

**Die Glucose-induzierte Katabolitinaktivierung  
der Fructose-1,6-bisphosphatase  
der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*:  
Neue Komponenten ihres  
Ubiquitin-Proteasom-katalysierten Abbaus**

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

vorgelegt von  
Dipl.-Chem. Frank S. Josupeit  
aus Böblingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf  
Mitberichter: Priv.-Doz. Dr. Michael Thumm  
Tag der mündlichen Prüfung: 04.04.2003

Institut für Biochemie  
der Universität Stuttgart  
2003

# 1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	2
2	Abkürzungen.....	9
3	Einleitung.....	12
3.1	<i>S. cerevisiae</i> als eukaryoter Modellorganismus.....	12
3.2	Proteolyse-Systeme der Hefe.....	13
3.2.1	Die Vakuole.....	14
3.2.2	Das Proteasom.....	15
3.2.3	Das Ubiquitin-System.....	17
3.2.4	Ubiquitin-ähnliche Proteine.....	20
3.3	Die Katabolitinaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase.....	21
3.4	Zielsetzung der Arbeit.....	24
4	Material und Methoden.....	26
4.1	Material.....	26
4.1.1	Verwendete Stämme.....	26
4.1.1.1	<i>S. cerevisiae</i> -Stämme.....	26
4.1.1.2	<i>E. coli</i> -Stämme.....	31
4.1.2	Plasmide.....	31
4.1.3	Oligonukleotide.....	34
4.1.4	Wachstumsmedien.....	37
4.1.4.1	Hefemedien.....	37
4.1.4.1.1	Vollmedium YPD.....	37
4.1.4.1.2	Ethanolhaltiges Hungermedium YPEtOH.....	38
4.1.4.1.3	Acetathaltiges Hungermedium YPKG.....	38
4.1.4.1.4	Synthetisches Vollmedium CM.....	38
4.1.4.1.5	Synthetisches Hungermedium CMEtOH.....	39
4.1.4.1.6	Synthetisches Nährmedium CMGal.....	39
4.1.4.1.7	Mineralmedium MV.....	39
4.1.4.1.8	Mineralmedium MVohne.....	39
4.1.4.1.9	Medien für Pulse Chase-Analysen.....	39
4.1.4.1.10	Hungermedium 1%KAc.....	40
4.1.4.1.11	Chase-Medium 1%KAc+Met.....	40

---

4.1.4.2	Medien für <i>E. coli</i> -Kulturen.....	40
4.1.4.2.1	Vollmedium LB.....	40
4.1.4.2.2	LB <sub>Amp</sub> -Medium (zur Selektion auf Ampicillin-Resistenz).....	40
4.1.4.2.3	Transformationsmedium SOC.....	40
4.1.4.2.4	2 x YTAG-Medium (zur Expression von GST-Fusionsproteinen).....	41
4.1.5	Antikörper .....	41
4.1.6	Enzyme.....	42
4.1.7	Chemikalien .....	42
4.1.8	Kits .....	46
4.1.9	Geräte .....	46
4.2	Methoden.....	48
4.2.1	Wachstumsbedingungen.....	48
4.2.1.1	Dauerkulturen.....	48
4.2.1.2	Wachstumsbedingungen der Hefe.....	48
4.2.1.2.1	Induktion und Inaktivierung der FB Pase .....	48
4.2.1.2.2	Wachstumsbedingungen bei Ubiquitylierungsuntersuchungen .....	49
4.2.1.3	Wachstumsbedingungen von <i>E. coli</i> .....	50
4.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	50
4.2.2.1	Isolierung von DNA .....	50
4.2.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (boiling prep).....	50
4.2.2.1.2	Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe.....	51
4.2.2.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe.....	51
4.2.2.2	Transformation .....	52
4.2.2.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	52
4.2.2.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> durch Elektroporation .....	52
4.2.2.2.3	Transformation von Hefezellen nach der Lithiumacetat-Methode .....	52
4.2.2.3	Restriktionsverdau von DNA .....	53
4.2.2.4	DNA-Agarose-Gelelektrophorese.....	53
4.2.2.5	Gelextraktion von DNA .....	54
4.2.2.6	Ligation von DNA-Fragmenten .....	54
4.2.2.7	Genaustausch durch homologe Rekombination.....	54
4.2.2.8	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	54
4.2.2.9	Reinigung von PCR-Produkten.....	58
4.2.2.10	Southern-Blot-Analyse.....	59

---

4.2.2.10.1	Auftrennung der DNA-Fragmente .....	59
4.2.2.10.2	Transfer der DNA (Kapillar-Blot-Verfahren) .....	59
4.2.2.10.3	Hybridisierung und Detektion .....	60
4.2.2.11	Konzentrationsbestimmung von DNA .....	61
4.2.2.12	Plasmid-DNA-Sequenzierung .....	61
4.2.3	Zellbiologische und biochemische Methoden .....	61
4.2.3.1	Paarung haploider Stämme .....	61
4.2.3.2	Sporulation und Tetradendisektion .....	61
4.2.3.3	Bestimmung des Paarungstyps von Hefestämmen .....	62
4.2.3.4	Alkalische Lyse von Hefezellen .....	62
4.2.3.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	63
4.2.3.6	Western-Blot .....	64
4.2.3.6.1	Proteintransfer auf eine Membran .....	64
4.2.3.6.2	Detektion mit dem ECL™-System .....	64
4.2.3.7	Pulse-Chase-Analyse .....	65
4.2.3.7.1	Wachstumsbedingungen und radioaktive <i>in vivo</i> Markierung von Hefeproteinen .....	65
4.2.3.7.2	Zellaufschluss und Immunpräzipitation .....	65
4.2.3.7.3	SDS-PAGE und Detektion .....	66
4.2.3.8	GST-Interaktionsstudien .....	66
4.2.3.8.1	Wachstumsbedingungen, Expression in <i>S. cerevisiae</i> und nativer Zellaufschluss .....	66
4.2.3.8.2	GST-Pulldown mit GST-Fusionsproteinen exprimiert in <i>S. cerevisiae</i> .....	67
4.2.3.8.3	Wachstumsbedingungen, Expression in <i>E. coli</i> und Zellaufschluss .....	69
4.2.3.8.4	GST-Pulldown mit GST-Fusionsproteinen exprimiert in <i>E. coli</i> .....	70
4.2.3.9	Co-Immunopräzipitation .....	70
4.2.3.9.1	Wachstumsbedingungen und Probennahme .....	70
4.2.3.9.2	Zellaufschluss .....	71
4.2.3.9.3	Immunopräzipitation .....	72
4.2.3.10	Antikörperaufreinigung .....	72
4.2.3.10.1	Mit Hilfe des Deletionsstammes .....	72
4.2.3.10.2	Mit Hilfe einer Affinitätssäule .....	73
4.2.3.11	Ubiquitinierungsuntersuchungen .....	74
4.2.3.12	Zellfraktionierung .....	75

---

4.2.3.13	Subzelluläre Fraktionierung (Sucrosedichtegradient).....	76
4.2.3.14	Glyceringradient.....	77
4.2.3.15	FPLC .....	78
4.2.3.15.1	Wachstumsbedingungen und nativer Aufschluss.....	78
4.2.3.15.2	Auftrennung auf der Superose6-Säule .....	78
4.2.3.16	Indirekte Immunfluoreszenz.....	79
4.2.3.17	Kopplung eines Antikörpers an Protein A Sepharose.....	80
4.2.3.18	Vesikeltest .....	81
4.2.3.19	Überlebenstest .....	81
4.2.3.20	Proteinbestimmung nach Bradford.....	81
4.2.3.20.1	Herstellung der Bradford-Lösung: .....	81
4.2.3.20.2	Erstellung einer Eichgeraden: .....	82
4.2.3.20.3	Messung: .....	82
4.2.3.21	Anfärben von SDS-Gelen.....	83
4.2.3.21.1	Mit Coomassie-Staining.....	83
4.2.3.21.2	Mit Silver-Staining.....	83
4.2.3.22	Überprüfung der Membranassoziation von Proteinen .....	84
4.2.3.23	Gesamtproteinturnover.....	85
4.2.3.24	Herstellung polyklonaler Peptidantikörper .....	86
4.2.3.24.1	Herstellung eines polyklonalen Peptidantikörpers gegen Vid24p .....	86
4.2.3.24.2	Herstellung eines polyklonalen FBPase-Antikörpers .....	86
5	Ergebnisse .....	88
5.1	Untersuchung des FBPase-Abbaus unter Bedingungen nach H.L. Chiang .....	88
5.1.1	Derepressionszeit 48 h .....	89
5.1.2	Derepressionszeit 65 h .....	90
5.1.3	Zellfraktionierung.....	93
5.1.4	Sucrose-Gradienten .....	94
5.1.5	Überlebenstest .....	95
5.1.6	Derepressionszeit 5 h bzw. 16 h.....	96
5.2	Suche nach neuen Komponenten des proteasomalen FBPase-Abbaus.....	97
5.2.1	Überprüfung des Einflusses von Chaperonen aus der Hsp70-Familie.....	97
5.2.2	Überprüfung des Einflusses von Cdc48p.....	99
5.2.3	Überprüfung des Einflusses von Proteinen des Ufd-Weges .....	101
5.2.4	Überprüfung des Einflusses von UbA-Domänen-Proteinen .....	103

---

5.2.5	Überprüfung des Einflusses von Autophagozytosemutanten.....	104
5.2.6	Suche nach dem E3-Enzym des proteasomalen Abbaus.....	105
5.2.6.1	Vorgehensweise: Datenbanksuche nach möglichen E3-Enzymen.....	105
5.2.6.2	Überprüfung des FB Pase-Abbaus in Deletionsmutanten der möglichen E3-Enzyme.....	110
5.2.6.3	Die Proteine Hex3p und Slx8p.....	113
5.2.6.4	Analyse der Katabolitdegradation der FB Pase in <i>hex3-</i> und <i>slx8-</i> Deletionsmutanten.....	114
5.2.6.5	Herstellung einer <i>hex3Δ slx8Δ</i> -Doppelmutante .....	115
5.2.6.6	Analyse der Katabolitdegradation der FB Pase in einer <i>hex3Δ slx8Δ</i> -Doppelmutante .....	116
5.2.7	Pulse Chase-Analysen des FB Pase-Abbaus in Deletionsmutanten neu gefundener <i>GID</i> -Gene .....	117
5.2.8	Überprüfung des Einflusses der Proteine Fyv10p und YBL049wp auf die Katabolitdegradation der FB Pase.....	119
5.2.9	Überprüfung des Einflusses der von der Gruppe um H.L. Chiang gefundenen Proteine Vid22p, Cpr1p und Vid27p auf den FB Pase-Abbau .....	120
5.2.10	Überprüfung des Einflusses des Proteins Hxk2p.....	122
5.3	Das Protein Gid2p.....	122
5.3.1	Der Turnover von Gid2p .....	123
5.3.2	Herstellung eines <i>gid2</i> -Deletionsstammes im WCG4a-Hintergrund.....	123
5.3.3	Test der <i>gid2Δ</i> -Mutante auf den Autophagozytosephänotyp.....	125
5.3.4	Gesamtproteinturnover in einem <i>gid2</i> -Deletionsstamm .....	126
5.3.5	Lokalisierung von Gid2p durch indirekte Immunfluoreszenz .....	128
5.3.6	Liegt Gid2p in einem Komplex vor?.....	129
5.3.6.1	Bestimmung der Größe von Gid2p mit Hilfe einer Superose6-Säule.....	129
5.3.6.2	Bestimmung der molekularen Masse von Gid2-Ha <sub>3</sub> mit Hilfe eines Glycerin-Gradienten.....	131
5.4	Das Protein Vid24p.....	133
5.4.1	Herstellung chromosomal getaggtter Versionen von Vid24p.....	134
5.4.1.1	Einführung eines C-terminalen Ha-Tags.....	134
5.4.1.1.1	Herstellung eines C-terminalen Ha-Tags .....	134
5.4.1.1.2	Überprüfung des Stammes mit Hilfe eines Southern Blots.....	135
5.4.1.1.3	Funktionalitäts- und Expressionsprüfung von Vid24-Ha <sub>3</sub> .....	136

---

5.4.1.2	Konstruktion eines N-terminalen HA-Tags an Vid24p.....	137
5.4.2	Herstellung einer <i>vid24</i> -Deletionsmutante.....	138
5.4.3	Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus im <i>vid24</i> -Deletionsstamm .....	139
5.4.4	Vid24p-Turnover.....	139
5.4.4.1	Turnover-Messung in Wildtyp-Stämmen.....	140
5.4.4.2	Abbau von Vid24p in Mutantenstämmen .....	140
5.4.4.3	In einer Pulse Chase-Analyse.....	142
5.4.5	Ubiquitinierung der FBPase im <i>vid24</i> -Deletionsstamm.....	143
5.4.6	Test der <i>vid24</i> -Deletionsmutante auf einen Autophagozytosephänotyp.....	144
5.4.7	Überprüfung der Membranassoziation.....	145
5.5	Das Protein Ubc8p .....	145
5.5.1	Messung des Ubc8p-Abbaus.....	145
5.6	Interaktionsstudien .....	147
5.6.1	GST-Pulldown-Experimente.....	147
5.6.1.1	Expression von GST-Gid2p in <i>E. coli</i> .....	148
5.6.1.2	Expression von GST-Vid24p in <i>E. coli</i> .....	148
5.6.1.2.1	Herstellung des GST-Vid24p-Expressionsplasmids .....	148
5.6.1.2.2	Expression von GST-Vid24p in <i>E. coli</i> .....	148
5.6.1.3	Expression von GST-Ubc8p in <i>E. coli</i> .....	149
5.6.1.3.1	Herstellung des GST-Ubc8p-Expressionsplasmids .....	149
5.6.1.3.2	Expression von GST-Ubc8p.....	149
5.6.1.3.3	GST-Pulldown.....	150
5.6.1.4	Expression von GST-Vid24p in <i>S. cerevisiae</i> .....	151
5.6.1.4.1	Funktionalitätsprüfung des Plasmids .....	151
5.6.1.4.2	Resultate des GST-Pulldown .....	152
5.6.2	Co-Immunopräzipitationen .....	154
5.6.2.1	Herstellung der benötigten Stämme .....	155
5.6.2.2	Überprüfung der Stämme mit Hilfe eines Southern-Blots.....	155
5.6.2.3	Resultate der Co-Immunopräzipitationen .....	157
6	Diskussion.....	159
7	Zusammenfassung.....	172
8	Abstract .....	174
9	Literaturverzeichnis.....	176
10	Anhang .....	186

Inhaltsverzeichnis	8
--------------------	---

---

Danksagung.....	188
-----------------	-----

Veröffentlichungshinweis .....	189
--------------------------------	-----

## 2 Abkürzungen

(m)A	(Milli-) Ampere
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
Ade	Adenin
ADP	Adenosin-diphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	engl. „anaphase promoting complex“
API	Aminopeptidase I
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
ATP	Adenosin-triphosphat
ATPase	Adenosin-triphosphatase
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serum-Albumin (engl. „bovine serum albumin“)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CM	synthetisches Vollmedium
CPY	Carboxypeptidase yscY
Cys	Cystein
(k)Da	(Kilo-) Dalton (1 Da = 1 g / mol)
ddH <sub>2</sub> O	zweifach deionisiertes Wasser
d.h.	das heißt
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNAase	Desoxyribonuclease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat (N = Adenosin, Guanosin, Cytidin, Thymidin)
DTT	Dithiotreitol
E1-Enzym	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2-Enzym	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3-Enzym	Substrat-erkennendes Enzym, Ubiquitin-Ligase
ECL	engl. „Enhanced Chemoluminescence“
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-dinatriumsalz
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Etc.	etcetera
EtOH	Ethanol
(μ)Farad	(Mikro-) Farad
Fas	Fettsäuresynthase
FBP	Fructose-1,6-diphosphat
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
5-FOA	5-Fluoro-orotsäure

---

(m, $\mu$ )g	(Milli-, Mikro-) Gramm
Gal2p	Galaktosepermease
Glc	Glucose
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
Ha	Haemagglutinin
Ha-Ub	epitopmarkiertes Ubiquitin, Ha-Ubiquitin
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
His	Histidin
HOAc	Essigsäure
HRPO	Meerrettich-Peroxidase (engl. „horseradish peroxidase“)
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilobasenpaare
<i>KAN</i>	Kanamycin-resistenz Gen
(m, $\mu$ )l	(Milli-, Mikro-) Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
Lsg.	Lösung
(m)M	(milli-) molar
MeOH	Methanol
Met	Methionin
min	Minute
MV	Mineralmedium
NC	Nitrocellulose
nm	Nanometer
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
ORF	offener Leserahmen (engl. „open reading frame“)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PGK	3-Phosphoglyceratkinase
PGPH	peptidyl-glutamyl-peptid-hydrolysierend
PIPES	Piperazin-N,N'-bis[2-ethansulfonsäure]
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Pro	Prolin
RING	engl. „really interesting new gene“
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SCF	Skp1p/Cullin/F-Box-Komplex
SDS	Natriumdocecylsulfat
<i>S. p.</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
TAE	Tris / Acetat mit EDTA
TBS	engl. „Tris buffered saline“
TBS-T	engl. „Tris buffered saline with Tween 20“
TCA	Trichloressigsäure

---

TE	Tris mit EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan
Trp	Tryptophan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
u.a.	unter anderem
Ub	Ubiquitin / Ubiquityl-Rest
UbA	engl. „ubiquitin associated“
UbL	engl. „ubiquitin-like“
Upm	Umdrehungen pro Minute
Ura	Uracil
usw.	und so weiter
V	Volt
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Massenprozent
WT	Wildtyp
WT-Ub	Wildtyp-Ubiquitin
x g	x-fache Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
YPD	Glucose-Vollmedium
z.B.	zum Beispiel

## 3 Einleitung

### 3.1 *S. cerevisiae* als eukaryoter Modellorganismus

In höheren Organismen ist die Untersuchung komplexer zellulärer Prozesse schwierig. Deshalb wurde ein Modellsystem für die eukaryontische Zelle gesucht, welches die Untersuchung solcher Prozesse mit biochemischen, zell- und molekularbiologischen Mitteln erlaubt und leicht zugänglich ist. Als idealer Organismus hierfür hat sich die einzellige Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* herausgestellt (Guthrie and Fink, 1991), welche dem Menschen schon seit Jahrtausenden zur Herstellung von Nahrungs- und Genussmitteln wie Brot und Bier dient. Im ältesten biotechnologischen Verfahren überhaupt, der alkoholischen Gärung, führt sie den anaeroben Abbau von Glucose zu Ethanol und Kohlendioxid durch. Neben diesem anaeroben Stoffwechselweg kann die Hefe auch einen aeroben Stoffwechselweg durchlaufen, bei welchem bei ausreichender Sauerstoffzufuhr die Glucose vollständig zu Kohlendioxid oxidiert wird.

Der Aufbau dieser Hefezelle ist dem Aufbau von Zellen komplexerer Organismen sehr ähnlich und auch die Hefeproteine sind mit den entsprechenden Proteinen höherer Organismen funktionell und strukturell nahe verwandt, so dass sich Ergebnisse der Hefeforschung oftmals auch auf Säugerzellen übertragen lassen. Grundlegende zelluläre Vorgänge wie Genregulation, Proteinsynthese und -abbau und Sekretion, um nur einige wenige zu nennen, sind von der Hefe bis hin zu Säugerzellen in hohem Maße konserviert. Bei der Untersuchung dieser und anderer Prozesse bietet die Hefezelle eine ganze Reihe von Vorteilen gegenüber einer Säugerzelle:

Hefezellen können sowohl auf Agarplatten als auch in Flüssigkulturen relativ einfach kultiviert werden, und das relativ schnelle Wachstum (Hefezellen verdoppeln sich etwa alle 90 min) ermöglicht die Anzucht größerer Zellmengen innerhalb relativ kurzer Zeit (1 – 2 Tage). Durch das relativ einfache DNA-Replikationssystem der Hefe bieten sich vielfältige Möglichkeiten zur Genom-Manipulation mit, im Vergleich zu Säugerzellen, sehr einfachen Mitteln (Guthrie and Fink, 1991). Plasmide können unter Selektionsdruck in der Hefezelle stabil gehalten werden. Für die Selektion werden meist auxotrophe Marker verwendet. Dafür werden Stämme verwendet, welche Mutationen in Genen tragen, die für die Biosynthese von Nucleinbasen oder Aminosäuren benötigt werden (Guthrie and Fink, 1991). Ferner sind eine Vielzahl weiterer biochemischer, zell- und molekularbiologischer Methoden für die Hefe

etabliert. Das Genom der Hefe ist mit 14000 kb auf 16 Chromosomen relativ klein. Es ist nur ca. dreimal größer als das von *E. coli* (4000 kb), aber deutlich kleiner als das menschliche Genom (3500000 kb) (Stryer, 1995). Seit 1997 ist das komplette Hefegenom mit etwa 6000 Genen bekannt und im Internet frei zugänglich (Goffeau et al., 1997), wodurch das molekularbiologische Arbeiten wesentlich vereinfacht wurde. Für etwa die Hälfte der Gene ist eine biochemische Funktion bekannt.

