPase im *ssa1Δ/ssa1Δ* Deletionsstamm wildtypmäßig abgebaut. Dieses Experiment wurde mit einem *ssa2Δ/ssa2Δ* Stamm (Y31512) wiederholt. Hier wird FBPase ebenfalls wildtypmäßig abgebaut (Abb. 14B). Selbst in dem Doppeldeletionsstamm *ssa1Δ ssa2Δ* (YPD03), in dem die beiden Hsp70 Chaperone Ssa1 und Ssa2 fehlen, wird FBPase abgebaut (Abb. 14C). Mit diesen Experimenten kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass Ssa1 dennoch am Abbau der FBPase beteiligt ist. Neben Ssa1 werden noch die Hsp70 Proteine Ssa2, Ssa3 und Ssa4 in der Zelle synthetisiert, die zu 84 % bis 99 % untereinander identisch sind und überlappende Funktionen haben. Steht ein Ssa-Protein nicht zur Verfügung, so kann seine Funktion von anderen Ssa-Proteinen übernommen werden (Satyanarayana *et al.*, 2000).

In weiteren Versuchen wurde ein *ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ* Deletionsstamm verwendet, der entweder ein *SSA1* Wildtypgen oder ein temperatursensitives (ts), punktmutiertes *ssa1-45<sup>ts</sup>* Allel enthielt.

Es wurde im Folgenden ein Katabolitinaktivierungsexperiment der FBPase in den Stämmen *SSA1* (YPD21) und *ssa1-45<sup>ts</sup>* (YPD22), in dem alle drei weiteren Ssa-Chaperone fehlen, durchgeführt (Becker *et al.*, 1996; Taxis *et al.*, 2003). Die Zellen wurden bei 25 °C in ethanolhaltigem Medium angezogen, eine Stunde bei 37 °C inkubiert (dies führt zur Fehlfaltung bzw. Inaktivierung von Ssa1 im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>*) und dann in glucosehaltiges, vorgewärmtes Medium umgesetzt und weiterhin bei 37 °C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben gezogen, aufgeschlossen und einer Western Blot Analyse unterzogen (siehe Abb. 15A). Die Immunodetektion erfolgte mit FBPase- und PGK-Antikörpern. In der *ssa1-45<sup>ts</sup>*-Mutante wird FBPase nicht mehr abgebaut.

Um die Degradation der FBPase in dem Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* zu quantifizieren, wurde eine Pulse-Chase Analyse durchgeführt (Abb. 15B). Die Zellen der Stämme *SSA1* (YPD21) und *ssa1-45<sup>ts</sup>* (YPD22) wurden wie im Material & Methoden Teil beschrieben, angezogen, mit <sup>35</sup>S-Methionin radioaktiv markiert und geerntet. Nach der Lyse wurden die Proben mit FBPase-Antikörpern und Protein A Sepharose behandelt, um FBPase zu präzipitieren. Das Experiment wurde dreimal durchgeführt. Im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* wird FBPase nicht mehr abgebaut, die Stabilisierung beträgt ca. 100%. Daraus folgt, dass Ssa1 für den katabolitinduzierten Abbau der FBPase essentiell ist.



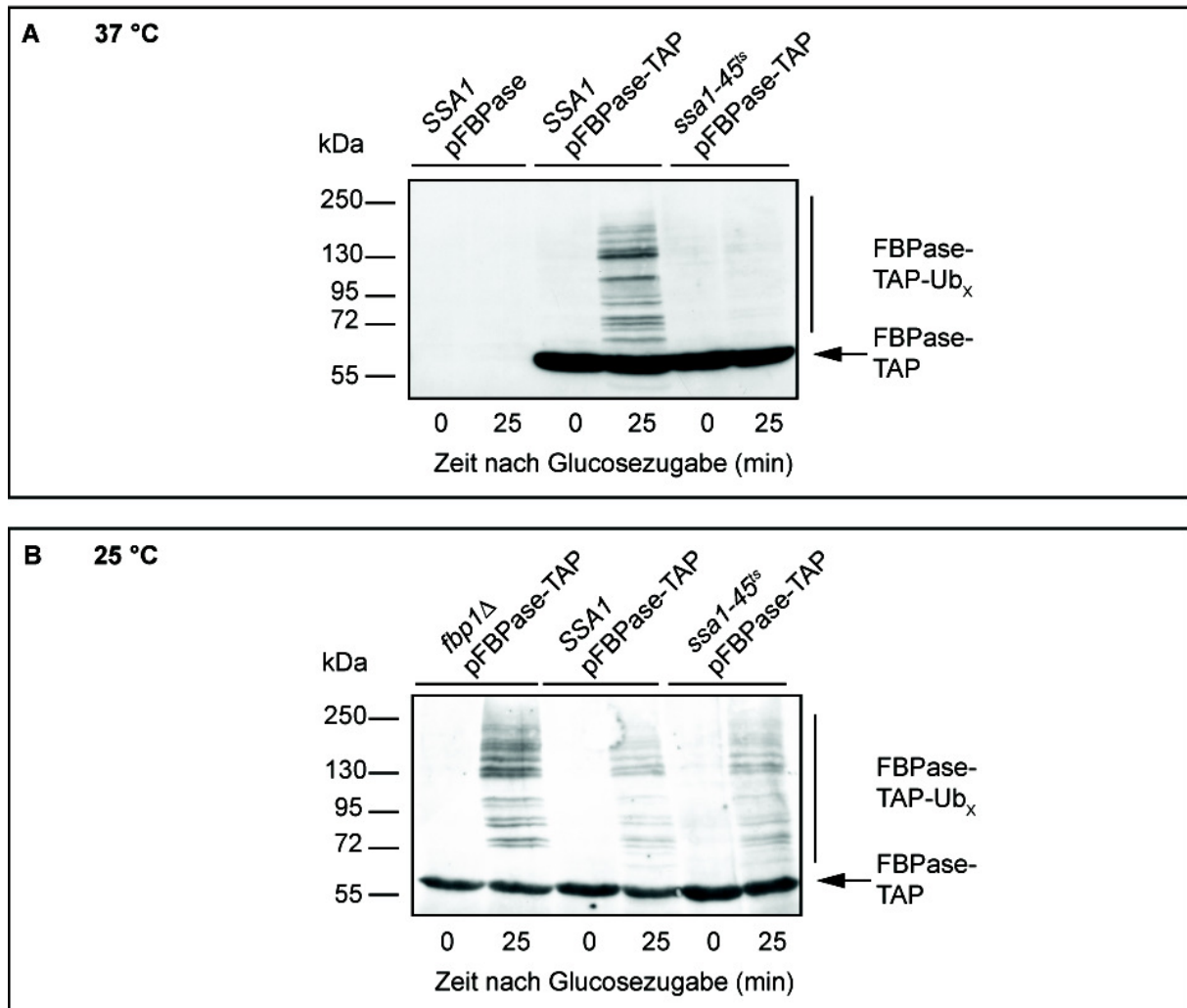
**Abbildung 15: Katabolitdegradation der FBPase im Stamm *ssa1-45<sup>s</sup>*.** (A) Zellen der Stämme *SSA1* (YPD21) und *ssa1-45<sup>s</sup>* (YPD22) wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen bei 25 °C inkubiert, 1 h bei 37 °C und dann in glucosehaltiges Medium überführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen, aufgeschlossen und einer Western Blot Analyse mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle) unterzogen. (B) Eine Pulse-Chase Analyse wurde mit den Stämmen *SSA1* (YPD21) und *ssa1-45<sup>s</sup>* (YPD22), wie in Material & Methoden beschrieben, durchgeführt. Die Zellen wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen mit <sup>35</sup>S-Methionin markiert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach "Shift" in glucosehaltiges Medium geerntet. Die Präzipitation erfolgte mit FBPase-Antikörpern. Die Kurven stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten dar, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

### **Ssa1 wird für die Polyubiquitinierung der FB Pase benötigt**

Es ist bekannt, dass zumindest die Untereinheiten Gid1/Vid30, Gid2, Gid3/Ubc8, Gid4/Vid24 und Gid7 des Gid-Komplexes für die Polyubiquitinierung von FB Pase benötigt werden (Schüle *et al.*, 2000; Regelman *et al.*, 2003; T. Pfirrmann, 2006; Santt *et al.*, 2008). Da Ssa1 für den Abbau der FB Pase notwendig ist, stellte sich nun die Frage, ob Ssa1 auch für die vorhergehende Polyubiquitinierung essentiell ist. Bei Polyubiquitinierungsversuchen treten häufig Probleme bei der Detektion der polyubiquitinierten Substrate auf. Da der TAP-Tag gut detektierbar ist, wurde hier FB Pase-TAP als Substrat gewählt.

Das funktionelle Plasmid pFBPase-TAP wurde in die Stämme *SSA1* (YPD21) und *ssa1-45<sup>ts</sup>* (YPD22) transformiert. Als Kontrolle wurde der Stamm *SSA1* pFBPase verwendet. Zellen wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen bei 25 °C inkubiert, 1 h bei 37 °C und dann in glucosehaltiges, vorgewärmtes Medium überführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen (siehe Abb. 16A). Nach dem Zellaufschluss wurde eine Immunopräzipitation mit IgG-Sepharose durchgeführt. Nach der Elution der Proteine wurden die Proben einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen, die Immunodetektion erfolgte mit Ubiquitin-Antikörpern. Im Stamm *SSA1* pFBPase-TAP ist nach Induktion der Katabolitinaktivierung polyubiquitinierte FBPase-TAP detektierbar, im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* pFBPase-TAP findet nach Glucosezugabe keine Polyubiquitinierung von FBPase-TAP mehr statt (Abb. 16A). Im Kontrollstamm, transformiert mit dem Vektor pFBPase, ist wie erwartet keine Bande zu erkennen. Dies zeigt, dass Ssa1 für die Polyubiquitinierung von FBPase benötigt wird. Offensichtlich sind sowohl Ssa1 als auch der Gid-Komplex an diesem Prozess beteiligt.

Es wurde ebenfalls ein Polyubiquitinierungsversuch mit den Stämmen *fbp1Δ* (YJJ08) pFBPase-TAP, *SSA1* pFBPase-TAP und *ssa1-45<sup>ts</sup>* (YPD22) pFBPase-TAP unter permissiven Bedingungen (25 °C) durchgeführt, um zu zeigen, dass *ssa1-45<sup>ts</sup>* prinzipiell funktionstüchtig ist und der Effekt nur auf dem Temperaturshift bzw. der daraus resultierenden Inaktivierung von *ssa1-45<sup>ts</sup>* beruht. Es zeigte sich, dass das Substrat FBPase-TAP im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* nach Glucosegabe noch polyubiquitiniert wird (Abb. 16B).



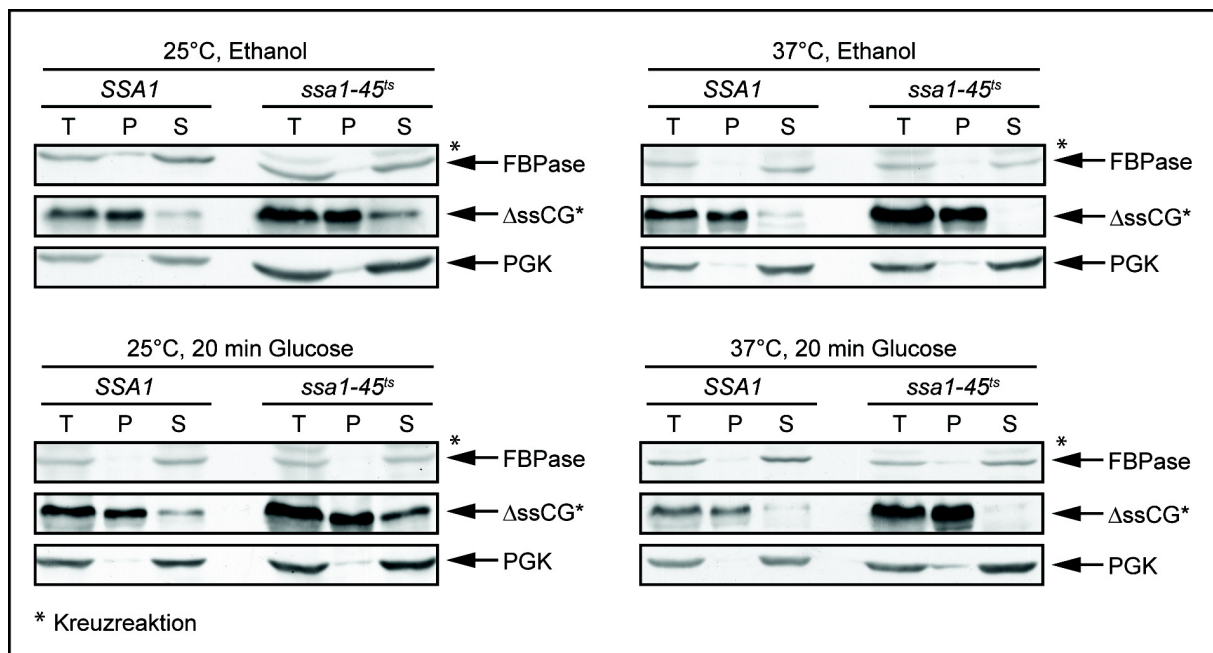
**Abbildung 16: Ssa1 wird für die Polyubiquitinierung von FBPAse benötigt.** Die Zellen wurden unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen bei 25 °C angezogen, 1 h bei 37 °C und dann in glucosehaltiges Medium überführt (A), bei (B) erfolgte die Inkubation ausschließlich bei 25 °C. Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und aufgeschlossen. Es wurde eine Immuno- präzipitation mit IgG-Sepharose durchgeführt, die Western Blot Analyse erfolgte mit Ubiquitin- Antikörpern. Die Versuche wurden mit folgenden Stämmen durchgeführt (A) *SSA1* (YPD21) pFBPAse, *SSA1* pFBPAse-TAP und *ssa1-45<sup>ts</sup>* (YPD22) pFBPAse-TAP, (B) *fbp1Δ* (YJJ08) pFBPAse-TAP, *SSA1* pFBPAse-TAP und *ssa1-45<sup>ts</sup>* (YPD22) pFBPAse-TAP.

### 5.3.3 Untersuchungen zur Löslichkeit der FBPAse

Es ist bekannt, dass das Hsp70 Chaperon Ssa1 dazu benötigt wird, Proteine löslich zu halten (Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Diese Proteine können korrekt gefaltet oder auch fehlgefaltet sein, wie das künstliche Substrat  $\Delta$ ssCG\* (Park *et al.*, 2007). Dieses Substrat besteht aus fehlgefaltetem CPY\* (Carboxypeptidase Y)-Protein fusioniert mit GFP (engl. „green fluorescent protein“).  $\Delta$ ssCG\* fehlt die ER-Signalsequenz, so dass das Protein nicht in das endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert wird sondern im Cytosol vorliegt. Es

stellte sich die Frage, ob die essentielle Funktion des Proteins Ssa1 für die Polyubiquitinierung und Degradation der FBPase darin besteht, dass Ssa1 dazu benötigt wird, FBPase in einem löslichen Zustand zu halten. Ohne Ssa1 würde FBPase möglicherweise aggregieren und deswegen nicht dem Ubiquitin-Proteasom-System zugeführt werden können.

Aus diesem Grund wurde eine Zellfraktionierung analog zu Park *et al.* (2007) durchgeführt und getestet in welcher Fraktion FBPase vorliegt. Als Kontrolle wurde das plasmidcodierte Substrat  $\Delta$ ssCG\* ( $p\Delta$ ssCG\*) verwendet, das in die Stämme *SSA1* (YPD21) und *ssa1-45<sup>ts</sup>* (YPD22) transformiert wurde. Es ist bekannt, dass dieses Substrat nach einstündiger Inkubation bei 37 °C im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* nicht mehr in der löslichen Fraktion vorliegt (Park *et al.*, 2007).



**Abbildung 17: Löslichkeit von FBPase im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>*.** Es wurden Zellen der Stämme *SSA1* (YPD21) und *ssa1-45<sup>ts</sup>* (YPD22), die mit dem Plasmid  $p\Delta$ ssCG\* transformiert wurden, in ethanolhaltigem Medium bei 25 °C angezogen. Danach wurden die Zellen entweder direkt in glucosehaltiges Medium überführt, oder erst nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C. Es wurden Proben zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, aufgeschlossen und einer Zellfraktionierung unterzogen. Die selben Proteinmengen der Fraktion Gesamtproteinmenge (T), Überstand (S) und Pellet (P) wurden einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen. Die Immunodetektion erfolgte mit FBPase-, CPY- und PGK-Antikörpern (Kontrolle).

Die Zellen der Plasmid-transformierten Stämme wurden über Nacht in ethanolhaltigem Medium bei 25 °C inkubiert. Danach wurden sie entweder direkt oder erst nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C in glucosehaltiges Medium überführt. An jedem Zwischenschritt wurden Proben gezogen (siehe Abb. 17), aufgeschlossen und einer Zellfraktionierung



unterzogen. Die Zentrifugation erfolgte bei 130 000 x g, um die lösliche cytosolische Fraktion (S; engl. „supernatant“) von der Membranfraktion und den aggregierten Proteinen (P) zu trennen. Es wurden gleiche Proteinmengen der Fraktionen Gesamtproteinmenge (T; engl. „total protein“), Überstand (S) und Pellet (P) auf ein Gel geladen, einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen. Die Immunodetektion erfolgte mit FBPase-Antikörpern, CPY- und PGK-Antikörpern zur Kontrolle. PGK ist ein lösliches Substrat und befindet sich bei einer Zellfraktionierung im Überstand (S). Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, befindet sich das Kontrollsubstrat  $\Delta$ ssCG\* im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* bei 37 °C, wie erwartet, in der Pelletfraktion (P). In Zellen der Stämme *SSA1* und *ssa1-45<sup>ts</sup>* befindet sich FBPase bei 25 °C und 37 °C, unter gluconeogenetischen Bedingungen (Ethanol) sowie nach "Shift" der Zellen in glucosehaltiges Medium (Glucose) im Überstand (S). Folglich wird Ssa1 nicht dazu benötigt, FBPase in einem löslichen Zustand zu halten. Ssa1 muss also eine andere Rolle beim Abbau der FBPase innehaben.

### 5.3.4 Analyse der Interaktion von FBPase mit Ssa1 und Gid1/Vid30

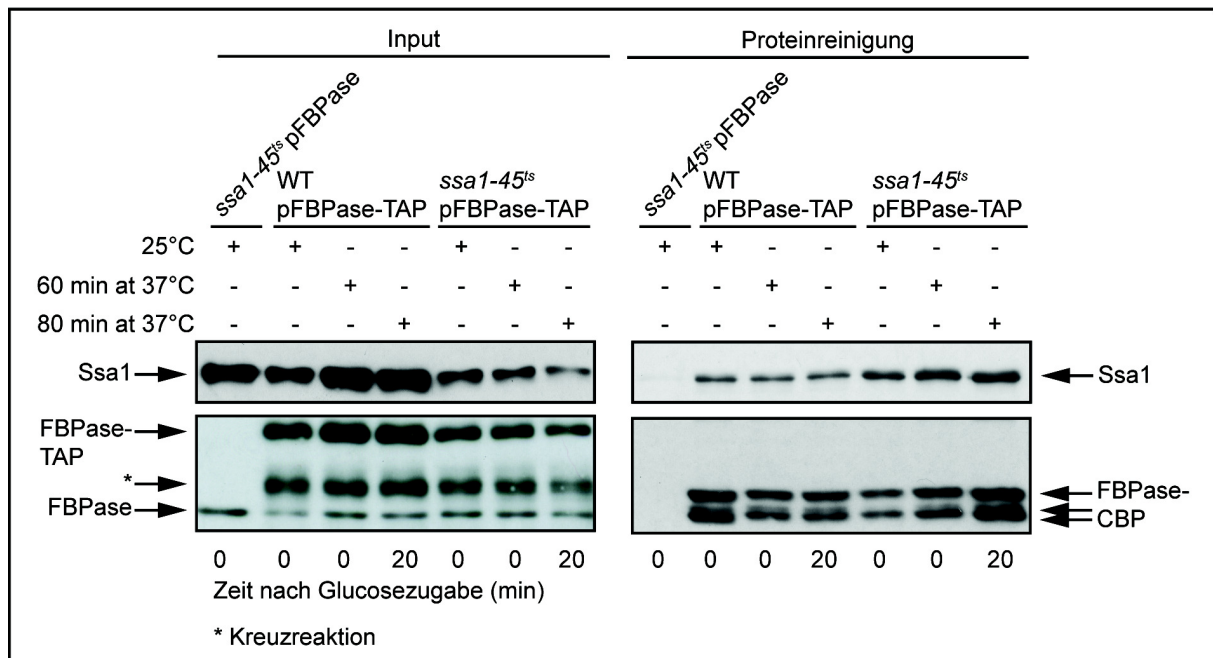
Der Gid-Komplex ist essentiell für die Polyubiquitinierung und den Abbau der FBPase (Schüle *et al.*, 2000; Regelman *et al.*, 2003; Santt *et al.*, 2008). Während dieses Prozesses findet eine Interaktion zwischen Gid-Proteinen und FBPase statt, die mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationen gezeigt werden konnte (Abb. 9; Santt *et al.*, 2008). Da Ssa1 an der Polyubiquitinierung der FBPase beteiligt ist, stellte sich die Frage, ob im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* unter restriktiven Bedingungen (37 °C) die Interaktion von FBPase zu Ssa1 und Gid1/Vid30 verändert ist.

#### Interaktion von FBPase mit Ssa1

Es sollte die Frage beantwortet werden, wie sich die Interaktion von FBPase mit Ssa1 unter verschiedenen Bedingungen verhält und ob fehlgefaltetes, inaktives Ssa1 überhaupt noch an FBPase gebunden ist. Da Ssa1 in Immunopräzipitationsexperimenten unspezifisch an die Protein A Sepharose bindet, wurden hierfür Proteinreinigungen nach Puig *et al.* (2001) mit zwei Affinitätsreinigungsschritten durchgeführt.

Zellen der Stämme *SSA1* (YPD21) und *ssa1-45<sup>ts</sup>* (YPD22) wurden mit den Plasmiden pFBPase und pFBPase-TAP transformiert und bei 25 °C unter gluconeogenetischen Bedingungen über Nacht angezogen. Vor dem „Shift“ in glucosehaltiges Medium erfolgte

eine Inkubation von 1 h bei 37 °C. 400 OD<sub>600</sub> Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und einer TAP-Proteinreinigung unterzogen (siehe Abb. 18). Proben des Lysats (Input) und der Proteinreinigung wurden einer Western Blot Analyse mit Ssa1- und FBPase-Antikörpern unterzogen. In Abbildung 18 ist deutlich zu sehen, dass FBPase-TAP zu allen Zeitpunkten mit Ssa1 interagiert, selbst nach Inaktivierung von Ssa1 im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* bei der restriktiven Temperatur von 37 °C. Im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* kann im Vergleich zum Stamm *SSA1* mehr Ssa1-Protein präzipitiert werden. Eventuell verhindert die Punktmutation ein Ablösen des an FBPase-TAP gebundenen Proteins Ssa1-45. In den Proben der Protein-reinigung treten mehrere FBPase-CBP (FBPase mit Calmodulin Bindepeptid) Banden auf, die vermutlich auf ein TAP-Tag Artefakt zurückzuführen sind.



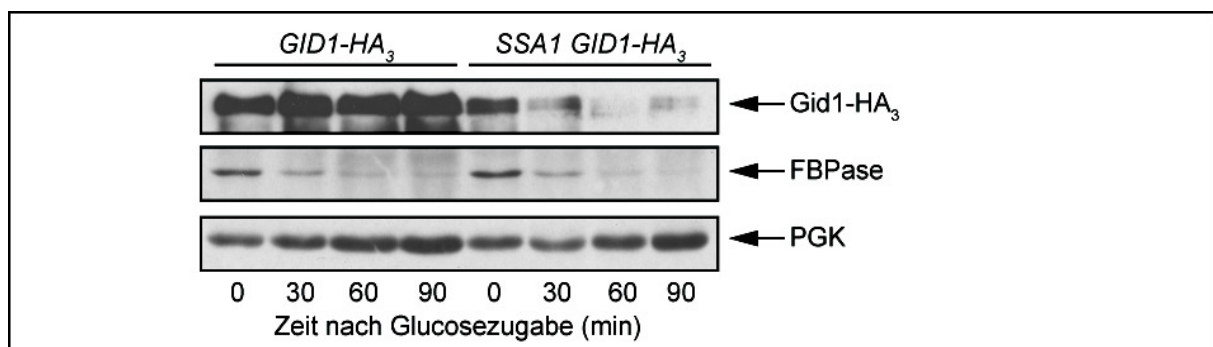
**Abbildung 18: Proteinreinigung von FBPase-TAP im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>*.** Zellen der Stämme *SSA1* (YPD21) und *ssa1-45<sup>ts</sup>* (YPD22), transformiert mit den Plasmiden pFBPase und pFBPase-TAP, wurden bei 25 °C unter gluconeogenetischen Bedingungen über Nacht angezogen. Vor dem Überführen in glucosehaltiges Medium erfolgte eine Inkubation von 1 h bei 37 °C. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und einer TAP-Proteinreinigung unterzogen. Nach einer SDS-PAGE und einem Western Blot mit Proben des Lysats (Input) und der Proteinreinigung, erfolgte die Immunodetektion mit Ssa1- und FBPase-Antikörpern.

### Interaktion von FBPase mit dem Gid Komplex in Abhängigkeit von Ssa1

Da FBPase unter allen gewählten Bedingungen mit Ssa1 interagiert und das Chaperon für die Polyubiquitinierung von FBPase essentiell ist, stellte sich die Frage, ob Ssa1 für die Bindung des Gid-Komplexes an FBPase benötigt wird. Ein ähnlicher Prozess findet in Säugerzellen statt. Bei einigen Substraten, wie z.B. ungereiftem CFTR (engl. „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“) rekrutiert das interagierende Chaperon Hsp70 die

Ligase CHIP, welche für die Polyubiquitinierung sowie den Abbau des Substrats benötigt wird (Arndt *et al.*, 2005). Allerdings ist CHIP nicht in Hefezellen konserviert.

Um die Bindung von FB Pase an den Gid-Komplex über das Ssa1-Protein zu testen, wurde im Stammhintergrund *SSA1 ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ* (YPD21) und *ssa1-45<sup>ts</sup> ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ* (YPD22) Gid1 und als Kontrollprotein Gid6 mit einem HA<sub>3</sub>-Tag versehen. Die Funktionalität von Gid1 und Gid6 in den Stämmen *SSA1 GID1-HA<sub>3</sub>* (YJJ20) und *SSA1 GID6-HA<sub>3</sub>* (YJJ19) bzw. *ssa1-45<sup>ts</sup> GID1-HA<sub>3</sub>* (YJJ18) wurde durch Katabolitinaktivierungsexperimente bestätigt (nicht gezeigt). Es erfolgte eine Expression der Epitop-markierten Gid-Proteine, FB Pase wurde immer noch wie im Wildtyp abgebaut. Zusätzlich wurde ein Katabolitinaktivierungsexperiment mit den Stämmen *GID1-HA<sub>3</sub>* (YJR12) und *SSA1 GID1-HA<sub>3</sub>* (YJJ20) durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Proteinmenge an Gid1-HA<sub>3</sub> im Stammhintergrund *SSA1 ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ* deutlich geringer ist als im W303-1B Hintergrund (Abb. 19).

