

# **Die Ubiquitin-Proteasom vermittelte Regulation gluconeogenetischer Enzyme in Hefe: Die Funktion der RING Untereinheiten der Gid-Ubiquitin Ligase**

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

vorgelegt von  
**Bernhard Sebastian Braun**  
geboren in Waiblingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf  
Mitberichter: PD Dr. Wolfgang Hilt  
Tag der mündlichen Prüfung: 16. März 2012

Institut für Biochemie der Universität Stuttgart

2012



## **Erklärung**

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

Tübingen, den 20. Januar 2012

Bernhard Braun

## **Danksagungen**

Ich danke Herrn Prof. Dr. D. H. Wolf für die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Überlassung des interessanten und vielfältigen Themas, seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie für die sehr freie Entfaltungsmöglichkeit im Labor.

Weiter möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Biochemie für Ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Alexandra und meinen Eltern, die mich während meiner Arbeit unterstützten und mir immer mit Verständnis und Geduld begegnet sind.

## **Veröffentlichungshinweis**

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

Braun, B., Pfirrmann, T., Menssen, R., Hofmann, K., Scheel, H., Wolf, D. H. (2011). Gid9, a second RING finger protein contributes to the ubiquitin ligase activity of the Gid complex required for catabolite degradation. *FEBS Lett.* 585 (24), 3856-3861

Menssen, R., Schweiggert, J., Schreiner, J., Kušević, D., Reuther, J., Braun, B., Wolf, D. H. (2012). Exploring the topology of the Gid complex, the E3 ubiquitin ligase involved in catabolite induced degradation of gluconeogenic enzymes. (Manuskript eingereicht)

## Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
bp	Basenpaare
cAMP	cyclisches AMP
CHIP	chaperone interacting protein
CM	complete medium (synthetisches Vollmedium)
CPY*	Carboxypeptidase yscY G255R
CRA	CT11-RanBPM
CTLH	c-terminal to LisH
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
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
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assozierte Degradation
EtOH	Ethanol
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
g	Erdbeschleunigung

Gid	glucose induced degradation deficient
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Haemagglutinin
HECT	homologous to E6-AP C-terminus
HOAc	Essigsäure
IgG	Immunoglobulin G
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
Leu2	cytosolische $\beta$ -Isopropylmalat-Dehydrogenase
LisH	Lissencephaly type-1-like homology
c-MDH	cytosolische Malatdehydrogenase
MeOH	Methanol
NAD <sup>+</sup>	oxidiertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NaOAc	Natriumacetat
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$ nm
ODC	Ornithindecaboxylase
ORF	open reading frame
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPCK	Phosphoenolpyruvatkarboxykinase
PGK	3-Phosphoglyceratkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RING	really interesting new gene
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse	Ribonuclease
Rpn	regulatory particle non ATPase

Rpt	regulatory particle triple ATPase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizzosaccharomyces pombe</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMART	<u>S</u> imple <u>M</u> odular <u>A</u> rchitecture <u>R</u> esearch <u>T</u> ool
TAE	Tris-Acetat mit EDTA
TBS	tris buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton-X-100	Polyethylenglycol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether
U	Units
Ub	Ubiquitin
UBL	ubiquitin like protein
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
v/v	Volumen pro Volumen
Vid	vacuole import and degradation
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
YPD	yeast peptone dextrose (Glucose Vollmedium)
YPEtOH	yeast peptone ethanol (Ethanol Vollmedium)



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>DIE HEFE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i></b>	<b>7</b>
<b>2.2</b>	<b>KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL</b>	<b>8</b>
2.2.1	GLYKOLYSE	8
2.2.2	GLUCONEOGENESE	10
<b>2.3</b>	<b>PROTEINABBAU</b>	<b>11</b>
2.3.1	VAKUOLE/LYSOSOM	11
2.3.2	DAS PROTEASOM	12
2.3.3	DAS UBIQUITIN-PROTEASOM-SYSTEM UND DIE FAMILIE DER RING-E3 UBIQUITIN LIGASEN	15
2.3.4	KATABOLINAKTIVIERUNG UND KATABOLITDEGRADATION GLUCONEOGENETISCHER ENZYME	20
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>DER GID-KOMPLEX</b>	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>SEQUENZANALYSE VON GID2 UND GID9</b>	<b>24</b>
<b>3.3</b>	<b>INAKTIVIERUNG DER GID2-RING-DOMÄNE</b>	<b>28</b>
<b>3.4</b>	<b>E3-UBIQUITIN-LIGASEAKTIVITÄT VON GID2</b>	<b>30</b>
<b>3.5</b>	<b>INAKTIVIERUNG DER RING-DOMÄNE IN GID9</b>	<b>33</b>
<b>3.6</b>	<b>EINFLUSS DER RING-MUTANTEN AUF DIE KATABOLITDEGRADATION VON PEPCK UND C-MDH</b>	<b>36</b>
3.6.1	EINFLUSS VON GID9 AUF DEN ABBAU VON PEPCK UND C-MDH	36
3.6.2	EINFLUSS VON GID2 AUF DEN ABBAUPROZESS VON PEPCK UND C-MDH	37
<b>3.7</b>	<b>GID2 UND GID9 INTERAGIEREN MITEINANDER</b>	<b>39</b>
<b>3.8</b>	<b>DIE POLYUBIQUITINIERUNG GLUCONEOGENETISCHER ENZYME <i>IN VIVO</i> WIRD DURCH DIE MUTATION GID9C434S VERHINDERT</b>	<b>41</b>
<b>3.9</b>	<b>UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONALITÄT UND STABILITÄT VON GID2C379S-HA<sub>3</sub>, GID2ΔCTLH-HA<sub>3</sub> UND GID2ΔLIS-HA<sub>3</sub> MUTANTENPROTEINEN</b>	<b>44</b>
3.9.1	STABILITÄT VON GID2ΔCTLH-HA <sub>3</sub> UND GID2C379S-HA <sub>3</sub> MUTANTENPROTEINEN	44
3.9.2	ÜBERPRÜFUNG DER BIOLOGISCHEN FUNKTIONALITÄT VON GID2ΔCTLH-HA <sub>3</sub>	45
3.9.3	BIOLOGISCHE FUNKTIONALITÄT DER GID2ΔLIS-HA <sub>3</sub> MUTANTE	47

Inhaltsverzeichnis	2
3.9.4 EINFLUSS DER <i>GID2</i> MUTANTEN AUF DIE TOPOLOGIE DES GID-KOMPLEXES <i>IN VIVO</i>	49
<b>3.10 UNTERSUCHUNGEN ZUR BIOLOGISCHEN FUNKTIONALITÄT DER GID9-CTLH- UND DER GID9-CRA-MUTANTEN</b>	<b>50</b>
3.10.1 GID9 STABILISIERT GID2-V5 IN EINEM $\Delta$ GID STAMM	55
<b>3.11 DAS GID2/GID9-HETERODIMER BINDET UNABHÄNGIG VONEINANDER AN GID1 UND GID5</b>	<b>56</b>
3.11.1 INTERAKTION ZWISCHEN GID2, GID9 UND GID1	56
3.11.2 INTERAKTION ZWISCHEN GID2, GID9 UND GID5	57
<b>3.12 MOLEKULARE MASSENBESTIMMUNG DES GID-KOMPLEXES MITTELS GELFILTRATION</b>	<b>58</b>
3.12.1 GELFILTRATIONSEXPERIMENT MIT ZELLYSAT	59
<b>3.13 UNTERSUCHUNGEN ZU GID8</b>	<b>62</b>
<b>3.14 EINFLUSS VON TOR1 AUF DIE EXPRESSION VON GID4 UND GID5 UND WEITERE GLUCONEOGENETISCHEN ENZYMEN</b>	<b>64</b>
3.14.1 RAPAMYCIN VERLANGSAMT DEN FBPASE-ABBAU IN <i>S. CEREVISIAE</i>	65
3.14.2 WACHSTUMSTEST <i>TOR1</i> DELETIERTER HEFESTÄMME UNTER GLYKOLYTISCHEN UND GLUCONEOGENETISCHEN BEDINGUNGEN	67
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>71</b>
<b>5 MATERIAL &amp; METHODEN</b>	<b>80</b>
<b>5.1 MATERIAL UND STÄMME</b>	<b>80</b>
5.1.1 ANTIKÖRPER	80
5.1.2 SACCHAROMYCES CEREVISIAE STÄMME	80
5.1.3 ESCHERICHIA COLI STÄMME	82
5.1.4 PLASMIDE	82
5.1.5 OLIGONUCLEOTIDE	83
<b>5.2 MEDIEN</b>	<b>84</b>
5.2.1 MEDIEN FÜR HEFEKULTUREN	85
5.2.2 MEDIEN FÜR E. COLI KULTUREN	86
<b>5.3 WACHSTUMSBEDINGUNGEN</b>	<b>86</b>
5.3.1 DAUERKULTUREN	86
5.3.2 WACHSTUMSBEDINGUNGEN	87
<b>5.4 ZELL- UND MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>88</b>
5.4.1 HERSTELLUNG VON HEFESTÄMMEN	88

---

5.4.2	ISOLIERUNG CHROMOSOMALER DNA AUS HEFE	89
5.4.3	“PLASMID RESCUE” (ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS HEFE)	89
5.4.4	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS <i>E.COLI</i>	90
5.4.5	POLYMERASEKETTENREAKTION	90
5.4.6	RESTRIKTIONSVERDAU VON PLASMID-DNA	91
5.4.7	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	91
5.4.8	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN	92
5.4.9	SOUTHERNBLOT-ANALYSE	92
5.4.10	ZELLTRANSFORMATION	93
<b>5.5</b>	<b>BIOCHEMISCHE METHODEN</b>	<b>94</b>
5.5.1	ALKALISCHE LYSE	94
5.5.2	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	95
5.5.3	WESTERN BLOTTING	96
5.5.4	IMMUNODETEKTION VON PROTEINEN MIT DEM ECL™-SYSTEM	96
5.5.5	NATIVER GLASPERLENAUFSCHLUSS UND IMMUNOPRÄZIPITATION	97
5.5.6	CYCLOHEXIMID CHASE	97
5.5.7	FÄRBUNG VON SDS-GELEN	97
5.5.8	POLYUBIQUITINIRUNGSVERSUCH	98
5.5.9	EXPRESSION UND AUFREINIGUNG VON GST-FUSIONSPROTEINEN IN <i>E.COLI</i>	100
5.5.10	GELFILTRATIONSCHROMATOGRAPHIE	101
5.5.11	PROTEINKONZENTRATIONSBESTIMMUNG NACH BRADFORD	102
5.5.12	PONCEAUS-FÄRBUNG	102
5.5.13	SEQUENZANALYSE	102
5.5.14	PULSE CHASE ANALYSE	103
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>105</b>

---

## 1 Abstract

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass neun sogenannte *GID* (glucose induced degradation deficient) Gene für den reibungslosen Ablauf der Katabolit-induzierten proteasomalen Degradation von Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) essentiell sind. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass sieben der *Gid*-Proteine (*Gid1*, *Gid2*, *Gid4*, *Gid5*, *Gid7*, *Gid8* und *Gid9*) in einem Proteinkomplex vorliegen (Regelmann et al., 2003; Santt et al., 2008). *Gid3/Ubc8* ist in diesem Prozess das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) (Regelmann et al., 2003; Santt et al., 2008). *Gid6* ist identisch mit *Ubp14*, einem deubiquitinierenden Enzym (Pickart, 1997). *Gid4* dient als "molekularer Schalter" des Abbauprozesses von FBPase, da es in weniger als fünf Minuten nach Glucosegabe zu gluconeogenetisch gewachsenen Zellen exprimiert wird und die Ubiquitinierungsreaktion von FBPase einleitet (Santt et al., 2008).

Mittels bioinformatischer Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass *Gid2/Rmd5* und *Gid9/Fyv10* Domänen mit einer hohen Ähnlichkeit zu bekannten RING-Finger-Proteinen besitzen. Durch die Mutation hochkonservierter Aminosäuren in diesen Proteinbereichen konnte der FBPase-Abbau nach Glucosegabe zu gluconeogenetisch gewachsenen Zellen beinahe vollständig unterbunden werden.

*Gid2* ist in der Lage, Proteine *in vivo* und *in vitro* zu polyubiquitinieren. *Gid2* ist damit maßgeblich für die E3 Ubiquitin-Ligaseaktivität des *Gid*-Komplexes verantwortlich. In *Gid9* führt die Mutation der degenerierten RING-Domäne *in vivo* zu einem vollständigen Ausbleiben der Ubiquitinierungsreaktion von FBPase, Phosphoenolpyruvatkarboxykinase (PEPCK) und cytoplasmatischer Malatdehydrogenase (c-MDH) und verhindert so deren weiteren proteasomalen Abbau.

*Gid2* und *Gid9* interagieren miteinander und bilden ein für RING-Finger-Proteine typisches Heterodimer aus. Diese Interaktion wird durch die Mutation/Deletion der konservierten LisH-/CTLH-Proteindomänen nur unwesentlich beeinflusst. Das *Gid2/Gid9* Heterodimer bindet unabhängig von weiteren *Gid*-Untereinheiten an *Gid1*, das "Gerüst"-Protein des *Gid*-Komplexes.

Mittels Gelfiltrationschromatographie war es möglich, die Größe des *Gid*-Komplexes erstmals genauer zu bestimmen. Der *Gid*-Komplex fraktioniert zwischen dem Fettsäuresynthasekomplex und dem Aminopeptidasekomplex 1 bei etwa 1000 kDa. Eine

Interaktion zu seinen Substratproteinen konnte auf diese Weise nicht nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *TOR1* in *Saccharomyces cerevisiae* zum Absterben der Zellen bei Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen führt. Tor1 ist eine essentielle Komponente des TOR-Signalnetzwerkes, durch das zahlreiche Zellfunktionen wie Wachstum und Metabolismus gesteuert werden.

In recent studies nine so-called *GID* genes (glucose induced degradation deficient) were discovered to be necessary for glucose induced degradation of FBPase via the proteasome. Seven *Gid* proteins (*Gid1*, *Gid2*, *Gid4*, *Gid5*, *Gid7*, *Gid8* and *Gid9*) were shown to be part of a multisubunit protein complex (Ho et al., 2002; Regelman et al., 2003; Santt et al., 2008). The major ubiquitin conjugating enzyme (E2) in this process is *Gid3/Ubc8* (Regelman et al., 2003; Santt et al., 2008). *Gid6/Ubp14* is a deubiquitinating enzyme (Pickart, 1997). *Gid4/Vid24* occurs early after glucose addition to gluconeogenic grown cells. It functions as a molecular switch triggering FBPase polyubiquitylation and subsequent proteasomal degradation (Santt et al., 2008).

By sequence analysis a degenerated RING finger domain was discovered in *Gid2/Rmd5* and in *Gid9/Fyv10*. This prompted us to suspect that the *Gid* complex may be an E3 ubiquitin ligase. In yeast strains carrying mutated *GID2\*RING* or *GID9\*RING* genes, FBPase degradation is actually dramatically impaired after glucose addition to gluconeogenic cells.

*Gid2* was shown to polyubiquitylate proteins *in vivo* and *in vitro*. *Gid2* bears E3 ligase activity and is for this reason a crucial catalytic subunit of the *Gid* ubiquitin ligase complex. Mutation of the degenerated RING finger domain in *Gid9* leads to a lack in polyubiquitylation of the gluconeogenic enzymes FBPase, phosphoenolpyruvat carboxykinase (PEPCK) and cytoplasmic malate dehydrogenase (c-MDH) when cells are shifted from gluconeogenic to glycolytic conditions, by this preventing subsequent proteasomal degradation.

*Gid2* and *Gid9* form a heterodimeric subunit and interact in the *Gid* complex. Deletion of the LisH-/CTLH-domain within *Gid2* does not affect the formation of the heterodimer with *Gid9*. The *Gid2/Gid9* dimer binds to *Gid1*, the scaffold protein of the *Gid* complex, in the absence of all other *Gid* proteins.

By gel filtration chromatography the size of the *Gid* complex was determined more exactly. The *Gid* complex fractionates between the fatty acid synthase complex (ca. 2 MDa) and the aminopeptidase 1 complex (600 kDa) at 1000 kDa. In this way no interaction to its substrates FBPase and PEPCK could be displayed.

In this study it is displayed that deletion of *TOR1* in *Saccharomyces cerevisiae* leads to apoptosis under gluconeogenic growth conditions. The *Tor1* protein is essential for the TOR signaling network, regulating growth and metabolism in all eukaryotic cells.

## 2 Einleitung

### 2.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Der Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* basiert wie alle derzeit bekannten Organismen auf der gleichen, universellen morphologischen Einheit, der Zelle. Die Abschottung gegen die Umwelt und die Kompartimentierung dieses „Reaktionsraums“ bietet den Lebewesen viele Vorteile. Einerseits können sie sich dadurch vor ungünstigen Umwelteinflüssen (Schadstoffe etc.) schützen, andererseits können gewünschte Stoffe in hohen Konzentrationen angereichert werden, wodurch eine höhere Effizienz bei chemischen Reaktionen erzielt wird und eine eventuell eintretende Mangelversorgung mit diesen Stoffen verhindert werden kann.

*S. cerevisiae* gehört zu den Eukaryonten, die sich u.a. durch einen membranumschlossenen Zellkern, in dem ihre DNA eingeschlossen ist, von den Prokaryonten unterscheidet. Zu der Klasse der Eukaryonten, die sowohl Einzeller als auch vielzellige Organismen umfasst, gehören auch alle pflanzlichen und tierschen Zelltypen. Aufgrund dieser Verwandtschaft, sowie ihrer leichten Handhabung, hat sich die einzellige Hefe *S. cerevisiae* als Modellorganismus für molekularbiologische Untersuchungen als ideal erwiesen (Guthrie and Fink, 1991). Zahlreiche Zellvorgänge wie u. a. Abbau und Regulation von Proteinen lassen sich mit einfachen biochemischen Methoden untersuchen. Zudem ist das Hefegenom seit 1996 vollständig entschlüsselt und über öffentliche Datenbanken zugänglich (Regelmann et al., 2003; Santt et al., 2008). Aufgrund der Verfügbarkeit von Null- und Punktmutanten (z.B. EUROSCARF, Deletionsbank) können gezielt *in vivo* Funktionen wie die Degradation von Proteinen oder das Zusammenlagern von Proteinen zu größeren Komplexen erforscht werden. Die Verfügbarkeit von genetischen Markern und stabilen Plasmiden sowie die einfach durchzuführende Transformation von DNA in *S. cerevisiae* tragen zur guten Handhabung des Organismus für molekularbiologische Studien bei. Ein weiterer Vorteil ist die ungewöhnlich hohe Neigung von *S. cerevisiae*, fremde DNA aufzunehmen und durch homologe Rekombination ins Genom zu integrieren. Dadurch lassen sich Gene in vielfältiger Weise variieren. Seit 2003 gilt auch das menschliche Genom als endgültig entschlüsselt (<http://www.ornl.gov>). Seit dieser Zeit ist

es noch leichter geworden, im Modellorganismus Hefe gewonnene Erkenntnisse auf den Menschen zu übertragen und im Kampf gegen Krankheiten einzusetzen.

## 2.2 Kohlenhydratstoffwechsel

Zellen können ihr Überleben nur sichern, wenn sie sich den ständig verändernden Umweltbedingungen durch Regulation ihres Stoffwechsels anpassen. Glucose spielt als wichtige Kohlenstoffquelle auch bei der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels als Signalmolekül eine entscheidende Rolle (Rolland et al., 2002). Bei der Signalübermittlung spielen der Ras / zyklisches AMP (cAMP) / Proteinkinase A (PKA) vermittelte Signalweg und die Snf3/Rgt2 Glucosesensoren eine herausragende Rolle (Santangelo, 2006; Zaman et al., 2008). Über Hxk2/Mig1 werden gluconeogenetische Gene glucoseabhängig reprimiert, und auch durch den TOR (target of rapamycin)-Signalweg werden zahlreiche Transkriptionsfaktoren Glucose-induziert reguliert (Beck and Hall, 1999; Belinchón and Gancedo, 2007).

### 2.2.1 Glykolyse

Die wichtigste Kohlenstoff- wie auch Energiequelle stellt für viele Zellen die D-Glucose dar. Die Verstoffwechslung von D-Glucose zu Pyruvat und die daraus resultierende Energiegewinnung wird von nahezu allen Organismen beherrscht und die dafür notwendigen Enzyme ähneln sich in Pflanzen, Säugetieren, Pilzen und auch einer großen Anzahl von Bakterien sehr (Berg et al., 2006). Da die Glykolyse in anaeroben wie auch aeroben Organismen stattfindet, ist anzunehmen, dass sie schon vor der sauerstoffverbrauchenden Zellatmung etabliert war. Als Kohlenstofflieferant versorgt die Glykolyse den Organismus mit den notwendigen Bausteinen für die Synthese von z.B. DNA (Ribose), Fetten und Lipiden (Dihydroxyacetonphosphat), Aminosäuren (Pyruvat) sowie in Säugetieren Oxalacetat (Pyr.) und sichert so das Überleben der Zelle. Die Glykolyse findet im Cytosol statt und ihre Nettoreaktion lautet:



Um sich die chemische Energie der Glucose nutzbar zu machen, ist die Umwandlung in Pyruvat in etliche Einzelschritte unterteilt (Abb. 1). Irreversible und regulatorisch wichtige, katalytische Schritte sind hierbei die Phosphorylierung von Glucose durch die Hexokinase, die Phosphorylierung von Fructose-6-Phosphat durch die Phosphofruktokinase und



schließlich die Synthese von Pyruvat und ATP aus Phosphoenolpyruvat durch die Pyruvatkinase (Berg et al., 2006). Dem gegenläufigen Prozess, der Gluconeogenese, stehen an diesen Stellen andere Enzyme zur Verfügung. Er findet immer dann statt, wenn der Zelle von außen keine Glucose angeboten wird.

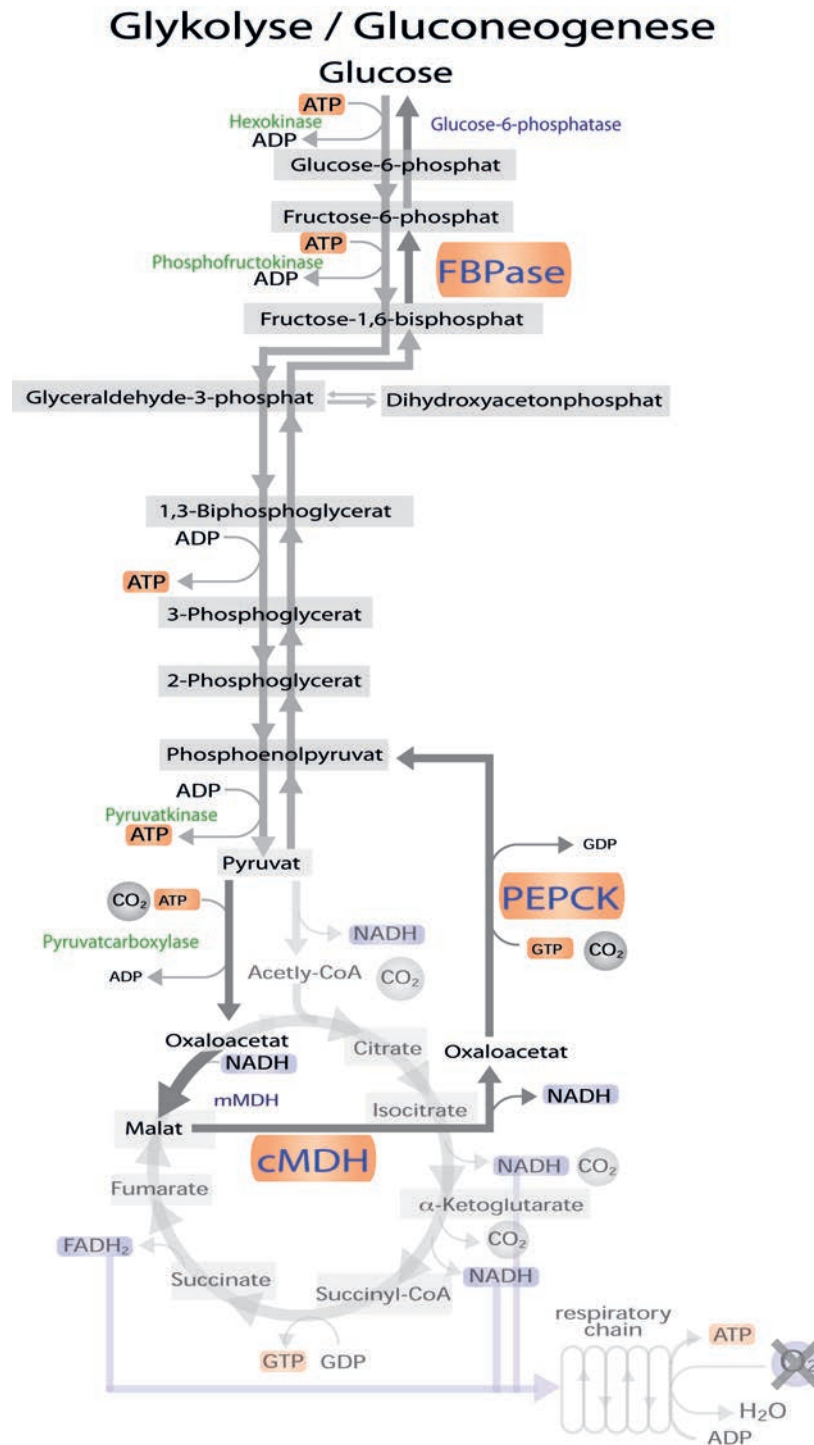


Abbildung 1: **Schematische Darstellung der Glykolyse/Gluconeogenese und angrenzender Stoffwechselwege.** Details siehe Text. (Die Vorlage der Abbildung stammt von W.Hilt).

### 2.2.2 Gluconeogenese

Als Gluconeogenese bezeichnet man den metabolischen Prozess, bei welchem aus nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Ethanol oder Acetat Glucose synthetisiert wird. Diese Moleküle müssen erst als Acetyl-Coenzym A in den Citrat-Zyklus eingespeist werden, um in Phosphoenolpyruvat umgewandelt der Gluconeogenese zugeführt werden zu können (siehe Abb. 1). Dabei stellt die Gluconeogenese keine einfache Umkehr der Glykolyse dar, bei drei Reaktionen sind die glykolytischen Enzyme durch verschiedenartige, gluconeogenetische Enzyme ersetzt, da diese glykolytischen Reaktionen thermodynamisch betrachtet nur in eine Richtung verlaufen können. Die ausgetauschten Enzyme sind die Glucose-6-phosphatase zur Dephosphorylierung von Glucose-6-phosphat, die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) zur Dephosphorylierung von Fructose-1,6-bisphosphat sowie die zur Synthese von Phosphoenolpyruvat notwendigen Enzyme cytoplasmatische Malatdehydrogenase (c-MDH) und Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) (Berg et al., 2006). Ein weiterer Vorteil des Einsatzes verschiedener Enzyme bei gegensätzlichen Stoffwechselwegen ist die notwendige divergente Regulation dieser antagonistischen Stoffwechselwege.

Die ersten spezifischen Reaktionen der Gluconeogenese betreffen die Umwandlung von Pyruvat in Oxalacetat. Da die Bildung von Oxalacetat aus Pyruvat ausschließlich in den Mitochondrien stattfindet, die weiteren Enzyme zur Umwandlung von Phosphoenolpyruvat (PEP) in Glucose sich aber im Zytosol befinden, muss ein Transport der Metabolite zwischen den Kompartimenten stattfinden (Voet, 2008). Dafür wird Oxalacetat im Mitochondrium zu Malat reduziert, ins Zytosol transportiert und hier von der c-MDH wieder zu Oxalacetat oxidiert. Die Umwandlung von Oxalacetat in Phosphoenolpyruvat (PEP) kann nun durch die PEPCK erfolgen, da die exergone Decarboxylierung von Oxalacetat genug Energie für die PEP-Synthese liefert. Die nächste irreversible Reaktion der Gluconeogenese benötigt das Enzym FBPase, welches die Dephosphorylierung von Fructose-1,6-bisphosphat zu Fructose-6-phosphat katalysiert. Interessanter Weise konnte in *S. cerevisiae* gezeigt werden, dass c-MDH, PEPCK und FBPase miteinander interagieren (Gibson and McAlister-Henn, 2003), was zu einer Art "Substratkanalisierung" führen und so die Geschwindigkeit der Gluconeogenese unter Ausschluss von Nebenprodukten erhöhen könnte (Miles et al., 1999). Die letzte nicht umkehrbare Reaktion der Gluconeogenese, die Dephosphorylierung von Glucose-6-phosphat, findet nur bei Tieren in der Leber statt, um freie Glucose in den Blutkreislauf

einzuspeisen. In *S. cerevisiae* ist bis heute keine Glucose-6-phosphatase identifiziert worden, was den Schluss nahelegt, dass in diesem Organismus die Gluconeogenese vor dieser Stufe endet.

## 2.3 Proteinabbau

Die zum Überleben notwendige Anpassung der Zelle an die sich ständig ändernden Umweltbedingungen findet unter anderem durch die im dynamischen Gleichgewicht befindliche Synthese und Proteolyse von Proteinen statt. Der Proteinabbau spielt eine wichtige Rolle, da durch ihn Transkriptionsfaktoren von Enzymen reguliert, fehlgefaltete Proteine entsorgt und ausreichend Aminosäuren für die Neu-Synthese von Proteinen gewonnen werden. Jedoch birgt dieser Prozess auch eine immense Gefahr für die Zelle. Sollte er unkontrolliert ablaufen, würde das zur Schädigung von Zellfunktionen bis hin zum Zelltod führen. Eine strenge Regulation und eine hohe Selektivität des Proteinabbaus sind daher unabdingbar.

Der Zelle stehen zwei unabhängige Degradationswege zur Verfügung: a) die Proteolyse innerhalb der Vakuole und b) die Proteolyse durch das Proteasom. Während die Vakuole unspezifisch agierende Proteasen enthält und alle ihr zugeführten Makromoleküle verdaut, ist der Abbau von Proteinen über das Proteasom hochselektiv. Das abzubauen Protein muss hierbei im Voraus mithilfe einer Enzymkaskade mit dem hochkonservierten Polypeptid Ubiquitin markiert werden, bevor es der Proteolyse zugeführt wird (Hilt and Wolf, 1996; Wolf and Hilt, 2004).

### 2.3.1 Vakuole/Lysosom

Die Vakuole von *S. cerevisiae* entspricht dem Lysosom höher entwickelter eukaryontischer Zellen. Sie ist ein großes, membranumschlossenes Zellkompartiment, das saure Hydrolasen enthält, die bei einem pH-Wert von 4.8 - 6 arbeiten. Um den geringeren pH-Wert im Vergleich zum Zytosol (pH 7) aufrecht zu erhalten, müssen Protonen ( $H^+$ ) vom Zytosol unter ATP Verbrauch ins Lumen der Vakuole gepumpt werden. Die umgebende Membran schützt die restliche Zelle vor den abbauenden Enzymen der Vakuole. Ein weiterer Schutzmechanismus vor der zerstörenden Wirkung der Hydrolasen ist ihr pH-Optimum. Bei neutralem pH sind die meisten Proteine verdauenden Enzyme wirkungslos oder besitzen nur eine stark verminderte Aktivität. Vakuolen werden auch als "Zellmagen"

bezeichnet, da sie aufgrund der Vielzahl an verschiedenen Hydrolasen (ca. 40) alle Arten von Makromolekülen verdauen können.

Unter Stressbedingungen spielt die Vakuole eine wichtige Rolle. Der Abbau der meisten cytosolischen Proteine erfolgt unspezifisch (Knop et al., 1993). Während bei normalen Wachstumsbedingungen 40 % der Proteine in der Vakuole abgebaut werden, sind es unter Stressbedingungen dagegen bis zu 85 % (Teichert et al., 1989). Die intrazellulären Proteine werden dabei via Autophagozytose in die Vakuole transportiert (Mizushima et al., 1998; Mizushima and Klionsky, 2007). Neben Proteinen und anderen Makromolekülen werden auch ganze Zellorganellen, z.B. Mitochondrien oder Peroxisomen, über Autophagozytose oder Endozytose von der Vakuole aufgenommen und abgebaut. Der Vakuole werden dadurch mehrere Aufgaben zuteil: einerseits speichert sie Nährstoffe und entsorgt gegebenenfalls für die Zelle giftige Stoffe, andererseits hält sie die Flüssigkeitsbalance in der Zelle aufrecht und kann sogar deren relative Größe beeinflussen (Bryant and Stevens, 1998; Klionsky, 1997; Munakata and Klionsky, 2010; Rose, 1991). Während die meisten langlebigen Proteine von der Vakuole abgebaut werden, findet die selektive Degradation kurzlebiger Proteine durch das Proteasom statt (Wolf, 2004).

### **2.3.2 Das Proteasom**

Proteasomen sind hochentwickelte, aus zahlreichen Untereinheiten aufgebaute Proteasekomplexe (Hilt and Wolf, 1996; Hilt et al., 1996; Fischer et al., 1994; Wolf and Hilt, 2004), die sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern eukaryotischer Zellen lokalisiert sind. Entsprechend ihrer Größe werden zwei Komplexe unterschieden, die nach ihrem Sedimentationsverhalten als 20S- und 26S-Proteasomen bezeichnet werden (S = Svedberg Konstante) und in einem dynamischen Gleichgewicht nebeneinander vorliegen. Für die Zelle sind die Proteasomen lebensnotwendig, sie kontrollieren Prozesse wie den Zellmetabolismus oder den Zellzyklus durch die signalvermittelte Proteolyse von Schlüsselenzymen und regulatorischen Proteinen (Wolf and Hilt, 2004; Eisele and Wolf, 2008; Stolz and Wolf, 2010). Außerdem operieren Proteasomen bei der Stressantwort (Heinemeyer et al., 1991; Hilt et al., 1993), indem abnormal gefaltete Proteine entfernt werden (Fang et al., 2011), sowie bei der Immunantwort durch Bildung antigener Peptide (Kloetzel, 2004).

### Das 20S-Proteasom

20S-Proteasomen konnten in den verschiedensten Eukaryoten, von der Hefe bis zum Menschen, gefunden werden (Wolf and Hilt, 2004). Das 20S-Proteasom ist ein zylinderförmiges Partikel mit einem Molekulargewicht von etwa 800 kDa, das aus zwei identischen Subkomplexen mit je 7 verschiedenen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut ist. Damit ergibt sich eine  $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Stöchiometrie, wie Röntgenstrukturanalysen des 20S-Proteasoms aus *S. cerevisiae* gezeigt haben (Baumeister et al., 1988; Jäger et al., 1999; Groll et al., 1999; Wolf and Hilt, 2004). Durch Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass diese Proteinuntereinheiten gleich Ringen übereinander angeordnet sind (Abb. 2). Außerhalb des Eukaryotenreiches wurde ein dem 20S-Proteasom vergleichbarer Komplex bisher nur im Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* identifiziert, welcher als eine Urform des Proteasoms angesehen werden kann (Grziwa et al., 1991; Hegerl et al., 1991).

Während die  $\alpha$ -Untereinheiten hauptsächlich eine strukturgebende sowie eine "gating" Rolle erfüllen, erhält das 20S-Proteasom durch die  $\beta$ -Untereinheiten seine katalytische Aktivität. Das 20S-Proteasom ist eine Threoninprotease. Das N-terminale Threonin der  $\beta$ -Untereinheiten katalysiert als Nucleophil die Hydrolyse von Peptidbindungen. Aufgereinigte 20S-Proteasomen von Eukaryoten zeigen fünf unterschiedliche peptidspaltende Aktivitäten. Sie können Substrate an der Carboxylseite von sauren (PGPH Aktivität), basischen (Trypsin-ähnliche Aktivität) und hydrophoben Aminosäuren (Chymotrypsin-ähnliche Aktivität) spalten. Die verbleibenden beiden Aktivitäten schneiden an verzweigten bzw. hydrophoben Aminosäuren. *In vitro* katalysieren 20S-Proteasomen den ATP-unabhängigen Abbau bestimmter denaturierter und oxidierter Proteine, wobei Fragmente von 3-30 Aminosäuren mit einem Optimum von 7-8 Aminosäuren erhalten werden. Von den sieben verschiedenen  $\beta$ -Untereinheiten der Hefe *S. cerevisiae* sind drei proteolytisch aktiv. Die Pup1p-Untereinheit gibt dem Proteasom seine Trypsin-ähnliche Aktivität, Pre2p die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität und Pre3p die Peptidyl-glutamyl-peptid-spaltende (PGPH) Aktivität (Heinemeyer et al., 1997; Nussbaum et al., 1998; Groll et al., 1999).

### Das 26S-Proteasom

Das 26S-Proteasom ist ein hochmolekularer Komplex mit einem Molekulargewicht von etwa 2.5 MDa (Rosenzweig and Glickman, 2008). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass es aus einem 20S-Kernkörper besteht, dem auf beiden

Seiten je ein 19S-Partikel gleich einem Deckel aufgesetzt ist (Gallastegui and Groll, 2010; Förster et al., 2009). Diese 19S-Caps übernehmen die Erkennung, Bindung, Prozessierung und Entfaltung der ubiquitinmarkierten Substratmoleküle (Glickman et al., 1998a). Sie bestehen aus 17-18 Untereinheiten, davon besitzen sechs ATPase-Aktivität (Rpt1 bis Rpt6) und vermitteln die Triebkraft für die Entfaltung des Substrats und seine Translokation in den 20S-Partikel durch ATP-Hydrolyse. Die sechs ATPasen bilden einen Ring, der direkt mit den  $\alpha$ -Untereinheiten des 20S-Kernpartikels interagiert. Diese Wechselwirkung vermittelt das Öffnen der Kernpore und macht so erst den Proteinabbau möglich (Köhler et al., 2001b; 2001a; Bar-Nun and Glickman, 2011). Alle Rpt-Untereinheiten (regulatory particle triple ATPase) sind essentiell für die Funktionalität des 26S-Proteasoms (Rubin et al., 1998; Glickman et al., 1998b). Gemeinsam mit Rpn1, Rpn2 und Rpn10 (regulatory particle non-ATPase) bilden die Rpt-Untereinheiten die Basis der 19S-Cap Partikel. Die übrigen Untereinheiten (Rpn3 bis Rpn12) bilden den Deckel („lid“) des 19S-Partikels (Abbildung 2). Deletionsuntersuchungen einzelner Untereinheiten zeigten, dass besonders Rpt5, Rpn10 und Rpn13 für die Erkennung und Bindung der Polyubiquitinketten verantwortlich sind (Husnjak et al., 2008; Lam et al., 2002). Jedoch findet man auch nicht-ubiquitinierte Proteine, z.B. die Ornithin Decarboxylase (ODC), die direkt mit dem Proteasom interagieren kann und proteasomabhängig abgebaut wird. Dabei wird der Abbauprozess durch einen negativen "Feedback-Loop" der Reaktionsprodukte der ODC reguliert (Zhang et al., 2003; Hoyt and Coffino, 2004; Hoyt et al., 2006; Toth and Coffino, 1999). Zu den bekannten *in vivo* Substraten des Proteasoms in der Hefe gehören weiter die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK), die cytosolische Malatdehydrogenase (c-MDH) (Braun et al., 2011), eine falsch gefaltete Form der Carboxypeptidase (CPY\*), die  $\alpha$ -Untereinheit der Fettsäuresynthase (Fas2p), Zyklone und der Transkriptionsrepressor Mat $\alpha$ 2. In Säugerzellen sind es der Tumorsuppressor p53, die Ionenpumpe CTFR, Histone wie H2A, I $\kappa$ B $\alpha$  (Inhibitor von NF- $\kappa$ B) diverse Zellzyklusregulatoren (Zyklone) und viele andere (Wolf and Hilt, 2004; Ciechanover and Schwartz, 2004).

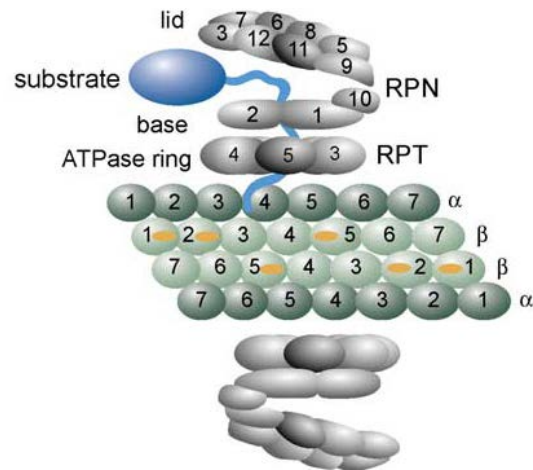


Abbildung 2: **Struktur des 26S-Proteasoms.** Substrate des Proteasoms werden durch die 19S-Cap erkannt, die in eine aus sechs ATPasen bestehende Basis und das aus 11-12 Rpn Einheiten aufgebaute "Lid" unterteilt werden kann. Den enzymatischen Abbau der Substrate übernimmt der aus  $\alpha$ -/ $\beta$ - Untereinheiten aufgebaute 20S-Kernpartikel. (Abbildung modifiziert aus (Wolf and Hilt, 2004)).

### 2.3.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System und die Familie der RING-E3 Ubiquitin Ligasen

E3-Ligasen verleihen dem Prozess der Ubiquitinierung Spezifität, indem sie ihre Zielsubstrate erkennen und die Übertragung des Ubiquitins vom ubiquitinkonjugierenden Enzym E2 auf das Substratmolekül unter streng eingegrenzten Bedingungen vermitteln. Die Aktivität der meisten bekannten E3 Ligasen wird durch eine RING-Domäne (really interesting new gene) vorgegeben, die an einen E2-Ubiquitin Thioester bindet und die Abgabe von Ubiquitin an einen Lysinrest des Substrats aktiviert. E2-E3-Komplexe können dabei entweder eine Monoubiquitinierung durchführen oder die Polyubiquitinierung des Substrats einleiten, indem mehrere Ubiquitinmoleküle über Lysinreste miteinander verknüpft werden. Diese verschiedenen Modifikationen können zahlreiche Effekte auf das Zielprotein haben, von der Proteasom-vermittelten Proteolyse über Funktionsänderungen bis hin zu Änderungen der Proteinstruktur und ihrer Lokalisation in der Zelle (Weissman, 2001).

Inzwischen sind über 600 menschliche Gene bekannt, die für RING basierte E3-Ligasen kodieren und in allen möglichen zellulären Prozessen eine entscheidende Rolle spielen.