Ein weiterer Vorteil von *S. cerevisiae* ist ihr haplodiplobiontischer Entwicklungszyklus. Sie kann sowohl in haploider als auch diploider Form vorliegen. Haploide Zellen können durch Paarung in diploide Zellen umgewandelt werden. Umgekehrt erfolgt die Umwandlung zu haploiden Zellen über Sporulation. Im Zuge der Mitose vermehren sich sowohl haploide als auch diploide Zellen unter optimalen Kulturbedingungen. Dabei bilden die Zellen Knospen, in welche die replizierten Chromosomen und Organellen eingelagert werden. Die Knospen trennen sich danach von der Mutterzelle. Die Tochterzelle wächst bis zur Größe der Mutterzelle heran und beginnt ihrerseits dann einen neuen Knospungszyklus.

Bei haploiden Zellen der Hefe unterscheidet man wie bei höheren Tieren und Pflanzen zwei Geschlechtstypen, welche mit  $a$  und  $\alpha$  bezeichnet und durch den „MAT-Locus“ genannten Genort bestimmt werden. Die Kreuzung zweier haploider Zellen unterschiedlicher Geschlechtstypen ergibt eine diploide Zelle. Diese durchläuft bei Nährstoffmangel eine Meiose. Dabei bildet die Zygote einen Ascus mit 4 haploiden Sporen. Jeweils 2 dieser Sporen weisen dann den Paarungstyp  $a$  und die anderen den Paarungstyp  $\alpha$  auf.

In Medien mit ausreichender Glucosemenge steigt die Zahl der Hefezellen zunächst exponentiell an (sog. logarithmische Phase). Wird allerdings die Glucosemenge limitierend, so findet keine weitere Vermehrung mehr statt und die Zellen treten in die stationäre Phase ein (Rose and Harrison, 1987).

## 3.2 Proteolyse-Systeme der Hefe

Lebende Zellen zeichnen sich durch ein hochkomplexes System von katabolen und anabolen Stoffwechselprozessen aus. Für die Aufrechterhaltung dieses Systems und dem damit verbundenen Überleben der Zelle, ist die Anpassung der Enzymausstattung und des Metabolismus an sich ständig ändernde Umweltbedingungen unerlässlich. Dies ist nur durch eine strenge und präzise Regulation von Enzymaktivitäten und Enzymkonzentrationen möglich. Hierfür stehen den Zellen verschiedene Mechanismen zur Verfügung. Durch

Variation der Enzymaktivität und Affinität zum Substratprotein bzw. –molekül durch z.B. allosterische Wechselwirkungen, Bindung von Molekülen (z.B. ATP, GTP) oder kovalente Modifikationen, meistens Phosphorylierungen, kann eine schnelle Anpassung stattfinden. Alle diese Möglichkeiten sind reversibel, können also bei einer Änderung der Bedingungen wieder rückgängig gemacht werden. Eine langsamere, allerdings auch nachhalterige Methode der Regulation ist eine Beeinflussung der Proteinmenge. Diese kann entweder durch eine Änderung der Neusynthese, welche auf der Ebene der Transkription und Translation reguliert werden kann, oder den Proteinabbau gesteuert werden.

Der Proteinabbau dient der Eliminierung von Proteinen, die nicht mehr funktionsfähig sind, deren biologische Funktionen nicht mehr länger benötigt werden oder deren Anwesenheit bei bestimmten Bedingungen schädlich ist. Die wichtigsten Abbausysteme der Hefe sowie aller Eukaryontenzellen sind die Vakuole (Lysosom) und das im Cytosol und im Zellkern vorkommende Proteasom.

### 3.2.1 Die Vakuole

In Eukaryoten entfällt ein beträchtlicher Teil der intrazellulären Proteolyse auf das Lysosom. Die Vakuole der Hefe *S. cerevisiae*, die dem Lysosom höherer Eukaryoten entspricht, ist ein saures, von einer Membran eingehülltes Kompartiment, dem vor allem die unspezifische Degradation von Proteinen unter Nährstoffbegrenzung sowie langlebiger Proteine zugeschrieben wird (Jones, 1984; Klionsky and Emr, 1990; Teichert et al., 1989). Über Transportwege wie die Autophagocytose (Egner et al., 1993; Takeshige et al., 1992) und die Endocytose (Riezman, 1985; Riezman, 1993) werden Makromoleküle (Proteine, Lipide, Polysaccharide, usw.) und ganze Organellen (z.B. Mitochondrien) (Thumm and Wolf, 1998) in die Vakuole befördert und dort hydrolysiert. Eine Vielzahl von unspezifischen Proteasen gelangt über den sekretorischen Transportweg in dieses Organell. Sie werden innerhalb der Vakuole von Proteinasen gereift (Klionsky et al., 1990). Zu den wichtigsten und aktivsten vakuolären Enzymen gehören die Proteinase yscA und yscB. Sie sind an der Reifung ihrer inaktiven Vorläufermoleküle und vieler anderer Hydrolasen beteiligt. Weitere Beispiele vakuolärer Proteinase sind die Carboxy-peptidasen yscY und yscS und die Aminopeptidase I. Letztere bildet eine Ausnahme, da sie nicht über den sekretorischen Weg sondern über Autophagozytose oder den cvt-Weg in die Vakuole transportiert und dort gereift wird (Baba et al., 1997; Scott et al., 1997; Thumm, 2000). Durch die Kompartimentierung der

hochaktiven Proteinasen ist eine direkte strenge Kontrolle dieser Enzyme nicht nötig. Die Kontrolle findet im Rahmen des Imports von abzubauenen Molekülen in die Vakuole statt. Neben dem Protein- und Makromolekülabbau dient die Vakuole noch als Speicherorganell für Aminosäuren und zahlreiche Ionen (z.B. Kalzium- und Phosphationen). Außerdem spielt sie eine wichtige Rolle bei der Sporulation, der Osmoregulation und der pH-Homeostase (Klionsky et al., 1990).

### 3.2.2 Das Proteasom

Das Proteasom ist ein multimerer Protease-Komplex, der sowohl im Zytosol als auch im Zellkern vorkommt. Es besteht aus dem ca. 700 kDa großen und proteolytisch aktiven 20S-Proteasom, einem zylindrischen Kernpartikel, und zwei regulatorischen 19S-Partikeln, die sich an beiden Enden des Zylinders befinden. Zusammen bilden die 3 Partikel das 26S-Proteasom mit einem Molekulargewicht von ca. 1700 kDa (Coux et al., 1996; Hilt and Wolf, 1995; Hilt and Wolf, 1996). Die Bezeichnung 19S, 20S und 26S beziehen sich auf die Sedimentationskonstanten der einzelnen Partikel in Svendberg-Einheiten.

Das 20S-Proteasom besteht aus 14 verschiedenen Untereinheiten. 4 Ringe mit je 7 Untereinheiten sind dabei übereinander zu einem symmetrischen Hohlzylinder angeordnet. Die beiden inneren bestehen aus  $\beta$ -Untereinheiten, welche auch die katalytischen Zentren enthalten, und die äußeren aus  $\alpha$ -Untereinheiten (Groll et al., 1997; Hilt and Wolf, 1995). Sämtliche Untereinheiten sind für das Überleben der Hefe essentiell. Im Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* ist das 20S-Proteasom ähnlich aufgebaut. Allerdings bestehen hier die Ringe aus jeweils 7 identischen  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheiten (Lowe et al., 1995). In Kombination mit Mutantanalysen zeigten Strukturanalysen an diesem Proteasom, dass es sich beim 20S-Proteasom um eine Threoninprotease und damit um einen neuartigen Proteasotyp handelt (Lowe et al., 1995; Seemuller et al., 1995).

Die katalytische Aktivität des 20S-Proteasoms wird durch die drei  $\beta$ -Untereinheiten Pup1p, Pre2p und Pre3p ausgeübt (Heinemeyer et al., 1997). Diese drei weisen chymotrypsin-ähnliche (Pep2p), trypsin-ähnliche (Pup1p) oder peptidyl-glutamyl-peptid-hydrolysierende (PGPH, Pre3p) Aktivitäten auf (Gerards et al., 1998; Groll et al., 1999). Die katalytischen Zentren sind im Inneren des Hohlzylinders lokalisiert, in den auf Grund der Größe des Durchmessers ihrer Öffnungen an beiden Seiten nur entfaltete Proteine gelangen können (Groll et al., 1997). In einem ATP-unabhängigen Prozess kann das 20S-Proteasom *in vitro*

nicht gefaltete Peptidketten in kleinere Peptide mit einer durchschnittlichen Länge von 8 bis 10 Aminosäuren spalten (Baumeister et al., 1998; Heinemeyer et al., 1997).

Die *in vivo*-Substrate von 26S-Proteasomen sind jedoch in der Regel gefaltete Proteine, welche vorher durch eine Polyubiquitinkette markiert wurden (Pickart, 2000) (vgl. auch Abschnitt 3.2.3). Die an beiden Seiten des Kernpartikels assoziierten 19S-Partikel übernehmen die Funktion der Erkennung, Bindung und Entfaltung der ubiquitin-markierten Substratproteine (DeMartino et al., 1994; Glickman et al., 1998b). Das 19S-Partikel besteht aus 18 Untereinheiten, von denen 6 ATPasen sind (Rpt1p bis Rpt6p). Diese bilden einen Ring über der Öffnung des 20S-Partikels und vermitteln über ATP-Hydrolyse die Triebkraft für die Entfaltung des Substrates und seine Translokation in das Kernpartikel (Hoffman and Rechsteiner, 1994; Seeger et al., 1997) und weisen somit auch Chaperon-Aktivität auf. Die 6 ATPasen bilden zusammen mit Rpn1p und Rpn2p die sogenannte Basis („Base“) des 19S-Partikels. Die übrigen Untereinheiten (Rpn3 – 12) bilden den sogenannten Deckel („Lid“) (Glickman et al., 1998a). Es wurde herausgefunden, dass die „Base“ im allgemeinen und das Rpt5p im besonderen für die Erkennung und wohl auch Bindung der Polyubiquitinketten zuständig ist (Lam et al., 2002). Die nicht ATPase-Untereinheiten, Rpn1p bis Rpn12p, sind sehr unterschiedlicher Natur und zeigen wenig Homologien zu anderen Proteinen (Glickman et al., 1998b). Zumindest eine der Untereinheiten wurde als ein deubiquitinierendes Enzym identifiziert (Lam et al., 1997).

Das Proteasom erfüllt in der Zelle eine Vielzahl essentieller Funktionen. Dazu gehören u.a. die stressabhängige und Ubiquitin-vermittelte Proteolyse (Heinemeyer et al., 1991; Hilt et al., 1993), der Abbau metabolischer Enzyme, wie z.B. Fructose-1,6-bisphosphatase (Schork et al., 1994a; Schork et al., 1995), der Abbau von Transkriptionsfaktoren, wie dem MAT $\alpha$ -Repressor (Chen et al., 1993; Richter-Ruoff et al., 1994), die Proteolyse falsch gefalteter lumenaler Proteine des Endoplasmatischen Reticulums (ER) (z.B. CPY) oder Membranproteine (z.B. Pdr5p), welche innerhalb des ER erkannt und über einen retrograden Transport (zentrale Komponente: Sec61p-Translokon) ins Cytoplasma zurück befördert werden (Deak and Wolf, 2001; Hiller et al., 1996; Plemper et al., 1997; Plemper et al., 1998; Plemper and Wolf, 1999), sowie die Beteiligung an der Zellzykluskontrolle (Glutzer et al., 1991; Nasmyth, 1993; Richter-Ruoff and Wolf, 1993).

### 3.2.3 Das Ubiquitin-System

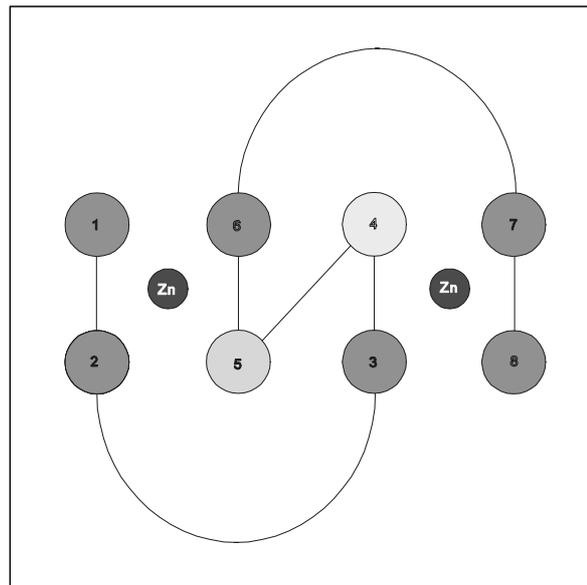
Das konservierte, 76-Aminosäuren große Polypeptid Ubiquitin erfüllt essentielle Funktionen in Eukaryoten über seine kovalente Kopplung an intrazelluläre Proteine (Hershko and Ciechanover, 1998; Hochstrasser, 1996). Mit einer polymeren Kette von Ubiquitin markierte Proteine werden vom 26S-Proteasom als Substrate erkannt und abgebaut (Chau et al., 1989; Hershko and Ciechanover, 1998; Hochstrasser, 1996), wohingegen bestimmte Substratproteine, die nur mit einem oder wenigen Ubiquitinmolekülen markiert werden, Ziele für Endozytose darstellen und letztendlich in der Vakuole abgebaut werden (Hicke, 1999). Durch Ubiquitinierung werden eine Vielzahl kritischer zellulärer Prozesse geregelt, häufig durch einen nachfolgenden selektiven Abbau eines regulatorischen Proteins. Das Fortschreiten des Zellzyklus (Koepp et al., 1999), die Immunantwort (Ghosh et al., 1998) und die Antigenpräsentation (Rock and Goldberg, 1999) sind nur ein paar der vielen Prozesse, an denen die Ubiquitin / Proteasom-abhängige Proteolyse beteiligt ist. Es verwundert nicht, dass eine Funktionsstörung in der Regulation der Ubiquitin-abhängigen Proteolyse damit in Verbindung gebracht wird, eine Ursache für Krebs (Bignell et al., 2000; Joazeiro et al., 1999; Loda et al., 1997; Maxwell et al., 1999; Scheffner et al., 1990; Waterman et al., 1999) und z.B. einiger erblicher Krankheiten (Kishino et al., 1997; Lam et al., 2000; Matsuura et al., 1997; Maxwell et al., 1999; Saigoh et al., 1999; Shimura et al., 2000; Staub et al., 1997; van Leeuwen et al., 1998) zu sein. Abbau ist nicht das ausschließliche Schicksal von Ubiquitin-markierten Proteinen. Die Ubiquitinierung reguliert auch Prozesse durch Mechanismen, die anscheinend nichts mit Proteolyse zu tun haben. Zu diesen Prozessen zählen ribosomale Funktionen (Spence et al., 2000), postreplikationale DNA-Reparatur (Hofmann and Pickart, 1999; Spence et al., 1995), die Initiierung der Immunantwort (Deng et al., 2000) und die Funktion bestimmter Transkriptionsfaktoren (Kaiser et al., 2000).

Eine Ubiquitinierung resultiert in der Regel in der Ausbildung einer Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus des Ubiquitins (G76) und der  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrestes des Substratmoleküls. Diese Reaktion erfordert den schrittweisen Einsatz dreier Enzyme. Zuerst bildet das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 (in *S. cerevisiae* Uba1p) unter ATP-Verbrauch mit der Carboxylgruppe des G76 eine Thioesterbindung aus (McGrath et al., 1991). Dadurch wird der C-Terminus von Ubiquitin (Ub) für nucleophile Angriffe aktiviert (Pickart, 2001). Im zweiten Schritt wird das Ub auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 (Ubc1p – Ubc8p, Ubc10p, Ubc11p und Ubc13p) übertragen und ebenfalls über eine Thioesterbindung gebunden (Jentsch et al., 1990). Im dritten Schritt schließlich wird mit Hilfe

einer Ubiquitin-Protein-Ligase (E3) das Ub auf die  $\epsilon$ -Aminogruppe eines Lysinrestes des Substratmoleküls übertragen (Pickart, 2001). Diese Übertragung kann entweder, durch das E3 vermittelt, direkt vom E2 aus erfolgen oder über eine Übertragung des Ub vom E2 auf das E3 und dann auf das Substratmolekül vonstatten gehen. In jedem Fall spielt das E3 eine zentrale Rolle in der Substraterkennung und sorgt somit für die hohe Spezifität des Systems (Hershko and Ciechanover, 1998). Die Homologie der E3s untereinander ist nicht sehr hoch und viele E3-Enzyme sind für ein oder wenige Substrate spezifisch. Dieser Mechanismus erfolgt bei allen Ubiquitinierungen, unabhängig davon, was nachfolgend mit den ubiquitinmarkierten Proteinen passiert. Um ein Protein für den proteasomalen Abbau zu markieren, muss ein Polyubiquitinkette aus mindestens 4 Ubs angehängt werden. Dazu wird der oben aufgeführte Mechanismus mindestens 3 weitere Male durchlaufen, wobei nun das Ub an die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysinrestes 48 (K48) des zuvor angehängten Ubiquitins übertragen wird (Chau et al., 1989). Die Affinität einer Ub<sub>4</sub>-Kette zum Proteasom ist mehr als 100-fach höher als einer Ub<sub>2</sub>-Kette, wohingegen die Affinität einer Ub<sub>12</sub>-Kette nur 10 mal höher ist als von Ub<sub>4</sub> (Pickart, 2000; Thrower et al., 2000). Polyubiquitinierte Substrate werden vom 26S-Proteasom erkannt, entfaltet und im Innern in kleinere Peptide gespalten. Die Polyubiquitinkette wird durch verschiedene Deubiquitinierungsenzyme (sogenannte Ubps) abgespalten und in einzelne Ubs zerlegt. So kann die Zelle das Ubiquitin wieder verwenden.

Die Familie der E3-Enzyme kann in 2 Gruppen eingeteilt werden, nämlich die HECT-Domänen-E3-Proteine und die RING-E3-Proteine (Jackson et al., 2000). HECT-Domänen-E3s kommen in Eukaryoten von Hefe bis zum Menschen vor und zeichnen sich durch eine 350 Aminosäuren große HECT-Domäne aus („homologous to E6-AP C terminus“), die erstmals im humanen E6-AP-Protein gefunden wurde (Scheffner, 1998). In Hefe gibt es 5 HECT-E3s: Hul4p, Hul5p, Rsp5p, Tom1p und Ufd4p. Diese Gruppe von E3s bildet Thioester-Bindungen mit Ubiquitin und überträgt dieses anschließend auf ihr Substrat (Smith et al., 1996).

Die wesentlich zahlreichere Klasse der RING-E3-Proteine zeichnet sich durch einen sogenannten RING-Finger aus, einer Domäne aus 6 Cysteinen und 2 Histidinen (RING-H2) oder 7 Cysteinen und einem Histidin (RING-HC). Von diesen Aminosäuren werden 2 Zinkionen komplexiert (Jackson et al., 2000) (vgl. Abbildung 3-1).