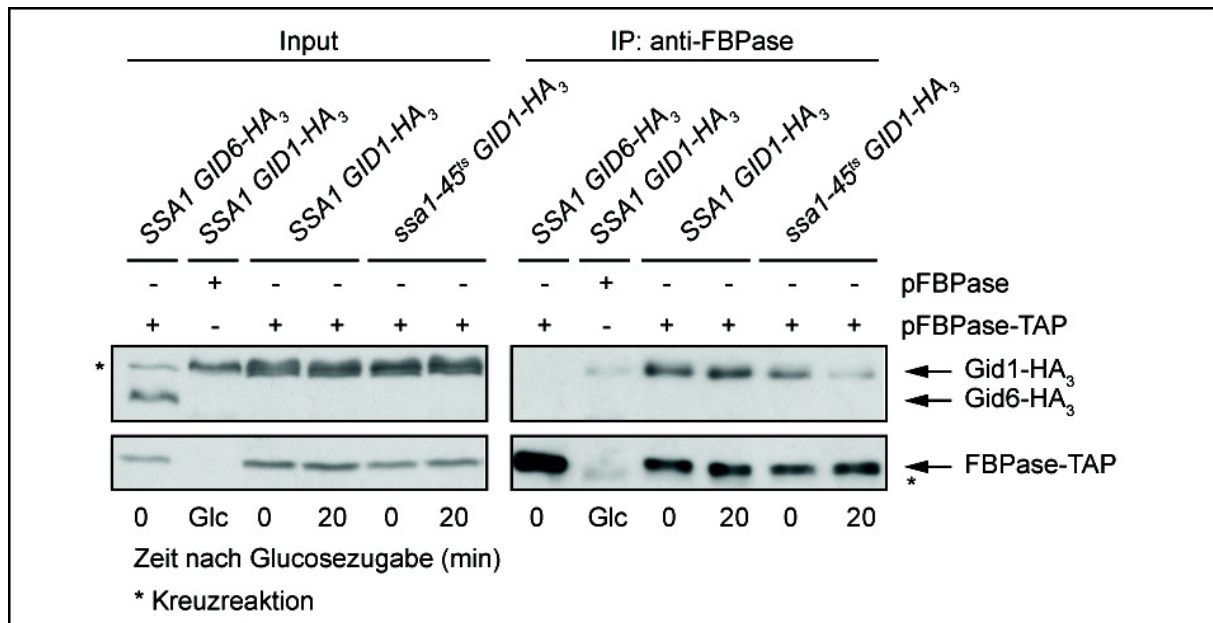


**Abbildung 19: Expression von Gid1-HA<sub>3</sub>.** Es wurden Katabolitinaktivierungsexperimente der FB Pase in den Stämmen *GID1-HA<sub>3</sub>* (YJR12) und *SSA1 GID1-HA<sub>3</sub>* (YJJ20) durchgeführt, Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen. Nach einer SDS-PAGE und einem Western Blot erfolgte die Immunodetektion mit FB Pase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle).

Es wurde nun die Interaktion von FB Pase mit Gid1-HA<sub>3</sub> in Abhängigkeit von Ssa1 untersucht. In Immunopräzipitationsexperimenten mit FB Pase traten immer wieder Detektionsprobleme auf. Das FB Pase-Monomer hat eine molekulare Masse von 38 kDa und in Immunoblots liegen die Proteinbanden unterhalb der IgG-Banden von 50 kDa und werden von diesen starken Signalen verdeckt. Aufgrund dessen wurde in dem Experiment FB Pase-TAP mit einer molekularen Masse von 58 kDa als Substrat eingesetzt.

Die Stämme *SSA1 GID6-HA<sub>3</sub>* (YJJ19), *SSA1 GID1-HA<sub>3</sub>* (YJJ20) und *ssa1-45<sup>ts</sup> GID1-HA<sub>3</sub>* (YJJ18) wurden mit den Plasmiden pFB Pase und pFB Pase-TAP transformiert. Die Zellen wurden unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen bei 25 °C angezogen und vor dem Wechsel in glucosehaltiges Medium 1 h bei 37 °C inkubiert. Proben wurden zu den

angegebenen Zeitpunkten geerntet (siehe Abb. 20), nach der Lyse der Zellen erfolgte die Immunopräzipitation mit FBPase-Antikörpern. Es wurden Proben des Lysats (Input) und der Immunopräzipitation (IP) einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen. Die Immunodetektion wurde mit HA- und FBPase-Antikörpern vorgenommen.



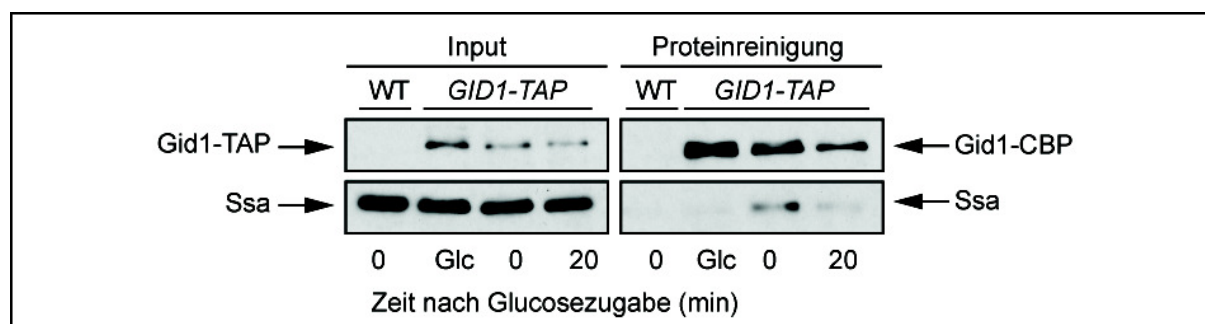
**Abbildung 20: Interaktion von FBPase mit Gid1/Vid30 in Abhängigkeit von Ssa1.** Die Stämme *SSA1 GID6-HA<sub>3</sub>* (YJJ19), *SSA1 GID1-HA<sub>3</sub>* (YJJ20) und *ssa1-45<sup>ts</sup> GID1-HA<sub>3</sub>* (YJJ18) wurden mit dem Plasmid pFBPase und pFBPase-TAP transformiert. Die Zellen wurden in glucosehaltigem Medium (Glc), dann in ethanolhaltigem Medium angezogen und wieder in glucosehaltiges Medium überführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen. Nach der Lyse erfolgte die Immunopräzipitation mit FBPase-Antikörpern. Die Immunodetektion wurde mit HA- und FBPase-Antikörpern vorgenommen.

Wie in Abbildung 20 zu sehen ist, konnte keine Interaktion von FBPase-TAP mit Gid6-HA<sub>3</sub> nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass keine unspezifische Interaktion von FBPase-TAP und dem HA<sub>3</sub>-Tag auftrat. Ebenso konnte im Kontrollstamm *SSA1 GID1-HA<sub>3</sub>* pFBPase unter glykolytischen Bedingungen (Glc; keine FBPase Expression) das Protein Gid1-HA<sub>3</sub> nicht präzipitiert werden, der FBPase-Antikörper bindet also nicht unspezifisch an Gid1-HA<sub>3</sub>. FBPase-TAP interagiert unter gluconeogenetischen Bedingungen (0 min) und 20 min nach dem „Shift“ der Zellen in glucosehaltiges Medium immer mit Gid1-HA<sub>3</sub>. Im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup> GID1-HA<sub>3</sub>* pFBPase-TAP ist die Interaktion von FBPase-TAP mit Gid1-HA<sub>3</sub> nach Glucosezugabe (20 min) praktisch nicht mehr vorhanden. Ssa1 ist offensichtlich das Verbindungsglied zwischen FBPase und seiner Ligase, dem Gid-Komplex unter den restriktiven Bedingungen von 37 °C. Fehlgefaltetes, inaktives Ssa1 führt zu einem Verlust der Interaktion von FBPase und dem E3 allerdings erst nach Glucosezugabe.

### 5.3.5 Interaktion von Gid1/Vid30 mit Ssa-Proteinen

FBPase interagiert unter gluconeogenetischen Bedingungen und nach „Shift“ der Zellen in glucosehaltiges Medium mit Ssa1 und dem Gid-Komplex. Somit sollte es auch möglich sein, eine Interaktion zwischen Komponenten des Gid-Komplexes und Ssa1 nachzuweisen. Da eine Detektion von Ssa1 in Immunopräzipitationsexperimenten nicht möglich ist, wurde hier wieder eine Proteinreinigung nach Puig *et al.* (2001) mit funktionellem Gid1-TAP als Substrat durchgeführt.

Es wurden die Stämme W303-1B (WT) und *GID1-TAP* (YJJ16) in YPD-Medium inkubiert (Glc), dann über Nacht in YPEtOH angezogen und dann wieder in glucosehaltiges Medium überführt. 800 OD<sub>600</sub> Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und einer TAP-Proteinreinigung unterzogen (siehe Abb. 21). Proben des Lysats (Input) und der Proteinreinigung wurden einer Western Blot Analyse mit Ssa1- und TAP-Antikörpern unterzogen. In den Proben der Proteinreinigung war eine Detektion von FBPase nicht möglich. Dies ist vermutlich auf die geringe Menge an gebundener FBPase zurückzuführen. Die Detektion der Proben der Proteinreinigung von Gid1-TAP mit Ssa1-Antikörpern zeigt unter gluconeogenetischen Bedingungen (0 min) und nach "Shift" der Zellen in glucosehaltiges Medium (20 min) ein Gid1-CBP Signal. Es ist auch ein Ssa-Signal detektierbar. Es sind allerdings alle 4 Ssa-Proteine in den Zellen vorhanden, die auch aufgrund der Ähnlichkeit alle mit dem Ssa1-Antikörper detektiert werden können. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse ist es aber sehr wahrscheinlich, dass es sich bei dem Ssa-Signal um Ssa1 handelt. Nach Glucosegabe (20 min) ist die Ssa-Bande deutlich schwächer wie unter gluconeogenetischen Bedingungen (0 min), dies ist vermutlich auf die geringere Proteinmenge an Gid1-TAP zurückzuführen (siehe Input).

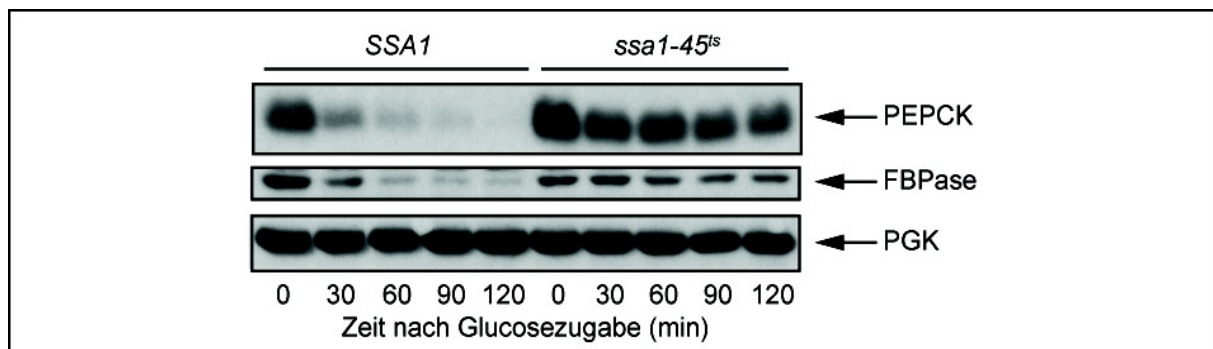


**Abbildung 21: Proteinreinigung von Gid1-TAP.** Zellen der Stämme W303-1B (WT) und *GID1-TAP* (YJJ16) wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen inkubiert und dann in glucosehaltiges Medium überführt, Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und einer TAP-Proteinreinigung unterzogen. Die Proben des Lysats (Input) und der Proteinreinigung wurden einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen, die Immunodetektion erfolgte mit TAP- und Ssa1-Antikörpern.

### 5.3.6 Ssa1 ist auch am Abbau von PEPCK beteiligt

Die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) ist ein weiteres Schlüsselenzym der Gluconeogenese. Sie wird ebenso wie FBPase unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen exprimiert, nach Überführen in glucosehaltiges Medium wird das Enzym inaktiviert und dann abgebaut (Holzer, 1976; Muller *et al.*, 1981; von Herrath und Holzer, 1988; Mercado and Gancedo, 1992). Es wurde postuliert, dass FBPase, PEPCK und MDH2 gemeinsam abgebaut werden (Gibson and McAlister-Henn, 2003). In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass der Gid-Komplex auch essentiell für den PEPCK-Abbau ist, denn in den Deletionsstämmen *gid2Δ* und *gid3Δ/ubc8Δ* ist PEPCK nach Glucosegabe stabilisiert (Santt *et al.*, 2008). Es stellte sich nun die Frage, ob Ssa1 ebenfalls am Abbau von PEPCK beteiligt ist.

Zellen der Stämme *SSA1* (YPD21) und *ssa1-45<sup>ts</sup>* (YPD22) wurden in ethanolhaltigem Medium bei 25 °C angezogen, 1 h bei 37 °C inkubiert und dann in glucosehaltiges Medium überführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten (Abb. 22) entnommen, aufgeschlossen und einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen. Die Immunodetektion erfolgte mit PEPCK-, FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle). Im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* werden PEPCK und FBPase unter den für *ssa1-45<sup>ts</sup>* restriktiven Bedingungen von 37 °C im Vergleich zum Kontrollstamm nicht abgebaut. Ssa1 ist somit auch am Abbau von PEPCK beteiligt.



**Abbildung 22: Katabolitdegradation von PEPCK und FBPase im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>*.** Die Zellen der Stämme *SSA1* (YPD21) und *ssa1-45<sup>ts</sup>* (YPD22) wurden in ethanolhaltigem Medium bei 25 °C angezogen, 1 h bei 37 °C und dann in glucosehaltiges Medium überführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen, aufgeschlossen, einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen. Die Immunodetektion erfolgte mit PEPCK-, FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle).

### 5.3.7 Einfluss verschiedener Co-Faktoren auf den Abbau der FBPase

Das Hsp70 Chaperon Ssa1 ist essentiell für den Abbau von FBPase. Es ist nahe liegend, dass weitere Faktoren der Chaperon-Maschinerie wie die Co-Faktoren der Klasse Hsp40 oder NEF (engl. „nucleotide exchange factor“), die die ATPase Funktion von Ssa1 katalysieren, ebenfalls am katabolitinduzierten FBPase-Abbau beteiligt sind. Hsp40 Chaperone rekrutieren z.B. Substrate für die Hsp70-Maschinerie oder unterstützen die benötigte ATP-Hydrolyse bei Faltungsprozessen. NEFs katalysieren die Substratloslösung von Hsp70. Aus diesem Grund wurden die aus der Literatur bekannten Co-Faktoren von Ssa1 auf ihren Einfluss auf die FBPase-Degradation untersucht (Übersicht siehe Tabelle 1; Chang *et al.*, 2007). Hierzu wurden die Zellen unter gluconeogenetischen Bedingungen inkubiert und dann in glucosehaltiges Medium umgesetzt. Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, aufgeschlossen, einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen, die Immunodetektion wurde mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle) durchgeführt. Temperatursensitive (ts) Stämme wurden bei 25 °C in ethanolhaltigem Medium angezogen, eine Stunde bei 37 °C inkubiert und dann in glucosehaltiges, vorgewärmtes Medium umgesetzt und weiterhin bei 37 °C inkubiert.

Die Hsp40 Chaperone Cns1 und Ydj1 sind nicht am katabolitinduzierten Abbau der FBPase beteiligt (Abb. 23), ebenso sind Hsp104 und die NEFs Fes1, Sse1 und Sse2 nicht beteiligt. Eine Beteiligung der Hsp90-Maschinerie kann ebenfalls ausgeschlossen werden, denn die Hsp82/Hsc82 Doppelmutante hat keinen Einfluss auf den Abbau der FBPase. Das gleiche gilt für das HOP-homologe Protein Sti1. HOP-Proteine (HOP: engl. „hsp organizing protein“) verknüpfen die Hsp70- mit der Hsp90-Maschinerie. Ein möglicher Einfluss des Hsp40 Chaperons Sis1 auf den FBPase-Abbau wurde nicht überprüft, da eine *SIS1* Deletion für die Zellen letal ist und nur verschiedene, kaum charakterisierte Punktmutanten existieren.

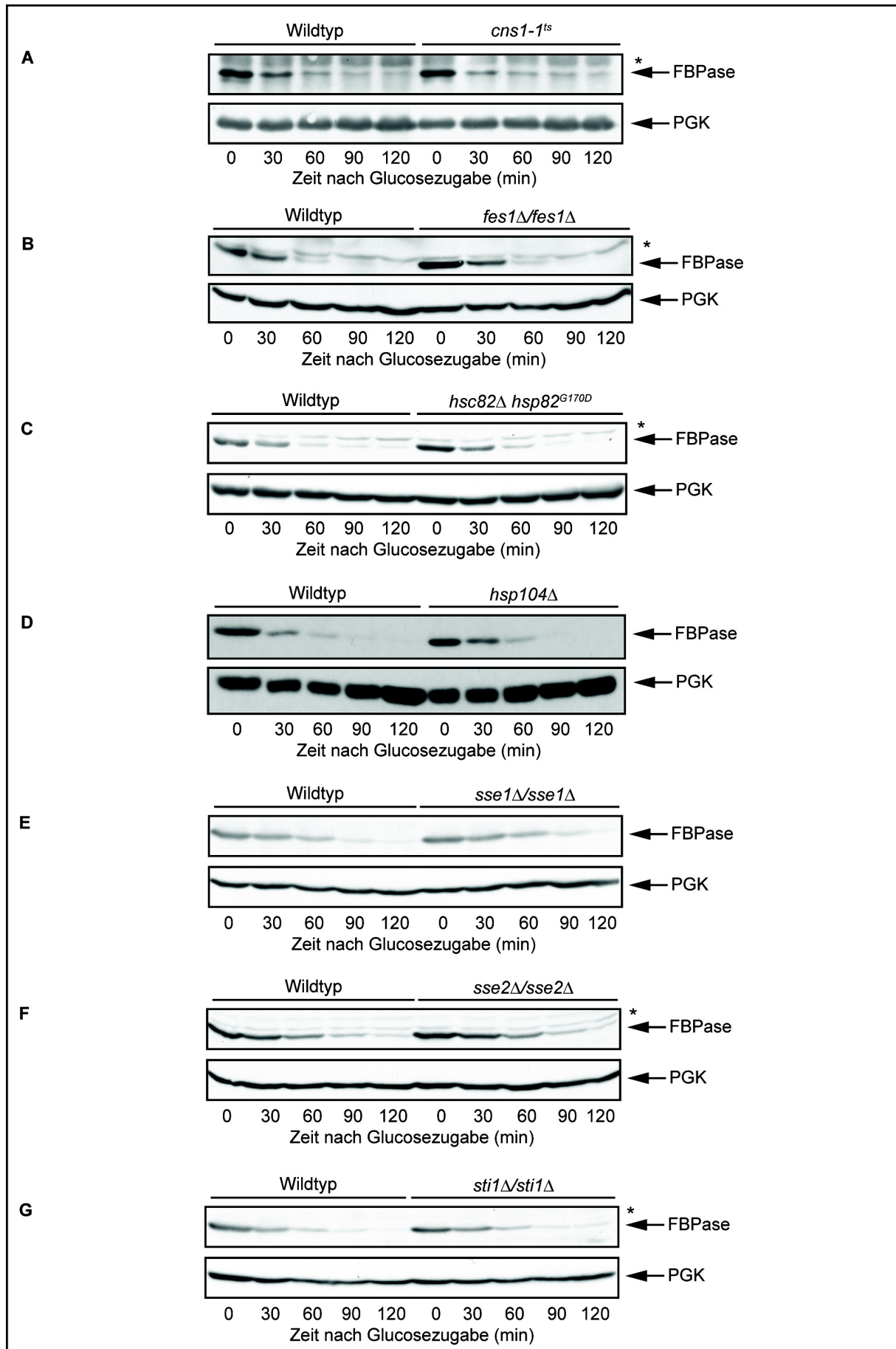
Hingegen konnte für Snl1 eine Beteiligung am FBPase-Abbau gezeigt werden (Abb. 24). Hier wurden die Katabolitinaktivierungsexperimente zunächst im BY4743 Stammhintergrund durchgeführt. Eine Verlangsamung im Abbau der FBPase konnte im W303-1B und YPD21 Stammhintergrund bestätigt werden. Snl1 ist ein NEF und enthält eine BAG-1 Domäne, die Funktionen von Snl1 sind bisher noch nicht näher beschrieben (Sondermann *et al.*, 2002) (siehe Tabelle 1).

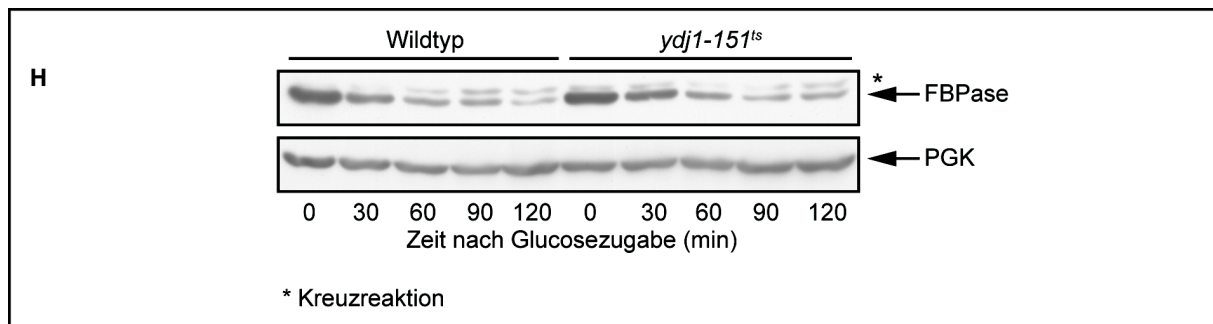
## Ergebnisse

Co-Chaperone von Ssa1	Lokalisation	Funktionen	Homologe Proteine	Deletionsstamm	Einfluss auf den FB Pase Abbau
<b>Cns1</b> [YBR155W]	Cytosol	Hsp40; Hsp70/Hsp90 Co-Chaperon; involviert in Proteinfaltung, ...	Mamm. TTC4	Nein, <i>cns1-1<sup>ts</sup></i>	Kein Effekt
<b>Fes1</b> [YBR101C]	Cytosol, cytosolische Ribosomen	NEF von Hsp70; involviert in Translation, ...	FES1 Familie	Ja	Kein Effekt
<b>Hsp82/Hsp90</b> [YPL240C]	Cytosol	Involviert in Proteinfaltung, Stressantwort, Reifung von Signalproteinen, ...	HSP90 Familie	Ja, hier <i>hsc82Δ hsp82<sup>G170D</sup></i>	Kein Effekt
<b>Hsp104</b> [YLL026W]	Cytosol, Kern	involviert in Resolubilisierung und Refaltung aggregierter Proteine, Stressantwort, Prionen Vermehrung, ...	HSP100	ja	Kein Effekt
<b>Sis1</b> [YNL007C]	Cytosol, Kern	Hsp40; reguliert Hsp70 Aktivität, involviert in Proteinfaltung, ...	DNAJ Familie	nein	Nicht getestet
<b>Snl1</b> [YIL016W]	ER Membran, Membranen, „Nuclear Envelope“, Kern	Unbekannte molekulare Funktion; NEF ; beteiligt an Organisation des Kernporenkomplexes und Proteinfaltung	Mamm. BAG-1	ja	Stabilisierung von FB Pase
<b>Sse1</b> [YPL106C]	Cytosol	Hsp110; NEF von Hsp70; ATPase, bindet ungefaltete Proteine,...	Mamm. HSP70	ja	Kein Effekt
<b>Sse2</b> [YBR169C]	Cytosol	siehe Sse1	homolog zu Sse1	ja	Kein Effekt
<b>Sti</b> [YOR027W]	Cytosol	Co-Chaperon von Hsp90, aktiviert ATPase Aktivität von Ssa1,...	Mamm. HOP	ja	Kein Effekt
<b>Ydj1</b> [YNL064C]	Cytosol, Mikrosomen, perinukleare Regionen des Cytosols	Hsp40; Regulation der Funktion von Hsp70; involviert in Proteintransport über Membranen hinweg, Proteinfaltung, ...	DNAJ Familie	Nein, <i>ydj1-151<sup>ts</sup></i>	Kein Effekt

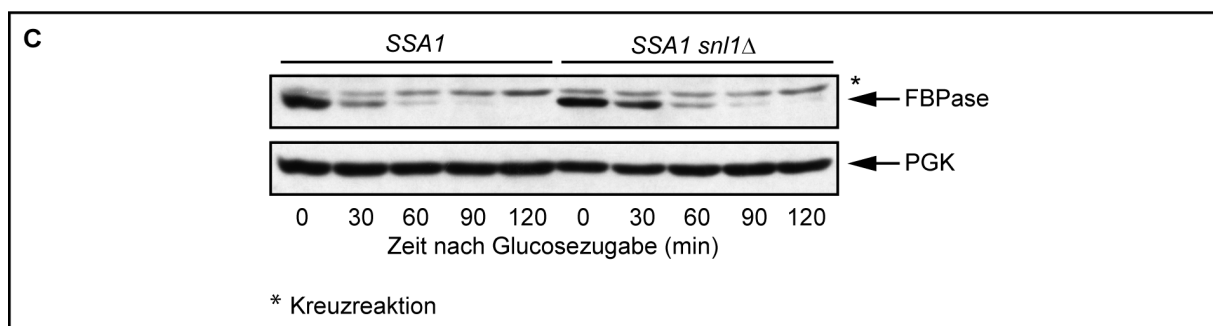
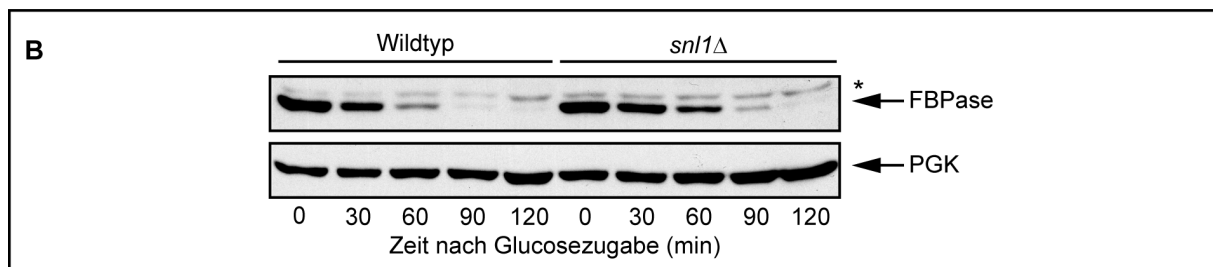
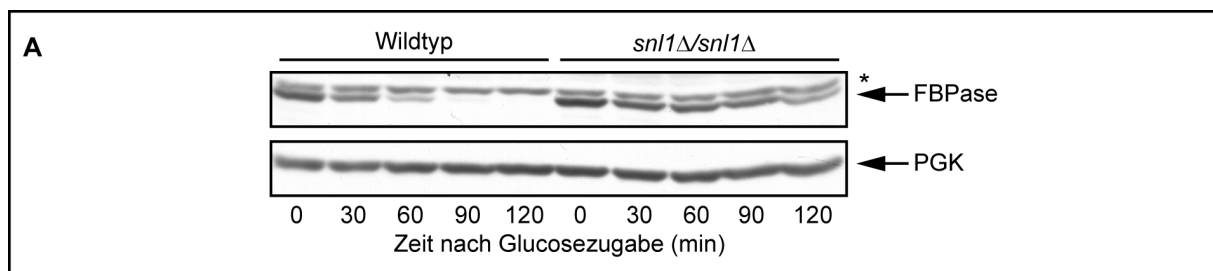
**Tabelle 1: Übersicht der mit Ssa1 interagierenden Co-Faktoren.** Die Daten wurden der SGD (engl. „Saccharomyes genome database“)-Datenbank entnommen. Abkürzungen: NEF: engl. „nucleotide exchange factor“; HOP: engl. „hsp organizing protein“; BAG: engl. „bcl-2-associated athanogene“; Mamm.: engl. „Mammalian“.







**Abbildung 23: Einfluss verschiedener Chaperone auf den FBPase-Abbau.** Es wurden Katabolitinaktivierungsexperimente der FBPase in verschiedenen Stämmen durchgeführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen. Nach einer SDS-PAGE und einem Western Blot erfolgte die Immunodetektion mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle). (A) Wildtyp (W303-1B) und *cns1-1<sup>ts</sup>* (MTY818), (B) Wildtyp (BY4743) und *fes1Δ/fes1Δ* (Y33240), (C) Wildtyp (W303-1C) und *hsc82Δ hsp82<sup>G170D</sup>* (YRH050), (D) Wildtyp (W303-1C) und *hsp104Δ* (YRH023), (E) Wildtyp (BY4743) und *sse1Δ/sse1Δ* (Y32146), (F) Wildtyp (BY4743) und *sse2Δ/sse2Δ* (Y37167), (G) Wildtyp (BY4743) und *sti1Δ/sti1Δ* (Y31803), (H) Wildtyp (W303-1C) und *ydj1-151<sup>ts</sup>* (YPD05).



**Abbildung 24: Snl1 ist am Abbau der FBPase beteiligt.** Es wurden Katabolitinaktivierungsexperimente der FBPase in verschiedenen *SNL1* Deletionsstämmen durchgeführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen. Nach einer SDS-PAGE und einem Western Blot erfolgte die Immunodetektion mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle). (A) Wildtyp (BY4743) und *snl1Δ/snl1Δ* (Y31409) (B) Wildtyp (W303-1B) und *snl1Δ* (YJJ21) (C) *SSA1* (YPD22) und *SSA1 snl1Δ* (YJJ22).