### Signalwege des Ubiquitin-Proteasom vermittelten Abbaus

Die Lebensdauer einzelner Proteine in der Zelle ist sehr unterschiedlich. Während langlebige Proteine 200 Stunden und länger überdauern, werden kurzlebige Proteine innerhalb von Minuten oder gar Sekunden abgebaut (Rechsteiner, 1987). Nach welchen Kriterien die Zelle die Halbwertszeit von Proteinen festlegt, sind bisher nur unzureichend verstanden. Bekannt ist, dass Proteine über sogenannte Degrons (Abbausignale) verfügen. Ein Degron umfasst eine Peptidsequenz, die benötigt wird, um von der Proteolyse-Maschinerie erkannt zu werden. Bedeutend ist hierbei die Eigenschaft der Degrons, dass man ihre Peptidsequenz mit molekularbiologischen Techniken auf andere Substratmoleküle übertragen kann. Durch Hydroxylierung, Phosphorylierung oder proteolytische Abspaltung eines kurzen Peptids vom Protein kann die Aktivität der Degrons post-translational modifiziert werden (Ravid and Hochstrasser, 2008).

Ein weiteres Abbausignal des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus wird durch den N-terminalen Aminosäurerest des Proteins vermittelt, auch bekannt als "N-end-rule pathway" (Bachmair et al., 1986). Hierbei werden die N-terminalen Aminosäuren nach ihrer einem Protein Lang- oder Kurzlebigkeit vermittelten Eigenschaft unterteilt. N-terminale Degrons bestehen aus einer destabilisierenden Aminosäure am N-Terminus des Proteins und einem internen Lysinrest, an welchem polyubiquitiniert werden kann (Varshavsky, 1997; 1995; Xie and Varshavsky, 1999).

Vergleicht man die Proteinsequenzen kurzlebiger Proteine miteinander, stellt man fest, dass viele ein Degradationssignal, die sogenannte PEST Sequenz, beinhalten. Dieser Proteinbereich zeichnet sich durch die Anreicherung von Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) aus (Rogers et al., 1986; Rechsteiner and Rogers, 1996). Ein weiteres bekanntes Abbausignal sind die "destruction boxes", Proteinsequenzen, die auf den Abbau und die Stabilität von Cyclinen, regulatorischen Proteinen des Zellzyklus, einen großen Einfluss haben (Glotzer et al., 1991).

### Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS)

Die selektive Degradation von vielen kurzlebigen Proteinen in eukaryontischen Zellen wird vom Ubiquitin-Proteasom-System ausgeführt. Kurzlebige Proteine sind typischerweise meistens wichtige Regulatoren zellulärer Prozesse, die entsprechende Signalsequenzen tragen, die sie für die Abbaumaschinerie kenntlich machen. Ebenso wichtig ist der schnelle Abbau fehlgefalteter Proteine, die durch exponierte hydrophobe Bereiche vom Ubiquitin-



System erkannt werden. Da Ubiquitin durch seine einzigartige Signalvermittlung im Zellzyklus, dem Metabolismus, der Stressantwort sowie der Reparatur von DNA eine essentielle Rolle spielt, führen Defekte im Ubiquitin-System zu schwerwiegenden Störungen in der Zelle (Hershko and Ciechanover, 1998; Ciechanover, 2010; Hershko, 2005). Für den Ubiquitin veranlassten Proteinabbau wird das Substratprotein mit einer Polyubiquitinkette an einem internen Lysinrest oder an seinem N-Terminus verknüpft. Zur Aktivierung muss das 76 Aminosäuren große Ubiquitin zuerst mit einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1, in *S. cerevisiae* Uba1) über eine Thioesterbindung zwischen dem C-terminalen Glycin des Ubiquitins und einem Cysteinrest des E1's unter ATP Verbrauch (Adenylierung von Ubiquitin) verbunden werden (McGrath et al., 1991). Das aktivierte Ubiquitin wird dann auf den Cysteinrest eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2, in Hefe Ubc1 - Ubc8, Ubc10, Ubc11 und Ubc13) übertragen. Danach wird das Ubiquitin auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysins des Zielproteins (Isopeptidbindung) oder den N-Terminus in einer konzertierten Reaktion von E2- und E3-Ligase übertragen (Abbildung 3) (Kleiger et al., 2009; Glickman and Ciechanover, 2002; Hershko and Ciechanover, 1998). Durch Acetylierung des N-Terminus kann die Ubiquitinierung von Proteinen verhindert werden (Li et al., 2002). Die Substratspezifität in diesem Prozess wird hauptsächlich durch die E3 Ligase gewährleistet, die bestimmte Sequenzmotive in ihren jeweiligen Substraten erkennt und bindet. Während auf HECT E3-Ligasen das Ubiquitin vom E2-Enzym direkt übertragen wird (Pickart, 2001), bevor Ubiquitin auf das gebundene Zielprotein übertragen wird, werden bei RING E3-Ligasen E2-Ubiquitin und das Zielprotein gemeinsam gebunden und die direkte Übertragung des Ubiquitins vom E2 auf das Substrat katalysiert (Deshaies and Joazeiro, 2009). In Hefe sind nur fünf HECT-Ligasen bekannt, der Großteil der Ubiquitinligasen fällt der Gruppe der RING E3's zu. Für den proteasomalen Abbau des Substrats ist eine Monoubiquitinierung nicht ausreichend. Erst durch die Verknüpfung von mindestens vier Ubiquitin-Molekülen zu einer Polyubiquitinkette wird das Zielprotein ausreichend für den Abbau markiert (Chau et al., 1989). Hierbei werden nacheinander Ubiquitinmoleküle an Lys<sup>48</sup>-Reste schon gebundener Ubiquitineinheiten angehängt. Ob das Substrat den ganzen Polyubiquitinierungsprozess über an die E3-Ligase gebunden bleibt oder jeweils neu andocken muss, ist bisher nur unzureichend verstanden (Deshaies and Joazeiro, 2009). Der Grund für die Verlängerung der Ubiquitinkette am Substratmolekül liegt in ihrer stark zunehmenden Affinität zum Proteasom: eine Ub<sub>4</sub>-Kette besitzt eine 100fach höhere Affinität als eine Ub<sub>2</sub>-Kette

(Thrower et al., 2000; Pickart, 2000; Chau et al., 1989). Inzwischen ist bekannt, dass die Verlängerung der Kette auch über andere Lysinreste (meist Lys<sup>63</sup>) erfolgen kann, was die Proteine dann für die verschiedensten Aufgaben und Bestimmungsorte in der Zelle markiert (Grabbe and Dikic, 2009; Grabbe et al., 2011; Lok et al., 2011).

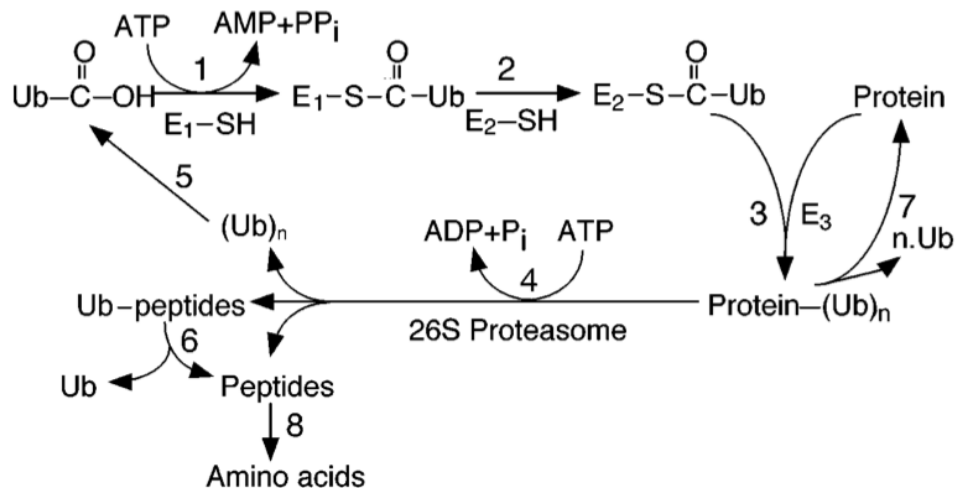


Abbildung 3: **Enzymatische Reaktionen des Ubiquitin-Systems.** Reihenfolge der Reaktionen des proteolytischen Abbauweges. Ubiquitin wird unter ATP-Verbrauch adenyliert und unter Ausbildung einer Thioesterbindung auf das E1-Enzym übertragen. Nach Übertragung von E1 auf E2 kann Ubiquitin nun an die Substratproteine weitergegeben werden. Dieser Prozess muss sich pro Substratmolekül mindestens vier mal wiederholen, bevor dieses vom Proteasom erkannt und abgebaut wird (Abbildung aus (Hershko and Ciechanover, 1998)).

### RING E3-Ubiquitin-Ligasen

Die erste Beschreibung der RING Domäne geht auf Freemont und Kollegen zurück (Freemont et al., 1991). Die inzwischen anerkannte, grundlegende Aminosäuresequenz des klassischen RING Motivs lautet wie folgt: Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>(9-39)</sub>-Cys-X<sub>(1-3)</sub>-His-X<sub>(2-3)</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>(4-48)</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys (X: beliebige Aminosäure) (Deshaies and Joazeiro, 2009). Die dreidimensionale Kristallstruktur in Abbildung 4b veranschaulicht, wie die konservierten Cystein- und Histidin-Reste im Inneren der Domäne angeordnet sind und durch die Bindung zweier Zn<sup>2+</sup>-Ionen ihre Gesamtstruktur aufrechterhalten. Durch die Verschachtelung der Zink-Koordinationsstellen ergibt sich eine sehr steife, kugelförmige Plattform, die für Protein-Protein-Interaktionen wie geschaffen ist (Borden et al., 1995; Barlow et al., 1994).

Mit der Zeit wurden zahlreiche RING Varianten beobachtet, bei denen Cystein- und Histidinliganden gegeneinander ausgetauscht wurden oder durch eine andere Aminosäure ersetzt wurden die ebenfalls  $Zn^{2+}$  koordinieren kann, z.B. Asp in Rbx1/Roc1 (Zheng et al., 2002). Diese Vielfalt geht sogar so weit, dass in den sogenannten U-Box-Proteinen alle Zink-bindenden Reste durch geladene oder polare Liganden ersetzt wurden, die über Wasserstoffbrücken die Struktur und Funktionalität der Domäne aufrechterhalten (Aravind and Koonin, 2000; Vander Kooi et al., 2006).

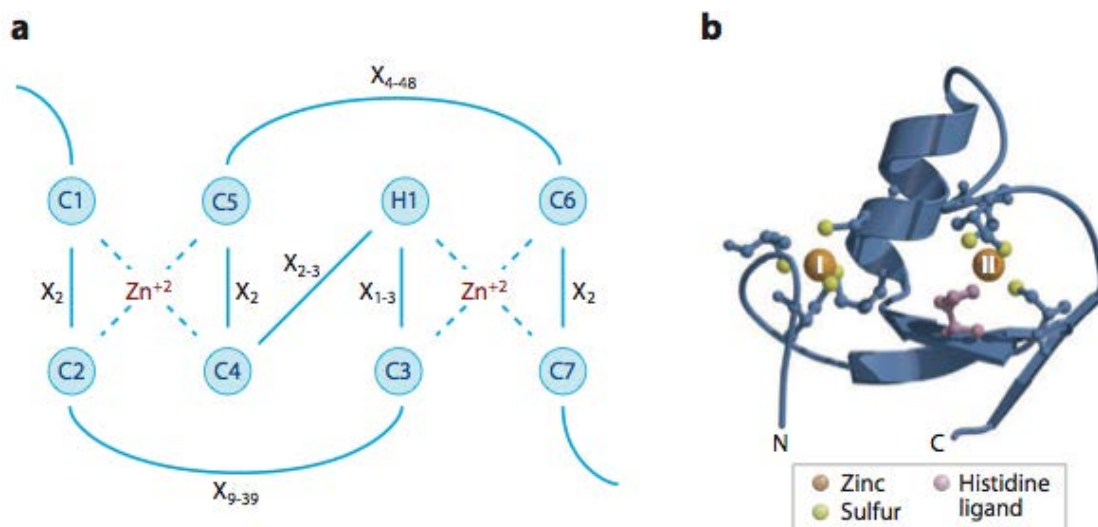


Abbildung 4: **Die RING Finger Domäne.** (a) Organisation der Primärstruktur der RING Domäne. C1 steht für das erste Cystein, das an der Komplexierung von Zink beteiligt ist. H1 markiert den Histidinliganden.  $X_n$  deutet den Abstand zwischen den konservierten Zink-bindenden Liganden an. (b) Dreidimensionale Kristallstruktur der RING Domäne aus c-Cbl. Die gebundenen Zinkatome sind nummeriert, die Termini mit N und C hervorgehoben. (Abbildung aus (Deshaies and Joazeiro, 2009)).

Eine Verbindung zwischen RING Proteinen und dem Ubiquitinsystem wurde erstmals von Bailly und Kollegen nachgewiesen, indem sie Rad6 und Rad18 in direkten Zusammenhang mit der Ubiquitinierung von Histonen stellten (Bailly et al., 1997). Danach wurden sehr schnell weitere RING Proteine entdeckt, beispielsweise Der3/Hrd1 und Ubr1, die im ERAD (endoplasmatic reticulum-associated degradation) beziehungsweise dem "N-end rule pathway" für den Abbau von Proteinen gebraucht werden (Bordallo et al., 1998; Kwon et al., 1998).

Inzwischen sind in *S. cerevisiae* 47 Gene bekannt, die für Proteine mit RING Domäne kodieren. Mindestens 26 dieser RING Proteine kodierenden Hefegene sind in

eukaryontischen Zellen stark konserviert, wie man unter anderem auch durch das Auffinden menschlicher Orthologe sehen kann (Li et al., 2008). Die meisten der entdeckten RING Proteine, die näher untersucht wurden, agieren als Ubiquitin-Ligasen. Jedoch ist mittlerweile auch bekannt, dass nicht jede RING Domäne E3-Aktivität besitzt. Erst durch die direkte Interaktion mit einem anderen RING Protein unter Ausbildung eines Heterodimers wird ihre E3-Aktivität stimuliert. Prominente Beispiele hierfür sind die Bard1/Brac1, Bmi1/Ring1b und MdmX/Mdm2 heterodimeren E3-Ubiquitin-Ligasekomplexe (Hashizume et al., 2001; Wang et al., 2004; Linares et al., 2003).

RING Ubiquitin-Ligase-Komplexe wie der APC/C- oder SCF-Komplex (APC/C: anaphase promoting complex/cyclosome; SCF: Skp1-Cul-F-box) bestehen aus mehreren Untereinheiten, von denen einige austauschbar sind (Willems et al., 2004). Dadurch erhält die Zelle die Möglichkeit, mit ein und demselben Grundkomplex sich den wandelnden Bedingungen anzupassen und mehrere Substrate spezifisch zu ubiquitinieren. Dabei lagern sich an einen "Kernkomplex" über unterschiedliche Bindedomänen, z.B. WD40-/Kelch-repeats, F-box oder Leucin-reiche Sequenzen, Adaptorproteine an, die nun selbst über spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen Substratproteine rekrutieren und polyubiquitinieren (Skowyra et al., 1997; Kus et al., 2004; Willems et al., 2004).

#### **2.3.4 Katabolitinaktivierung und Katabolitdegradation gluconeogenetischer Enzyme**

Inaktivierung der Fruktose-1,6-bisphosphatase

Werden Hefezellen auf nicht-fermentierbaren, natürlichen Kohlenstoffquellen wie Ethanol herangezogen, wird das gluconeogenetische Enzym Fruktose-1,6-bisphosphatase exprimiert. Unter diesen Bedingungen ist die FBPase ein langlebiges Protein mit einer Halbwertszeit von ungefähr 90 Stunden (Funayama et al., 1980). Ändert man die Wachstumsbedingungen und bietet den Hefezellen Glukose an, wird die FBPase sehr schnell inaktiviert und abgebaut (Holzer, 1976; 1989; Gancedo, 1971). Um diesen Prozess einzuleiten, reichen schon sehr geringe Glukosemengen (ungefähr 0.005% im Medium) (Mercado et al., 1994). Gleichzeitig reprimiert die Zelle das *FBP1* Gen, um die weitere Expression des Proteins zu unterbinden (Mercado et al., 1991; Yin et al., 1996). Um die katalytische Funktionalität der FBPase möglichst schnell herabzusetzen, wird diese reversibel phosphoryliert (Müller and Holzer, 1981; Mazón et al., 1982; Purwin et al., 1982),

und durch AMP und Fruktose-2,6-bisphosphat allosterisch inhibiert (Pohlig et al., 1983; Rolland et al., 2002) (Abb.4). Die Phosphorylierung findet am Serin 11 der FBPase statt und ist ein Proteinkinase-A-abhängiger Prozess (Rittenhouse et al., 1984; 1987). Die Annahme, dass die Phosphorylierung auch als Schalter für den proteasomalen Abbau dient, erwies sich als falsch. Mit einer FBPase<sup>S11A</sup>-Mutante konnte gezeigt werden, dass auch die nicht phosphorylierte FBPase-Variante trotzdem ubiquitiniert und abgebaut wird (Hämmerle et al., 1998). In der gleichen Studie konnte weiter gezeigt werden, dass der N-Terminus der FBPase für die Ubiquitinierung und den nachfolgenden Abbau eine essentielle Rolle spielt.

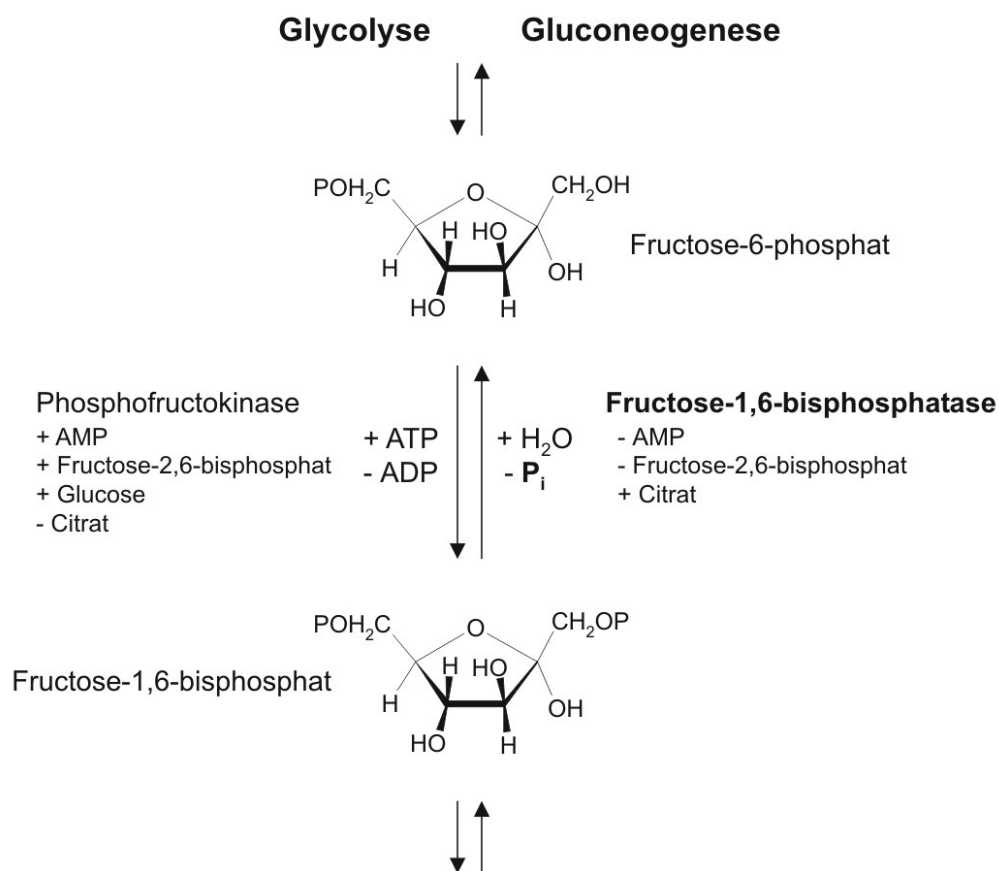


Abbildung 4: **FBPase katalysierte Teilreaktion der Gluconeogenese und Umkehrreaktion der Glykolyse.**

Fructose-1,6-bisphosphat wird von FBPase zu Fructose-6-phosphat hydrolysiert. Hohe Citratkonzentrationen stimulieren, hohe AMP- oder Fructose-2,6-bisphosphatkonzentrationen hemmen diese Reaktionen. Die glykolytische Gegenreaktion der Phosphofruktokinase wird invers reguliert.

#### Abbau gluconeogenetischer Enzyme über das Ubiquitin-Proteasom-System

Die FBPase ist hinsichtlich ihrer Inaktivierung und dem daran anschließenden proteasomalen Abbauprozess eines der am Besten untersuchten gluconeogenetischen

Enzyme. Jedoch beschreiten weitere gluconeogenetische Enzyme wie die Enzyme PEPCK und c-MDH den gleichen Degradationsweg (Müller and Holzer, 1981; Holzer, 1976; Minard and McAlister-Henn, 1992; 1994; Holzer, 1989). Mittels proteasomaler Mutanten konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass der Abbau der FBPase über das Ubiquitin-Proteasom-System unter der Beteiligung der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc1, Ubc4 und Ubc5 stattfindet (Schork et al., 1994b; 1994a; 1995). Weitere Studien identifizierten drei Gene, deren Nullmutanten zur Stabilisierung von FBPase nach Glukosegabe führen, und daraufhin mit *GID1-3* bezeichnet wurden (englisch: glucose induced degradation deficient) (Hämmerle et al., 1998). *Gid3* ist identisch mit Ubc8, einem weiteren Ubiquitin-konjugierendem Enzym. *Gid3* ist essentiell für die Polyubiquitinierung von FBPase und den glukoseinduzierten proteasomalen Abbau (Schüle et al., 2000). Wenig später konnte unser Labor sechs weitere *GID* Gene identifizieren, die am proteasomabhängigen Degradationsprozess von FBPase beteiligt sind (Regelmann et al., 2003).

Alle *Gid*-Proteine (*Gid1*, *Gid2* und *Gid4-9*), ausgenommen *Gid6*, konnten in einem Glycerin-Dichte-Gradienten in höhermolekularen Fraktionen gefunden werden. Sie kofraktionierten dabei mit der Aminopeptidase 1 (*Ape1*), einem Proteinkomplex von ungefähr 600 kDa. *Gid6* entspricht einem schon bekannten Enzym: *Ubp14*. Dieses zur Familie der deubiquitinierenden Enzyme gehörende Protein regeneriert einzelne Ubiquitin-Moleküle aus Polyubiquitinketten, nachdem diese vom Substrat am Proteasom abgespalten wurden. Die Deletion von *UBP14* führt zur Akkumulation freier Polyubiquitinketten in der Zelle und der kompetitiven Hemmung des 26S-Proteasoms, wodurch Proteolysedefekte auftreten können (Amerik and Hochstrasser, 2004; Eisele et al., 2006; Pickart, 1997).

Nach Glucosegabe konnte für *Gid1*, *Gid2*, *Gid4*, *Gid5* und *Gid7-9* mittels Immunopräzipitationsexperimenten nachgewiesen werden, dass sie gemeinsam in einem Proteinkomplex vorliegen (Pfirrmann, 2006). *Gid4* nimmt dabei eine gewisse Sonderstellung ein, da es erst mit Glukosegabe exprimiert wird und nach ca. 30 min wie FBPase wieder durch den *Gid*-Komplex proteasomal abgebaut wird (Santt et al., 2008). Die verbleibenden sechs *Gid*-Proteine werden auch schon unter gluconeogenetischen Bedingungen ständig exprimiert und bilden einen stabilen Proteinkomplex (Santt et al., 2008). Eine Interaktion mit *Gid3* konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse konnten nahezu parallel durch systematische, massenspektrometrische Analysen bestätigt werden (Pitre et al., 2006; Ho et al., 2002; Krogan et al., 2006). Ho et al. identifizierte neben *Gid1*, *Gid2*, *Gid4*, *Gid5*, *Gid8* und *Gid9* auch noch *Cft19*, *Moh1*, *Ume1*,

Shs1, Hxt7 und Vma1 als Interaktionspartner von Gid7. Krogan und Kollegen fanden bei einer proteomweit durchgeführten Reinigung von Proteinen mittels TAP-Tag (englisch: tandem affinity purification) Gid1 als Teil eines Komplexes, den sie als Vid30c-Komplex bezeichneten. Neben Gid2, Gid4, Gid5, Gid7, Gid8, Gid9 wurde noch ein nicht weiter charakterisiertes Protein, Ydl176w, als Interaktionspartner gefunden. Pitre et al. versuchten durch Computer-basierte Protein-Protein-Interaktionsvorhersagen die Topologie des Vid30c-Komplexes weiter aufzulösen. In  $\Delta$ gid2- und  $\Delta$ gid8-Stämmen durchgeführte Proteinreinigungen mit Gid1-TAP unter glykolytischen Bedingungen ergaben einen Kernkomplex, bestehend aus Gid1, Gid5, Gid8 und Ydl176w.

Diese Vorhersagen konnten von unserem Labor nur zum Teil bestätigt werden, eine Studie zur Topologie des Gid-Komplexes, die auch die Rolle der vielfach auftretenden Proteinbindedomänen in den einzelnen Gid-Proteinen aufklärt, steht kurz vor der Publikation (Menssen et al., submitted).

Die Funktion einzelner Gid-Proteine liegt derzeit noch im Dunkeln, jedoch konnten bei einer bioinformatischen Sequenzanalyse zwei Gid-Proteine als Träger einer degenerierten RING-Domäne gefunden werden: Gid2 und Gid9. Proteine mit RING Domänen sind in vielen Fällen Teil eines Ligasekomplexes (Lorick et al., 1999; Joazeiro and Weissman, 2000). Durch Mutation hochkonservierter Cysteinreste in diesen beiden Untereinheiten, die auch hier höchstwahrscheinlich für die Komplexierung von  $Zn^{2+}$ -Ionen verantwortlich sind und dadurch die Struktur des Proteins stabilisieren, konnte für beide Proteine gezeigt werden, dass die Polyubiquitinierung von FBPase, PEPCK und c-MDH zum Erliegen kommt (Santt et al., 2008; Braun et al., 2011). Ausgelöst wird der Gid-Komplex vermittelte Abbauprozess durch das Auftauchen von Gid4 nach Glukosegabe (Santt et al., 2008).

Weiter konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass das Hsp70 Chaperon Ssa1 und ein bekannter Co-Faktor, der "nucleotide exchange factor" (NEF) Snl1 mit FBPase interagieren und bei dessen Polyubiquitinierung eine essentielle Rolle spielen (Juretschke et al., 2010). Ebenso konnte der Einfluss einer weiteren ATPase bei der Katabolitdegradation der FBPase nachgewiesen werden. Cdc48<sup>Ufd1-Npl4</sup>, eine aus sechs Untereinheiten aufgebaute AAA-ATPase und seine Co-Faktoren Ufd1 und Npl4, sowie die proteasomalen Ubiquitinbindenden Rezeptorproteine Dsk2 und Rad23 spielen nach der Polyubiquitinierung der FBPase/PEPCK bei der Entfaltung des ubiquitinmarkierten Proteins am Proteasom eine wichtige Rolle (Barbin et al., 2010).

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Der Gid-Komplex**

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass neun sogenannte *GID* Gene für den reibungslosen Ablauf der Katabolit-induzierten Degradation von FBPase essentiell sind. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass sieben der Gid-Proteine (Gid1, Gid2, Gid4, Gid5, Gid7, Gid8 und Gid9) in einem Komplex vorliegen und als Ubiquitin-Ligase (E3) die Polyubiquitinierung von gluconeogenetischen Enzymen nach Glucosegabe zum Nährmedium bewerkstelligen (Regelmann et al., 2003; Santt et al., 2008). Gid3/Ubc8 ist in diesem Prozess das wichtigste Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) (Schork et al., 1995; Schüle et al., 2000). Gid6 ist identisch mit Ubp14, einem deubiquitinierenden Enzym (Pickart, 1997). Gid4 dient als molekularer Schalter, da es in weniger als fünf Minuten nach Glucosegabe exprimiert wird und die Ubiquitinierung von FBPase einleitet (Santt, 2009). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Gid2/Rmd5 und Gid9/Fyv10 die katalytischen Untereinheiten des Gid-Komplexes darstellen und für die Polyubiquitinierung von FBPase, PEPCK und c-MDH verantwortlich sind (veröffentlicht in (Santt et al., 2008; Braun et al., 2011)).

### **3.2 Sequenzanalyse von Gid2 und Gid9**

Alle Gid-Proteine besitzen verschiedene funktionelle Domänen, die sie für weitergehende Untersuchungen sehr interessant machen. Funktionelle Domänen sind Elemente, die sich unabhängig vom restlichen Protein falten können und in vielen Fällen eine bestimmte Funktion (Bindestelle, katalytisches Zentrum, etc.) erfüllen. Da solche Domänen von der Evolution oftmals konserviert wurden und ähnlich einem Baukastenprinzip funktionieren, ist es heute möglich, die Funktion unbekannter Proteine durch Vergleich der Aminosäuresequenz mit bereits gut charakterisierten Proteinen vorherzusagen. Dabei kann man auf umfangreiche Datenbanken zurückgreifen, die bestehende Homologien zwischen Proteinen aufzeigen (yeastgenome.org; smart.embl-heidelberg.de) (Ponting et al., 1999; Schultz et al., 2000; 1998; Letunic et al., 2011). Diese werden fortlaufend weiterentwickelt und mit neuen Daten ergänzt.



Für die Gid-Proteine erhält man bei SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) derzeit folgendes Bild:

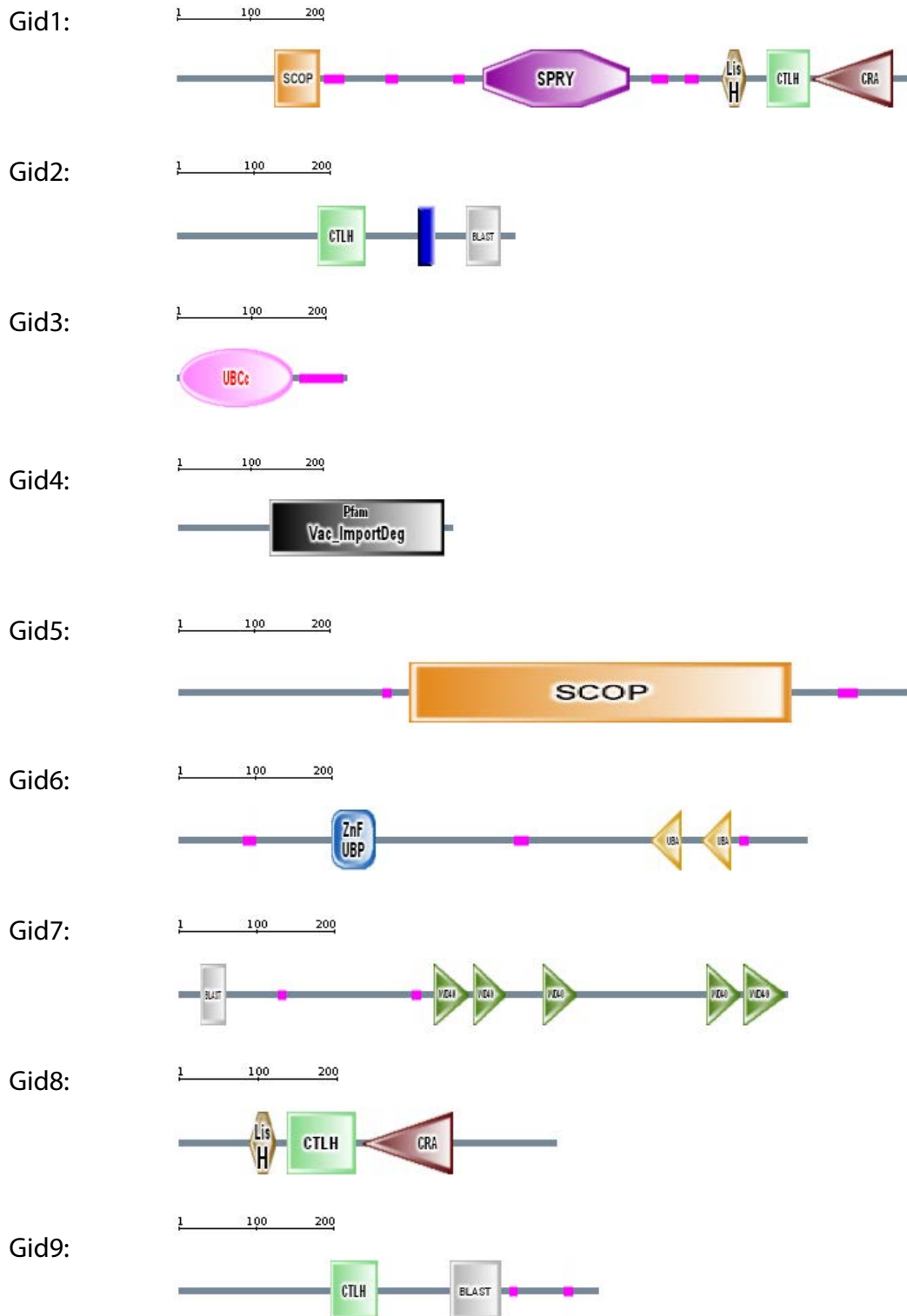


Abbildung 5: **Mit SMART vorhergesagte Domänenstruktur der Gid-Proteine.** SPRY (SPIa and ryanodine receptors), LisH (Lissencephaly type-1-like homology), CTLH (C-terminal to LisH), CRA (CT11-RanBPM), WD40

Domäne, ZnF-UBP (Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase-like zinc finger), UBA (Ubiquitin-associated domain), UBCc (Ubiquitin-conjugating enzyme E2).

In diesen Ergebnissen ist kein direkter Treffer für eine Ubiquitin-Ligase typische Domäne (HECT oder RING) enthalten. Das verwundert, konnte doch für Gid2 gezeigt werden, dass die Deletion der codierenden Sequenz zu einer fehlenden Polyubiquitinierung von FBpase führt (Regelmann et al., 2003). Jedoch wurde ein Bereich in Gid2 gefunden (Aminosäurereste 361-404, BLAST), der mit der klassischen RING-Domänen verwandt sein könnte. Um eine eventuell vorhandene evolutionäre Verwandtschaft näher zu untersuchen, wurde ein Sequenzalignment von Gid2 aus *S. cerevisiae* und homologen Proteinen aus anderen Organismen sowie von unterschiedlichsten Vertretern der klassischen RING-Proteinfamilie erstellt (Abb. 6A) (Santt et al., 2008; Pfirrmann, 2006). Dabei wurde ein als degenerierter RING-Finger bezeichneter Sequenzbereich identifiziert, der fünf der acht  $Zn^{2+}$ -bindenden, konservierten Aminosäurereste einer RING-Domäne aufweist (Positionen 1, 3, 4, 7 und 8) (Abb. 6A). Für Gid9 wurde nach der gleichen Methode eine Sequenzanalyse durchgeführt, und auch hier wurde eine degenerierte RING-Domäne gefunden, jedoch sind hier nur die Aminosäurereste auf Position 1 und 2 konserviert (Abb. 6B). Die Cartoons in Abbildung 6A und 6B geben die Größe der vorhergesagten funktionellen Domänen einschließlich der degenerierten RING Domäne in Gid2 und Gid9 sowie ihre relative Lage in der Primärstruktur/Sekundärstruktur des Proteins an. Der grau oder schwarz hinterlegte Hintergrund in den Alignments markiert Aminosäurepositionen, die in mindestens 50 % der Sequenzen konserviert oder durch chemisch verwandte Aminosäurereste substituiert sind. Die Nummern 1-8 über dem Alignment heben die Positionen hervor, die in klassischen RING-Finger-Proteinen für die  $Zn^{2+}$ -Bindung zuständig sind. Die rot unterlegten Zahlen markieren die Stelle der eingefügten Punktmutation in Gid2 (C379S) und Gid9 (C434S), die für später beschriebene Experimente von Bedeutung sind. Die mit einem # markierten Aminosäurereste sind für die Interaktion zwischen UbcH7 und Cbl essentiell.

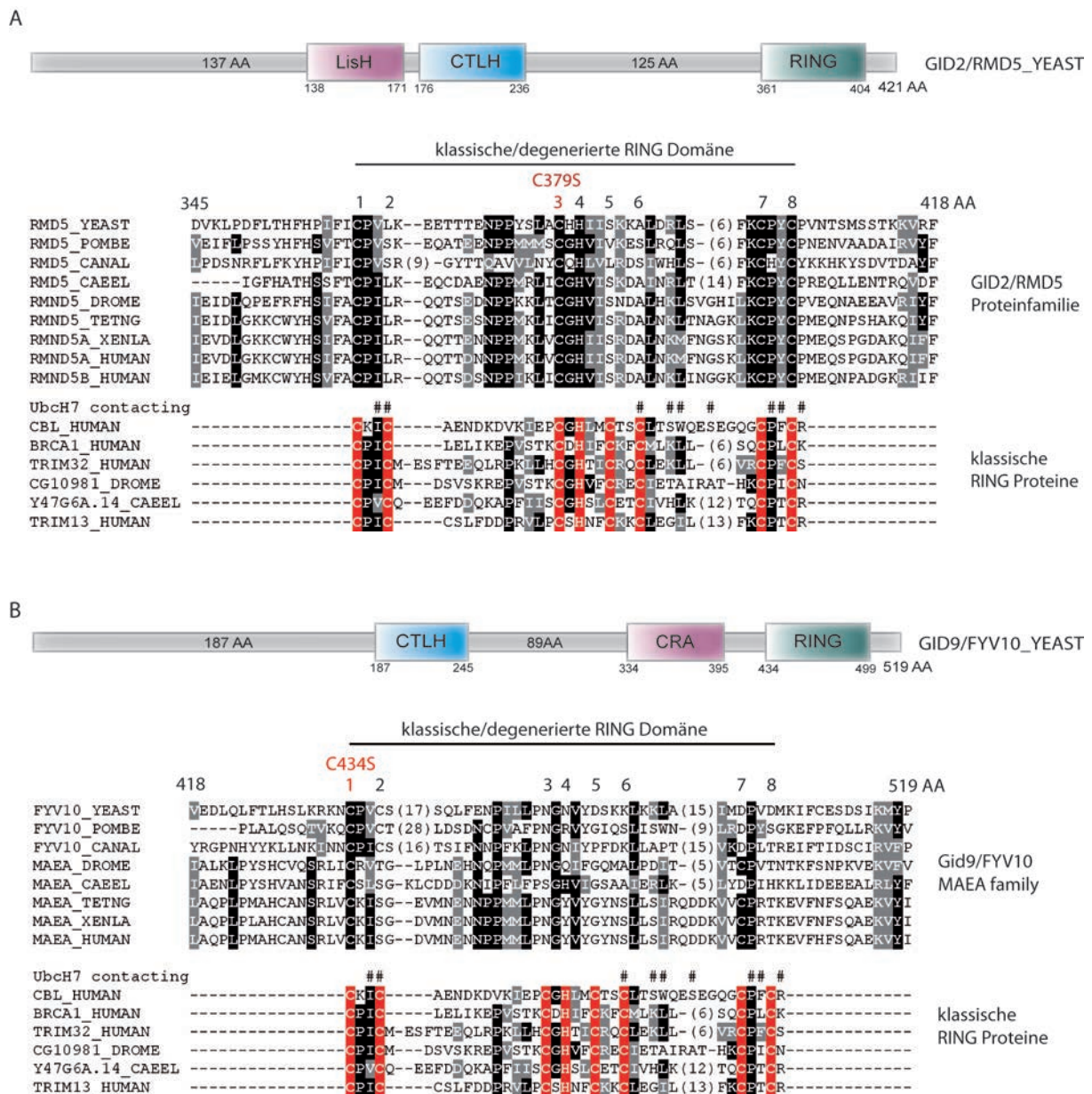


Abbildung 6: Sequenzabgleich klassischer RING-Proteine mit Vertretern der Gid2/Rmd5 Proteinfamilie (A) und der Gid9/MAEA Proteinfamilie (B). Die Cartoons geben die Größe der vorhergesagten funktionellen Domänen in Gid2 und Gid9 sowie ihre relative Lage in der Primärstruktur/Sekundärstruktur des Proteins an. Grau oder schwarz hinterlegter Hintergrund markiert Aminosäurepositionen, die in mindestens 50 % der Sequenzen konserviert oder durch chemisch verwandte Aminosäurereste substituiert sind. Die Nummern 1-8 über dem Alignment heben die Positionen hervor, die in klassischen RING-Finger-Proteinen für die Zn<sup>2+</sup>-Bindung zuständig sind. Die rot unterlegten Zahlen markieren die Stelle der eingefügten Punktmutationen in Gid2 (C379S) und Gid9 (C434S). # markiert Aminosäurereste, die für die Interaktion zwischen Ubch7 und Cbl essentiell sind. MAEA: macrophage erythroblast attacher. Abkürzung der Spezies: YEAST, *Saccharomyces cerevisiae*; POMBE, *Schizosaccharomyces pombe*; CANAL, *Candida albicans*; DROME, *Drosophila melanogaster*; CAEEL, *Caenorhabditis elegans*; TETNG, *Tetraodon nigroviridis*; XENLA, *Xenopus*

*laevis*; HUMAN, *Homo sapiens*. (Alignments wurden erstellt von der Firma MEMOREC)(Abbildung modifiziert aus (Santt et al., 2008; Braun et al., 2011)).