**Abb. 3-1:** Eine schematische Darstellung der räumlichen Struktur der RING-Finger-Domäne. Die Aminosäure 5 ist in RING-H2-Motiven ein Histidin und in RING-HC-Motiven ein Cystein. Die Aminosäure 4 ist immer ein Histidin, die übrigen (1 – 3 und 6 – 8) allesamt Cysteine (Jackson et al., 2000).

Der RING-Finger wurde erstmals 1993 als ein dem Zink-Finger verwandtes Sequenzmotiv beschrieben und steht für „really interesting new gene“ (Freemont, 1993). Inzwischen wurden in Hefe fast 40 Proteine indentifiziert, die eine RING-Domäne aufweisen. Obwohl es sich bei vielen davon um E3-Enzyme handelt, kann nicht definitiv gesagt werden, ob jedes RING-Finger-Protein ein E3 ist, da der Wirkungsmechanismus dieses Motivs noch weitgehend unklar ist. Ring-E3s bilden kein Thioester-Intermediat mit Ubiquitin, sondern vermitteln indirekt die Übertragung des Ub vom E2 aus auf das Substrat (Jackson et al., 2000; Joazeiro and Weissman, 2000). Dies bedingt eine Affinität und Spezifität sowohl gegenüber dem Substrat als auch gegenüber dem entsprechenden E2.

Neben eigenständigen, monomeren RING-E3s (z.B. Ubr1p in Hefe), existieren auch multimere E3-Komplexe, die jeweils eine RING-Finger-Komponente enthalten (Tyers and Willems, 1999). Zu diesen gehört der SCF-Komplex („Skp1p / Cullin / F-Box“) mit dem RING-Finger-Protein Hrt1p (Deshaies, 1999), sowie der APC-Komplex („anaphase promoting complex“) mit dem RING-Finger-Protein Apc11p, welcher eine entscheidene Rolle im Zellzyklus spielt (Zachariae and Nasmyth, 1999). Ein weiterer, dem SCF-Komplex strukturell verwandter E3-Komplex ist die von Hippel-Lindau (VHL)-Elongin B-Elongin C (VBC) Ubiquitin-Ligase, die den VHL-Tumorsupressor enthält, welcher bei der von Hippel-Lindau Krankheit inaktiviert vorliegt (Deshaies, 1999; Kaelin and Maher, 1998). Für die biologische Aktivität der RING-E3s ist die Integrität des RING-Fingers essentiell, sowohl für die Fähigkeit zur Autoubiquitinierung *in vitro* als auch in vielen Fällen für eine Wechselwirkung mit dem entsprechenden E2-Enzym (Jackson et al., 2000; Joazeiro and

Hunter, 2000). So konnte z.B. eine direkte Interaktion zwischen Ubr1p und Ubc2p (Xie and Varshavsky, 1999), sowie zwischen dem humanen E3 c-Cbl und UbcH7 (Zheng et al., 2000) bzw. dem humanen E3 AO7 und UbcH5 (Lorick et al., 1999) nachgewiesen werden. Dass der RING-Finger im APC die entscheidende Komponente für die Ubiquitinierung ist, konnte dadurch gezeigt werden, dass für die Bildung von Polyubiquitinketten *in vitro* die Komponenten Apc11p, Ubc4p und Uba1p ausreichend sind (Gmachl et al., 2000).

### 3.2.4 Ubiquitin-ähnliche Proteine

Außer Ubiquitin gibt es weitere Proteine ähnlicher Größe, in Hefe u.a. Smt3p und Rub1p, welche analog zu Ubiquitin an Lysinreste von Substratproteinen gebunden werden können und eine etwa 50 %ige Homologie zu Ubiquitin aufweisen. Diese Markierung, bei der nur ein Molekül auf das Substrat übertragen wird (Hochstrasser, 2000; Jentsch and Pyrowolakis, 2000), ist im Gegensatz zur Ubiquitinierung allerdings kein Abbausignal, sondern dient dem Schutz potentieller Substratmoleküle vor Ubiquitinierung oder der Regulation der Aktivität von Enzymen (Furukawa et al., 2000; Lammer et al., 1998). Um ihre Aktivität gegenüber dem Substrat zu erhöhen und sie vor Selbstubiquitinierung zu schützen, werden insbesondere bestimmte E3-Enzyme mit Smt3p modifiziert. Eine Entfernung des Smt3p-Restes hat dann einen Abbau des E3-Enzyms und dadurch eine Stabilisierung des Substrates zur Folge. Als Beispiel hierfür kann man das humane E3 Mdm2 anführen (Melchior and Hengst, 2000).

Weiterhin gibt es noch einige andere Ubiquitin-ähnliche Proteine, die zwar wesentlich größer als Ubiquitin sind, dafür aber am Aminoterminus eine starke Homologie zu Ub (UbL-Domäne) und im carboxyterminalen Bereich eine sog. UbA-Domäne aufweisen (Jentsch and Pyrowolakis, 2000). Während die UbL-Domäne mit dem Proteasom interagiert, weist die UbA-Domäne die Fähigkeit auf, an Polyubiquitinketten zu binden. Dies legt die Vermutung nahe, dass diese Proteine am Transport von Substraten zum Proteasom beteiligt sind. In der Hefe sind dies zum einen Rad23p, welches eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielt (Schauber et al., 1998), und zum anderen Dsk2p. Ebenfalls eine UbA-Domäne besitzt die nicht-essentielle proteasomale Untereinheit Rpn10p.

### 3.3 Die Katabolitinaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase

In Zellen, die auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Ethanol oder Acetat wachsen, wird die zum Überleben notwendige Glucose aus Nicht-Kohlenhydratvorstufen synthetisiert. Dies erfolgt durch Gluconeogenese, dem Umkehrprozess der Glykolyse. Die beiden Prozesse haben sowohl gemeinsame als auch für einzelne Schritte spezifische Komponenten. Durch Zugabe von Glucose zu den Zellen wird die Gluconeogenese gehemmt, indem einige der für diesen Zyklus spezifischen Enzyme schnell inaktiviert werden. Dieser Vorgang wird Katabolitinaktivierung genannt (Holzer, 1976; Holzer, 1989). Die Katabolitinaktivierung dient nicht nur dazu, die Glucosesynthese zu regulieren, sondern auch der Verhinderung eines nutzlosen ATP-Verbrauchs durch gleichzeitige Synthese und Abbau von Glucose („futile cycle“) (Purwin et al., 1982; Zubenko and Jones, 1981). Deshalb ist es bemerkenswert, dass dieser Vorgang in der eng verwandten Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe* unbekannt ist (Vassarotti and Colson, 1979; Vassarotti and Friesen, 1985). In neueren Studien konnte jedoch gezeigt werden, dass die Proteolyse gluconeogenetischer Enzyme den Zellen einen Selektionsvorteil gegenüber Zellen ohne diesen Mechanismus bringt (Navas and Gancedo, 1996). Da die Hefe *S. cerevisiae* in der Natur stark mit zuckerhaltigen Früchten vergesellschaftet ist, ist dieser Prozess für sie wohl von großer Bedeutung.

Eines der Schlüsselenzyme der Gluconeogenese ist die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase). Dieses Enzym unterliegt der Glucose-induzierten Katabolitinaktivierung. Das zytosolische Protein katalysiert die Dephosphorylierung von Fructose-1,6-bisphosphat zu Fructose-6-phosphat (Funayama et al., 1980; Gancedo, 1971; Holzer, 1976). Wachsen die Hefezellen auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle, so wird u.a. FBPase exprimiert, von welcher nach 5 – 6 h die Hauptmenge gebildet wird. Während das Enzym unter Expressionsbedingungen eine Halbwertszeit von 90 h aufweist, wird diese durch Glucosezugabe drastisch auf 20 – 30 min verkürzt (Gancedo, 1971; Holzer, 1976). Die Katabolitinaktivierung der FBPase erfolgt auf 3 Ebenen: Zum einen durch Transkriptionskontrolle der Proteinsynthese, zum anderen durch Phosphorylierung sowie durch proteolytischen Abbau des Enzyms.

Bisher ist über die zugrundeliegende Signaltransduktion, welche den Katabolitinaktivierungsmechanismus der FBPase vermittelt, relativ wenig bekannt. Beim Mechanismus, der zur Phosphorylierung führt, ist bekannt, dass das Glucosesignal die RAS-abhängige Adenylatcyclase stimuliert, wodurch kurzfristig ein starker Anstieg des cAMP-Spiegels ausgelöst wird. Dies wiederum aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase A, die weitere

Enzyme durch kovalente Modifizierung aktiviert bzw. hemmt. Letzendlich wird die FBPase reversibel am Serinrest 11 phosphoryliert, wodurch ihr pH-Optimum auf pH 8.0 verschoben wird und sie so bei pH 7.0 nur noch ca. 50 % der Ausgangsaktivität aufweist (Mazon, 1985; Mazon et al., 1982; Müller and Holzer, 1981; Purwin et al., 1982; Rittenhouse et al., 1986; Rittenhouse et al., 1987). Davon unabhängig läuft die Katabolitdegradation der FBPase ab. Hier ist bisher bekannt, dass die Glucose über Glucosetransporter in die Zelle gelangt, durch die Hexokinase2 zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert wird, das Signal unter Beteiligung der Proteine Reg1p und Grr1p weitergeleitet wird und schließlich zu einem noch unbekanntem Signal, welches den proteolytischen Degradationmechanismus auslöst (Horak et al., 2002). Diesen Signalweg hat die FBPase mit dem integralen Plasmamembranprotein Galaktosepermease (Gal2p) gemeinsam, welches ebenfalls der Glucose-induzierten Katabolitinaktivierung unterliegt und nach Monoubiquitinierung unter Mithilfe der Enzyme Uba1p, Ubc1p, Ubc4p, Ubc5p und Rsp5 in Vesikel verpackt und in der Vakuole abgebaut wird (Horak et al., 2002; Horak and Wolf, 1997; Horak and Wolf, 2001). Vergleichbare Glucose-induzierte Inaktivierungsprozesse wurden auch für die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PepCK) (Haarasilta and Oura, 1975a; Haarasilta and Oura, 1975b), die cytosolische Malatdehydrogenase (cMDH) (Hagele et al., 1978) und für die Isocitratlyase (ICL) (Lopez-Boado et al., 1987; Ordiz et al., 1995; Ordiz et al., 1996) beobachtet.

Um den Ort der proteolytischen Degradation der FBPase wird nach heutigem Stand der Forschung immer noch gestritten. In der Literatur findet man sowohl Beschreibungen eines Abbaus über das Ubiquitin-Proteasom-System als auch über die Vakuole (Schork et al., 1994b). Es wurde berichtet, dass die FBPase in eine neue Art von Vesikel verpackt, zur Vakuole transportiert und von vakuolären Proteasen abgebaut wird (Chiang et al., 1996; Huang and Chiang, 1997). Frühere Arbeiten favorisierten ein aus fünf Aminosäuren bestehendes Erkennungsmotiv der FBPase (EKVKE oder QKKLQ) als verantwortlich für den spezifischen Transport und Import in die Vakuole auf ähnliche Weise, wie es bei der RNase A (Motiv KFERQ) in Säugerzellen der Fall ist (Chiang and Dice, 1988; Chiang and Schekman, 1991; Dice, 1990; Dice, 1992). In weiteren Untersuchungen wurden Komponenten der Vesikelentstehung, der Verpackung der FBPase in Vesikel und des Transportes dieser Vesikel zur Vakuole entdeckt. Es wurde eine Beteiligung des Enzyms Ubc1p an der Biogenese der Vid-Vesikel („vacuolar import and degradation“) gefunden (Shieh et al., 2001). An dem Transport der FBPase in die Vid-Vesikel sind die Proteine Cpr1p, Vid22p und das Hsp70-Chaperon Ssa2p beteiligt (Brown et al., 2001; Brown et al.,

2000; Brown et al., 2002). Dabei reguliert das Plasmamembranprotein Vid22p den Spiegel von Cyclophilin A (Cpr1p), welches wiederum den Import der FBPase in die Vid-Vesikel bewerkstelligt (Brown et al., 2002). Als weitere Komponente wurde das Protein Vid24p identifiziert. Es befindet sich als peripheres Membranprotein außen an den FBPase-enthaltenden Vid-Vesikeln und vermittelt den Transport dieser zur Vakuole (Chiang and Chiang, 1998).

Auf der anderen Seite konnten die oben angeführten Ergebnisse in unserem Labor nicht bestätigt werden. Aufgrund vielfältiger Experimente wird von unserem Labor das System des Ubiquitin-vermittelten Abbaus der FBPase über das 26S-Proteasom unabhängig von vakuolären Enzymaktivitäten favorisiert (Schork et al., 1994a). In Zellen mit Defekten in der vakuolären Proteolyse konnten unter den bei uns angewendeten Versuchsbedingungen keine Beeinträchtigung des FBPase-Abbaus beobachtet werden, wohingegen in proteasomalen Mutantenstämmen eine deutliche Stabilisierung der FBPase unter Inaktivierungsbedingungen zu beobachten war (Schork et al., 1994b). Dies alles deutet stark auf eine Beteiligung des 26S-Proteasoms am Abbau des Enzyms hin (Schork et al., 1995). Für diese Untersuchungen wurden sowohl Mutantenstämme (*pre1-1*, *pre1-1 pre2-1*) mit einem Defekt im 20S-Kernkomplex als auch temperatursensitive Mutanten (*cim3-1*) mit veränderten 19S-Untereinheiten eingesetzt. Weitere Nachforschungen ergaben einen Einfluss des Ubiquitinsystems bei der Katabolitdegradation der FBPase (Schork et al., 1995). Mit Hilfe von epitopmarkiertem Ub konnten nach Glucosegabe zu dereprimierten Zellen größere Mengen von FBPase-Ubiquitinkonjugaten nachgewiesen werden. Ein Einfluss der Phosphorylierung der FBPase auf die Ubiquitinierung konnte durch Ubiquitinierungsuntersuchungen an einer punktmutierten FBPase (Phosphorylierungsstelle Serin 11 gegen Alanin ausgetauscht) ausgeschlossen werden (Hammerle et al., 1998). Eine Mutation des aminoterminalen Prolins der FBPase dagegen führt nicht nur zu einer Stabilisierung der FBPase unter Inaktivierungsbedingungen, sondern verhindert auch eine Ubiquitinierung unter diesen Bedingungen vollständig (Hammerle et al., 1998). Dies deutet darauf hin, dass das aminoterminaler Prolin der FBPase eine entscheidende Rolle bei der Katabolitdegradation spielt. Weiterhin wurden eine Reihe von ubiquitin-konjugierenden Enzymen (E2s) gefunden, die am Abbau der FBPase beteiligt sind. Während in entsprechenden Deletionsmutanten der Gene *UBC1*, *UBC4* und *UBC5* nur eine Verlangsamung des Abbaus zu beobachten war, ist in einer *ubc8*-Deletionsmutante die Degradation fast vollständig blockiert (Schork et al., 1995; Schuele et al., 2000). Dies deutet darauf hin, dass Ubc8p das entscheidende E2 für den Abbau ist. In einer *ubc8*-Deletionsmutante konnte ebenfalls gezeigt werden, dass hier nach

Glucosegabe keine ubiquitinierte FBPase mehr nachweisbar ist (Schuele et al., 2000). Dadurch wird wiederum die zentrale Rolle von Ubc8p bestätigt. Als weiteres für den FBPase-Abbau benötigtes Protein wurde das cytosolisch lokalisierte Gid2p („glucose induced degradation deficient“) gefunden. Auch in *gid2*-Deletionsmutanten konnte keine Ubiquitinierung der FBPase unter Inaktivierungsbedingungen gefunden werden (Schüle, Dissertation 2000). Dies lässt den Schluss zu, dass Gid2p seine Funktion nach oder während der Ubiquitinierung der FBPase hat. Außerdem wurde festgestellt, dass bei gleichzeitiger Zugabe von Glucose und Cycloheximid zu dereprimierten Zellen kein Abbau der FBPase mehr stattfindet (Schork, Dissertation 1995). Cycloheximid wird eingesetzt, um die Peptidyltransferase am Ribosom zu blockieren und dadurch die Proteinneusynthese zu hemmen (Alberts, 2002). Damit wurde gezeigt, dass Neusynthese eine entscheidende Rolle beim FBPase-Abbau spielt. Eines der erst nach Glucosegabe synthetisierten Proteine ist Vid24p (Chiang and Chiang, 1998). Weitere solche Proteine sind bisher nicht bekannt. Ein solches könnte auch das bisher noch nicht gefundene E3-Enzym des FBPase-Abbaus sein.

Betrachtet man die bisherigen Ergebnisse aus unserem Labor, so legen diese den Befund des Ubiquitin-Proteasom vermittelten Abbaus der FBPase nahe. Im Gegensatz dazu vermitteln die veröffentlichten Ergebnisse der Gruppe um H.L. Chiang dagegen den Abbau der FBPase in der Vakuole. Eine Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte in den unterschiedlichen Derepressionszeiten liegen. Die vakuoläre Proteolyse könnte bei längeren Derepressionszeiten an Einfluss gewinnen, wobei ein Teil der FBPase über die unspezifische Autophagozytose in die Vakuole gelangt.

### **3.4 Zielsetzung der Arbeit**

Für Zellen ist die selektive Proteolyse ein essentieller zellulärer Regulationsmechanismus. Sie dient einerseits der Beseitigung nicht mehr benötigter oder biologisch infunktionaler Proteine. Insbesondere kann aber die Zelle durch Proteolyse intakter, biologisch aktiver Proteine auf veränderte Umweltbedingungen reagieren. Da diese Regulationen für viele biologische Prozesse von essentieller Bedeutung sind, ist eine Aufklärung der Signalwege und Proteolysemechanismen, die dem Abbau von Schlüsselenzymen zugrunde liegen, äußerst wichtig. Die Kenntnis der Regulationsmechanismen von Enzymkonzentrationen trägt zu besserem Verständnis des hochkomplexen Systems von katabolen und anabolen Prozessen innerhalb der Zelle bei.

Die Hefe *S. cerevisiae* hat sich als besonders geeignet erwiesen, komplexe Vorgänge innerhalb der Zelle zu untersuchen. Das gluconeogenetische Schlüsselenzym Fructose-1,6-bisphosphatase dieser Hefe bietet sich für die Untersuchung der selektiven Proteolysemechanismen in ausgezeichneter Weise an. Der Abbau der FBPase kann leicht durch Zugabe von Glucose zu den Zellen induziert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mehr über den Abbaumechanismus der Glucose-induzierten Katabolitdegradation der FBPase herauszufinden. Als erstes sollte versucht werden, die Ergebnisse der Gruppe um H.L. Chiang mit dem dort gefundenen vakuolären Abbau zu überprüfen. Dabei sollte in vakuolären und proteasomalen Mutantenstämmen der FBPase-Abbau nach langer Derepressionszeit (mind. 48 h, Bedingungen nach H.L. Chiang) überprüft werden. Es sollte, falls der vakuoläre Mechanismus von Chiang bestätigt werden konnte, der „Schalter“ gefunden werden, welcher den proteasomalen Abbaumechanismus in den vakuolären ändert und umgekehrt.

Weiterhin sollte das von der Gruppe um Chiang gefundene Protein Vid24p und andere von ihr gefundene Proteine auf eine Beteiligung am proteasomalen Abbau der FBPase untersucht werden. Die Funktion des Vid24p und des Gid2p beim proteasomalen Abbau der FBPase sollte näher untersucht werden. Dazu sollten u.a. auch Protein-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt werden, um sowohl Interaktionspartner für Gid2p als auch für Vid24p zu finden.

Als weiteres sollten die unten näher bezeichneten Proteine auf eine Beteiligung am proteasomalen Abbau der FBPase untersucht werden, um neue Komponenten dieses Abbauweges zu finden. Zu den zu untersuchenden Proteinen zählen u.a. Proteine der Hsp70-Familie (Ssa1p – Ssa4p), die AAA ATPase Cdc48p, einige Autophagozytoseproteine (Aut1p, Aut3p, Aut5p) und UbA-Domänen-Proteine (Rad23p, Dsk2p, Rpn10p).