## 5.4 Studien zu den Phosphorylierungsstellen der FBPase

Die FBPase wird in fast allen Organismen unter gluconeogenetischen Bedingungen exprimiert. In den bisher untersuchten Zellen wird FBPase nach dem Überführen der Zellen in glucosehaltiges Medium inaktiviert und abgebaut. In der Hefe *S. cerevisiae* beinhaltet die Katabolitinaktivierung der FBPase die Repression des *FBP1* Gens, die reversible Phosphorylierung des Proteins und die allosterische Inhibition durch Fructose-2,6-bisphosphat und Adenosinmonophosphat (AMP) (Gancedo, 1971; Holzer, 1976; Funayama *et al.*, 1980; Mazon *et al.*, 1982; von Herrath and Holzer, 1988; Marcus *et al.*, 1988). Nach der Inaktivierung wird die FBPase polyubiquitiniert und über das Proteasom abgebaut (Schork *et al.*, 1994a, b; Schork *et al.*, 1995; Santt *et al.*, 2008). Die Phosphorylierung der FBPase erfolgt am Aminosäurerest Serin11 (S11) und ist keine Voraussetzung für die Polyubiquitinierung und den Abbau der FBPase (Hämmerle *et al.*, 1998; Horak *et al.*, 2002). Nach Hämmerle *et al.* (1998) wird die punktmutierte FBPase-S11A (der Aminosäurerest Serin11 wurde durch Alanin ersetzt) nach Glucosegabe nicht mehr phosphoryliert, damit wäre S11 die einzige Phosphorylierungsstelle der FBPase. In mehreren Publikationen wurden aber weitere Phosphorylierungsstellen postuliert (Rakus *et al.*, 2003; Hung *et al.*, 2004). So konnte die Gruppe um H. L. Chiang mittels radioaktiver Markierung zeigen, dass FBPase-S11A nach dem Überführen der Zellen von gluconeogenetischen Bedingungen in glucosehaltiges Medium trotzdem noch phosphoryliert wird (Hung *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit sollten weitere Phosphorylierungsstellen der FBPase identifiziert und der Einfluss möglicher Phosphorylierungsstellen auf den Abbau des Enzyms untersucht werden.

### 5.4.1 Potentielle Phosphorylierungsstellen der FBPase

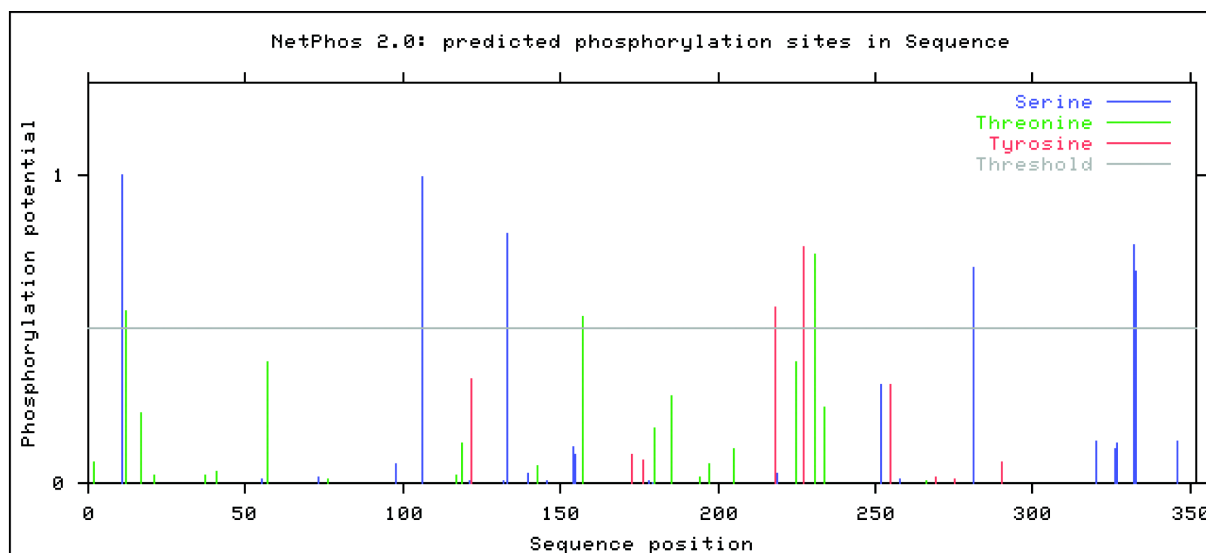
Zunächst wurden mit dem Programm NetPhos mögliche Phosphorylierungsstellen der FBPase bestimmt (Blom *et al.*, 1999). Diese Vorhersagen beruhen auf der primären Aminosäuresequenz. Es wurden nun zunächst alle Stellen, deren Phosphorylierung wahrscheinlicher als 0,5 bzw. 50 % ist, näher betrachtet (Abb. 25; Datentabelle siehe Anhang):

Serin11 (99,8 %)	Threonin12 (56,1 %)	Tyrosin218 (57,1 %)
Serin106 (99,4 %)	Threonin157 (53,9 %)	Tyrosin227 (76,9 %)
Serin133 (80,8 %)	Threonin231 (74,5 %)	

Serin281 (70,1 %)

Serin332 (77,3 %)

Serin333 (68,5 %)



**Abbildung 25: Potentielle Phosphorylierungsstellen der FBPase.** Es sind die mithilfe des Programms NetPhos berechneten Phosphorylierungsstellen der FBPase dargestellt (Blom *et al.*, 1999). Über der Position des Aminosäurerestes ist die Wahrscheinlichkeit einer möglichen Phosphorylierung aufgetragen (maximale Wahrscheinlichkeit 1 bzw. 100 %).

Da bekannt war, dass die Vorhersage von Phosphorylierungsstellen aufgrund der primären Aminosäuresequenz oft fehlerbehaftet ist, wurde zusätzlich ein Sequenzvergleich (Alignment) von FBPase-Proteinen verschiedener Eukaryonten mit dem Programm ClustalW durchgeführt (Higgins and Sharp, 1988; Harney *et al.*, 2005). Konsensussequenzen sind in verschiedenen Organismen konservierte Sequenzbereiche, sie sind für die Funktion eines Proteins oft sehr wichtig. Es zeigte sich, dass nicht alle potentiellen Phosphorylierungsstellen nach NetPhos in den verschiedenen Organismen konserviert sind (Abb. 26). Es wurden nun zunächst die nicht-konservierten Positionen ausgeschlossen, damit blieben noch folgende Aminosäurereste als mögliche Phosphorylierungsstellen der FBPase übrig:

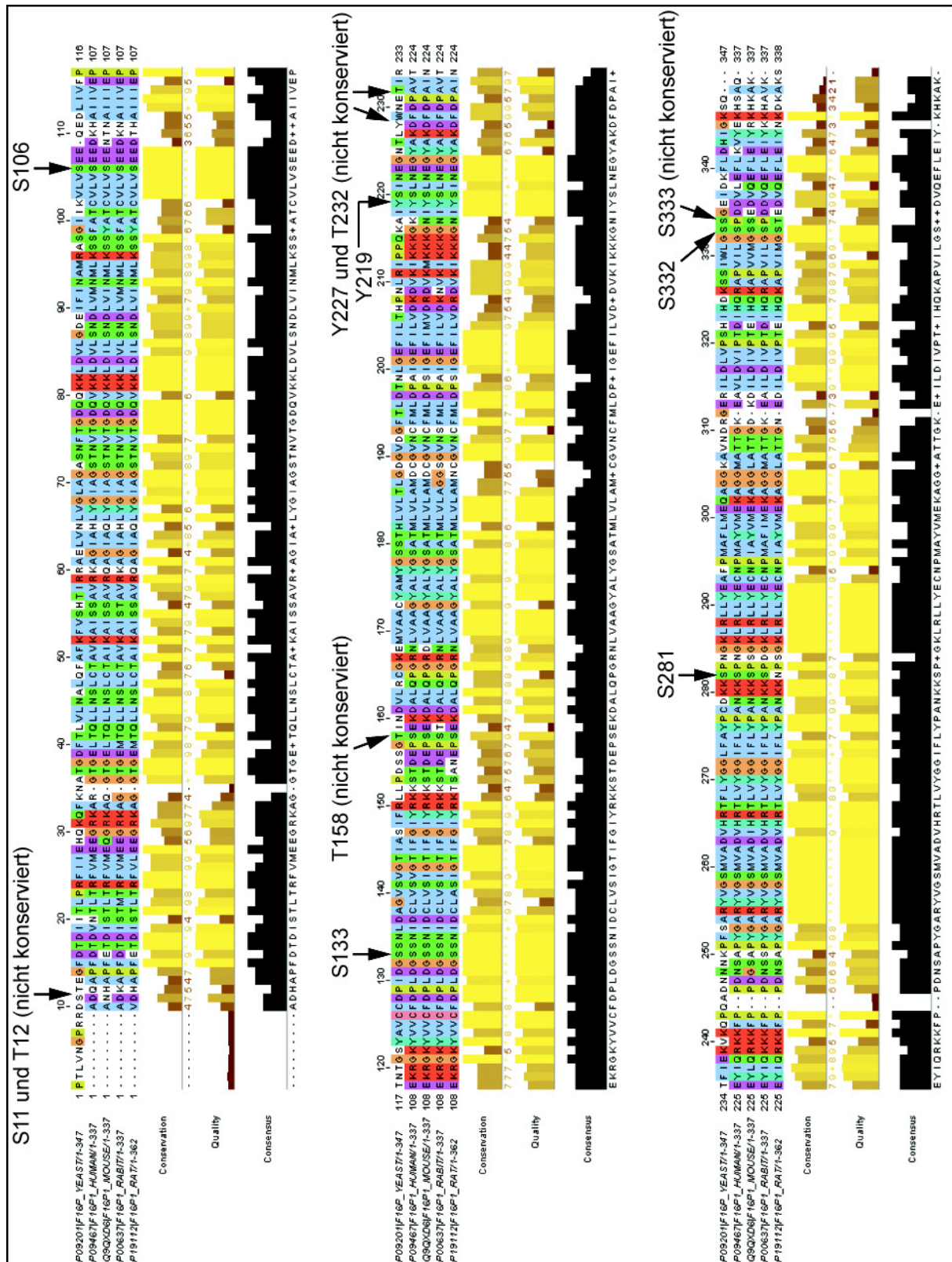
Serin106 (99,4 %)

Tyrosin218 (57,1 %)

Serin133 (80,8 %)

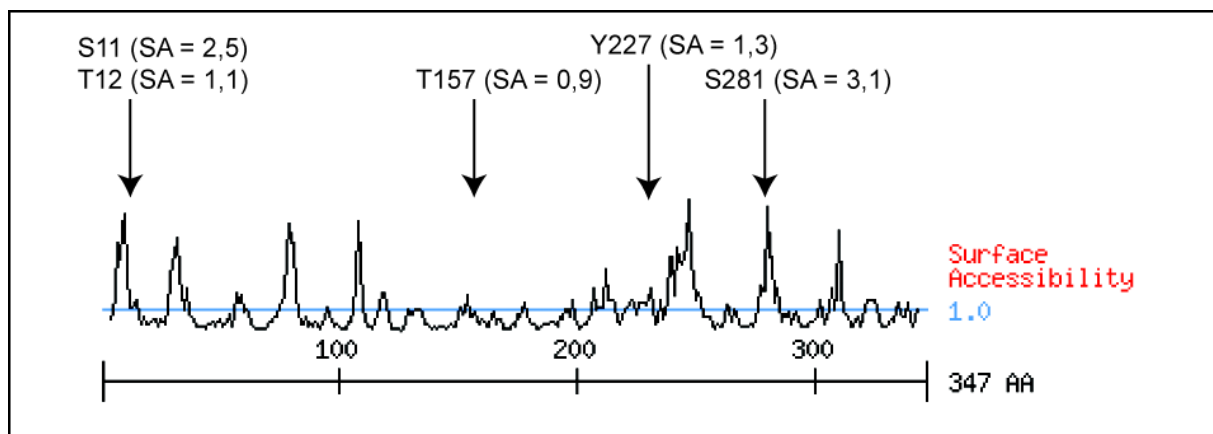
Serin281 (70,1 %)

Serin332 (77,3 %)



**Abbildung 26: Sequenzvergleich von FBPase-Proteinen aus verschiedenen Spezies.** Die Sequenzen folgender Organismen wurden verglichen: YEAST: *S. cerevisiae*; HUMAN: *Homo sapiens*; MOUSE: *Mus musculus*; RABIT: *Oryctolagus cuniculus*; RAT: *Rattus norvegicus*. Das Alignment wurde mit ClustalW erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/es/cgi-bin/clustalw2>; Higgins and Sharp, 1988) und mit Jalview dargestellt.

*In vivo* genutzte Phosphorylierungsstellen sollten an der Protein-Oberfläche liegen, da die Aminosäurereste für Kinasen und Phosphatasen zugänglich sein müssen. Mit dem Programm Scansite 2.0 (Obenauer *et al.*, 2003) wurde die Erreichbarkeit der potentiellen Phosphorylierungsstellen an der FBPase-Oberfläche berechnet (siehe Abb. 27). Die Zugänglichkeit der Stellen an der Protein-Oberseite (engl. „Surface Accessibility“, SA) ist als „theoretische Anzahl der Wasser-Moleküle, die mit diesem Aminosäurerest in Kontakt stehen“ definiert (Harney *et al.*, 2005). Zusätzlich zur schon bekannten Phosphorylierungsstelle S11 ist der Aminosäurerest S281 sehr wahrscheinlich (70,1 % nach NetPhos), er ist in Eukaryontenzellen konserviert und auch gut für Kinasen zugänglich (SA = 3,1). Alle weiteren potentiellen Phosphorylierungsstellen haben einen SA-Wert deutlich kleiner 1 oder treten in der Datentabelle gar nicht auf und sind daher nicht in Abb. 27 vertreten.



**Abbildung 27: Berechnete Zugänglichkeit der potentiellen Phosphorylierungsstellen an der FBPase-Oberfläche.** Mit dem Programm Scansite 2.0 (Obenauer *et al.*, 2003) wurde die Zugänglichkeit der FBPase-Protein-Oberfläche berechnet und über der Position der Aminosäurereste (AA) aufgetragen. Die Erreichbarkeit der Positionen (engl. „Surface Accessibility“, SA) ist definiert als „theoretische Anzahl der Wasser-Moleküle, die mit diesem Aminosäurerest in Kontakt stehen“.

Die Werte der potentiellen Phosphorylierungsstellen nach NetPhos, Konservierung der Stellen in Eukaryonten und die mit Scansite berechnete Oberflächen-Zugänglichkeit sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Es sollte nun zunächst die am besten zugängliche mögliche Phosphorylierungsstelle S281 mutiert werden, um dann den Einfluss auf den Abbau der FBPase zu untersuchen.

Aminosäurerest der FBPase	Wahrscheinlichkeit nach NetPhos	Konservierung	Oberflächen- Zugänglichkeit (SA)
S11	99,8 %	nein	2,49
S106	99,4 %	ja	-
S133	80,8 %	ja	-
S281	70,1 %	ja	3,14
S332	77,3 %	ja	-
S333	68,5 %	nein	-
T12	56,1 %	nein	1,10
T157	53,9 %	nein	0,86
T231	74,5 %	nein	1,90
Y218	57,1 %	ja	-
Y227	76,9 %	nein	1,30

**Tabelle 2: Übersicht über die potentiellen Phosphorylierungsstellen von FBPase.** Wahrscheinlichkeit nach NetPhos (Blom *et al.*, 1999), Konservierung in Eukaryonten (siehe Abb. 26), die Oberflächen-Zugänglichkeit wurde mit Scansite berechnet (Obenauer *et al.*, 2003). - : der Wert ist zu klein (< 0,2), daher zeigt Scansite keinen Wert an.

#### 5.4.2 Einfluss der Punktmutationen S11A und S281A auf den FBPase- Abbau

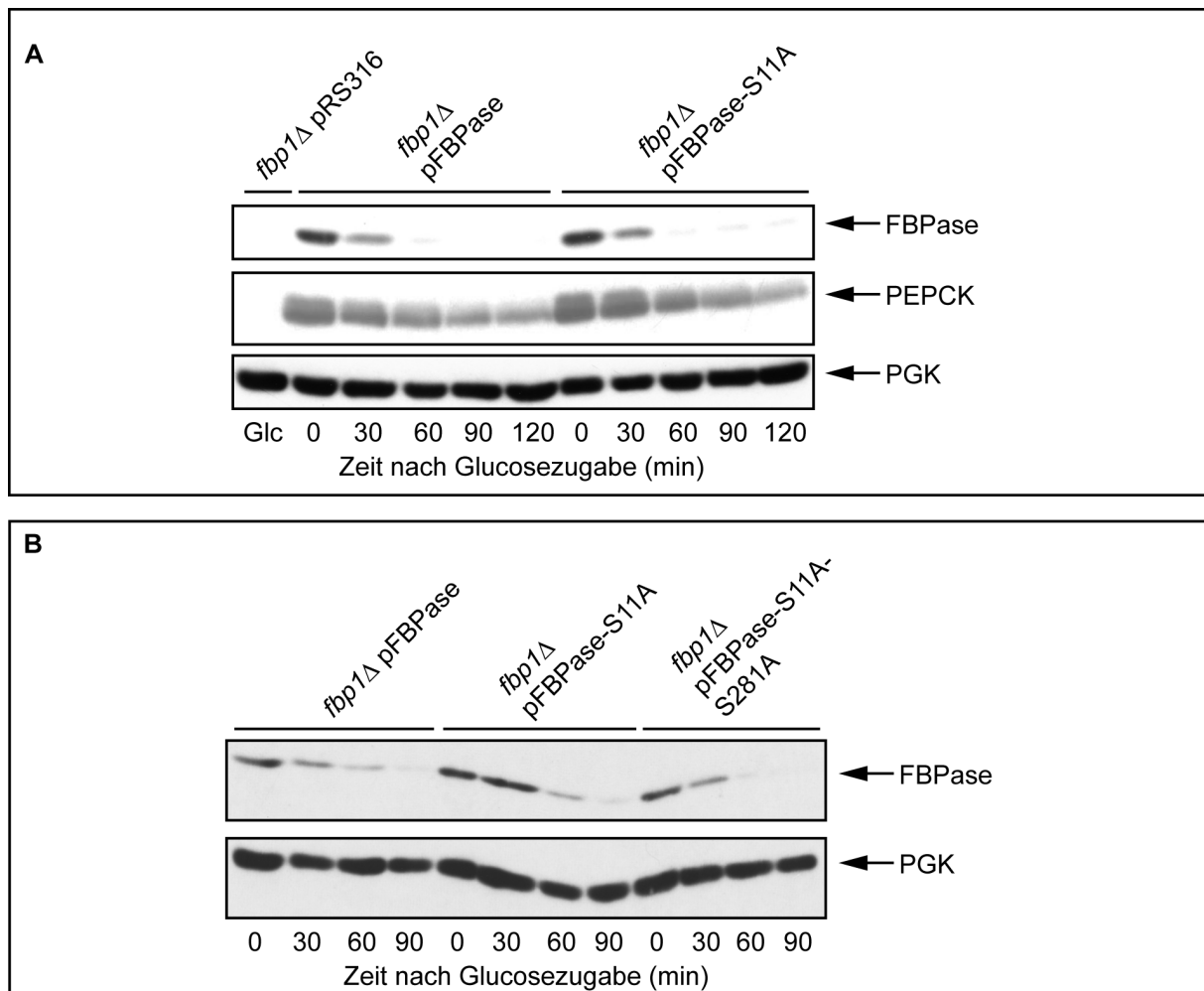
Um den Einfluss der Punktmutationen auf den FBPase-Abbau möglichst schnell und flexibel untersuchen zu können, sollten die Studien mit plasmid-codierter FBPase durchgeführt werden. Der Aminosäurerest Serin11 des *FBP1*-Gens im Vektor pKD-10 wurde in Alanin überführt, hierfür wurde das *QuickChange® XL Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) mit den Primern S12A-FP und S12A-RP verwendet. Von verschiedenen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Das *FBP1-S11A*-Gen des entstandenen Plasmids pKD-10 Ser11Ala wurde mit nativem Promotor und Terminator mit den Primern P FBP1 forward und P FBP1 reverse amplifiziert, hierbei wurden eine *Clal*- und eine *SpeI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt, über welche dann die Klonierung in den Vektor pRS316 stattfand. Das Plasmid pFBPase-S11A wurde sequenziert und in den Stamm *fbp1Δ* (YJJ08) transformiert. Der Stamm *fbp1Δ* pFBPase-S11A kann in ethanolhaltigem Medium wachsen; dies ist nur möglich, wenn das Konstrukt und damit die FBPase funktionell ist. Des weiteren wurde ein Katabolitinaktivierungsexperiment mit den Stämmen *fbp1Δ* pRS316, *fbp1Δ* pFBPase und *fbp1Δ* pFBPase-S11A durchgeführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen (siehe Abb. 28A), aufgeschlossen und einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen. Die Immunodetektion erfolgte mit FBPase-, PEPCK- und PGK-

Antikörpern (Ladekontrolle). Im Stamm *fbp1Δ* pRS316 ist unter glykolytischen Bedingungen (Glc) wie erwartet keine FBPase zu sehen. FBPase-S11A wird ebenso wie Wildtyp-FBPase abgebaut, die Punktmutation hat wie erwartet keinen Einfluss auf den FBPase-Abbau (Hämmerle *et al.*, 1998). Auch der Abbau des weiteren Schlüsselenzyms der Gluconeogenese PEPCK (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase) wird durch die Punktmutation FBPase-S11A nicht beeinflusst. Es wurde postuliert, dass der Abbau von FBPase, MDH2 (cytosolische Malatdehydrogenase) und PEPCK aneinander gekoppelt ist, siehe Kap. 5.5 (Gibson and McAlister-Henn, 2003).

In das Plasmid pFBPase-S11A wurde nun zusätzlich die Mutation S281A eingeführt. Dies erfolgte mit dem *Transformer<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit* (Clontech) mit den Primern P1 FBP-S281A forw und PRS Swal-Pmel rev. Von verschiedenen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und mittels Restriktionsverdau auf die vorhandene Mutation überprüft (siehe Material & Methoden). Von positiven Klonen wurde die DNA sequenziert. Ein Plasmid wurde ausgewählt und in den Stamm *fbp1Δ* (YJJ08) transformiert. Der Hefestamm *fbp1Δ* pFBPase-S11A-S281A kann ebenfalls in ethanolhaltigem Medium wachsen; dies ist nur möglich, wenn das FBPase-S11A-S281A Plasmid funktionell ist und eine aktive FBPase exprimiert wird. Es wurde nun ein Katabolitinaktivierungsexperiment mit den Stämmen *fbp1Δ* pFBPase, *fbp1Δ* pFBPase-S11A und *fbp1Δ* pFBPase-S11A-S281A durchgeführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen (siehe Abb. 28B), aufgeschlossen, einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen. Die Immunodetektion erfolgte mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle). FBPase-S11A-S281A wird ebenso wie Wildtyp-FBPase abgebaut. Die Doppelmutation hat keinen Einfluss auf den FBPase-Abbau. Da die mögliche Phosphorylierungsstelle S281 im Vergleich zu allen anderen potentiellen Resten am besten an der Protein-Oberfläche zugänglich ist, wurde dieses Ergebnis nicht erwartet.

Da die eingeführte Doppelmutation FBPase-S11A-S281A nicht den erwarteten Effekt auf den FBPase-Abbau hatte, wurde das Projekt zunächst gestoppt. Es sollte nun zuerst gezeigt werden, dass das mutierte Protein FBPase-S11A tatsächlich noch weiter phosphoryliert wird, um dann per Massenspektrometrie weitere Phosphorylierungsstellen zu bestimmen und deren Einfluss auf die Inaktivierung und den Abbau dann zu charakterisieren.





**Abbildung 28: Einfluss der Punktmutationen S11A und S11A-S281A auf den FBPase-Abbau.** Zellen wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen und dann in glucosehaltiges Medium überführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen, aufgeschlossen, einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen, die Immunodetektion erfolgte mit FBPase-, PEPCCK- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle). Die Experimente wurden mit folgenden Stämmen durchgeführt (A) *fbp1Δ* (YJJ08) pRS316, *fbp1Δ* pFBPase und *fbp1Δ* pFBPase-S11A, (B) *fbp1Δ* pFBPase, *fbp1Δ* pFBPase-S11A und *fbp1Δ* pFBPase-S11A-S281A.

### 5.4.3 Studien zu den Phosphorylierungsstellen der FBPase

Es wurde ein einfacher Nachweis für eine phosphorylierte FBPase und eine möglicherweise weiterhin phosphorylierte FBPase-S11A gesucht. Zunächst wurde versucht, mit einem Phospho-Serin-Antikörper die Phosphorylierung am S11-Rest der FBPase zu detektieren. In einem IP-Experiment wurde FBPase und FBPase-S11A mit FBPase-Antikörpern präzipitiert. Die Proben wurden einer Western Blot Analyse unterzogen. Eine Detektion von phosphorylierter bzw. unphosphorylierter FBPase war auch mit unterschiedlichsten Detektionsprotokollen nicht möglich (nicht gezeigt).

Eine weitere Möglichkeit die Phosphorylierungen eines Proteins zu detektieren, ist die

Durchführung eines Phosphatase-Assays. Ein Teil der Probe der präzipitierten Proteine werden mit einer Proteinphosphatase behandelt, die das Substrat dephosphoryliert. Wenn das Substrat phosphoryliert vorlag, dann können nach dem Durchführen einer Western Blot Analyse Unterschiede in der molekularen Masse der beiden Proben (mit und ohne Phosphatase-Behandlung) detektiert werden. Jochen Regelman konnte mit diesem Protokoll die Phosphorylierung von Gid1/Vid30 nachweisen (Regelman, 2005). Ein Nachweis der Phosphorylierung von FBPase und FBPase-S11A bzw. FBPase-TAP nach diesem Protokoll war nicht möglich (nicht gezeigt). Da Gid1/Vid30 mehrfach phosphoryliert vorliegt (Smolka *et al.*, 2007; R. Menssen-Franz, persönliche Mitteilung), könnte es natürlich auch sein, dass der Unterschied in der molekularen Masse zwischen der phosphorylierten und nicht-phosphorylierten FBPase bzw. FBPase-TAP zu gering ist, um im Western Blot detektiert zu werden.

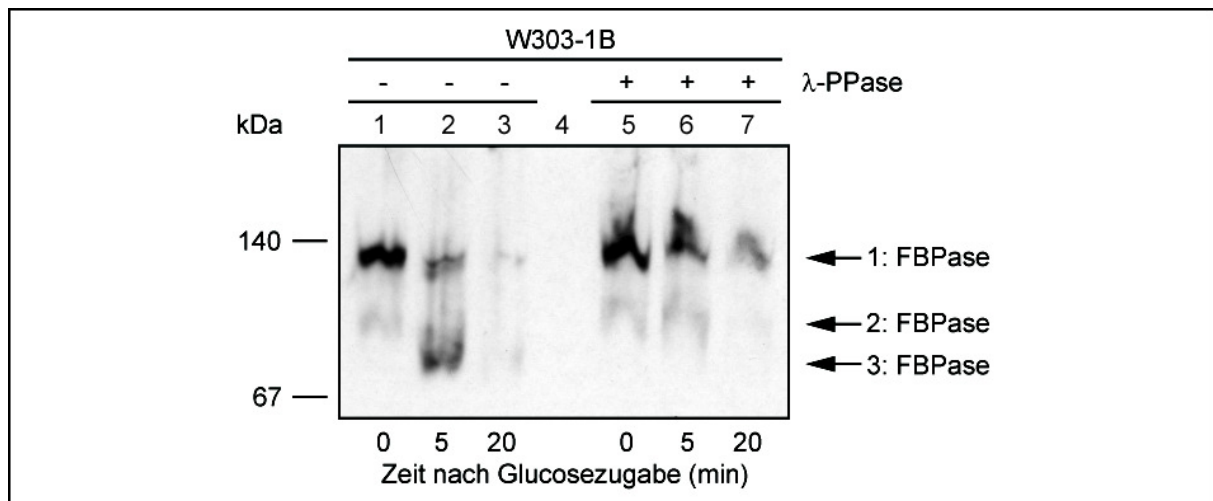
### **5.4.4 Studien zu den Phosphorylierungsstellen der FBPase mittels nativer Gelelektrophorese**

Bei der nativen Gelelektrophorese werden Proteine nach ihrer Ladung, Größe und Form aufgetrennt. Dadurch kann sie zum Nachweis von Proteinkomplexen und auch unterschiedlichen Proteinmodifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen eingesetzt werden (A. T. Andrews, 1986). Um den Phosphorylierungsstatus von FBPase beurteilen zu können, sollte ein Teil der Proben mit einer Proteinphosphatase dephosphoryliert und dann auf ein natives Gel aufgetragen werden und mit unbehandelter Probe verglichen werden.