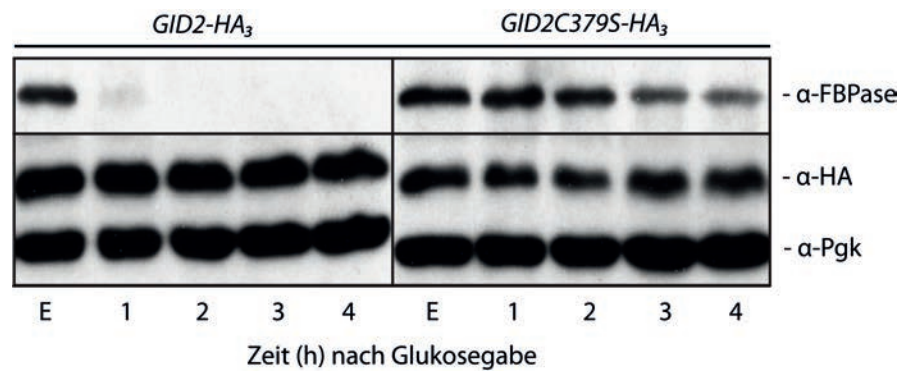
### 3.3 Inaktivierung der Gid2-RING-Domäne

Um die Ubiquitin-Ligaseaktivität von Gid2 *in vitro* und *in vivo* zu charakterisieren, wurde mit den nun neu gewonnenen Erkenntnissen der bioinformatischen Sequenzanalyse der hochkonservierte Aminosäurerest Cystein 379 der postulierten, degenerierten RING-Domäne in Gid2 mutiert. Das mutierte *GID2C379S* Gen wurde ohne seinen endogenen Promotor/Startcodon und mit einem T<sub>ADH1</sub>-Terminator in den Plasmidvektor pRS306 kloniert und nach enzymatischem Verdau mit BlnI in einen  $\Delta$ *gid2* Stamm transformiert (siehe Material & Methoden). Bei RING-E3-Ligasen ist bekannt, dass durch eine Mutation der konservierten Cys-Reste in der RING Domäne die Funktionalität des Proteins nachhaltig zerstört wird (Bordallo and Wolf, 1999). Erste FB Pase Degradationsexperimente in einem das mutierte *GID2C379S* tragendem Stamm erhärteten diesen Verdacht. Die Aussagekraft dieses Experiments war jedoch gering, da die Expression des mutierten Proteins aufgrund fehlender Antikörper nicht nachgewiesen werden konnte (Pfaffmann, 2006). Aus diesem Grund wurde Gid2C379S mit einem dreifachen Hämagglutinin-(HA<sub>3</sub>)-Epitop-Tag am C-terminalen Ende versehen. Das HA-Epitop ist sehr klein, beeinflusst die Proteinfunktion in der Regel nicht und es sind kommerziell sehr spezifische Antikörper gegen das Epitop erhältlich. Es konnte in der Tat gezeigt werden, dass die Funktionalität von Gid2 durch die Fusion mit dem HA<sub>3</sub>-Epitop nicht beeinträchtigt wird: FB Pase wird in einem *GID2-HA<sub>3</sub>* Stamm nach Glucoseshift wildtypmäßig abgebaut und Gid2-HA<sub>3</sub> über die gesamte Versuchszeit gleichmäßig exprimiert (Abb. 7A, (Regelmann et al., 2003)). In dieses Genkonstrukt wurde erneut die Punktmutation C379S eingefügt, indem der genetische Code an dieser Stelle durch einen Primer so variiert wurde, dass der Dreibasencode "TGC" für Cystein in "AGC" umgewandelt wurde und somit nun für Serin kodiert. So erhält man ein Plasmid pRS316Gid2C379S-HA<sub>3</sub> das den ORF (open reading frame) für *GID2C379S-HA<sub>3</sub>* gemeinsam mit seinen endogenen Promotor- und Terminatorregionen trägt (verwendete Primer und Restriktionsenzyme siehe Material & Methoden). Der korrekte Austausch der Base T gegen A wurde mittels Sequenzierung überprüft. Wie man in Abbildung 7A sehen kann, ist der FB Pase-Abbau in der Gid2-Mutante im Vergleich zum Wildtyp-Protein stark verlangsamt. Die Expression von Gid2-HA<sub>3</sub> und Gid2C379S-HA<sub>3</sub> ist unter Derepressionsbedingungen und während der kompletten Degradationsphase von FB Pase

stabil, wodurch eine eventuelle Destabilisierung des Proteins durch das Anfügen des HA<sub>3</sub>-Epitops ausgeschlossen werden kann. Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass der hochkonservierte Aminosäurerest Cys379 tatsächlich für einen effizienten FB Pase-Abbau notwendig ist. Dies untermauert die Annahme, dass es sich bei der identifizierten Gid2-Domäne um eine degenerierte RING-Domäne handeln könnte. Die unterste Reihe von Abb. 7A zeigt als Ladekontrolle das konstitutiv exprimierte Protein 3-Phosphoglyceratkinase (Pgk), wodurch ein gleichmäßiges Auftragen der Proben sichergestellt wurde.

Das erhaltene Ergebnis konnte durch eine Pulse-Chase-Analyse verifiziert und quantifiziert werden (Abb. 7B).

A



B

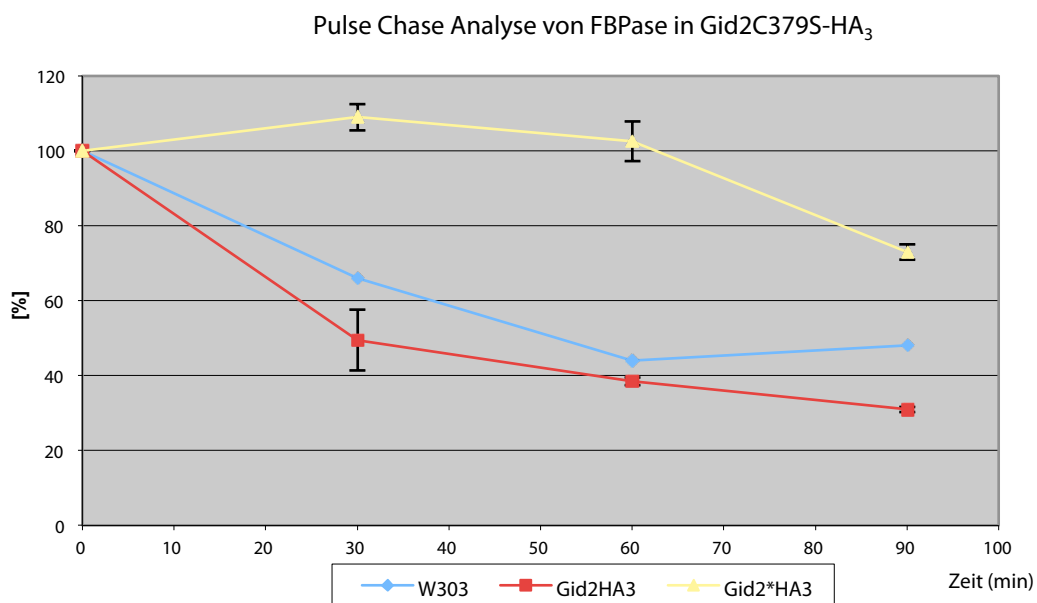


Abbildung 7: **Der konservierte AS-Rest Cys379 ist für einen effizienten FB Pase-Abbau notwendig.** (A) Hefestämme, die Gid2-HA<sub>3</sub> oder Gid2C379S-HA<sub>3</sub> exprimieren wurden für 16 h in YPethanol Medium bei 25 °C kultiviert. 1.5 OD<sub>600</sub> Zellen wurden entnommen (E) und nach Überführung der Zellen in YPD Medium jede weitere Stunde eine Probe gezogen. Nach Zellyse, SDS-PAGE und einem Westernblot wurden der FB Pase-Abbau und die Gid2-Expression mittels spezifischer Antikörper detektiert. Ladekontrolle: Pgc, 3-Phosphoglycerat Kinase. (B) Pulse-Chase-Experiment zum FB Pase Abbau in Gid2C379S-HA<sub>3</sub>. Die Zellen wurden wie unter 4.5.14 beschrieben angezogen und Proben entnommen. Die Immunopräzipitation erfolgte mit je 3 µl FB Pase-Antikörpern. Detektiert wurde die prozentuale Abnahme der FB Pase-Konzentration. Die Quantifizierung wurde mithilfe der ImageQuaNT 5.2 Software von Molecular Dynamics durchgeführt. W303, Wildtypstamm; Gid2\*HA<sub>3</sub> bezeichnet die Gid2C379S-HA<sub>3</sub> Mutante.

### 3.4 E3-Ubiquitin-Ligaseaktivität von Gid2

RING-Ubiquitinligasen können einzelne Proteine oder aus mehreren Untereinheiten aufgebaute Proteinkomplexe sein. Allen gemein ist die RING-Finger-Domäne mit ihren acht konservierten Cys/His-Resten, die zwei Zn<sup>2+</sup>-Ionen komplexieren und dadurch die spezifische E3-Ligaseaktivität gewährleisten (Lorick et al., 1999; Fang and Weissman, 2004). Die meisten RING-Proteine behalten diese Ligaseaktivität auch in einem artifiziellen Versuchssystem bei, wenn sie nur mit den essentiellen Komponenten des Ubiquitin-Systems zusammengebracht werden (Enzyme E1 und E2, ATP, Ubiquitin sowie ATP-Regenerationslösung). Setzt man in einem solchen *in vitro* Experiment gereinigte Proteinproben ein, erfolgt eine Autopolyubiquitinierung des eingesetzten E3's. Arbeitet man dagegen mit bakteriellen Zellysaten in denen das zu untersuchende E3-Enzym enthalten ist, erfolgt eine wahllose Polyubiquitinierung verschiedenster Proteine. Der Einsatz von Zellysat ist möglich, da das Ubiquitin-System zwar in allen Eukaryonten verbreitet ist, in Bakterien jedoch nicht gefunden wurde. In Bakterien übernimmt möglicherweise das Proteine "Pup" (prokaryotic ubiquitin like protein) die Aufgabe von Ubiquitin (Burns and Darwin, 2010). Nachdem für die *GID2C379S-HA<sub>3</sub>* Mutante *in vivo* gezeigt werden konnte, dass die partielle Zerstörung der Zn<sup>2+</sup> Koordinationsstelle zum vollständigen Ausbleiben der FB Pase-Polyubiquitinierung führt (Santt, 2009), sollte nun die E3-Aktivität von Gid2 *in vitro* überprüft werden. Hierfür wurden verschiedene GST-Gid2-Fusionsproteine hergestellt (Material & Methoden; P. Kimmig, Diplomarbeit 2007) und in *E. coli* BL21 Zellen exprimiert. Um das Aggregieren der Proteine zu verhindern (Bildung von "inclusion bodies"), erfolgte die Expression der GST-Fusionsproteine in den Bakterien möglichst langsam bei 16 °C für 14 h. Danach wurden die Zellen geerntet, in PBS-

Puffer aufgenommen und mit einer French Press lysiert. Die Lysate wurden mit E1, E2 (UbcH5b), ATP, HA-Ubiquitin und ATP-Regenerationsmix versetzt und für 2 h bei 30 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach einer SDS-PAGE und einem Westernblot wurde die Ubiquitinierung mit HA-Antikörpern detektiert.

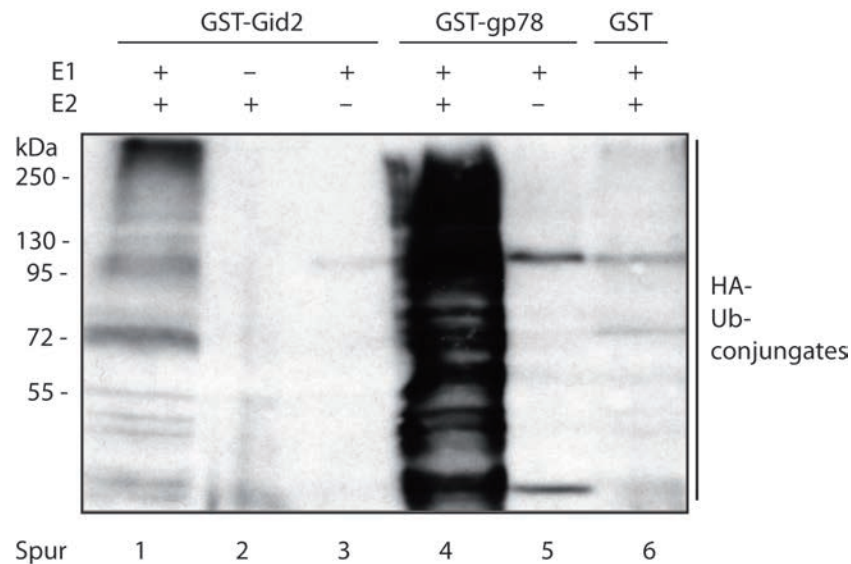


Abbildung 8: **Gid2 besitzt E3-Ligaseaktivität.** Gid2 ubiquitiniert Proteine *in vitro*. Gid2, das tierische RING-Finger-Protein gp78 (Positivkontrolle) und GST (Negativkontrolle) wurden in *E. coli* exprimiert und nach Lyse der Zellen mit E1, E2 (UbcH5b), ATP und HA-Ubiquitin für 2 h bei 30 °C inkubiert. Um die Spezifität der Reaktion beurteilen zu können, wurden die gleichen Lysate ohne E1 oder E2 inkubiert. Nach SDS-PAGE wurde die Polyubiquitinierung mit monoklonalem HA-Antikörper sichtbar gemacht.

Als Positivkontrolle für eine erfolgreiche Ubiquitinierungsreaktion wurde gp78 eingesetzt. Gp78 ist eine menschliche, gut charakterisierte ERAD-(endoplasmatic reticulum associated degradation) E3-Ligase (Chen et al., 2006). Wie man in Abbildung 8 deutlich sehen kann, ist die Ubiquitinierungsreaktion mit gp78 (Positivkontrolle, Abb. 8, Spur 4) besonders stark. Die Reaktion verläuft spezifisch, da in der Probe ohne E2-Enzym keine signifikante Ubiquitinierung erkennbar ist (Abb. 8, Spur 5). Das GST-Gid2-Fusionsprotein zeigt ebenfalls eine deutliche Polyubiquitinierungsreaktion (Abb. 8, Spur 1), während beide Negativkontrollen (E1 bzw. E2 wurde nicht zugegeben) kein Ubiquitinsignal erkennen lassen (Abb. 8, Spur 2 & 3). Auch die Probe, in der GST anstatt eines E3-Enzyms in den Reaktionsansatz gegeben wurde, zeigt keine Polyubiquitinierung von Protein (Negativkontrolle, Abb. 8, Spur 6). Aus den Ergebnissen von Abb. 7 und 8 kann geschlossen werden, dass Gid2 E3-Aktivität besitzt und der Gid-Komplex damit wahrscheinlich den

gesuchten E3-Ubiquitinligasekomplex für die Polyubiquitinierung von FBPase darstellt (publiziert in (Santt et al., 2008)).

Gid2 besitzt neben seiner degenerierten RING-Domäne noch zwei weitere Domänen (LisH und CTLH, siehe Abb. 6), die die Interaktion zu anderen Proteinen vermitteln können. Um auszuschließen, dass eine dieser Domänen für die Polyubiquitinierungsreaktion von Bedeutung ist, wurden zwei weitere GST-Gid2-Fusionsproteine entworfen. Einerseits wurde der N-terminale Teil von Gid2 mit GST verknüpft (GST-Gid2<sub>1-173</sub>, umfasst die LisH-Domäne, siehe Abb. 9), andererseits der C-terminale Teil (GST-Gid2<sub>281-421</sub>, umfasst eine transmembrane Domäne und die RING-Domäne, siehe Abb. 9). Das Mittelstück von Gid2 mit der CTLH-Domäne wurde nicht weiter in Betracht gezogen (siehe Abb. 6). Das Experiment zeigt die Polyubiquitinierungsreaktion, die durch die Gid2 Fragmente induziert wird. Die Immundetektion erfolgte mit HA-Antikörpern. Wie man in Abbildung 9 sehen kann, findet in zwei Proben eine Polyubiquitinierungsreaktion statt. Mit GST-gp78 (Positivkontrolle) erhält man ein sehr starkes Ubiquitinierungssignal (Abb. 9, Spur 2). Das C-terminale GST-Gid2-Fusionsprotein zeigt ebenfalls das typische Ubiquitin-Signal (Abb. 9, Spur 4). Die Negativkontrolle (GST) zeigt kein Signal (Abb. 9, Spur 1), die Reaktion verlief damit spezifisch. Auch der Reaktionsansatz mit dem N-terminalen Gid2-Fragment zeigt keinerlei Polyubiquitinierung von Protein (Abb. 9, Spur 3). Dieses Ergebnis zeigt, dass für die E3-Aktivität von Gid2 nur der C-Terminus benötigt wird welcher die RING-Domäne trägt. Die degenerierte RING-Domäne in Gid2 ist für eine erfolgreiche Polyubiquitinierung ausreichend.



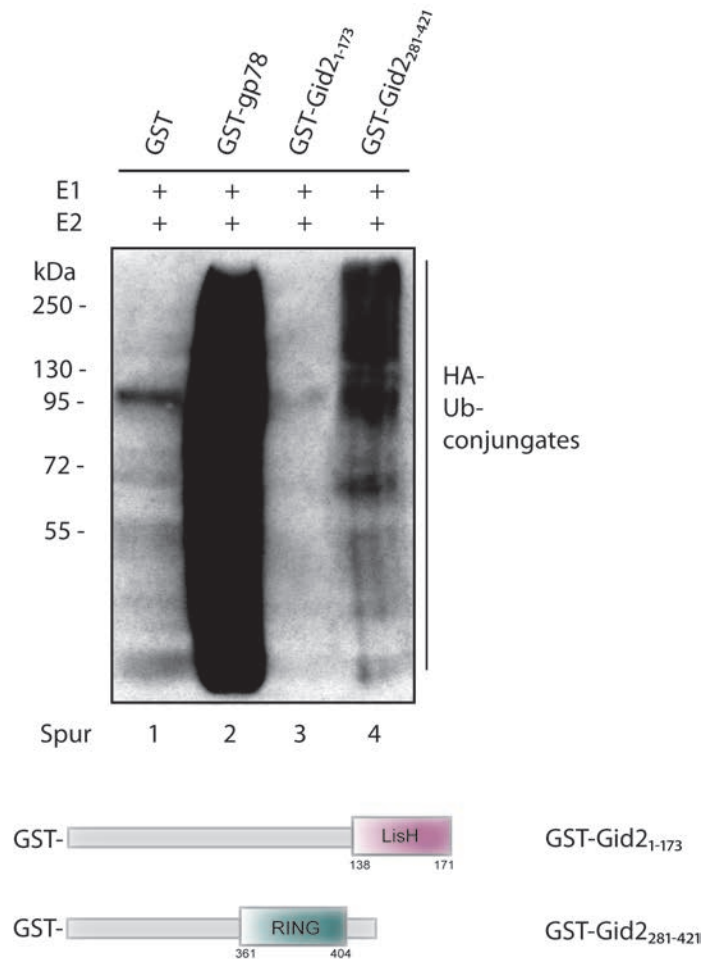


Abbildung 9: **Die Ligaseaktivität von Gid2 beruht auf der RING-Domäne in Nähe des C-Terminus.** GST, das tierische RING-Finger-Protein gp78, ein N-terminales Gid2-Fragment (GST-Gid2<sub>1-173</sub>) sowie ein C-terminales Gid2-Fragment (GST-Gid2<sub>281-421</sub>) wurden in *E. coli* exprimiert und nach der Zellyse mit E1, E2 (UbcH5b), ATP und HA-Ubiquitin für 2 h bei 30 °C inkubiert. Die Immunodetektion der Polyubiquitinierungsreaktion erfolgte nach SDS-PAGE mit monoklonalem HA-Antikörper. Die Cartoons geben die Fragmente des Proteins Gid2 und die darin enthaltenen Domänen wieder, die für das Experiment an GST fusioniert eingesetzt wurden.

### 3.5 Inaktivierung der RING-Domäne in Gid9

Gid9 ist neben Gid2 eine weitere Komponente des Gid-Komplexes, die eine degenerierte RING-Domäne besitzt. Da auch hier kein spezifischer Antikörper gegen das Protein vorlag, wurde das Gid9 Protein, wie Gid2, mit einem C-terminalen HA<sub>3</sub>-Epitop versehen. Bei einer Überprüfung der Funktionalität von Gid9-HA<sub>3</sub> zeigte sich jedoch, dass die Verknüpfung von Gid9 mit einem HA<sub>3</sub>-Tag in einem biochemisch inaktiven Fusionsprotein resultiert.

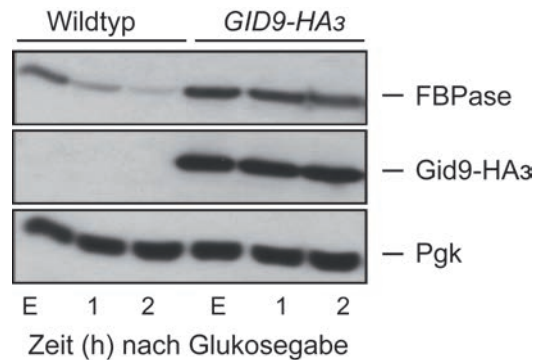


Abbildung 10: **Ein C-terminaler HA<sub>3</sub>-Tag inaktiviert Gid9.** Wildtyp Hefe und ein Stamm der die mit HA<sub>3</sub>-fusionierte Version von Gid9 exprimiert, wurden 16 h auf YPethanol Medium kultiviert. 1.5 OD<sub>600</sub> Zellen wurden entnommen (E) und nach Überführung in YPD Medium jede Stunde eine weitere Probe gezogen. Nach alkalischer Lyse und SDS-PAGE wurde der FBPase-Abbau und die Gid9-Expression mittels Immunoblotting detektiert. Ladekontrolle: Pgk, 3-Phosphoglyceratkinase.

Abbildung 8 zeigt, dass nach dem Wechsel von gluconeogenetischen zu glykolytischen Bedingungen FBPase im Wildtyp (Abb. 10, linke Seite) rasch abgebaut wird. Dagegen ist ein *GID9-HA<sub>3</sub>* Stamm nicht mehr in der Lage, den FBPase-Abbau einzuleiten (Abb. 10, rechte Seite). Offensichtlich beeinträchtigt das HA<sub>3</sub>-Epitop die Funktionalität des Proteins entscheidend. Aus diesem Ergebnis lässt sich auch schlussfolgern, dass ein strukturell intaktes Gid9 Protein eine zentrale Funktion im Gid-Komplex während der Katabolit-induzierten-Degradation einnimmt. Auch die Fusion mit anderen Epitopen (GFP, Myc; C-terminal sowie N-terminal) ergab immer ein biologisch inaktives Gid9 Protein (Daten nicht gezeigt).

Für weitere Funktionsuntersuchungen musste daher ein spezifischer Antikörper gegen Gid9 hergestellt werden. Hierfür wurde ein 15 Aminosäuren langes Peptid aus der Gid9-Sequenz synthetisiert (Aminosäuren 471-486, mittels bioinformatischer Sequenzanalyse ausgewählt (Braun et al., 2011)) und zur Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet (CharlesRiver). Das gewonnene Antiserum wurde über eine Säule gereinigt (Squarix). Die gewonnenen Antikörper zeigen ein spezifisches Signal (Abb. 11, obere Reihe) und konnten damit im Folgenden für die Immunodetektion von Gid9 eingesetzt werden (Verdünnung 1:500). Aufgrund der zahlreichen Kreuzreaktionen ist der Antikörper allerdings nicht für Immunopräzipitationsexperimente geeignet.

Um die Funktionalität der vorhergesagten, degenerierten RING-Domäne in *Gid9* zu überprüfen, wurde die konservierte Aminosäure Cystein434, analog zu *Gid2*, durch ein Serin ersetzt (siehe Material & Methoden). Das mutierte *GID9C434S* Gen wurde mit seinen endogenen Promotor- und Terminatorregionen in den Plasmidvektor pRS316 kloniert und in einen  $\Delta$ *gid9* Stamm transformiert. Um die Funktionalität von *Gid9C434S* hinsichtlich der Katabolitdegradation von FBPase zu überprüfen, wurde Wildtyp *Gid9* und das mutierte *Gid9C434S* in einen  $\Delta$ *gid9* Stamm vom Plasmid exprimiert. Dazu wurden die Zellen 16 h in Selektionsmedium (CM Medium mit Ethanol als Kohlenstoffquelle und ohne Uracil (die Zelle benötigt das Plasmid zur Uracil-Synthese)) bei 30 °C kultiviert. 1.5 OD<sub>600</sub> Zellen wurden entnommen (Probe E) und danach die verbliebenen Zellen in glukosehaltiges Selektionsmedium überführt. Jede weitere Stunde wurden Proben von 1.5 OD<sub>600</sub> Zellen entnommen. Nach alkalischer Lyse der Proben, SDS-PAGE und Westernblot erfolgte die Immunodetektion der gewünschten Proteine mit spezifischen *Gid9*-, FBPase- und *Pgk*-Antikörpern.

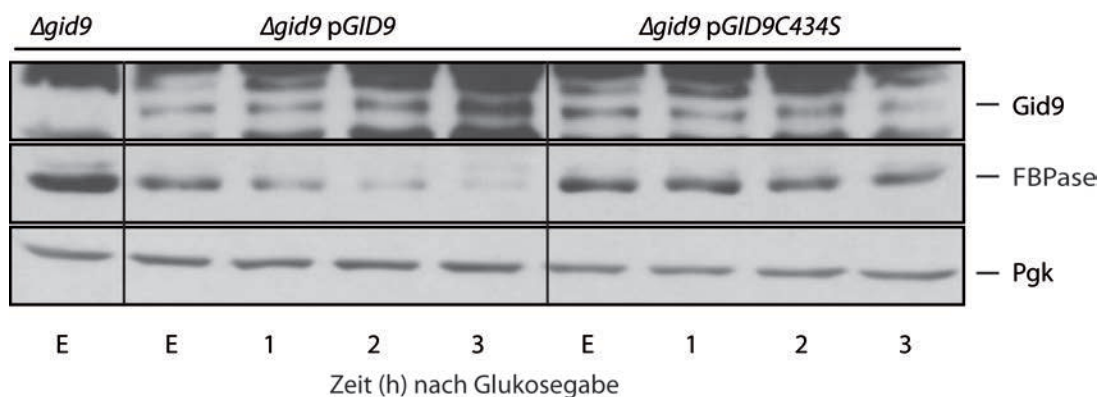


Abbildung 11: **Gid9 Expression und Stabilisierung von FBPase in einer *Gid9C434S* RING-Domänen-Mutante.** *Gid9* und *Gid9C434S* wurden in einem  $\Delta$ *gid9* Stamm vom Plasmid pRS316 exprimiert. Die Zellen wurden auf CM Medium mit Ethanol als Kohlenstoffquelle und ohne Uracil für 16 h bei 30 °C kultiviert und in dasselbe Medium überführt mit Glukose als Kohlenstoffquelle anstatt Ethanol. 1.5 OD<sub>600</sub> Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen, lysiert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Expression von *Gid9* und der FBPase-Abbau wurden immunologisch mit spezifischen Antikörpern detektiert. Ladekontrolle: *Pgk*, 3-Phosphoglyceratkinase.

Wildtyp *Gid9* und die mutierte Proteinversion *Gid9C434S* wurden unter Derepressionsbedingungen und während der kompletten Degradationsphase der FBPase exprimiert, im Wildtyp ist sogar eine leichte Zunahme der Proteinmenge nach dem Wechsel des

Mediums erkennbar (Abb. 11, oberste Zeile). Die Punktmutation beeinflusst die Stabilität von Gid9 nicht. Jedoch führt die Mutation in der RING-Domäne von Gid9 zur Inaktivierung des Proteins bezüglich der FB Pase-Degradation (Abb. 11, mittlere Reihe). Dieses Ergebnis zeigt, dass die mutmaßliche degenerierte RING-Domäne in Gid9, wie auch schon für das Protein Gid2 gezeigt (Kapitel 2.3), einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionalität des Gid-Komplexes hat. Ladekontrolle: P<sub>gk</sub>, 3-Phosphoglyceratkinase (Abb. 11, unten).

### **3.6 Einfluss der RING-Mutanten auf die Katabolitdegradation von PEPCK und c-MDH**

Neben FB Pase spielen auch die Enzyme PEPCK und c-MDH in der Gluconeogenese eine essentielle Rolle: PEPCK leitet die Gluconeogenese ein, indem es Phosphoenolpyruvat aus Oxalacetat synthetisiert, welches wiederum von der c-MDH durch die Umwandlung von Malat zur Verfügung gestellt wird. Dass ein Proteinkomplex von der Größe des Gid-Komplexes nur für die Katabolit-induzierte-Degradation der FB Pase von der Zelle konzipiert wurde, erscheint recht unwahrscheinlich. In einigen Gid-Nullmutanten konnte in der Tat gezeigt werden, dass auch die PEPCK beim Wechsel von gluconeogenetischen zu glykolytischen Bedingungen stark verlangsamt abgebaut wird (Santt et al., 2008).

#### **3.6.1 Einfluss von Gid9 auf den Abbau von PEPCK und c-MDH**

Nachdem der stabilisierende Effekt der Gid9-RING-Mutation auf den Abbau von FB Pase gezeigt werden konnte, sollte hier nun überprüft werden, ob der Gid-Komplex auch die verantwortliche E3-Ligase für die Katabolitdegradation der gluconeogenetischen Enzyme PEPCK und c-MDH ist. Zellen, die entweder das mutierte Gid9 oder seine Wildtypform vom Plasmid exprimieren, wurden 16 h in Selektionsmedium (CM Medium mit Ethanol als Kohlenstoffquelle und ohne Uracil) zur Induktion der Gluconeogenese kultiviert. 1.5 OD<sub>600</sub> Zellen wurden als Nullprobe entnommen, danach wurden die Zellen auf frisches glukosehaltiges Selektionsmedium (CM Medium ohne Uracil) umgesetzt. Jede weitere Stunde wurde eine Probe entnommen. Nach alkalischer Lyse, SDS-PAGE und einem Westernblot wurden die Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert.

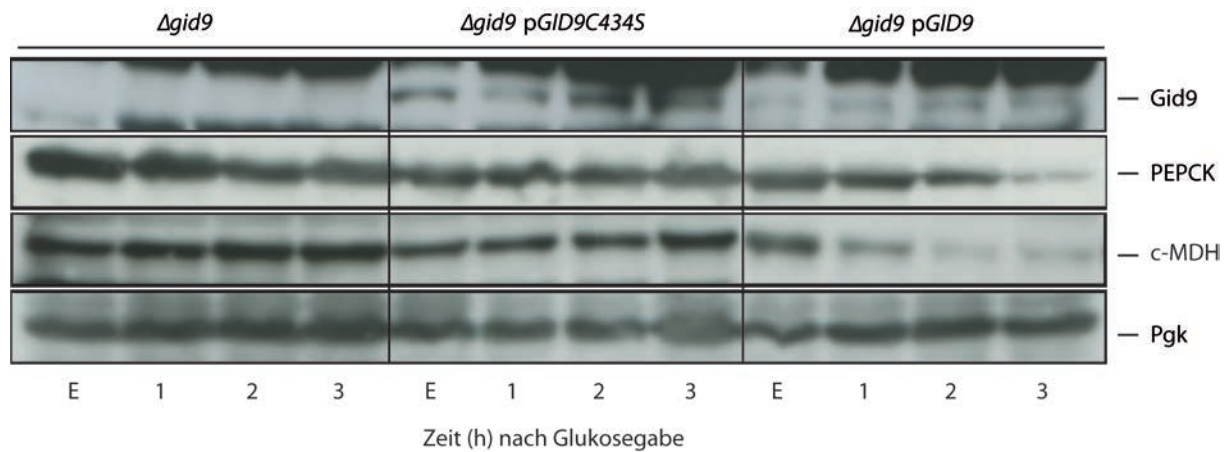


Abbildung 12: **Eine Mutation in der degenerierten RING-Domäne von Gid9 (Gid9C434S) inaktiviert das Protein in Bezug auf die Degradation von PEPCK und c-MDH.** Gid9 und sein mutierter C434S Gegenspieler wurden in einem  $\Delta gid9$  Stamm vom pRS316 Plasmid exprimiert. Die Zellen wurden 16 h bei 30 °C in CM Medium mit Ethanol als Kohlenstoffquelle und ohne Uracil inkubiert. Dann wurden sie auf das gleiche Medium umgesetzt, jedoch mit Glukose als Kohlenstoffquelle. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen. Nach Lyse und SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Immunoblotting mit spezifischen Antikörpern detektiert. Ladekontrolle: Pgk, 3-Phosphoglyceratkinase.

Wie in Abbildung 12 zu erkennen ist, werden Wildtyp Gid9 und die Gid9C434S-Mutante über den kompletten Probenzeitraum exprimiert (Abb. 12, obere Reihe). Die Enzyme PEPCK sowie auch die c-MDH werden in der Gid9C434S-Mutante nicht mehr abgebaut (Abb. 12, Bild Mitte). Im  $\Delta gid9$  Stamm in dem das Wildtyp Gid9 Protein exprimiert wird, werden beide Substratproteine normal degradiert: die Expression des Gid9-Proteins vom Plasmid komplementiert die Deletion also vollständig. Der Stabilisierungseffekt der Gid9-RING-Mutante entspricht dem eines Gen-Knockouts von *GID9* (Abb. 12, Bild linke Seite). Dieses Ergebnis führt zu dem Schluss dass der Gid-Komplex, gezeigt im Rahmen der Funktion von Gid9 auch bei der Katabolitdegradation der gluconeogenetischen Enzyme PEPCK und c-MDH eine essentielle Rolle spielt.

### 3.6.2 Einfluss von Gid2 auf den Abbauprozess von PEPCK und c-MDH

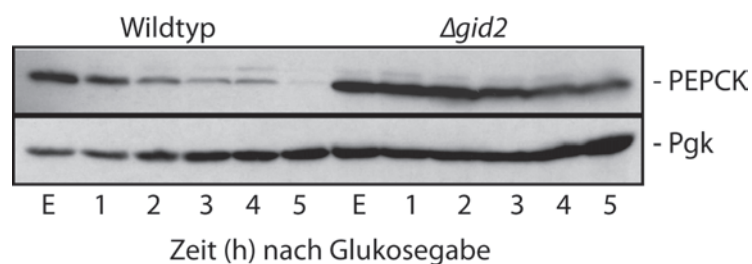
Es wurde auch der Einfluss der zweiten RING-Domänen Untereinheit Gid2 des Gid-Komplexes auf den Abbau von PEPCK und c-MDH gemessen. Ein Wildtypstamm und ein  $\Delta gid2$ -Stamm wurden unter gluconeogenetischen Bedingungen kultiviert und in

glukosehaltiges Medium umgesetzt. Nach Lyse der Zellen, SDS-PAGE und einem Westernblot erfolgte die Immunodetektion mit PEPCK- und P<sub>gk</sub>-Antikörper.

In Abbildung 13A erkennt man deutlich, dass das Enzym PEPCK in einem  $\Delta gid2$ -Stamm stark verlangsamt abgebaut wird. Das Gid2 Protein ist wie erwartet also auch an der Katabolitdegradation von PEPCK beteiligt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die RING-Domäne von Gid9 für den Abbau von PEPCK und c-MDH notwendig ist, wurde auch der Einfluss der Gid2C379S-RING-Mutante bezüglich des Abbauprozesses von PEPCK und c-MDH ebenfalls getestet. Zellen, die entweder eine HA-getaggte Wildtypvariante von Gid2 oder das mutierte Gid2C379S-HA<sub>3</sub> Protein chromosomal exprimieren, wurden 16 h auf YPethanol kultiviert. Dann wurden die Zellen in glukosehaltiges YPD Medium umgeimpft. Es wurde jede Stunde eine Probe entnommen, um den Degradationsprozess von PEPCK und c-MDH zu verfolgen. Nach alkalischer Lyse, SDS-PAGE und einem Westernblot wurden die Proteine via Immunoblotting detektiert.

A



B

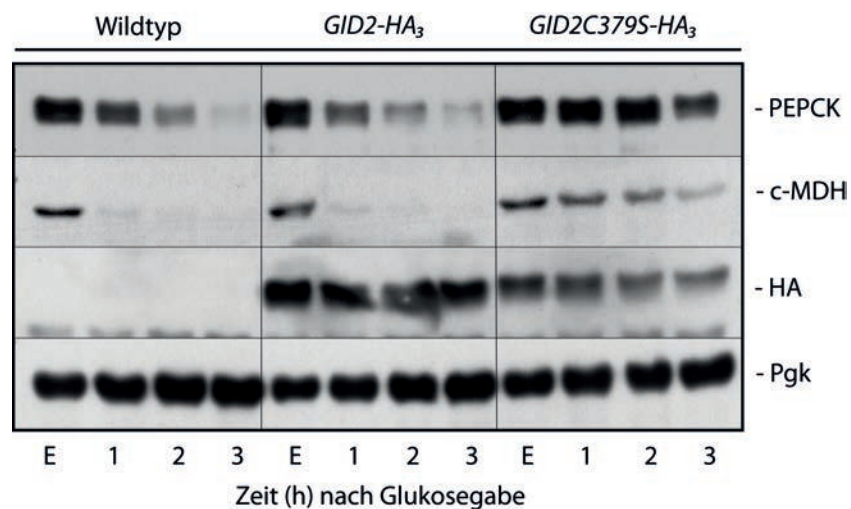


Abbildung 13: (A) **Die Deletion des *GID2* Gens verhindert den Abbau von PEPCK nach Glucoseshift.** Zellen wurden 16 h auf YPethanol kultiviert und in YPD umgeimpft. Die Probenentnahme erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Nach alkalischer Lyse der Zellen und einem Westernblot erfolgte die Immunodetektion mit PEPCK- und Pgk-Antikörper. Ladekontrolle: Pgk, 3-Phosphoglycerat Kinase. (B) **Die Punktmutation in der degenerierten RING-Domäne von *Gid2* (*Gid2C379S*) inaktiviert das Protein hinsichtlich der Degradation von PEPCK und c-MDH.** Die *Gid2*-HA<sub>3</sub> und *Gid2C379S*-HA<sub>3</sub> tragende Stämme wurden 16 h auf YPethanol Medium kultiviert und zur Einleitung der Katabolitdegradation auf YPD Medium umgeimpft. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 1.5 OD<sub>600</sub> Zellen als Probe entnommen. Nach Zellyse und SDS-PAGE wurden die Proteine mittels Immunoblotting detektiert. Ladekontrolle: Pgk, 3-Phosphoglycerat Kinase.

Wie man den oberen zwei Reihen in Abbildung 13B entnehmen kann, erfolgt der Abbau von PEPCK und c-MDH im *Gid2*-HA<sub>3</sub> Stamm wildtypmäßig (Bild linke Seite und Mitte). Dagegen werden im *Gid2C379S*-HA<sub>3</sub> Stamm beide Enzyme stark verlangsamt abgebaut. Die Punktmutation inaktiviert das Protein nicht nur in Bezug auf die FBPase-Degradation, sondern auch hinsichtlich des Abbaus von PEPCK und c-MDH. Die beiden HA getaggten Proteinvarianten von *Gid2* werden über den gesamten Probenzeitraum exprimiert. Die mutierte *Gid2* Variante erscheint in diesem Experiment leicht instabil zu sein, jedoch konnte schon in früheren Experimenten gezeigt werden, dass *Gid2C379S*-HA<sub>3</sub> über den betrachteten Probenzeitraum stabil ist (Kapitel 2.3).

### 3.7 **Gid2 und Gid9 interagieren miteinander**

Aus der Literatur ist bekannt, dass in zahlreichen E3-Ligasekomplexen die aktiven RING-Domänen-Proteine als Homo- oder Heterodimere in Erscheinung treten. In einigen Fällen ist eine der Untereinheiten erst nach der Dimerisierung katalytisch aktiv (Hashizume et al., 2001; Linares et al., 2003; Willems et al., 2004). Aus diesem Grund wurde überprüft, ob *Gid2* und *Gid9* direkt miteinander interagieren und die degenerierten RING-Domänen in *Gid2* und *Gid9* zusammen arbeiten. Zu diesem Zweck wurde *Gid2* mit einem V5-Tag fusioniert. Das *Gid2*-V5-Fusionsprotein ist bei Katabolitdegradationsexperimenten voll aktiv (J. Schweiggert, Diplomarbeit 2011). Um die Interaktion zwischen *Gid2* und *Gid9* zu untersuchen, wurden beide Proteine in einem Hefestamm exprimiert, in dem alle sieben *Gid*-Komplex-Untereinheiten (*GID1*, *GID2*, *GID4*, *GID5*, *GID7*, *GID8*, *GID9*) deletiert sind. Dieser Stamm (*Δgid*) ist voll lebensfähig, kann jedoch keine gluconeogenetischen Enzyme mehr abbauen. *Gid2*-V5 wurde dafür unter seinem endogenen Promotor chromosomal

integriert, *Gid9* wurde von dem CEN-Plasmid pRS316 unter seinem nativen Promotor exprimiert. Die Zellen wurden 16 h auf Selektionsmedium (CM Medium mit Ethanol als Kohlenstoffquelle und ohne Uracil) kultiviert. 50 OD<sub>600</sub> Zellen wurden geerntet und nativ lysiert, um aus den Untereinheiten aufgebaute Proteinkomplexe zu erhalten. Danach erfolgte die Immunopräzipitation mit V5-Antikörpern. Es wurden Proben des Lysats (Input) und der Immunopräzipitation (IP) mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die Immunodetektion wurde mit V5- und *Gid9*-Antikörpern vorgenommen.

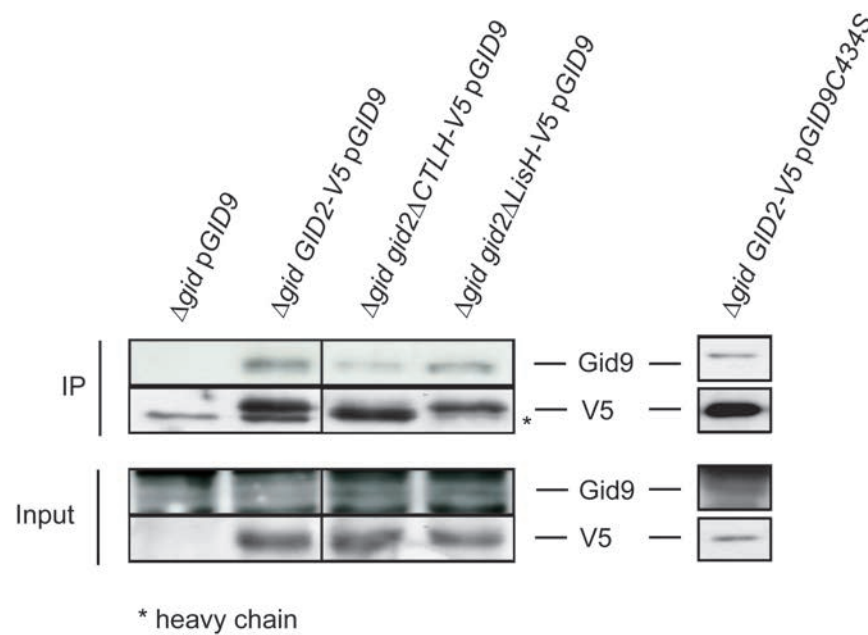


Abbildung 14: **Gid2 und Gid9 interagieren direkt miteinander.** In einen *Δgid* Stamm, der jeweils chromosomal *GID2-V5*, *gid2Δ216-229CTLH-V5* oder *gid2Δ138-171LisH-V5* exprimiert, wurde das Plasmid pWO 0747 transformiert, um *Gid9* zu exprimieren. Die Zellen wurden 16 h auf Selektionsmedium (CM Medium mit Ethanol als Kohlenstoffquelle, ohne Uracil) kultiviert. Proben wurden entnommen, lysiert und Protein mit V5-Antikörpern immunopräzipitiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Immunodetektion mit V5- und *Gid9*-Antikörpern.