Außerdem sollte versucht werden, das bisher noch unbekannte E3-Enzym des proteasomalen FBPase-Abbaus zu finden. Zum einen sollte durch Interaktionsstudien mit dem E2-Enzym des Abbaus (Ubc8p) ein mögliches E3 gefunden werden und zum anderen durch Suche in Datenbanken mögliche oder bestätigte E3s mit HECT- oder RING-Finger-Domänen gefunden werden und auf eine Beteiligung am Abbau überprüft werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Verwendete Stämme

##### 4.1.1.1 *S. cerevisiae*-Stämme

**Tabelle 4-1:** In dieser Arbeit eingesetzte *S. cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Plasmid	Quelle
27061b	<i>Mata ura3 trp1</i>		R. Haguenuer-Tsapis
27064b	27061b <i>rsp5</i>		R. Haguenuer-Tsapis
EJ758/pYEX4t-1GID2 (4828)	<i>Mata his3-Δ200 leu2-3, 112 ura3-52, pep4Δ::HIS3</i>	pYEX4t-1GID2	Yeast ExClones
EJ758/pYEX4t-1VID24 (964)	<i>Mata his3-Δ200 leu2-3, 112 ura3-52, pep4Δ::HIS3</i>	pYEX4t-1VID24	Yeast ExClones
JB67	JN55 <i>ssa1-45:URA3 ssa2Δ::LEU2 ssa3Δ::TRP1 ssa4Δ::LYS2</i>		E. Craig
JN212	JN54 <i>ssb1Δ::LEU2 ssb2Δ::HIS3</i>		E. Craig
JN516	JN55 <i>ssa2Δ::LEU2 ssa3Δ::TRP1 ssa4Δ::LYS2</i>		E. Craig
JN54	<i>Matα his3-11, 15 leu2-3, 112 ura3-52 trp1-1 lys2</i>		E. Craig
JN55	<i>Matα leu2-3, 112 his3-11 ura3-52 trp1Δ1 lys2</i>		E. Craig
MW123	JN54 <i>ssa1Δ::HIS3 ssa2Δ::LEU2</i>		E. Craig
MW328	JN54 <i>ssa1Δ::HIS3 ssa3Δ::TRP1</i>		E. Craig
MW329	JN54 <i>ssa1Δ::HIS3 ssa4Δ::LYS2</i>		E. Craig
PJ69-4A	<i>Mata trp1-901 leu2-3, 112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ GAL2-ADE2</i>		P. James

	<i>LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ</i>		
BWG1-7a	<i>Mata ura3-52 leu2-3,112 his4-519 ade1-100</i>		E. Johnson
PM373	BWG1-7a <i>ufd1-1</i>		E. Johnson
PM211	BWG1-7a <i>ufd2-1</i>		E. Johnson
PM164	BWG1-7a <i>ufd3-1</i>		E. Johnson
PM642	BWG1-7a <i>ufd4-1</i>		E. Johnson
PM381	BWG1-7a <i>ufd5-1</i>		E. Johnson
W3031B	<i>Mata<math>\alpha</math> ade2 leu2-3, 112 his3 trp1 ura3</i>		H.L. Chiang
W303-1BKO	W303-1B <i>fbp1<math>\Delta</math>::LEU2</i>		H.L. Chiang
W303-1C	W303-1B <i>prc1-1</i>		M. Knop
W303-1C/CDC48	W303-1C <i>cdc48<math>\Delta</math>::URA3</i>	YE <sub>p</sub> CDC48	J. Bordallo
W303-1C/cdc48E	W303-1C <i>cdc48<math>\Delta</math>::URA3</i>	YE <sub>p</sub> cdc48E	J. Bordallo
W303-1C/cdc48F	W303-1C <i>cdc48<math>\Delta</math>::URA3</i>	YE <sub>p</sub> cdc48F	J. Bordallo
W303-1C/cdc48G	W303-1C <i>cdc48<math>\Delta</math>::URA3</i>	YE <sub>p</sub> cdc48G	J. Bordallo
W303-CPQ	<i>Mata<math>\alpha</math> ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ade2-1ocre can1-100 prc1-1 ubc6<math>\Delta</math>::LEU2 ubc7<math>\Delta</math>::LEU2</i>		M. Hiller
WCG4a	<i>Mata<math>\alpha</math> his3-11, 15 leu2-3, 112 ura3</i>		W. Heinemeyer
WCG4a	<i>Mata his3-11, 15 leu2-3, 112 ura3</i>		W. Heinemeyer
WCG4-11	WCG4a <i>pre1-1</i>		W. Heinemeyer
WCG4-11/22	WCG4a <i>pre1-1 pre2-2</i>		W. Heinemeyer
BY4742	<i>Mata his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>		EUROSCARF
Y06114	<i>Mata his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 slx8<math>\Delta</math>::KANMX4</i>		EUROSCARF
Y13709	<i>Mata<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0 hex3<math>\Delta</math>::KANMX4</i>		EUROSCARF
BY4743	<i>Mata/<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1/his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0/leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0/LYS2 MET15/met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0/ura3<math>\Delta</math>0</i>		EUROSCARF

---

Y30278	BY4743 <i>rad23Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y30405	BY4743 <i>vps8Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y30601	BY4743 <i>pex12Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y30862	BY4743 <i>dsk2Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y30953	BY4743 <i>yhl010cΔ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y31214	BY4743 <i>pex2Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y31268	BY4743 <i>far1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y31410	BY4743 <i>vid28Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y31472	BY4743 <i>air1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y31488	BY4743 <i>gid9Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y31579	BY4743 <i>ubr2Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y31746	BY4743 <i>yol054wΔ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y31943	BY4743 <i>yhr115cΔ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y32000	BY4743 <i>vid27Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y32447	BY4743 <i>ris1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y32894	BY4743 <i>rpn10Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y32960	BY4743 <i>ynl116wΔ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33075	BY4743 <i>ybl049wΔ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33195	BY4743 <i>ubp14Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33244	BY4743 <i>vid24Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33253	BY4743 <i>rad16Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33368	BY4743 <i>slx1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33446	BY4743 <i>ycl039wΔ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33513	BY4743 <i>cpr1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33614	BY4743 <i>gid2Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33624	BY4743 <i>pex10Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33625	BY4743 <i>ydr266cΔ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33682	BY4743 <i>pep7Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33709	BY4743 <i>hex3Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33771	BY4743 <i>bre1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33873	BY4743 <i>air2Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y34105	BY4743 <i>pep3Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y34196	BY4743 <i>vid21Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y34291	BY4743 <i>tom1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF

Y34391	BY4743 <i>pib2Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y34508	BY4743 <i>hul5Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y34594	BY4743 <i>gid1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y34620	BY4743 <i>hxc2Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y34859	BY4743 <i>ufd4Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y34883	BY4743 <i>tul1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y34903	BY4743 <i>vid31Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y35088	BY4743 <i>ykr017cΔ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y35156	BY4743 <i>ylr247cΔ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y35282	BY4743 <i>vid22Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y35381	BY4743 <i>vps27Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y35510	BY4743 <i>ypr093cΔ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y35787	BY4743 <i>rad18Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y36030	BY4743 <i>ylr427wΔ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y36114	BY4743 <i>slx8Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y36172	BY4743 <i>ecm32Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y36214	BY4743 <i>nam7Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y36430	BY4743 <i>rad5Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y36576	BY4743 <i>ymr135cΔ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y36577	BY4743 <i>ubc8Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y36834	BY4743 <i>hul4Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y36902	BY4743 <i>grr1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y36953	BY4743 <i>yml068wΔ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y37080	BY4743 <i>fab1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y37299	BY4743 <i>ssm4Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
YCT549	W303-1C <i>cdc48<sup>y834E</sup>::KAN<sup>R</sup></i>	C. Taxis
YFJ1	W303-1B <i>vid24Δ::KAN<sup>R</sup></i>	diese Arbeit
YFJ2	WCG4a <i>vid24Δ::KAN<sup>R</sup></i>	Diplomarbeit
YFJ3	WCG4a <i>VID24-HA<sub>3</sub>::HIS5 (S.p.)</i>	diese Arbeit
YFJ4	W303-1B <i>VID24-HA<sub>3</sub>::HIS5 (S.p.)</i>	diese Arbeit
YFJ5	W303-1BKO <i>GID2-HA<sub>3</sub>::HIS5 (S.p.)</i>	diese Arbeit
YFJ6	YFJ1 <i>GID2-HA<sub>3</sub>::HIS5 (S.p.)</i>	diese Arbeit
YFJ7	WCG4a <i>Matα gid2Δ::KAN<sup>R</sup> Mito-Mutante</i>	diese Arbeit

YFJ8	WCG4a <i>Matα gid2Δ::KAN<sup>R</sup></i>	diese Arbeit
YFJ9	BY4742 <i>Matα hex3Δ::KANMX4 slx8Δ::KANMX4</i>	diese Arbeit
YFJ9	BY4742 <i>Mata hex3Δ::KANMX4 slx8Δ::KANMX4</i>	diese Arbeit
YFJ10	YMH2 <i>GID2-HA<sub>3</sub>::HIS5 (S.p.)</i>	diese Arbeit
YFJ11	YMH1 <i>GID2-HA<sub>3</sub>::HIS5 (S.p.)</i>	diese Arbeit
YJB009	<i>Matα ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ade2-1ocre can1-100 prc1-1 der3Δ::HIS3</i>	J. Bordallo
YJR13	WCG4a <i>gid1Δ::KAN<sup>R</sup></i>	J. Regelmann
YMH1	W303-1B <i>FBP1-P1W</i>	M. Hämmerle
YMH2	W303-1B <i>FBP1-P1S</i>	M. Hämmerle
YMTA	WCG4a <i>pep4Δ::HIS3</i>	M. Thumm
YMTAB	WCG4a <i>pep4Δ::HIS3 prb1Δ::URA3</i>	M. Thumm
YR312	<i>Mata his1-123</i>	H. Rudolph
YR320	<i>Matα his1-123</i>	H. Rudolph
YMS5	WCG4a <i>aut1Δ::KAN<sup>R</sup></i>	M. Schlumpberger
YTL10	WCG4a <i>aut2Δ::KAN<sup>R</sup></i>	T. Lang
YMS30	WCG4a <i>aut3Δ::KAN<sup>R</sup></i>	M. Straub
YIS3	WCG4a <i>aut4Δ::KAN<sup>R</sup></i>	I. Suriapranata
YIS4	WCG4a <i>aut5Δ::KAN<sup>R</sup></i>	I. Suriapranata
YSR2	WCG4a <i>aut9Δ::KAN<sup>R</sup></i>	S. Reiche
YTS1	W303-1B <i>gid2Δ::KAN<sup>R</sup></i>	T. Schüle
YTS2	W303-1B <i>ubc8Δ::KAN<sup>R</sup></i>	T. Schüle
YTS3	W3031B <i>GID2-HA<sub>3</sub>::HIS5 (S.p.)</i>	T. Schüle
YTS4	W3031B <i>UBC8-HA<sub>3</sub>::HIS5 (S.p.)</i>	T. Schüle

### 4.1.1.2 *E. coli*-Stämme

**Tabelle 4-2:** In dieser Arbeit eingesetzte *E. coli*-Stämme.

Stamm	Eigenschaft / Verwendung	Quelle
DH5 $\alpha$	DNAse-defizienter Stamm für die Amplifikation und Sicherung von Plasmiden	(Hanahan, 1983)
BL21	Protease-defizienter Stamm zur Expression von GST-Fusionsproteinen	Amersham, Little Chalfont, GB

### 4.1.2 Plasmide

**Tabelle 4-3:** In dieser Arbeit eingesetzte Plasmide.

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pYEX4T-1GID2	Expressionsplasmid für GST-Gid2 unter der Kontrolle des <i>CUPI</i> -Promotors. Wird in <i>S. cerevisiae</i> repliziert (Selektionsmarker <i>URA3</i> ).	(Martzen et al., 1999)
pYEX4T-1VID24	Expressionsplasmid für GST-Vid24 unter der Kontrolle des <i>CUPI</i> -Promotors. Wird in <i>S. cerevisiae</i> repliziert (Selektionsmarker <i>URA3</i> ).	(Martzen et al., 1999)
YEp96	Expressionsplasmid (2 $\mu$ ) für Ubiquitin (WT-Ub) unter der Kontrolle des <i>CUPI</i> -Promotors. Wird in <i>S. cerevisiae</i> (Selektionsmarker <i>TRP1</i> ) und <i>E. coli</i> (Selektionsmarker <i>AMP<sup>R</sup></i> ) repliziert.	(Hochstrasser et al., 1991)
YEp112	Expressionsplasmid (2 $\mu$ ) für Ha-Ubiquitin (Ha-Ub) unter der Kontrolle des <i>CUPI</i> -Promotors. Wird in <i>S. cerevisiae</i> (Selektionsmarker <i>TRP1</i> ) und <i>E. coli</i> (Selektionsmarker <i>AMP<sup>R</sup></i> ) repliziert.	(Hochstrasser et al., 1991)
YEp105	Expressionsplasmid (2 $\mu$ ) für 13-MYC-Ubiquitin (MYC-Ub) unter der Kontrolle des <i>CUPI</i> -Promotors. Wird in <i>S. cerevisiae</i> (Selektionsmarker <i>TRP1</i> ) und <i>E. coli</i> (Selektionsmarker	(Hochstrasser et al., 1991)

pUG6	<p><i>AMP<sup>R</sup></i>) repliziert.</p> <p>Plasmid zur Herstellung von Deletionskonstrukten. Es enthält einen Replikationsursprung (<i>ori</i>) und als Deletionskassette das Kanamycinresistenzgen unter der Kontrolle von Promotor und Terminator des <i>TEF</i>-Gens aus <i>Ashbya gossypii</i> (Wach <i>et al.</i>, 1994). Außerdem wird das Kanamycingen flankiert von den Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase (<i>loxP</i>). Mit geeigneten Oligonukleotiden kann durch PCR (4.2.2.8) die <i>loxP-KAN<sup>R</sup>-loxP</i>-Kassette sowie flankierende Bereiche des zu deletierenden Gens synthetisiert und zur Herstellung eines Deletionsstammes verwendet werden.</p>	(Güldener et al., 1996)
p3XHA- <i>HIS5</i>	<p>Das 4,3 kb große Plasmid eignet sich zur Erzeugung chromosomaler Fusionen mit dem dreifachen Ha-(Haemagglutinin)-Epitop des Influenzavirus und dem <i>HIS5</i>-Gen aus <i>S. pombe</i> als Selektionsmarker. Es basiert auf dem Plasmid pBluescript II SK. Mit geeigneten Oligonukleotiden kann durch PCR (4.2.2.8) ein DNA-Fragment (Integrationskassette), das ein dreifaches HA-Epitop und den <i>HIS5</i>-Marker enthält, hergestellt werden. Dieses Fragment wird chromosomal in den Hefestamm integriert. Bei Expression ergeben sich dann C-terminal markierte Proteine.</p>	S. Munro, Cambridge, UK
pGEX-4T-1	<p>Plasmid zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen und deren Expression in <i>E. coli</i> (Selektionsmarker <i>AMP<sup>R</sup></i>).</p>	Amersham, Little Chalfont, UK
pGEX-4T-3	<p>Plasmid zur Herstellung von GST-Fusionsproteinen und deren Expression in <i>E. coli</i> (Selektionsmarker <i>AMP<sup>R</sup></i>).</p>	Amersham, Little Chalfont, UK
pRS306	<p>Integratives Plasmid ohne Hefe-Replikations-</p>	(Sikorski and

	sequenz. Wird in <i>E. coli</i> (Selektionsmarker <i>AMP<sup>R</sup></i> ) repliziert. Enthält den Selektionsmarker <i>URA3</i> .	Hieter, 1989)
pRS424	2 $\mu$ -Plasmid. Wird in <i>S. cerevisiae</i> (Selektionsmarker <i>TRP1</i> ) und <i>E. coli</i> (Selektionsmarker <i>AMP<sup>R</sup></i> ) repliziert.	(Sikorski and Hieter, 1989)
pGBD-C1	Plasmid zur Herstellung von Bindedomänen-Fusionsproteinen und zur Expression in <i>S. cerevisiae</i> . Wird für 2-hybrid-Studien verwendet.	(James et al., 1996)
pGBD-C1_Ubc8	Expressionsplasmid für das Bindedomänen-Ubc8-Fusionsprotein. Die Basensequenz von <i>Ubc8</i> wurde in die Schnittstellen von EcoRI und ClaI eingefügt.	diese Arbeit
pGEX-4T-1_Vid24	Expressionsplasmid für das GST-Vid24-Fusionsprotein. Die Basensequenz von <i>Vid24</i> wurde in die Schnittstellen von BamHI und NotI eingefügt.	diese Arbeit
pGEX-4T-1_Ubc8(gereifte Form)	Expressionsplasmid für das GST-Ubc8(gereifte Form)-Fusionsprotein. Die Basensequenz der gereiften Form (ab Basenpaar 163) von <i>Ubc8</i> wurde in die Schnittstellen von EcoRI und NotI eingefügt.	diese Arbeit
pGEX-4T-1_Ubc8	Expressionsplasmid für das GST-Ubc8-Fusionsprotein. Die Basensequenz von <i>Ubc8</i> wurde in die Schnittstellen von EcoRI und NotI eingefügt.	diese Arbeit
pGEX-4T-1_C126S-Ubc8	Expressionsplasmid für das GST-Ubc8 (Cystein126 gegen Serin ausgetauscht)-Fusionsprotein. Die Basensequenz von <i>Ubc8</i> (Cystein126 gegen Serin ausgetauscht) wurde in die Schnittstellen von EcoRI und NotI eingefügt.	diese Arbeit
pJR10	Expressionsplasmid für das GST-Gid2-Fusionsprotein. Die Basensequenz von <i>Gid2</i> wurde in den Plasmid pGEX-4T-3 eingefügt.	J. Regelmann
pRS306_Vid24	Integratives Plasmid, das die Promotorregion von	diese Arbeit

	<i>Vid24</i> und ein N-terminal 2 x HA-getaggtetes <i>Vid24</i> enthält.	
pRS424_Ubc8	2 $\mu$ -Plasmid zur Expression von C-terminal RYIRS getaggttem Ubc8p. Das getaggte <i>UBC8</i> wurde in Zählrichtung in die <i>Sma</i> I-Schnittstelle integriert.	diese Arbeit
pRS424_Gid2	2 $\mu$ -Plasmid zur Expression von C-terminal RYIRS und 6-fach His getaggttem Gid2p. Das getaggte <i>GID2</i> wurde in Zählrichtung in die <i>Sma</i> I-Schnittstelle integriert.	diese Arbeit
YCp50/III	Genbankplasmid ausgehend von YCp50 (Rose et. Al., 1987). In die <i>Bam</i> HI-Schnittstelle ist ein ca. 8 kB großes Stück von Chromosom V von <i>S. cerevisiae</i> insertiert, das u.a. das <i>UBC8</i> -Gen inklusive dessen Promotor enthält. Wird in <i>S. cerevisiae</i> (Selektionsmarker <i>URA3</i> ) und <i>E. coli</i> (Selektions-marker <i>AMP<sup>R</sup></i> ) repliziert.	T. Schüle
YCp50/Ubc8HA <sub>3</sub>	Das Plasmid YCp50 wurde mit dem Restriktionsenzym <i>Bfr</i> I geschnitten und über einen Gap Repair in einem Stamm, der <i>Ubc8-HA<sub>3</sub></i> enthielt, wurde das Backbone wieder komplementiert. Nun enthält das Plasmid zusätzlich ein 3-fach HA-getaggtetes <i>Ubc8</i> und das <i>HIS5</i> -Gen aus <i>S. p.</i>	diese Arbeit
pHIT128	Expressionsplasmid für GST in <i>S. cerevisiae</i> unter Kontrolle des Gal-Promotors. Das Plasmid trägt einen <i>LEU2</i> -Marker.	R. Hitt

### 4.1.3 Oligonukleotide

Synthetische Oligonukleotide für die PCR (Primer) wurden von der Firma MWG Biotech (München) bezogen. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 4-4 angegeben.