Es wurden Zellen des Stammes W303-1B unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen und dann in glucosehaltiges Medium überführt, Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (siehe Abb. 29). Nach dem Aufschluss der Zellen wurde ein Teil der nativen Lysate mit  $\lambda$ -Proteinphosphatase inkubiert, die restlichen Proben wurden auf Eis aufbewahrt. Danach wurden alle Proben mit Probenpuffer versetzt und einer nativen, kontinuierlichen Gelelektrophorese unterzogen. Da die Isoelektrischen Punkte der FBPase und aller Gid-Proteine zwischen 3,9 und 8,3 liegen, wurden alle Puffer auf pH 8,8 eingestellt, um bei der Elektrophorese eine negative Ladung der Proteine zu gewährleisten. Nach dem Western Blot erfolgte die Immunodetektion mit FBPase-Antikörpern (Abb. 29). In der Probe vor Glucosezugabe (0 min) ist eine intensive Bande bei ca. 140 kDa (Bande 1) und eine schwächere FBPase-Bande (Bande 2) detektierbar, FBPase scheint schon unter diesen Bedingungen in zwei verschiedenen Formen vorzuliegen. Nach dem Überführen in

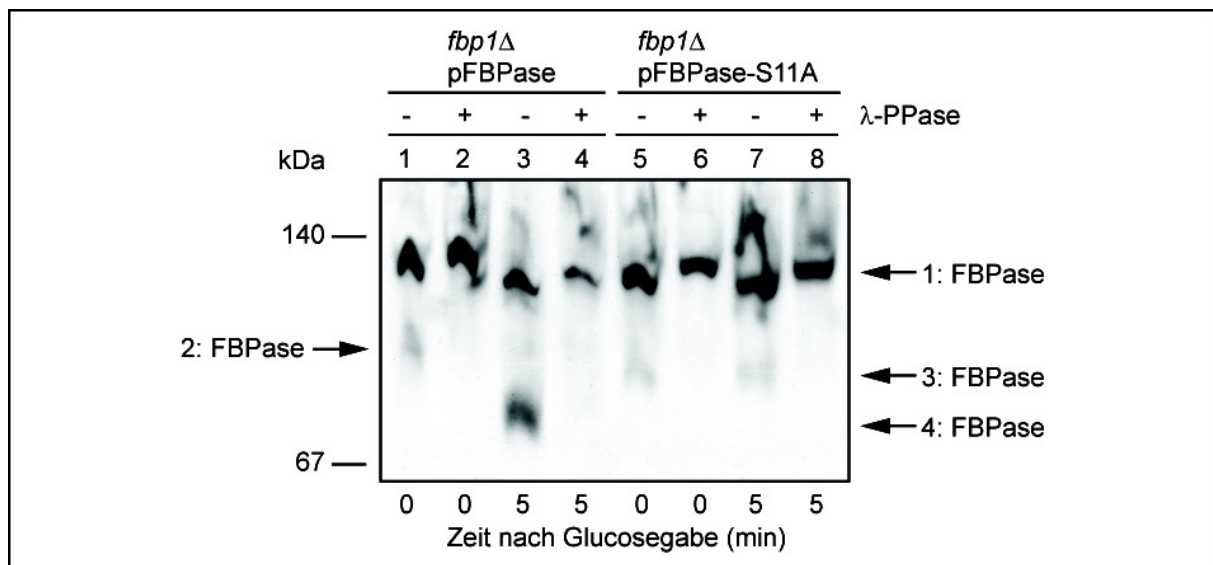
glucosehaltiges Medium (5 min) erscheint eine zusätzliche starke niedermolekulare Bande (Bande 3). Da bekannt ist, dass FBPase unter diesen Bedingungen phosphoryliert wird könnte es sich bei den zwei Banden um unterschiedlich häufig phosphorylierte Formen der FBPase handeln. Die Phosphorylierung von FBPase führt zu einem stärker negativ geladenen Protein, das in der nativen Gelelektrophorese schneller läuft. Durch Behandlung mit  $\lambda$ -Proteinphosphatase wird das Protein dephosphoryliert, es ist somit nicht so stark negativ geladen und sollte im nativen Gel entsprechend langsamer wandern. Bei Behandlung der vor und nach Glucosegabe gezogenen Proben mit  $\lambda$ -Proteinphosphatase trat eine intensive Bande auf, die der nicht-phosphorylierten FBPase entspricht sowie eine deutlich schwächere Bande, die durch den Vergleich mit Abb. 30 (Spur 2 und 4) vermutlich auf nicht vollständig dephosphorylierte FBPase zurückzuführen ist.

Dieses Experiment ist ein Indiz dafür, dass die FBPase nach Glucosegabe nicht in zwei verschiedenen FBPase-Subkomplexen vorliegt. Wäre dies der Fall, müsste die untere Bande (Abb. 29, Bande 3) auch nach  $\lambda$ -Proteinphosphatase-Behandlung noch vorhanden sein. Das Fehlen dieser Bande nach Phosphatase-Behandlung deutet aber darauf hin, dass das schnellere Laufverhalten der unbehandelten Probe nach Glucosegabe (Spur 2, Bande 3) lediglich auf eine oder mehrere Phosphorylierungen der FBPase zurückzuführen ist.



**Abbildung 29: Verhalten von FBPase in nativen Gelen mit und ohne Phosphatase-Behandlung.** Zellen des Stammes W303-1B wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen und dann in glucosehaltiges Medium überführt, Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen. Nach dem Zellaufschluss wurde ein Teil der Proben mit  $\lambda$ -Proteinphosphatase ( $\lambda$ -PPase) behandelt. Nach der nativen Gelelektrophorese und dem Western Blot erfolgte die Immunodetektion mit FBPase-Antikörpern.

Es wurden nun Zellen der Stämme *fbp1Δ* (YJJ08) pFBPase und *fbp1Δ* pFBPase-S11A unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen und in glucosehaltiges Medium überführt, Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (siehe Abb. 30) und aufgeschlossen. Danach wurde jeweils ein Teil der Proben mit  $\lambda$ -Proteinphosphatase inkubiert, die restlichen Proben wurden auf Eis aufbewahrt. Alle Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und einer nativen Gelelektrophorese unterzogen. Nach dem Western Blot erfolgte die Immunodetektion mit FBPase-Antikörpern (Abb. 30).



**Abbildung 30: Verhalten von FBPase und FBPase-S11A in nativen Gelen mit und ohne Phosphatase-Behandlung.** Zellen der Stämme *fbp1Δ* (YJJ08) pFBPase und *fbp1Δ* pFBPase-S11A wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen und in glucosehaltiges Medium überführt. Nach dem Zellaufschluss wurde ein Teil der Proben mit  $\lambda$ -Proteinphosphatase ( $\lambda$ -PPase) behandelt. Alle Proben wurden danach einer nativen Gelelektrophorese und einer Western Blot Analyse mit FBPase-Antikörpern unterzogen.

Im Kontrollstamm *fbp1Δ* pFBPase trat FBPase unter gluconeogenetischen Bedingungen in zwei Formen auf, von denen die höhermolekulare Form die intensivere ist (Spur 1). Nach dem Überführen der Zellen in glucosehaltiges Medium erscheint eine zusätzliche starke niedermolekulare Bande (Bande 4). Da bekannt ist, dass FBPase unter diesen Bedingungen phosphoryliert wird, könnte es sich bei den zwei Banden um unterschiedlich häufig phosphorylierte Formen der FBPase handeln. Bei Behandlung der vor und nach Glucosegabe gezogenen Proben mit  $\lambda$ -Proteinphosphatase trat eine intensive Bande auf (Bande 1), die der nicht-phosphorylierten FBPase entspricht. Im Stamm *fbp1Δ* pFBPase-S11A treten unter gluconeogenetischen Bedingungen wie auch nach Überführen der Zellen in glucosehaltiges Medium zwei FBPase-S11A-Banden auf (Bande 1 und 3). Nach Glucosegabe findet keine Änderung des Laufverhaltens der FBPase-S11A im nativen Gel

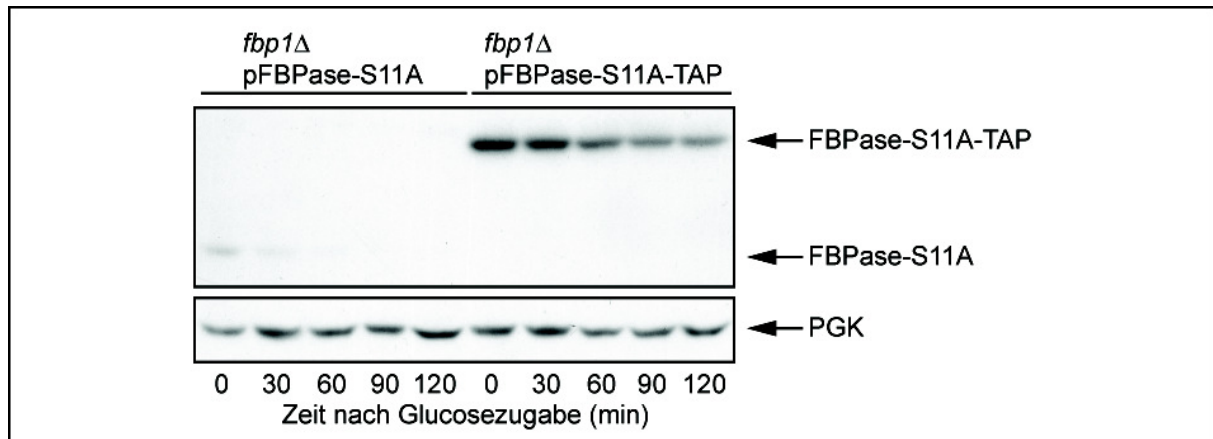
auf. Die Inkubation mit  $\lambda$ -Protein-phosphatase resultiert in beiden Fällen in einer einzigen FBPase-S11A-Bande (Spur 6 und 8). Vermutlich liegt FBPase-S11A ebenso wie FBPase unter gluconeogenetischen Bedingungen in einer phosphorylierten und einer nicht-phosphorylierten Form vor. Nach Glucosegabe findet an FBPase-S11A dann aber keine weitere Phosphorylierung statt. Insgesamt bedeutet dies für die FBPase, dass es noch weitere Phosphorylierungsstellen gibt, welche bei einer Mutation am Serinrest 11 zum Einsatz kommen. Die geringen Abweichungen der Laufhöhe der intensivsten FBPase- und FBPase-S11A-Bande (Bande 1) bei ca. 140 kDa sind vermutlich auf die unterschiedliche Beladungsmenge der Proben zurückzuführen.

#### **5.4.5 Identifikation weiterer Phosphorylierungsstellen in FBPase und FBPase-S11A mittels massenspektrometrischer Analyse**

Aufgrund der Daten aus den Experimenten mit nativer Gelelektrophorese und den Daten von Hung *et al.* (2004) sollten nun die Phosphorylierungsstellen von FBPase und FBPase-S11A per massenspektrometrischer Analyse bestimmt werden. Es wurden wiederum FBPase-TAP-Proteinreinigungen nach Puig *et al.* (2001) durchgeführt, um ausreichende Mengen an FBPase und FBPase-S11A zu isolieren. Hierfür wurde ein FBPase-S11A-TAP Expressionsplasmid benötigt.

#### **Funktionalität des Vektors pFBPase-S11A-TAP**

Für ein FBPase-S11A-TAP Expressionsplasmid wurde die Kasette *TAP::TRP1<sup>K.I.</sup>* des Vektors pBS1479 mit den Primern P FBP-TAP forw und P FBP-TAP rev amplifiziert und mittels homologer Rekombination in das Plasmid pFBPase-S11A transformiert. Das entstandene Plasmid pFBPase-S11A-TAP wurde in den Stamm *fbp1Δ* (YJJ08) transformiert, durch Wachstum in ethanolhaltigem Medium wurde die Funktionalität des Vektors in Bezug auf die Expression einer aktiven FBPase bestätigt. Es wurde ein Katabolitinaktivierungsexperiment mit Zellen der Stämme *fbp1Δ* pFBPase-S11A und *fbp1Δ* pFBPase-S11A-TAP durchgeführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen (siehe Abb. 31), nach dem Zellaufschluss wurde eine Western Blot Analyse mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle) durchgeführt. In beiden Stämmen wird FBPase-S11A, wie erwartet, abgebaut. Die Proteinbanden von FBPase-S11A-TAP sind intensiver als von FBPase-S11A, da durch die Protein A Domäne des TAP-Epitops mehr FBPase-Antikörper binden können.

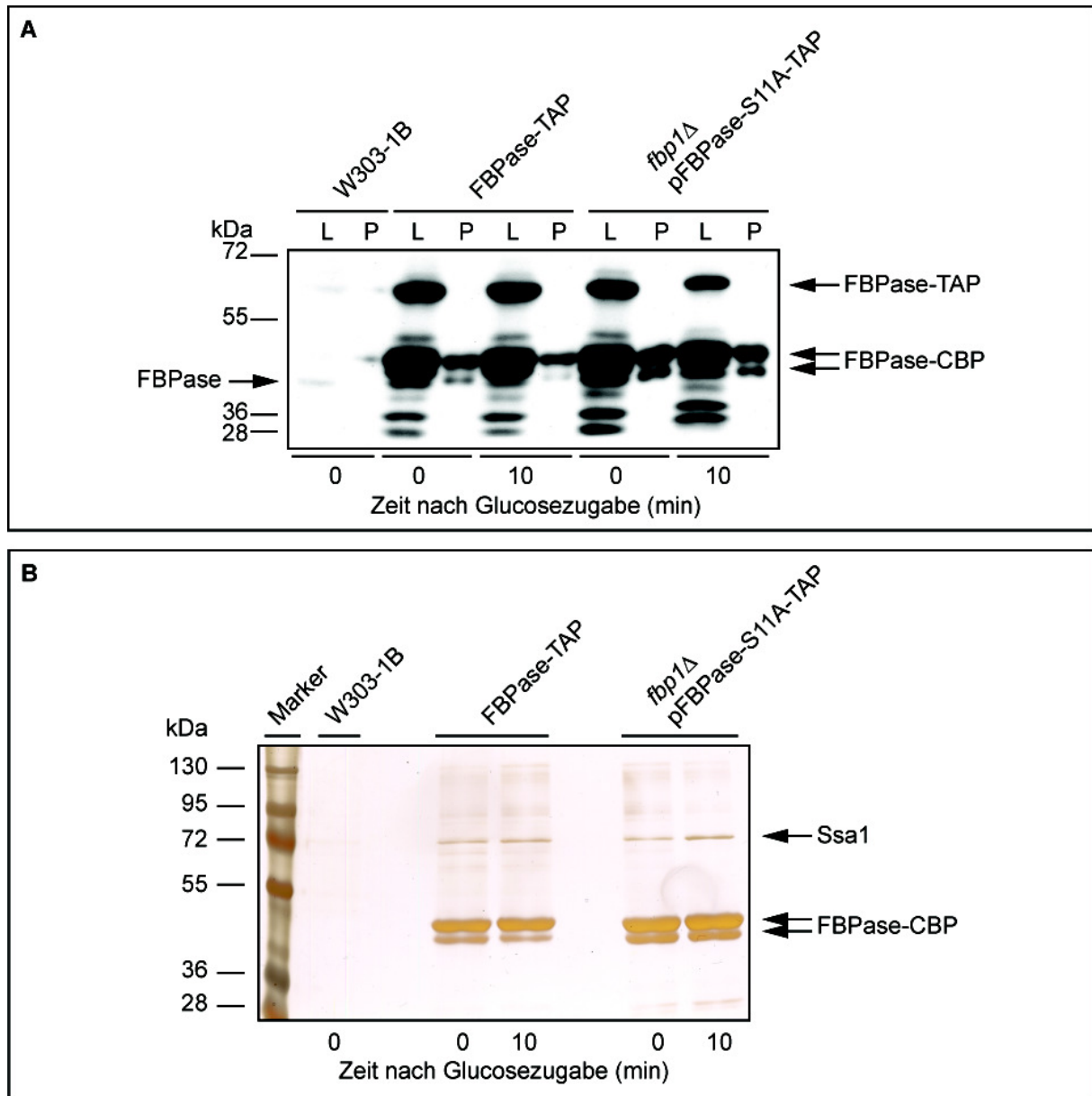


**Abbildung 31: Funktionalität des Vektors pFBPase-S11A-TAP.** Es wurde ein Katabolitinaktivierungsexperiment mit Zellen der Stämme *fbp1Δ* (YJJ08) pFBPase-S11A und *fbp1Δ* pFBPase-S11A-TAP durchgeführt. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen und standardmäßig behandelt. Die Western Blot Analyse erfolgte mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle).

### Proteinreinigung von FBPase-TAP und FBPase-S11A-TAP

Die Hefestämme W303-1B (Wildtyp), FBPase-TAP und *fbp1Δ* (YJJ08) pFBPase-S11A-TAP wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen und dann in glucosehaltiges Medium überführt, die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (siehe Abb. 32). Nach dem Zellaufschluss wurde FBPase-TAP und FBPase-S11A-TAP mit IgG-Sepharose präzipitiert, es folgte ein Verdau mit TEV-Protease, dabei wurde die Protein A Domäne abgespalten und FBPase-CBP freigesetzt. FBPase-CBP wurde dann an Calmodulin "Beads" gebunden, mit EGTA-Lösung eluiert und mit TCA präzipitiert. Die Proben wurden zunächst einer Western Blot Analyse unterzogen (Abb. 32A), die Immunodetektion erfolgte mit FBPase-Antikörper. Es wurden jeweils Proben des Lysats (L) und der Proteinreinigung (P) nebeneinander aufgetragen. Im Lysat (L) ist FBPase-TAP bzw. FBPase-S11A-TAP (58 kDa) sowie FBPase mit einer geringeren molekularen Masse detektierbar, hierbei handelt es sich um Abbauprodukte von FBPase-TAP und FBPase-S11A-TAP. Nach der Proteinreinigung (P) sind zwei FBPase-Banden erkennbar. Da das Calmodulin Bindepeptid (CBP) an die FBPase gebunden bleibt, führt dies zu einer molekularen Masse von ca. 42 kDa im Vergleich zur molekularen Masse von FBPase mit 38 kDa.

Zusätzlich wurde bei den FBPase-S11A-TAP-Proben die intensive Bande bei 72 kDa ausgeschnitten und per Massenspektrometrie als Ssa1 identifiziert. Die punktmutierte FBPase-S11A interagiert also genauso wie FBPase mit dem Hsp70 Chaperon Ssa1 (Abb. 32B).



**Abbildung 32: Proteinreinigung von FBPase-TAP und FBPase-S11A-TAP.** Zellen der Stämme W303-1B, FBPase-TAP und *fbp1Δ* (YJJ08) pFBPase-S11A-TAP wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen, dann in glucosehaltiges Medium überführt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet, es wurde eine TAP-Proteinreinigung nach Puig *et al.* (2001) durchgeführt. (A) Western Blot Analyse, es wurden Lysat-Proben (L) und Proben der Proteinreinigung (P) aufgetragen, die Immunodetektion erfolgte mit FBPase-Antikörpern. (B) Silbergefärbtes SDS-Gel mit Proben der Proteinreinigung. Banden wurden ausgeschnitten und angegebene Proteine mittels Massenspektrometrie (Dr. A. Sickmann und Dr. U. Lewandrowski, Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg) identifiziert bzw. die Phosphorylierungsstellen von FBPase und FBPase-S11A bestimmt.

### **Auswertung der Daten der massenspektrometrischen Analyse**

Bislang war nur die Phosphorylierungsstelle S11 der FBPase bekannt. Durch die massenspektrometrische Analyse der Proben konnten nun weitere Stellen identifiziert werden (Übersicht siehe Tab. 3). FBPase liegt demzufolge schon unter gluconeogenetischen Bedingungen (0 min) phosphoryliert vor. Die Phosphorylierungsstellen der oberen FBPase-Bande (0 min) wurden als S11, S219, T12, T37 und Y255 und die der unteren Bande als S11, T12 und Y255 identifiziert. Nach Glucosegabe (10 min) ist FBPase an S11, S219 oder Y218 und T12 oder T17 phosphoryliert. Hier treten T17 und Y218 als zusätzliche Stellen auf. Überraschenderweise liegt FBPase schon unter gluconeogenetischen Bedingungen phosphoryliert vor. Es ist nicht klar wie groß der Anteil der phosphorylierten FBPase im Gegensatz zur unphosphorylierten FBPase ist. Nach einem Vergleich der Messdaten mit den vorhergesagten FBPase-Phosphorylierungsstellen per NetPhos zeigte sich, dass hier nur die potentiellen Stellen S11 und Y218 auftreten. Die konservierten Stellen S106, S133, S281 und S332 mit einer Phosphorylierungs-Wahrscheinlichkeit nach NetPhos größer 50 % sind nicht phosphoryliert. FBPase-S11A liegt unter gluconeogenetischen Bedingungen (0 min) unphosphoryliert vor, nach Glucosegabe erfolgt eine Phosphorylierung an den Stellen S327 oder S328 und Y255.

Die gereinigten Proteine FBPase-CBP und FBPase-S11A-CBP treten als 2 Banden im silbergefärbten SDS-Gel auf. Ein Unterschied in der molekularen Masse der Proteine könnte darauf zurückzuführen sein, dass FBPase in unterschiedlichen Modifikationen vorliegt oder dass der TAP-Tag zu einem Artefakt führt. Momentan kann keine der beiden Möglichkeiten ausgeschlossen werden. Um diese Daten zu bestätigen, wurden weitere Proteinreinigungen mit den selben Stämmen durchgeführt. Leider lagen zum Zeitpunkt des Abschlusses dieser Arbeit die Messergebnisse noch nicht vor.



## Ergebnisse

Beschreibung	Position	Wahrscheinlichkeit nach NetPhos	Konservierung	Oberflächenzugänglichkeit (SA)
FBPase (0 min) obere Bande	S11	100 %	nein	3,14
	S219	3 %	nein	-
	T12	56 %	nein	1,10
	T37	3 %	nein	-
	Y255	32 %	ja	-
FBPase (0 min) untere Bande	S11	100 %	nein	3,14
	T12	56 %	nein	1,10
	Y255	32 %	ja	-
FBPase (10 min) obere Bande	S11	100 %	nein	3,14
	S219 oder Y218 T12 oder T17	3 % / 57 % 56 % / 23 %	nein / ja nein / ja	- / - 1,10 / -
FBPase (10 min) untere Bande	S11	100 %	nein	3,14
	T12 oder T17	56 % / 23 %	ja / ja	1,10 / -
FBPase-S11A (0 min) obere+untere Bande	-	-	nein	-
FBPase-S11A (10 min) obere Bande	Y255	32 %	ja	-
FBPase-S11A (10 min) untere Bande	S327 oder S328	11 % / 13 %	nein / nein	- / -

**Tabelle 3: Phosphorylierungsstellen von FBPase und FBPase-S11A.** Die Stellen wurden von Dr. A. Sickmann und Dr. U. Lewandrowski (Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg) mittels Massenspektrometrie-Analyse mit Proben aus TAP-Proteinreinigungen bestimmt. Wahrscheinlichkeit nach NetPhos (Blom *et al.*, 1999), Konservierung in Eukaryonten (siehe Abb. 2) und die Oberflächen-Zugänglichkeit (SA) wurde mit Scansite berechnet (Obenauer *et al.*, 2003). - : der Wert ist zu klein (< 0,2), daher zeigt Scansite keinen Wert an.

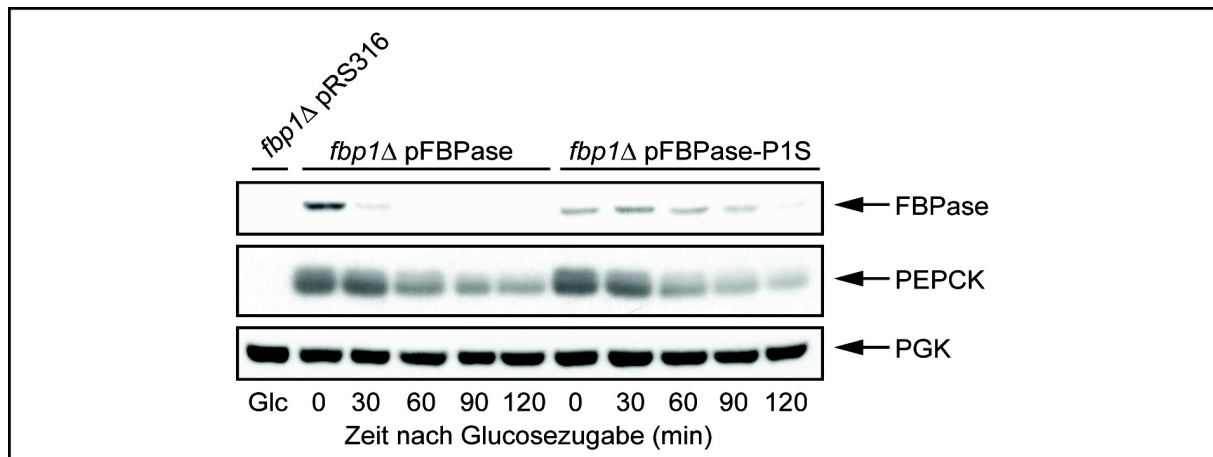
## 5.5 Studien zum N-Terminus der FBPase

Der N-terminale Aminosäurerest Prolin der FBPase ist essentiell für die Polyubiquitinierung und den Abbau der FBPase über das Ubiquitin-Proteasom-System (Hämmerle *et al.*, 1998). Es ist bislang unklar, welche Rolle diese Aminosäure oder das ganze N-terminale Peptid spielen. Das cytosolische Enzym MDH2 (Malatdehydrogenase) wird ebenso wie FBPase für das Wachstum unter gluconeogenetischen Bedingungen mit Ethanol oder Acetat als Kohlenstoffquelle benötigt (Gibson and McAlister-Henn, 2003). MDH2 besitzt ebenfalls ein aminoterminalen Prolin, das für den Abbau des Enzyms notwendig ist. Des Weiteren findet über den N-Terminus der MDH2 die Interaktion zu PEPCK (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase) statt. Es wurde postuliert, dass FBPase, MDH2 und PEPCK gemeinsam abgebaut werden (Gibson and McAlister-Henn, 2003). Hier sollte nun die essentielle Funktion des N-Terminus der FBPase beim Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System weiter untersucht werden.

### 5.5.1 Einfluss der N-terminalen Punktmutation *FBP1-P1S* auf den Abbau der FBPase

Um möglichst flexibel Experimente durchführen zu können, sollten die Studien zum N-Terminus der FBPase mit plasmid-codierter FBPase-P1S (der N-terminale Prolinrest wurde durch Serin ersetzt) durchgeführt werden. Hierzu wurde zunächst das vorhandene *FBP1-P1S* Gen auf dem „high-copy“-Plasmid pKD10S in den Vektor pRS316 umklontiert. Das Gen mit seinem Promotor und Terminator wurde mit den Primern P FBP1 forward und P FBP1 reverse amplifiziert. Hierbei wurden eine *Clal*- und eine *SpeI*-Restriktionsschnittstelle eingefügt, über welche dann die Klonierung in den Vektor pRS316 stattfand. Das entstandene Plasmid pFBPase-P1S wurde sequenziert und in den Stamm *fbp1Δ* (YJJ08) transformiert. Der Stamm *fbp1Δ* pFBPase-P1S kann in ethanolhaltigem Medium wachsen; dies ist nur möglich, wenn der Vektor funktionell ist. Des Weiteren wurde ein Katabolitinaktivierungsexperiment mit den Stämmen *fbp1Δ* (YJJ08) pRS316, *fbp1Δ* pFBPase und *fbp1Δ* pFBPase-P1S durchgeführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen (siehe Abb. 32), aufgeschlossen, einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen. Die Immunodetektion erfolgte mit FBPase-, PEPCK- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle). Im Stamm *fbp1Δ* pRS316 ist unter glykolytischen Bedingungen (Glc) wie erwartet keine FBPase und kein PEPCK zu sehen. Im Stamm *fbp1Δ* pFBPase-P1S findet im

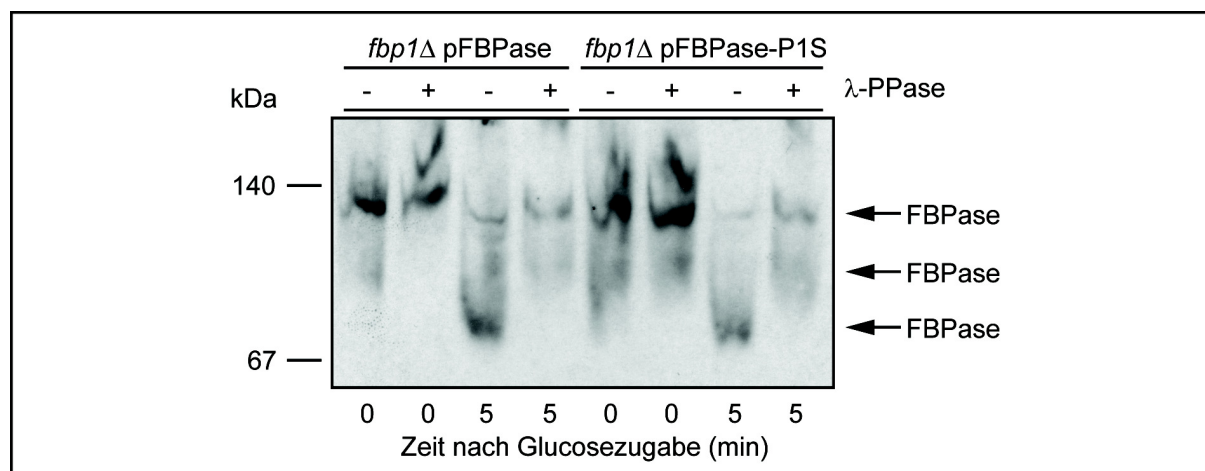
Vergleich zum Kontrollstamm ein stark verlangsamer FBPase-Abbau statt. Die N-terminale Mutation der FBPase hat aber keinen Einfluss auf den Abbau des Enzyms PEPCK.