Wie man in Abbildung 14 sehen kann, co-präzipitiert *Gid9*, wenn man *Gid2* mit V5-Antikörpern präzipitiert. Es ist offensichtlich, dass *Gid2* und *Gid9* im *Gid*-Komplex als Heterodimer vorliegen. Für ihre Interaktion benötigen *Gid2* und *Gid9* keine weiteren *Gid* Proteine. Damit lässt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit sagen, dass es sich bei dieser Interaktion um eine direkte Wechselwirkung zwischen beiden Untereinheiten des *Gid*-Komplexes handelt. Als Kontrolle diente ein *Δgid* Stamm, der außer *Gid9* kein weiteres *Gid*-Protein exprimiert. Wie erwartet, konnte in diesem Stamm kein *Gid9* Protein präzipitiert



werden (Abb. 14, ganz links). Dies schließt aus, dass Gid9 unspezifisch mit dem V5-Antikörper oder den Protein-A-Sepharosebeads interagiert.

Zusätzlich zu seiner RING-Domäne besitzt Gid2 noch eine LisH- und eine CTLH-Domäne (siehe Abb. 6). LisH-Domänen sind aus der Literatur bekannt, für die Interaktion zwischen Proteinen verantwortlich zu sein (Mateja et al., 2006). Über die Funktion der CTLH-Domänen ist bisher noch nichts bekannt. In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass die CTLH-Domäne in Gid1 für die Interaktion zu Gid7 essentiell ist. Hier sollte getestet werden, ob eine dieser Domänen einen Einfluss auf die Interaktion zwischen Gid2 und Gid9 hat. Dafür wurde ein hochkonservierter Bereich der Gid2-CTLH-Domäne (Gid2 $\Delta$ 216-229CTLH-V5) oder die gesamte LisH-Domäne (Gid2 $\Delta$ 138-171LisH-V5) deletiert (siehe Abb. 16, 18; Kapitel 2.9).

Trotz der mutierten Domänen wurden beide Gid2 Proteinvarianten zusammen mit Gid9 in dem  $\Delta$ gid-Stamm ko-präzipitiert (Abb. 14, Mitte). Beide deletierten Bereiche scheinen für die Interaktion zwischen Gid2 und Gid9 nicht essentiell zu sein. Die Interaktion der beiden Proteine war jedoch in der Gid2 $\Delta$ 216-229CTLH-V5-Mutante deutlich verringert. Dies bedeutet, dass der hier deletierte Bereich zumindest einen schwachen Einfluss auf die Bindung zwischen Gid2 und Gid9 hat, jedoch nicht alleine dafür verantwortlich ist. Es ist durchaus möglich, dass für die Interaktion beide Domänen benötigt werden, oder der verbleibende Teil der CTLH-Domäne ausreicht, um noch eine Bindung zu ermöglichen.

Wird Gid2-V5 zusammen mit Gid9C434S in dem  $\Delta$ gid-Stamm exprimiert, sieht man, dass auch die Mutation in der RING-Domäne keinen Einfluss auf die Interaktion der beiden Proteine hat (Abb. 14). Gid2 und Gid9 bilden offenbar ein stabiles Heterodimer unabhängig von der Anwesenheit weitere Untereinheiten des Gid-Komplexes.

### **3.8 Die Polyubiquitinierung gluconeogenetischer Enzyme *in vivo* wird durch die Mutation Gid9C434S verhindert**

Für Gid9 konnte kein erfolgreiches *in vitro* Experiment durchgeführt werden, um eine E3-Ligaseaktivität zu belegen. Es ist jedoch unklar, ob dieses Ergebnis auf der schlechten Exprimierbarkeit des Gid9-GST-Fusionsproteins in *E. coli* beruht, oder ob Gid9 nur als Heterodimer mit seinem Interaktionspartner Gid2 E3-Aktivität besitzt.

Im folgenden Experiment wurde nun untersucht, ob ein Gid-Komplex mit dem mutiertem Gid9C434S Allel *in vivo* noch in der Lage ist, FBPase, PEPCCK und c-MDH zu

polyubiquitinieren. In einem  $\Delta gid9$  Stamm wurden hierfür entweder Wildtyp Gid9 oder das mutierte Gid9C434S Allel vom Plasmid exprimiert sowie gleichzeitig ein Polyhistidin-getaggttes Ubiquitin (His<sub>6</sub>-Ub). Die Zellen wurden 16 h auf Selektionsmedium (CM Medium mit Ethanol als Kohlenstoffquelle, ohne Uracil und Leucin) kultiviert und anschließend in ein Selektionsmedium mit Glukose anstatt Ethanol überführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Nach der Lyse der Zellen erfolgte die Präzipitation aller mit (His<sub>6</sub>Ub)<sub>x</sub>-markierten Proteinen mittels Ni-NTA-Sepharosebeads. Nach einer SDS-PAGE und einem Westernblot wurde die Polyubiquitinierung mit spezifischen Antikörpern gegen (A) FBPase, (B) PEPCK und (C) c-MDH detektiert. Wie man in Abbildung 15 deutlich sehen kann, findet in der das Gid9C434S Allel exprimierenden RING-Mutante keine signifikante Polyubiquitinierung gluconeogenetischer Enzyme mehr statt. Daraus lässt sich folgern, dass auch Gid9 Ligaseaktivität besitzt und für die Ubiquitin-Ligaseaktivität des Komplexes mit verantwortlich ist. Im Gegensatz zu Gid2 besitzt Gid9 jedoch keine *in vitro* Ligaseaktivität, sondern ist offensichtlich nur in einem strukturell intakten Gid-Komplex aktiv.

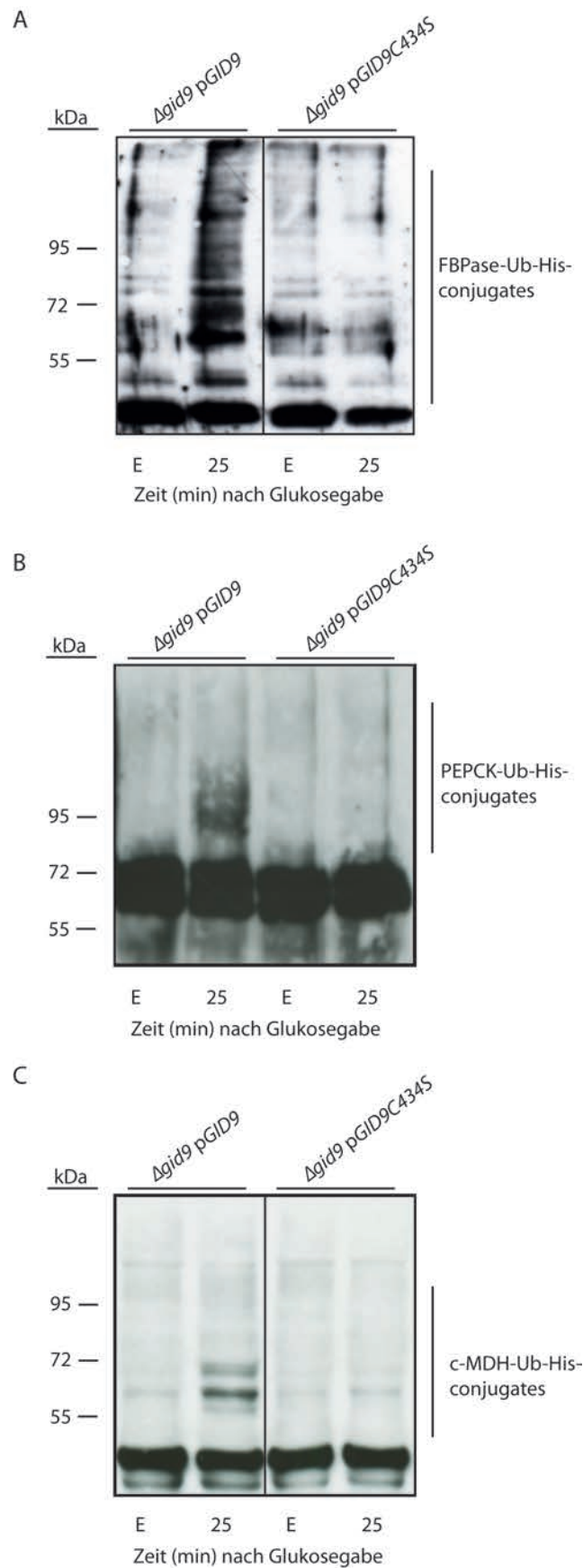


Abbildung 15: In einem *Gid9C434S* exprimierendem  $\Delta gid9$  Stamm findet keine signifikante Polyubiquitinierung gluconeogenetischer Enzyme mehr statt. Ein  $\Delta gid9$  Stamm, der entweder *Gid9* oder

Gid9C434S vom Plasmid pRS316 und His<sub>6</sub>-Ub exprimiert, wurde für 16-22 h in CM Medium ohne Uracil und Leucin und mit 2% Ethanol als Kohlenstoffquelle kultiviert. Dann wurden die Zellen auf das gleiche Medium mit Glukose anstatt Ethanol umgeimpft. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Polyhistidin-getaggtetes Ubiquitin wurde mit Ni-NTA-Sepharosebeads präzipitiert. Nach einer SDS-PAGE wurde die Polyubiquitinierung mit spezifischen Antikörpern gegen (A) FBPase, (B) PEPCK und (C) c-MDH detektiert.

### 3.9 Untersuchungen zur Funktionalität und Stabilität von **Gid2C379S-HA<sub>3</sub>**, **Gid2ΔCTLH-HA<sub>3</sub>** und **Gid2ΔLisH-HA<sub>3</sub>** Mutantenproteinen

Gid2 besitzt neben seiner RING-Domäne noch zwei weitere Domänen, die beim bioinformatischen Abgleich der Gid2-Proteinsequenz mit Datenbanken gefunden wurden. Die LisH- (Lissencephaly type-1-like homology) Domäne besteht aus einer  $\alpha$ -Helix und wurde ursprünglich in dem LIS1 Protein des menschlichen Gehirns gefunden. Hier konnte gezeigt werden, dass die LisH-Domäne für die Dimerisierung und die Halbwertszeit des Proteins eine entscheidende Rolle spielt (Gerlitz et al., 2005). In direkter Nachbarschaft der LisH-Domäne wird häufig ein zweites  $\alpha$ -helikales Motiv gefunden, die CTLH- (C-terminal to LisH) Domäne. Über die Funktionalität dieser Domäne ist bisher nichts bekannt. In *S. cerevisiae* wurde diese Domäne nur in vier Proteinen (Gid1, 2, 8, 9; siehe Abb. 5) gefunden (Regelmann et al., 2003; Santt et al., 2008). Da beide Domänen für die Interaktion zwischen Gid2 und Gid9 ohne Bedeutung zu sein scheinen (Kapitel 2.7), sollte ihre biologische Funktionalität näher untersucht werden.



Abbildung 16: **Domänen in Gid2**. Das Cartoon gibt die Größe der vorhergesagten funktionellen Domänen und ihre relative Lage in der Primärstruktur/Sekundärstruktur des Proteins an.

#### 3.9.1 Stabilität von **Gid2ΔCTLH-HA<sub>3</sub>** und **Gid2C379S-HA<sub>3</sub>** Mutantenproteinen

Um auszuschließen, dass sich Mutationen in Gid2 auf die Stabilität des Proteins auswirken, wurde ein Cycloheximid- (CHX) Chase durchgeführt. CHX wirkt als Translationshemmer in eukaryontischen Zellen und unterbindet dadurch die Neusynthese von Proteinen. Für das

Experiment wurden *GID2-HA<sub>3</sub>*, *GID2C379S-HA<sub>3</sub>* und *GID2ΔCTLH-HA<sub>3</sub>* Allele (Deletion der AS 216-229, siehe Abb. 18) tragende Hefestämme auf YPethanol Medium für 16 h kultiviert (finale OD<sub>600</sub> ≈ 1.5). 15 OD<sub>600</sub> Zellen wurden entnommen und in YPD Medium resuspendiert, mit 250 mg Cycloheximid versetzt und sofort eine Probe (E) entnommen. Jede Stunde wurde eine weitere Probe gezogen (1,2).

Wie man in Abbildung 19 sehen kann, ist das mit HA-Antikörpern detektierte Signal über den kompletten Versuchszeitraum gleichbleibend (obere Reihe). *Gid2* und seine mutierten Proteinvarianten *Gid2C379S-HA<sub>3</sub>* und *Gid2ΔCTLH-HA<sub>3</sub>* sind wenigstens zwei Stunden lang stabil, nachdem die Zellen von gluconeogenetischen auf glykolytische Bedingungen umgesetzt wurden und die Neusynthese von Proteinen mit Cycloheximid CHX unterbunden wurde. FBPase wird unter diesen Versuchsbedingungen nicht abgebaut (mittlere Reihe). Die Mutationen haben also keinen Einfluss auf die Stabilität der Proteine.

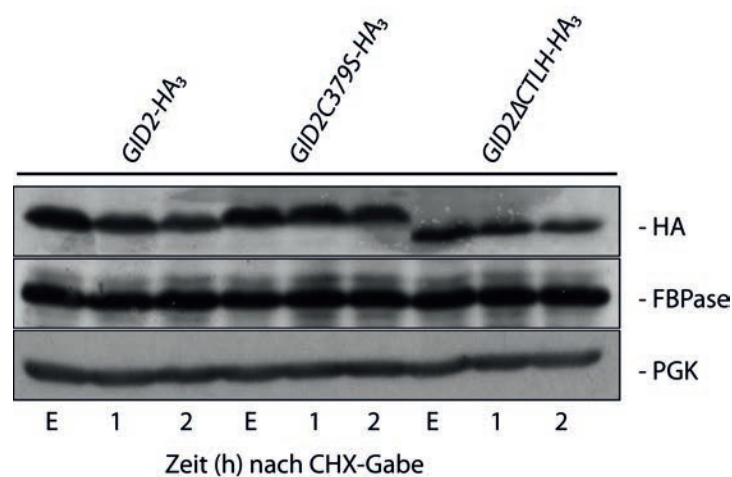


Abbildung 17: **CHX Chase von *Gid2-HA<sub>3</sub>*, *Gid2C379S-HA<sub>3</sub>* und *Gid2ΔCTLH-HA<sub>3</sub>*.** *Gid2-HA<sub>3</sub>*, *Gid2C379S-HA<sub>3</sub>* und *Gid2ΔCTLH-HA<sub>3</sub>* exprimierende Zellen wurden 16 h auf YPethanol Medium kultiviert. Danach erfolgte die Umsetzung der Zellen in 2.5 ml YPD Medium, das mit 250 mg Cycloheximid versetzt war. Es wurde sofort eine Probe (E) und jede Stunde eine weitere Probe (1,2) gezogen. Nach alkalischer Lyse und SDS-PAGE wurde die Immunodetektion mit HA- und FBPase-Antikörpern durchgeführt. Ladekontrolle: Pgc, 3-Phosphoglyceratkinase.

### 3.9.2 Überprüfung der biologischen Funktionalität von *Gid2ΔCTLH-HA<sub>3</sub>*

In tierischen Zellen wurde ein dem *Gid*-Komplex homologer Proteinkomplex entdeckt, der sogenannte CTLH-Komplex (Kobayashi et al., 2007). Aus diesem Grund wurde ein

Sequenzvergleich verschiedener CTLH-Domänen vorgenommen (diese Arbeit, zusammen mit E. Diler), um stark konservierte Aminosäurereste zu identifizieren.

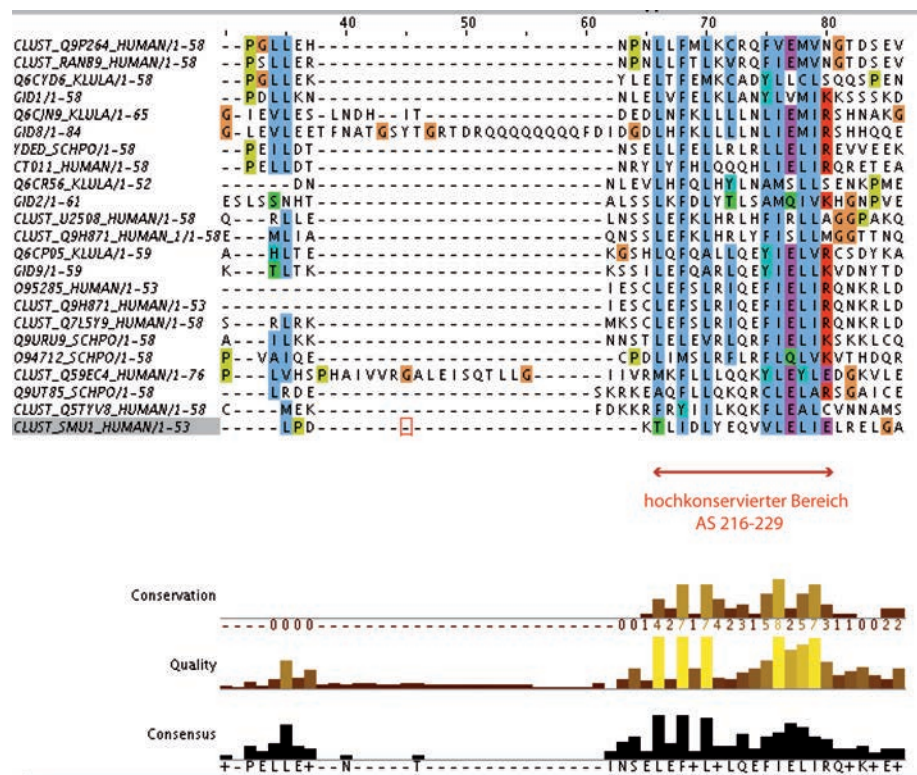


Abbildung 18: **Ausschnitt aus dem Sequenzvergleich der CTLH-Domänen unterschiedlicher Spezies.** Aus gängigen Datenbanken (SGD, NCBI) wurden die Proteinsequenzen unterschiedlichster CTLH-Domänen in das Programm ClustalW (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/clustalw> (Higgins and Sharp, 1988)) hochgeladen und ein Sequenzalignment erstellt. Der durch einen roten Pfeil markierte Bereich wurde in *GID2ΔCTLH-HA<sub>3</sub>* deletiert. HUMAN: *Homo sapiens*; KLULA: *Kluyveromyces lactis*; SCHPO: *Schizosaccharomyces pombe*. (Abbildung: diese Arbeit zusammen mit E. Diler).

Der mit einem roten Pfeil in Abbildung 17 markierte Bereich (AS216-229) wurde mittels PCR-Technik mit den Primern ED3, ED4, ED9 und ED10 und dem Plasmid pWO1153 wie unter (siehe Material & Methoden) beschrieben deletiert und das daraus resultierende verkürzte *GID2ΔCTLH-HA<sub>3</sub>* (ohne Promotor Region und Startcodon) chromosomal an der Stelle des Wildtyp *GID2* Gens integriert. Die Deletion des konservierten AS-Bereiches wurde mittels Sequenzierung (Eurofins MWG Operon, Ebersberg) bestätigt, die korrekte Integration ins Chromosom wurde durch eine Kontroll-PCR überprüft.

Um den Einfluss der Mutation der CTLH-Domäne auf den FBPase-Abbau zu überprüfen, wurden Zellen eines *GID2-HA<sub>3</sub>* Wildtyp Stammes und der *GID2ΔCTLH-HA<sub>3</sub>* Mutante für 16 h

in YPethanol Medium kultiviert und dann auf YPD Medium umgesetzt, um die Katabolitdegradation von FBPase einzuleiten. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 1.5 OD<sub>600</sub> Zellen als Probe entnommen. Es folgte eine Westernblotanalyse mit anschließender Immunodetektion.

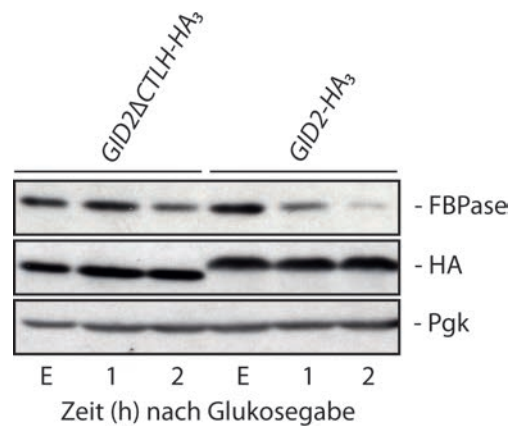


Abbildung 19: **FBPase-Abbau in der Gid2 $\Delta$ CTLH-HA<sub>3</sub> Mutante und Gid2-HA<sub>3</sub> Wildtyp.** Die Gid2 $\Delta$ CTLH-HA<sub>3</sub> bzw. Gid2-HA<sub>3</sub> tragende Stämme wurden 16 h auf YPethanol Medium kultiviert und 1.5 OD<sub>600</sub> Zellen entnommen. Nach Überführung der Zellen in YPD wurde jede weitere Stunde eine Probe gezogen. Nach Westernblotanalyse erfolgte die Immunodetektion des FBPase Abbaus mit spezifischen Antikörpern. Ladekontrolle: Pgk, 3-Phosphoglyceratkinase.

Wie man der obersten Reihe in Abbildung 18 entnehmen kann, zeigt der Gid2 $\Delta$ CTLH-HA<sub>3</sub> exprimierende Stamm einen verlangsamten FBPase Abbau, während in Gid2-HA<sub>3</sub> FBPase wildtypmäßig abgebaut wird. Da die Deletion auf die Bindung zwischen Gid2 und Gid9 nur einen geringen Effekt hatte (siehe Abb. 14), muss die CTLH-Domäne von Gid2 im Gid-Komplex und bei der FBPase Degradation noch eine andere unbekannte Rolle spielen. Beide HA<sub>3</sub>-fusionierten Proteine werden unter Derepressionsbedingungen und während der kompletten Degradationsphase gleichmäßig exprimiert (Abb. 18, mittlere Reihe). Die untere Reihe zeigt eine Ladekontrolle (Pgk), um ein gleichmäßiges Auftragen der Proben sicherzustellen.

### 3.9.3 Biologische Funktionalität der Gid2 $\Delta$ LisH-HA<sub>3</sub> Mutante

Zuletzt sollte der Einfluss der LisH-Domäne auf die Katabolitdegradation gluconeogenetischer Enzyme getestet werden. Die LisH-Domäne ist dafür bekannt, dass

sie bei der Dimerisierung oder der Interaktion zu anderen Proteinen eine wichtige Rolle spielt (Mateja et al., 2006). Nachdem gezeigt wurde, dass die *Gid2ΔLisH-V5*-Deletion für die Interaktion zu *Gid9* in einem *Δgid* Stamm ohne Bedeutung ist (siehe Abb. 14), sollte nun überprüft werden, ob die Integration von *GID2Δ138-171LisH-HA<sub>3</sub>* anstelle von *GID2-HA<sub>3</sub>* in einem sonst wildtypmäßigen *Gid1-Myc<sub>13</sub> Hid2-HA<sub>3</sub>* Stamm einen Effekt auf den proteasomalen Abbau von *FBPase*, *PEPCK* und *c-MDH* hat. Hierfür wurden Wildtyp *GID2-HA<sub>3</sub>* und *GID2ΔLisH-HA<sub>3</sub>* Zellen zuerst in ethanolhaltigem Medium (E) 16 h angezogen und anschließend auf glukosehaltiges Medium (1,2,3) überführt. Nach der alkalischen Lyse, SDS-PAGE und einem Westernblot erfolgte die Immundetektion mit spezifischen Antikörpern.

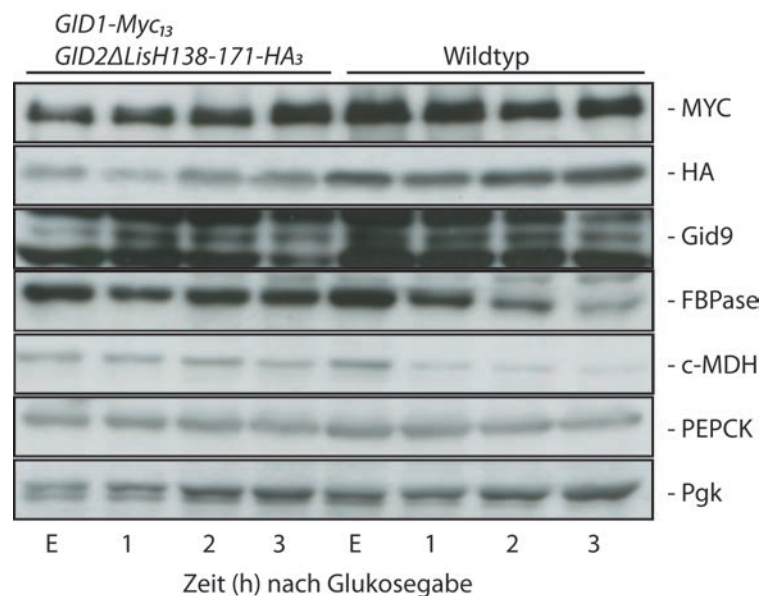


Abbildung 20: **Einfluss von *Gid2ΔLisH* auf die Katabolitdegradation von *FBPase*, *PEPCK* und *c-MDH*.** Die Zellen wurden auf YPEtOH Medium 16 h kultiviert und dann auf glukosehaltiges Medium umgesetzt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Nach alkalischer Lyse und SDS-PAGE sowie einem Westernblot erfolgte die Immunodetektion mit Myc-, HA-, *Hid9*-, *FBPase*-, *PEPCK*-, *c-MDH*-, und *Pgk*-Antikörpern. Ladekontrolle: *Pgk*, 3-Phosphoglycerat Kinase.

Die obersten drei Reihen in Abbildung 20 zeigen die Expressionshöhe der Proteine *Gid1*, *Gid2* und *Hid9*. Während *Hid9* und *Gid1* wie im Wildtypstamm exprimiert werden, scheint *Gid2ΔLisH-HA<sub>3</sub>* eine etwas geringere Expressionshöhe als im Wildtyp aufzuweisen, ist jedoch über den kompletten Probenzeitraum stabil. In den nächsten beiden Reihen kann man erkennen, dass in der *LisH* Mutante kein Abbau von *FBPase* oder *c-MDH* mehr



stattfindet (Abb. 20, Bild linke Seite). Die Deletion der Domäne führt zu einem biologisch inaktiven Protein bezüglich der Katabolit-induzierte-Degradation von FBPase und c-MDH. Bei der Katabolitdegradation der PEPCCK kann man jedoch keinen sichtbaren Einfluss beobachten. Allerdings erfolgt der Abbau der PEPCCK bereits im wildtypähnlichen Vergleichsstamm sehr langsam. Dieses Ergebnis überrascht, da in einem *Gid2* Deletionsstamm eine deutliche Stabilisierung von PEPCCK im Vergleich zum WT gefunden wurde (Abb. 13A, aus (Santt et al., 2008)). Es wäre auch denkbar, dass der beobachtete Unterschied auf der Verwendung von zwei verschiedenen PEPCCK-Antikörpern beruht, die in den beiden Experimenten eingesetzt wurden.

### 3.9.4 Einfluss der *GID2* Mutanten auf die Topologie des *Gid*-Komplexes *in vivo*

Nun sollte untersucht werden, ob die getesteten *GID2* Mutanten noch mit dem *Gid*-Komplex *in vivo* interagieren. Hierfür wurden *GID2C379S-HA<sub>3</sub>* und *GID2ΔCTLH-HA<sub>3</sub>* chromosomal in einen *GID1-Myc<sub>13</sub>* Stamm an Stelle des *GID2 ORF's* integriert. Hierfür wurden die Integrations-Plasmide *pRS306GID2C379S-HA<sub>3</sub>* und *pRS306GID2ΔCTLH-HA<sub>3</sub>* (verkürzte Proteinversionen ohne Promotorregion und Startcodon) mit *BlpI* verdaut und jeweils ein *GID1-Myc<sub>13</sub> GID2-HA<sub>3</sub>* Stamm mit den Konstrukten transformiert. Nach der Selektion von Einzelkolonien wurde die korrekte Integration der Mutationen in das Genom mittels Kontroll-PCR und Sequenzanalyse überprüft. Die Zellen wurden zuerst in ethanolhaltigem YPethanol Medium (E) für 16 h angezogen und in glukosehaltiges Medium (25 min) überführt. Vor und nach der Überführung in glukosehaltiges Medium wurden 50 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet und nativ lysiert, um Proteininteraktionen nicht zu zerstören. Dann erfolgte die Immunopräzipitation mit Myc-Antikörpern. Es wurden Proben des Lysats (Input) und der Immunopräzipitation (IP) einer SDS-PAGE und einem Westernblot unterzogen, die Immunodetektion wurde mit Myc-, *Gid9*- und HA-Antikörper durchgeführt.

Die obere Reihe in Abbildung 21 zeigt die präzipitierte Menge an *Gid1-Myc<sub>13</sub>*, dabei wird auf Ethanol in allen Stämmen mehr Protein präzipitiert als nach dem Glucoseshift. In allen Stämmen kann eine Interaktion mit *Gid2* nachgewiesen werden, die Mutationen haben keinen Einfluss auf die Bindung zwischen *Gid1* und *Gid2*. Jedoch geht die Interaktion zu *Gid9* in der *Gid2ΔCTLH-HA<sub>3</sub>* Mutante nahezu ganz verloren. Es ist nur noch ein sehr schwaches Signal zu erkennen. Dieses Ergebnis steht in gewissem Widerspruch zu dem in

Kapitel 2.7 erhaltenem Befund, nach dem Gid2 und Gid9 unabhängig von den Mutationen in der CTLH-, RING- und LisH-Domäne interagieren. Bei dem hier gezeigten Experiment ist es möglich, dass weitere Untereinheiten des Gid-Komplexes mit Gid9 um die Bindestelle an Gid2 konkurrieren, und die Interaktion dadurch stark abgeschwächt ist.

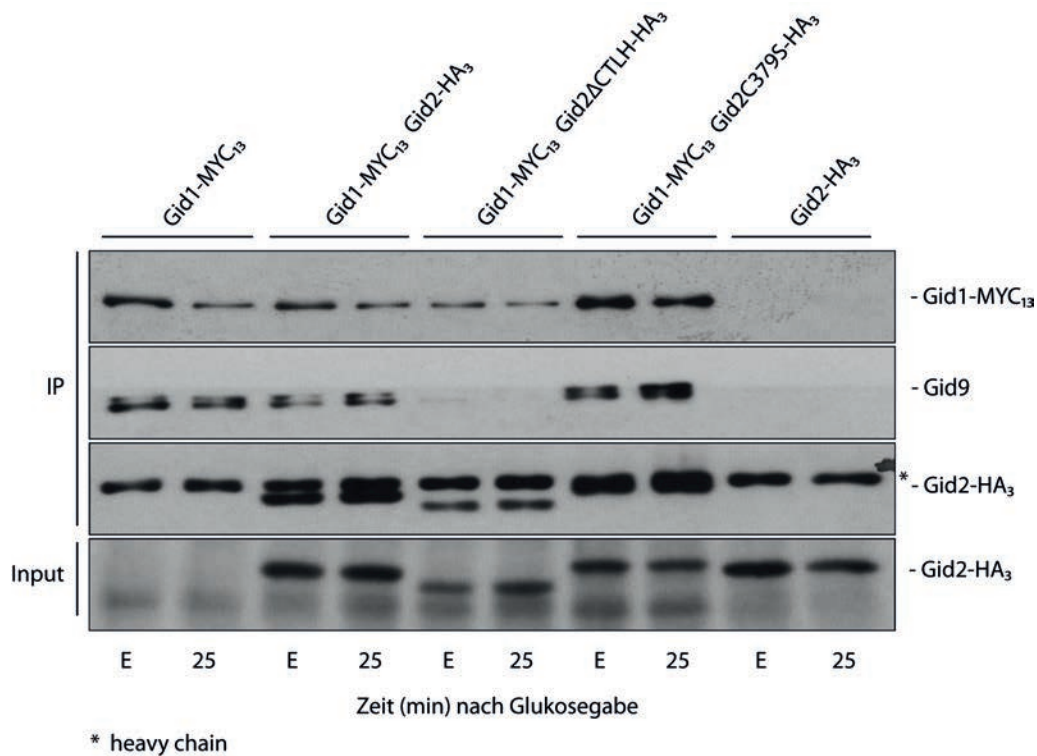


Abbildung 21: **Interaktion von Gid2 und Gid9 zu Gid1 in Gid2ΔCTLH und Gid2C379S.** Die Zellen wurden in YPethanol Medium 16 h angezogen und dann auf YPD Medium umgesetzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Nach der Lyse der Zellen erfolgte die Immunopräzipitation mit Myc-Antikörpern. Nach einer SDS-PAGE und einem Westernblot erfolgte die Immunodetektion mit spezifischen Antikörpern. Input: Lysat-Proben; IP: Immunopräzipitation-Proben.

### 3.10 Untersuchungen zur biologischen Funktionalität der Gid9-CTLH- und der Gid9-CRA-Mutanten

Gid9 besitzt wie Gid2 neben seiner degenerierten RING-Domäne noch zwei weitere Domänen, eine CTLH- (C-terminal to LisH) Domäne und eine CRA- (CT11-RanBPM) Domäne (Menon et al., 2004). Über beide Domänen ist bisher wenig bekannt, man nimmt jedoch an, dass sie für die Interaktion zwischen Proteinen verantwortlich sind. Die CRA-Domäne wurde erstmals in menschlichen RanBPM-Proteinen gefunden. Die meisten RanBP-

Proteine werden in Verbindung mit nuklearen Poren und deren Maschinerie gebracht und besitzen eine sogenannte Ran-binde-Domäne (Denti, 2003). Gid8 ist neben Gid9 ein weiteres Gid-Protein, das eine CRA-Domäne besitzt. Punktmutationen in der CRA-Domäne von Gid8 führen zu einer vollständigen Unterbindung der Katabolitdegradation der FBPase, was die Wichtigkeit dieser Domäne in dem betrachteten Prozess unterstreicht (Barbin, 2009).



Abbildung 22: **Domänen in Gid9.** Das Cartoon gibt die Größe der vorhergesagten funktionellen Domänen und ihre relative Lage in der Primärstruktur/Sekundärstruktur des Proteins an. Gid9\*CTLH und Gid9\*CRA geben die mittels PCR-Technik vorgenommenen Punktmutationen an, die zu einer Umwandlung der AS-Reste in Glycin führen.

Für die Funktionsuntersuchungen in Gid9 wurden zuerst die Aminosäuren des hochkonservierten Bereichs der Gid9-CTLH-Domäne deletiert, wie schon in Kapitel 2.9.1 angegeben (Abbildung 17). Jedoch stellte sich heraus, dass durch die sich ergebende Größenänderung Gid9 mit unserem spezifischen Antikörper nicht mehr zu detektieren war, da das Signal vom starken Hintergrund überlagert wurde (Daten nicht gezeigt). Es wurden weitere Sequenzabgleiche erstellt, um geeignete Regionen in der CTLH Domäne von Gid9 für gezielte Punktmutationen zu finden, durch welche ein Funktionsverlust mit hoher Wahrscheinlichkeit herbeigeführt werden könnte.

```

✔ smart | CTLH-uniprot | Q6FTG6 | FYV1      -ILLTGNRISTALVDNHDLRPLLDWINDSK-----SYLK--KN
✔ smart | CTLH-uniprot | P40492 | FYV1      -VLEANRISTSLHERNLLPLISWINENK-----KTLT--KK
✔ smart | CTLH-uniprot | Q6FQR6 | Q6FQ      -VLRIRQELR-KLINQREIEKCIITFLNDKI-----PDLL--GN
✔ smart | CTLH-uniprot | P53076 | VID3      -MVKIRQELR-YLINKGQISKCINYIDNEI-----PDLL--KN
✔ smart | CTLH-uniprot | Q6CR56 | Q6CR      DYIEMANIVK--EMRSGNLNTCIRWCO-----DN
✔ smart | CTLH-uniprot | Q12508 | RMD5      EPIEMGQIVH--DLKKGDTESCLKWCNSNEM-----ESLSSNHT
✔ smart | CTLH-uniprot | Q9NNU2 | CT01      -TLDERIKIR-EMILKGQIQEAIALINSLH-----PELL--D
✔ smart | CTLH-uniprot | Q5TYV8 | Q5TY      -PSDDMLFLR-QLILDGQWDEVLPFIQPLE-----CMEK--FD
✔ smart | CTLH-uniprot | Q9P264 | Q9P2      -SIKNRQRIQ-KLVLEGRVGEAIEI TORFY-----PGLL--EH
✔ smart | CTLH-uniprot | P40208 | GID8      -KIKERPHIK-HLIKLRINEAMEEINSIFGLEVLEETFNATGSYTGRTD
✔ smart | CTLH-uniprot | Q7L5Y9-2 | Q7      -KRMDRMMVE-HLLRCGYNTAVKLARQ-----S
      :   :   :

✔ smart | CTLH-uniprot | Q6FTG6 | FYV1      GSR-----LEFEARFQQYIELLKASEYEE
✔ smart | CTLH-uniprot | P40492 | FYV1      SSI-----LEFQARLQEYIELLKVDNYTD
✔ smart | CTLH-uniprot | Q6FQR6 | Q6FQ      NVE-----LHFELRVVQYLIQLSNSPK--
✔ smart | CTLH-uniprot | P53076 | VID3      NLE-----LVFELKLANVLMIKKSSSKD
✔ smart | CTLH-uniprot | Q6CR56 | Q6CR      NLEV-----LHPQLHYLNAMSLLENKPM
✔ smart | CTLH-uniprot | Q12508 | RMD5      ALSS-----LKFPLYLSAMQIVKHGNPVE
✔ smart | CTLH-uniprot | Q9NNU2 | CT01      TNRY-----LYPHLQQQHLIELIRQRETEA
✔ smart | CTLH-uniprot | Q5TYV8 | Q5TY      KKR-----FRYIILKQKFEALCVNNAMS
✔ smart | CTLH-uniprot | Q9P264 | Q9P2      NPN-----LLFMLKCRQPVEMVNGTDSEV
✔ smart | CTLH-uniprot | P40208 | GID8      RQQQQQQQPDIDGDLHFKLLLNLIEMIRSHHQE
✔ smart | CTLH-uniprot | Q7L5Y9-2 | Q7      GIES-----CLEFSLRIQEFIELIRQNKRLD
      :   :   :

```

Abbildung 23: **Sequenzabgleich von CTLH-Domänen aus Hefeproteinen und menschlichen Proteinen.** Das Alignment wurde mit ClustalW erstellt (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/clustalw>). Die Sequenzen der Domänen wurden über die Uniprot-Datenbank erhalten. Hoch konservierte AS-Reste sind mit zwei schwarzen Punkten markiert, die in Gid9 mutierten Reste sind durch rote Sterne gekennzeichnet.

Die mit einem roten Stern markierten Aminosäuren der Gid9-CTLH-Domäne (Abb. 23, AS 233-236) wurden mittels PCR-Technik in vier Glycin Reste umgeändert, da Glycin andere chemische Eigenschaften als Isoleucin, Glutamat und Leucin aufweist. Das so erhaltene Integrationsplasmid pRS306*GID9\*CTLH* wurde nach dem Verdau mit EagI an der Stelle des *GID9* Wildtypgens in einen *GID2-HA<sub>3</sub>* Stamm chromosomal integriert. Die korrekte Integration der Mutation wurde mittels Kontroll-PCR und Sequenzanalyse überprüft.

```

✔ smart |CRA-uniprot |P40208 |GID8_  ----DFILNLIQYSQNKL---AIKASSSVK---KMQELEMAMTLLFPPLS
✔ smart |CRA-uniprot |A62MJ5 |A62MJ  ----DFILNLIQYSQNKL---AIKASSSVK---KMQELEMAMTLLFPPLS
✔ smart |CRA-uniprot |Q7L5Y9-6 |Q7L  -----FRHARKHF---SQAEGS-----QLDEVROAMGLAFPPD
✔ smart |CRA-uniprot |Q59H52 |Q59H5  --LKCAKMLFFRHARKHF---SQAEGS-----QLDEVROAMGLAFPPD
✔ smart |CRA-uniprot |Q7L5Y9-2 |Q7L  ----NKRLDAVRHARKHF---SQAEGS-----QLDEVROAMGLAFPPD
✔ gid9CRA  -----SSLINLQSG
✔ smart |CRA-uniprot |P53076 |VID30  DEIENLILKGQELSNFPIYDTKIPQSLRDR---FSGQLSNVSALLAYSNP
✔ smart |CRA-uniprot |Q9NWU2 |CT011  ----RETEAALEFAQTQL---AEQGESRE---CLTEMERTLALLAFDSP
✔ smart |CRA-uniprot |Q9P264 |Q9P26  ----AATERIILFGRELQALSEQLGREYGKLAHTEMLQDAPSLAYSDD
                                     :   :   ***
                                     :   :   !!!

✔ smart |CRA-uniprot |P40208 |GID8_  DSADSGS IKLPKSLQNLYSISLRSKIADLVNEKLLKFIHPRIQFEISNNN
✔ smart |CRA-uniprot |A62MJ5 |A62MJ  DSADSGS IKLPKSLQNLYSISLRSKIADLVNEKLLKFIHPRIQFEISNNN
✔ smart |CRA-uniprot |Q7L5Y9-6 |Q7L  THIS-----P--YKDLLDP-ARWR-----MLIQQFRYDNYRLHQLGNN
✔ smart |CRA-uniprot |Q59H52 |Q59H5  THIS-----P--YKDLLDP-ARWR-----MLIQQFRYDNYRLHQLGNN
✔ smart |CRA-uniprot |Q7L5Y9-2 |Q7L  THIS-----P--YKDLLDP-ARWRCTVA-DLIQQFRYDNYRLHQLGNN
✔ gid9CRA  DPER-----YLNLLDD-QRWS-----VLNDFLSDPYSMYGISQN
✔ smart |CRA-uniprot |P53076 |VID30  LVEA-----PKEISGYLSDEYLQE-----RLFQVSNNTILTFLHKDSE
✔ smart |CRA-uniprot |Q9NWU2 |CT011  EESP-----FGDLLHTMQRQK-----VNSEVNVQAVLDYENREST
✔ smart |CRA-uniprot |Q9P264 |Q9P26  WSCP-----VGQQLDPIQREP-----VCAALNSAILESQNLPKQ
                                     .

✔ smart |CRA-uniprot |P40208 |GID8_  SKFPDLLNSDKKIITQNFTV---
✔ smart |CRA-uniprot |A62MJ5 |A62MJ  SKFPDLLNSDKKIITQNFTV---
✔ smart |CRA-uniprot |Q7L5Y9-6 |Q7L  SVFTLTQAGLSAIKTPYPTSRA
✔ smart |CRA-uniprot |Q59H52 |Q59H5  SVFTLTQAGLSAIKTPQCYKED
✔ smart |CRA-uniprot |Q7L5Y9-2 |Q7L  SVFTLTQAGLSAIKTPQCYKED
✔ gid9CRA  DPLLIYLSLGISLKTRDCLH--
✔ smart |CRA-uniprot |P53076 |VID30  CALENVISNTRAMLSTLLEYNAP
✔ smart |CRA-uniprot |Q9NWU2 |CT011  PKLAKLLKLLWAQNELDQKVKV
✔ smart |CRA-uniprot |Q9P264 |Q9P26  PPLMLALGQASECLRLMARAGLG
                                     :   :

```

Abbildung 24: **Sequenzabgleich von CRA-Domänen aus Hefeproteinen und menschlichen Proteinen.**

Das Alignment wurde mit ClustalW erstellt (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/clustalw>). Die Sequenzen der Domänen wurden über die Uniprot-Datenbank ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) erhalten. Hoch konservierte AS-Reste sind mit zwei schwarzen Punkten markiert, die in Gid9 mutierten Reste sind durch rote Sterne gekennzeichnet.