**Tabelle 4-4: In dieser Arbeit eingesetzte Primer.**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz</b>	<b>verwendet für</b>
HA-VID-1	5'-AAA TAA AGT CGA GTC CAG TGA TTG TTC TTT TGA GTT TGC TGG AGC AGG GGC GGG TGC-3'	YFJ3 und YFJ4
HA-VID-2	5'-AAG AGA AAA GGG TAT GCA GGT AAA AAC GAA TAT ATC ACA CAG AGG TCG ACG GTA TCG ATA AG-3'	YFJ3 und YFJ4
Del1	5'-GCG TCT TGT GCA TGA CAC CAA CAC ATA TCG CAA GCT TGA GTC-3'	YFJ1 und YFJ2
Del2	5'-AGA AAA GGG TAT GCA GGT AAA AAC GAA TAT ATC ACA CA-3'	YFJ1 und YFJ2
NotI-Promotor	5'-GGG CCC GCG GCC GCG GCT GCT CGG TTC TCT T-3'	pRS306_Vid24
BamHI-HA-Promotor	5'-GCC GCC GGA TCC GCC CGC ATA GTC AGG GAC GTC GTA CGG GTA CAT GAC TCA AGC TTG CGA TAT G-3'	pRS306_Vid24
BamHI-HA-Vid24	5'-GCC GCC GGA TCC TAT CCA TAC GAC GTG CCC GAC TAC GCT ATC AAT AAT CCT AAG GTA GAC-3'	pRS306_Vid24
ClaI-Vid24	5'-GCG GCG ATC GAT TCA AGC AAA CTC AAA AGA AC-3'	pRS306_Vid24
GST_Vid24_1_BamHI	5'-GCC GCC GGA TCC ATC AAT AAT CCT AAG GTA GAC-3'	pGEX-4T-1_Vid24
GST_Vid24_2_NotI	5'-GGG CCC GCG GCC GCA GTC AAG CAA ACT CAA AAG AAC-3'	pGEX-4T-1_Vid24
BD_Ubc8_1_EcoRI	5'-GGG CCC GAA TTC AAA CTG TTG ATG AGT GAT CA-3'	pGBD-C1_Ubc8
BD_Ubc8_2_ClaI	5'-GCG GCG ATC GAT TTA TTG	pGBD-C1_Ubc8

	ATT AGC GAC TTC GT-3'	
Ubc8_GST_1_EcoRI	5'-GGG CCC GAA TTC ATG AAA CTG TTG ATG AGT GA-3'	pGEX-4T-1_Ubc8 (gereifte Form)
Ubc8_GST_2_NotI	5'-GGG CCC GCG GCC GCT TAT TGA TTT GCG ACT TCG T-3'	pGEX-4T-1_Ubc8 (gereifte Form)
Gid2_HA3_1	5'-CCG TAA ATA CTT CAA TGA GCA GTA CAA AAA AGG TTC GTT TTG TTA TGC TTG GAG CAG GGG CGG GTG C-3'	YFJ5, YFJ6, YFJ10 und YFJ11
Gid2_HA3_2	5'-TTA TCG CTT CCA ATA AAA AAA AAA AAA AAA AAC CTA TGC AAA AAT TTC AGG AGG TCG ACG GTA TCG ATA AG-3'	YFJ5, YFJ6, YFJ10 und YFJ11
1000_vor_Ubc8	5'-AGA GGC TGT CTT TGT TCC- 3'	pRS424_Ubc8
Ende_Ubc8+RYIRS	5'-AAA TTA AGA ACG AAT ATA ACG TTG ATT TGC GAC TTC GTC G-3'	pRS424_Ubc8
1000_vor_Gid2_ClaI	5'-GGG CCC ATC GAT AAT TAC CAT TTT CAG TCT TTG-3'	pRS424_Gid2
Gid2_RYIRS_6His_2	5'-GGG AAA GCG GCC GCT CAA TGA TGA TGA TGA TGA TGA GAA CGA ATA TAA CGA AGC ATA ACA AAA CGA ACC T-3'	pRS424_Gid2
pYEX4T-1_P1	5'-GAA TTC CAG CTG ACC ACC- 3'	Überprüfung von pYEX4T-1GID2 und pYEX4T-1VID24
pYEX4T-1_P2	5'-GAT CCC CGG GAA TTG CCA T-3'	Überprüfung von pYEX4T-1GID2 und pYEX4T-1VID24
Kan_Gid2_1	5'-TTC AAG AGA GAT GCA GCA CTG AGT AGG GAA CCA AGA AAC GCA GCT GAA GCT TCG TAC GC-3'	YFJ8

Kan_Gid2_2	5'-CAA TAA AAA AAA AAA AAA AAA ACC TAT GCA AAA ATT TCA GAG CAT AGG CCA CTA GTG GAT CTG-3'	YFJ8
pGEX4T-1_Ubc8_1_EcoRI	5'-GGG CCC GAA TTC ATG AGG TAT GTT TGA TAA GAT-3'	pGEX-4T-1_C126S- Ubc8 und pGEX-4T- 1_Ubc8
Ubc8_Cys-Ser_Primer1	5'-TAA TTA CGT CCA AAC TTA TGG ACC CCG ATG CGA TA-3'	pGEX-4T-1_C126S- Ubc8
Ubc8_Cys-Ser_Primer2	5'-CAT CGG GGT CCA TAA GTT TGG ACG TAA TTA ACT CT-3'	pGEX-4T-1_C126S- Ubc8
pGEX4T-1_Ubc8_2_NotI	5'-GGG AAA GCG GCC GCT TAT TGA TTT GCG ACT TCG T-3'	pGEX-4T-1_C126S- Ubc8 und pGEX-4T- 1_Ubc8

#### 4.1.4 Wachstumsmedien

Für die Herstellung der Wachstumsmedien wurde ausschließlich zweifach deionisiertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet. Wachstumsmedien wurden zur Sterilisation für 25 min bei 120°C autoklaviert.

Feste Medien (Agarplatten) enthielten jeweils zusätzlich zu den angegebenen Komponenten 2 % Bacto-Agar.

Alle Prozentangaben in diesem Abschnitt beziehen sich auf w/v. Die pH-Wert-Einstellung erfolgte mit Salzsäure oder Natronlauge.

##### 4.1.4.1 Hefemedien

###### 4.1.4.1.1 Vollmedium YPD

pH 5,5

1 % Hefeextrakt

2 % Bacto-Pepton

2 % D-Glucose

**4.1.4.1.2 Ethanolhaltiges Hungermedium YPEtOH**

pH 5,5

1 % Hefeextrakt

2 % Bacto-Pepton

2 % Ethanol

**4.1.4.1.3 Acetathaltiges Hungermedium YPKG**

pH 5,5

1 % Hefeextrakt

2 % Bacto-Pepton

0,5 % D-Glucose

1 % Kaliumacetat

**4.1.4.1.4 Synthetisches Vollmedium CM**

pH 5,6

0,67 % Yeast nitrogen base w/o amino acids

2 % D-Glucose

0,0117 % L-Alanin

0,0117 % L-Arginin

0,0117 % L-Asparagin

0,0117 % L-Asparaginsäure

0,0117 % L-Cystein

0,0117 % L-Glutamin

0,0117 % L-Glutaminsäure

0,0117 % L-Glycin

0,0117 % L-Isoleucin

0,0117 % L-Methionin

0,0117 % L-Phenylalanin

0,0117 % L-Prolin

0,0117 % L-Serin

0,0117 % L-Threonin

0,0117 % L-Tyrosin

0,0117 % L-Valin

0,0117 % myo-Inosit

0,00117 % p-Aminobenzoensäure

Je nach Selektionsbedingungen wurden folgende Supplemente hinzugefügt:

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

#### **4.1.4.1.5 Synthetisches Hungermedium CMEtOH**

Wie CM, allerdings statt 2% D-Glucose enthält es 2% Ethanol.

#### **4.1.4.1.6 Synthetisches Nährmedium CMGal**

Wie CM, allerdings statt 2% D-Glucose enthält es 2% Galactose.

#### **4.1.4.1.7 Mineralmedium MV**

pH 5,5:

0,67% Yeast nitrogen base w/o amino acids

2% D-Glucose

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

Für 5-FOA-Medium (zur Gegenselektion auf URA3) zusätzlich:

1 mg/ml 5-Fluoro-orotsäure

0,4 mM Uracil

#### **4.1.4.1.8 Mineralmedium MVohne**

pH 5,5:

0,67% Yeast nitrogen base w/o amino acids

2% D-Glucose

#### **4.1.4.1.9 Medien für Pulse Chase-Analysen**

**4.1.4.1.9.1 Labelling-Medium CM-MetEtOH**

Wie CM<sub>EtOH</sub>, allerdings ohne L-Methionin und L-Cystein.

**4.1.4.1.9.2 Methioninfreies synthetisches Vollmedium CM-Met**

Wie CM, allerdings ohne L-Methionin und L-Cystein.

**4.1.4.1.9.3 Chase-Medium CM+Met**

Wie CM, allerdings enthält es 10 mM L-Methionin.

**4.1.4.1.10 Hungermedium 1%KAc**

1 % Kaliumacetat

**4.1.4.1.11 Chase-Medium 1%KAc+Met**

1 % Kaliumacetat

10 mM L-Methionin

**4.1.4.2 Medien für *E. coli*-Kulturen****4.1.4.2.1 Vollmedium LB**

pH 7,5

1 % Bacto-Trypton

0,5 % Hefeextrakt

0,5 % Natriumchlorid

**4.1.4.2.2 LB<sub>Amp</sub>-Medium (zur Selektion auf Ampicillin-Resistenz)**

Wie LB, allerdings zusätzlich 75 µg/ml Ampicillin

**4.1.4.2.3 Transformationsmedium SOC**

pH 7,4

2 % Bacto-Trypton

0,5 % Hefeextrakt

0,4 % D-Glucose

10 mM Natriumchlorid

10 mM Magnesiumchlorid

10 mM Magnesiumsulfat

2,5 mM Kaliumchlorid

#### 4.1.4.2.4 2 x YTAG-Medium (zur Expression von GST-Fusionsproteinen)

pH 7,0

1,6 % Bacto-Trypton

1 % Hefeextrakt

0,5 % Natriumchlorid

100 µg/ml Ampicillin

2 % D-Glucose

#### 4.1.5 Antikörper

**Tabelle 4-5:** In dieser Arbeit eingesetzte Antikörper.

Antikörper	Verdünnung	Quelle
Kaninchen-anti-API, polyklonal	1 : 5000	(Klionsky et al., 1992)
Kaninchen-anti-Cdc48p, polyklonal	1 : 10000	K.U. Fröhlich
Kaninchen-anti-Fas, polyklonal	1 : 1000	(Egner et al., 1993)
Kaninchen-anti-FBPase, polyklonal (1)	1 : 5000	K.D. Entian, Frankfurt
Kaninchen-anti-FBPase, polyklonal (2)	1 : 1000	diese Arbeit
Kaninchen-anti-GST, polyklonal	1 : 5000, 2 % Magermilchpulver	T. Lang
Kaninchen-anti-Pre4p, polyklonal	1 : 4000	W. Heinemeyer
Kaninchen-anti-Rpt5p, polyklonal	1 : 25000	Affiniti, Exeter, UK
Kaninchen-anti-Vid24p, polyklonal	1 : 1000	diese Arbeit
Maus-anti-CPY, monoklonal	1 : 10000	Molecular Probes, Leiden, Holland
Maus-anti-Ha-Epitop (clone 16B12), monoklonal	1 : 10000	BAbCO, Richmond, USA
Maus-anti-Ha-Epitop (kovalent an Protein A Sephrose gebunden), monoklonal	-	BAbCO, Richmond, USA
Maus-anti-Myc-Epitop, monoklonal	1 : 10000	Roche, Mannheim
Maus-anti-PGK, monoklonal	1 : 10000	Molecular Probes, Leiden, Holland
Maus-anti-Pup1p, monoklonal	1 : 1000	Affiniti, Exeter, UK
Maus-anti-RYIRS, monoklonal	1 : 5000	BAbCO, Richmond, USA

Maus-anti-Ubiquitin, monoklonal	1 : 1000	Oncogene, Boston, USA
Ziege-anti-Kaninchen IgG, HRPO konjugiert	1 : 5000, 1 % Magermilchpulver	Medac, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG, HRPO konjugiert	1 : 10000	Dianova, Hamburg

#### 4.1.6 Enzyme

**Tabelle 4-6:** In dieser Arbeit eingesetzte Enzyme.

Enzym	Quelle
Glusulase	Sigma, Deisenhofen
Lysozym	Roche, Mannheim
Restriktions-Endonucleasen	Roche, Mannheim und New England Biolabs, Beverly, USA
RNase A	Sigma, Deisenhofen
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim
Vent-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Beverly, USA
Zymolyase 100-T	Seikagaku Kyogo, Tokio, Japan

#### 4.1.7 Chemikalien

**Tabelle 4-7:** In dieser Arbeit eingesetzte Chemikalien.

Bezeichnung	Quelle
Adenin	Sigma, Deisenhofen
Agarose NEEO	Roth, Karlsruhe
L-Alanin	Sigma, Deisenhofen
p-Aminobenzoesäure	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumacetat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Ampicillin	Roche, Mannheim
Antipain	Calbiochem, San Diego, USA
L-Arginin	Sigma, Deisenhofen

---

L-Asparagin	Sigma, Deisenhofen
L-Asparaginsäure	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco, Michigan, USA
Bacto-Pepton	Difco, Michigan, USA
Bacto-Trypton	Difco, Michigan, USA
Benzamidin	Calbiochem, San Diego, USA
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Blottingpapier GB001, GB002 und GB003	Schleicher & Schuell, Dassel
Bromphenolblau	Riedel-De Haën, Seelze
BTPNA	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Chymostatin	Calbiochem, San Diego, USA
Complete™ Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Cycloheximid	Sigma, Deisenhofen
L-Cystein	Sigma, Deisenhofen
Desoxyadenosin-triphosphat	Roche, Mannheim
Desoxycytidin-triphosphat	Roche, Mannheim
Desoxyguanosin-triphosphat	Roche, Mannheim
Desoxythymidin-triphosphat	Roche, Mannheim
Dithiothreit	Roth, Karlsruhe
DMF	Roth, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
DNA-Längenstandard (1 kb DNA-Leiter)	Roche, Mannheim
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Epoxy-activated Sepharose 6B	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Essigsäure	Riedel-De Haën, Seelze
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
5-FOA	Toronto Res. Chem., New York, Kanada
D-Galactose	Sigma, Deisenhofen
Gasperlen	B. Braun Biotech, Melsungen
D-Glucose	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen

---

L-Glutaminsäure	Sigma, Deisenhofen
Glutathion Sepharose™ 4B	Amersham, Little Chalfont, UK
Glycerin	Riedel-De Haën, Seelze
L-Glycin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Difco, Michigan, USA
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Hering-Sperma-DNA	Promega, Madison, USA
L-Histidin	Sigma, Deisenhofen
Hybond-N-Nylonmembran	Amersham-Buchler, Braunschweig
Hyperfilm™ ECL™	Amersham, Little Chalfont, UK
myo-Inosit	Sigma, Deisenhofen
IPTG	BTS, St. Leon-Rot
Isobutanol	Riedel-De Haën, Seelze
L-Isoleucin	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Riedel-De Haën, Seelze
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
L-Leucin	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Calbiochem, San Diego, USA
Lithiumacetat	Sigma, Deisenhofen
L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver	Dr. Gross, Sauerlach
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Roth, Karlsruhe
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Roth, Karlsruhe
L-Methionin	Sigma, Deisenhofen
[ $\alpha$ - <sup>35</sup> S]-L-Methionin	Amersham, Little Chalfont, UK
MG132	Calbiochem, San Diego, USA
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Riedel-De Haën, Seelze

---

Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdesoxycholat	Sigma, Deisenhofen
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
NC-Membran (Protran BA 70)	Schleicher & Schuell, Dassel
NCSII	Roth, Karlsruhe
Pefabloc	Merck, Darmstadt
PEG 4000	Sigma, Deisenhofen
Pepstatin	Calbiochem, San Diego, USA
Phenol, TE-gesättigt (Roti® -Phenol)	Roth, Karlsruhe
L-Phenylalanin	Sigma, Deisenhofen
PMSF	Merck, Darmstadt
Ponceau S	Sigma, Deisenhofen
L-Prolin	Sigma, Deisenhofen
Protein A Sepharose CL-4B	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Proteinmarker (SeeBlue™ Pre-Stained Standard)	Novex, San Diego, USA
Proteinmarker (Precision Plus Protein™ Standards, All Blue)	BioRad, Hercules, USA
Protogel 30%	Kimberly Research, Atlanta, USA
Rinderserumalbumin	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure 37%	Riedel-De Haën, Seelze
TEMED	Merck, Darmstadt
D-Saccharose	Roth, Karlsruhe
SDS	Sigma, Deisenhofen
L-Serin	Sigma, Deisenhofen
D-Sorbit	Sigma, Deisenhofen
TCA	Roth, Karlsruhe
L-Threonin	Sigma, Deisenhofen
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton-X-100	Roth, Karlsruhe
L-Tryptophan	Sigma, Deisenhofen
L-Tyrosin	Sigma, Deisenhofen

Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Ubiquitin-Aldehyde	Sigma, Deisenhofen
Uracil	Sigma, Deisenhofen
L-Valin	Sigma, Deisenhofen
X-Gal	BTS, St. Leon-Rot
Yeast nitrogen base w/o amino acids	Difco, Michigan, USA

#### 4.1.8 Kits

**Tabelle 4-8:** In dieser Arbeit eingesetzte Kits.

Bezeichnung	Quelle
ECL™ Kit	Amersham, Little Chalfont, GB
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

#### 4.1.9 Geräte

**Tabelle 4-9:** In dieser Arbeit eingesetzte Geräte.

Bezeichnung	Quelle
Analysenwaage <i>AE 163</i>	Mettler, Giessen, Schweiz
<i>Biofuge Fresco</i>	Heraeus, Hanau
<i>Biofuge Pico</i>	Heraeus, Hanau
DNA-Gelelektrophorese-Apparaturen	Bio-Rad, Hercules, USA
Elektroporations-Apparatur <i>Gene Pulser™</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
Entwicklungsmaschine <i>Optimax</i>	Protec Medizintechnik, Oberstenfeld
Geltrockner	Fröbel Labortechnik, Lindau
Heizblock <i>Test Tube Thermostat TCR100</i>	Roth, Karlsruhe
Inkubator <i>B 6200</i>	Heraeus, Hanau
Ionenaustauscher <i>Milli-Q Academics</i>	Millipore, Eschborn
Laborschüttler für Kulturen (div. Größen)	A. Kühner, Birsfelden, Schweiz

---

Liquid Scintillation Counter <i>Wallace 1410</i>	Wallace, Freiburg
Magnetrührer <i>Ikamag REO</i>	IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.
Netzgerät <i>Consort E831</i>	Consort, Turnhout, Belgien
Netzgerät <i>Power-Pac 300</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
PCR-Maschine <i>Robocycler® Gradient 40</i>	Stratagene, La Jolla, USA
pH-Meter <i>CG 820</i>	Schott, Hofheim
pH-Meter <i>CG 832</i>	Schott, Hofheim
PhosphoImager <i>Storm 860</i>	Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA
Plattformschüttler <i>VSR23</i>	Grant Instruments, Shepreth, GB
Protein-Gelelektrophorese-Apparatur <i>Protean II</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
Schüttler <i>KS10</i>	Edmund Bühler, Tübingen
Semidry-Blot-Apparatur	ITF Labortechnik, Wasserburg
Spektralphotometer <i>Jasco V-530</i>	Jasco, Gross-Umstadt
Spektralphotometer <i>Novaspec II</i>	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Thermomixer <i>5437</i>	Eppendorf, Hamburg
Tischultrazentrifuge <i>Optima™ TLX</i>	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Tischzentrifuge <i>5415 C</i>	Eppendorf, Hamburg
Überkopfschüttler <i>34528</i>	Snijders Scientific, Tilburg, NL
Überkopfschüttler <i>REAX 2</i>	Heidolph, Schwabach
Überkopfschüttler <i>Roto Shake Genie</i>	Scientific Industries Inc, Bohemia, USA
Ultraschall-Sonifikator <i>Sonic Power</i>	Branson, Danbury, USA
Ultrazentrifuge <i>Centrikon T-1065</i>	Kontron, Neufarn
Videoprinter für Agarosegele	MWG Biotech, München
Vortexer <i>Vibrofix VF1</i>	IKA-Labortechnik, Staufen i. Br.
Waage <i>PM460</i>	Mettler, Giessen, Schweiz
Wasserbad <i>SWB25</i>	Haake, Karlsruhe
Wasserbad <i>WI3/F3</i>	Haake, Karlsruhe
Zentrifuge <i>3K10</i>	Sigma, Deisenhofen
Zentrifuge <i>5804 R</i>	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge <i>Centrikon T-124</i>	Kontron, Neufarn
Zentrifuge Sorvall RC 5B	Kendro, Osterode
Zentrifuge <i>Z 320 K</i>	Eppendorf, Hamburg

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Wachstumsbedingungen

Zellkulturen in flüssigen Nährmedien wurden in Reagenzgläsern und Erlenmeyerkolben angesetzt, die mindestens das 5-fache Volumen der Nährflüssigkeit hatten, und auf einem Rundschüttler inkubiert. Hefekulturen wurden mit 220 Upm bei 30°C, *E. coli*-Kulturen mit 220 Upm bei 37°C geschüttelt. Änderungen der Wachstumsbedingungen wurden ausdrücklich bei den entsprechenden Experimenten angegeben.