**Abbildung 33: Einfluss der Punktmutation P1S auf den Abbau der FBPase.** Zellen der Stämme *fbp1Δ* (YJJ08) pRS316, *fbp1Δ* pFBPase und *fbp1Δ* pFBPase-P1S wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen und in glucosehaltiges Medium überführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen, aufgeschlossen, einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen, die Immunodetektion erfolgte mit FBPase-, PEPCK- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle).

### 5.5.2 Verhalten von FBPase-P1S im nativen Gel

Es wurde nun untersucht, wie sich FBPase-P1S im Vergleich zu FBPase bei einer nativen Gelelektrophorese verhält und ob die Inkubation mit Phosphatase einen Einfluss auf das Laufverhalten hat (siehe Kap. 5.4). Hierzu wurden Zellen der Stämme *fbp1Δ* (YJJ08) pFBPase und *fbp1Δ* pFBPase-P1S unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen, in glucosehaltiges Medium überführt. Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (siehe Abb. 34) und aufgeschlossen. Danach wurde jeweils ein Teil der Proben mit  $\lambda$ -Proteinphosphatase inkubiert, die restlichen Proben wurden auf Eis aufbewahrt. Alle Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und einer nativen Gelelektrophorese unterzogen. Nach der SDS-PAGE und dem Western Blot erfolgte die Immunodetektion mit FBPase-Antikörpern (Abb. 34). FBPase-P1S verhält sich genauso wie FBPase im nativen Gel, eine Dephosphorylierung resultiert im gleichen Laufverhalten der FBPase-P1S wie bei der FBPase des Kontrollstamms. FBPase-P1S ist zu jedem Zeitpunkt gleich phosphoryliert wie FBPase. Die Mutation hat keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von FBPase, dies entspricht den Daten von Hämmerle *et al.* (1998).



**Abbildung 34: Verhalten von FBPase-P1S im nativen Gelen mit und ohne Phosphatase-Behandlung.** Zellen der Stämme *fbp1Δ* (YJJ08) pFBPase und *fbp1Δ* pFBPase-P1S wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen und in glucosehaltiges Medium überführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen. Nach dem Zellaufschluss wurde ein Teil der Proben mit  $\lambda$ -Proteinphosphatase ( $\lambda$ -PPase) behandelt. Nach der nativen Gelelektrophorese und dem Western Blot erfolgte die Immunodetektion mit FBPase-Antikörpern.

### 5.5.3 Einfluss der Punktmutation FBPase-P1S auf die Interaktion von FBPase mit dem Gid-Komplex und Ssa1

Der N-Terminus von FBPase ist essentiell für die Polyubiquitinierung und den Abbau von FBPase (Hämmerle *et al.*, 1998). Deshalb wurde untersucht, ob in FBPase-P1S die Interaktion zur E3 Ligase bzw. dem Gid-Komplex oder zum Hsp70 Chaperon Ssa1 gestört ist und dadurch keine Polyubiquitinierung mehr stattfinden kann. Hierzu wurden nun Co-Immunopräzipitationsexperimente durchgeführt.

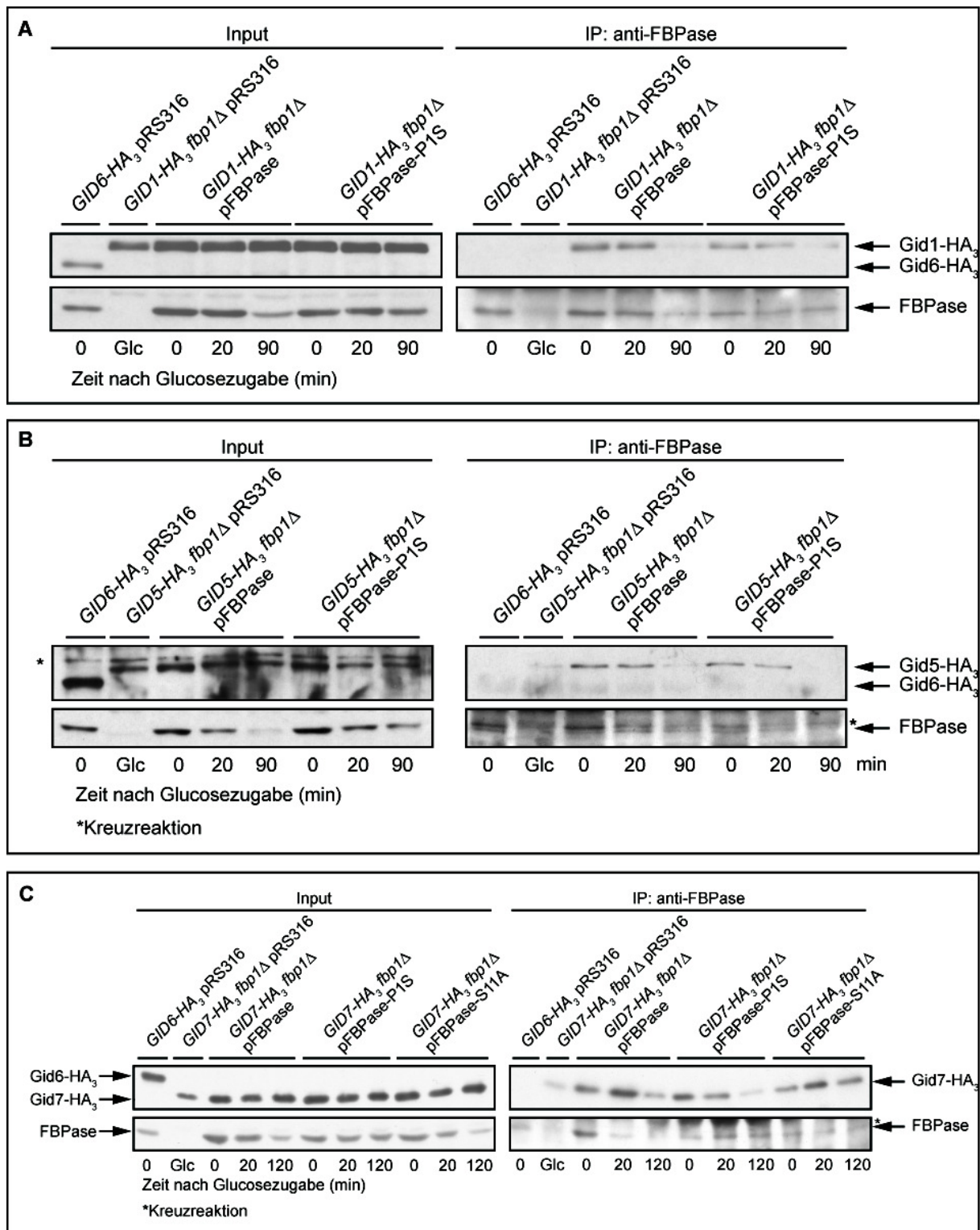
#### Interaktion von FBPase-P1S mit verschiedenen Gid-Proteinen

Es wurde die Interaktion von FBPase-P1S mit Gid1-HA<sub>3</sub>, Gid5-HA<sub>3</sub> und Gid7-HA<sub>3</sub> untersucht, diese Proteine sind Teil des Gid-Komplexes. Als Negativkontrolle für die Interaktion von FBPase mit dem Komplex wurde Gid6-HA<sub>3</sub> eingesetzt, ein Protein, welches nicht Teil des Gid-Komplexes ist (Ho *et al.*, 2002; Krogan *et al.*, 2006; Pitre *et al.*, 2006; Santt *et al.*, 2008).

Zunächst wurden Zellen der Stämme *GID6-HA<sub>3</sub>* (YBB1) pRS316, *GID1-HA<sub>3</sub> fbp1Δ* (YJJ09) pRS316, *GID1-HA<sub>3</sub> fbp1Δ* pFBPase und *GID1-HA<sub>3</sub> fbp1Δ* pFBPase-P1S unter glykolytischen Bedingungen (Glc), dann unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen sowie in glucosehaltiges Medium überführt, Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen. Die Zellen des Stammes *GID1-HA<sub>3</sub> fbp1Δ* pRS316 wurden unter glykolytischen Bedingungen geerntet, da dieser *FBP1* Deletionsstamm unter gluconeogenetischen

Bedingungen aufgrund fehlender FBPase nicht wachsen kann. Nach der Lyse der Zellen erfolgte die Immunopräzipitation der Komplexe mit FBPase-Antikörpern. Es wurden Proben des Lysats (Input) und der Immunopräzipitation (IP) einer SDS-PAGE und einem Western Blot unterzogen, die Immunodetektion wurde mit HA- und FBPase-Antikörpern vorgenommen. Wie in Abbildung 35A zu sehen ist, interagiert FBPase und FBPase-P1S mit Gid1-HA<sub>3</sub> unter gluconeogenetischen Bedingungen (0 min) und 20 min nach dem „Shift“ der Zellen in glucosehaltiges Medium. Es konnte keine Interaktion von FBPase mit Gid6-HA<sub>3</sub> nachgewiesen werden, dies zeigt, dass keine unspezifische Interaktion von FBPase und dem HA<sub>3</sub>-Tag auftrat. Ebenso konnte im *FBP1* Deletionsstamm Gid1-HA<sub>3</sub> nicht präzipitiert werden, die FBPase-Antikörper binden also nicht unspezifisch an Gid1-HA<sub>3</sub>.

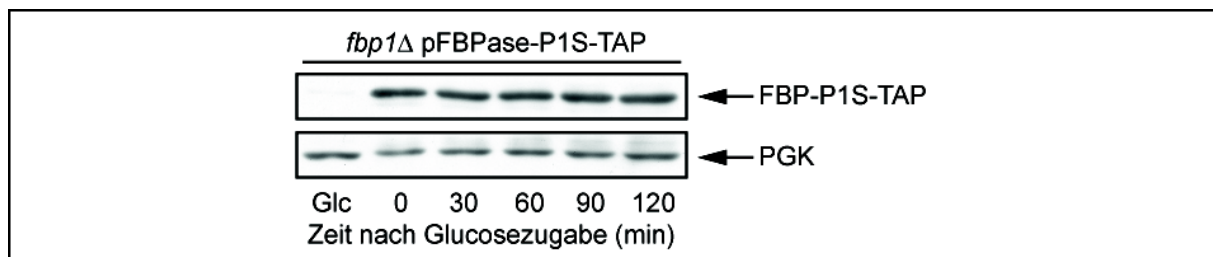
Das Experiment wurde mit Zellen der Stämme *GID6-HA<sub>3</sub>* pRS316, *GID5-HA<sub>3</sub>* *fbp1Δ* (YJJ11) pRS316, *GID5-HA<sub>3</sub>* *fbp1Δ* pFBPase und *GID5-HA<sub>3</sub>* *fbp1Δ* pFBPase-P1S (Abb. 35B) bzw. *GID6-HA<sub>3</sub>* pRS316, *GID7-HA<sub>3</sub>* *fbp1Δ* (YJJ01) pRS316, *GID7-HA<sub>3</sub>* *fbp1Δ* pFBPase, *GID7-HA<sub>3</sub>* *fbp1Δ* pFBPase-P1S und *GID7-HA<sub>3</sub>* *fbp1Δ* pFBPase-S11A (Abb. 35C) wiederholt. In allen Fällen zeigte sich, dass die Interaktion von FBPase-P1S zu den Gid-Proteinen nicht gestört ist, dies ist also nicht die Ursache für die fehlende Polyubiquitinierung von FBPase-P1S nach Glucosegabe.



**Abbildung 35: Interaktion von FBPase-P1S mit Gid-Proteinen.** Die Zellen wurden unter glykolytischen (Glc), dann unter gluconeogenetischen Bedingungen (0 min) angezogen sowie in glucosehaltiges Medium überführt (20, 90 oder 120 min). Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen. Nach der Lyse erfolgte die Immunopräzipitation mit FBPase-Antikörpern. Die Immunodetektion wurde mit HA- und FBPase-Antikörpern vorgenommen. Die Experimente wurden mit folgenden Stämmen durchgeführt (A) *GID6-HA<sub>3</sub>* (YBB1) pRS316, *GID1-HA<sub>3</sub> fbp1Δ* (YJJ09) pFBPase oder pFBPase-P1S, (B) *GID6-HA<sub>3</sub>* (YBB1) pRS316, *GID5-HA<sub>3</sub> fbp1Δ* (YJJ11) pRS316, pFBPase oder pFBPase-P1S, (C) *GID6-HA<sub>3</sub>* (YBB1) pRS316, *GID7-HA<sub>3</sub> fbp1Δ* (YJJ01) pRS316, pFBPase, pFBPase-P1S oder pFBPase-S11A.

### Interaktion von FBPase-P1S mit Ssa1

Als nächstes wurde die Interaktion von FBPase-P1S zu Ssa1 untersucht. Da mit Ssa1 keine Immunopräzipitationsexperimente möglich sind (siehe Kap. 5.3), sollten wieder Proteinreinigungen nach Puig *et al.* (2001) mit einem FBPase-P1S-TAP Expressionsvektor durchgeführt werden. Hierfür wurde die Kasette *TAP::TRP1<sup>K.I.</sup>* des Vektors pBS1479 mit den Primern P FBP-TAP forw und P FBP-TAP rev amplifiziert und mittels homologer Rekombination in das Plasmid pFBPase-P1S transformiert. Das entstandene Plasmid wurde in den Stamm *fbp1Δ* (YJJ08) transformiert, durch Wachstum in ethanolhaltigem Medium wurde die Funktionalität des Konstrukts in Bezug auf die Expression aktiver FBPase bestätigt. Dann wurde ein Katabolitinaktivierungsexperiment mit Zellen des Stammes *fbp1Δ* pFBPase-P1S-TAP durchgeführt. Proben wurden unter glykolytischen (Glc) und gluconeogenetischen (0) Wachstumsbedingungen sowie nach Glucosezugabe gezogen. Nach dem Zellaufschluss wurde eine Western Blot Analyse mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle) durchgeführt. Wie erwartet wurde FBPase-P1S-TAP nicht abgebaut (Abb. 36).

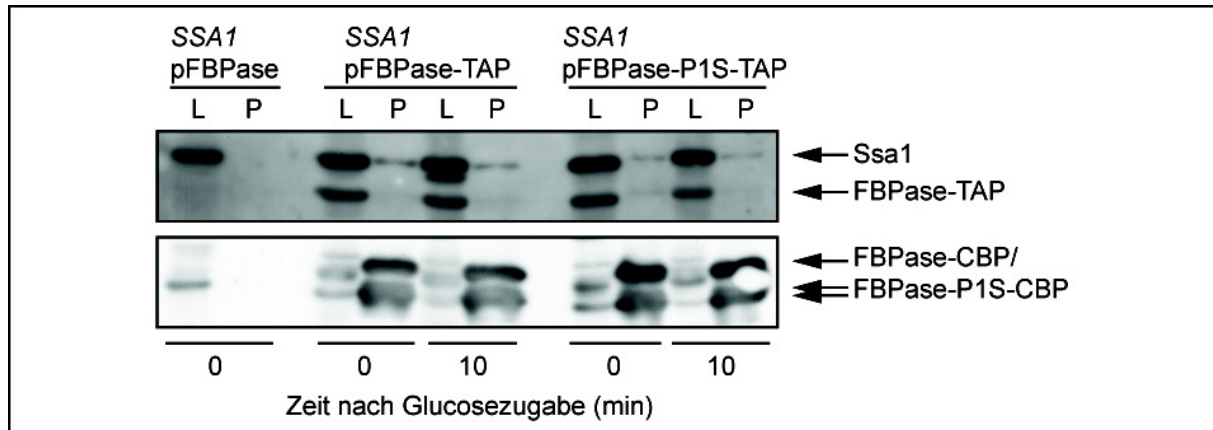


**Abbildung 36: Funktionalität des Vektors pFBPase-P1S-TAP.** Es wurde ein Katabolitinaktivierungsexperiment der FBPase im Stamm *fbp1Δ* (YJJ08) pFBPase-P1S-TAP durchgeführt. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen. Nach einer SDS-PAGE und einem Western Blot wurde die Immunodetektion mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle) durchgeführt.

Da die 4 Ssa-Proteine überlappende Funktionen haben, wurden die Proteinreinigungen im Stammhintergrund *SSA1 ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ* (YPD21) durchgeführt. Es wurden Zellen der Stämme *SSA1* (YPD21) pFBPase, *SSA1* pFBPase-TAP und *SSA1* pFBPase-P1S-TAP unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen angezogen und dann in glucosehaltiges Medium überführt. Je 400 OD<sub>600</sub> Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und einer TAP-Proteinreinigung unterzogen (siehe Abb. 37). Nach einer SDS-PAGE und einem Western Blot mit Proben des Lysats (L) und der Proteinreinigung (P) erfolgte die Immunodetektion mit Ssa1- und FBPase-Antikörpern. In Abbildung 37 ist zu sehen, dass FBPase-TAP und FBPase-P1S-TAP vor und nach Glucosegabe mit Ssa1 interagieren. Im Kontrollstamm *SSA1* pFBPase ist wie erwartet keine Interaktion mit Ssa1 detektierbar. Der

N-Terminus von FBPase ist also auch nicht für die Interaktion zum Chaperon Ssa1 zuständig.

Bei Proben der Proteinreinigung traten mehrere FBPase-CBP (FBPase mit Calmodulin Bindepeptid) Banden auf, die vermutlich auf ein TAP-Tag Artefakt zurückzuführen sind.



**Abbildung 37: Interaktion von FBPase-P1S mit Ssa1.** Zellen der Stämme *SSA1* (YPD21) pFBPase, pFBPase-TAP oder pFBPase-P1S-TAP wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen über Nacht inkubiert und dann in glucosehaltiges Medium überführt. Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und einer TAP-Proteinreinigung unterzogen. Nach einer SDS-PAGE und einem Western Blot mit Proben des Lysats (L) und der Proteinreinigung (P), erfolgte die Immunodetektion mit Ssa1- und FBPase-Antikörpern.

#### 5.5.4 Befindet sich am N-Terminus der FBPase ein Degron?

Der Abbau von Proteinen wird über sogenannte Degrons (Abbausignale) vermittelt. Da der N-Terminus der FBPase essentiell für den Abbau ist, könnte sich hier eine solche Sequenz befinden (Hämmerle *et al.*, 1998). Frühere Studien zu Degradations-Signalen der FBPase mittels Fusionsproteinen aus FBPase-Fragmenten und *E. coli*  $\beta$ -Galactosidase zeigten, dass FBPase in zwei Bereichen destabilisierende Sequenzen enthält, die ersten 18 Aminosäurereste der FBPase wurden aber nicht näher untersucht (Gamo *et al.*, 1994). Des Weiteren unterscheidet sich die FBPase-Sequenz der Hefen *S. pombe* und *S. cerevisiae* im N-Terminus, der Rest ist sehr ähnlich (Rogers *et al.*, 1988). Interessanterweise fehlt der FBPase aus *S. pombe* das N-terminale Prolin und weitere Reste und sie unterliegt auch nicht der Katabolitinaktivierung (Gamo *et al.*, 1994).



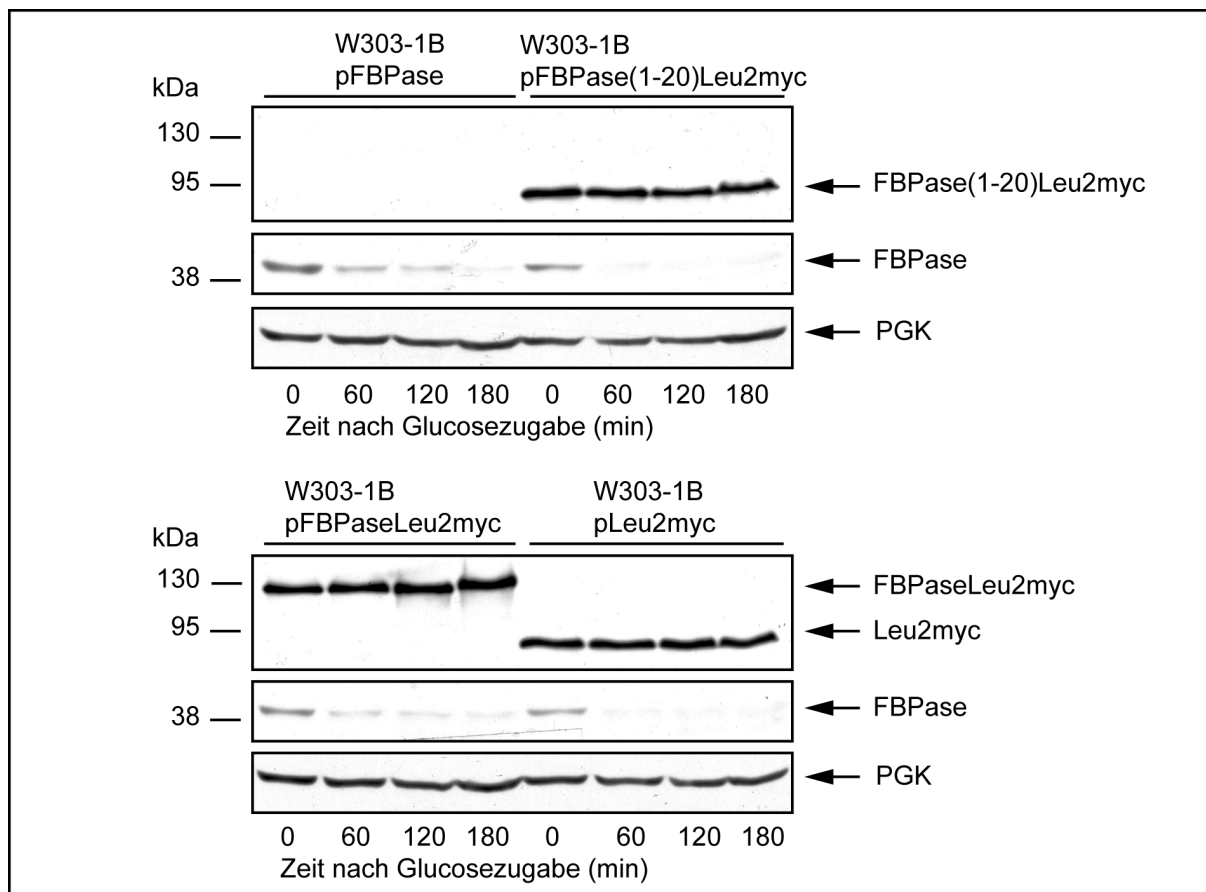
### Abbauverhalten verschiedener FBPaseLeu2myc-Konstrukte

Eine grundlegende Eigenschaft der Degrons ist, dass sie übertragbar sind (Levy *et al.*, 1999; Sheng *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005; Ravid and Hochstrasser, 2008). Würde FBPase am N-Terminus ein Degron enthalten, dann würde jedes Protein, das mit der FBPase-Degron-Sequenz versehen wird, abgebaut werden. Hierzu sollten Studien mit FBPaseLeu2myc-Konstrukten durchgeführt werden, damit der Abbau der Proteine mittels Immunodetektion mit einem vorhanden myc-Antikörper verfolgt werden konnte. Das Protein CTL\*myc ist als ERAD-Substrat etabliert, es steht für CPY\* (fehlgefaltete Carboxypeptidase yscY) mit einer Transmembrandomäne und stabilem Leu2myc (Kohlmann *et al.*, 2008). Leu2 ist die Abkürzung für die cytosolische  $\beta$ -Isopropylmalat-Dehydrogenase.

Zunächst wurde das Leu2myc-Fragment des Plasmids pSK7, welches das Protein CTL\*myc exprimiert, mit den Primern PD1 forw und PD2 rev amplifiziert und mithilfe der Restriktionsschnittstellen *Xba*I und *Sal*I in den Vektor pRS316 kloniert. Das Konstrukt enthält keinen Promotor. In diesen pLeu2myc\*-Vektor wurden nun verschieden große FBPase-Fragmente mit nativem Promotor kloniert, hierfür wurden die *Not*I- und *Xba*I-Schnittstellen verwendet. Der Promotor der FBPase wurde mit den Primern PD3 forw und PD6 rev amplifiziert und mittels der *Not*I- und *Xba*I-Schnittstellen in das pLeu2myc\*-Plasmid kloniert, daraus resultierte der Vektor pLeu2myc. Für die Amplifikation des Promotors und des gesamten *FBP1* Gens wurden die Primer PD3 forw und PD5 rev verwendet, die Klonierung in den Vektor pLeu2myc\* ergab das Plasmid pFBPaseLeu2myc. Für das Konstrukt pFBPase(1-20)Leu2myc, das den nativen Promotor und die Basen 1-60 (Aminosäuren 1-20) der FBPase enthält, wurden die Primer PD3 forw und PD4 rev verwendet. Alle Konstrukte wurden durch Restriktionsverdau überprüft.

Das verkürzte FBPase-Protein FBPase(1-20)Leu2myc ist nicht funktionell, da das aktive Zentrum des Proteins fehlt. Deswegen wurde die Expressionskontrolle der Proteine nicht im *fbp1* $\Delta$  sondern im W303-1B Stammhintergrund durchgeführt. Es wurden Zellen der Stämme W303-1B pFBPase, W303-1B pFBPase(1-20)Leu2myc, W303-1B pFBPaseLeu2myc und W303-1B pLeu2myc unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen und dann in glucosehaltiges Medium überführt, Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen (siehe Abb. 38). Nach dem Zellaufschluss wurde eine SDS-PAGE und ein Western Blot durchgeführt, die Immunodetektion erfolgte mit myc-, FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle). Wie in Abbildung 38 zu sehen ist, wird in allen Konstrukten die native FBPase abgebaut. Das Kontrollprotein pLeu2myc wird wie erwartet nicht abgebaut. Die

Proteine FBPaseLeu2myc und FBPase(1-20)Leu2myc werden ebenfalls nicht abgebaut. Da FBPaseLeu2myc nicht abgebaut wird, könnte es auch sein, dass die Epitop-Markierung mit Leu2myc den erwarteten FBPase-Abbau verhindert. Möglicherweise ist die Abbau-maschinerie mit den Konstrukten „überfordert“. Ein N-Degron kann mit diesen Experimenten nicht ausgeschlossen werden. Eine Wiederholung der Experimente mit einem anderen Fusionsprotein an der FBPase würde hier weiterhelfen.

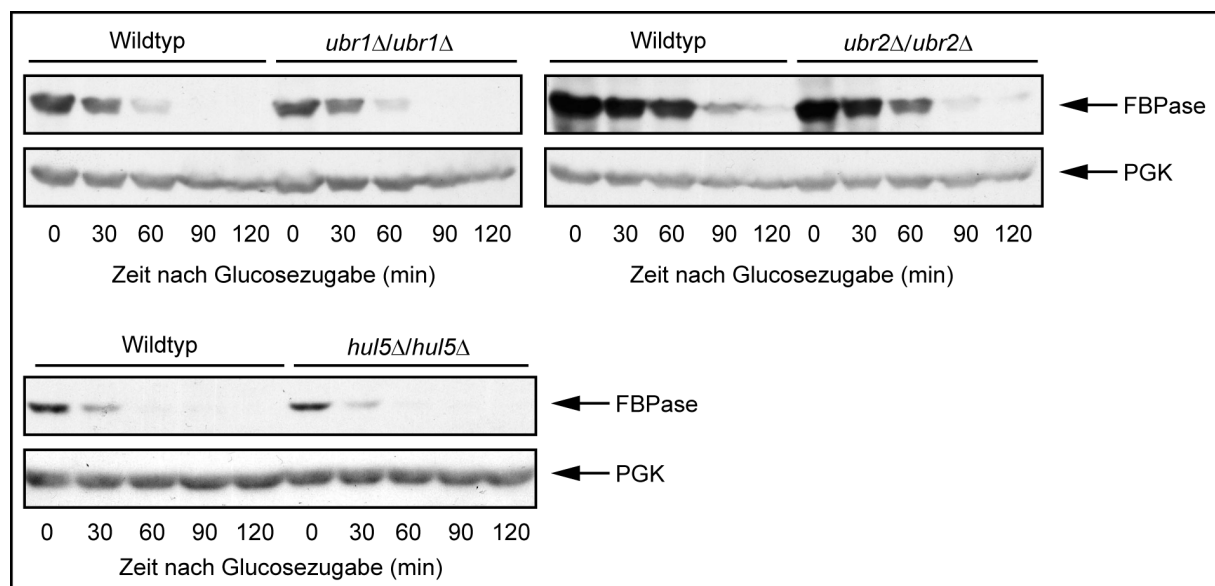


**Abbildung 38: Abbauverhalten der FBPaseLeu2myc-Konstrukte.** Die Stämme W303-1B pFBPase, pFBPase(1-20)Leu2myc, pFBPaseLeu2myc oder pLeu2myc wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen und in glucosehaltiges Medium überführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen und aufgeschossen. Nach einer SDS-PAGE und einem Western Blot erfolgte die Immunodetektion mit myc-, FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle).