Die Gid9-CRA-Domäne wurde mit derselben Technik wie die CTLH-Domäne mutiert. Hier wurden drei konservierte Aminosäurereste (AS336-338, mit roten Sternen markierte AS in Abb. 24) in Glycin umgewandelt. Die chromosomale Integration des Integrations-Plasmids pRS306GID9\*CRA erfolgte nach dem Verdau mit EagI anstelle des GID9 Wildtypgens in einen GID2-HA<sub>3</sub> Stamm. Die korrekte Integration der Mutation wurde mittels Kontroll-PCR und Sequenzanalyse überprüft.

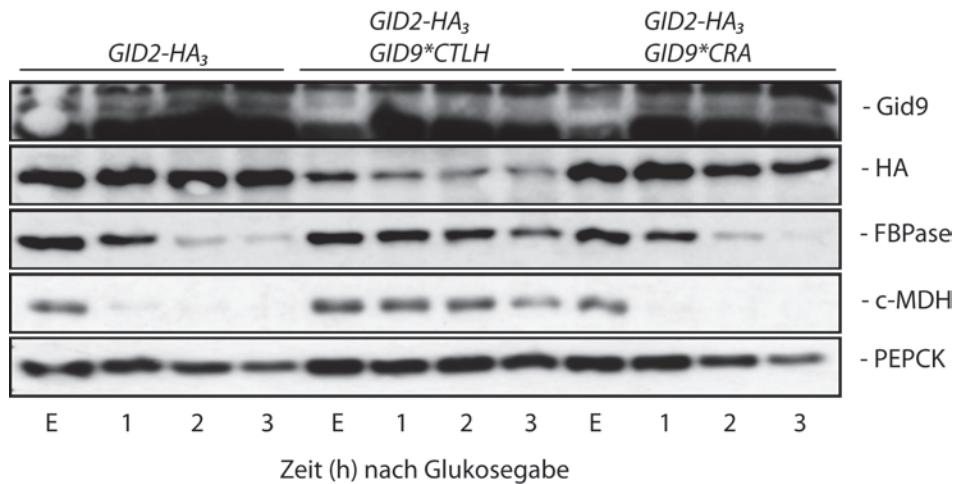


Abbildung 25: **Katabolitdegradation gluconeogenetischer Enzyme in der *Gid9\*CTLH*- und der *Gid9\*CRA*-Mutante.** Die Zellen wurden 16 h auf YPethanol Medium kultiviert und anschließend in YPD Medium überführt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Nach Lyse der Zellen, SDS PAGE und einem Westernblot erfolgte die Immunodetektion mit Gid9-, HA-, FBPase-, c-MDH- und PEPCK-Antikörpern.

Nun sollte der Einfluss der vorgenommenen Punktmutationen in der CTLH- und CRA-Domäne von Gid9 auf die Katabolitdegradation gluconeogenetischer Enzyme getestet werden. Hierfür wurden die Stämme *GID2-HA<sub>3</sub>*, *GID2-HA<sub>3</sub> GID9\*CTLH* und *GID2-HA<sub>3</sub> GID9\*CRA* in ethanolhaltigem Medium 16 h angezogen (Probe E) und anschließend auf glukosehaltiges YPD Medium (Proben 1, 2 und 3) umgesetzt. Nach der alkalischen Lyse wurden die Proben einer SDS-PAGE und einem Westernblot unterzogen. Die Immunodetektion der gewünschten Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern.

Wie man Abbildung 25 entnehmen kann, hat die Mutation in der CTLH-Domäne von Gid9 einen starken Einfluss auf den Abbau aller getesteten gluconeogenetischen Enzyme. FBPase, c-MDH und PEPCK werden im Vergleich zum Wildtyp verlangsamt degradiert. Die *Gid9\*CTLH*-Mutation wirkt sich ebenfalls auf die Expressionsstärke der Proteine Gid9 und Gid2 aus. In dem *Gid9\*CTLH* tragenden Stamm liegen beide Proteine in geringerer Menge vor als im Wildtyp. Die Mutation scheint auch die Stabilität beider Gid-Proteine zu beeinflussen. Es ist möglich, dass die Interaktion von Gid9 und Gid2 durch die Mutation in der *Gid9*-CTLH-Domäne zum Gid-Komplex gestört wird und die Proteine daraufhin abgebaut werden. Die *Gid9\*CRA*-Mutation hat hingegen keinen Einfluss auf die Katabolitdegradation gluconeogenetischer Enzyme. FBPase, c-MDH und PEPCK werden

wildtypmäßig abgebaut. Auch die Expressionshöhen von *Gid2* und *Gid9* entsprechen denen des Wildtyps.

### 3.10.1 *Gid9* stabilisiert *Gid2-V5* in einem $\Delta$ *gid* Stamm

Da die *Gid9*\*CTLH-Mutation einen destabilisierenden Effekt auf *Gid2* hat, sollte nun getestet werden, ob sich die Stabilität von *Gid2* durch die Anwesenheit von dem Wildtyp *Gid9* Protein beeinflussen lässt. Hierfür wurde ein in allen *Gid* Proteinen defizienter Stamm ( $\Delta$ *gid*) der nur *Gid2-V5* exprimiert mit dem Plasmid pRS314*GID9* transformiert, um *Gid9* in diesem Stammhintergrund zur Expression zu bringen. Beide Stämme wurden nun unter gluconeogenetischen Bedingungen 16 h lang kultiviert, danach erfolgte die Umsetzung auf glukosehaltiges Medium. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und alkalisch lysiert. Nach einer SDS-PAGE und einem Westernblot erfolgte die Immunodetektion mit V5- und Pgk-Antikörpern.

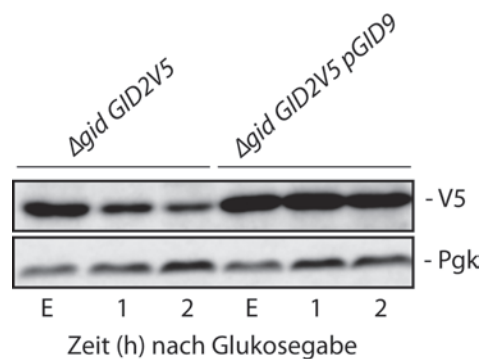


Abbildung 26: **Stabilisierender Effekt von *Gid9* auf *Gid2* in einem  $\Delta$ *gid* Stamm.** Ein  $\Delta$ *gid* *Gid2-V5* Stamm wurde mit dem Plasmid pRS314*GID9* transformiert, um eine *Gid9* Expression zu ermöglichen. Die Zellen wurden 16 h auf Selektionsmedium (CM Medium mit Ethanol als Kohlenstoffquelle und ohne Uracil) kultiviert und dann ins gleichen Medium mit Glukose anstatt Ethanol als Kohlenstoffquelle umgesetzt. Die Probenentnahme erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Nach Lyse, SDS PAGE und Westernblot erfolgte die Immunodetektion mit V5-Antikörpern. Ladekontrolle: Pgk, 3-Phosphoglyceratkinase.

Abbildung 26 zeigt deutlich, dass in einem  $\Delta$ *gid* Stamm *Gid2-V5* nach Änderung der Bedingungen von gluconeogenetischem zu glykolytischem Wachstum schnell abgebaut wird (Bild linke Seite). Dagegen bleibt die Expressionshöhe von *Gid2-V5* über den gesamten Probenzeitraum stabil, wenn noch zusätzlich *Gid9* in dem  $\Delta$ *gid* Stamm

exprimiert wird. Gid9 hat somit einen essentiellen Einfluss auf die Stabilität von Gid2. Das gebildete Heterodimer Gid2/Gid9 scheint von der Zelle nicht mehr abgebaut zu werden.

### 3.11 Das Gid2/Gid9-Heterodimer bindet unabhängig voneinander an Gid1 und Gid5

Nachdem in Kapitel 2.7 gezeigt werden konnte, dass Gid2 und Gid9 unabhängig von allen anderen Gid-Proteinen ein stabiles Heterodimer bilden, sollte nun weiter untersucht werden, mit welchen Gid-Komplex Untereinheiten dieses Dimer direkt interagiert.

#### 3.11.1 Interaktion zwischen Gid2, Gid9 und Gid1

Um die Interaktion zwischen Gid2, Gid9 und Gid1 zu untersuchen, wurde der Hefestamm YWO1863 (*GID1-MYC<sub>13</sub> GID2-V5 Δgid4 Δgid5 Δgid7 Δgid8 Δgid9*) mit dem Plasmid pRS314*GID9* transformiert, um die Expression von Gid9 zu gewährleisten. Die Zellen wurden auf Selektionsmedium (CM EtOH-TRP Medium) 16 h lang angezogen. Je Probe wurden 70 OD<sub>600</sub> Zellen entnommen. Nach der Lyse erfolgte die Immunopräzipitation mit V5-Antikörpern. Nach einer SDS-PAGE und einem Westernblot wurde die Immunodetektion mit Myc-, Gid9- und V5-Antikörpern vorgenommen.

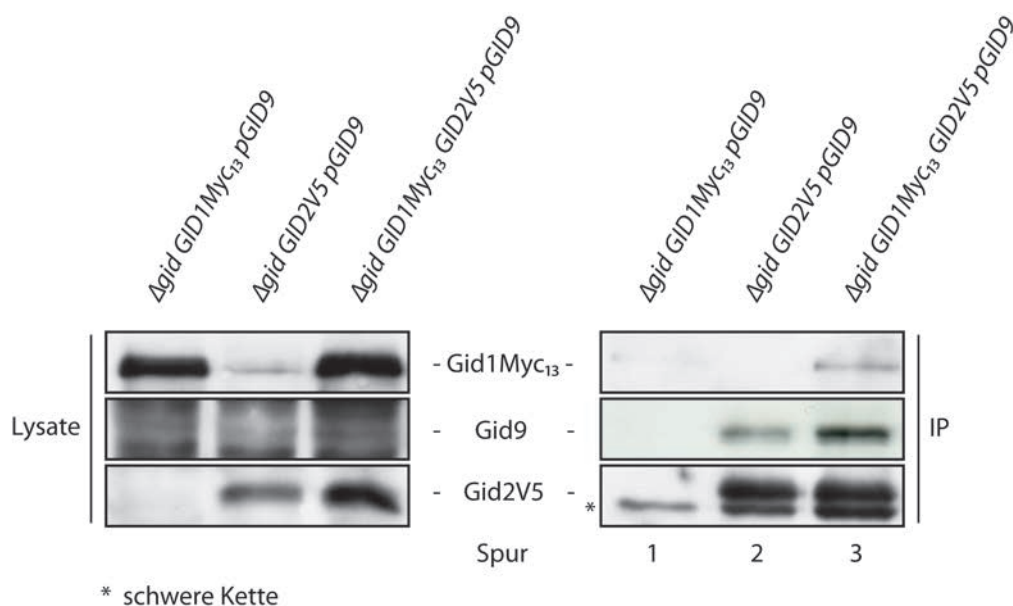


Abbildung 27: **Interaktion zwischen Gid1, Gid2 und Gid9 in einem *Δgid* Stamm.** In einem *Δgid* Stamm wurden Gid1-Myc<sub>13</sub> und Gid2-V5 chromosomal unter ihren nativen Promotoren integriert. Dieser Stamm

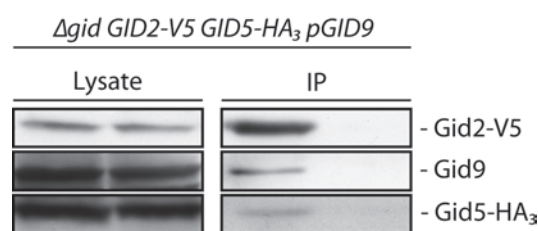


wurde mit dem Plasmid pRS314*GID9* transformiert, um *Gid9* zu exprimieren. Die Zellen wurden 16 h auf CM-EtOH-TRP Medium angezogen. Es wurden 70 OD<sub>600</sub> Zellen als Proben entnommen. Nach der Lyse der Zellen erfolgte die Immunopräzipitation mit V5-Antikörpern. Die Immunodetektion wurde mit Myc-, *Gid9*- und V5-Antikörpern vorgenommen.

Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, interagieren *Gid1-Myc<sub>13</sub>*, *Gid9* und *Gid2-V5* unter gluconeogenetischen Bedingungen miteinander (Abb. 27, Spur 3). Auch in Abwesenheit aller anderen *Gid*-Proteine bildet sich ein Teilkomplex. Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass *Gid1* direkt an das Heterodimer *Gid2/Gid9* bindet ohne Hilfe eines zusätzlichen *Gid*-Proteins. Im Stamm  $\Delta gid$  *GID1-Myc<sub>13</sub>* *pGID9* konnte mit V5-Antikörpern kein Protein präzipitiert werden. Dies bedeutet, dass weder *Gid1-Myc<sub>13</sub>* noch *Gid9* unspezifisch mit dem eingesetzten V5-Antikörper oder den Protein-A-Sepharosebeads interagieren (Abb. 27, Spur 1).

### 3.11.2 Interaktion zwischen *Gid2*, *Gid9* und *Gid5*

Um die Interaktion zwischen *Gid2*, *Gid9* und *Gid5* zu untersuchen, wurde der Hefestamm YWO1873 (*GID2-V5 GID5-HA<sub>3</sub> Δgid2 Δgid4 Δgid7 Δgid8 Δgid9*) mit dem Plasmid pRS314*GID9* transformiert, um die *Gid9* Expression gewährleisten zu können. Die Zellen wurden auf Selektionsmedium (CM EtOH-TRP Medium) 16 h lang kultiviert. Je Probe wurden 70 OD<sub>600</sub> Zellen entnommen. Nach der Lyse erfolgte die Immunopräzipitation mit V5-Antikörpern. Nach einer SDS-PAGE und einem Westernblot erfolgte die Immunodetektion mit HA-, *Gid9*- und V5-Antikörpern.



IP: Immunopräzipitation

Abbildung 28: **Interaktion zwischen *Gid2*, *Gid5* und *Gid9* in einem  $\Delta gid$  Stamm.** In einem  $\Delta gid$  Stamm wurden *GID5-HA<sub>3</sub>* und *GID2-V5* chromosomal unter ihren nativen Promotoren integriert. Dieser Stamm wurde mit dem Plasmid pRS314*GID9* transformiert, um *Gid9* zu exprimieren. Die Zellen wurden 16 h auf CM-EtOH-TRP Medium angezogen. Es wurden 70 OD<sub>600</sub> Zellen als Proben entnommen. Nach der Lyse der Zellen

erfolgte die Immunopräzipitation mit V5-Antikörpern. Die Immunodetektion wurde mit HA-, Gid9- und V5-Antikörpern vorgenommen.

Wie man in Abbildung 28 erkennen kann, interagieren Gid2-V5, Gid5-HA<sub>3</sub> und Gid9 auch in Abwesenheit weiterer Gid-Proteine miteinander. Auch hier bildet sich ein stabiler Teilkomplex. Gid5-HA<sub>3</sub> bindet direkt an das Gid2/Gid9 Heterodimer ohne weitere bekannte Interaktionspartner. Als Negativkontrolle wurde die Immunopräzipitation ohne V5-Antikörper durchgeführt (Abb. 28, rechte Seite). Es konnte kein Protein nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass weder Gid2-V5, Gid5-HA<sub>3</sub> noch Gid9 unspezifisch mit den Protein-A-Sepharosebeads interagieren und die gefundenen Interaktionen spezifisch sind.

### 3.12 Molekulare Massenbestimmung des Gid-Komplexes mittels Gelfiltration

Um die Topologie des Gid-Komplexes genauer zu bestimmen, wurde mithilfe von Gelfiltrationsexperimenten versucht, eine exaktere Größenbestimmung des Komplexes durchzuführen, als es mit den bisherigen Glyceringradienten möglich war (Regelmann et al., 2003). Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob gluconeogenetische Enzyme mit dem Gid-Komplex co-fractionieren.

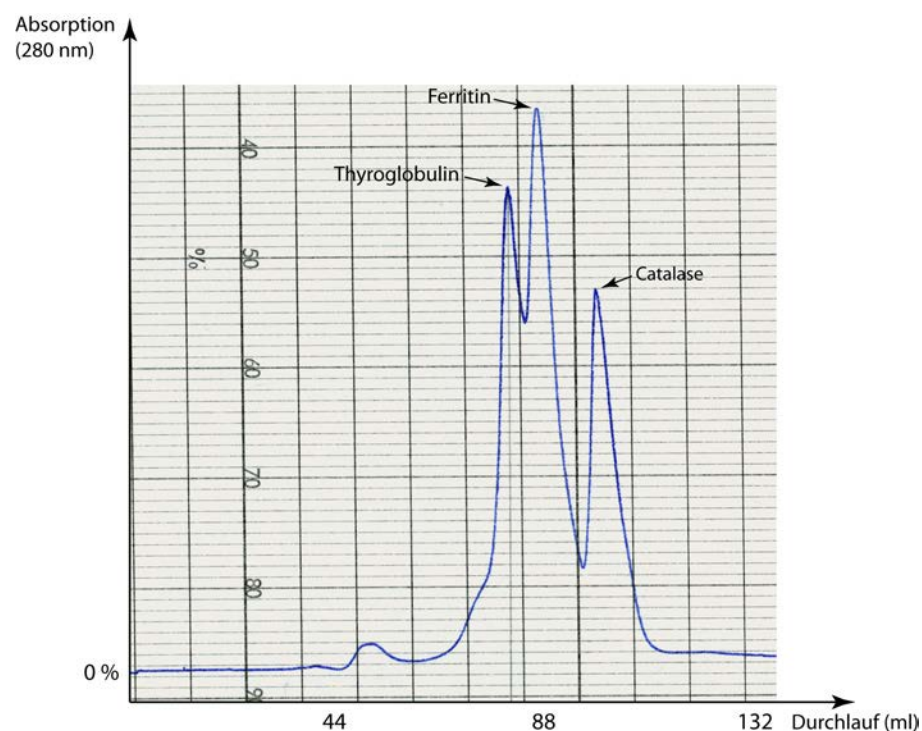


Abbildung 29: **Absorptionsdiagramm der Markerproteine auf einer Superose6-Trennsäule.** Von gereinigtem Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa) und Katalase (232 kDa) wurden je 2 mg in 0.5 ml Puffer G (150 mM NaCl, 50 mM Phosphat) vollständig gelöst und auf die Superose6-Säule aufgetragen. Danach wurde mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 7 ml/h ca. 20 h getrennt. Große Proteine fließen schneller durch die Säule, da sie weniger ins Säulenmaterial diffundieren.

Die Trennsäule wurde mit gereinigten Proteinen bekannten Molekulargewichts geeicht. Wie man in Abbildung 29 erkennen kann, erfolgte bei den gewählten Bedingungen eine ausreichend saubere Trennung der eingesetzten Markerproteine. Zwischen der 232 kDa großen Katalase und dem 440 kDa großen Ferritin erfolgt eine sehr gute Trennung, die Absorption geht dazwischen auf ca. 25 % des Maximalwerts zurück. Dies bedeutet, dass sich beide Proteine in nur sehr geringen Mengen in wenigen Proben gemeinsam befinden. Auch zwischen Ferritin und Thyroglobulin ist die Auflösung hoch genug, um eine klare Unterscheidung ihrer Maximalwerte treffen zu können.

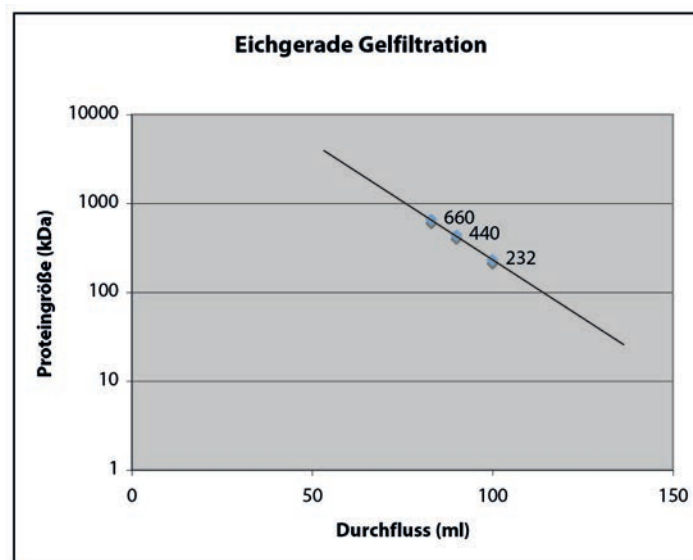


Abbildung 30: **Eichgerade der Superose6-Gelfiltrationssäule.** Von den Markerproteinen Katalase (232 kDa), Ferritin (440 kDa) und Thyroglobulin (660 kDa) wurden je 2 mg in 0.5 ml Puffer gelöst und auf die Trennsäule aufgetragen und getrennt. Bei einer logarithmischen Auftragung der Proteingröße (kDa) gegen das Durchflussvolumen (ml) erhält man eine Gerade.

### 3.12.1 Gelfiltrationsexperiment mit Zelllysate

Um möglichst viele Gid-Proteine detektieren zu können, wurde ein *GID1-MYC<sub>13</sub> GID2-HA<sub>3</sub>* Stamm unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen herangezogen. Die Zellen

wurden dann für 30 min auf glukosehaltigem Medium umgesetzt, 300 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet, unter nativen Bedingungen lysiert und in möglichst wenig Puffer auf die Trennsäule aufgebracht. Die Auftrennung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie für die Markerproteine. Die Probenentnahme begann ca. sieben Stunden nach dem Beladen der Säule (erster Ausschlag des Photometers) und endete nach weiteren elf Stunden, da sich ab hier nur noch Proteine mit einem Molekulargewicht < 50 kDa auf der Säule befanden (Wert berechnet aus Eichgerade).

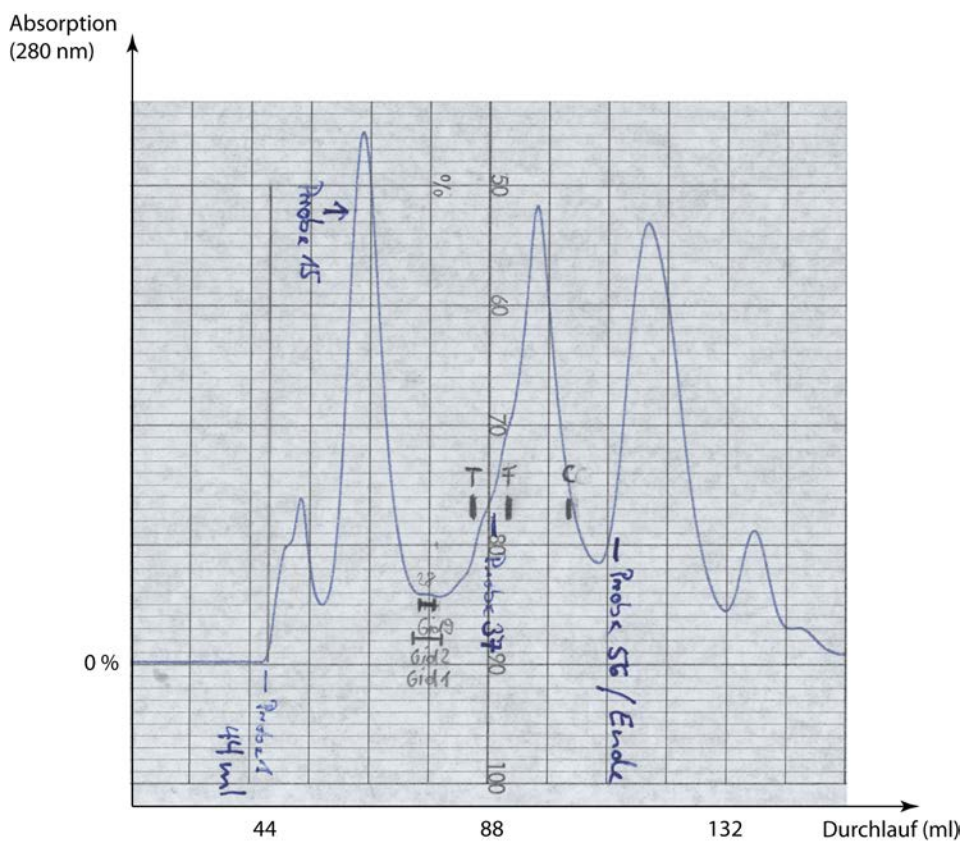


Abbildung 31: **Absorptionsspektrum des Gid1-Myc<sub>13</sub> Gid2-HA<sub>3</sub> Zelllysats.** 300 OD<sub>600</sub> Zellen wurden nach einer nativen Lyse auf die Superose6 Trennsäule aufgetragen und in Puffer G (150 mM NaCl, 50 mM Phosphat) über ca. 20 h aufgetrennt. Es wurden 56 Proben je 1.2-1.3 ml gesammelt und auf Eis aufbewahrt. Die Probenentnahme wurde nach ca. 15 ml nach dem berechneten Durchfluss der Katalase beendet.

Die Proteine der gesammelten Proben wurden mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt, die Pellets in Harnstoffpuffer aufgenommen und anschließend eine SDS-PAGE und ein Westernblot durchgeführt. Die Immunodetektion erfolgte mit Myc-, HA-, Gid9-, FAS-, Ape1-, FBpase- und PEPCK-Antikörpern.

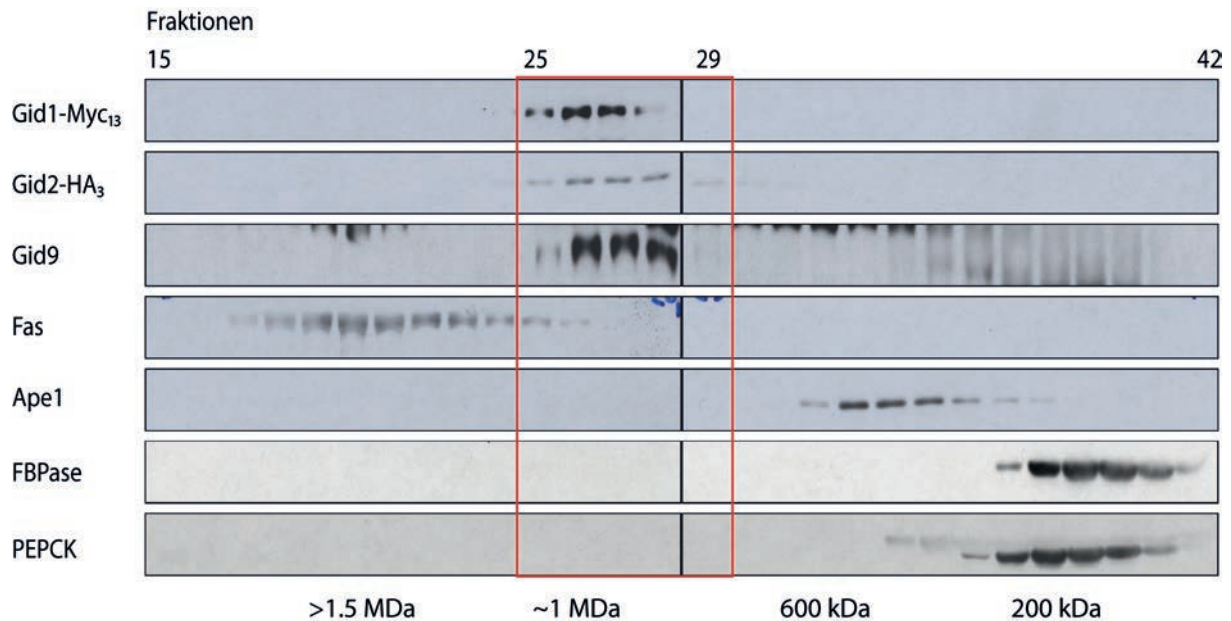


Abbildung 32: **Gid1-Myc<sub>13</sub>, Gid2-HA<sub>3</sub> und Gid9 ko-fractionieren bei einem berechneten Molekulargewicht von ungefähr 1000 kDa Größe.** Es wurden Zellen in ethanolhaltigem Medium für 16 h kultiviert und anschließend für 30 min auf glukosehaltiges Medium umgesetzt. 300 OD<sub>600</sub> Zellen wurden geerntet, lysiert und auf die Superose6-Trennsäule aufgetragen. Es wurden 56 Proben entnommen und einer SDS-PAGE und einem Westernblot unterzogen. Die Immunodetektion erfolgte mit Myc-, HA-, Gid9-, FAS-, Ape1-, FBPase- und PEPCK-Antikörpern. Die Abbildung zeigt den für die Detektion der Proteine relevanten Ausschnitt.

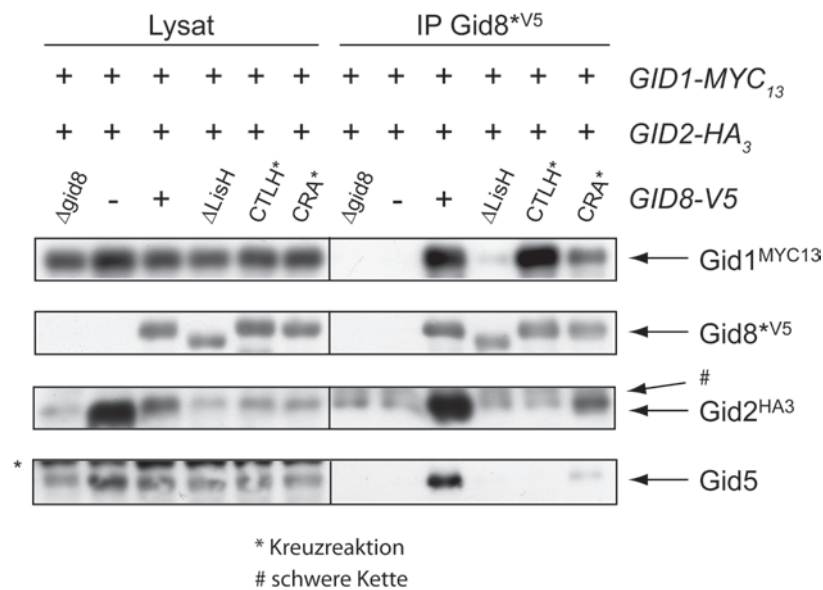
Wie man in Abbildung 32 deutlich erkennen kann, co-fractionieren Gid1-Myc<sub>13</sub>, Gid2-HA<sub>3</sub> und Gid9 mit ihrem jeweiligen Intensitätsmaximum in den Proben 26-28. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die Gid-Proteine in hochmolekularen Proteinkomplexen vorliegen müssen. Jedoch scheint der Gid-Komplex unter den getesteten Bedingungen größer zu sein als bisher angenommen (Regelmann et al., 2003; Santt et al., 2008). Aus der Eichgeraden berechnet sich die Größe der Komplexe bzw. des Komplexes auf ca. 1000 kDa. Dies bestätigt sich auch durch die Detektion der Kontrollproteine Fas1 (Fettsäuresynthase Komplex, ca. 2 MDa) und Ape1 (Aminopeptidase 1, 660 kDa), die einerseits in "höhermolekularen" Fraktionen (Fas1), andererseits in deutlich "niedermolekularen" Fraktionen (Ape1) nachgewiesen wurden. FBPase und PEPCK wurden ebenfalls nur in den Fraktionen eines kleineren Molekulargewichts nachgewiesen. Auch hier erkennt man noch deutlich den Größenunterschied der als Tetramere vorliegenden Enzyme FBPase (140 kDa) und PEPCK (240 kDa). Während der Katabolitdegradation scheint keine stabile Bindung zwischen dem Gid-Komplex und seinen Substraten vorzuliegen. Weitere Experimente

wurden mit gluconeogenetisch gewachsenen Zellen durchgeführt. Hier konnte keine signifikante Änderung in Bezug auf die Gid-Komplex Größe zu den auf glukosehaltigem Medium umgesetzten Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.13 Untersuchungen zu Gid8

Nachdem in Gid8 die CRA-Domäne schon näher analysiert worden war und ihr Einfluss auf die Degradation von FBPase gezeigt werden konnte (Barbin, 2009), sollten hier die zwei verbleibenden Domänen hinsichtlich ihrer biologischen Funktionalität untersucht werden. Hierfür wurden analog zu Gid2 und Gid9 Bereiche der LisH- und der CTLH-Domäne deletiert (Abbildung 33). Mittels PCR-Technik wurden zwei Plasmide erzeugt, *pRS316GID8Δ85-117LisH-HA<sub>3</sub>* und *pRS316GID8Δ193-207CTLH-HA<sub>3</sub>*, dabei wurde die LisH-Domäne komplett deletiert, bei der CTLH-Domänen-Mutante wurde ein hochkonservierter Bereich von 15 Aminosäuren deletiert, der durch den Sequenzabgleich verschiedener CTLH-Domänen aus Hefe und Menschen bestimmt wurde (Abbildung 17). Die korrekte Einführung der Deletionen in den ORF von Gid8 wurde mittels Sequenzierung überprüft. Die Funktionalität der Gid8-CTLH-Mutante war in ersten Experimenten schon untersucht worden, jedoch waren die Experimente noch nicht aussagekräftig genug, um das Thema abzuschließen (E. Diler, Diplomarbeit 2008). Weitere Untersuchungen zur biologischen Funktionalität der Domänenmutanten und zur Interaktion mit anderen Gid-Proteinen wurden unter meiner Anleitung von Denis Kušević im Rahmen seiner Diplomarbeit (2011) durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass Gid8 über seine LisH-Domäne mit Gid1 interagiert (Abb. 33A) und dass Gid8 die Interaktion zwischen dem Gid2/Gid9-Heterodimer und Gid1 verstärkt. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von Gid5 zum Gid Komplex von Gid8 abhängt (Abb. 33A).

A



B



Abbildung 33: **(A) Gid8 ist für die Interaktion zwischen Gid1, Gid2 und Gid5 essentiell.** Hefezellen wurden unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen kultiviert und bei einer  $OD_{600}$  von ca. 1 geerntet. Die Zellen wurden mit Glasperlen aufgeschlossen und zentrifugiert. Die Immunopräzipitation erfolgte mit V5-Antikörper. Nach einer SDS PAGE und einem Westernblot konnten die Proteine mit V5-, HA-, Myc- und Gid5-Antikörper detektiert werden. (Abbildung erhalten von Denis Kušević) **(B) Domänen in Gid8.** Das Cartoon gibt die Größe der identifizierten Domänen und ihre relative Lage in der Primärstruktur/Sekundärstruktur des Proteins wieder. Die eingefügten Mutationen sind farblich hervorgehoben.

### **3.14 Einfluss von Tor1 auf die Expression von Gid4 und Gid5 und weitere gluconeogenetischen Enzymen**

Das "Target of Rapamycin" Protein (TOR1) ist eine Ser/Thr-Kinase der PIKK (phosphatidylinositol kinase-related kinase) Familie, das erstmals in Hefe in zwei eigenständigen Multi-Proteinkomplexen mit unterschiedlichen Aufgaben gefunden wurde: TORC1 und TORC2 (Martin and Hall, 2005). Diese konservierten Komplexe regulieren eine Vielzahl unterschiedlicher Prozesse beim Zellwachstum (Rohde et al., 2001; Wullschleger et al., 2006) und stehen dabei in ständigem Austausch mit extrazellulären und intrazellulären Signalen (Abbildung 34). TORC1 reagiert dabei auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen, wie Aminosäuren, Glukose oder auch Sauerstoff (Kapahi et al., 2010). Der TORC1-Komplex übernimmt hierbei die Funktion einer Schaltzentrale für das Zellwachstum, die von vielen verschiedenen Faktoren reguliert wird. Durch die TORC1-Aktivität werden die Translation von mRNA (Hay and Sonenberg, 2004; Ma and Blenis, 2009), die Autophagozytose (Lum et al., 2005; Kamada et al., 2005), die Transkription (Tsang et al., 2010), der Metabolismus die Proliferation, die Größe und das Wachstum der Zelle sowie weitere zelluläre Prozesse beeinflusst (Thomas and Hall, 1997; Thomas et al., 2003). Durch essentielle Aminosäuren kann TORC1 aktiviert werden (Nicklin et al., 2009), bei Verfügbarkeit von Nährstoffen wie Glukose wird durch die AMPK (AMP dependent kinase) die Phosphorylierung von TORC1 vermittelt, wodurch deren Aktivität sinkt (Gwinn et al., 2008; Hardie, 2007). In *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass Kohlenstoff- und Phosphat-Hungerung zur Inhibierung von TORC1 führen (Urban et al., 2007). Weiter konnte in  $\Delta tor1$  Stämmen gezeigt werden, dass sich durch die Abwesenheit von Tor1 die Lebensspanne des Organismus verlängern lässt (Kaeberlein et al., 2005).

Hier sollte nun untersucht werden, ob der "Tor Pathway" auch einen Einfluss auf den Abbau gluconeogenetischer Enzyme oder die Expression von Gid-Proteinen hat, da diese je nach Verfügbarkeit fermentierbarer oder nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquellen reguliert werden oder in diesen Regulationsprozess selbst eingreifen.



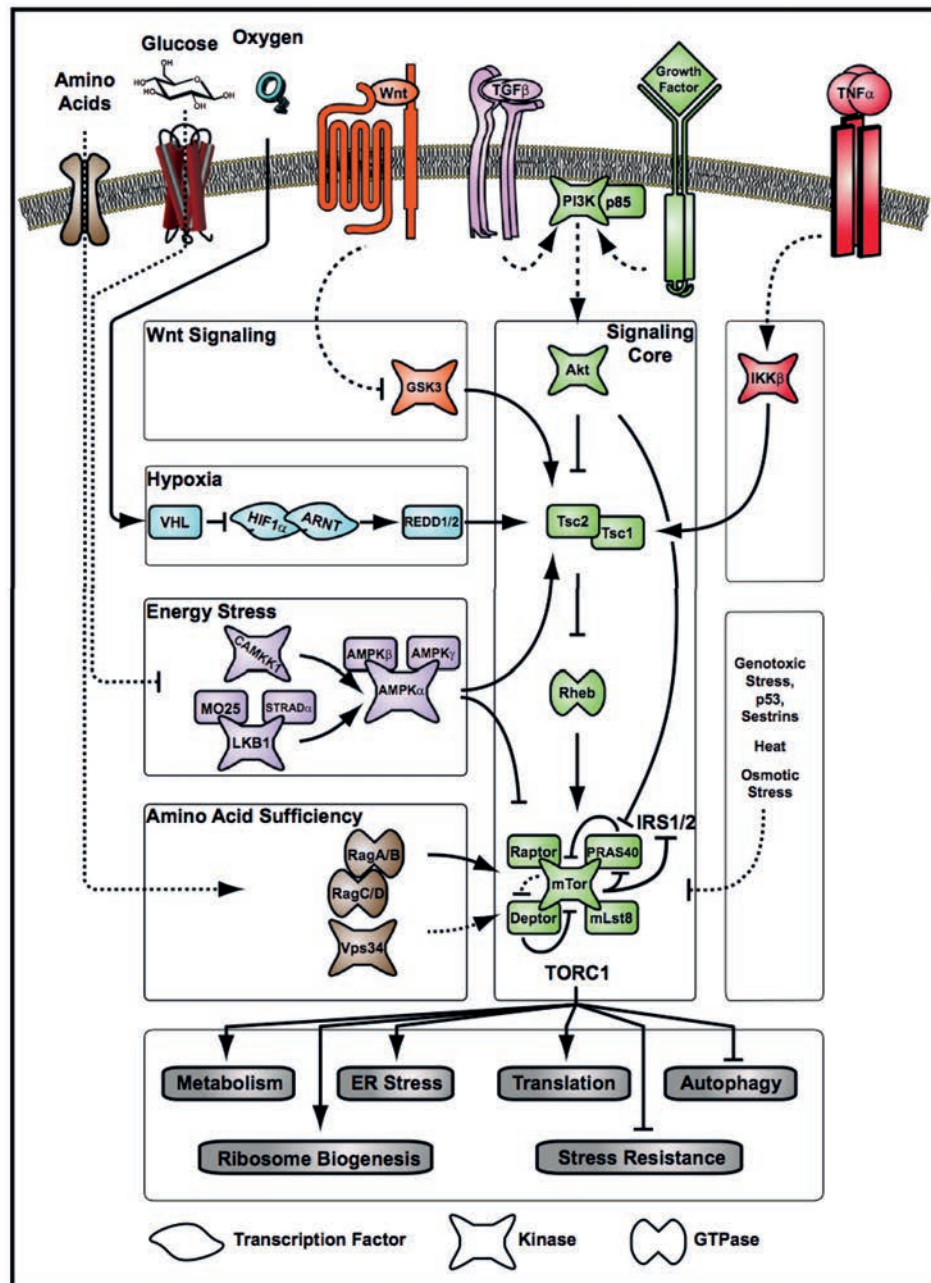


Abbildung 34: **TOR-Signalnetzwerk in tierischen Zellen.** TORC1 verknüpft zahlreiche intra- und extrazelluläre, durch Umwelteinflüsse zustande gekommenen Signale miteinander, indem die Signale in einer Art Schaltzentrale (grün hervorgehoben) zusammengeführt werden und dadurch im Weiteren verschiedenste Zellabläufe steuert, die das Wachstum der Zelle und die Verfügbarkeit von Nährstoffen in der Umgebung in der richtigen Balance halten. (Abbildung übernommen aus (Kapahi et al., 2010))

### 3.14.1 Rapamycin verlangsamt den FBPase-Abbau in *S. cerevisiae*

Um einen Einfluss des Tor-Pathways auf den FBPase-Abbau zu überprüfen, ist die einfachste Möglichkeit, gluconeogenetisch gewachsene Zellen nach dem Shift auf glukosehaltiges Medium zusätzlich noch mit Rapamycin zu versetzen. Rapamycin bindet

an FKBP12 (FK-506 binding protein) und inhibiert dadurch die Interaktion von mTOR mit seinen Substratproteinen (Chung et al., 1992; Kuo et al., 1992; Gingras et al., 2004; Raught et al., 2001).