#### 4.2.1.1 Dauerkulturen

Zur Erzeugung von Hefedauerkulturen wurden zahnstocherkopfgroße Mengen des jeweiligen Hefestammes direkt von einer Agarplatte genommen, in 1 ml sterilem 15 %-igem Glycerin suspendiert und bei -80°C gelagert. *E. coli*-Dauerkulturen wurden durch Mischen von 500 µl einer Flüssigkultur mit 500 µl sterilem 60 %-igem Glycerin angelegt und bei -80°C aufbewahrt.

#### 4.2.1.2 Wachstumsbedingungen der Hefe

Vorkulturen wurden durch Beimpfen eines 5 ml Nährmediums mit Hefezellen, die direkt von einer Agarplatte stammen, in einem Reagenzglas angesetzt und bei 30°C inkubiert. Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase (24-48 h) wurde die Vorkultur zum Anlegen einer Hauptkultur verwendet. Plasmidtragende Hefestämme wurden in CM-Medium ohne die entsprechenden Auxotrophiemarker inkubiert.

Hefekulturen auf Agarplatten benötigen bei 30°C eine Inkubationszeit von 2-4 Tagen.

##### 4.2.1.2.1 Induktion und Inaktivierung der FB Pase

Wachsen Zellen auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen wie Ethanol oder Acetat, so wird die Expression der FB Pase und anderer gluconeogenetischer Enzyme induziert. Diese

Expression findet ebenso statt, wenn die in Medien enthaltene Glucose aufgebraucht worden ist.

Um das Abbauverhalten der FBPase in Immunoblots untersuchen zu können, wurden die Zellen folgendermaßen angezogen und anschließend folgendermaßen Proben genommen:

#### **4.2.1.2.1.1 Standardbedingungen**

Aus einer stationären glucosehaltigen Vorkultur (YPD oder CM) wurde 1 : 12,5 in eine glucosehaltige Hauptkultur ungeimpft. Nach mindestens 7 h wurde aus dieser Hauptkultur heraus 1 : 17 in ethanolhaltiges Medium (YPEtOH oder CMEtOH) umgesetzt. Nach 16 h wurde zum einen eine 0-Probe entnommen (3 – 5 OD<sub>600</sub>-Zellen) und zum anderen die Zellen abzentrifugiert und so in glucosehaltigem Medium (YPD oder CM) aufgenommen, dass eine Zellsuspension mit einer OD<sub>600</sub> von 3 - 5 resultierte. Zu den gewünschten Zeitpunkten (meistens 30, 60, 90 und 120 min) wurde jeweils eine Probe von 1 ml entnommen.

#### **4.2.1.2.1.2 Bedingungen nach H.L. Chiang**

Aus einer stationären glucosehaltigen Vorkultur (YPD) wurde 1 : 1000 in acetathaltiges Medium (YPKG) ungeimpft. Nach 48 - 65 stündiger Inkubation wurden dann Proben analog wie unter 4.2.1.2.1.1 gezogen.

#### **4.2.1.2.2 Wachstumsbedingungen bei Ubiquitylierungsuntersuchungen**

Aus einer stationären Vorkultur (CM-Medium ohne Trp, 24h) wurde eine glucosehaltige Hauptkultur (CM ohne Trp) so angeimpft, dass die Zellen nach 16 h eine OD<sub>600</sub> von 4 – 5 aufwiesen. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, mit Wasser gewaschen und so in CMEtOH-Medium ohne Trp aufgenommen, dass eine Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 2,5 resultierte. Nach Zugabe von 100 µM Kupfersulfat zur Expression der verschiedenen Ubiquitinvarianten (Ha-Ub, WT-Ub) und 6 Stunden Inkubation in Derepressionsmedium, wurden zum einen 50 OD<sub>600</sub> Zellen als 0-Probe entnommen und zum anderen 50 OD<sub>600</sub> Zellen abzentrifugiert und in 10 ml glucosehaltigem Medium (CM ohne Trp, 100 µM Kupfersulfat)

resuspendiert und 25 min lang inkubiert (25 min Probe). Sämtliche Proben wurden auf Eis aufbewahrt.

Alternativ wurde ausgehend von einer 7 Stunden alten glucosehaltigen Hauptkultur (CM ohne Trp) 1 : 10 in CMEtOH ohne Trp umgesetzt, 100  $\mu$ M Kupfersulfat zugesetzt und 16 h lang inkubiert. Danach wurde wiederum eine 0-Probe von 50 OD<sub>600</sub>-Zellen entnommen und eine ebenso große Zellmenge in glucosehaltigem Medium (CM ohne Trp) aufgenommen und nach 25 min geerntet (25 min Probe).

#### **4.2.1.3 Wachstumsbedingungen von *E. coli***

*E. coli*-Kulturen wurden direkt mit Zellen von Agarplatten oder aus Glycerinkulturen, die bei -80°C gelagert wurden, in LB-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert. Flüssigmedien und Agarplatten enthielten 75 mg/l Ampicillin (LB<sub>Amp</sub>-Flüssigmedium bzw. LB<sub>Amp</sub>-Platten).

### **4.2.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **4.2.2.1 Isolierung von DNA**

##### **4.2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* (boiling prep)**

1,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (2 min 6500 Upm) und in 350  $\mu$ l STET-Puffer (50 mM Tris / HCl pH 8,0, 50 mM EDTA, 2,5 % Triton X-100, 8 % Sucrose) resuspendiert. Dann wurden 350  $\mu$ l STET-Lysozymlösung (enthält 0,1575  $\mu$ g Lysozym, frisch zubereitet) zugegeben, zweimal vorsichtig invertiert und 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Suspension bei offenem Reaktionsgefäßdeckel 3 min bei 95°C gekocht, 10 min auf Eis gestellt und 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit einem Zahnstocher entfernt und die gelöste Plasmid-DNA durch Zugabe einer gleichen Volumenmenge (meist 700  $\mu$ l) von Isopropanol gefällt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Probe zentrifugiert (10 min, 13000 Upm) und das Pellet in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgenommen.

#### 4.2.2.1.2 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe

2 ml einer Hefeübernachtskultur wurden 30 s bei 13000 Upm abzentrifugiert und mit 0,5 ml Wasser gewaschen. Danach wurden die Zellen in 200 µl Breaking Buffer (2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl einer 1:1-Mischung aus Phenol und Chloroform und von 300 µl Glasperlen, wurde die Mischung 4 Minuten mittels eines Vortexers gerüttelt. Nach Zugabe von 200 µl Wasser und kurzem Mischen durch Invertieren, wurde die Probe 5 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Danach wurde die wässrige Phase abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß mit 1 ml kaltem Ethanol (100 %) versetzt, gemischt und 15 Minuten bei - 80°C gelagert. Daraufhin wurde erneut 2 Minuten bei 13000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl Wasser, dem 30 µg Rnase A zugesetzt worden war, resuspendiert und 5 min bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurde wieder 1 ml kaltes Ethanol (100 %) und 10 µl einer 6 M Ammoniumacetat-Lösung zugegeben und mehrmals invertiert. Nachdem die Mischung wieder 15 Minuten bei - 80°C gehalten worden war, wurde 2 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert und mit kaltem Ethanol (70 %) gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde in 50 µl Wasser resuspendiert und bis zur Verwendung bei - 20°C gelagert.

#### 4.2.2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefe

Die Methode 4.2.2.1.2 liefert bei Vorhandensein von Plasmid-DNA auch kleine Mengen ebendieser neben der chromosomalen DNA. Diese Mengen reichen zur Transformation von *E. coli* aus. Zur Amplifikation der so erhaltenen Plasmid-DNA wurde der *E. coli* Stamm DH5α transformiert (4.2.2.2.2) und entsprechend der oben genannten Methode (4.2.2.1.1) isoliert.

## 4.2.2.2 Transformation

### 4.2.2.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Eine 600 ml-Hauptkultur des Stammes DH5 $\alpha$  in LB-Medium wurde mit einer stationären Vorkultur 1 : 100 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden 30 min auf Eis abgekühlt und danach zentrifugiert (4°C, 6500 Upm, 8 min). Anschließend wurde jeweils unter Eiskühlung mit 600 ml, 250 ml und abschließend mit 100 ml eiskaltem, sterilem 10 % Glycerin gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml 10 % Glycerin aufgenommen und in Aliquots zu 40  $\mu$ l bei – 80°C gelagert.

### 4.2.2.2.2 Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Ein Aliquot kompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut, mit 0,2 - 1  $\mu$ l der zu transformierenden DNA versetzt und 1 min auf Eis inkubiert. Dann wurde die Zellsuspension in eine gekühlte Elektroporationsküvette überführt und die Elektroporation bei 2,3 kV, 400 W und 250  $\mu$ F mittels eines Gene Pulsers durchgeführt. Die Zellen wurden danach sofort in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Von dieser Suspension wurden 100  $\mu$ l bis 1 ml auf LB<sub>Amp</sub>-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Stammtte die zu transformierende DNA aus einer „blunt end“-Ligation, wurde auf den LB<sub>Amp</sub>-Platten vor dem Zellenausplattieren 100  $\mu$ l X-Gal-Lösung (20 mg X-Gal / ml DMF).ausgestrichen. Dies führt dazu, dass *E. coli*-Klone mit Plasmid ohne Insert blau wurden, wohingegen Klone mit Plasmid mit Insert weiß blieben, da hier der ORF des *LACZ*-Gens durch das Insert unterbrochen ist und so der Klon X-Gal nicht mehr zu einem blauen Farbstoff umsetzen kann.

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

5 OD<sub>600</sub> Zellen einer Übernachtskultur in YPD mit einer OD<sub>600</sub> von 0,4 – 0,8 wurden abzentrifugiert (3 min 2500 Upm) und 2 mal mit 1 ml LiSorb (100 mM Lithiumacetat, 1 mM EDTA, 1 M Sorbitol, 10 mM Tris, pH 7.5) gewaschen und in 50  $\mu$ l LiSorb resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei 30°C wurden 5  $\mu$ l Heringssperma-DNA (wurde vorher durch 10 minütiges Kochen bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt), 5  $\mu$ l der zu transformierenden

DNA und 300 µl PEG-Lösung (40 % PEG, 100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA) zugegeben, die Mischung 30 Minuten lang bei 30°C inkubiert und anschließend 20 Minuten lang ein Heat Shock bei 42°C durchgeführt. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (3 min 2500 Upm) und mit 0,5 ml Wasser gewaschen. (Bei Transformation mit einem Kanamycin-Resistenzgen wurde das erhaltene Pellet in 3 ml YPD resuspendiert und 3 h lang bei 30°C geschüttelt.) Dann wurde erneut abzentrifugiert (3 min 2500 Upm) und das Pellet in 50 - 150 µl Wasser resuspendiert und auf 1 - 3 Selektionsplatten ausplattiert.

#### **4.2.2.3 Restriktionsverdau von DNA**

Für einen 10 - 30-µl-Verdauansatz wurden zwischen 1 und 15 µl DNA-Lösung, 0,1 - 1 µl Restriktionsendonuclease und 1 - 3 µl des jeweiligen 10fach-Inkubationspuffers (A, B, L, M oder H) eingesetzt. Es wurde mit H<sub>2</sub>O auf 10 - 30 µl aufgefüllt und 1 bis 2 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Danach wurde der Verdau durch Zugabe von 1 - 3 µl 10-fach-DNA-Probenpuffer (1 M Tris / HCl pH 8.0, 50% (v/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau) abgebrochen und eine DNA-Agarose-Gelelektrophorese (4.2.2.4) durchgeführt.

#### **4.2.2.4 DNA-Agarose-Gelelektrophorese**

Die DNA-Proben wurden mit der entsprechenden Menge 10-fach DNA-Probenpuffer (siehe 4.2.2.3) versetzt und in einer Flachbett-Elektrophorese-Kammer (Pharmacia, Bio-Rad) in 0,8 %-igen Agarosegelen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei RT und einer Spannung von 120 V 20 – 40 min lang durchgeführt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer (40 mM Tris / Essigsäure pH 7.5, 2 mM EDTA) verwendet. Die x-kb-Leiter (Boehringer Mannheim und Gibco) diente als DNA-Längenstandard (50 µl x-kb zu 450 µl 1-fach DNA-Probenpuffer). Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Gele mit dem Dokumentationssystem der Firma MWG-Biotech unter UV-Licht (302 nm) dokumentiert.

#### 4.2.2.5 Gelextraktion von DNA

Zur Isolierung eines bestimmten DNA-Fragments aus einem Plasmidverdau (4.2.2.3), wurde nach elektrophoretischer Auftrennung des Fragmentgemisches im Agarosegel (4.2.2.4) der QIAEX II Kit, entsprechend der vorliegenden Arbeitsvorschrift des Herstellers (Qiagen), verwendet.

#### 4.2.2.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Pro Ansatz wurden je 0,5 bis 6  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung (geschnittener Plasmid-backbone und Insert), 0,3  $\mu\text{l}$  T4-DNA-Ligase (5 U /  $\mu\text{l}$  in Glycerin) und 1  $\mu\text{l}$  10-fach Ligationpuffer mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 10  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und über Nacht bei 18 °C inkubiert. Nach der Ligation wurde 0,5 – 1  $\mu\text{l}$  der DNA in *E. coli* transformiert (4.2.2.2).

#### 4.2.2.7 Genaustausch durch homologe Rekombination

Ein integratives Plasmid mit *URA3*-Marker, welches die Promotorregion von *VID24* und ein N-terminal 2 x Ha-getaggtes *VID24* enthielt (pRS306\_Vid24), wurde innerhalb der Promotorregion linearisiert. Mit diesem linearisierten Plasmid wurde ein Wildtypstamm (W303-1B) transformiert (4.2.2.3) und auf Ura-Platten selektioniert. Mit positiven Klonen wurden YPD-Übernachtskulturen beimpft und 500  $\mu\text{l}$  dieser Kulturen auf 5-FOA-Platten ausplattiert. Nach 2 – 3 Tagen Inkubationszeit wurden die gewachsenen Kolonien auf eine Expression des 2 x Ha-getaggten Vid24p getestet. Theoretisch sollte etwa die Hälfte der Kolonien das getaggte Vid24p exprimieren.

#### 4.2.2.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Der Standard PCR-Ansatz bestand aus folgenden Bestandteilen:

- 2,5  $\mu\text{l}$  DMSO
- 1  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix (je 10 mM)

- 5  $\mu$ l Polymerasepuffer (Thermopol-Puffer)
- je 1  $\mu$ l beider Primer (100 pmol/ $\mu$ l)
- 1  $\mu$ l Template (Plasmid-DNA oder chromosomale DNA)
- 36  $\mu$ l Wasser
- 50  $\mu$ l Mineralöl
- 0,5  $\mu$ l Magnesiumsulfat (100 mM)
- 1  $\mu$ l Vent-DNA-Polymerase (2 U /  $\mu$ l) (wurde im Normalfall erst im 1. Zyklus des PCR-Programm während des Denaturierungsschrittes zugegeben („Hot Start“))

Abweichungen vom Standard-PCR-Ansatz sind bei den einzelnen PCR-Programmen angegeben. Bei veränderten Mengen wurde die Wassermenge entsprechend angepasst.

Folgende PCR-Programme wurden verwendet:

**Tabelle 4-10: PCR-Programm 1**

Wiederholungen des Programmzyklus	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation / DNA-Synthese
1 mal	3 min 94°C		
26 mal	30 s 94°C	30 s 50 – 57°C	2 min 72°C
1 mal			5 min 72°C

Dieses Programm wurde für die Herstellung folgender Konstrukte verwendet:

Die beiden Inserts, um pRS306\_Vid24 zu erhalten (Primer NotI-Promotor und BamHI-HA-Promotor bzw. BamHI-HA-Vid24 und ClaI-Vid24, Annealing-Temperatur jeweils 50°C), das Insert, um pGBD-C1\_Ubc8 zu erhalten (Primer BD\_Ubc8\_1\_EcoRI und BD-Ubc8\_2\_ClaI, Annealing-Temperatur 57°C, 0  $\mu$ l MgSO<sub>4</sub>, 0  $\mu$ l DMSO), das Insert, um pGEX-4T-1\_Vid24 zu erhalten (Primer GST-Vid24\_1\_BamHI und GST-Vid24\_2\_NotI, Annealing-Temperatur 54°C, 0  $\mu$ l MgSO<sub>4</sub>) und das Insert, um pGEX-4T-1\_Ubc8 (gereifte Form) (Primer Ubc8\_GST\_1\_EcoRI und Ubc8\_GST\_2\_NotI, Annealing-Temperatur 57°C, 0  $\mu$ l MgSO<sub>4</sub>). Als Template wurde jeweils chromosomale DNA aus einem Wildtyp-Stamm (W303-1B) benutzt.

Außerdem wurde mit diesem Programm eine Knockout-Kassette für *VID24* erzeugt, mit welcher das *VID24*-Gen chromosomal gegen das *KAN<sup>R</sup>*-Gen ausgetauscht werden kann. Als Primer wurden Del1 und Del 2 und als Template wurde pUG6 verwendet.

**Tabelle 4-11: PCR-Programm 2**

Wiederholungen des Programmzyklus	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation / DNA-Synthese
1 mal	3 min 94°C		
26 mal	30 s 94°C	30 s 56°C	2 min 30 s 72°C
1 mal			5 min 72°C

Diese Programm wurde für die Herstellung des Inserts, um pRS424\_Gid2 zu erhalten, verwendet (Primer 1000 vor Gid2\_ClaI und Gid2\_RYIRS\_6His\_2). Als Template wurde chromosomale DNA aus einem Wildtyp-Stamm (W303-1B) benutzt.

**Tabelle 4-12: PCR-Programm 3**

Wiederholungen des Programmzyklus	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation / DNA-Synthese
1 mal	5 min 94°C	2 min 54 - 61°C	3 min 72°C
35 mal	45 s 94°C	45 s 54 - 61°C	3 min 72°C
1 mal			5 min 72°C

Dieses Programm wurde für die Herstellung folgender Konstrukte verwendet:

C-terminale Ha<sub>3</sub>-Tag Konstrukte mit *HIS5*-Marker aus *S. p.* für *VID24* und *GID2* (Primer HA-VID1 und HA-VID2 bzw. Gid2\_HA3\_1 und Gid2\_HA3\_2, Template: p3XHA-*HIS5*) und Insert, um pRS424\_Ubc8 zu erhalten (Primer 1000\_vor\_Ubc8 und Ende\_Ubc8+RYIRS, Annealing-Temperatur 54°C, Template: chromosomale DNA aus Wildtypstamm (W303-1B)).

**Tabelle 4-13: PCR-Programm 4**

Wiederholungen des Programmzyklus	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation / DNA-Synthese
1 mal	5 min 95°C	1 min 30 s 57°C	3 min 72°C
25 mal	1 min 95°C	50 s 57°C	1 min 40s 72°C
1 mal	1 min 95°C	50 s 57°C	5 min 72°C

Mit diesem Programm wurde eine Knockout-Kassette für *GID2* erzeugt, mit welcher das *GID2*-Gen chromosomal gegen das *KAN<sup>R</sup>*-Gen ausgetauscht werden kann. Abweichend vom Standard-PCR-Ansatz wurden 5 µl DMSO, jeweils 0,5 µl von den Primern Kan\_Gid2\_1 und Kan\_Gid2\_2 und 0,3 µl pUG6 als Template verwendet.