### Einfluss der Ligasen Ubr1, Ubr2 und Hul5 auf den Abbau der FBPase

Im Ubiquitin-abhängigen „N-end rule“-Signalweg wird die Lebensdauer eines Proteins von seiner N-terminalen Aminosäure bestimmt (Bachmair *et al.*, 1986). Das aminotermine Prolin der FBPase gehört zu den stabilisierenden Aminosäuren bzw. zu den Aminosäuren, die einem Protein Langlebigkeit verleihen (Varshavsky, 1997; Sheng *et al.*, 2002). Ubr1 und Ubr2 sind E3 Ligasen des „N-end rule“-Weges. Hier sollte ihr Einfluss auf den FBPase-Abbau untersucht werden. Des weiteren sollte ein möglicher Einfluss der E4 Ligase Hul5 überprüft werden. Hul5 ist ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym und ist an der Verlängerung der Polyubiquitinketten am Substrat beteiligt (Crosas *et al.*, 2006; Kohlmann *et al.*, 2008).

Es wurden Zellen der Stämme BY4743 (Wildtyp), *ubr1Δ/ubr1Δ* (Y34814), *ubr2Δ/ubr2Δ* (Y31579) sowie *hul5Δ/hul5Δ* (Y34508) unter gluconeogenetischen Bedingungen inkubiert und dann in glucosehaltiges Medium überführt, Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen (siehe Abb. 39), aufgeschlossen und einer SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot unterzogen. Die Immunodetektion erfolgte mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle). Die Deletion aller drei Ligasen führt zu einem „wildtypmäßigen“ FBPase-Abbau. Ubr1, Ubr2 und Hul5 sind nicht am Abbau der FBPase über das Ubiquitin-Proteasom-System beteiligt.

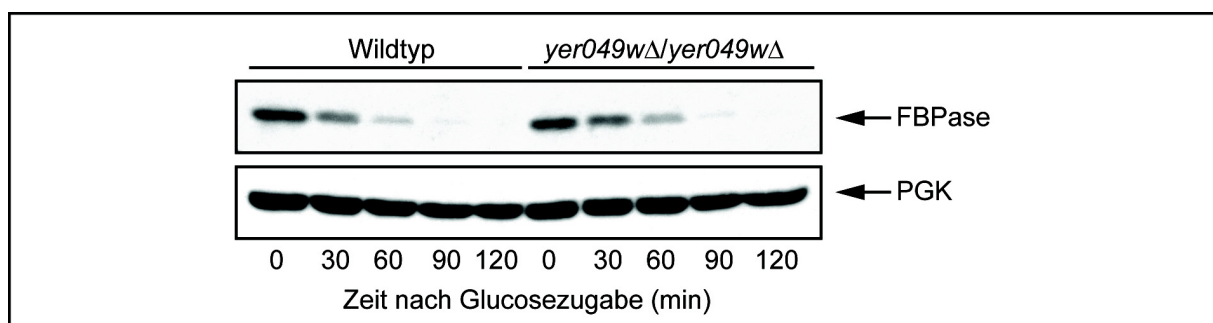


**Abbildung 39: Einfluss verschiedener E3- und E4-Ligasen auf den FBPase-Abbau.** Die Zellen der Stämme BY4743 (Wildtyp), *ubr1Δ/ubr1Δ* (Y34814), *ubr2Δ/ubr2Δ* (Y31579) und *hul5Δ/hul5Δ* (Y34508) wurden unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen inkubiert und dann in glucosehaltiges Medium überführt, Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen. Nach dem Zellaufschluss erfolgte eine Western Blot Analyse mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle).

### Einfluss einer potentiellen Hydroxylase auf den Abbau der FBPase

Es ist schon lange bekannt, dass Prolin-Reste hydroxyliert werden können, dies kann auch ein Signal für die Polyubiquitinierung eines Proteins und den Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System sein (Chvapil and Hurych, 1959; Ravid and Hochstrasser, 2008). Beispielsweise wird ein Proteinkomplex aus HIF-Untereinheiten (HIF engl. „hypoxia inducible factor“) bei ausreichender Sauerstoffzufuhr in Säugerzellen nicht benötigt und deshalb dann an einem Prolin-Rest hydroxyliert. Dies führt zur Interaktion mit einer E3 Ligase, die zur Polyubiquitinierung und Abbau des Faktors über das Proteasom führt (Berra *et al.*, 2006). Hydroxylasen enthalten sogenannte PHD-Domänen (PHD engl. „prolyl hydroxylase domain“), welche die Hydroxylierung von Substraten katalysieren. Diese Domänen gehören zur Familie der Eisen- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, die durch Sauerstoff reguliert werden (Ozer and Bruick, 2007). Sie kommen in fast allen Spezies vor (Berra *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2006). In humanen Zellen gibt es 12 Proteine, die eine PHD-Domäne enthalten, aber es gibt keine homologen Proteine in Hefezellen. Es gibt ein einziges Protein in *S. cerevisiae* mit einer ähnlichen Domäne, das eine unbekannt Funktion hat. Der Einfluss der Deletion dieses Gens auf den FBPase-Abbau wurde nun untersucht.

Zellen der Stämme BY4743 (Wildtyp) und *yer049wΔ/yer049wΔ* (Y30184) wurden unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen angezogen und dann in glucosehaltiges Medium überführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (siehe Abb. 40), aufgeschlossen und einer Western Blot Analyse unterzogen. Die Immunodetektion erfolgte mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle). Im Deletionsstamm wird FBPase ebenso wie im Wildtypstamm abgebaut, die potentielle Hydroxylase, die durch den ORF *YER049w* codiert wird, ist nicht am Abbau der FBPase beteiligt.



**Abbildung 40: Einfluss einer potentiellen Hydroxylase auf den FBPase-Abbau.** Die Zellen der Stämme BY4743 (Wildtyp) und *yer049wΔ/yer049wΔ* (Y30184) wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen angezogen und in glucosehaltiges Medium überführt, Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen. Nach einer SDS-PAGE und einem Western Blot erfolgte die Immunodetektion mit FBPase- und PGK-Antikörpern (Ladekontrolle).

## 6 . Diskussion

Der Zucker Glucose ist ein essentieller Nährstoff. Er wird über die Glykolyse umgesetzt und ist nötig für die Energiegewinnung sowie die Synthese von Bausteinen für den zellulären Metabolismus. Steht den Zellen keine Glucose zur Verfügung, so muss diese über die Gluconeogenese synthetisiert werden. Glykolyse und Gluconeogenese sind antagonistische Stoffwechselwege. Sie werden reziprok reguliert, um u.a. die Verschwendung von ATP zu vermeiden (Purwin *et al.*, 1982). Die meisten Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels katalysieren sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion eines Schrittes. Aus thermodynamischen Gründen gibt es aber drei irreversible Schritte, die für die Glykolyse und die Gluconeogenese unterschiedliche Enzyme benötigen. Eines der Schlüsselenzyme der Gluconeogenese ist die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), die die Dephosphorylierung von Fructose-1,6-bisphosphat zu Fructose-6-phosphat katalysiert. Das zur FBPase reziproke Enzym in der Glykolyse ist die Phosphofruktokinase. FBPase wird nur bei Wachstum auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle wie beispielsweise Ethanol exprimiert. Nach dem Überführen der Zellen in glucosehaltiges Medium wird FBPase nicht mehr benötigt, sie wird inaktiviert und abgebaut. Die sogenannte Katabolitinaktivierung der FBPase beinhaltet die Repression des *FBP1* Gens, die reversible Phosphorylierung am Serinrest 11 der FBPase, die zur Inaktivierung des Enzyms führt, und die allosterische Inhibition durch Fructose-2,6-bisphosphat und AMP (Gancedo, 1971; Holzer, 1976; Funayama *et al.*, 1980; Mazon *et al.*, 1982; von Herrath and Holzer, 1985, 1988; Marcus *et al.*, 1988). Nach der Inaktivierung wird die FBPase mittels der Enzymkaskade der Enzyme E1 (Uba1), E2 (Gid3/Ubc8) und E3 (Ubiquitin-Ligase) polyubiquitiniert und dann über das 26S-Proteasom abgebaut (Schork *et al.*, 1994a, b; Schork *et al.*, 1995; Santt *et al.*, 2008).

### 6.1 FBPase und ihre Phosphorylierungsstellen

Bei der Katabolitinaktivierung wird FBPase reversibel am Serinrest 11 phosphoryliert, dieser Prozess ist von der Proteinkinase A abhängig (Rittenhouse *et al.*, 1986, 1987; T. Pfirmann, 2006). Durch die Phosphorylierung der FBPase wird das benötigte pH-Optimum von einem neutralen pH-Wert in den alkalischen Bereich verschoben, so dass die Enzymaktivität unter cytosolischen Bedingungen um ca. 50 % reduziert wird (Funayama, 1980; Pohlig and Holzer, 1985; Holzer and Purwin, 1986; Rittenhouse *et al.*, 1987). Eine punktmutierte FBPase-S11A (der Aminosäurerest Serin11 (S11) wurde durch Alanin ersetzt) wird nach Glucosegabe nicht

mehr an dieser Stelle phosphoryliert, aber immer noch polyubiquitiniert und abgebaut (Hämmerle *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung am Rest S11 ist somit nur für die schnelle Inaktivierung von FBPase essentiell und nicht für den Abbau. In anderen Studien wurden weitere Phosphorylierungsstellen in der FBPase postuliert (Rakus *et al.*, 2003; Hung *et al.*, 2004). Die Gruppe um H. L. Chiang konnte mittels radioaktiver Markierung zeigen, dass FBPase-S11A nach dem Überführen der Zellen von gluconeogenetischen Bedingungen in glucosehaltiges Medium trotzdem noch phosphoryliert wird (Hung *et al.*, 2004). Eine nähere Charakterisierung der Phosphorylierung wurde aber nicht vorgenommen.

In dieser Arbeit sollten weitere Phosphorylierungsstellen der FBPase identifiziert und untersucht werden. Dazu wurden zunächst mit dem Programm NetPhos mögliche Phosphorylierungsstellen der FBPase bestimmt (Abb. 25) (Blom *et al.*, 1999). Die folgenden Stellen besitzen eine Wahrscheinlichkeit größer als 50 % phosphoryliert zu werden: S11, S106, S133, S281, S332, S333; T12, T157, T231; Y218 und Y227. Des Weiteren wurde ein Sequenzvergleich (Alignment) von FBPase-Proteinen verschiedener Eukaryonten durchgeführt (Abb. 26). Für die Funktion eines Proteins wichtige Sequenzbereiche sind oft konserviert. Damit konnten die potentiellen Phosphorylierungsstellen der FBPase zunächst auf die Reste S106, S133, S281, S332 und Y218 eingegrenzt werden. Die *in vivo* genutzten Phosphorylierungsstellen der FBPase sollten an der Protein-Oberfläche liegen, da die Aminosäurereste für Kinasen und Phosphatasen zugänglich sein müssen. Dazu wurde die Erreichbarkeit der potentiellen Phosphorylierungsstellen mit dem Programm Scansite 2.0 berechnet (Abb. 27) (Obenauer *et al.*, 2003). Die Zugänglichkeit der Stellen an der Protein-Oberseite (engl. „Surface Accessibility“, SA) ist als „theoretische Anzahl der Wasser-Moleküle, die mit diesem Aminosäurerest in Kontakt stehen“ definiert (Harney *et al.*, 2005). Der SA-Wert für den bekannten Rest S11 liegt bei 2,5, für den Rest S281 bei 3,1. Alle weiteren potentiellen Phosphorylierungsstellen haben einen deutlich kleineren SA-Wert (Abb. 27, Übersicht siehe Tab. 2). Es wurde nun die Doppelmutation FBPase-S11A-S281A eingeführt, um deren Einfluss auf den Abbau der FBPase zu untersuchen. Es zeigte sich, dass die Serinreste 11 und 281 nicht am FBPase-Abbau beteiligt sind (Abb. 28). Dieses Ergebnis war sehr überraschend, da die potentielle Phosphorylierungsstelle S281 nach NetPhos eine Phosphorylierungswahrscheinlichkeit von 70,1 % hat, konserviert ist und sehr gut zugänglich sein sollte (Tab. 2).

Weiterhin wurde ein einfacher Nachweis für die Phosphorylierung der FBPase gesucht. Der Einsatz eines Phospho-Serin-Antikörpers sowie die Durchführung eines Phosphatase-Tests mit immunopräzipitierter Wildtyp FBPase und der mutierten FBPase-S11A waren dabei nicht erfolgreich. Es wurde dann das Verhalten von FBPase und FBPase-S11A in der nativen Gelelektrophorese untersucht. Ein Teil der Zelllysate wurde zusätzlich mit  $\lambda$ -

Proteinphosphatase behandelt. Nach der nativen Gelelektrophorese wurden die Proben einem Western Blot und einer Immunodetektion mit FBPase-Antikörpern unterzogen. Im Kontrollstamm W303-1B trat eine reproduzierbare, charakteristische Bandenstruktur auf (Abb. 29). Schon unter gluconeogenetischen Bedingungen liegt FBPase demzufolge in zwei Formen vor, von denen die höhermolekulare Form die intensivere ist (Abb. 29, Spur1). Nach dem Überführen in glucosehaltiges Medium erscheint eine zusätzliche, starke niedermolekulare Bande. Da bekannt ist, dass FBPase unter diesen Bedingungen phosphoryliert wird, könnte es sich bei den zwei Banden um unterschiedlich häufig phosphorylierte Formen der FBPase handeln. Die Phosphorylierung von FBPase führt zu einem stärker negativ geladenen Protein, das in der nativen Gelelektrophorese schneller läuft. Durch Behandlung mit  $\lambda$ -Proteinphosphatase wird das Protein dephosphoryliert, es ist somit nicht so stark negativ geladen und sollte im nativen Gel entsprechend langsamer wandern. Bei Behandlung der vor und nach Glucosegabe gezogenen Proben mit  $\lambda$ -Proteinphosphatase trat eine intensive Bande auf, die der nicht-phosphorylierten FBPase entspricht sowie eine deutlich schwächere Bande, die durch den Vergleich mit Abb. 30 (Spur 2 und 4) vermutlich auf nicht vollständig dephosphorylierte FBPase zurückzuführen ist.

Dieses Experiment ist ein Indiz dafür, dass die FBPase nach Glucosegabe nicht in zwei verschiedenen FBPase-Subkomplexen vorliegt. Wäre dies der Fall, müsste die untere Bande (Bande 2) auch nach  $\lambda$ -Proteinphosphatase-Behandlung noch vorhanden sein. Das Fehlen dieser Bande nach Phosphatase-Behandlung deutet aber darauf hin, dass das schnellere Laufverhalten der unbehandelten Probe nach Glucosegabe lediglich auf eine oder mehrere Phosphorylierungen der FBPase zurückzuführen ist.

Auch FBPase-S11A liegt unter gluconeogenetischen Bedingungen in zwei Formen vor (Abb. 30, Spur 5). Nach Glucosegabe findet keine Änderung des Laufverhaltens der FBPase im nativen Gel (Spur 7) statt. Die Inkubation mit  $\lambda$ -Proteinphosphatase resultiert in beiden Fällen in einer einzigen FBPase-Bande (Abb. 30, Spur 6 und 8). Vermutlich liegt FBPase-S11A ebenso wie FBPase unter gluconeogenetischen Bedingungen in einer phosphorylierten und einer nicht-phosphorylierten Form vor. Nach Glucosegabe findet an FBPase-S11A dann aber keine weitere Phosphorylierung statt. Insgesamt bedeutet dies für die FBPase, dass es noch weitere Phosphorylierungsstellen gibt, welche bei einer Mutation am Serinrest 11 zum Einsatz kommen.

Bei diesen Analysen ist überraschend, dass keine weiteren höhermolekularen Komplexe von FBPase gefunden wurden, da im Rahmen dieser Arbeit Interaktionen von FBPase zum Gid-Komplex und auch zum Chaperon Ssa1 unter verschiedenen Bedingungen gezeigt werden konnten. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Bindungsstellen des FBPase-Antikörpers an der FBPase unter nativen Bedingungen vom Gid-Komplex oder auch von Ssa1 verdeckt

und somit nicht vom FBPase-Antikörpern detektierbar sind.

Um dann mittels massenspektrometrischer Analyse die Phosphorylierungsstellen der FBPase und FBPase-S11A zu bestimmen, wurden Proteinreinigungen mit funktionellem FBPase-TAP und FBPase-S11A-TAP als Substrat durchgeführt. Die Messungen, vorgenommen von Dr. A. Sickmann und Dr. U. Lewandrowski (Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg) ergaben, dass FBPase schon unter gluconeogenetischen Bedingungen an folgenden Resten phosphoryliert vorliegt: S11, S219, T12, T37 und Y255. Nach Glucosegabe sind die Reste S11, S219 oder Y218 und T12 oder T17 phosphoryliert (Tab. 3). FBPase-S11A liegt nach dieser Analyse unter gluconeogenetischen Bedingungen unphosphoryliert vor, dies widerspricht den Daten der nativen Gelelektrophorese. Nach Glucosegabe ist FBPase-S11A an den Resten S327 oder S328 und Y255 phosphoryliert (Tab. 3). Insgesamt traten bei der Messung viele verschiedene Phosphorylierungsstellen auf. Erstaunlicherweise ist bis auf S11 keine der theoretischen Phosphorylierungsstellen der FBPase dabei. Die Vorhersage von Phosphorylierungsstellen mit Hilfe verschiedener Programme ist somit nicht zuverlässig. Leider wird durch die massenspektrometrischen Analysen nicht klar, wie groß der Anteil der jeweiligen phosphorylierten FBPase-Form ist und ob Mehrfach-Phosphorylierungen auftreten oder nur verschiedene Einfach-Phosphorylierungen. Es ist anzunehmen, dass FBPase unter gluconeogenetischen Bedingungen zum Großteil in einer unphosphorylierten Form vorliegt, da die Bande 1 im nativen Gel (Abb. 30, Spur 1) intensiver ist als die Bande 2. Parallel zur Synthese eines Proteins wird auch ständig ein geringer Anteil abgebaut. Dies erklärt, weshalb es schon unter gluconeogenetischen Bedingungen einen Anteil an phosphorylierter FBPase gibt und warum bei der Proteinreinigung von FBPase-TAP (Abb. 13) schwache, höhermolekulare Banden des Silbergels als FBPase identifiziert wurden, wobei es sich vermutlich um polyubiquitinierte FBPase handelt.

Die Ergebnisse aller durchgeführten Studien zu den Phosphorylierungsstellen der FBPase ergeben folgendes Bild: unter gluconeogenetischen Bedingungen wird FBPase exprimiert, hier wird schon ein geringer Anteil der FBPase phosphoryliert, polyubiquitiniert und abgebaut. Nach Überführen in glucosehaltiges Medium wird dann der größere Teil der FBPase durch Phosphorylierung am Serinrest 11 inaktiviert, polyubiquitiniert und dann abgebaut. FBPase wird hauptsächlich am Aminosäurerest S11 phosphoryliert, aber auch geringfügig an weiteren Stellen. Steht der Rest S11 nicht zur Verfügung, dann erfolgen die Phosphorylierungen an anderen Stellen, der Einfluss auf die Inaktivierung der FBPase ist aber bislang unklar.



## 6.2 Der N-Terminus der FBPase

Der aminoterminaler Prolinrest der FBPase ist essentiell für die Polyubiquitinierung und den Abbau des Enzyms über das Ubiquitin-Proteasom-System (Hämmerle *et al.*, 1998). Die Gründe hierfür sind bislang unklar. Es wurde vermutet, dass der N-Terminus der FBPase für die Interaktion zum Gid-Komplex, dem E3, benötigt wird. In dieser Arbeit konnte nun durch Co-Immunopräzipitationen gezeigt werden, dass dies nicht der Fall ist, denn FBPase-P1S (die N-terminale Aminosäure Prolin wurde durch Serin ersetzt) interagiert immer noch mit dem Gid-Komplex. FBPase-P1S konnte mit den Proteinen Gid1-HA<sub>3</sub>, Gid5-HA<sub>3</sub> und Gid7-HA<sub>3</sub> co-immunopräzipitiert werden (Abb. 35). Weiterhin wurde die Interaktion zum Chaperon Ssa1 untersucht, das die FBPase mit seiner E3 Ligase verknüpft. Aber auch diese besteht weiterhin (Abb. 37). Da die Interaktionen von FBPase-P1S zum Gid-Komplex und auch dem essentiellen Faktor Ssa1 nicht gestört sind, muss das N-terminale Prolin eine andere Aufgabe haben. Es könnte z.B. als Degron (Abbausignal) wirken. Ein N-terminales Fragment und die gesamte FBPase-Sequenz wurden an stabiles Leu2myc fusioniert, um zu untersuchen, ob die FBPase-Sequenzen den Abbau von Leu2myc induzieren können. Es zeigte sich allerdings, dass das Konstrukt FBPaseLeu2myc stabilisiert ist, d.h. Leu2myc ändert die Abbaueigenschaften der FBPase. Aus diesem Grund ist dieser Versuchsaufbau nicht dazu geeignet ein Degron zu erkennen. Die Studie könnte beispielsweise mit einem anderen Fusionsprotein wiederholt werden. Weiterhin wurde jahrelang diskutiert, ob FBPase ein Substrat des „N-end rule“-Weges ist. In diesem Signalweg hängt die Lebensdauer eines Proteins von seiner N-terminalen Aminosäure ab, es gibt langlebige und kurzlebige Aminosäurereste (Bachmair *et al.*, 1986; Varshavsky, 1997). Die Einteilung des Prolinrestes war lange Zeit umstritten. Er wurde ursprünglich den langlebigen Resten zugeordnet. Da der Rest für den Abbau der Kinase c-MOS essentiell ist, wurde er später den kurzlebigen Aminosäureresten zugeordnet, dies wurde aber widerlegt (Nishizawa *et al.*, 1992, 1993; Sheng *et al.*, 2002). In dieser Arbeit wurde der Einfluss der „N-end rule“-Ligasen Ubr1 und Ubr2 auf den FBPase-Abbau untersucht (Abb. 39). Es konnte kein Einfluss dieser Ligasen auf den Abbau festgestellt werden. Somit ist FBPase unter unseren Standardbedingungen kein Substrat dieses Abbauweges.

Es wäre auch denkbar, dass eine Modifikation am N-Terminus der FBPase nach Glucosegabe das Signal für den Abbau bildet. Eine mögliche Modifikation wäre eine Hydroxylierung am N-terminalen Prolin. Eukaryontenzellen passen sich kontinuierlich an schwankende Sauerstoffkonzentrationen an, deshalb erfolgt die Regulation einiger Proteine über Sauerstoff-abhängige Modifikationen von speziellen Degrons. So ist in Säugerzellen bei Hypoxie, einem Sauerstoffmangel im Gewebe, ein Komplex aus HIF-Untereinheiten (HIF: engl. „*hypoxia inducible factor*“) an der Transkription benötigter Gene beteiligt. Steht den

Zellen wieder ausreichend Sauerstoff zur Verfügung, so werden die HIF-1 $\alpha$ -Untereinheiten des Komplexes an einem oder zwei Prolin-Resten hydroxyliert und an einem Lysin-Rest acetyliert. Diese Reste befinden sich in der sogenannten „oxygen-dependent degradation“-Domäne. Durch die Prolin-Hydroxylierung entsteht eine Bindungsstelle für die E3 Ligase; so dass das Substrat polyubiquitiniert und abgebaut werden kann. Das von Hippel-Lindau (VHL)-Tumor-Suppressor-Protein ist Teil dieses Ligase-Komplexes und ist für die Substraterkennung zuständig (Semenza, 2001; Kaelin, 2002; Lee *et al.*, 2004; Kaelin, 2005; Ravid and Hochstrasser, 2008). Die Hydroxylierung von Substraten wird durch Hydroxylasen mit einer sogenannten PHD-Domäne katalysiert (PHD: engl. „prolyl hydroxylase domain“). Diese Domänen gehören zur Familie der Eisen- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, die durch Sauerstoff reguliert werden (Ozer and Bruick, 2007). Sie kommen in fast allen Spezies vor (Berra *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2007). Es gibt viele Proteine mit einer PHD-Domäne, bislang sind aber keine homologen Proteine in der Hefe *S. cerevisiae* bekannt. Das einzige Protein mit einer ähnlichen Domäne, das durch den ORF *YER049w* codiert wird, wurde in dieser Arbeit untersucht. Bei einem Katabolitinaktivierungsexperiment im *yer049w $\Delta$  Deletionsstamm konnte kein Einfluss auf den Abbau der FBPase festgestellt werden (Abb. 40). Es könnte selbstverständlich noch weitere bislang unbekannte Hydroxylasen in *S. cerevisiae* geben. So wurde erst vor kurzem die Hydroxylase Ofd1 in der Hefe *S. pombe* beschrieben (Hughes and Espenskade, 2008; Lee *et al.*, 2009). Allgemein wird die Hydroxylierung durch die Faktoren Sauerstoff, Fe<sup>2+</sup> und verschiedene Intermediate des Zitronensäurezyklus beeinflusst. Um zu testen, ob der Abbau der FBPase Sauerstoff-abhängig verläuft, bzw. indirekt von einer Hydroxylierung abhängt, müssten Abbau-Experimente der FBPase unter Sauerstoff-Ausschluss durchgeführt werden.*

Die Aconitase, ein Enzym des Citrat- und des Glyoxylatzyklus, katalysiert die Umwandlung von Citrat oder Isocitrat in Aconitat oder umgekehrt. Diese Prozesse werden von einem Eisen-Schwefel-Cluster als Co-Faktor beeinflusst. Interessanterweise wurde gezeigt, dass dieses Enzym an der Polyubiquitinierung und dem Abbau der FBPase beteiligt ist (G. Bee, 1995). Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche Hydroxylierung der FBPase sein.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine vom N-terminalen Prolin abhängige Phosphorylierung am Serinrest 11 der FBPase. Die Ergebnisse der nativen Gelelektrophorese von FBPase-P1S (Abb. 34) sowie die Daten von Hämmerle *et al.* (1998) zeigen, dass FBPase-P1S genauso wie FBPase phosphoryliert wird. Dies kann nicht der Grund für die fehlende Ubiquitinierung der FBPase-P1S sein. Weiterhin ist auch bekannt, dass die Phosphorylierung am Serinrest 11 der FBPase nicht für den Abbau benötigt wird, sondern für die Inaktivierung des Enzyms (Funayama *et al.*, 1980, Müller and Holzer, 1981; Mazon *et al.*, 1982; Marcus *et al.*, 1988).

### 6.3 Studien zum Gid-Komplex und FB Pase

Der Gid-Komplex bildet die E3 Ligase beim Abbau der FB Pase über das Ubiquitin-Proteasom-System (Schüle *et al.*, 2000; Regelman *et al.*, 2003; Santt *et al.*, 2008). Er ist unter gluconeogenetischen Bedingungen aus den Untereinheiten Gid1/Vid30, Gid2, Gid5/Vid28, Gid7, Gid8 und Gid9 aufgebaut. Nach Glucosezugabe wird Gid4/Vid24 exprimiert, wird Teil des Komplexes und aktiviert ihn. Dadurch wird FB Pase polyubiquitiniert und dann abgebaut.