Ein Stamm, der *Gid4* als *Myc<sub>9</sub>* Hybrid enthielt wurde unter gluconeogenetischen Bedingungen kultiviert und anschließend auf glukosehaltiges Medium umgesetzt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. Nach alkalischer Lyse der Zellen, einer SDS-PAGE und einem Westernblot wurden die gewünschten Proteine mit spezifischen Antikörpern detektiert.

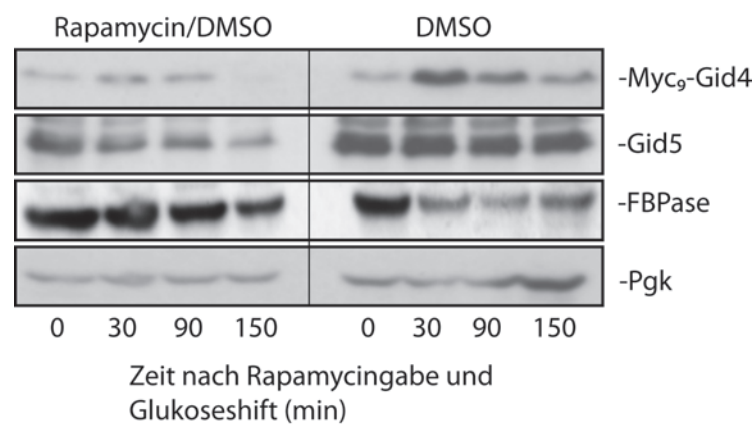


Abbildung 35: **Rapamycin verlangsamt den FBPase-Abbau.** Gluconeogenetisch gewachsene Zellen wurden nach 16 h auf glukosehaltiges Medium mit einer Rapamycinkonzentration von 200 ng/ml umgesetzt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Detektion der gewünschten Proteine erfolgte nach alkalischer Lyse, SDS-PAGE und Westernblot mit *Myc*-, *Gid5*- und *FBPase*-Antikörper. Ladekontrolle: *Pgk*, 3-Phosphoglycerinkinase.

Bei Anwesenheit von Rapamycin wird *FBPase* stark verlangsamt abgebaut (Abb. 35). Als Kontrolle diente der gleiche Stammhintergrund, der jedoch nach dem Glukoseshift nur mit *DMSO* (Lösungsmittel für die Rapamycin-Stammlösung) behandelt wurde. Auch in den *DMSO* behandelten Proben kann beobachtet werden, dass *FBPase* nach 2.5 h nicht vollständig degradiert ist, was auf einen leicht inhibierenden Effekt durch das Lösungsmittel auf den proteasomalen Abbau von *FBPase* hindeutet. Nach dem Wechsel auf glukosehaltiges Medium wird *Myc<sub>9</sub>-Gid4* in den mit Rapamycin behandelten Zellen weit weniger stark exprimiert als in dem Kontrollstamm. *Gid4* ist jedoch für die Initiierung des proteasomalen *FBPase*-Abbauprozesses unbedingt notwendig (Santt, 2009; Santt et al., 2008). Die starke Stabilisierung von *FBPase* in den mit Rapamycin behandelten Zellen lässt

sich damit plausibel durch die fehlende *Gid4* Expression erklären. Erstaunlicherweise hat die Behandlung der Zellen mit Rapamycin auch einen Einfluss auf die Stabilität von *Gid5*. Das *Gid5*-Signal nimmt über den gesamten Probenzeitraum stetig ab, während in den mit DMSO behandelten Kontroll-Zellen eine stabile Expression von *Gid5* beobachtet werden kann. Die Änderung von gluconeogenetischen zu glykolytischen Bedingungen bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit Rapamycin führt zu einer starken Destabilisierung des ansonsten stabilen *Gid5*-Proteins (Santt et al., 2008). Die Ergebnisse zeigen, dass der Tor-Pathway einen unmittelbaren Einfluss auf den proteasomalen Abbau von FBPase hat. Dies kann auf eine durch die Inhibierung des TORC1-Komplexes mittels Rapamycin veränderte Expression und Stabilität von *Gid4* und *Gid5* zurückgeführt werden. Infolge dieser Effekte wird die Funktionalität des *Gid*-Komplexes nachhaltig gestört und FBPase nach dem Wechsel von gluconeogenetischen zu glykolytischen Wachstumsbedingungen nicht mehr optimal proteasomal abgebaut.

### **3.14.2 Wachstumstest *TOR1* deletierter Hefestämme unter glykolytischen und gluconeogenetischen Bedingungen**

Bei Behandlung der Kontrollstämme mit DMSO wurde ein schwacher Effekt auf die Degradation von FBPase beobachtet. Um die Auswirkung des Fehlens von *Tor1* ohne Lösungsmittelleffekte zu studieren, sollte nun in einem Stamm mit *Myc<sub>9</sub>* getaggttem *Gid4* das *TOR1* Gen deletiert werden. Dazu sollte in dem resultierenden Stamm *Myc<sub>9</sub>-GID4 Δtor1* die Expression von *Gid4* und *Gid5* sowie die Abbaukinetik gluconeogenetischer Enzyme verfolgt werden.

Mittels PCR Technik wurde eine Deletionskassette über den gesamten Bereich des *TOR1* ORF's wie in (Güldener et al., 1996) beschrieben hergestellt und ein *Myc<sub>9</sub>-GID4* Stamm mit dem Konstrukt transformiert. Der erhaltene Stamm *Myc<sub>9</sub>-GID4 Δtor1::KANMX4* wurde mittels Kontroll-PCR auf die Richtigkeit der Integration der Deletionskassette überprüft. Bei den nachfolgenden Experimenten (Wachstum unter gluconeogenetischen Bedingungen, Wechsel des Mediums zu glykolytischen Bedingungen) stellte sich heraus, dass der *Δtor1* Stamm auf ethanolhaltigem Nährmedium nicht mehr wachsen konnte.

Nun wurden der *Myc<sub>9</sub>-GID4 Δtor1*, ein *Δfbp1* und ein *Myc<sub>9</sub>-GID4* Wildtypstamm auf glukosehaltigem Medium kultiviert, für 6 h auf YPethanol Medium umgesetzt und anschließend wieder in YPD Medium überführt. Über einen Zeitraum von 6 h haben die

Zellen genug Zeit, gluconeogenetische Proteine zu exprimieren, sterben aber nicht, auch wenn sie nicht in der Lage sind, unter diesen Bedingungen zu wachsen.

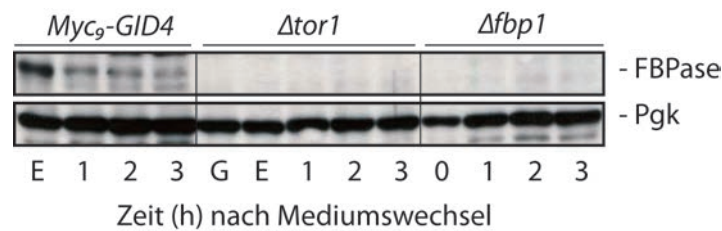


Abbildung 36: **Ein  $\Delta$ *tor1* Stamm kann keine FBPase mehr exprimieren.** Ein *Myc<sub>9</sub>-GID4*  $\Delta$ *tor1*, ein  $\Delta$ *fbp1* und ein *Myc<sub>9</sub>-GID4* Wildtypstamm wurden unter glykolytischen Bedingungen kultiviert, für 6 h auf YPethanol Medium umgeimpft und anschließend wieder in YPD Medium umgesetzt. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen. Die Immunodetektion erfolgte mit spezifischen FBPase- und Pgk-Antikörpern. Ladekontrolle: Pgk, 3-Phosphoglyceratkinase.

Im *Myc<sub>9</sub>-GID4* Wildtypstamm sieht man nach 6 h Wachstum auf YPethanol wie erwartet ein starkes FBPase-Signal und im weiteren Verlauf den Abbau der FBPase unter diesen Versuchsbedingungen. Im  $\Delta$ *tor1* Stamm wird wie im  $\Delta$ *fbp1* Kontrollstamm keine FBPase mehr exprimiert. Da dieses Enzym neben zahlreichen weiteren Proteinen für das Wachstum auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen unabdingbar ist, erklärt sich das Sterben der Zellen nach 16 h in YPethanol Medium.

Um zu dem Schluß zu kommen, dass es sich bei dem beobachteten Effekt um ein allgemeines, vom Stammhintergrund unabhängiges Phänomen handelt, wurde die *TOR1* Deletion in einen weiteren Stamm, Jk9-3da, mit abweichendem genetischen Hintergrund (Helliwell et al., 1994), eingeführt. Die korrekte Integration der Deletionskassette ins Genom wurde mittels Kontroll-PCR überprüft. Mit den beiden *TOR1* Deletionsstämmen wurde nun ein Wachstumstest auf YPD und YPethanol durchgeführt. Hierzu werden für die eingesetzten Hefestämme Verdünnungsreihen erstellt und auf den entsprechenden Agarplatten punktförmig aufgebracht. Anschließend werden die Platten bei 30 °C 48 h lang inkubiert.

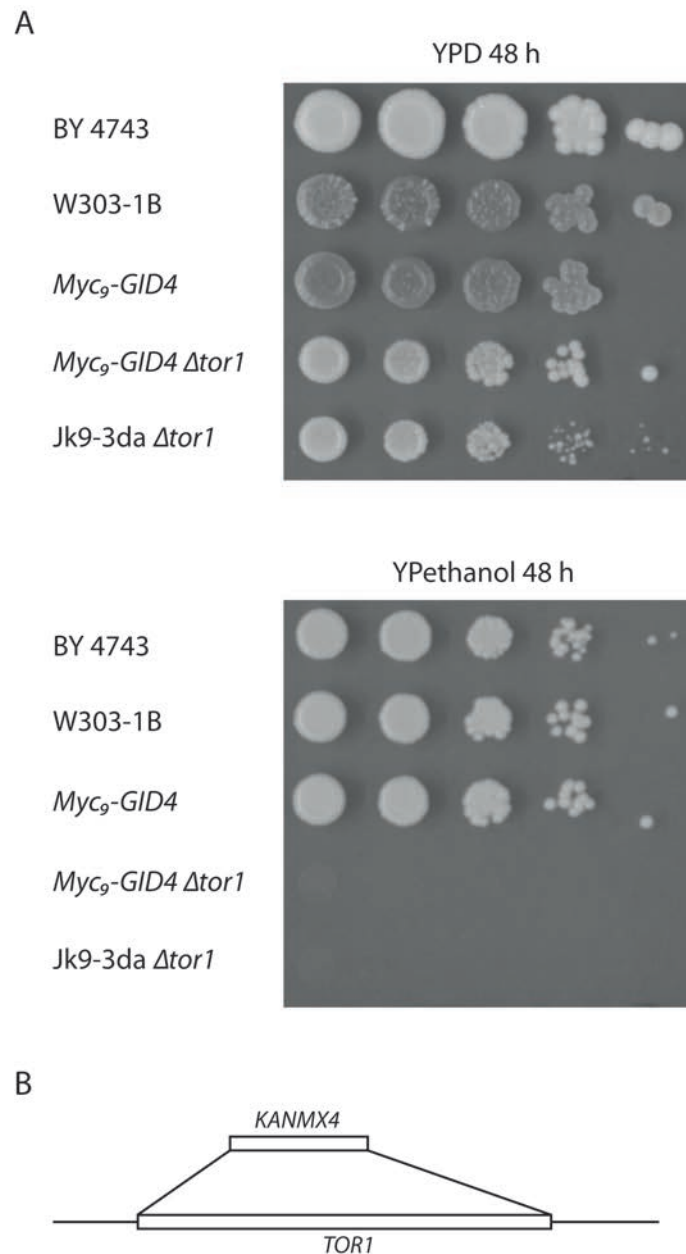


Abbildung 37: **Wachstumstest der *TOR1* Deletionsstämme auf YPD und YPethanol Medium.** **(A)** Die Hefestämme werden über Nacht in YPD Medium kultiviert, 1 OD<sub>600</sub> Zellen wurde entnommen und in 100 µl Wasser resuspendiert, jede weitere Probe wird im Verhältnis 1:10 zur vorherigen Probe verdünnt und davon auf den entsprechenden Agarplatten 5 µl punktförmig aufgebracht. Anschließend werden die Platten bei 30 °C 48 h lang inkubiert. **(B)** Das Cartoon zeigt schematisch die Deletion des *TOR1* Gens. Ein mittels PCR-Technik erhaltenes DNA-Fragment, das für das *KANMX4* Gen kodiert, wurde über die flankierenden Regionen des *TOR1* ORFs an dieser Stelle ins Genom integriert.

Wie man in Abbildung 37 A sehen kann, ist keine der beiden *TOR1* Deletionsmutanten in der Lage, auf YPethanol Medium zu wachsen. Dieses Ergebnis lässt schließen, dass es sich bei dem beobachteten Phänomen nicht um einen Stammhintergrund abhängigen Effekt

handelt, sondern dass Tor1 generell für das Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen benötigt wird.

Vergleicht man Abbildung 37 A mit Abbildung 38 A kann man erkennen, dass eine partielle Disruption des *TOR1* Gens (Abb. 38) nicht den gleichen drastischen Effekt auf das Wachstum der Zellen hat. Wird nur ein Teil von *TOR1* durch das *LEU2* Gen ersetzt (Abb. 38 B), können die Zellen weiterhin auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wachsen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass das 287 Aminosäuren umfassende N-terminale Tor1-Fragment, das in einem *tor1::LEU2-4* Stamm erhalten bleibt, weiterhin eine essentielle Funktion bei der Regulation des Stoffwechsels sowie weiterer Prozesse in der Zellen übernehmen kann.

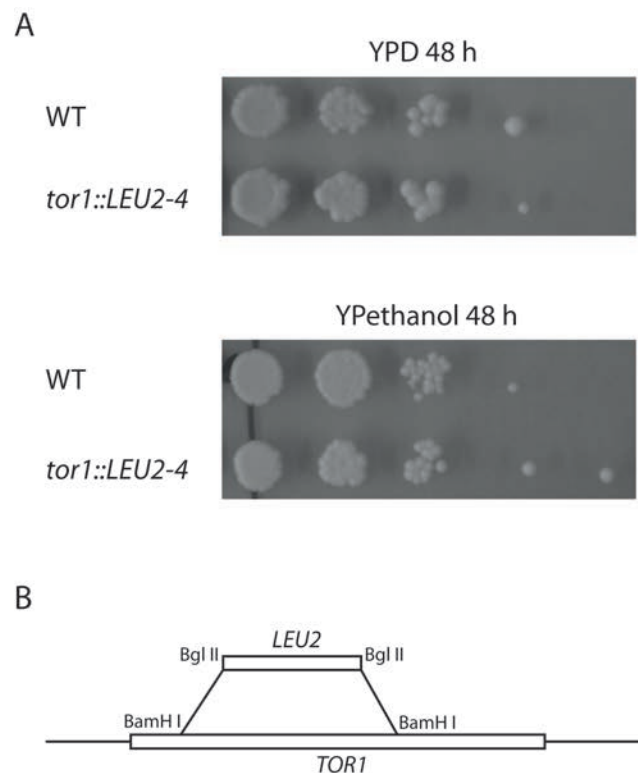


Abbildung 38: **Wachstumstest eines in *TOR1* disruptierten Stamms.** **(A)** Die Hefestämme werden über Nacht in YPD Medium kultiviert, 1 OD<sub>600</sub> Zellen wurde entnommen und in 100 µl Wasser resuspendiert, jede weitere Probe wurde im Verhältnis 1:10 zur vorherigen Probe verdünnt und davon auf den entsprechenden Agarplatten jeweils 5 µl punktförmig aufgebracht. Anschließend werden die Platten bei 30 °C 48 h lang inkubiert. **(B)** Das Cartoon zeigt schematisch die Disruption des 7413 bp großen *TOR1* Gens. Ein DNA-Fragment, das für das *LEU2* Gen kodiert, wurde über BamHI/BglII-Schnittstellen in den *TOR1* ORF integriert. BamHI schneidet den ORF nach 861 bzw. 5040 Basenpaaren. Abbildung modifiziert aus (Helliwell et al., 1994).

## 4 Diskussion

Die Anpassung der Zelle an die sie umgebenden äußere Bedingungen ist für ihr Überleben absolut notwendig. Nur so kann eine optimale Nutzung der vorhandenen Ressourcen gewährleistet werden. Für Hefezellen wie auch für viele andere Organismen ist der Zucker Glucose die bevorzugte Energie und Kohlenstoffquelle. Es ist daher nicht verwunderlich, dass die Zelle ein äußerst empfindliches Detektion-/Signalnetzwerk entwickelt hat, das permanent die Verfügbarkeit von Glucose überprüft und die Aufnahme und Verstoffwechselung (Glykolyse) dieses Zuckers überwacht. Wird der Zelle von außen keine Glucose bereitgestellt, muss sie diese über die Gluconeogenese selbst generieren. Gluconeogenese und Glykolyse sind antagonistische, reziprok regulierte Stoffwechselwege, die sich jedoch einen Großteil ihrer Enzyme teilen (siehe Abb. 1). Aus thermodynamischen und regulatorischen Gründen werden drei "Rück-Reaktionen" der Glykolyse in der Gluconeogenese durch verschiedenartige Enzyme bewerkstelligt. Diese Reaktionen sind die Phosphorylierung von Glukose durch die Hexokinase (Glykolyse) und die Dephosphorylierung von Glucose-6-phosphat durch die Glucose-6-phosphatase (Gluconeogenese), die Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat durch die Phosphofruktokinase (Glykolyse) und die Dephosphorylierung von Fructose-1,6-bisphosphat durch die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)(Gluconeogenese) sowie die Synthese von Pyruvat und ATP aus Phosphoenolpyruvat durch die Pyruvatkinase (Glykolyse) und die Synthese von Phosphoenolpyruvat durch die cytoplasmatische Malatdehydrogenase (c-MDH) und die Phosphoenolpyruvatkarboxykinase (PEPCK) (Gluconeogenese) (Berg et al., 2006). Eine Fehlfunktion bei der Regulation dieser Prozesse führt bei Menschen zu Typ-2-Diabetes (Wahren and Ekberg, 2007).

Wachsen Hefezellen auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle wie Ethanol, werden gluconeogenetische Enzyme wie FBPase, PEPCK und c-MDH synthetisiert. Der Wechsel der Zellen in eine Umgebung mit frei verfügbarer Glucose führt zur schnellen Inaktivierung und Degradation dieser Enzyme. Untersuchungen zur FBPase-Inaktivierung und zum FBPase-Abbau in *Saccharomyces cerevisiae* gehen zurück bis in die siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts (Gancedo, 1971; Holzer, 1976). Zur Inaktivierung von FBPase wird zuerst die Transkription des *FBP1* Gens unterdrückt, FBPase wird weiter von Fructose-2,6-bisphosphat und AMP allosterisch inhibiert (siehe Abb. 4), und letztendlich phosphoryliert

und abgebaut. Zwei unterschiedliche Mechanismen werden für den Degradationsprozess beschrieben (Wolf, 2004). Werden die Hefezellen in einem Acetat-Medium 48 h lang kultiviert beobachtet man nach Glukosegabe den Abbau der FBPase über die Vakuole. Für diesen Prozess wird die FBPase in Vid-Vesikel aufgenommen, wofür die sogenannten Vid-Proteine benötigt werden (Chiang and Schekman, 1991; Chiang and Chiang, 1998; Huang and Chiang, 1997). Wurden die Hefezellen dagegen für 16-18 h in einem ethanolhaltigem Medium kultiviert und mit Glucose versetzt, erfolgt der schnelle Abbau des Enzymes über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Diesen Prozess bezeichnet man auch als Katabolit-induzierte Degradation von FBPase (Schork et al., 1994a; 1994b; 1995; Regelman et al., 2003; Schüle et al., 2000; Santt et al., 2008). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein weiteres gluconeogenetisches Enzym, die PEPCCK, nach Glucosegabe ebenfalls den proteasomalen Degradationsweg beschreitet (Santt et al., 2008). Des Weiteren konnte eine Beteiligung des Hsp70 Chaperons Ssa1 und des Cdc48<sup>Ufd1-Npl4</sup> Motorkomplexes am proteasomalen Degradationsprozess von FBPase nachgewiesen werden. Ssa1 wurde als direkter Interaktionspartner von FBPase beim Polyubiquitinierungsprozess über eine TAP-Aufreinigung identifiziert, während der Cdc48<sup>Ufd1-Npl4</sup> Motorkomplex erst nach der Polyubiquitinierung von FBPase in den Abbauprozess eingreift (Barbin et al., 2010; Juretschke et al., 2010). Für den proteasomalen Abbauprozess der FBPase konnten neun essentielle ORF's, die sogenannten *GID* (glucose induced degradation deficient, *GID1-9*) Gene, identifiziert werden. *GID3* ist hierbei identisch mit dem für das Ubiquitin-konjugierende Enzym kodierende *UBC8*, während *GID6* für das deubiquitinierende Enzym Ubp14 kodiert (Regelman et al., 2003; Schüle et al., 2000). Neben dem bekannten Gid3 konnte für drei Untereinheiten des Gid-Komplexes bisher gezeigt werden, dass sie für die Polyubiquitinierung von FBPase notwendig sind: Gid1, Gid2 und Gid7 (Regelman et al., 2003; Pfirrmann, 2006). Jedoch konnte für keine der bisher bekannten E3-Ligasen eine Beteiligung als Ubiquitin Ligase an diesem Prozess nachgewiesen werden. Auch eine eingeschränkte Suche nach bekannten E3-Ligasen zur Ubiquitinierung von FBPase, die im Zellkern lokalisiert sind wie z. B. San1, blieb erfolglos (Santt, 2009). Dies legte den Schluss nahe, dass die gefundenen Gid-Proteine die fehlende E3-Ligase bilden könnten. Mithilfe von Glyceringradienten wurde gezeigt, dass alle Gid-Proteine in höhermolekularen Fraktionen sedimentieren, wie man aufgrund des gefundenen Molekulargewichts vermuten konnte (Regelman et al., 2003; Santt et al., 2008). Verschiedene Interaktionsstudien zeigten außerdem, dass alle sieben Gid-Proteine (Gid1, 2, 4, 5, 7, 8 und



9) in einem gemeinsamen Komplex vorliegen (Ho et al., 2002; Krogan et al., 2006; Pitre et al., 2006). Für einen ähnlichen Komplex, der aus den menschlichen Homologen der Gid-Proteine aufgebaut ist, konnte eine Beteiligung an der Proteasom vermittelten Degradation des  $\alpha$ -Catenins nachgewiesen werden (Kobayashi et al., 2007; Suzuki et al., 2008). Die Klasse der E3-Ligasen wird in zwei große Familien unterteilt: die HECT-Ubiquitin-Ligasen und die RING-Ubiquitin-Ligasen. Nach der Aktivierung des 76 Aminosäuren großen Ubiquitins durch ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1) wird Ubiquitin auf das Ubiquitin-konjugierende Enzym (E2) übertragen. Der Transfer von Ubiquitin auf das Substratmolekül findet in einem gemeinschaftlichen Prozess von E2 und der Ubiquitin-Ligase (E3) statt. Während HECT-Ligasen nach Erhalt des Ubiquitins dieses auf das abzubauen Protein übertragen, binden RING-Ligasen das E2 und das Substratmolekül gleichzeitig und katalysieren den direkten Ubiquitintransfer zwischen E2 und abzubauenem Protein (Deshaies and Joazeiro, 2009). Durch bioinformatische Sequenzanalysen konnten in zwei Gid-Proteinen degenerierte RING-Finger-Domänen gefunden werden (siehe Abb. 6). Die RING-Domäne von Gid2 besitzt noch fünf der acht hochkonservierten  $Zn^{2+}$ -Koordinationsstellen einer klassischen RING-Ligase. Dabei sind alle konservierten Reste der zweiten  $Zn^{2+}$ -Koordinationsstelle erhalten (Santt et al., 2008). Vertreter der Familie der sogenannten U-Box-Proteine haben keine konservierten  $Zn^{2+}$ -Koordinationsstellen mehr, besitzen jedoch noch die Fähigkeit, Proteine zu polyubiquitinieren (Ohi et al., 2003). In einem GID2 deletiertem Stamm konnte gezeigt werden, dass Gid2 für die Polyubiquitinierung von FBPase notwendig ist (Regelmann et al., 2003). Insbesondere konnte gezeigt werden, dass Gid2 Proteine *in vitro* polyubiquitiniert (siehe Abb. 8). Für die *in vitro* Polyubiquitinierung von Proteinen ist ein 140 AS großes, C-terminales, die RING-Domäne umfassendes Fragment von Gid2 bereits ausreichend (siehe Abb. 9). Zerstört man durch eine Punktmutation die verbleibende  $Zn^{2+}$ -Koordinationsstelle im Gid2 Protein (*GID2C379S*), führt dies zur Stabilisierung von FBPase, PEPCCK und c-MDH nach dem Wechsel von gluconeogenetischen zu glykolytischen Bedingungen (siehe Abb. 7 und Abb. 13). Des Weiteren kann ein mutiertes Gid2 Protein FBPase *in vivo* nicht mehr polyubiquitinieren (Santt et al., 2008). Diese Ergebnisse erlauben die Annahme, dass es sich beim Gid-Komplex um die gesuchte RING-E3-Ligase im Degradationsprozess gluconeogenetischer Enzyme handelt und das Gid2 die aktive Ligaseuntereinheit darstellt. In mehreren Fällen konnte bisher gezeigt werden, dass RING-E3-Ligasen ihre maximale Aktivität als Dimer ausüben, wobei Homodimere und Heterodimere gefunden wurden

(Deshaies and Joazeiro, 2009; Hashizume et al., 2001; Brzovic et al., 2003; Linares et al., 2003; Wang et al., 2004; Park et al., 1999; Polekhina et al., 2002). Aus diesem Grund wurde die zweite bei der Sequenzanalyse gefundene degenerierte RING-Domäne in Gid9 näher untersucht. Der RING-Finger in Gid9 weist nur noch zwei der in klassischen RING-Domänen konservierte  $Zn^{2+}$ -Koordinationsstellen auf (siehe Abb. 6). Jedoch sind an den konservierten Positionen 3-8 (vgl. Abb. 4) der RING-Domäne mit N, D und K Aminosäuren platziert, die ebenfalls ein Metallion komplexieren können. Um die Funktion von Gid9 im Gid-Komplex zu analysieren wurde Gid9 mit einem HA<sub>3</sub>-Tag am C-Terminus versehen. Es zeigte sich jedoch, dass das Gid9-HA<sub>3</sub> Fusionsprotein nicht funktionell ist: FBPase wird in einem *GID9-HA<sub>3</sub>* Stamm nicht mehr abgebaut, nachdem die Zellen von gluconeogenetischen zu glykolytischen Wachstumsbedingungen umgesetzt wurden (vgl. Abb. 10). HA getaggetes Gid9 ergibt offensichtlich eine biochemisch inaktive Gid9 Mutante. Dieses Experiment deutet darauf hin, dass ein strukturell intaktes Gid9 Protein eine zentrale Aufgabe innerhalb des Gid-Komplexes übernimmt. Aus diesem Grund wurden in Kaninchen Peptid-Antikörper gegen Gid9 produziert, um die Expression von Gid9 verfolgen zu können. Um nun die Funktion von Gid9 zu untersuchen, wurde der erste konservierte Rest (C434) der RING-Domäne mutiert (*GID9C434S*) (siehe Abb. 6B). Diese Mutation in Gid9 führt zum vollständigen Funktionsverlust des Gid-Komplexes: FBPase, PEPCCK und c-MDH werden nicht mehr abgebaut (siehe Abb. 11 und Abb. 12). Da der Gid-Komplex als Ubiquitin-Ligase im proteasomalen Degradationsprozess dieser drei Enzyme fungiert, wurde vermutet dass die Ubiquitinierung von FBPase, PEPCCK und c-MDH in der C434S Mutante von Gid9 gestört ist. Tatsächlich findet in einem das mutierte *Gid9C434S* Allel exprimierendem Stamm keine Polyubiquitinierung der drei Enzyme (FBPase, PEPCCK und c-MDH) mehr statt, wenn die Zellen von gluconeogenetischen auf glykolytische Wachstumsbedingungen umgesetzt werden (siehe Abb. 15). Dadurch wird der weitere proteasomale Abbau der Enzyme verhindert (vgl. Abb. 11 und Abb. 12). Um herauszufinden, ob Gid2 und Gid9 ein RING-Heterodimer bilden, wurde Gid2 mit einem V5-Tag fusioniert. Dieses Fusionsprotein ist *in vivo* biochemisch funktional (J. Schweiggert, Diplomarbeit 2011). Für Interaktionsstudien wurden Gid9 und Gid2-V5 in einem Hefestamm exprimiert, in dem allen sieben *GID* Gene ( $\Delta gid$ ) deletiert sind. Dieser Stamm ist lebensfähig, jedoch nicht mehr in der Lage, gluconeogenetische Enzyme abzubauen (R. Messen). Wird Gid2 mit V5-Antikörper präzipitiert, kopräzipitiert Gid9. Die Punktmutation in der Gid9 RING-Domäne beeinflusst die Interaktion zu Gid2 nicht (vgl. Abb. 14).

Gleichzeitig wirkt sich die gemeinsame Expression von Gid2 und Gid9 in dem  $\Delta gid$ -Stamm auf die Stabilität der Proteine aus. Wird Gid2 in dem  $\Delta gid$ -Stamm alleine exprimiert, wird es nach einem Wechsel von gluconeogenetischen zu glykolytischen Wachstumsbedingungen abgebaut, bei gemeinsamer Expression mit Gid9 bleibt es über den gesamten Probenzeitraum stabil (vgl. Abb. 26). Zusätzlich zu seiner RING-Domäne besitzt Gid2 noch eine LisH- und eine CTLH-Domäne. Die Deletion dieser Domänen verlangsamt den FBpase, PEpCK und c-MDH Abbau (siehe Abb. 19 und Abb. 20). Nun war die Frage, ob eine dieser Domänen die Interaktion zwischen Gid9 und Gid2 beeinflusst. Wurden die in der LisH- oder der CTLH-Domäne deletierten Gid2-V5 Proteinvarianten zusammen mit Gid9 in dem  $\Delta gid$ -Stamm exprimiert, konnte in beiden Gid2-Mutantenstämmen mit V5-Antikörper Gid9 kopräzipitiert werden (siehe Abb. 14). Dieses Ergebnis zeigt, dass weder die LisH-Domäne noch die CTLH-Domäne von Gid2 für die Interaktion zwischen Gid2 und Gid9 ausschließlich notwendig sind, auch wenn in der Gid2-CTLH-Mutante die Interaktion ein wenig abgeschwächt erscheint. Wird dagegen in einem Hefestamm, der noch alle Gid-Proteine exprimiert, das Gid1-Myc<sub>13</sub> Fusionsprotein mit Myc-Antikörpern präzipitiert, kopräzipitiert das in der CTLH-Domäne mutierte Gid2-Protein, während die Interaktion zu Gid9 beinahe vollständig verlorengeht (vgl. Abb. 21). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass Gid1 mit Gid9 um die beeinträchtigte Proteinbindestelle an der Gid2-CTLH-Mutante konkurriert und so weniger Gid9-Protein kopräzipitiert werden kann. Würde diese Annahme zutreffen, müssten Gid1, Gid2 und Gid9 in einem  $\Delta gid$ -Stamm interagieren. Exprimiert man Gid1-Myc<sub>13</sub>, Gid2-V5 und Gid9 gemeinsam in einem  $\Delta gid$ -Stamm und präzipitiert mit V5-Antikörpern Gid2, kopräzipitiert sowohl Gid1 als auch Gid9 (Abb. 27). Gid1, Gid2 und Gid9 interagieren also miteinander und bilden einen Subkomplex des Gid-Komplexes. Der Gid-Komplex wurde schon in einigen Interaktionsstudien gefunden (Krogan et al., 2006; Pitre et al., 2006; Ho et al., 2002). In Pitre et al. wird ein Gid-Kernkomplex bestehend aus Gid1, Gid5 und Gid8 vorhergesagt. Hier sollte überprüft werden, ob das Heterodimer Gid2/Gid9 neben Gid1 noch mit einem anderen der Gid-Proteine interagiert. Wurden Gid2, Gid5 und Gid9 in dem  $\Delta gid$ -Stamm gemeinsam exprimiert und Gid2 mit V5-Antikörpern präzipitiert, konnten Gid5 und Gid9 kopräzipitiert werden (siehe Abb. 28). Gid2, Gid5 und Gid9 interagieren also ohne weitere Gid-Proteine miteinander und bilden einen Subkomplex des Gid-Komplexes. In ersten Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass auch die Proteine Gid1, Gid2, Gid5 und

Gid9 miteinander interagieren, jedoch bedarf dieses Ergebnis noch der weiteren Überprüfung (B. Braun, nicht gezeigt).

Gid9 besitzt neben seiner RING-Domäne noch eine CTLH- und eine CRA-Domäne (siehe Abb. 6B). Die CRA-Domäne wurde erstmals in RanBP-Proteinen identifiziert (Denti, 2003). Lise Barbin konnte im Rahmen ihrer Doktorarbeit zeigen, dass die Mutation der Aminosäurereste Leucin 255 und 256 in der Gid8 CRA-Domäne einen stabilisierenden Einfluss auf die FB Pase Degradation hat und die Polyubiquitinierung von FB Pase beinahe vollständig unterbindet (Barbin, 2009). Analog zu dieser Vorgehensweise sollten die in einem Sequenzabgleich der CRA Domäne gefundenen homologen Aminosäurereste in Gid9 ebenfalls mutiert werden (siehe Abb. 24). Der Degradationsprozess von FB Pase, PEPC K und c-MDH nach Glucosegabe zu gluconeogenetisch kultivierten Zellen wird allerdings in dem das mutierte Gid9\*CRA Allel tragendem Stamm nicht gestört. Die Katabolitdegradation verläuft wie in einem Wildtypstamm (vgl. Abb. 25). Alle drei Gid-Substrate werden abgebaut. Dagegen zeigt eine Deletion der CTLH-Domäne von Gid9 eine deutliche Stabilisierung der drei gluconeogenetischen Enzyme nach dem Wechsel von gluconeogenetischen zu glykolytischen Wachstumsbedingungen (siehe Abb. 25). Der Abbau von FB Pase und c-MDH wird stark verlangsamt, bei der PEPC K ist noch ein schwacher Effekt erkennbar. Allerdings wirkt sich die eingeführte Mutation auch stark auf die Expression der Gid-Proteine aus. Die Expressionshöhe von Gid2 ist stark reduziert, während sich Gid9 beinahe nicht mehr detektieren lässt (Abb. 25). Hier wäre es interessant zu sehen, ob Gid9 und Gid2 weiterhin miteinander interagieren und ob ihre Interaktion mit Gid1 noch vorhanden ist. Wurde Gid1 komplett aus dem Genom entfernt oder wurden bestimmte Domänen von Gid1 deletiert wirkten sich diese Mutationen stark auf die Expressionshöhe der anderen Gid-Proteine aus (Menssen *et al.*, Manuskript eingereicht). Würde durch die Mutation der CTLH-Domäne von Gid9 die Interaktion zu Gid1 verloren gehen, könnte das die verminderte Stabilität der Gid9- und Gid2-Proteine erklären. Erste Versuche hierzu brachten leider keine eindeutigen Ergebnisse (B. Braun, nicht gezeigt).

Bisher gelang es nicht, den Gid-Komplex aus Zelllysate zu reinigen und seine Größe genauer zu bestimmen. Addiert man die molekularen Massen aller bisher identifizierten Interaktionspartner des Gid-Komplexes zu denen der Gid Proteine, erscheint das mit Glycerindichte-zentrifugation gefundene Molekulargewicht von ca. 600 kDa zu klein, geht man jedoch davon aus, dass sich unter gluconeogenetischen sowie glykolytischen Bedingungen ein stabiler Komplex alleine aus den sechs bzw. sieben Gid-Proteinen bildet,

ergäbe sich ein Molekulargewicht von nur ca. 450 kDa. Mittels Gelfiltration sollte daher eine genauere Größenbestimmung des Gid-Komplexes durchgeführt werden. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob der Gid-Komplex nach der Deletion bestimmter Gid-Proteine (z.B. Gid1), in kleinere Subkomplexe zerfällt. In Wildtypzellen lassen sich die Gid-Proteine Gid1, Gid2 und Gid9 nach der Gelfiltration wie erwartet in gleichen Fraktionen nachweisen (siehe Abb. 32). Die Gid-Proteine sedimentieren zwischen dem Fettsäuresynthasekomplex (Fas, ca. 2 MDa) und dem Aminopeptidase-Komplex 1 (Ape1, ca. 600 kDa). Auch mithilfe der erstellten Eichgerade für die Trennsäule ergibt sich ein Molekulargewicht von ca. 1000 kDa für den Gid-Komplex (vgl. Abb. 30 und Abb. 32). Die Gid-Komplex-Substrate FBpase (140 kDa) und PEPCCK (240 kDa) zeigen getrennte Maximalwerte und können mithilfe der Eichgeraden ihrem natürlichen Molekulargewicht der Homotetramere zugeordnet werden. Eine mögliche Interaktion der gluconeogenetischen Enzyme mit Gid-Komplex-Proteinen konnte auf diese Weise nicht bestätigt werden. Ssa1 sedimentierte in allen gesammelten Fraktionen (B. Braun, nicht gezeigt). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da Ssa1 in der Zelle sowohl zahlreiche Aufgaben als Monomer, wie auch an verschiedene Proteinkomplexe gebunden, übernimmt (Arndt et al., 2005; Seong et al., 2007; Thrower et al., 2000; Verma et al., 2000; Park et al., 2007; Satyanarayana et al., 2000). Zudem liegt das Ssa1-Protein in einer ca. vierhundertfach höheren Konzentration in der Zelle vor als die Gid-Proteine (<http://yeastgfp.yeastgenome.org>). Die Gelfiltrationsexperimente mit  $\Delta gid1$  Stämmen blieben leider ohne verwertbares Ergebnis, da es hier nicht mehr möglich war, die Proteine Gid2 und Gid9 mit spezifischen Antikörpern nachzuweisen.

In persönlicher Korrespondenz wurde von Jaroslav Horak (Institute of Physiology, Department of Membrane Transport, Academy of Science of the Czech Republic, 142 20 Prague, Czech Republic) auf eine mögliche Beteiligung des Tor1-Signalnetzwerks auf die Stabilität/Expression von Gid4 hingewiesen. In mit Rapamycin behandelten Zellen konnte von J. Horak ein beschleunigter Abbau von Gid4 nach Glucoseshift gluconeogenetisch gewachsener Zellen beobachtet werden. Dieses Ergebnis sollte in unserem Labor weiter verifiziert werden. Tor1 wird mit zahlreichen Stoffwechselfvorgängen in Verbindung gebracht (Kapahi et al., 2010). Eine Beteiligung an der Katabolit-induzierten-Degradation gluconeogenetischer Enzyme nach Glukosegabe erscheint aus diesem Grund plausibel. Wurden in eigenen Experimenten Zellen mit Rapamycin behandelt, konnte ein Einfluss von Tor1 auf zwei Gid-Proteine nachgewiesen werden. Gid4 wird nach Glukosegabe schneller abgebaut, jedoch ist die Proteinausgangsmenge wesentlich

geringer als im Vergleichsstamm (siehe Abb. 35). Tor1 hat möglicherweise einen Einfluss auf die Transkription/Translation von Gid4. Gleichzeitig kann eine Destabilisierung von Gid5 beobachtet werden. Sind hier die Ausgangsmengen an Protein zu Beginn des Experiments noch annähernd gleich, so wird Gid5 im Laufe der Zeit in den Rapamycin behandelten Zellen nach Glucosegabe abgebaut. Dadurch kommt es auch zu einer Stabilisierung von FBpase. Mit Rapamycin behandelte Zellen sind nicht mehr in der Lage, FBpase abzubauen (Abb. 35). Um den Einfluss von Tor1 auf weitere Gid-Proteine und die Katabolit-induzierte-Degradation gluconeogenetischer Enzyme zu überprüfen, wurde Tor1 in verschiedenen Stammhintergründen deletiert. Diese Stämme konnten jedoch auf ethanolhaltigem Medium nicht mehr kultiviert werden (vgl. Abb. 37). Im Westernblot kann in  $\Delta tor1$  Stämmen auch kein FBpase-Signal mehr detektiert werden (vgl. Abb. 36). Tor1 scheint bei der Transkription/Translation von FBpase eine essentielle Rolle einzunehmen. Stämme, in denen das *TOR1* Gen nach dem den N-Terminus kodierenden Teil des Proteins (Aminosäuren 1-287) disruptiert ist, sind dagegen auf ethanolhaltigem Medium lebensfähig (vgl. Abb. 38). Dieses Ergebnis impliziert, dass das N-terminale 287 Aminosäuren große Tor1-Fragment für das Wachstum auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen ausreichend ist und in noch viele bisher unbekannte Prozesse eingreifen kann.