**Tabelle 4-14: PCR-Programm 5**

Wiederholungen des Programmzyklus	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation / DNA-Synthese
1 mal	3 min 95°C	1 min 30 s 54 - 57°C	2 min 72°C
27 mal	45 s 95°C	45 s 54 - 57°C	1 min 72°C
1 mal	45 s 95°C	45 s 54 - 57°C	5 min 72°C

Mit diesem Programm wurden zum einen die Megaprimmer 1 und 2 (Primer pGEX4T-1-Ubc8\_1\_EcoRI und Ubc8\_Cys-Ser\_Primer1 bzw. Ubc8\_Cys-Ser\_Primer2 und pGEX4t-1\_Ubc8\_2\_NotI, Annealing-Temperatur: 57°C bzw. 54°C) und zum anderen das Insert, um pGEX-4T-1\_Ubc8 zu erhalten (Primer pGEX4T-1-Ubc8\_1\_EcoRI und pGEX4T-1\_Ubc8\_2\_NotI, Annealing-Temperatur: 56°C), hergestellt. Als Template wurde chromosomale DNA aus einem Wildtyp-Stamm (W303-1B) benutzt.

**Tabelle 4-15: PCR-Programm 6**

Wiederholungen des Programmzyklus	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation / DNA-Synthese
1 mal	4 min 95°C	1 min 30 s 53°C	2 min 72°C
3 mal	1 min 30 s 95°C	1 min 30 s 53°C	2 min 72°C
25 mal	45 s 95°C	45 s 53°C	1 min 72°C

1 mal	45 s	95°C	45 s	53°C	5 min	72°C
-------	------	------	------	------	-------	------

Mit diesem Programm wurde das Insert erzeugt, um pGEX-4T-1\_C126S\_Ubc8 zu erhalten. Als Primer wurden jeweils 2,5 µl der gereinigten (nach 4.2.2.9) Megaprimer (aus PCR-Programm 5) verwendet. Template war erneut chromosomale DNA aus einem Wildtyp-Stamm (W303-1B).

**Tabelle 4-16: PCR-Programm 7**

Wiederholungen des Programmzyklus	Denaturierung	DNA-Annealing	Elongation / DNA-Synthese
1 mal	5 min 95°C	2 min 52°C	1 min 72°C
30 mal	45 s 95°C	45 s 52°C	2 min 72°C
1 mal			5 min 72°C

Dieses Programm wurde zur Überprüfung der Plasmide pYEX4T-1GID2 und pYEX4T-1VID24 verwendet. Dazu wurde jeweils ein zahnstocherkopf große Menge der Hefestämme EJ758/pYEX4t-1GID2 (4828) und EJ758/pYEX4t-1VID24 (962) in einem PCR-Reaktionsgefäß in einer Mikrowelle 1 min lang erhitzt. Den so aufgeschlossenen Hefezellen wurde nach dem Abkühlen 4 µl 10-fach PCR-Puffer, 2 µl MgCl<sub>2</sub> (25 mM), jeweils 0,5 µl der Primer pYEX4T-1\_P1 und pYEX4T-1\_P2, 2 µl dNTPs, 2 µl DMSO und 28 µl H<sub>2</sub>O zugesetzt und sie darin resuspendiert. Dieser Ansatz wurde für die PCR benutzt. 1 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U / µl) wurde als „Hot Start“ zugegeben.

#### 4.2.2.9 Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem *QIAquick PCR Purification* Kit nach Firmenvorschrift gereinigt.

#### 4.2.2.10 Southern-Blot-Analyse

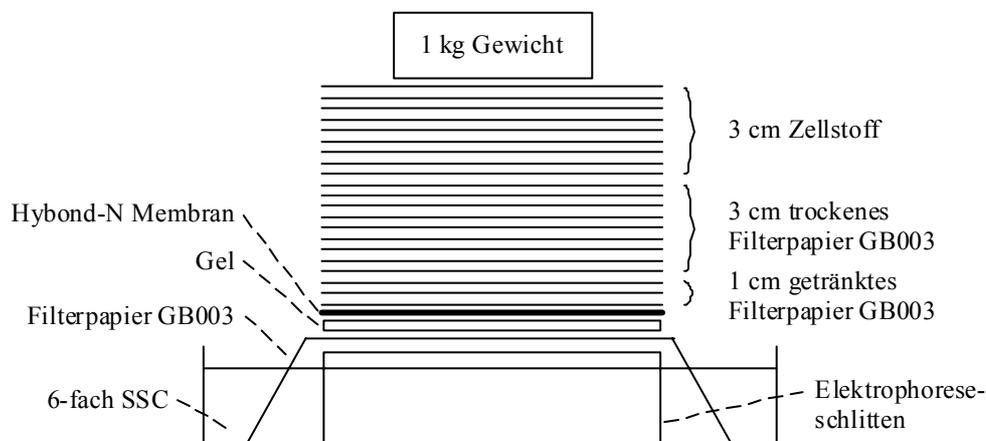
Diese Methode dient der Identifizierung einzelner, genomischer Fragmente. Sie können durch spezifische Sonden immunologisch detektiert und identifiziert werden (Southern, 1975; Sambrook et al., 1989).

##### 4.2.2.10.1 Auftrennung der DNA-Fragmente

Die isolierte chromosomale DNA der zu untersuchenden Hefestämme (4.2.2.1.2) wurde über Nacht in einem 20 µl Ansatz mit geeigneten Restriktionsendonucleasen verdaut (4.2.2.3) und dann mittels DNA-Agarose-Gelelektrophorese (4.2.2.4) aufgetrennt. Das Gel wurde unter UV-Licht mit einem Lineal (als Längenvergleich) fotografiert und dokumentiert.

##### 4.2.2.10.2 Transfer der DNA (Kapillar-Blot-Verfahren)

Das Gel wurde zuerst zweimal 8 min lang in Acid-Nicking-Puffer (0,25 M Salzsäure), dann zweimal 15 min lang in Denaturierungspuffer (1,5 M Natriumchlorid, 0,5 M Natriumhydroxid) und abschließend zweimal 45 min lang in Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris / Salzsäure pH 7,0, 3 M Natriumchlorid) gewaschen. Während dieser Zeit wurde sowohl eine Hybond™-N Nylonmembran als auch Filterpapier GB003 auf die Größe des Gels zugeschnitten.



**Abb. 4-1:** Aufbau der Kapillar-Blotting-Apparatur.

Die Membran und  $\frac{1}{4}$  der zugeschnittenen Filterpapiere wurde mit 6-fach SSC-Puffer (0,9 M Natriumchlorid, 0,09 M Natriumcitrat, pH 7.0) getränkt. Danach wurde die Blotting-Apparatur nach obiger Skizze (Abb. 4-1) zusammengebaut und die DNA über Nacht mit 6-fach SSC-Puffer transferiert. Anschließend wurde der Stapel zerlegt und die DNA durch 5 minütiges Bestrahlen mit UV-Licht auf der Membran fixiert.

#### 4.2.2.10.3 Hybridisierung und Detektion

Die fixierte Membran (ca. 50 cm<sup>2</sup>) wurde in einer Hybridisierungsröhre mit 15 ml Hybridisierungspuffer (5-fach SSC-Puffer, 0,1 % (w/v) SDS, 5 % (w/v) Dextransulfat, 5 % (w/v) Liquid-Block) 4 h lang im Drehofen bei 60°C vorhybridisiert. Daraufhin wurde die denaturierte Sonden-DNA (5 min 100°C, 5 min 0°C) hinzugefügt und über Nacht bei derselben Temperatur inkubiert. Die verwendeten Sonden erkannten folgende Gene: *HIS5* (*S. p.*) und *KAN<sup>R</sup>*.

Die Membran wurde anschließend zuerst 15 min lang mit 1-fach und dann 15 min lang mit 0,5-fach SSC-Puffer, der 0,1 % (w/v) SDS enthielt und auf 60°C vorgewärmt worden war, im Drehofen bei 60°C gewaschen. Nach kurzem Spülen (5 min, RT) mit Diluent-Puffer (100 mM Tris / Salzsäure pH 9.5, 300 mM Natriumchlorid), wurden freie Bindungsstellen der Membran mit 50 ml 10 % (v/v) Liquid-Block in Diluent-Puffer (1 h, RT) abgesättigt. Danach wurde erneut kurz mit Diluent-Puffer gespült. Durch Zugabe 18 ml einer Lösung von Anti-Fluorescin-AP-Konjugat (1 : 5000 in Diluent-Puffer mit 0,5 % (w/v) BSA) wurde die DNA-Sonde immunologisch detektiert (1 h, RT). Überschüssiges Konjugat wurde anschließend durch dreimaliges, je zehnminütiges Waschen der Membran mit je 200 ml 0,3 % (w/v) Tween 20 in Diluent-Puffer entfernt.

Zur Detektion wurde die Membran 2 – 5 min lang mit 2,5 ml dioxetane detection Reagenz inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurde die Membran luftdicht in einer Plastiktasche eingeschlossen. Danach wurde in einer Filmentwickelkassette ein ECL-Film 30 min – 24 h lang aufgelegt und entwickelt.

#### 4.2.2.11 Konzentrationsbestimmung von DNA

4 µl einer DNA-Lösung wurden zu 1 ml H<sub>2</sub>O gegeben und gemischt. Die Extinktion dieser Lösung wurde bei 260 nm (E<sub>260</sub>) in einer Quarzküvette im Jasco gemessen. Die Konzentration der DNA (c<sub>DNA</sub>) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c_{\text{DNA}} = E_{260} * 12,5 \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

#### 4.2.2.12 Plasmid-DNA-Sequenzierung

Aus *E. coli* wurde der gewünschte Plasmid mittels des *QIAprep Spin Miniprep Kits* nach Firmenvorschrift in hoher Reinheit isoliert. Zur Sequenzierung wurde die DNA-Lösung an die Firma GATC Biotech AG, Konstanz, geschickt, welche auch die zur Sequenzierung benötigten Primer bereitstellte bzw. vorher synthetisierte.

### 4.2.3 Zellbiologische und biochemische Methoden

#### 4.2.3.1 Paarung haploider Stämme

Zur Herstellung diploider Hefestämme wurden auf einer YPD-Agarplatte etwa gleiche Zellmengen der zu kreuzenden haploiden Stämme unterschiedlichen Paarungstyps gemischt. Nach mindestens vier Stunden bei 30°C waren Zygoten mikroskopisch aufgrund ihrer Morphologie (dreiblättriges Kleeblatt) nachweisbar und dadurch selektionierbar. Unter dem Mikroskop wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators (Ernst Leitz, Wetzlar und Lawrence Instruments, Hayward, USA) diploide Zellen von den anderen Zellen abgetrennt und waren nach 2 Tagen Inkubation bei 30°C als Einzelkolonien sichtbar. Bei diesen wurde nach 4.2.3.3 der Paarungstyp bestimmt.

#### 4.2.3.2 Sporulation und Tetradendisektion

Eine über-Nacht-Kultur in YPD eines diploiden Stammes wird zentrifugiert (3 min 2500 Upm), mit Wasser gewaschen und in 1 % KOAc resuspendiert. Nach mindestens 4 – 5 Tagen

bei 25°C wurde die Kultur unter dem Lichtmikroskop auf das Vorhandensein von Tetraden hin untersucht. War eine genügend große Menge an Tetraden sichtbar, so wurden 500 µl der Kultur zentrifugiert (3 min 2500 Upm) und 3 Mal mit Wasser gewaschen. Nach dem Aufnehmen in 200 µl H<sub>2</sub>O wurde zur Lyse der Ascuswände 3 µl Glusulase zugegeben und 3 min bei RT inkubiert. Danach wurde 800 µl Eiswasser zugeben und die Zellen über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden 10 – 50 µl der Zellsuspension (abhängig von der Zelldichte) auf einer YPD-Agarplatte aufgetragen, die Tetraden mit Hilfe eines Mikromanipulators dissektiert und bei 30°C 2 Tage lang inkubiert. Zur Überprüfung der Markersegregation wurden die Kolonien der Tetraden zunächst auf einer frischen YPD-Agarplatte ausgestrichen und dann auf entsprechenden Selektionsplatten replikaplatziert. Die Bestimmung des Paarungstyps erfolgte gemäß Kapitel 4.2.3.3.

#### 4.2.3.3 Bestimmung des Paarungstyps von Hefestämmen

Mit den Testerstämmen YR312 (*Mat a*) und YR320 (*Mat α*), deren Paarungstyp bekannt ist, wurde der Paarungstyp von Hefestämmen ermittelt. Die Testerstämme haben einen einzigen Auxotrophiemarker, der auf einen Defekt im *HIS1*-Lokus zurückzuführen ist und in keinem der sonst verwendeten Hefestämmen vorkommt. Die aus der Kreuzung mit den Testerstämmen resultierenden diploiden Stämme sollten deshalb auf Minimalmedium ohne Supplemente wachsen, sofern der zu überprüfende haploide Hefestamm einen anderen Paarungstyp als der Testerstamm aufweist.

Die zu testenden Stämme und der Testerstamm wurden nacheinander auf MVohne über Kreuz ausgestrichen und 2 - 3 Tage bei 30°C inkubiert. Aus dem Fehlen bzw. Auftreten diploider Stämme konnte auf den Paarungstyp der zu testenden Stämme geschlossen werden.

#### 4.2.3.4 Alkalische Lyse von Hefezellen

In Anlehnung an Yaffe und Schatz (1984) wurde diese Aufschlussmethode durchgeführt. Zellen mit einer OD<sub>600</sub> von 3 - 5 (aus 4.2.1.2.1) wurden zentrifugiert (30 s 13000 Upm) und bis zur Verwendung bei – 20°C aufbewahrt. Das Pellet wurde dann in 1 ml Wasser aufgenommen. Nach Zusatz von 150 µl Lyselösung (1,85 M NaOH, 7,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol) und kurzem Mischen wurde 10 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde

150 µl 50 % (w/v) TCA zugegeben, gemischt und erneut 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde 10 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert, mit Aceton gewaschen und das Pellet in 50 µl Harnstoffpuffer (8 M Harnstoff, 140 mM Tris / Salzsäure pH 6.8, 0,1 mM EDTA, 5% (w/v) SDS, 0,05% (w/v) Bromphenolblau, 1% (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugesetzt)) aufgenommen. Zum Lösen des Pellets wurden die Proben ca. 30 min auf einem Multivortexer (IKA-Vibrax) bei 37°C gerüttelt, daraufhin 2 -3 Minuten auf 95°C erhitzt und danach 1 min bei 13000 Upm abzentrifugiert. Bei der SDS-Gelelektrophorese (4.2.3.5) wurden 10 µl Probe pro Bahn aufgetragen. Die Proben wurden zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

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

Diese Methode wurde analog (Lämmli, 1970) durchgeführt.

**Tabelle 4-17: Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele**

	Trenngel (7,5 %)	Trenngel (10 %)	Trenngel (12 %)	Sammelgel
H <sub>2</sub> O	4,85 ml	4,02 ml	3,35 ml	6,1 ml
1,5 M Tris pH 8.8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	
0,5 M Tris pH 6.8				2,5 ml
10 % (w/v) SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Protogel 30 %	2,5 ml	3,33 ml	4,0 ml	1,3 ml
10 % (w/v) APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	20 µl

Es wurden jeweils Trenn- und Sammelgel frisch zubereitet und nach Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat (APS) und TEMED sofort zwischen die Glasplatten der zusammengebauten Elektrophorese-Apparatur eingefüllt. Pro Gel wurden zunächst 5 ml Trenngel eingefüllt und mit 1 ml wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach der Polymerisation (ca. 30 - 60 min) wurde das Isobutanol abgekippt und mit Wasser komplett aus dem Glasplattenzwischenraum herausgewaschen. Danach wurde der Kamm eingesetzt und die Apparatur mit 1 – 2 ml Sammelgel aufgefüllt.

Die Laufkammer wurde mit 800 ml Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 200 mM L-Glycin, 0,1% (w/v) SDS) gefüllt und je 10 µl der Proteinproben gegen 6 µl Proteinmarker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 150 V so lange durchgeführt, bis die Bromphenolblaubande aus dem Gel gelaufen war.

### 4.2.3.6 Western-Blot

#### 4.2.3.6.1 Proteintransfer auf eine Membran

Diese Methode wurde in Anlehnung an (Towbin et al., 1979) durchgeführt.

In einer Semidry-Blot-Apparatur wurden auf die Kathodenseite übereinander ein Sandwich aus 3 Lagen Filterpapier (GB002), dem Polyacrylamidgel (aus 4.2.3.5), einer Nitrocellulosemembran und erneut 3 Lagen Filterpapier gelegt. Filterpapier und Nitrocellulosemembran wurden vorher mit Blotpuffer (150 mM *L*-Glycin, 20 mM Tris, 20% (v/v) Methanol) getränkt. Nachdem Luftblasen und überschüssige Flüssigkeit aus dem Sandwich entfernt worden waren, wurde der Anodendeckel aufgelegt, mit einem Gewicht beschwert und der Proteintransfer auf die Membran wurde 90 Minuten lang bei 75 mA pro Gel durchgeführt.

#### 4.2.3.6.2 Detektion mit dem ECL™-System

Sämtliche folgenden Schritte wurden soweit nicht anders angegeben bei RT auf einem Schüttler durchgeführt.

Zum Absättigen freier Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran, wurde die Membran über Nacht bei 4°C oder mindestens 1 Stunde lang bei RT in 25 ml Coatingpuffer (TBS-T (20 mM Tris / Salzsäure pH 7.6, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) mit 10 % (w/v) Magermilchpulver) inkubiert. Anschließend wurde einmal kurz und einmal mindestens 5 min lang mit TBS-T gewaschen. Daraufhin wurde mit 25 ml des entsprechend verdünnten Antikörper in TBS-T (die verwendeten Antikörper und ihre Verdünnungen sind in Tabelle 4-5 angegeben) 1 Stunde lang inkubiert. Nach einmaligem kurzem und zweimaligem 10-minütigem Waschen mit TBS-T wurde 1 Stunde lang mit 25 ml des entsprechend verdünnten 2. Antikörper in TBS-T (Ziege-anti-Kaninchen oder Ziege-anti-Maus (für Verdünnungen siehe Tabelle 4-5)) inkubiert. Nach erneutem einmaligem kurzen, einmaligem 10-minütigem und dreimaligem 5-minütigem Waschen mit TBS-T wurde die Membran durch Abtropfen von überschüssigem TBS-T befreit und auf einer mit Parafilm™ überzogenen Glasplatte mit 800 µl ECL™-Lösung (1 : 1-Mischung aus ECL™ Lösung 1 und ECL™ Lösung 2) bedeckt. Nach einminütiger Inkubation und nachfolgender Entfernung von überschüssiger ECL™-Lösung wurde die Membran in eine Filmkassette gelegt, ein ECL™-Film aufgelegt und maschinell entwickelt.

### 4.2.3.7 Pulse-Chase-Analyse

#### 4.2.3.7.1 Wachstumsbedingungen und radioaktive *in vivo* Markierung von Hefeproteinen

Aus einer stationären Vorkultur in CM wurde so in CM-Met umgesetzt, dass die Kultur nach 16 h bei 30°C eine OD<sub>600</sub> von 4 – 5 hatte (ca. 1 : 500). Davon wurden 20 OD<sub>600</sub>-Zellen abgenommen, 3 min bei 2500 Upm zentrifugiert, ein Mal mit Wasser gewaschen und in 5 ml Labelling-Medium resuspendiert. Nach 2,5 Stunden Inkubation in einem Schüttelwasserbad bei 30°C wurden 25 µl radioaktives <sup>35</sup>S-Methionin (9,25 MBq) zugegeben und weitere 3,5 Stunden lang inkubiert. Danach wurden die Zellen 3 min bei 2500 Upm zentrifugiert, in 5,5 ml Chase-Medium aufgenommen und erneut auf dem Schüttelwasserbad bei 30°C inkubiert. Nach 0, 30, 60, 90 und 120 min wurde jeweils 1 ml Probe entnommen, zu 100 µl 110 % (w/v) TCA gegeben, gemischt und sofort bei – 80°C eingefroren.