In den Studien zum Gid-Komplex wurde zunächst die Stabilität des Komplexes unter gluconeogenetischen Bedingungen untersucht. Hierzu wurden Glycerindichtegradientenzentrifugations-Experimente in den Stämmen *gid7Δ* und *gid3Δ* durchgeführt (Abb. 6). Gid7 enthält sechs WD40-Domänen, die zu den Protein-Protein-Interaktionsdomänen gehören. Deshalb wurde vermutet, dass Gid7 den Gid-Komplex zusammenhält. Gid3/Ubc8 ist das E2 und sollte keinen Einfluss auf die Komplexstabilität haben. Es zeigte sich, dass die Deletion von *GID7* oder *GID3* unter gluconeogenetischen Bedingungen keinen Einfluss auf die Stabilität des Komplexes hat. Gid7 muss eine andere Rolle im Gid-Komplex spielen.

Eine direkte Beteiligung des Gid-Komplexes am Abbau der FB Pase konnte mit Co-Immunopräzipitationsexperimenten gezeigt werden. FB Pase interagiert unter gluconeogenetischen Bedingungen sowie nach Überführen in glucosehaltiges Medium mit Gid1-HA<sub>3</sub>, das Teil des Gid-Komplexes ist (Abb. 9; Santt *et al.*, 2008). Anschließend wurde untersucht, welche Untereinheit des Komplexes direkt mit FB Pase interagiert. Hier war nun Gid7 mit seinen WD40-Domänen wiederum der wahrscheinlichste Kandidat. Im SCF-Komplex (SCF: engl. „Skp1-Cullin-E-Box“) einer anderen E3 Ligase, werden die Substrate von den F-Box-Proteinen rekrutiert, die WD40-Domänen enthalten (Patton *et al.*, 1998). Zunächst wurden Katabolitinaktivierungsexperimente in *GID7* und *GID8* Deletionsstämmen durchgeführt. Der Abbau der FB Pase in den Stämmen *GID1-HA<sub>3</sub> gid7Δ* und *GID1-HA<sub>3</sub> gid8Δ* erfolgte wie erwartet deutlich langsamer als im Kontrollstamm (Abb. 10). Zusätzlich wird Gid1-HA<sub>3</sub> im Stamm *gid8Δ* schwächer exprimiert als im Kontrollstamm, die Expression von Gid1-HA<sub>3</sub> ist offensichtlich von Gid8 abhängig. Die Deletion von *GID7* hat keinen Einfluss auf die Expression von Gid1-HA<sub>3</sub>. In diesen Stämmen wurden Co-Immunopräzipitationsexperimente mit FB Pase-Antikörpern durchgeführt. Als Substrat wurde FB Pase (Abb. 11A) sowie FB Pase-TAP (Abb. 11B) verwendet. Es zeigte sich, dass die Interaktion von FB Pase und FB Pase-TAP zu Gid1-HA<sub>3</sub> trotz der Deletion von *GID7* oder *GID8* unter gluconeogenetischen Bedingungen wie auch nach Glucosegabe bestehen bleibt. Somit sind Gid7 mit seinen WD40-Domänen und auch Gid8 nicht essentiell für die Rekrutierung des Substrates FB Pase an den Gid-Komplex. Martin Lehmann konnte in seiner Diplomarbeit zeigen, dass auch die

Deletionen der Untereinheiten Gid1 und Gid5 die Interaktion der FBPase zum Komplex nicht verhindern. Dies bedeutet, entweder interagiert FBPase mit mehreren Gid-Proteinen des Komplexes, über ein noch unbekanntes Protein welches Teil des Gid-Komplexes ist oder über ein „Linkerprotein“ das FBPase mit dem Gid-Komplex verknüpft.

Ein eindeutiger Nachweis der direkten Interaktionspartner von FBPase könnte mit einer *in vitro*-Interaktionsstudie, wie in Kobayashi *et al.* (2007) publiziert erfolgen. Eine Chromatographiesäule mit gebundener bakteriell-exprimierter FBPase könnte mit verschiedenen *in vitro* translatierten, radioaktiv-markierten Gid-Proteinen inkubiert werden. Nach mehreren Waschschritten könnten die an FBPase-gebundenen Proteine mit Imidazol eluiert werden. Die Auswertung würde mittels SDS-PAGE und Autoradiographie erfolgen.

## **6.4 Die Funktion des Hsp70 Chaperons Ssa1 beim Abbau der FBPase**

Um den Abbau der FBPase über das Ubiquitin-Proteasom-System noch besser zu verstehen, wurden weitere Interaktionspartner von FBPase gesucht. Hierzu wurden Proteinreinigung mit funktionellem FBPase-TAP als Substrat unter verschiedenen Wachstumsbedingungen durchgeführt. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel silbergefärbt und mehrere distinkte Banden zu Dr. A. Sickmann (Rudolf-Virchow-Zentrum, Würzburg) gesendet, der dann die Bestimmung der Proteine mittels massenspektrometrischer Analyse vornahm. Überraschenderweise wurde das Hsp70 Chaperon Ssa1 als Interaktionspartner von FBPase unter gluconeogenetischen Bedingungen sowie nach „Shift“ der Zellen in glucosehaltiges Medium identifiziert (Abb. 13B). Einige höhermolekulare, schwächere Proteinbanden wurden als FBPase bestimmt. Dies ist vermutlich polyubiquitinierte FBPase, denn parallel zur Proteinsynthese findet auch immer der Abbau eines geringen Proteinanteils statt. Aber es konnten keine Proteine des Gid-Komplexes und auch keine anderen Proteine identifiziert werden. Es stellte sich nun die Frage warum „nur“ Ssa1 als Interaktionspartner von FBPase und kein Gid-Protein gefunden wurde und welche Rolle Ssa1 innehat. Dies könnte an den experimentellen Bedingungen liegen.

Ssa1 könnte verschiedene Aufgaben übernehmen. (A) Es wurde gezeigt, dass FBPase als Tetramer vorliegt (Rittenhouse *et al.*, 1984). Nach der Proteinsynthese der einzelnen Einheiten wird das Tetramer gebildet; Ssa1 könnte dafür benötigt werden die FBPase löslich

zu halten und die Aggregation zu verhindern. (B) Ssa1 könnte auch direkt an der Polyubiquitinierung bzw. am Abbau von FBPase beteiligt sein, denn Hsp70 Chaperone sind in Säugerzellen auch an der Rekrutierung von Ligasen beteiligt (Arndt *et al.*, 2005). (C) Weiterhin könnte Ssa1 auch die Interaktion von polyubiquitinerter FBPase zum Proteasom vermitteln. Ssa1 interagiert beispielsweise mit Rpn10, einer Untereinheit des 19S-Partikels des Proteasoms (Seong *et al.*, 2007). Oder Ssa1 ist beim Auseinanderbrechen der fest gefalteten, polyubiquitinierten Substrate bzw. der einzelnen Untereinheiten des FBPase-Tetramers vor dem Abbau über das Proteasom beteiligt (Thrower *et al.*, 2000; Verma *et al.*, 2000).

Zunächst wurde untersucht, ob Ssa1 am katabolitinduzierten Abbau der FBPase beteiligt ist. Katabolitinaktivierungsexperimente in einem *ssa1Δ/ssa1Δ* Stamm sowie dem Doppeldeletionsstamm *ssa1Δ ssa2Δ* zeigten, dass FBPase trotz des Fehlens dieser Chaperone noch abgebaut wird (Abb. 14). Die in den Zellen vorkommenden Proteine Ssa1-4 sind sehr ähnlich und haben überlappende Funktionen (Satyanarayana *et al.*, 2000). Daher wurde in weiteren Versuchen ein *ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ* Deletionsstamm verwendet, der entweder ein *SSA1* Wildtypgen oder ein temperatursensitives (ts), punktmutiertes *ssa1-45<sup>ts</sup>* Allel enthält. Erst mittels Katabolitinaktivierungsexperimenten und Pulse-Chase Analysen in den dreifach Deletionsstämmen konnte eine Beteiligung von Ssa1 am FBPase-Abbau gezeigt werden (Abb. 15). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Ssa1 auch für die Polyubiquitinierung von FBPase essentiell ist (Abb. 16A). Bei einem Polyubiquitinierungsexperiment bei der restriktiven Temperatur 37 °C, wenn die Fehlfaltung von Ssa1-45 induziert ist bzw. das Protein inaktiv ist, findet nach Glucosezugabe keine Polyubiquitinierung von FBPase-TAP mehr statt. Somit hat Ssa1 eine zentrale Rolle beim Abbau der FBPase über das Ubiquitin-Proteasom-System. Dieses Ergebnis war sehr überraschend, da bislang noch nie eine Beteiligung von Chaperonen am Abbau metabolischer Enzyme gezeigt wurde. Ssa1 und der Gid-Komplex als Ligase sind wahrscheinlich gemeinsam involviert, denn FBPase interagiert mit beiden Komponenten bereits unter gluconeogenetischen Bedingungen wie auch nach Glucosegabe und beide Teile sind für die Polyubiquitinierung essentiell.

Hsp70 Chaperone sind oft daran beteiligt, die Aggregation von cytosolischen Proteinen zu verhindern oder gar rückgängig zu machen (Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Park *et al.*, 2007). Würde FBPase bzw. das FBPase-Tetramer im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* aggregieren, dann würde dies die Polyubiquitinierung und den Abbau verhindern. Deswegen wurde die Löslichkeit von FBPase unter permissiven (25 °C) und restriktiven (37°C) Bedingungen untersucht. Bei diesem Zellfraktionierungsexperiment konnte keine Aggregation von FBPase nachgewiesen werden (Abb. 17). Ssa1 muss also eine andere Rolle beim FBPase-Abbau spielen.

Es sollte nun die Frage beantwortet werden, wie sich die Interaktion von FBPase mit Ssa1

unter permissiven und restriktiven Bedingungen verhält und ob fehlgefaltetes Ssa1 überhaupt noch an FB Pase gebunden ist. Es zeigte sich, dass die Interaktion von FB Pase-TAP zu Ssa1 und auch zu fehlgefaltetem bzw. inaktivem Ssa1-45 zu jedem Zeitpunkt besteht (Abb. 18). Der Grund für die fehlende Ubiquitinierung von FB Pase im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* nach Glucosezugabe musste also eine andere Ursache haben.

Bislang konnte der Interaktionspartner von FB Pase im Gid-Komplex, der E3 Ligase, nicht bestimmt werden. Vielleicht ist Ssa1 für die Bindung des Komplexes an FB Pase nötig. Hierzu wurden Co-Immunopräzipitationsexperimente zwischen FB Pase-TAP und den HA<sub>3</sub>-Epitop markierten Proteinen Gid1 und Gid6 im Stammhintergrund *SSA1* und *ssa1-45<sup>ts</sup>* durchgeführt. Wie erwartet wurde gezeigt, dass im Kontrollstamm *SSA1* FB Pase-TAP unter gluconeogenetischen Bedingungen (0 min) und 20 min nach dem „Shift“ der Zellen in glucosehaltiges Medium immer mit Gid1-HA<sub>3</sub> interagiert (Abb. 20). Im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* *GID1-HA<sub>3</sub>* pFBPase-TAP hingegen ist die Interaktion von FB Pase-TAP mit Gid1-HA<sub>3</sub> nach Glucosezugabe (20 min) unter den restriktiven Bedingungen von 37 °C nicht mehr vorhanden. Ssa1 verknüpft vermutlich FB Pase mit dem Gid-Komplex. Nach Glucosezugabe findet offenbar eine Veränderung am Gid-Komplex statt, die zur Aktivierung führt und in der Polyubiquitinierung von FB Pase resultiert. Dies ist im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* unter restriktiven Bedingungen nicht mehr möglich, denn nach Glucosezugabe wird der E3-Komplex von FB Pase-Ssa1 abgelöst. Da die Interaktion erst nach Glucosezugabe verloren geht, ist es sehr wahrscheinlich, dass Gid4/Vid24 oder ein noch unbekannter Faktor an diesem Prozess beteiligt sind. Allgemein führt die Induktion der Katabolitinaktivierung durch Überführen der Zellen in glucosehaltiges Medium zur Expression von Gid4/Vid24, das dann Teil des Gid-Komplexes wird, den Komplex aktiviert und den Abbau der FB Pase initiiert. Die Rolle von Gid4/Vid24 an diesem Prozess selbst ist noch unklar (Santt *et al.*, 2008; O. Santt, 2009). Gid4/Vid24 als Teil des E3-Komplexes könnte eine für die Polyubiquitinierung benötigte Konformationsänderung hervorrufen oder einen noch unbekannt Inhibitor deaktivieren oder entfernen. Bislang ist unklar, ob Gid4/Vid24 im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* überhaupt noch exprimiert wird. Eine fehlende Expression und die damit unterbundene Aktivierung des Gid-Komplexes könnte die Polyubiquitinierung verhindern. Eine weitere Option wäre, dass im Stamm *ssa1-45<sup>ts</sup>* Gid4/Vid24 zwar exprimiert wird, aber vielleicht aus sterischen Gründen gar nicht mehr an den Gid-Komplex binden und seine Funktion ausüben kann. Würde man myc-Gid4/Vid24 unter gluconeogenetischen Bedingungen im Stamm *SSA1* und *ssa1-45<sup>ts</sup>* künstlich exprimieren, dann könnten erste weitere mechanistische Hinweise erhalten werden.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob Ssa1 Teil des Gid-Komplexes ist. Der Gid-Komplex existiert unter glykolytischen wie auch gluconeogenetischen Wachstums-

bedingungen (Regelmann *et al.*, 2003; Krogan *et al.*, 2006; Pitre *et al.*, 2006; Santt *et al.*, 2008). Mit Gid1-TAP als Substrat konnte die Interaktion des Komplexes mit Ssa-Proteinen unter gluconeogenetischen Bedingungen wie auch wahrscheinlich nach Glucosegabe nachgewiesen werden (Abb. 21). Aufgrund des Wildtyp-Stammhintergrundes konnte hierbei nicht zwischen den vier Ssa-Proteinen unterschieden werden. Daher wurde der Versuch in den Stämmen *SSA1 ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ* und *ssa1-45<sup>ts</sup> ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ* wiederholt. Hier zeigte sich, dass die Expression von Gid1-TAP im Dreifachdeletionsstamm zu gering ist, um aussagekräftige Proteinreinigungen durchzuführen. Aufgrund der bisher gewonnenen Daten, ist aber anzunehmen dass Ssa1 Teil des Gid-Komplexes ist. Eine eindeutige Aussage, ob Ssa1 Teil des Komplexes ist könnte mit Proteinreinigungen von Gid-Proteinen gewonnen werden. Diese Proteinreinigungen sollten mit einem funktionellen TAP-fusionierten Protein des Gid-Komplexes unter glykolytischen und gluconeogenetischen Bedingungen sowie nach Glucosegabe durchgeführt werden mit nachfolgender Identifikation der distinkten Banden des silbergefärbten SDS-Gels durch massenspektrometrische Analysen. Hierbei kann dann auch zwischen den Proteinen Ssa1-4 unterschieden werden.

Die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) ist ein weiteres Schlüsselenzym der Gluconeogenese (siehe Abb. 2). Sie wird ebenso wie FBPase unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen exprimiert. Nach Überführen in glucosehaltiges Medium wird das Enzym inaktiviert und dann abgebaut (Holzer, 1976; Muller *et al.* 1981; von Herrath and Holzer, 1988; Mercado and Gancedo, 1992). In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass der Gid-Komplex essentiell für den PEPCK-Abbau ist, denn in den Deletionsstämmen *gid2Δ* und *gid3Δ/ubc8Δ* wird PEPCK nicht mehr abgebaut (Santt *et al.*, 2008). Hier konnte nun in einem Katabolitinaktivierungsexperiment gezeigt werden, dass Ssa1 auch am Abbau der PEPCK beteiligt ist (Abb. 22). Dies spricht dafür, dass Ssa1 Teil des Gid-Komplexes unter gluconeogenetischen Bedingungen wie auch kurzzeitig nach "Shift" in glucosehaltiges Medium ist. Es wurde postuliert, dass die Stoffwechsellzyme FBPase, MDH2 (cytosolische Malatdehydrogenase) und PEPCK gemeinsam abgebaut werden, um eine optimale Geschwindigkeit der Gluconeogenese zu erreichen (Hämmerle *et al.*, 1998; Miles *et al.*, 1999; Gibson and McAlister-Henn, 2003). Eventuell bildet der Gid-Komplex mit Ssa1 unter gluconeogenetischen Bedingungen eine „Plattform“ (engl. „scaffold“) für diese metabolischen Enzyme, um dann nach Glucosezugabe eine schnelle Inaktivierung und Polyubiquitinierung der Substrate zu gewährleisten. Hierzu wäre es interessant zu zeigen, ob der Gid-Komplex und Ssa1 auch direkt an der Polyubiquitinierung von PEPCK und MDH2 beteiligt sind.

Die ATPase-Funktion von Hsp70 Chaperonen wird durch Co-Faktoren katalysiert. Hsp40 Chaperone rekrutieren beispielsweise Substrate für die Hsp70-Maschinerie oder

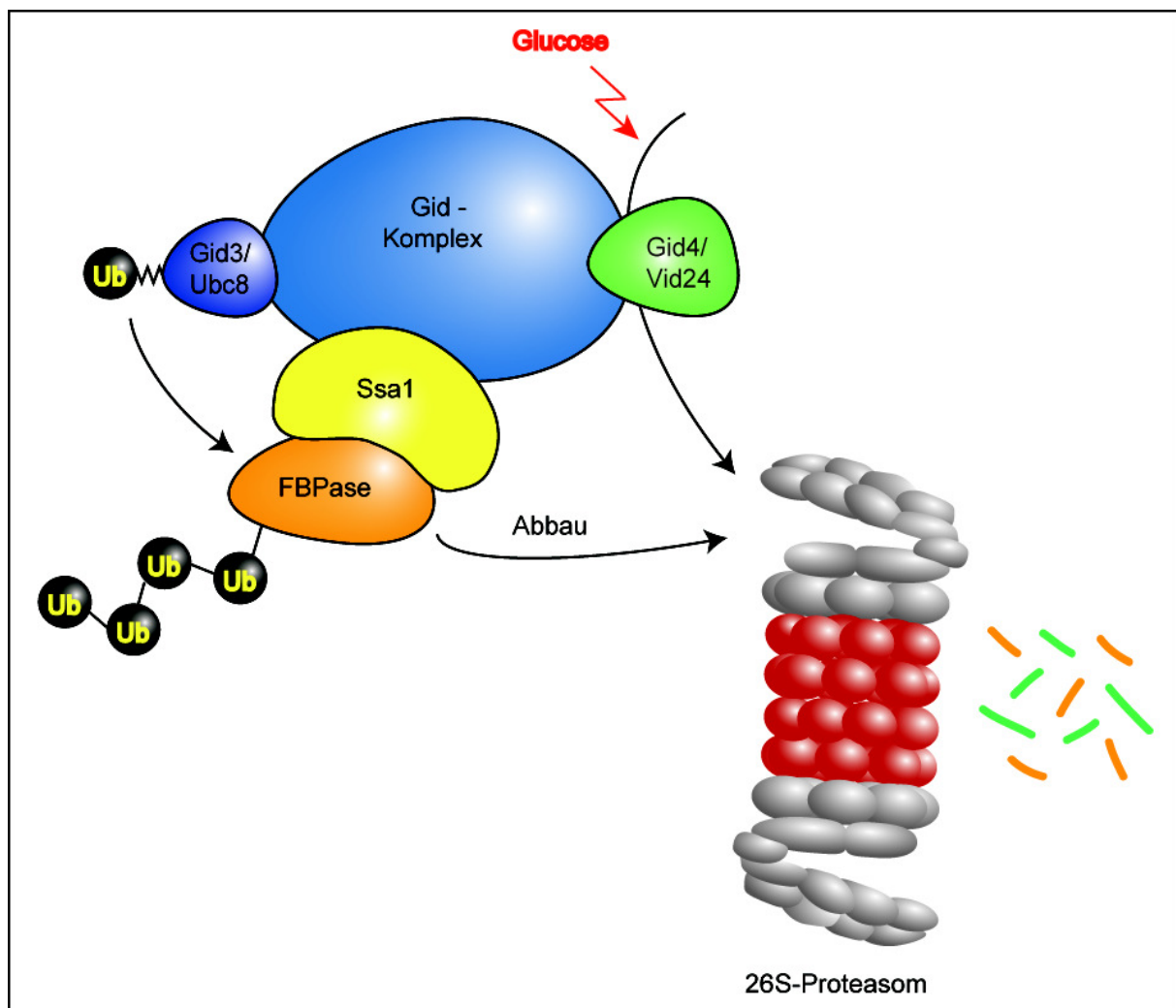
unterstützen die benötigte ATP-Hydrolyse bei Faltungsprozessen. NEFs (engl. „nucleotide exchange factor“) katalysieren die Substratloslösung von Hsp70. Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Beteiligung des Proteins Snl1 am katabolitinduzierten Abbau der FBPase gezeigt werden (Abb. 24). Die Beteiligung der Hsp90-Maschinerie, des HOP-homologen Proteins Sti1, das die Hsp70- mit der Hsp90-Maschinerie verknüpft, Hsp104, das an der Resolubilisierung und Refaltung aggregierter Proteine beteiligt ist sowie der NEFs Fes1, Sse1 und Sse2 konnte ausgeschlossen werden (Abb. 23; Übersicht siehe Tab. 1).

Das Protein Snl1 ist ein kleines Protein (18 kDa) und hat eine noch unbekannte Funktion. Es wurde vorgeschlagen, dass Snl1 an der Biogenese des Kern-Poren-Komplexes sowie an der Proteinfaltung beteiligt ist (Ho *et al.*, 1998; Sondermann *et al.*, 2002). Es enthält eine BAG-Domäne (BAG: engl. „Bcl-2-associated athanogene“) und wirkt als NEF (Sondermann *et al.*, 2002). Viele BAG-Proteine haben zusätzlich eine UBL-Domäne (UBL: engl. „ubiquitin-like domain“), die direkt mit dem Proteasom interagiert. Diese Proteine dienen als Bindeglied zwischen dem Chaperon Hsp70 und dem Proteasom (McClellan *et al.*, 2005; Mayer and Bukau, 2005). Bislang ist allerdings noch keine weitere Domäne in Snl1 bekannt. Ebenso könnte die Deletion von *SNL1* einen indirekten Einfluss auf den Abbau von FBPase haben. Eine direkte Beteiligung des Proteins an diesem Abbauprozess könnte z.B. mit Interaktionsstudien gezeigt werden.

Es ist erstaunlich, dass kein Hsp40 Co-Chaperon gefunden wurde, das am FBPase-Abbau beteiligt ist. Hierfür könnte es mehrere Gründe geben. In meinen Studien wurden zunächst nur direkt mit Ssa1-interagierende Faktoren überprüft, so dass andere beteiligte Chaperone eventuell nicht berücksichtigt wurden. Weiterhin könnten auch noch im Zusammenhang mit Ssa1 unbekannte Faktoren am katabolitinduzierten Abbau der FBPase beteiligt sein. Oder die Domänen von verschiedenen Co-Faktoren könnten sich nicht-kovalent zusammen lagern, um gemeinsam eine Funktion zu erfüllen. Um dies für Cns1 und Ydj1 zu untersuchen, könnten Katabolitaktivierungsexperimente in einer Hsp40-Doppelmutante *cns1-1<sup>ts</sup> ydj1-151<sup>ts</sup>* durchgeführt werden. Weiterhin ist bekannt, dass in der Mutante *cns1-1<sup>ts</sup>* die Funktion in Bezug auf die Interaktion zu Hsp90 gestört ist (Tescic *et al.*, 2003). Die Hsp90-Funktion wird beim Abbau der FBPase aber gar nicht benötigt. Hier wäre es sinnvoll andere Punktmutanten von *CNS1* in die Studien mit einzubeziehen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass für die Funktion von Ssa1 beim Abbau der FBPase die ATPase-Funktion mit den involvierten Co-Chaperonen gar nicht benötigt wird. Damit wäre eine ganz neue Funktion von Ssa1 in dieser Studie offengelegt worden.



Zusammenfassend ergibt sich folgendes Modell für den Mechanismus der Katabolitdegradation der Fructose-1,6-bisphosphatase (Abb. 41): Unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen wird FBPase exprimiert und interagiert bereits mit Ssa1 und dem inaktiven Gid-Komplex. Vermutlich interagiert FBPase über Ssa1 mit dem Komplex. Hierbei wird laufend ein geringer Teil der FBPase der Abbau-Maschinerie zugeführt. Nach Überführen der Zellen in glucosehaltiges Medium wird FBPase zunächst teilweise durch Inhibition und Phosphorylierung inaktiviert. Es wird Gid4/Vid24 exprimiert, das Protein wird Teil des Gid-Komplexes und aktiviert den Komplex. Daraufhin folgt dann die Polyubiquitinierung der FBPase durch die Enzymkaskade E1 (Uba1), E2 (Gid3/Ubc8) und E3 (aktiver Gid-Komplex). Polyubiquitinierte FBPase wie auch Gid4/Vid24 werden dann vom 26S-Proteasom abgebaut.



**Abbildung 41: Mechanismus der Katabolitdegradation der Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase).** Details siehe Text.

## 7 . Literaturverzeichnis

Amerik, A., Swaminathan, S., Krantz, B.A., Wilkinson, K.D., and Hochstrasser, M. (1997). *in vivo* disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *Embo J* 16, 4826-4838.

Amerik, A.Y., and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695, 189-207.

Andrews, A.T. (1986). Electrophoresis : theory, techniques, and biochemical and clinical applications. Clarendon Press ; Oxford University Press: Oxford, New York.

Arndt, V., Daniel, C., Nastainczyk, W., Alberti, S., and Hohfeld, J. (2005). BAG-2 acts as an inhibitor of the chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP. *Mol Biol Cell* 16, 5891-5900.

Arndt, V., Rogon, C., and Hohfeld, J. (2007). To be, or not to be--molecular chaperones in protein degradation. *Cell Mol Life Sci* 64, 2525-2541.

Ausubel, F.M., Kingston, R.E., Seidman, F.G., Struhl, K., Moore, D.D., Brent, R., and Smith, F.A. (1992). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene: New York.

Bachmair, A., Finley, D., and Varshavsky, A. (1986). *in vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234, 179-186.

Bajorek, M., and Glickman, M.H. (2004). Keepers at the final gates: regulatory complexes and gating of the proteasome channel. *Cell Mol Life Sci* 61, 1579-1588.

Becker, J., Walter, W., Yan, W., and Craig, E.A. (1996). Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation *in vivo*. *Mol Cell Biol* 16, 4378-4386.

Bee, G. (1995). Die Katabolitinaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*: Studien zu ihrem Mechanismus. Dissertation, Universität Stuttgart.

Belinchon, M.M., and Gancedo, J.M. (2007). Glucose controls multiple processes in *Saccharomyces cerevisiae* through diverse combinations of signaling pathways. *FEMS Yeast Res* 7, 808-818.

Berra, E., Ginouves, A., and Pouyssegur, J. (2006). The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling. *EMBO Rep* 7, 41-45.

Betts, S., Speed, M., and King, J. (1999). Detection of early aggregation intermediates by native gel electrophoresis and native western blotting. *Methods Enzymol* 309, 333-350.

Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294, 1351-1362.

Brown, C.R., McCann, J.A., and Chiang, H.L. (2000). The heat shock protein Ssa2p is required for import of fructose-1, 6- bisphosphatase into Vid vesicles. *J Cell Biol* 150, 65-76.

Caplan, A.J., Mandal, A.K., and Theodoraki, M.A. (2007). Molecular chaperones and protein kinase quality control. *Trends Cell Biol* 17, 87-92.