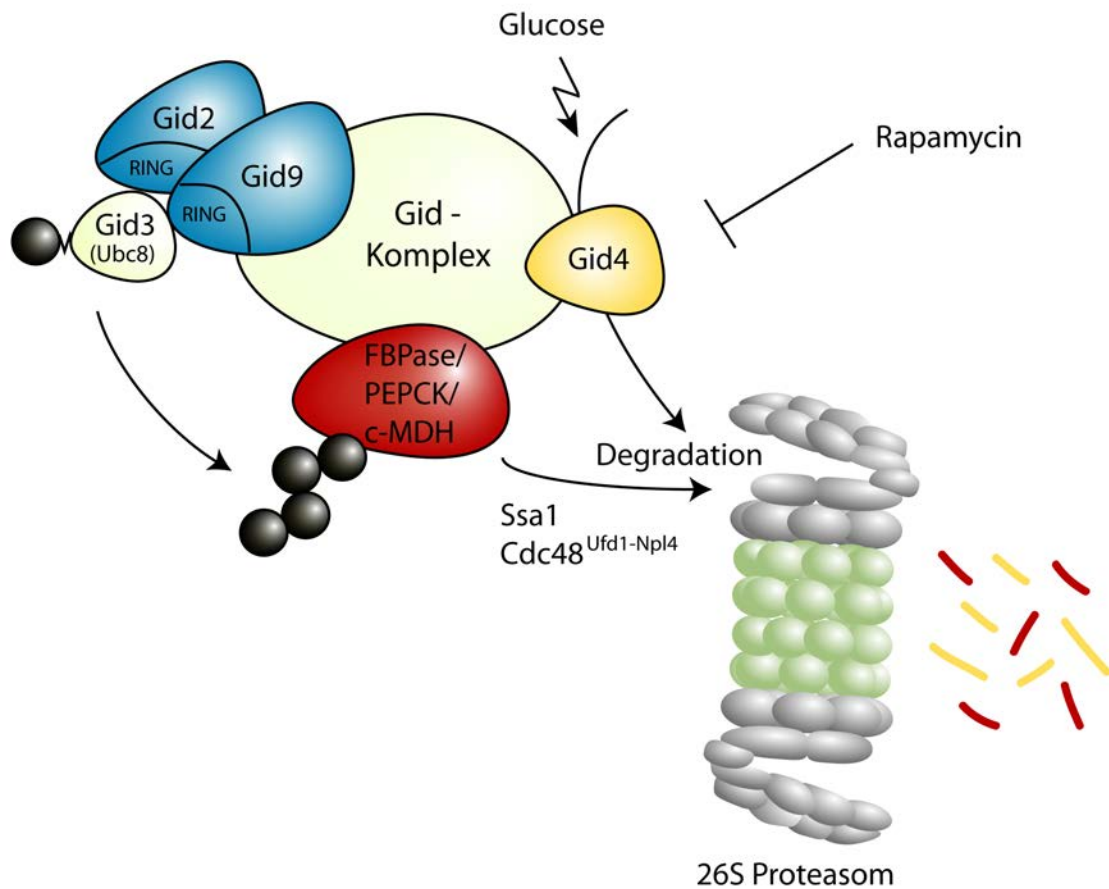


Abbildung 39: **Der Gid-Komplex vermittelt als E3 Ligase die Ubiquitinierung von FBPase, PEPCK und c-MDH und die anschließende Degradation dieser Enzyme durch das Proteasom.** Nach Glukosegabe erscheint Gid4 und aktiviert die Gid-E3-Ligase. Das Gid2/Gid9 Dimer polyubiquitiniert gemeinsam mit Gid3, dem Ubiquitin-konjugierendem Enzym Ubc8, die Substratproteine FBPase, PEPCK und c-MDH und leitet so ihren Abbau durch das Proteasom ein. Das Hsp70 Chaperon Ssa1 und der Cdc48<sup>Ufd1-Npl4</sup> Motorkomplex unterstützen die Polyubiquitinierung und proteasomale Degradation gluconeogenetischer Enzyme. Der Tor1 Kinase Inhibitor Rapamycin verlangsamt/verhindert die Gid4 Expression und beeinflusst auf diese Weise den beschriebenen Degradationsprozess.

## 5 Material & Methoden

### 5.1 Material und Stämme

#### 5.1.1 Antikörper

Antikörper	Verdünnung für Immunodetektion	Quelle
Kaninchen $\alpha$ -AP1, polyklonal	1 : 5000	(Klionsky et al., 1992)
Kaninchen $\alpha$ -FAS, polyklonal	1 : 10000	(Egner et al., 1993)
Kaninchen $\alpha$ -FBPase, polyklonal	1 : 5000	J. Juretschke
Kaninchen $\alpha$ -cMDH, polyklonal	1 : 15000	M. Ziegler
Kaninchen $\alpha$ -PEPCK, polyklonal	1 : 15000	M. Ziegler
Kaninchen $\alpha$ -Gid9	1 : 500, 0.25 % Milch	Diese Arbeit
Kaninchen $\alpha$ -Gid5	1 : 1000	Diese Arbeit
Maus $\alpha$ -HA (Klon 16B12), monoklonal	1 : 10000	Covance
Maus $\alpha$ -myc (Klon 9E10), monoklonal	1 : 10000	Sigma-Aldrich
Maus $\alpha$ -Pgk (Klon 22C5), monoklonal	1 : 10000	Molecular Probes
Maus $\alpha$ -Ub, monoklonal	1 : 1000	HISS-Diagnostics
Maus $\alpha$ -V5, monoklonal	1 : 20000	Sigma-Aldrich
Ziege $\alpha$ -Kaninchen, HRPO-konjugiert	1 : 5000	Medac, Hamburg
Ziege $\alpha$ -Maus, HRPO-konjugiert	1 : 5000	Dianova, Hamburg

#### 5.1.2 *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Name	Genotype	Herkunft
YWO0903	W303-1B MATalpha, <i>ade2 leu2-3, 112 his3 trp1 ura3</i>	H. -L. Chiang
YWO0986	W303 MATalpha, <i>ade2 leu2-3, 112 his3 trp1 ura3 GID9-HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S.pombe</sup></i>	T. Pfirrmann
Y31488	MATa/alpha, <i>his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0 MET15/met15<math>\Delta</math>0</i>	EUROSCARF



	<i>lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0 gid9Δ::KANMX4/gid9Δ::KANMX4</i>	
YRM49b	W303-1B <i>gid1Δ::loxP gid2Δ::loxP gid4Δ::loxP gid5Δ::loxP gid7Δ::loxP gid8Δ::loxP gid9Δ::loxP</i>	R. Menssen
YWO1850	W303-1B <i>gid1Δ::loxP gid2Δ::GID2-V5-HIS3<sup>S.pombe</sup> gid4Δ::loxP gid5Δ::loxP gid7Δ::loxP gid8Δ::loxP gid9Δ::loxP</i>	J. Schweiggert
YWO1978	W303-1B <i>gid1Δ::loxP gid2Δ::GID2ΔCTLH-V5-HIS3<sup>S.pombe</sup> gid4Δ::loxP gid5Δ::loxP gid7Δ::loxP gid8Δ::loxP gid9Δ::loxP</i>	Diese Arbeit
YWO1979	W303-1B <i>gid1Δ::loxP gid2Δ::GID2ΔLisH-V5-HIS3<sup>S.pombe</sup> gid4Δ::loxP gid5Δ::loxP gid7Δ::loxP gid8Δ::loxP gid9Δ::loxP</i>	Diese Arbeit
YWO1255	W303-1B <i>gid9Δ::KANMX4</i>	M. Lehmann
	W303-1B <i>GID2-HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S.pombe</sup></i>	T. Schüle
YWO1978	W303-1B <i>GID2-HA<sub>3</sub>::GID2C379S-HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S.pombe</sup></i>	Diese Arbeit
YWO1979	W303-1B <i>GID2-HA<sub>3</sub>::GID2ΔCTLH-HA<sub>3</sub>::URA3</i>	Diese Arbeit
YWO1980	W303-1B <i>GID2-HA<sub>3</sub>::GID2ΔLisH138-171-HA<sub>3</sub>::URA3</i>	Diese Arbeit
	W303-1B <i>Δgid2::KANMX4</i>	T. Schüle
YWO1981	W303-1B <i>GID1-MYC<sub>13</sub>::TRP1</i>	Diese Arbeit
YWO1982	W303-1B <i>GID1-MYC<sub>13</sub>::TRP1 GID2-HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S.pombe</sup></i>	Diese Arbeit
YWO1983	W303-1B <i>GID1-MYC<sub>13</sub>::TRP1 GID2ΔCTLH-HA<sub>3</sub>::URA3</i>	Diese Arbeit
YWO1984	W303-1B <i>GID1-MYC<sub>13</sub>::TRP1 GID2ΔLisH138-171-HA<sub>3</sub>::URA3</i>	Diese Arbeit
YWO1985	W303-1B <i>GID1-MYC<sub>13</sub>::TRP1 GID2C379S-HA<sub>3</sub>::URA3</i>	Diese Arbeit
YWO1986	W303-1B <i>GID2-HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S.pombe</sup> GID9*CTLH::URA3</i>	Diese Arbeit
YWO1987	W303-1B <i>GID2-HA<sub>3</sub>::HIS5<sup>S.pombe</sup> GID9*CRA::URA3</i>	Diese Arbeit
	W303-1B <i>gid1Δ::loxP gid2Δ::GID2-V5-HIS3<sup>S.pombe</sup> gid4Δ::loxP gid5Δ::GID5-HA<sub>3</sub>::LEU2 gid7Δ::loxP gid8Δ::loxP gid9Δ::loxP</i>	R. Menssen
	W303-1B <i>gid1Δ::GID1-MYC<sub>13</sub>::URA3 gid2Δ::loxP gid4Δ::loxP gid5Δ::loxP gid7Δ::loxP gid8Δ::loxP gid9Δ::loxP</i>	J. Schweiggert
	W303-1B <i>gid1Δ::GID1-MYC<sub>13</sub>::URA3 gid2Δ::GID2-V5::HIS3<sup>S.pombe</sup> gid4Δ::loxP gid5Δ::loxP gid7Δ::loxP gid8Δ::loxP gid9Δ::loxP</i>	J. Schweiggert
	W303-1B <i>MYC<sub>9</sub>-GID4</i>	O. Santt
	W303-1BKO <i>fbp1Δ::LEU2</i>	H. -L. Chiang
YWO1988	W303-1B <i>MYC<sub>9</sub>-GID4 Δtor1::KANMX4</i>	Diese Arbeit

	BY4743	EUROSCARF
	<i>Jk9-3da a leu2-3,112 ura3-52 trpl his4 rme1 HMLa</i>	Helliwell <i>et al.</i> (1994)
	<i>Jk9-3da a leu2-3,112 ura3-52 trpl his4 rme1 HMLa tor1::LEU2-4</i>	Helliwell <i>et al.</i> (1994)
YWO1989	<i>Jk9-3da a leu2-3,112 ura3-52 trpl his4 rme1 HMLa Δtor1::KANMX4</i>	Diese Arbeit

### 5.1.3 Escherichia coli Stämme

Name	Genotyp und Verwendung	Herkunft
BL21	F- <i>dcm ompT hsdS(rB- mB-) gal λ(DE3)</i>	Stratagene
DH5α	F- $\phi$ 80d <i>lac Z ΔM15 (argF-lacZYA) U169 end A1recA1 hsd R17(rk-, mk+) deo R thi- 1 supE44 λ- gyrA96 relA1Δ</i>	Stratagene, (Hanahan, 1983)

### 5.1.4 Plasmide

Plasmid	Verwendung und Beschreibung	Backbone	Herkunft
PWO0747	3.2kbp großes DNA Fragment mit dem Gid9 ORF unter seinen nativen Promotor- und Terminator-Regionen	pRS316	T. Pfirrmann, B.Braun
PWO1315	3.2kbp DNA Fragment mit Gid9C434S ORF unter seinem nativen Promotor/Terminator	pRS316	Diese Arbeit
pJD421	His <sub>6</sub> -Ubiquitin zwischen P <sub>CUP1</sub> und T <sub>CYC1</sub>	YEplac181	J. Dohmen
PWO1283	Gid2-V5, nativer Promotor, ADH1 Terminator	pRS303	J. Schweiggert
PWO1313	<i>gid2Δ216-229CTLH-V5</i>	pRS303	Diese Arbeit
PWO1314	<i>gid2Δ138-171LisH-V5</i>	pRS303	Diese Arbeit
PWO1153	Gid2-HA <sub>3</sub> , nativer Promotor, ADH1 Terminator	pRS316	L. Barbin
PWO1316	<i>gid2Δ216-229CTLH-HA<sub>3</sub></i> , zur Expression der Gid2 CTLH Mutante	pRS316	Diese Arbeit mit Hilfe von E. Diler
PWO1317	<i>gid2Δ138-171LisH-HA<sub>3</sub></i> , zur Expression der	pRS316	Diese Arbeit

	Gid2 LisH Mutante		
	GST-Gid2, zur Expression von Gid2 für <i>in vitro</i> Ubiquitinierungsversuche	pGEX4T3	J. Regelmann
	GST-gp78, zur Expression von gp78 für <i>in vitro</i> Ubiquitinierungsversuche	pGEX4T2	(Fang et al., 2001)
	Amp <sup>R</sup> , lacI <sup>q</sup>	pGEX4T3	GE Healthcare
PWO1318	GST-Gid2 <sub>1-173</sub> , zur Expression eines N-terminalen Gid2 Fragments für <i>in vitro</i> Ubiquitinierungsversuche	pGEX4T3	Diese Arbeit
PWO1319	GST-Gid2 <sub>281-421</sub> , zur Expression eines C-terminalen Gid2 Fragments für <i>in vitro</i> Ubiquitinierungsversuche	pGEX4T3	Diese Arbeit mit Hilfe von P. Kimmig
PWO1320	Zur Expression von Gid9 unter Trp-Selektionsdruck	pRS314	Diese Arbeit
PWO1321	Gid8Δ85-117LisH-HA <sub>3</sub> , unter nativem Promotor	pRS316	Diese Arbeit
PWO1322	Gid8Δ193-207CTLH-HA <sub>3</sub> unter nativem Promotor	pRS316	Diese Arbeit mit Hilfe von E. Diler

### 5.1.5 Oligonucleotide

Name	Sequenz 5' - 3'
Gid9fwd	aaagaattcgaaagcgagaagtataca
Gid9rev	aaaaactcgagaacttaatcaaggaagg
Gid9*RING fwd	cgctacattcactaaaaggaagaattctcccgttgcagtgagac
Swa1-Pme1	gctataaaaataattatagtttaaaacttttaataataatata
Gid2*CTLH fwd	ctaaccatacggctttatcgtccaagcatggaaatccggtagag
Gid2*CTLH rev	ctctaccggatttcgcttgacgataaagccgatggtag
Gid2 fwd	aaaatcgatttcgccccagtagaccacgggttccttacaa
Gid2-HA <sub>3</sub> rev	gtcagtcgacctgttatccctagcggatct
Gid2*LisH fwd	gagacaatggaaaatgtaataaagaagaatctactgaattattgagatg
Gid2*LisH rev	catctcaataaattcagtagattcttttcattaacattttccattgtctc
RM83	tatagtcgaccgctatcagagatggaccg

RM84	tatagcggccgcactacaaaaagcaccaaggcc
Gid9*CRA fwd	GGAGATTTGAAAAGATATCTGAATGGATCAGATGATCAAAGATGGTCGGTATTAAT
Gid9*CRA rev	ATTTAATACCGACCATCTTTGATCATCTGATCCATTCAGATATCTTTGAAATCTCC
Gid9*CTLH fwd	gacactgacaaaaagtcctctataaagggtggataactataccgacgct
Gid9*CTLH rev	agcgtcggtagttatccacctttatagtggaacttttggcagtgct
Gid9*233-236 K	gaatatggtggaggagaaa
Gid9*336-338 K	ttccggaggaggtttacaaag
Gid9 Sac1 fwd	atgagctcgtggattccattgaaattaaat
Gid8*CTLH fwd	CAGTTTGACATAGATGGAGATAGAAGTCACCATCAACAGG
Gid8*CTLH rev	CCTGTTGATGGTGACTTCTATCTCCATCTATGTCAAACG
Gid8*LisH fwd	ttgctaccatacagaccacaccaacaacaagacattgcggttttc
Gid8*LisH rev	gaaaaccgcaatgtctttgtgttggtgtggtctgtatggtagcaa
Gid2 <sub>1-173</sub> fwd	gtcgacATGTCTGAAT TACTAGATAG
Gid2 <sub>1-173</sub> rev	gcgccgcttctttattagtaattccgtag
Gid2 <sub>281-421</sub> fwd	gtcgacgagttagcgcacgttgactggactacg
Gid2 <sub>281-421</sub> rev	gcgccgccataacaaaacgaacctttttgtactg
Gid1-Myc <sub>13</sub> fwd	AAGATATTACAAAGCTATTAACCTTCGACGAAGATGTGTTGAATTTACGGATCCCCGGGTTA ATTAA
Gid1-Myc <sub>13</sub> rev	AATGACTGATATCACATGGCTTTGTTGTTGAAGGTGCTTGTTTTATGCGAATTCGAGCTCG TTTAAAC
<i>Δtor1</i> fwd	tcattggtaaagtgaaacatacatcaaccggctagcaggtttgcattgatcggatccccgggta attaa
<i>Δtor1</i> rev	caaaaaaaaaataatagtaaacaagcacgaaatgaaaaatgacaccgcaggaattcgagctcg tttaaac

## 5.2 Medien

Die Kultivierung von Hefe- und *E. coli*-Stämmen fand in Standardmedien statt (Guthrie and Fink, 1991; Ausubel, 1992). Zur Herstellung von Agar-Platten enthielten die Medien 2 % Bacto-Agar.

Die Nährmedien wurden mit zweifach deionisiertem Wasser (MILLIPORE) angesetzt, der gewünschte pH-Wert mit HCl bzw. NaOH eingestellt und danach autoklaviert. Zu den synthetische Vollmedien und Mineralmedien wurden je nach Bedarf der Stämme L-

Histidin, L-Leucin, L-Lysin, L-Tryptophan, Adenin und Uracil hinzugefügt. Sofern nicht anders vermerkt beziehen sich alle prozentuellen Angaben auf Gewicht/ Volumen (w/v).

## 5.2.1 Medien für Hefekulturen

### 5.2.1.1 Vollmedium(YPD), pH 5.5

1 %	Hefeextrakt
2 %	Bacto™ Pepton
2 %	D-Glucose

### 5.2.1.2 Ethanolhaltiges Hungermedium (YPEtOH), pH 5.5

1 %	Hefeextrakt
2 %	Bacto™ Pepton
2 %	EtOH

### 5.2.1.3 Synthetisches Vollmedium (CM), pH 5.6

0.67 %	Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids
2 %	D-Glucose
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-Aminobenzoensäure

Folgende Supplemente werden je nach Selektionsbedingungen zugegeben:

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

### 5.2.1.4 Synthetisches Hungermedium (CM EtOH), pH 5.6

Analog CM-Medium, statt D-Glucose werden 2 % EtOH zugegeben

## 5.2.2 Medien für *E. coli* Kulturen

### 5.2.2.1 Vollmedium (LB), pH 7.5

0.5 %	Hefeextrakt
1 %	Bacto™ Trypton
0.5 %	NaCl

Enthielten die Bakterien-Zellen ein Plasmid mit Ampicillin-Resistenzgen wurde dem Vollmedium noch 75mg/l Ampicillin zugesetzt.

### 5.2.2.2 Transformationsmedium (SOC), pH 7.4

0.5 %	Hefeextrakt
1 %	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

## 5.3 Wachstumsbedingungen

Flüssigkulturen wurden in Erlenmeyerkolben oder Reagenzgläsern angezogen, deren Volumen dem fünf- bis zehnfachen Volumen an eingesetztem Nährmedium entsprach. Die Inkubation erfolgte sofern nicht anders vermerkt für *S. cerevisiae*-Stämme bei 30 °C, für *E. coli*-Kulturen bei 37 °C Raumtemperatur auf einem Rundschtüttler bei 150 - 220 Upm.

### 5.3.1 Dauerkulturen

Dauerkulturen wurden von *E. coli*-Flüssigkulturen bzw. von Agar-Platten bei Hefekulturen in sterilem Glycerin mit einer Endkonzentration von 15 % (v/v) für Hefe und 30 % (v/v) für *E. coli* angelegt und bei -80 °C eingefroren.

### 5.3.2 Wachstumsbedingungen

#### 5.3.2.1 Wachstumsbedingungen für Hefekulturen

Für Flüssigkulturen wurde zuerst eine 2-ml-Vorkultur angeimpft und für 12 h inkubiert. Aus den stationären Vorkulturen wurden Hauptkulturen angeimpft, die bis zum Erreichen der gewünschten Wachstumsbedingungen inkubiert wurden. Das Zellwachstum wurde dabei durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Zellkulturen auf Agar-Platten wurden für 2-3 Tage inkubiert. Hefestämme, die spezielle Plasmide trugen wurden durch entsprechend supplementierte CM-Medien selektioniert.

#### 5.3.2.2 Wachstumsbedingungen von *E. coli*-Kulturen

*E. coli*-Stämme wurden mit Zellen aus Dauerkulturen (-80 °C) oder von Agar-Platten in Flüssigmedien angeimpft und ÜN bei 37 °C inkubiert.

#### 5.3.2.3 Induktion und Inaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase

Die Induktion gluconeogenetischer Enzyme wie die FBPase erfolgt beim Wachstum der Hefezellen auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie z.B. Ethanol. Dieses Enzym wird für die Synthese von Glucose aus nicht-Kohlenhydratvorstufen benötigt und ist für das Wachstum der Zellen essentiell. Wird in gluconeogenetisch aktiven Zellen Glucose supplementiert findet die sogenannte Katabolitinaktivierung und im Falle der FBPase auch der Prozess der Katabolitdegradation statt. Zur Untersuchung des Proteinumsatzes der FBPase wurden Westernblot Analysen durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür folgendermaßen angezogen:

Zunächst wurde eine stationäre Vorkultur in glukosehaltigem Medium (YPD/CM-Glc) herangezogen, im Verhältnis 1:12.5 verdünnt und im gleichen Medium für weitere 6 h inkubiert. Danach wurden die Zellen in ethanolhaltiges Medium so umgesetzt, dass eine OD<sub>600</sub> von 0.1-0.25 resultierte und weitere 16 h geschüttelt. Als Nullprobe wurden 1.5 OD Zellen entnommen, 10 mal 1.5 OD<sub>600</sub> Zellen wurden in 10 ml glukosehaltiges Medium umgesetzt um die Katabolitinaktivierung und die Katabolitdegradation zu induzieren. Zu den gewünschten Zeitpunkten (E, 0, 1, 2, 3 h oder wie angegeben) wurden jeweils 1.5 OD<sub>600</sub> Zellen als Probe entnommen. Die Zellen wurden sofort abzentrifugiert, mit 1 ml Wasser gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

## 5.4 Zell- und molekularbiologische Methoden

Alle Methoden wurden in sterilen Arbeitsgefäßen und mit sterilen Lösungen durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben beziehen sich alle Angaben auf die Standardprotokolle aus (Guthrie and Fink, 1991; Ausubel, 1992)

### 5.4.1 Herstellung von Hefestämmen

Deletionsstämme wurden sofern nicht anders beschrieben nach der in (Güldener et al., 1996) beschriebenen Methode durchgeführt. Alle verwendeten Primer sind in Kapitel 4.1.5 aufgelistet. Das Markieren von Proteinen mit einen Epitop-Tag wurde nach der Methode von (Longtine et al., 1998) durchgeführt. Die Tabelle in Kapitel 4.1.5 listet alle hierfür verwendeten Primer auf. Punktmutationen wurden mittels PCR Technik in den entsprechenden ORF eingeführt. Es wurden zwei PCR Fragmente hergestellt, die im Bereich der Mutation überlappende Sequenzen aufweisen und in einer dritten PCR zu einem einzigen Fragment zusammengefügt wurden.

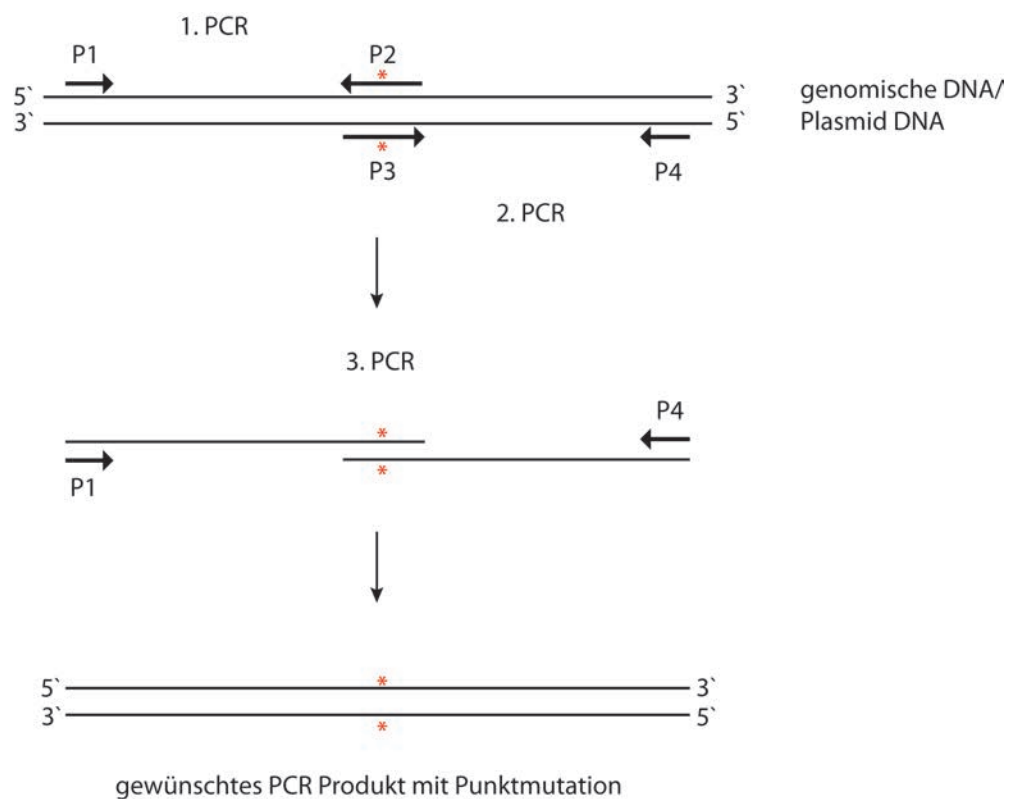


Abbildung 39: **Schematische Darstellung der Punktmutations-PCR Technik.** In einem ersten Schritt werden zwei unabhängige PCR Ansätze gefahren. Diese Ansätze enthalten jeweils die gleiche Template DNA, unterscheiden sich jedoch bei den eingesetzten Primern (P1 & P2 oder P3 & P4). Die resultierenden PCR



Fragmente werden in einer dritten PCR selbst als Template DNA verwendet und mit den Primern P1 und P4 zu einem gemeinsamen Fragment zusammengefügt.

#### 5.4.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe

Von einer stationären Vorkultur wurden 5 ml zentrifugiert (5 min, 2800 rpm) und in 1 ml Wasser gewaschen. Dann wurde der Ansatz mit 200 µl „breaking buffer“, 300 µl Glasperlen und 200 µl eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) versetzt. Die Proben wurden fünfmal 1 min am Vortexer aufgeschlossen und zwischen den einzelnen Schritten jeweils für 1 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 200 µl Wasser wurde 10 min zentrifugiert (10000 × g). Vom klaren Überstand wurden 250 µl abgenommen und mit 1 ml eiskaltem 100 %igem Ethanol versetzt. Bei –80 °C wurde für 20 min die DNA gefällt und anschließend bei 4 °C zentrifugiert (10 min, 10000 × g). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 400 µl Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 3 µl einer 100 × RNase-Lösung (10 mg/ml) wurde für 5 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 10 µl 5 M Ammoniumacetat-Lösung und 1 ml kaltes 100 %iges Ethanol zu den Proben gegeben, 15 min bei –80 °C stehengelassen und zentrifugiert (5 min, 10000 × g), mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25 µl Wasser resuspendiert.

„breaking buffer“:	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

#### 5.4.3 “Plasmid rescue” (Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe)

2.5 ml einer stationären Vorkultur in YPD wurden zentrifugiert (3 min, 4000 rpm) und mit 1 ml Wasser gewaschen. Dazu wurden je 200 µl „breaking buffer“, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) und Glasperlen gegeben. Am Vortexer wurden die Zellen 2 min lang aufgeschlossen und dann abzentrifugiert (5 min bei 10000 × g). Es wurden 100 µl Überstand abgenommen, mit 10 µl 3 M Natriumacetat-Lösung und 280 µl kaltem 100 %igem Ethanol versetzt und bei –80 °C die DNA gefällt, zentrifugiert (5 min, 10000 × g), mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 20 µl Wasser resuspendiert.

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

Zur Plasmidisolierung aus *E. coli* haben sich zwei Methoden etabliert, die alkalische Lyse sowie die Isolierung nach dem Standardprotokoll des QIAprep<sup>®</sup>Spin Miniprep Kit. Für Präparationen in kleinem Maßstab wurde in dieser Arbeit hauptsächlich die alkalische Lyse durchgeführt.

1,5 ml einer stationären *E. coli*-Kultur wurden 1 min bei 10000 × g zentrifugiert und in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 (entspricht einem Teil Lösung 2A und einem Teil 2B) wurde 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 300 µl Lösung 3 zugesetzt und 15 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde 10 min bei 10000 × g zentrifugiert und 300 µl des Überstands in ein neues Gefäß überführt. Nach Zugabe von 700 µl eisgekühltem 100 %igem Ethanol wurde die DNA 15 min bei -80 °C gefällt. Es wurde 10 min bei 10000 × g zentrifugiert und das Pellet mit 700 µl eisgekühltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Die erhaltene DNA wurde getrocknet und in 40-50 µl Wasser (inkl. 0,1 mg/ml RNase A) aufgenommen. Mitisolierte RNA wurde ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur mit RNase verdaut.

Lösung 1: 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 50 mM D-Glukose, 10 mM EDTA

Lösung 2A: 0,4 M NaOH

Lösung 2B: 2 % SDS

Lösung 3: 5 M KOAc pH 4,8

Die Isolierung großer Mengen hochreiner Plasmid-DNA („Large Prep“) aus *E. coli* erfolgte mit dem QIAprep<sup>®</sup>Spin Miniprep Kit nach den Angaben des Herstellers.

#### 5.4.5 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) können beliebige DNA-Abschnitte des Genoms in beliebiger Menge amplifiziert werden. Ein Reaktionszyklus besteht aus drei Schritten: Denaturierung der DNA (bei 94-95 °C), Hybridisierung der Primer (Abhängig von der optimalen „Annealing“-Temperatur der Primer) und der DNA-Synthese (bei 72 °C).

Die Durchführung erfolgte in einer vollautomatischen, programmierbaren PCR Maschine. Ein 50 µl Standardansatz enthält 0,5 µl chromosomale bzw. Plasmid-DNA als „Template“, jeweils 0,5 µl der beiden Primer (siehe Kapitel 4.1.5), 1 µl eines Gemisches aller vier

Desoxyribonucleosidtriphosphate (jeweils 10 mM), 5-10 µl Polymerase-Puffer und 0,25 µl der entsprechenden Polymerase. Mit deionisiertem Wasser wurde auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden gegebenenfalls 1-2 µl DMSO bzw. Magnesiumsulfat oder Formamid zugesetzt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden mittels eines DNA "Purification Kits" gemäß den Angaben der Hersteller gereinigt.

#### **5.4.6 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA**

Restriktionsenzyme erkennen bestimmte Basensequenzen (sog. Palindrome) in einer DNA-Doppelhelix und spalten beide Stränge an spezifischen Stellen.

In einer Standardreaktion wurden 1-5 µl DNA mit 1-2 Units Restriktionsenzym in einem Volumen von 10-20 µl bei der für das Enzym erforderlichen Temperatur 1,5 bis 12 h inkubiert. Als Puffer wurden die mit dem Enzym mitgelieferten Inkubationspuffer in einfacher Konzentration eingesetzt. Das benötigte Puffersystem wurde anhand einer von der Herstellerfirma mitgelieferten Tabelle ermittelt. Doppelverdaus werden nach Möglichkeit mit Restriktionsenzyme gleicher Pufferbedingungen durchgeführt. Ist das nicht möglich, wurde zweimal verdaut und die DNA dazwischen über eine Silicasäule gereinigt.

#### **5.4.7 Agarose-Gelelektrophorese**

DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dies geschah in einer Flachbett-Elektrophoresekammer mit 0.8-1.5 %igen Agarose-Gelen (w/v) und 0.01 % Ethidiumbromid in 1xTAE-Puffer. Je nach DNA-Konzentration wurden 3-8 µl der Proben mit 1 µl DNA-Probenpuffer versetzt und bei 120 V aufgetrennt. Als Kontrolle diente ein 1 kB DNA-Ladder (Fermentas). Die fertigen Gele wurden mit dem Dokumentationssystem der Firma MWG Biotech unter UV-Licht (302 nm) ausgewertet.

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus den Agarose-Gelen erfolgte mit einem DNA Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers.

TAE-Puffer:	40 mM Tris/Acetat pH 7.5
	2 mM EDTA
DNA-Probenpuffer:	50 mM EDTA

---

50%	Glycerin
0.1%	Bromphenolblau
0.25%	Xylencyanol

#### 5.4.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation wurden das enzymatisch geschnittene Plasmid und das DNA-Fragment im Verhältnis 1:3 bis 1:10 in einem 20 µl Ansatz eingesetzt. Nach Zugabe von 2 µl 10× Ligasepuffer, 1 µl T4-DNA-Ligase (NEB) wurde mit Wasser auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und 12 h bei 16 °C ligiert. Danach wurden nochmals 0.5 µl T4-DNA-Ligase zugegeben und 3 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde der komplette Ansatz direkt in kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

#### 5.4.9 Southernblot-Analyse

Bei einem Southernblot werden chromosomale DNA-Fragmente analysiert. Zuerst werden 20-30 µg chromosomale DNA der zu untersuchenden Hefestämme mit jeweils 1 µl Restriktionsenzym in 25 µl Gesamtvolumen über Nacht verdaut und das erhaltene Gemisch durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Zum Größenvergleich wurde das Gel unter UV-Licht mit einem Lineal fotografiert.

Anschließend wurde die DNA auf eine Nylonmembran übertragen. Dazu wurde eine Hybond™-Nylonmembran zurechtgeschnitten (etwas größer als das Gel) und in 2×SSC-Puffer äquilibriert. Die Blottingkammer sowie die Trägerfläche wurden mit dest. Wasser angefeuchtet, dann wurden die Nylonmembran, der Folienrahmen und das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Danach konnte ein Vakuum von 50 mbar angelegt werden. Das Gel wurde dann nacheinander mit Denaturierungspuffer, Neutralisierungspuffer (je 10 min) und 20×SSC-Puffer (1 h) überschichtet. Unter UV-Licht wurde die DNA schließlich mit der Membran vernetzt (5 min). Dann wurde die Membran bei 55 °C für 30 min mit Hybridisierungspuffer behandelt, danach die Sonde zugegeben und bei gleichbleibenden Bedingungen über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurde zweimal mit je 100 ml 55 °C warmem Primary-Waschpuffer 10 min lang gewaschen und zweimal 5 min mit je 200 ml Secondary-Waschpuffer bei RT. Zum Entwickeln der Membran wurden 6 ml Detection-Reagenz gleichmäßig verteilt. Abschließend wurde in einer Filmkassette für 1-3 h ein ECL-Hyperfilm aufgelegt und entwickelt.

Denaturierungspuffer:	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungspuffer:	0,5 M Tris/HCl pH 7, 3 M NaCl
20x SSC-Puffer:	0,3 M Natriumcitrat pH 7, 3 M NaCl
20x Secondary-Wash:	1 M Tris, 2 M NaCl, pH 10
1x Primary-Wash:	2 M Harnstoff, 0.1 % SDS, 50 mM Natriumphosphat pH 7, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 0.2 % Blocking Reagenz (Kit)
Hybridisierungspuffer:	0.5 M NaCl, 4 % Blocking Reagenz
Sonde:	100 ng DNA (5 min, 95 °C), 10 µl Reaktionspuffer, 2 µl Labelling Reagenz, 10 µl Crosslinker „working solution“, 30 min 37 °C inkubieren

## 5.4.10 Zelltransformation

### 5.4.10.1 Transformation von Hefezellen

Die Transformation von Hefezellen erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode. Hierzu wurde aus einer Hefe-Vorkultur eine Hauptkultur so angeimpft, dass eine OD<sub>600</sub> von 0.2 resultierte. Nachdem die Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 0.8 gewachsen waren, wurden 8 OD Zellen entnommen, zentrifugiert (3000 Upm, 5 min), mit 1 ml Wasser und 1 ml Lithiumsorbitol gewaschen und in 500 µl Lithiumsorbitol resuspendiert. Daraus wurden 50 µl Aliquots hergestellt, die für 30 min bei 30 °C inkubiert wurden. Zur Transformation wurde die Zellsuspension mit 5 µl Heringsperma-DNA (SS-DNA) und 2-5 µl Plasmid-DNA versetzt und nach Zugabe von 300 µl frischer 40 %igen PEG-Lösung und 37.5 µl DMSO vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde 30 Minuten bei 30 °C und anschließend weitere 15 Minuten bei 42 °C (Hitzeschock) inkubiert. Die Zellen wurden 4 Minuten bei 3000 Upm abzentrifugiert, in 100 µl Wasser aufgenommen und auf Selektionsmedium ausplattiert.

10x TE:	100 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM EDTA
10x LiOAc:	1 M LiOAc
40 % PEG:	240 µl 50 % PEG-4000, 30 µl 10x TE, 30 µl 10x LiOAc

#### 5.4.10.2 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Elektroporation

Zur Transformation wurden 10 µl eines Ligationsansatzes bzw 5 µl Plasmid-DNA nach Dialyse eingesetzt. Die DNA wurde auf die unter Eiskühlung aufgetauten *E. coli*-Zellen pipettiert, gemischt und 1 Minute auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und die DNA mit einem elektrischen Impuls (Gene Pulser, Biorad: 2,5 kV, 400 Ω, 25 µF) transformiert. Unmittelbar danach wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion auf plasmidtragende *E. coli*-Zellen wurde die Suspension auf LB-Platten mit Ampicilin (50-75 mg/l) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 5.4.10.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

5 ml einer stationären Vorkultur des Stammes DH5α wurden in 500 ml LB-Medium angeimpft und bei 37 °C etwa 2,5 Stunden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 geschüttelt. Die Zellen wurden 30 Minuten auf Eis gekühlt und 10 Minuten bei 4000 Upm (4 °C) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen nacheinander mit 500 ml, 250 ml und 20 ml eisgekühlter 10 % iger Glycerinlösung gewaschen. Die Zellen wurden in 2-4 ml 10 %igem Glycerin aufgenommen und in Aliquots zu je 100 µl bei -80 °C gelagert.

#### 5.4.10.4 Hitzeschock Transformation in *E. coli* Zellen

Hitzeschockkompetente Zellen werden auf Eis aufgetaut, mit 1-20 µl Plasmid oder Ligationsansatz versetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen 2 min auf 42 °C erhitzt. Danach nochmals 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl SOC Medium werden die Zellen 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Zellen werden bei 10000 x g abzentrifugiert und auf Selektionsmedium ausplattiert.

## 5.5 Biochemische Methoden

### 5.5.1 Alkalische Lyse

Für Westernblot Analysen wurden die Zellen unter den gewünschten Wachstumsbedingungen angezogen und ein Volumen entnommen, welches je Probe 1,5 OD Zellen entsprach. Danach wurde zentrifugiert und das Pellet bei -20 °C gelagert. Zum

Aufschluss wurden die Zellen in 1 ml Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 150  $\mu$ l 1,85 M NaOH/7,5 %  $\beta$ -ME (frisch hergestellt aus 2 M NaOH und  $\beta$ -ME) erfolgte eine zehnmünütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 150  $\mu$ l 50 %ige TCA zugesetzt und weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann 10 Minuten bei 10000  $\times$  g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit 500  $\mu$ l eiskaltem Aceton gewaschen, etwa 30 min bei 37 °C getrocknet und nach Zugabe von 50  $\mu$ l Protein-Probenpuffer auf dem Schüttler (37 °C) gelöst. Vor der Elektrophorese wurden die Proben 3-4 Minuten auf 95 °C erhitzt und 1 Minute bei 10000  $\times$  g zentrifugiert.

Protein-Probenpuffer: 1 ml Harnstoffpuffer, 1 %  $\beta$ -ME, 10 % 1M Tris/HCl pH 8  
 Harnstoffpuffer: 8 M Harnstoff, 40 mM Tris, 0.1 M EDTA, 5 % SDS,  
 0.05 % Bromphenolblau, pH 6.8

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

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in 800 ml SDS-Laufpuffer bei einer Spannung von 100-150 V durchgeführt. Bei diesem Verfahren können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Pro Bahn wurden 7-20  $\mu$ l Proteinlösung aufgetragen.

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

Es wurden hauptsächlich 9-10 %ige Trenngelle hergestellt, mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet und 45 Minuten polymerisiert. Dann wurde das Sammelgel gegossen und 1 Stunde polymerisiert.

Komponenten	10 % Trenngel	Sammelgel
Wasser	4.02 ml	2 ml
1.5 M Tris pH 8.8	2.5 ml	
0.5 M Tris pH 6.8	-	0.83 ml
10 % SDS (w/v)	100 $\mu$ l	33 $\mu$ l
30 % Acrylamidlösung	3.33 ml	433 $\mu$ l
10 % APS (w/v)	50 $\mu$ l	17 $\mu$ l

TEMED	5 $\mu$ l	3.3 $\mu$ l
-------	-----------	-------------

### 5.5.3 Western Blotting

Sehr geringe Proteinmengen können mit einer immunologischen Technik nachgewiesen werden, die Westernblot Analyse genannt wird.

Zunächst wurden mit den Proben eine SDS-PAGE (Kapitel 4.5.2) durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden dann in einer Wet-Blot-Apparatur auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Dazu wurden pro Polyacrylamid-Gel zwei dicke Blatt Filterpapier und ein Blatt Nitrocellulose in Transferpuffer getränkt und zu einem „Sandwich“ aufgebaut. Netzgeräteeinstellung: 1,5-3 Stunden und 75 mA pro Gel. Um ein Erwärmen der Apparatur zu vermeiden, wurde das gesamte Transferbehältnis in eine Eisbox gestellt. Im Anschluss erfolgte die Antikörperdetektion.

1 x Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,02 % SDS, 20 % Methanol

### 5.5.4 Immunodetektion von Proteinen mit dem ECL™-System

Mittels hochspezifischer Antikörper können Proteine detektiert werden. Die vom Antikörper zu erkennende Gruppe bezeichnet man als Epitop.