- Chang, H.C., Tang, Y.C., Hayer-Hartl, M., and Hartl, F.U. (2007). SnapShot: molecular chaperones, Part I. *Cell* 128, 212.
- Chau, V., Tobias, J.W., Bachmair, A., Marriott, D., Ecker, D.J., Gonda, D.K., and Varshavsky, A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science* 243, 1576-1583.
- Chvapil, M., and Hurych, J. (1959). Hydroxylation of proline in vitro. *Nature* 184(Suppl 15), 1145.
- Crosas, B., Hanna, J., Kirkpatrick, D.S., Zhang, D.P., Tone, Y., Hathaway, N.A., Buecker, C., Leggett, D.S., Schmidt, M., King, R.W., Gygi, S.P., and Finley, D. (2006). Ubiquitin chains are remodeled at the proteasome by opposing ubiquitin ligase and deubiquitinating activities. *Cell* 127, 1401-1413.
- Egner, R., Thumm, M., Straub, M., Simeon, A., Schüller, H.J., and Wolf, D.H. (1993). Tracing intracellular proteolytic pathways. Proteolysis of fatty acid synthase and other cytoplasmic proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268, 27269-27276.
- Eisele, F., Braun, B., Pfirrmann, T., and Wolf, D.H. (2006). Mutants of the deubiquitinating enzyme Ubp14 decipher pathway diversity of ubiquitin-proteasome linked protein degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 350, 329-333.
- Elsasser, S., Chandler-Militello, D., Muller, B., Hanna, J., and Finley, D. (2004). Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *J Biol Chem* 279, 26817-26822.
- Elsasser, S., Gali, R.R., Schwickart, M., Larsen, C.N., Leggett, D.S., Muller, B., Feng, M.T., Tubing, F., Dittmar, G.A., and Finley, D. (2002). Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol* 4, 725-730.
- Emerling, B.M., and Chandel, N.S. (2005). Oxygen sensing: getting pumped by sterols. *Sci STKE* 2005, pe30.
- Enenkel, C., Lehmann, A., and Kloetzel, P.M. (1998). Subcellular distribution of proteasomes implicates a major location of protein degradation in the nuclear envelope-ER network in yeast. *Embo J* 17, 6144-6154.
- Enenkel, C., Lehmann, A., and Kloetzel, P.M. (1999). GFP-labelling of 26S proteasomes in living yeast: insight into proteasomal functions at the nuclear envelope/rough ER. *Mol Biol Rep* 26, 131-135.
- Esser, C., Alberti, S., and Hohfeld, J. (2004). Cooperation of molecular chaperones with the ubiquitin/proteasome system. *Biochim Biophys Acta* 1695, 171-188.
- Ferguson, J.J., Jr., Boll, M., and Holzer, H. (1967). Yeast malate dehydrogenase: enzyme inactivation in catabolite repression. *Eur J Biochem* 1, 21-25.
- Finley, D., and Chau, V. (1991). Ubiquitination. *Annu Rev Cell Biol* 7, 25-69.
- Funayama, S., Gancedo, J.M., and Gancedo, C. (1980). Turnover of yeast fructose-bisphosphatase in different metabolic conditions. *Eur J Biochem* 109, 61-66.

- Gamo, F.J., Navas, M.A., Blazquez, M.A., Gancedo, C., and Gancedo, J.M. (1994). Catabolite inactivation of heterologous fructose-1,6-bisphosphatases and fructose-1,6-bisphosphatase-beta-galactosidase fusion proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* 222, 879-884.
- Gancedo, C. (1971). Inactivation of fructose-1,6-diphosphatase by glucose in yeast. *J Bacteriol* 107, 401-405.
- Gancedo, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 334-361.
- Gibson, N., and McAlister-Henn, L. (2003). Physical and genetic interactions of cytosolic malate dehydrogenase with other gluconeogenic enzymes. *J Biol Chem* 278, 25628-25636.
- Glickman, M.H., and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V.A., and Finley, D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* 94, 615-623.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Larsen, C.N., Schmidt, M., and Finley, D. (2000). The regulatory particle of the yeast proteasome. In: *Proteasomes: The World of Regulatory Proteolysis*, eds. W. Hilt and D.H. Wolf: Landes Bioscience, Georgetown/Eurekah.com, Austin, USA, 71-90.
- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132-138.
- Groll, M., Bajorek, M., Kohler, A., Moroder, L., Rubin, D.M., Huber, R., Glickman, M.H., and Finley, D. (2000). A gated channel into the proteasome core particle. *Nat Struct Biol* 7, 1062-1067.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., and Huber, R. (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386, 463-471.
- Güldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinbauer, J., and Hegemann, J.H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24, 2519-2524.
- Guterman, A., and Glickman, M.H. (2004). Complementary roles for Rpn11 and Ubp6 in deubiquitination and proteolysis by the proteasome. *J Biol Chem* 279, 1729-1738.
- Guthrie, C., and Fink, G.R. (1991). *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*: San Diego.
- Hämmerle, M., Bauer, J., Rose, M., Szallies, A., Thumm, M., Dusterhus, S., Mecke, D., Entian, K.D., and Wolf, D.H. (1998). Proteins of newly isolated mutants and the amino-terminal proline are essential for ubiquitin-proteasome-catalyzed catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 25000-25005.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.

- Hanna, J., and Finley, D. (2007). A proteasome for all occasions. *FEBS Lett* *581*, 2854-2861.
- Harney, D.F., Butler, R.K., and Edwards, R.J. (2005). Tyrosine phosphorylation of myosin heavy chain during skeletal muscle differentiation: an integrated bioinformatics approach. *Theor Biol Med Model* *2*, 12.
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* *295*, 1852-1858.
- Heinemeyer, W., Fischer, M., Krimmer, T., Stachon, U., and Wolf, D.H. (1997). The active sites of the eukaryotic 20 S proteasome and their involvement in subunit precursor processing. *J Biol Chem* *272*, 25200-25209.
- Heinemeyer, W., Kleinschmidt, J.A., Saidowsky, J., Escher, C., and Wolf, D.H. (1991). Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity for cell survival. *Embo J* *10*, 555-562.
- Heinemeyer, W., Ramos, P.C., and Dohmen, R.J. (2004). The ultimate nanoscale mincer: assembly, structure and active sites of the 20S proteasome core. *Cell Mol Life Sci* *61*, 1562-1578.
- Hershko, A. (2005). The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell-division cycle (Nobel lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* *44*, 5932-5943.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* *67*, 425-479.
- Higgins, D.G., and Sharp, P.M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* *73*, 237-244.
- Hilt, W., and Wolf, D.H. (1996). Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem Sci* *21*, 96-102.
- Ho, A.K., Raczniak, G.A., Ives, E.B., and Wentz, S.R. (1998). The integral membrane protein snl1p is genetically linked to yeast nuclear pore complex function. *Mol Biol Cell* *9*, 355-373.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A.R., Sassi, H., Nielsen, P.A., Rasmussen, K.J., Andersen, J.R., Johansen, L.E., Hansen, L.H., Jespersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B.D., Matthiesen, J., Hendrickson, R.C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M.F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C.W., Figgeys, D., and Tyers, M. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* *415*, 180-183.
- Holzer, H. (1976). Catabolite inactivation in yeast. *Trends Biochem.Sci.* *1*, 178-181.
- Holzer, H. (1989). Proteolytic catabolite inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Revis Biol Celular* *21*, 305-319.
- Holzer, H., and Purwin, C. (1986). How does glucose initiate proteolysis of yeast fructose-1,6-bisphosphatase? *Biomed Biochim Acta* *45*, 1657-1663.

- Horak, J., Regelmann, J., and Wolf, D.H. (2002). Two distinct proteolytic systems responsible for glucose-induced degradation of fructose-1,6-bisphosphatase and the Gal2p transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* share the same protein components of the glucose signaling pathway. *J Biol Chem* 277, 8248-8254.
- Hoyt, M.A., and Coffino, P. (2004). Ubiquitin-free routes into the proteasome. *Cell Mol Life Sci* 61, 1596-1600.
- Hughes, B.T., and Espenshade, P.J. (2008). Oxygen-regulated degradation of fission yeast SREBP by Ofd1, a prolyl hydroxylase family member. *Embo J* 27, 1491-1501.
- Hung, G.C., Brown, C.R., Wolfe, A.B., Liu, J., and Chiang, H.L. (2004). Degradation of the gluconeogenic enzymes fructose-1,6-bisphosphatase and malate dehydrogenase is mediated by distinct proteolytic pathways and signaling events. *J Biol Chem* 279, 49138-49150.
- Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K.J., Finley, D., and Dikic, I. (2008). Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature* 453, 481-488.
- Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., and Reimann, J.D. (2000). The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* 10, 429-439.
- Joazeiro, C.A., and Weissman, A.M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549-552.
- Kaelin, W.G. (2005). Proline hydroxylation and gene expression. *Annu Rev Biochem* 74, 115-128.
- Kaelin, W.G., Jr. (2002). How oxygen makes its presence felt. *Genes Dev* 16, 1441-1445.
- Kisselev, A.F., Callard, A., and Goldberg, A.L. (2006). Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem* 281, 8582-8590.
- Klionsky, D.J. (1997). Protein transport from the cytoplasm into the vacuole. *J Membr Biol* 157, 105-115.
- Klionsky, D.J., Cueva, R., and Yaver, D.S. (1992). Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J. Cell Biol.* 119, 287-299.
- Klionsky, D.J., Herman, P.K., and Emr, S.D. (1990). The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 54, 266-292.
- Knop, M., Finger, A., Braun, T., Hellmuth, K., and Wolf, D.H. (1996). Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *Embo J* 15, 753-763.
- Kobayashi, N., Yang, J., Ueda, A., Suzuki, T., Tomaru, K., Takeno, M., Okuda, K., and Ishigatsubo, Y. (2007). RanBPM, Muskelin, p48EMLP, p44CTLH, and the armadillo-repeat proteins ARMC8alpha and ARMC8beta are components of the CTLH complex. *Gene* 396, 236-247.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U., and Jentsch, S. (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96, 635-644.

- Kohler, A., Cascio, P., Leggett, D.S., Woo, K.M., Goldberg, A.L., and Finley, D. (2001). The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell* 7, 1143-1152.
- Kohlmann, S., Schafer, A., and Wolf, D.H. (2008). Ubiquitin ligase Hul5 is required for fragment-specific substrate degradation in endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* 283, 16374-16383.
- Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., Punna, T., Peregrin-Alvarez, J.M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M., Robinson, M.D., Paccanaro, A., Bray, J.E., Sheung, A., Beattie, B., Richards, D.P., Canadien, V., Lalev, A., Mena, F., Wong, P., Starostine, A., Canete, M.M., Vlasblom, J., Wu, S., Orsi, C., Collins, S.R., Chandran, S., Haw, R., Rilstone, J.J., Gandi, K., Thompson, N.J., Musso, G., St Onge, P., Ghanny, S., Lam, M.H., Butland, G., Altaf-Ul, A.M., Kanaya, S., Shilatifard, A., O'Shea, E., Weissman, J.S., Ingles, C.J., Hughes, T.R., Parkinson, J., Gerstein, M., Wodak, S.J., Emili, A., and Greenblatt, J.F. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440, 637-643.
- Lam, Y.A., Lawson, T.G., Velayutham, M., Zweier, J.L., and Pickart, C.M. (2002). A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature* 416, 763-767.
- Lee, C.Y., Stewart, E.V., Hughes, B.T., and Espenshade, P.J. (2009). Oxygen-dependent binding of Nro1 to the prolyl hydroxylase Ofd1 regulates SREBP degradation in yeast. *Embo J* 28, 135-143.
- Lee, J.W., Bae, S.H., Jeong, J.W., Kim, S.H., and Kim, K.W. (2004). Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med* 36, 1-12.
- Levy, F., Johnston, J.A., and Varshavsky, A. (1999). Analysis of a conditional degradation signal in yeast and mammalian cells. *Eur J Biochem* 259, 244-252.
- Liu, Z., Spirek, M., Thornton, J., and Butow, R.A. (2005). A novel degron-mediated degradation of the RTG pathway regulator, Mks1p, by SCFGrr1. *Mol Biol Cell* 16, 4893-4904.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.
- Löwe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W., and Huber, R. (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution [see comments]. *Science* 268, 533-539.
- Marcus, F., Rittenhouse, J., Moberly, L., Edelstein, I., Hiller, E., and Rogers, D.T. (1988). Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) fructose-1,6-bisphosphatase. Properties of phospho and dephospho forms and of two mutants in which serine 11 has been changed by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 263, 6058-6062.
- Mayer, M.P., and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62, 670-684.
- Mazon, M.J., Gancedo, J.M., and Gancedo, C. (1982). Inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. *in vivo* phosphorylation of the enzyme. *J Biol Chem* 257, 1128-1130.

- McClellan, A.J., Tam, S., Kaganovich, D., and Frydman, J. (2005). Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat Cell Biol* 7, 736-741.
- McGrath, J.P., Jentsch, S., and Varshavsky, A. (1991). UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *Embo J* 10, 227-236.
- Miles, E.W., Rhee, S., and Davies, D.R. (1999). The molecular basis of substrate channeling. *J Biol Chem* 274, 12193-12196.
- Molano, J., and Gancedo, C. (1974). Specific inactivation of fructose 1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* by a yeast protease. *Eur J Biochem* 44, 213-217.
- Müller, D., and Holzer, H. (1981). Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast by phosphorylation/dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 103, 926-933.
- Nair, U., and Klionsky, D.J. (2005). Molecular mechanisms and regulation of specific and nonspecific autophagy pathways in yeast. *J Biol Chem* 280, 41785-41788.
- Nasmyth, K. (1993). Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr Opin Cell Biol* 5, 166-179.
- Nelson, R.J., Heschl, M.F., and Craig, E.A. (1992). Isolation and characterization of extragenic suppressors of mutations in the SSA hsp70 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 131, 277-285.
- Nishizawa, M., Furuno, N., Okazaki, K., Tanaka, H., Ogawa, Y., and Sagata, N. (1993). Degradation of Mos by the N-terminal proline (Pro2)-dependent ubiquitin pathway on fertilization of *Xenopus* eggs: possible significance of natural selection for Pro2 in Mos. *Embo J* 12, 4021-4027.
- Nishizawa, M., Okazaki, K., Furuno, N., Watanabe, N., and Sagata, N. (1992). The 'second-codon rule' and autophosphorylation govern the stability and activity of Mos during the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *Embo J* 11, 2433-2446.
- Obenauer, J.C., Cantley, L.C., and Yaffe, M.B. (2003). Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res* 31, 3635-3641.
- Ozer, A., and Bruick, R.K. (2007). Non-heme dioxygenases: cellular sensors and regulators jelly rolled into one? *Nat Chem Biol* 3, 144-153.
- Pal, B., Chan, N.C., Helfenbaum, L., Tan, K., Tansey, W.P., and Gething, M.J. (2007). SCFCdc4-mediated degradation of the Hac1p transcription factor regulates the unfolded protein response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 18, 426-440.
- Pan, Y., Mansfield, K.D., Bertozzi, C.C., Rudenko, V., Chan, D.A., Giaccia, A.J., and Simon, M.C. (2007). Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity *in vivo* and *in vitro*. *Mol Cell Biol* 27, 912-925.
- Park, S.H., Bolender, N., Eisele, F., Kostova, Z., Takeuchi, J., Coffino, P., and Wolf, D.H. (2007). The cytoplasmic Hsp70 chaperone machinery subjects misfolded and endoplasmic reticulum import-incompetent proteins to degradation via the ubiquitin-proteasome system. *Mol Biol Cell* 18, 153-165.



- Patton, E.E., Willems, A.R., Sa, D., Kuras, L., Thomas, D., Craig, K.L., and Tyers, M. (1998a). Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes Dev* 12, 692-705.
- Patton, E.E., Willems, A.R., and Tyers, M. (1998b). Combinatorial control in ubiquitin-dependent proteolysis: don't Skp the F-box hypothesis. *Trends Genet* 14, 236-243.
- Pfarrmann, T. (2006). Characterization of Novel Proteins involved in Catabolite Degradation of Fructose-1,6-bisphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Universität Stuttgart.
- Pickart, C.M. (2000). Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* 25, 544-548.
- Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503-533.
- Pickart, C.M., and Cohen, R.E. (2004). Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 177-187.
- Pitre, S., Dehne, F., Chan, A., Cheetham, J., Duong, A., Emili, A., Gebbia, M., Greenblatt, J., Jessulat, M., Krogan, N., Luo, X., and Golshani, A. (2006). PIPE: a protein-protein interaction prediction engine based on the re-occurring short polypeptide sequences between known interacting protein pairs. *BMC Bioinformatics* 7, 365.
- Pohlig, G., and Holzer, H. (1985). Phosphorylation and inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase by cyclic AMP-dependent protein kinase from yeast. *J Biol Chem* 260, 13818-13823.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Seraphin, B. (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24, 218-229.
- Purwin, C., Leidig, F., and Holzer, H. (1982). Cyclic AMP-dependent phosphorylation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 107, 1482-1489.
- Raasi, S., and Wolf, D.H. (2007). Ubiquitin receptors and ERAD: a network of pathways to the proteasome. *Semin Cell Dev Biol* 18, 780-791.
- Rakus, D., Zarzycki, M., and Dzugaj, A. (2003). Rabbit muscle fructose-1,6-bisphosphatase is phosphorylated *in vivo*. *Acta Biochim Pol* 50, 115-121.
- Ravid, T., and Hochstrasser, M. (2008). Diversity of degradation signals in the ubiquitin-proteasome system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 679-690.
- Rechsteiner, M., and Rogers, S.W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21, 267-271.
- Regelmann, J. (2005). Katabolitinaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase: Identifizierung und Charakterisierung neuer, für ihren Ubiquitin-Proteasom-katalysierten Abbau benötigter Enzyme. Dissertation, Universität Stuttgart.
- Regelmann, J., Schüle, T., Josupeit, F.S., Horak, J., Rose, M., Entian, K.D., Thumm, M., and Wolf, D.H. (2003). Catabolite Degradation of Fructose-1,6-bisphosphatase in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: A Genome-wide Screen Identifies Eight Novel GID Genes and Indicates the Existence of Two Degradation Pathways. *Mol Biol Cell* 14, 1652-1663.

- Richter-Ruoff, B., and Wolf, D.H. (1993). Proteasome and cell cycle. Evidence for a regulatory role of the protease on mitotic cyclins in yeast. *Febs Lett* 336, 34-36.
- Rittenhouse, J., Harrsch, P.B., and Marcus, F. (1984). A re-evaluation of the molecular weight of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 120, 467-473.
- Rittenhouse, J., Moberly, L., and Marcus, F. (1987). Phosphorylation *in vivo* of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) fructose-1,6-bisphosphatase at the cyclic AMP-dependent site. *J Biol Chem* 262, 10114-10119.
- Rittenhouse, J., Moberly, L., O'Donnell, M.E., Owen, N.E., and Marcus, F. (1986). Phosphorylation of atrial natriuretic peptides by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 261, 7607-7610.
- Rogers, D.T., Hiller, E., Mitsock, L., and Orr, E. (1988). Characterization of the gene for fructose-1,6-bisphosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. Sequence, protein homology, and expression during growth on glucose. *J Biol Chem* 263, 6051-6057.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-368.
- Rolland, F., Winderickx, J., and Thevelein, J.M. (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res* 2, 183-201.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y.
- Santt, O. (2009). Gid4p, the regulatory unit of a novel E3 ubiquitin ligase involved in carbohydrate metabolism E3 in yeast. Dissertation, Universität Stuttgart.
- Santt, O., Pfirrmann, T., Braun, B., Juretschke, J., Kimmig, P., Scheel, H., Hofmann, K., Thumm, M., and Wolf, D.H. (2008). The yeast GID complex, a novel ubiquitin ligase (E3) involved in the regulation of carbohydrate metabolism. *Mol Biol Cell* 19, 3323-3333.
- Satyanarayana, C., Schroder-Kohne, S., Craig, E.A., Schu, P.V., and Horst, M. (2000). Cytosolic Hsp70s are involved in the transport of aminopeptidase 1 from the cytoplasm into the vacuole. *FEBS Lett* 470, 232-238.
- Schmidt, M., Haas, W., Crosas, B., Santamaria, P.G., Gygi, S.P., Walz, T., and Finley, D. (2005a). The HEAT repeat protein Blm10 regulates the yeast proteasome by capping the core particle. *Nat Struct Mol Biol* 12, 294-303.
- Schmidt, M., Hanna, J., Elsasser, S., and Finley, D. (2005b). Proteasome-associated proteins: regulation of a proteolytic machine. *Biol Chem* 386, 725-737.
- Schork, S., Bee, G., Thumm, M., and Wolf, D.H. (1994a). Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast is mediated by the proteasome. *FEBS Lett.* 349, 270-274.
- Schork, S., Bee, G., Thumm, M., and Wolf, D.H. (1994b). Site of catabolite inactivation. *Nature* 369, 283-284.
- Schork, S.M., Thumm, M., and Wolf, D.H. (1995). Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Degradation occurs via the ubiquitin pathway. *J. Biol. Chem.* 270, 26446-26450.

- Schreiner, P., Chen, X., Husnjak, K., Randles, L., Zhang, N., Elsasser, S., Finley, D., Dikic, I., Walters, K.J., and Groll, M. (2008). Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction. *Nature* *453*, 548-552.
- Schüle, T., Rose, M., Entian, K.D., Thumm, M., and Wolf, D.H. (2000). Ubc8p functions in catabolite degradation of fructose-1, 6- biphosphatase in yeast. *Embo J* *19*, 2161-2167.
- Semenza, G.L. (2001). HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* *107*, 1-3.
- Seong, K.M., Baek, J.H., Ahn, B.Y., Yu, M.H., and Kim, J. (2007). Rpn10p is a receptor for ubiquitinated Gcn4p in proteasomal proteolysis. *Mol Cells* *24*, 194-199.
- Sheng, J., Kumagai, A., Dunphy, W.G., and Varshavsky, A. (2002). Dissection of c-MOS degnon. *Embo J* *21*, 6061-6071.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* *68*, 850-858.
- Shulga, N., Roberts, P., Gu, Z., Spitz, L., Tabb, M.M., Nomura, M., and Goldfarb, D.S. (1996). *in vivo* nuclear transport kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for heat shock protein 70 during targeting and translocation. *J Cell Biol* *135*, 329-339.
- Slater, M.R., and Craig, E.A. (1987). Transcriptional regulation of an hsp70 heat shock gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* *7*, 1906-1916.
- Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E.J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* *24*, 181-185.
- Smolka, M.B., Albuquerque, C.P., Chen, S.H., and Zhou, H. (2007). Proteome-wide identification of *in vivo* targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 10364-10369.
- Sondermann, H., Ho, A.K., Listenberger, L.L., Siegers, K., Moarefi, I., Wentz, S.R., Hartl, F.U., and Young, J.C. (2002). Prediction of novel Bag-1 homologs based on structure/function analysis identifies Snl1p as an Hsp70 co-chaperone in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* *277*, 33220-33227.
- Stryer, L. (1999). Biochemie.
- Suzuki, T., Ueda, A., Kobayashi, N., Yang, J., Tomaru, K., Yamamoto, M., Takeno, M., and Ishigatsubo, Y. (2008). Proteasome-dependent degradation of alpha-catenin is regulated by interaction with ARMc8alpha. *Biochem J* *411*, 581-591.
- Taldone, T., Sun, W., and Chiosis, G. (2009). Discovery and development of heat shock protein 90 inhibitors. *Bioorg Med Chem* *17*, 2225-2235.
- Taxis, C., Hitt, R., Park, S.H., Deak, P.M., Kostova, Z., and Wolf, D.H. (2003). Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of ERAD. *J Biol Chem* *278*, 35903-35913.
- Teichert, U., Mechler, B., Muller, H., and Wolf, D.H. (1989). Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J Biol Chem* *264*, 16037-16045.

- Tesic, M., Marsh, J.A., Cullinan, S.B., and Gaber, R.F. (2003). Functional interactions between Hsp90 and the co-chaperones Cns1 and Cpr7 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 32692-32701.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J* 19, 94-102.
- Tyers, M., and Willems, A.R. (1999). One ring to rule a superfamily of E3 ubiquitin ligases. *Science* 284, 601, 603-604.
- van der Merwe, G.K., Cooper, T.G., and van Vuuren, H.J. (2001). Ammonia regulates VID30 expression and Vid30p function shifts nitrogen metabolism toward glutamate formation especially when *Saccharomyces cerevisiae* is grown in low concentrations of ammonia. *J Biol Chem* 276, 28659-28666.
- Varshavsky, A. (1997). The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* 2, 13-28.
- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, Koonin, E.V., and Deshaies, R.J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298, 611-615.
- Verma, R., Chen, S., Feldman, R., Schieltz, D., Yates, J., Dohmen, J., and Deshaies, R.J. (2000). Proteasomal proteomics: identification of nucleotide-sensitive proteasome-interacting proteins by mass spectrometric analysis of affinity-purified proteasomes. *Mol Biol Cell* 11, 3425-3439.
- Verma, R., Oania, R., Graumann, J., and Deshaies, R.J. (2004). Multiubiquitin chain receptors define a layer of substrate selectivity in the ubiquitin-proteasome system. *Cell* 118, 99-110.
- von Herrath, M., and Holzer, H. (1985). Oxidative inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. *Prog Clin Biol Res* 180, 329-340.
- von Herrath, M., and Holzer, H. (1988). Sensitivity of fructose-1,6-bisphosphatase from yeast, liver and skeletal muscle to fructose-2,6-bisphosphate and 5'-adenosine monophosphate. *Z Lebensm Unters Forsch* 186, 427-430.
- Wahren, J., and Ekberg, K. (2007). Splanchnic regulation of glucose production. *Annu Rev Nutr* 27, 329-345.
- Wandinger, S.K., Richter, K., and Buchner, J. (2008). The Hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem* 283, 18473-18477.
- Werner-Washburne, M., Stone, D.E., and Craig, E.A. (1987). Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7, 2568-2577.
- Wilk, S., and Orlowski, M. (1983). Evidence that pituitary cation-sensitive neutral endopeptidase is a multicatalytic protease complex. *J Neurochem* 40, 842-849.
- Willems, A.R., Schwab, M., and Tyers, M. (2004). A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim Biophys Acta* 1695, 133-170.
- Witt, I., Kronau, R., and Holzer, H. (1966). [Repression by glucose of alcohol dehydrogenase, malate dehydrogenase, isocitrate lyase and malate synthase in yeast]. *Biochim Biophys Acta* 118, 522-537.

Wolf, D.H., and Hilt, W. (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* 1695, 19-31.

Young, J.C., Agashe, V.R., Siegers, K., and Hartl, F.U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 781-791.

Zhang, M., Pickart, C.M., and Coffino, P. (2003). Determinants of proteasome recognition of ornithine decarboxylase, a ubiquitin-independent substrate. *Embo J* 22, 1488-1496.

## 8 . Anhang

Bestimmung der potentiellen Phosphorylierungsstellen von FBPase mit NetPhos.

„Phosphorylation sites predicted“: Serin: 6 Threonin: 3 Tyrosin: 2

### Serine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
Sequence	11	PRRDSTEGF	0.998	*S*
Sequence	55	FKFVSHTIR	0.014	.
Sequence	73	LAGASNFTG	0.020	.
Sequence	98	AMRASGIK	0.061	.
Sequence	106	KVLVSEEQE	0.994	*S*
Sequence	121	TNTGSYAVC	0.005	.
Sequence	132	PIDGSSNLD	0.006	.
Sequence	133	IDGSSNLDA	0.808	*S*
Sequence	140	DAGVSVGTI	0.030	.
Sequence	146	GTIASIFRL	0.005	.
Sequence	154	LLPDSSGTI	0.118	.
Sequence	155	LPDSSGTIN	0.094	.
Sequence	178	AMYGSSTHL	0.009	.
Sequence	179	MYGSSTHLV	0.003	.
Sequence	219	KAIYSINEG	0.028	.
Sequence	252	NKPFSARYV	0.317	.
Sequence	258	RYVGSMVAD	0.014	.
Sequence	281	CDKKSPNGK	0.701	*S*
Sequence	320	DLVPSHIHD	0.136	.
Sequence	326	IHDKSSIWL	0.109	.
Sequence	327	HDKSSIWLG	0.130	.
Sequence	332	IWLGSSEI	0.773	*S*
Sequence	333	WLGSSGEID	0.685	*S*
Sequence	346	HIGKSQ---	0.133	.

### Threonine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
Sequence	2	---PTLVNG	0.066	.
Sequence	12	RRDSTEGFD	0.561	*T*
Sequence	17	EGFDTDIIT	0.225	.
Sequence	21	TDIITLPRF	0.022	.
Sequence	37	FKNATGDFT	0.025	.
Sequence	41	TGDFTLVLN	0.039	.
Sequence	57	FVSHTIRRA	0.395	.
Sequence	76	ASNFTGDQQ	0.012	.
Sequence	117	IVFPTNTGS	0.023	.
Sequence	119	FPTNTGSYA	0.126	.
Sequence	143	VSVGTIASI	0.055	.
Sequence	157	DSSGTINDV	0.539	*T*
Sequence	180	YGSSTHLVL	0.179	.
Sequence	185	HLVLTLDG	0.280	.
Sequence	194	VDGFTLDTN	0.021	.
Sequence	197	FTLDTNLGE	0.059	.

## Anhang

---

Sequence	205	EFILTHPNL	0.113	.
Sequence	225	NEGNTLYWN	0.390	.
Sequence	231	YWNETIRTF	0.745	*T*
Sequence	234	ETIRTFIEK	0.248	.
Sequence	266	DVHRTFLYG	0.008	.

---

### Tyrosine predictions

Name	Pos	Context	Score	Pred
Sequence	122	NTGSYAVCC	0.338	.
Sequence	173	VAACYAMYG	0.092	.
Sequence	176	CYAMYGSST	0.074	.
Sequence	218	QKAIYSINE	0.571	*Y*
Sequence	227	GNTLYWNET	0.769	*Y*
Sequence	255	FSARYVGSM	0.318	.
Sequence	269	RTFLYGGLF	0.021	.
Sequence	275	GLFAYPCDK	0.015	.
Sequence	290	LRLLYEAFP	0.069	.

---