Zur Blockung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran 1h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in 10 % Milchpulver/TBS-T oder 3 % BSA/TBS-T Lösung geschwenkt, anschließend zwei Mal 10 min mit TBS-T gewaschen und 20 ml einer Lösung mit dem 1. Antikörper in der entsprechenden Verdünnung (Kapitel 4.1.1) zugegeben. Nach 1-2 stündiger Inkubationszeit wurde drei Mal 10 min lang mit TBS-T gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von Peroxidase markiertem Ziege Anti-Hase- bzw. Ziege Anti-Maus-Antikörper (Kapitel 4.1.1). Nach 1-2 h Inkubationszeit wurde vier Mal 5 min mit TBS-T gewaschen und anschließend wurden 600  $\mu$ l ECL-Lösung (300  $\mu$ l Lösung 1 und 300  $\mu$ l Lösung 2) gleichmäßig auf der Membran verteilt. Nach 1 min Einwirkungszeit wurde sofort ein lichtempfindlicher Film aufgelegt und entwickelt.

TBS-T Puffer: 137 mM NaCl, 0,1 % Tween-20, 20 mM Tris pH 7,6



### 5.5.5 Nativer Glasperlenaufschluss und Immunopräzipitation

Die Zellen wurden wie unter 4.3.2 beschrieben kultiviert, 50-70 OD Zellen je Probe geerntet und im Anschluss bei 2000 × g 5 min lang zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml Wasser gewaschen und bei 2000 × g 3 min zentrifugiert. Danach wurde in 500 µl PBS-Puffer (inkl. Complete Protease Block (Fermentas), 1.1 mM PMSF, 0.5 % Triton-X-100) resuspendiert, mit 300 µl Glasperlen versetzt, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend 15 min auf einem Vortexer bei 8 °C aufgeschlossen. Dann wurde bei 20000 × g 15 min und 4 °C abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit der gewünschten Menge Antikörper versetzt (HA: 3 µl, MYC: 3 µl, V5: 0.6 µl). Die Immunopräzipitation fand bei 8 °C auf einem Überkopfschüttler statt. Dann wurden 50 µl 5 % Protein A Sepharose™ CL-4B (GE Healthcare) zugegeben und weitere 1.5 h auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Im Anschluss wurde bei 2000 × g 3 min lang zentrifugiert und die Immunopräzipitate 5x mit PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 50 µl Harnstoffpuffer wurden die Proben vor der Elektrophorese noch 20 min auf 75 °C in einem Schüttler erhitzt und bei 10000 × g abzentrifugiert.

PBS-Puffer pH 7,4: 137 mM NaCl, 1,25 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,35 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 % Triton-X-100

### 5.5.6 Cycloheximid Chase

In den entsprechenden CM-Medien wurden Hauptkulturen herangezogen (OD<sub>600</sub> ≈ 1-2), 15 OD Zellen entnommen, zentrifugiert (3000 Upm, 4 min) und in 2.5 ml des gleichen Mediums resuspendiert. Dazu wurden 50 µl Cycloheximid (5mg/ml in DMSO) gegeben, gemischt und sofort 500 µl als Nullprobe sowie weitere Proben zu den gewünschten Zeitpunkten entnommen und mit 500 µl eiskaltem Natriumazid versetzt. Nach 10 min auf Eis wurde die Proben zentrifugiert (10000 × g, 1 min), der Überstand abgenommen und in einem ml Wasser resuspendiert. Nachdem die Zellen alkalisch lysiert waren, wurde eine Immunoblot-Analyse durchgeführt.

### 5.5.7 Färbung von SDS-Gelen

Coomassie-Färbung

Mit der Coomassie-Färbung können Proteine in Konzentrationen zwischen 50-400 ng in SDS Gelen detektiert werden. Nach der SDS PAGE werden die SDS Gele in einer Glaswanne

mit 50 ml Coomassie-Lösung versetzt und 30 min auf einem Schüttler inkubiert. Danach wird mehrmals mit der Entfärberlösung gewaschen, bis diskrete Proteinbanden erkennbar sind.

Coomassie-Lösung: 0,02 % Coomassie Brilliant Blue G250, 25 % EtOH, 8 % HOAc

Entfärberlösung: 40 % MeOH, 10 % HOAc

### Silberfärbung

Mit der Silberfärbung nach (Shevchenko et al., 1996) können Proteinkonzentrationen zwischen 1-20 ng analysiert werden. Nach der SDS PAGE wurde das SDS Gel in einer Glaswanne mit Fixierlösung überschichtet und 20 min inkubiert. Dann wurde das Gel mit 50 %igem Methanol (v/v) und mit Wasser je 10 min gewaschen. Nun wurde das Gel 1 min in 0,02 %iger Natriumthiosulfatlösung inkubiert und zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Danach wurde eiskalte Silbernitratlösung zugegeben und bei 4 °C für 20 min inkubiert. Das Gel wurde zweimal mit Wasser gewaschen und mit der Färbelösung überschichtet. Waren die Proteinbanden in der gewünschten Intensität sichtbar, wurde die Färbereaktion mit 5 %iger Essigsäure gestoppt.

Fixierlösung: 50 % MeOH, 5 % HOAc

Färbelösung: 0,04 % Formaldehyd, 2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (w/v)

### 5.5.8 Polyubiquitinierungsversuch

#### Tansey Lab Ubiquitinierungsassay

In den gewünschten Stämmen wird die Expression eines poly-Histidin getaggten Ubiquitins (His<sub>6</sub>-Ub) durch die Zugabe von 0.2 mM CuSO<sub>4</sub> induziert, nachdem die Zellen auf CM/Ethanol Medium umgeimpft wurden. Nach 20 - 22 Stunden werden 150 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet, mit Wasser gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Nach dem Auftauen auf Eis werden 300 µl Glasperlen und 600 µl Puffer A2 zugegeben und 10 min bei 8 °C gevortext. Danach wurde bei 4 °C und 11000 × g 10 min lang zentrifugiert. 350 µl des klaren Überstandes wurden abgenommen, mit 100 µl Ni-NTA Agarose Suspension versetzt und 2 h auf dem Überkopfschüttler bei 8 °C inkubiert. In 50 µl Überstand wurden mit 450 µl eiskaltem Ethanol alles Protein bei -20 °C / 1-2h gefällt. Die

trübe Lösung wurde dann 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet bei 65 °C 20 min lang getrocknet. Das trockene Pellet wurde anschließend in 50 µl UREA - Puffer aufgenommen und im Heizblock bei 95 °C gelöst. Die Ni-NTA Agarose wurde durch zentrifugieren bei 2500 rpm / 3 min gesammelt, zweimal mit Puffer A2 und dreimal mit Puffer T2 gewaschen und danach in 100 µl UREA Puffer (mit zusätzlichen 250 mM Imidazol) aufgenommen. Das gebundene Protein wurde durch Erhitzen auf 95 °C für 15 min von den Agarose Beads gelöst. Im Anschluss wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und die gewünschten Proteine im Western Blot detektiert.

Puffer A2:	6 M Guanidinium-HCl 100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8.0 10 mM Imidazol 250 mM NaCl 0.5 % NP-40
Puffer T2:	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 8.0 250 mM NaCl 20 mM Imidazol 0.5 % NP-40
UREA-Puffer:	8 M Harnstoff, 40 mM Tris, 0.1 M EDTA, 5 % SDS, 0.05 % Bromphenolblau, pH 6.8

### *In vitro* Ubiquitinierungsassay

Eine der gängigsten Methode zur Untersuchung der Interaktion zwischen einem E2 und einem E3 ist die *in vitro* Ubiquitinierung (Mimnaugh et al., 1999; Davydov et al., 2004). Hierfür wird das vermutliche E3-Enzym gemeinsam mit einem E1 Enzym, E2 Enzym, Ubiquitin und ATP (vollständige Ubiquitin-Kaskade + Energieträger) in einem Eppendorf Gefäß zusammen pipettiert und bei 30 °C für 2 h unter leichtem Schütteln (700 rpm) inkubiert.

Als mögliche E3-Ligasen wurden unterschiedliche GST-Gid2 Konstrukte (pGEX4T3::Gid2; pGEX4T3::Gid2<sub>1-173</sub>, pGEX4T3::Gid2<sub>281-421</sub>) verwendet und in *E. coli* BL21 Zellen exprimiert. Die tierische E3-Ligase gp78 (pGEX4T3::gp78<sub>309-643</sub>, (Fang et al., 2001)) diente hierbei als positive Kontrolle, ein vom "leeren" Vektor (pGEX4T3) exprimiertes GST-Protein wurde als negativ Kontrolle verwendet. Beide Proteine wurden ebenfalls in BL21 Zellen exprimiert.

Die Zellkulturen wurden bei einer  $OD_{600}$  von 1 mit einer finalen Konzentration von 0,2 mM IPTG versetzt, wodurch die artifizielle Proteinsynthese induziert wurde und anschließend über Nacht bei 16° C kultiviert.

Nach kurzem Kühlen der Zellsuspensionen auf Eis wurden die Zellen bei 5000 rpm 15min (4 °C) abzentrifugiert, in Tris-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 5 mM DTT, 2 mM PMSF, 1 % Triton-X100, 1x Complete™ Protease Inhibitor Lösung) resuspendiert, einmal mit 40 ml Tris-Puffer gewaschen und in 1 ml Puffer je g Pellet gelöst - hiermit wurde gewährleistet, dass die unterschiedlichen Zellysate die gleiche Proteinkonzentration (g/ml) besitzen. Zum Aufschluss der Zellsuspensionen wurde eine French Press verwendet. Ein 20 µl *in vitro* Ubiquitinierungsassay setzte sich wie folgt zusammen:

E1 (Ubc5H)	0,5 µl
E2	0,8 µl
E3 Lysat	8 µl
ATP (100mM, pH 7.5)	1 µl
HA-Ub (5 µg/µl)	2 µl
Ubiquitinierungspuffer (10x)	2 µl
ATP-Regenerierungskit (10x)	2 µl
steriles ddH <sub>2</sub> O	ad to 20 µl

Ubiquitinierungspuffer: 0,5 M NaCl, 0,5 M Tris, 0,1 M MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DDT, pH 7,5

Der Ansatz wurde 2-3 h bei 30 °C auf einem Schüttler inkubiert, im Anschluß wurde das gleiche Volumen Harnstoffpuffer zugegeben, 10 min bei 95 °C erhitzt und mittels SDS PAGE, Westernblot und Immunodetektion die Autoubiquitinierung/Ubiquitinierung der RING E3 Ligase nachgewiesen.

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

Zu Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen wurde auf das Glutathion S-Transferase (GST) Genfusionssystem von GE-Healthcare zurückgegriffen (N-terminaler GST-tag mit einem Molekulargewicht von 26kDa). In dieser Arbeit wurde mit dem Vektor pGEX-4T3 gearbeitet, er enthält einen mit IPTG induzierbaren *Tac*-Promotor, sowie einen

Ampicillin-Resistenzmarker zur Selektion der *E. coli* Zellen ([www.gehealthcare.com](http://www.gehealthcare.com); GST Handbuch). Als Expressionstamm wurden BL21 Zellen verwendet, der aufgrund seines Genotyps eine höhere Ausbeute an rekombinanten Proteinen ermöglichte (Deletion von intrazellulären Proteasen). Falls nicht anders vermerkt wurde eine über Nacht gewachsene 10 ml 2 x YT Vorkultur in eine 650 ml Hauptkultur 2 x YT+ 2 % Glucose überführt und bis zu einer OD<sub>600</sub> 1 bei 37 °C angezogen. Anschließend wurden der Kultur 14 ml 100 %iges EtOH (Endkonzentration 2 %) zugesetzt und 15 min auf Eis abgekühlt. Zur Induktion des *Tac*-Promotors wurde 0,1-1 mM IPTG zugegeben und anschließend 10-16 h bei 16 °C inkubiert. Nach kurzem Lagern der Zellsuspensionen auf Eis wurden die Zellen für 15 min bei 5000 rpm (4 °C) pelletiert und in eiskaltem Puffer (PBS-Puffer, Tris-Puffer, Phosphatpuffer) resuspendiert und mittels "French Press" aufgeschlossen. Nach 30 min Inkubation bei RT auf einem Überkopfschüttler wurde das Lysat 40 min bei 16.000 rpm (4 °C) abzentrifugiert und anschließend 50 % Gluthation Sepharose 4B 250-500 µl zugegeben. Zur optimalen Bindung des GST-Fusionsproteins an die Sepharose wurde nochmals 30 min (4 °C) auf einem Überkopfschüttler gedreht. Anschließend wurde 5 min bei 500 x g zentrifugiert und das Sepharose-Pellet drei Mal mit 10-20 ml des jeweilig verwendeten Puffers gewaschen. Die Elution erfolgte mit 15 mM reduziertem Gluthation (frisch hergestellt). Der Nachweis der erfolgreichen Aufreinigung wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließender Proteinfärbung überprüft (Coomassie- oder Silberfärbung).

### 5.5.10 Gelfiltrationschromatographie

Die Zellen wurden 16 h lang auf YPethanol Medium inkubiert, bei 2000 x g 5 min zentrifugiert und in YPD Medium resuspendiert und nach 30 min 200 OD<sub>600</sub> Zellen geerntet. Die Zellen wurden mit Wasser gewaschen und in 1 ml Probenpuffer (50 mM Tris pH 7,5, 250 mM NaCl, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert. Dann wurden 500 µl Glasperlen zugegeben und die Zellen 15 min auf einem Vortexer nativ aufgeschlossen. Dann wurde 15 min bei 20000 x g zentrifugiert. Vom klaren Überstand wurden 800 µl auf die mit Superose6 (GE Healthcare) gepackte Trennsäule aufgetragen und für ca. 20 h bei einer Fließgeschwindigkeit von 7 ml/h getrennt. Sobald am Photometer eine Absorption bei 280 nm gemessen wurde, wurden Proben mit einem Volumen von 1,3 ml gesammelt, mit 80 µl 110 %iger TCA versetzt und 15 min lang auf Eis

inkubiert. Dann wurde 10 min bei 11000 x g zentrifugiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Die Proben wurden getrocknet und in 50 µl Harnstoffpuffer aufgenommen. Nach SDS PAGE und einem Westernblot wurden die gewünschten Proteine per Immunodetektion nachgewiesen.

#### **5.5.11 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Zur Herstellung der Bradfordlösung wurden 0,01 % Serva Blau G250 über Nacht unter Rühren in 2 % Ethanol gelöst. Zu dieser Lösung wurden 10 % (v/v) 85 %iger Phosphorsäure gegeben und mit Wasser aufgefüllt. Eine Eichgerade wurde mit Hilfe von BSA Proben bekannter Proteinkonzentration erstellt.

Es wurden immer je 100 µl Proteinlösung und 1 ml Bradfordlösung zusammenpipetiert, gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt. In einem Diagramm wurde die Extinktion gegen die Proteinkonzentration aufgetragen.

#### **5.5.12 PonceauS-Färbung**

Um Proteine auf einer Nitrocellulosemembran anzufärben, wurde diese nach dem Western Blot in einem Plastikschälchen mit ca. 25 ml PonceauS-Lösung versetzt und 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Färbelösung abgegossen und die Membran mit klarem Wasser solange gewaschen, bis diskrete Proteinbanden sichtbar waren.

PonceauS-Lösung:           0.2 % PonceauS (w/v)  
                                  5 % Essigsäure (v/v)

#### **5.5.13 Sequenzanalyse**

Die Suche in Sequenzdatenbanken wurde mittels eines redundanzfreien Datensatz von Uniprot und GenPept ausgeführt (Benton, 1990; Bairoch and Apweiler, 1997). Der Abgleich mehrerer Sequenzen wurde mit MUSCLE berechnet, statt der ganzen Proteinsequenz werden hier einzelne Domänenbereiche getrennt betrachtet (Edgar, 2004). Verallgemeinerte Profile und Suchen wurden dezentral mit der pftools Software, Version 2.1, und der BLOSUM 45 Substitutionsmatrix durchgeführt (Bucher et al., 1996; Henikoff and Henikoff, 1992). Profiletreffer wurden hinsichtlich statistischer Signifikanz analysiert

anhand der "Score-Streuung" einer willkürlichen Datenbank (Hofmann, 2000). Nur Sequenztreffer, die mit einer Wahrscheinlichkeit  $p$  kleiner als 0.01 detektiert wurden, wurden für die verfeinerte Analyse weiterverwendet.

#### **5.5.14 Pulse Chase Analyse**

Von einer stationären Vorkultur ( $OD_{600} \approx 4$ ) wurde in CM Medium ohne Methionin und Cystein mit Glukose auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 umgeimpft und 16 h lang inkubiert. Dann wurden 20  $OD_{600}$  Zellen entnommen, bei 1000 x g 3 min zentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Diese Zellen wurden in 10 ml CM Medium ohne Methionin und Cystein Medium mit Ethanol als Kohlenstoffquelle resuspendiert und in einem Wasserbad bei 30 °C 3 h inkubiert. Dann wurden 25  $\mu$ l  $^{35}$ S-Methionin zugegeben und weitere 3 h inkubiert. Dann wurden die Zellen geerntet und in 5,5 ml Chase Medium (CM Medium mit allen Supplementen, 10 mM Methionin und 2 % Glukose) resuspendiert. Es wurde sofort sowie alle weiteren 30 min eine Probe von 4 OD Zellen entnommen, mit 100  $\mu$ l 110 %iger TCA (w/v) versetzt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und 15 min bei 11000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 100  $\mu$ l Aceton gewaschen und bei 37 °C getrocknet. Dann wurde das Zellpellet in 100  $\mu$ l BB1 Puffer resuspendiert und 100  $\mu$ l Glasperlen zugegeben. Die Zellen wurden dreimal 5 min gevortext und 1 min bei 95 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen 2 min auf Eis inkubiert und es wurden 900  $\mu$ l IP Puffer zugegeben. Die Proben wurden 10 min bei 11000 x g zentrifugiert, 800  $\mu$ l des klaren Überstands entnommen und in einen neues Eppendorfgefäß überführt und mit 3  $\mu$ l FBPase Antikörper versetzt. Dann wurde 2 h bei RT auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Dann wurde mit 50  $\mu$ l 5 %iger Protein A Sepharose™ CL 4B versetzt und eine weitere Stunde inkubiert. Die Proben wurden bei 1000 x g zentrifugiert und dreimal mit IP Puffer gewaschen. Die Sepharose Pellets wurden in 50  $\mu$ l Harnstoffpuffer aufgenommen und bei 95 °C 10 min lang inkubiert. Dann wurde eine SDS PAGE durchgeführt und im Anschluss das Gel getrocknet und in einer Filmkassette fixiert. Nun wurde für 1-3 Tage ein PhosphorImager Film aufgelegt. Der geschwärzte Film wurde an einem PhosphorImager Storm 860 gescannt und mit Hilfe der ImageQuant 5.2 Software (Molecular Dynamics) ausgewertet.

BB1-Puffer: 50 mM Tris pH7,5, 6 M Harnstoff, 1 % SDS (w/v), 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 x Complete™

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



## 6 Literaturverzeichnis

- Amerik, A. Y., and Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695, 189–207.
- Aravind, L., and Koonin, E. V. (2000). The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. *Curr. Biol.* 10, R132–4.
- Arndt, V., Daniel, C., Nastainczyk, W., Alberti, S., and Höhfeld, J. (2005). BAG-2 acts as an inhibitor of the chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP. *Mol Biol Cell* 16, 5891–5900.
- Ausubel, E. B. F. M. (1992). *Short Protocols in Molecular Biology* 2nd ed. F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl, eds. (John Wiley & Sons).
- 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.
- Bailly, V., Lauder, S., Prakash, S., and Prakash, L. (1997). Yeast DNA repair proteins Rad6 and Rad18 form a heterodimer that has ubiquitin conjugating, DNA binding, and ATP hydrolytic activities. *J Biol Chem* 272, 23360–23365.
- Bairoch, A., and Apweiler, R. (1997). The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL. *Nucleic Acids Res* 25, 31–36.
- Bar-Nun, S., and Glickman, M. H. (2011). Proteasomal AAA-ATPases: Structure and function. *Biochim Biophys Acta*.
- Barbin, L. (2009). Ubiquitin-proteasome dependent catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase: localization and involvement of novel components. (Stuttgart: Universität Stuttgart).
- Barbin, L., Eisele, F., Santt, O., and Wolf, D. H. (2010). The Cdc48-Ufd1-Npl4 complex is central in ubiquitin-proteasome triggered catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 394, 335–341.
- Barlow, P. N., Luisi, B., Milner, A., Elliott, M., and Everett, R. (1994). Structure of the C3HC4 domain by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy. A new structural class of zinc-finger. *J Mol Biol* 237, 201–211.
- Baumeister, W., Dahlmann, B., Hegerl, R., Kopp, F., Kuehn, L., and Pfeifer, G. (1988). Electron microscopy and image analysis of the multicatalytic proteinase. *FEBS Lett* 241, 239–245.
- Beck, T., and Hall, M. N. (1999). The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* 402, 689–692.
- Belinchón, 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.
- Benton, D. (1990). Recent changes in the GenBank On-line Service. *Nucleic Acids Res* 18, 1517–1520.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., and Stryer, L. (2006). *Biochemistry*. (W. H. Freeman and Company, New York.).
- Bordallo, J., and Wolf, D. H. (1999). A RING-H2 finger motif is essential for the function of Der3/Hrd1 in endoplasmic reticulum associated protein degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 448, 244–248.
- Bordallo, J., Plemper, R. K., Finger, A., and Wolf, D. H. (1998). Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins. *Mol Biol Cell* 9, 209–222.
- Borden, K. L., Boddy, M. N., Lally, J., O'Reilly, N. J., Martin, S., Howe, K., Solomon, E., and Freemont, P. S. (1995). The solution structure of the RING finger domain from the acute promyelocytic leukaemia proto-oncoprotein PML. *EMBO J* 14, 1532–1541.
- Braun, B., Pfirrmann, T., Menssen, R., Hofmann, K., Scheel, H., and Wolf, D. H. (2011). Gid9, a second RING finger protein contributes to the ubiquitin ligase activity of the Gid complex required for catabolite degradation. *FEBS Lett*.
- Bryant, N. J., and Stevens, T. H. (1998). Vacuole Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: Protein Transport Pathways to the Yeast Vacuole. *Microbiology and molecular biology reviews* 62, 230–247.
- Brzovic, P. S., Keeffe, J. R., Nishikawa, H., Miyamoto, K., Fox, D., Fukuda, M., Ohta, T., and Klevit, R. (2003). Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 5646–5651.
- Bucher, P., Karplus, K., Moeri, N., and Hofmann, K. (1996). A flexible motif search technique based on generalized profiles. *Comput. Chem.* 20, 3–23.
- Burns, K. E., and Darwin, K. H. (2010). Pupylation versus ubiquitylation: tagging for proteasome-dependent degradation. *Cellular microbiology* 12, 424–431.
- 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.
- Chen, B., Mariano, J., Tsai, Y. C., Chan, A. H., Cohen, M., and Weissman, A. M. (2006). The activity of a human endoplasmic reticulum-associated degradation E3, gp78, requires its Cue domain, RING finger, and an E2-binding site. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 341–346.
- Chiang, H. L., and Schekman, R. (1991). Regulated import and degradation of a cytosolic protein in the yeast vacuole. *Nature* 350, 313–318.
- Chiang, M. C., and Chiang, H. L. (1998). Vid24p, a novel protein localized to the fructose-1,

- 6-bisphosphatase-containing vesicles, regulates targeting of fructose-1,6-bisphosphatase from the vesicles to the vacuole for degradation. *J Cell Biol* 140, 1347–1356.
- Chung, J., Kuo, C. J., Crabtree, G. R., and Blenis, J. (1992). Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 69, 1227–1236.
- Ciechanover, A. (2010). The ubiquitin system: historical perspective. *Proc Am Thorac Soc* 7, 11–12.
- Ciechanover, A., and Schwartz, A. L. (2004). The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochim Biophys Acta* 1695, 3–17.
- Davydov, I. V., Woods, D., Safiran, Y. J., Oberoi, P., Fearnhead, H. O., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M., Kenten, J. H., and Vousden, K. H. (2004). Assay for ubiquitin ligase activity: high-throughput screen for inhibitors of HDM2. *J Biomol Screen* 9, 695–703.
- Denti, S. (2003). RanBPM Is a Phosphoprotein That Associates with the Plasma Membrane and Interacts with the Integrin LFA-1. *J Biol Chem* 279, 13027–13034.
- Deshaies, R. J., and Joazeiro, C. A. P. (2009). RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* 78, 399–434.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 113.
- 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., and Wolf, D. H. (2008). Degradation of misfolded protein in the cytoplasm is mediated by the ubiquitin ligase Ubr1. *FEBS Lett* 582, 4143–4146.
- 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.
- Fang, N. N., Ng, A. H. M., Measday, V., and Mayor, T. (2011). Hul5 HECT ubiquitin ligase plays a major role in the ubiquitylation and turnover of cytosolic misfolded proteins. *Nature*.
- Fang, S., and Weissman, A. M. (2004). A field guide to ubiquitylation. *Cell Mol Life Sci* 61, 1546–1561.
- Fang, S., Ferrone, M., Yang, C., Jensen, J. P., Tiwari, S., and Weissman, A. M. (2001). The tumor autocrine motility factor receptor, gp78, is a ubiquitin protein ligase implicated in degradation from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 14422–14427.
- Fischer, M., Hilt, W., Richter-Ruoff, B., Gonen, H., Ciechanover, A., and Wolf, D. H. (1994). The

- 26S proteasome of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 355, 69–75.
- Förster, F., Lasker, K., Beck, F., Nickell, S., Sali, A., and Baumeister, W. (2009). An atomic model AAA-ATPase/20S core particle sub-complex of the 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 388, 228–233.
- Freemont, P. S., Hanson, I. M., and Trowsdale, J. (1991). A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell* 64, 483–484.
- Funayama, S., Gancedo, J. M., and Gancedo, C. (1980). Turnover of yeast fructose-bisphosphatase in different metabolic conditions. *Eur J Biochem* 109, 61–66.
- Gallastegui, N., and Groll, M. (2010). The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends Biochem Sci* 35, 634–642.
- Gancedo, C. (1971). Inactivation of fructose-1,6-diphosphatase by glucose in yeast. *J Bacteriol* 107, 401–405.
- Gerlitz, G., Darhin, E., Giorgio, G., Franco, B., and Reiner, O. (2005). Novel functional features of the Lis-H domain: role in protein dimerization, half-life and cellular localization. *Cell Cycle* 4, 1632–1640.
- 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.
- Gingras, A. C., Raught, B., and Sonenberg, N. (2004). mTOR signaling to translation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 279, 169–197.
- 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. (1998a). 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., Fried, V. A., and Finley, D. (1998b). The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol Cell Biol* 18, 3149–3162.
- Glotzer, M., Murray, A. W., and Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132–138.
- Grabbe, C., and Dikic, I. (2009). Functional roles of ubiquitin-like domain (ULD) and ubiquitin-binding domain (UBD) containing proteins. *Chem. Rev.* 109, 1481–1494.
- Grabbe, C., Husnjak, K., and Dikic, I. (2011). The spatial and temporal organization of ubiquitin networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 295–307.
- Groll, M., Heinemeyer, W., Jäger, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D. H., and Huber, R. (1999). The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: a mutational and crystallographic study. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 10976–10983.

- Grziwa, A., Baumeister, W., Dahlmann, B., and Kopp, F. (1991). Localization of subunits in proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* by immunoelectron microscopy. *FEBS Lett* 290, 186–190.
- Guthrie, C., and Fink, G. R. (1991). *Methods in Enzymology, Volume 194: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, (Academic Press Inc.).
- Güldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J., and Hegemann, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 24, 2519–2524.
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., Vasquez, D. S., Turk, B. E., and Shaw, R. J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30, 214–226.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557–580.
- Hardie, D. G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 774–785.
- Hashizume, R., Fukuda, M., Maeda, I., Nishikawa, H., Oyake, D., Yabuki, Y., Ogata, H., and Ohta, T. (2001). The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem* 276, 14537–14540.
- Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18, 1926–1945.
- Hämmerle, M., Bauer, J., Rose, M., Szallies, A., Thumm, M., Düsterhus, 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.
- Hegerl, R., Pfeifer, G., Pühler, G., Dahlmann, B., and Baumeister, W. (1991). The three-dimensional structure of proteasomes from *Thermoplasma acidophilum* as determined by electron microscopy using random conical tilting. *FEBS Lett* 283, 117–121.
- 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.
- Helliwell, S. B., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R., and Hall, M. N. (1994). TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol Biol Cell* 5, 105–118.

- Henikoff, S., and Henikoff, J. G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 10915–10919.
- 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.
- Hilt, W., Heinemeyer, W., and Wolf, D. H. (1993). Studies on the yeast proteasome uncover its basic structural features and multiple in vivo functions. *Enzyme Protein* 47, 189–201.
- Hilt, W., Heinemeyer, W., and Wolf, D. H. (1996). The proteasome and protein degradation in yeast. *Adv. Exp. Med. Biol.* 389, 197–202.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G. D., Moore, L., Adams, S.-L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., et al. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415, 180–183.
- Hofmann, K. (2000). Sensitive protein comparisons with profiles and hidden Markov models. *Brief. Bioinformatics* 1, 167–178.
- 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.
- Hoyt, M. A., and Coffino, P. (2004). Ubiquitin-free routes into the proteasome. *Cell Mol Life Sci* 61, 1596–1600.
- Hoyt, M. A., Zich, J., Takeuchi, J., Zhang, M., Govaerts, C., and Coffino, P. (2006). Glycine-alanine repeats impair proper substrate unfolding by the proteasome. *EMBO J* 25, 1720–1729.
- Huang, P. H., and Chiang, H. L. (1997). Identification of novel vesicles in the cytosol to vacuole protein degradation pathway. *J Cell Biol* 136, 803–810.
- 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.
- Jäger, S., Groll, M., Huber, R., Wolf, D. H., and Heinemeyer, W. (1999). Proteasome beta-type subunits: unequal roles of propeptides in core particle maturation and a hierarchy of active site function. *J Mol Biol* 291, 997–1013.

- Joazeiro, C. A., and Weissman, A. M. (2000). RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102, 549–552.
- Juretschke, J., Menssen, R., Sickmann, A., and Wolf, D. H. (2010). The Hsp70 chaperone Ssa1 is essential for catabolite induced degradation of the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 397, 447–452.
- Kaeberlein, M., Powers, R. W., Steffen, K. K., Westman, E. A., Hu, D., Dang, N., Kerr, E. O., Kirkland, K. T., Fields, S., and Kennedy, B. K. (2005). Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science* 310, 1193–1196.
- Kamada, Y., Fujioka, Y., Suzuki, N. N., Inagaki, F., Wullschleger, S., Loewith, R., Hall, M. N., and Ohsumi, Y. (2005). Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Mol Cell Biol* 25, 7239–7248.
- Kapahi, P., Chen, D., Rogers, A. N., Katewa, S. D., Li, P. W.-L., Thomas, E. L., and Kockel, L. (2010). With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging. *Cell Metab* 11, 453–465.
- Kleiger, G., Saha, A., Lewis, S., Kuhlman, B., and Deshaies, R. J. (2009). Rapid E2-E3 assembly and disassembly enable processive ubiquitylation of cullin-RING ubiquitin ligase substrates. *Cell* 139, 957–968.
- 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.
- Kloetzel, P.-M. (2004). The proteasome and MHC class I antigen processing. *Biochim Biophys Acta* 1695, 225–233.
- Knop, M., Schiffer, H. H., Rupp, S., and Wolf, D. H. (1993). Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 5, 990–996.
- 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.
- Köhler, A., Bajorek, M., Groll, M., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H., and Finley, D. (2001a). The substrate translocation channel of the proteasome. *Biochimie* 83, 325–332.
- Köhler, A., Cascio, P., Leggett, D. S., Woo, K. M., Goldberg, A. L., and Finley, D. (2001b). 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.
- Krogan, N. J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A. P., et al. (2006). Global landscape of protein complexes in the yeast

- Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* *440*, 637–643.
- Kuo, C. J., Chung, J., Fiorentino, D. F., Flanagan, W. M., Blenis, J., and Crabtree, G. R. (1992). Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature* *358*, 70–73.
- Kus, B. M., Caldon, C. E., Andorn-Broza, R., and Edwards, A. M. (2004). Functional interaction of 13 yeast SCF complexes with a set of yeast E2 enzymes in vitro. *Proteins* *54*, 455–467.
- Kwon, Y. T., Reiss, Y., Fried, V. A., Hershko, A., Yoon, J. K., Gonda, D. K., Sangan, P., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Varshavsky, A. (1998). The mouse and human genes encoding the recognition component of the N-end rule pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* *95*, 7898–7903.
- 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.
- Letunic, I., Doerks, T., and Bork, P. (2011). SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res.*
- Li, M., Luo, J., Brooks, C. L., and Gu, W. (2002). Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. *J Biol Chem* *277*, 50607–50611.
- Li, W., Bengtson, M. H., Ulbrich, A., Matsuda, A., Reddy, V. A., Orth, A., Chanda, S. K., Batalov, S., and Joazeiro, C. A. P. (2008). Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS ONE* *3*, e1487.
- Linares, L. K., Hengstermann, A., Ciechanover, A., Müller, S., and Scheffner, M. (2003). HdmX stimulates Hdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci USA* *100*, 12009–12014.
- Lok, G. T.-M., Sy, S. M.-H., Dong, S.-S., Ching, Y.-P., Tsao, S. W., Thomson, T. M., and Huen, M. S. Y. (2011). Differential regulation of RNF8-mediated Lys48- and Lys63-based polyubiquitylation. *Nucleic Acids Res.*
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 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.
- Lorick, K. L., Jensen, J. P., Fang, S., Ong, A. M., Hatakeyama, S., and Weissman, A. M. (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA* *96*, 11364–11369.
- Lum, J. J., DeBerardinis, R. J., and Thompson, C. B. (2005). Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 439–448.
- Ma, X. M., and Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 307–318.



- Martin, D. E., and Hall, M. N. (2005). The expanding TOR signaling network. *Curr Opin Cell Biol* 17, 158–166.
- Mateja, A., Cierpicki, T., Paduch, M., Derewenda, Z., and Otlewski, J. (2006). The dimerization mechanism of LIS1 and its implication for proteins containing the LisH motif. *J Mol Biol* 357, 621–631.
- Mazón, 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.
- McGrath, J. P., Jentsch, S., and Varshavsky, A. (1991). UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *EMBO J* 10, 227–236.
- Menon, R. P., Gibson, T. J., and Pastore, A. (2004). The C terminus of fragile X mental retardation protein interacts with the multi-domain Ran-binding protein in the microtubule-organising centre. *J Mol Biol* 343, 43–53.
- Mercado, J. J., Smith, R., Sogliocco, F. A., Brown, A. J., and Gancedo, J. M. (1994). The levels of yeast gluconeogenic mRNAs respond to environmental factors. *Eur J Biochem* 224, 473–481.
- Mercado, J. J., Vincent, O., and Gancedo, J. M. (1991). Regions in the promoter of the yeast FBP1 gene implicated in catabolite repression may bind the product of the regulatory gene MIG1. *FEBS Lett* 291, 97–100.
- Miles, E. W., Rhee, S., and Davies, D. R. (1999). The molecular basis of substrate channeling. *J Biol Chem* 274, 12193–12196.
- Mimnaugh, E. G., Bonvini, P., and Neckers, L. (1999). The measurement of ubiquitin and ubiquitinated proteins. *Electrophoresis* 20, 418–428.
- Minard, K. I., and McAlister-Henn, L. (1992). Glucose-induced degradation of the MDH2 isozyme of malate dehydrogenase in yeast. *J Biol Chem* 267, 17458–17464.
- Minard, K. I., and McAlister-Henn, L. (1994). Glucose-induced phosphorylation of the MDH2 isozyme of malate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys* 315, 302–309.
- Mizushima, N., and Klionsky, D. J. (2007). Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr* 27, 19–40.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395–398.
- Munakata, N., and Klionsky, D. J. (2010). “Autophagy suite”: Atg9 cycling in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Autophagy* 6, 679–685.
- Müller, D., and Holzer, H. (1981). Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast by phosphorylation/dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 103, 926–933.
- Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M.,

- Kung, C., Wilson, C., et al. (2009). Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136, 521–534.
- Nussbaum, A. K., Dick, T. P., Keilholz, W., Schirle, M., Stevanović, S., Dietz, K., Heinemeyer, W., Groll, M., Wolf, D. H., Huber, R., et al. (1998). Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 12504–12509.
- Ohi, M. D., Vander Kooi, C. W., Rosenberg, J. A., Chazin, W. J., and Gould, K. L. (2003). Structural insights into the U-box, a domain associated with multi-ubiquitination. *Nat Struct Biol* 10, 250–255.
- 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.
- Park, Y. C., Burkitt, V., Villa, A. R., Tong, L., and Wu, H. (1999). Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature* 398, 533–538.
- Pfaffmann, T. (2006). Characterization of Novel Proteins involved in Catabolite Degradation of Fructose-1,6-bisphosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* (Universität Stuttgart).
- Pickart, C. M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70, 503–533.
- Pickart, C. M. (1997). Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB J* 11, 1055–1066.
- Pickart, C. M. (2000). Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* 25, 544–548.
- Pitre, S., Dehne, F., Chan, A., Cheetham, J., Duong, A., Emili, A., Gebbia, M., Greenblatt, J., Jessulat, M., Krogan, N., et al. (2006). PIPE. *BMC Bioinformatics* 7, 365.
- Pohlig, G., Wingender-Drissen, R., Noda, T., and Holzer, H. (1983). Cyclic AMP and fructose-2,6-bisphosphate stimulated in vitro phosphorylation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 115, 317–324.
- Polekhina, G., House, C. M., Traficante, N., Mackay, J. P., Relaix, F., Sassoon, D. A., Parker, M. W., and Bowtell, D. D. L. (2002). Siah ubiquitin ligase is structurally related to TRAF and modulates TNF-alpha signaling. *Nat Struct Biol* 9, 68–75.
- Ponting, C. P., Schultz, J., Milpetz, F., and Bork, P. (1999). SMART: identification and annotation of domains from signalling and extracellular protein sequences. *Nucleic Acids Res* 27, 229–232.
- 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.
- Raught, B., Gingras, A. C., and Sonenberg, N. (2001). The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 7037–7044.
- 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. (1987). Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3, 1–30.
- Rechsteiner, M., and Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21, 267–271.
- 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.
- 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.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M. (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364–368.
- Rohde, J., Heitman, J., and Cardenas, M. E. (2001). The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J Biol Chem* 276, 9583–9586.
- Rolland, F., Winderickx, J., and Thevelein, J. M. (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res* 2, 183–201.
- Rose, A. H. (1991). *The Yeasts, Volume 4, Second Edition: Yeast Organelles* 2nd ed. (Academic Press).
- Rosenzweig, R., and Glickman, M. H. (2008). Chaperone-driven proteasome assembly. *Biochem Soc Trans* 36, 807–812.
- Rubin, D. M., Glickman, M. H., Larsen, C. N., Dhruvakumar, S., and Finley, D. (1998). Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J* 17, 4909–4919.
- Santangelo, G. (2006). Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews*.
- Santt, O. (2009). *Gid4p, the regulatory unit of a novel E3 ubiquitin ligase involved in carbohydrate metabolism in yeast*. Dissertation. (Stuttgart: 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., Schröder-Köhne, 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.
- Schork, S. M., 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. M., 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.
- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P., and Bork, P. (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic Acids Res* 28, 231–234.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 5857–5864.
- Schüle, T., Rose, M., Entian, K. D., Thumm, M., and Wolf, D. H. (2000). Ubc8p functions in catabolite degradation of fructose-1, 6-bisphosphatase in yeast. *EMBO J* 19, 2161–2167.
- 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.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850–858.
- Skowyra, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J., and Harper, J. W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91, 209–219.
- Stolz, A., and Wolf, D. H. (2010). Endoplasmic reticulum associated protein degradation: A chaperone assisted journey to hell. *Biochim Biophys Acta*.
- 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.
- Teichert, U., Mechler, B., Müller, 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.
- Thomas, G., and Hall, M. N. (1997). TOR signalling and control of cell growth. *Curr Opin Cell Biol* 9, 782–787.
- Thomas, G., Sabatini, D., and Hall, M. (2003). TOR: Target of Rapamycin (Current Topics in Microbiology and Immunology) (Vol 279) 1st ed. G. Thomas, D. M. Sabatini, and M. N. Hall, eds. (Springer).
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C. M. (2000). Recognition of the

- polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* 19, 94–102.
- Toth, C., and Coffino, P. (1999). Regulated degradation of yeast ornithine decarboxylase. *J Biol Chem* 274, 25921–25926.
- Tsang, C. K., Liu, H., and Zheng, X. F. S. (2010). mTOR binds to the promoters of RNA polymerase I- and III-transcribed genes. *Cell Cycle* 9, 953–957.
- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., et al. (2007). Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 26, 663–674.
- Vander Kooi, C. W., Ohi, M. D., Rosenberg, J. A., Oldham, M. L., Newcomer, M. E., Gould, K. L., and Chazin, W. J. (2006). The Prp19 U-box crystal structure suggests a common dimeric architecture for a class of oligomeric E3 ubiquitin ligases. *Biochemistry* 45, 121–130.
- Varshavsky, A. (1997). The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* 2, 13–28.
- Varshavsky, A. (1995). The N-end rule. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60, 461–478.
- 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.
- Voet, J. G. V. A. C. W. P. D. (2008). *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level 3rd Edition (Third Ed.)* 3e By Donald Voet, Judith G. Voet and Charlotte W. Pratt 2008.
- Wahren, J., and Ekberg, K. (2007). Splanchnic regulation of glucose production. *Annu Rev Nutr* 27, 329–345.
- Wang, H., Wang, L., Erdjument-Bromage, H., Vidal, M., Tempst, P., Jones, R. S., and Zhang, Y. (2004). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. *Nature* 431, 873–878.
- Weissman, A. M. (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 169–178.
- 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.
- Wolf, D. H. (2004). From lysosome to proteasome: the power of yeast in the dissection of proteinase function in cellular regulation and waste disposal. *Cell Mol Life Sci* 61, 1601–1614.
- Wolf, D. H., and Hilt, W. (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* 1695, 19–31.
- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471–484.
- Xie, Y., and Varshavsky, A. (1999). The E2-E3 interaction in the N-end rule pathway: the RING-H2 finger of E3 is required for the synthesis of multiubiquitin chain. *EMBO J* 18,

6832–6844.

- Yin, Z., Smith, R. J., and Brown, A. J. (1996). Multiple signalling pathways trigger the exquisite sensitivity of yeast gluconeogenic mRNAs to glucose. *Mol Microbiol* 20, 751–764.
- Zaman, S., Lippman, S. I., Zhao, X., and Broach, J. R. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* 42, 27–81.
- 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.
- Zheng, N., Schulman, B. A., Song, L., Miller, J. J., Jeffrey, P. D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D. M., Elledge, S. J., Pagano, M., et al. (2002). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 416, 703–709.