Diese Methode wurde so durchgeführt für eine Detektion der Proteine FBPase und Ubc8p. Für Ubc8p wurde alternativ auch sofort mit Zugabe des Labelling-Mediums radioaktives <sup>35</sup>S-Methionin zugesetzt und dann 6 Stunden lang inkubiert.

Zur Detektion von Vid24p wurde radioaktives <sup>35</sup>S-Methionin erst nach 6 stündiger Inkubation in Labelling-Medium und mit der Aufnahme der zentrifugierten Zellen in CM-Met zugegeben. 30 min nach Inkubation im Wasserbadschüttler bei 30°C wurde 10 mM nicht-radioaktives Methionin zugesetzt und dann 0, 15, 30, 60 und 90 min nach Zugabe des nicht-radioaktiven Methionins je 1 ml Probe entnommen und wie oben beschrieben behandelt.

#### 4.2.3.7.2 Zellaufschluss und Immunpräzipitation

Die aufgetauten Proben wurden 15 min bei 13000 Upm zentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Zellen mit 100 µl Aceton gewaschen und getrocknet. Nach Zugabe von 100 µl BB1-Puffer (6 M Harnstoff, 1 % SDS, 1 mM EDTA, 50 mM Tris / HCl pH 7.5) wurden die Zellen mit Hilfe eines Zahnstochers resuspendiert. Nachdem 100 µl Glasperlen zugegeben worden waren, wurden die Proben 3 Mal je abwechselnd 5 min auf einem Multivortexer gerüttelt und dann 1 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und 900 µl IP-Puffer (50 mM Tris / Salzsäure pH 7.5, 190 mM NaCl, 1,25 % (w/v)

Triton X-100, 6 mM EDTA) zugegeben, der folgende Inhibitoren enthielt: Complete™ (25 x Stock in IP-Puffer) und 1 mM PMSF (200 mM Stock in Isopropanol). Nach kurzem Mischen wurde 10 min lang bei 13000 Upm zentrifugiert. 900 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 3 µl Antikörper (FBPase-Antikörper, Vid24p-Antikörper oder HA-Antikörper je nach zu detektierendem Protein) zugegeben. Die Immunpräzipitation wurde 2 Stunden lang auf einem Überkopfschüttler bei RT durchgeführt. Danach wurde 50 µl 5 % (w/v) Protein A Sepharose in IP-Puffer (wurde zuvor mind. 30 min auf einem Überkopfschüttler inkubiert) zugeben und erneut 1 Stunde auf einem Überkopfschüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurde 2 min bei 3000 Upm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 3 Mal mit IP-Puffer gewaschen. Zu den Pellets wurde daraufhin 50 µl 2 x Lämmli-Puffer (200 mM Tris / HCl pH 6.8, 5 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugesetzt)) zugegeben.

#### **4.2.3.7.3 SDS-PAGE und Detektion**

Nach 10 minütigem Lösen bei 95°C wurden die Proben 2 min lang bei 13000 Upm zentrifugiert. Mit 10 µl je Probe wurde einen SDS-PAGE durchgeführt (siehe 4.2.3.5). Nachdem die Bromphenolblaubande aus dem Gel gelaufen war, wurde die Apparatur auseinandergelassen, das Gel vom Sammelgel befreit und falten- und luftbalsenfrei auf ein auf die Gelgröße zugeschnittenes Filterpapier gelegt. Das Gel wurde anschließend auf einem Gelrockner mit angeschlossener Vakuumpumpe mind. 90 min lang bei 60°C getrocknet. Dann wurde in einer Filmkassette ein Röntgenfilm aufgelegt, um den Proteinabbau optisch sichtbar zu machen. Zur Quantifizierung des Abbaus wurde eine PhosphoImager-Plate aufgelegt, die anschließend mittels eines PhosphoImagers eingescannt wurde. Die dadurch erhaltenen Daten konnten per Computer ausgewertet werden.

#### **4.2.3.8 GST-Interaktionsstudien**

##### **4.2.3.8.1 Wachstumsbedingungen, Expression in *S. cerevisiae* und nativer Zellaufschluss**

Aus einer stationären, glucosehaltigen Vorkultur (YPD, CM ohne Ura bzw. CM ohne Leu) wurde bei sämtlichen Stämmen 1 : 12,5 in neues, glucosehaltiges Medium (YPD, CM ohne Ura bzw. CM ohne Leu) umgeimpft. Nach mindestens 7 Stunden wurde erneut umgesetzt. Sämtliche Stämme wurden so umgesetzt, dass nach 16 Stunden (bei YTS1 mit pHIT128 20 Stunden) Wachstum eine OD<sub>600</sub> von 4 – 5 resultierte. Stämme, die das Plasmid pYEX4T-1VID24 trugen (YTS1, YFJ6), wurden in CM<sub>EtOH</sub> ohne Ura, Stämme, die das Plasmid pHIT128 trugen (YTS1), wurden in CM<sub>Gal</sub> ohne Leu und Stämme ohne Plasmid (YTS3, YTS4) in YP<sub>EtOH</sub> umgesetzt. Danach wurden 30 OD<sub>600</sub>-Zellen der Stämme YTS3 und YTS4 zentrifugiert (2500 Upm 3min), in 10 ml YPD resuspendiert und nach 30 min Inkubationszeit geerntet und auf Eis gelagert. 35 OD<sub>600</sub>-Zellen des Stammes YTS1 mit pYEX4T-1VID24 bzw. 75 OD<sub>600</sub>-Zellen des Stammes YFJ6 mit pYEX4T-1VID24 wurden zentrifugiert (s.o.), in 30 ml CM ohne Ura aufgenommen, nach Zugabe von 100 µM Kupfersulfat 2 Stunden lang (YFJ6 nur 30 min) inkubiert und anschließend 75 OD<sub>600</sub>-Zellen geerntet und auf Eis aufbewahrt. Vom Stamm YTS1 mit pHIT128 wurden direkt 75 OD<sub>600</sub>-Zellen geerntet und auf Eis aufbewahrt.

Ab hier wurden sämtliche Schritte auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Sämtliche verwendeten Lösungen waren eiskalt (gilt auch für Kapitel 4.2.3.8.2). Alle Proben wurden 3 min bei 2500 Upm zentrifugiert, mit Wasser gewaschen und in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt. Die Pellets wurden in 700 µl PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) resuspendiert. Nach Zugabe von 56 µl Complete™ (25 x Stock in PBS), 10 µl PMSF (200 mM Stock in Isopropanol), 2,5 µl MG132 (40 mM Stock in DMSO), 1 µl Pefabloc (1 M Stock in H<sub>2</sub>O), 1 µl Benzamidin (2,5 M Stock in DMSO), 1 µl Inhibitor-Mix (1000 x Stock: je 1 mg / ml von Antipain, Pepstatin, Chymostatin und Leupeptin) und 300 µl Glasperlen wurden die Proben 25 min lang auf einem Multivortexer gerüttelt. Anschließend wurde 15 min bei 13000 Upm zentrifugiert und je 700 µl der Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert.

#### **4.2.3.8.2 GST-Pulldown mit GST-Fusionsproteinen exprimiert in *S. cerevisiae***

400 µl Glutathion Sepharose 4B wurde 5 min bei 2500 Upm zentrifugiert, mit 1 ml Wasser gewaschen und 300 µl PBS zugesetzt (siehe 4.2.3.8.1). Dem Säulenmaterial wurde danach die Aufschlüsse aus 4.2.3.8.1 zugesetzt. Für diesen und die nachfolgenden Schritte gab es je nach verwendeten Stämmen 2 unterschiedliche Methoden.

Bei Methode 1 wurde dem Säulenmaterial 700 µl des Aufschlusses des Stammes YFJ6 mit pYEX4T-1VID24 zugesetzt und 3 Stunden lang auf einem Überkopfschüttler rotiert. Anschließend wurde 5 min lang bei 2500 Upm zentrifugiert, 700 µl des Überstandes abgenommen und zur Fällung der Proteine mit 70 µl 110 % (w/v) TCA versetzt (ergibt Probe: „Nichtgebundene Proteine“ (ngP)). Der verbliebene Überstand wurde ebenfalls abgenommen und die Säule erst mit 1 ml PBS-260 (PBS mit 260 mM NaCl), dann mit 1 ml PBS-380 (PBS mit 380 mM NaCl) und abschließend mit 1 ml PBS-500 (PBS mit 500 mM NaCl) gewaschen. Sowohl dem PBS-260 als auch dem PBS-380 und PBS-500 wurden vorher 28 µl Complete™ (25 x Stock in PBS) und 5 µl PMSF (200 mM Stock in Isopropanol) zugesetzt. Vom abgenommenen Überstand des letzten Waschrisses (mit PBS-500) wurden 900 µl mit 90 µl 110 % (w/v) TCA versetzt (ergibt Probe: „letzter Waschriss“ (W3)). Zur verbliebenen Säule wurde 200 µl Harnstoffpuffer (siehe 4.2.3.4) gegeben und vorsichtig bei niedriger Stufe mittels eines Vortexers gemischt (ergibt Probe: „An Säule gebundene Proteine (gP)). Die mit TCA-versetzten Überstände wurden 10 min bei 13000 Upm und RT zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Pellets mit Aceton gewaschen und getrocknet. Zum Lösen der getrockneten Pellets in 200 µl Harnstoffpuffer wurden die Proben auf einem Multivortexer ca. 30 min lang bei 37°C gerüttelt. Die gelösten Proben wurden ebenso wie die mit Harnstoffpuffer versetzte Säule bei –20°C aufbewahrt.

Methode 2 funktioniert weitgehend ähnlich. Hier wurde 700 µl des Aufschlusses des Stammes YTS1 mit pYEX4T-1VID24 bzw. des Stammes YTS1 mit pHIT128 zum Säulenmaterial gegeben und 1,5 oder 3 Stunden lang auf einem Überkopfschüttler rotiert. Anschließend wurde genauso wie bei Methode 1 verfahren. Abweichend von Methode 1 wurde der Überstand des letzten Waschrisses nicht mit TCA gefällt und die Säule nicht mit Harnstoffpuffer versetzt. Die analog der Probe ngP von Methode 1 gezogene Probe wird hier „nichtgebundene GST-Proteine“ (ngG) genannt. Zur Säule wird danach 700 µl des Aufschlusses des Stammes YTS3 bzw. YTS4 gegeben, dem vorher nochmals frisch die gleiche Menge an Inhibitoren wie beim Aufschluss zugegeben worden war. Nach 90 minütiger, 3 stündiger oder 16 stündiger Inkubation auf einem Überkopfschüttler, wurde exakt wie bei Methode 1 fortgefahren.

Die aufgetauten gP-Proben wurden zum Ablösen der an die Säule gebundenen Proteine 10 min bei 95°C inkubiert, kurz vorsichtig geschüttelt und 2 min lang bei 13000 Upm und RT zentrifugiert. Die anderen Proben (ngP, ngG und W3) wurden 2 min bei 95°C aufgekocht und 1 min bei 13000 Upm und RT zentrifugiert. Jeweils 10 µl der Proben wurden für die SDS-PAGE (siehe 4.2.3.5) verwendet.

#### 4.2.3.8.3 Wachstumsbedingungen, Expression in *E. coli* und Zellaufschluss

Zur Expression von GST-Fusionsproteinen wurde der *E. coli*-Stamm BL21 verwendet. Dazu wurden der BL21-Stamm mit dem pGEX-4T-1-Plasmid bzw. mit pGEX-4T-1-Plasmiden mit unterschiedlichen Inserts (pGEX-4T-1\_Vid24, pGEX-4T-1\_Ubc8(gereifte Form), pGEX-4T-1\_Ubc8, pGEX-4T-1\_C126S-Ubc8 und pJR10) transformiert (siehe 4.2.2.2) und die plasmidtragenden Stämme zur Expression von GST bzw. GST-Fusionsproteinen verwendet. Dazu wurde eine 4 ml große über-Nacht-Kultur dieser Stämme in LB<sub>Amp</sub> dazu benutzt, um mit 2,5 ml davon eine 200 ml Hauptkultur in 2 x YTAG (vorher vorgewärmt auf 30°C) anzupflanzen. Nach 2,5 stündiger Inkubation wurde 100 µl Probe abgenommen, 30 s bei 13000 Upm zentrifugiert, das Pellet in 44 µl PBS und 14 µl 4 x Lämmli-Puffer (400 mM Tris / HCl pH 6.8, 10 % (w/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugesetzt)) resuspendiert und bei – 20°C gelagert (ergibt Probe: „Vor Induktion“ (vI)). Die verbliebene Kultur wurde mit 500 µl IPTG (100 mM in H<sub>2</sub>O) versetzt und erneut 2,5 Stunden lang inkubiert. Anschließend wurde 10 min lang bei 8000 Upm und 4°C zentrifugiert und die Zellen in 10 ml eisgekühltem PBS (siehe 4.2.3.8.1) resuspendiert. Davon wurde 10 µl abgenommen, mit 34 µl PBS und 14 µl 4 x Lämmli-Puffer versetzt und bei – 20°C gelagert (ergibt Probe: „Nach Induktion“ (nI)). Die in PBS resuspendierten Zellen wurden gleichmäßig auf 2 15-ml-Falcontubes verteilt und durch Ultraschall aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen 5 Mal je abwechselnd 5 – 10 s mittels eines Sonifikators mit Ultraschall behandelt und danach 1 min auf Eis stehen gelassen. Danach wurde der Erfolg des Aufschlusses durch Betrachten der Zellen unter dem Lichtmikroskop überprüft. Anschließend wurden die aufgeschlossenen Zellen wieder vereinigt, mit 500 µl Triton-X-100 (20 % (w/v) in H<sub>2</sub>O) versetzt und 30 – 45 min bei RT auf einem Überkopfschüttler rotiert. Dann wurden die Zellen 10 min lang bei 10000 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vom Pellet abgetrennt. Vom Überstand wurden 15 µl entnommen, mit 29 µl PBS und 14 µl 4 x Lämmli-Puffer versetzt und bei – 20°C gelagert (ergibt Probe: „gelöste Proteine“ (gP)). Eine etwa zahnstocherkopfgroße Menge des Pellets wurde in 88 µl PBS resuspendiert, mit 28 µl 4 x Lämmli-Puffer versetzt und bei – 20°C gelagert (ergibt Probe: „unlösliche Proteine“ (uP)). Der verbliebene Überstand wurde bei – 20°C eingefroren bzw. auf Eis gelagert. Die 4 genommenen Proben (vI, nI, gP und uP) wurden 5 min bei 95°C gekocht, 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert und davon jeweils 10 µl für eine SDS-PAGE verwendet (siehe 4.2.3.5). Das resultierende Gel wurde mit Coomassie-Staining angefärbt (siehe 4.2.3.21.1), um zu überprüfen, ob das zu exprimierende GST-Fusionsprotein bzw. GST selbst exprimiert wurde

und beim Aufschluss in Lösung gegangen war. War beides erfüllt, konnte der erhaltene Überstand für den GST-Pulldown (4.2.3.8.4) verwendet werden.

#### **4.2.3.8.4 GST-Pulldown mit GST-Fusionsproteinen exprimiert in *E. coli***

133 µl Glutathion Sepharose 4B wurden 5 min bei 2500 Upm zentrifugiert, mit 1 ml PBS gewaschen und in 100 µl PBS aufgenommen. Zum Säulenmaterial wurde dann 10 ml des Aufschlusses der Zellen aus 4.2.3.8.3, die GST-Fusionproteinen exprimierten, bzw. 1 ml des Aufschlusses der Zellen aus 4.2.3.8.3, die GST exprimierten, gegeben und 3 Stunden lang auf einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Säule 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 15 µl abgenommen, mit 29 µl PBS und 14 µl 4 x Lämmli-Puffer versetzt und bei – 20°C gelagert (ergibt Probe: „nicht an die Säule gebundene Proteine“ (nSgP)). Der restliche Überstand wurde abgenommen und die Säule 2 mal mit eiskaltem PBS und 1 mal mit eiskaltem PBS-500 (siehe 4.2.3.8.2) gewaschen. 10 µl der Säule wurden abgenommen, mit 34 µl PBS und 14 µl 4 x Lämmli-Puffer versetzt und bei – 20°C gelagert (ergibt Probe: „an die Säule gebundene Proteine“ (SgP)). Mit dieser (SgP) und der nSgP-Probe wurde so verfahren wie mit den 4 genommenen Proben (vI, nI, gP und uP) aus 4.2.3.8.3. Im angefärbten Gel konnte eine Bindung des GST bzw. GST-Fusionsprotein an das Säulenmaterial überprüft werden.

Zur Säule mit dem gebundenen GST bzw. GST-Fusionsprotein wurde 700 µl des Aufschlusses der Stämme YTS3 bzw. YTS4 aus 4.2.3.8.1 gegeben, wobei diesen Aufschlüssen nur Complete™ und PMSF zugegeben worden war. Nach Inkubation der Säule über Nacht auf einem Überkopfschüttler bei 4°C wurde analog zu Methode 1 aus 4.2.3.8.2 verfahren. Einzige Abweichung war, dass die gewaschene Säule nur in 100 µl Harnstoffpuffer aufgenommen wurde. Das Lösen der Proben und die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte ebenfalls so wie in diesem Kapitel angegeben.

#### **4.2.3.9 Co-Immunopräzipitation**

##### **4.2.3.9.1 Wachstumsbedingungen und Probennahme**

Aus einer stationären Vorkultur in YPD oder CM ohne Ura wurde 1 : 12,5 in YPD oder CM ohne Ura umgeimpft. Nach mindestens 7 h Wachstum wurde so in YPEtOH bzw CMEtOH ohne Ura umgesetzt (ca. 1 : 10), dass nach 16 h Inkubationszeit eine OD<sub>600</sub> von 4 – 5 resultierte. Für jeden Zeitpunkt wurden 50 OD<sub>600</sub>-Zellen zentrifugiert (3 min 2500 Upm). Die 0-Probe wurde auf Eis gelagert. Die 25 min Probe wurde in YPD bzw. CM ohne Ura, welchen 100 µM Kupfersulfat zugesetzt worden waren, aufgenommen, 25 min bei 30°C inkubiert und 3 min bei 2500 Upm und 4°C zentrifugiert. Sämtliche Proben wurden auf Eis gelagert und mit 1 ml kaltem H<sub>2</sub>O gewaschen.

#### **4.2.3.9.2 Zellaufschluss**

##### **4.2.3.9.2.1 Nativer Glasperlenaufschluss**

Sämtliche Schritte wurden bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt. Die Proben wurden in 500 µl HEPES-Puffer (50 mM HEPES pH 7.0, 50 mM Kaliumacetat, 5 mM Magnesiumacetat, 100 mM Sorbitol) resuspendiert, der folgende Inhibitoren enthielt: Complete™ (25 x Stock in HEPES), 1 mM PMSF (200 mM Stock in Isopropanol), 100 µM MG132 (40 mM Stock in DMSO), 1 mM Pefabloc (1 M Stock in H<sub>2</sub>O), 2,5 mM Benzamidin (2,5 M Stock in DMSO), 1 µl / ml Inhibitor-Mix (1000 x Stock: je 1 mg / ml von Antipain, Pepstatin, Chymostatin und Leupeptin). Nach Zugabe von 300 µl Glasperlen wurden die Proben 20 min lang auf einem Multivortexer gerüttelt und dann 10 min lang bei 13000 Upm zentrifugiert. 450 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

##### **4.2.3.9.2.2 Denaturierender Glasperlenaufschluss**

Die Proben wurden in 300 µl BB1-Puffer (siehe 4.2.3.7.2) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Glasperlen wurden die Proben 3 Mal je abwechselnd 5 min auf einem Multivortexer gerüttelt und dann 1 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt, 900 µl HEPES-Puffer mit oben aufgeführten Inhibitoren (4.2.3.9.1) zugegeben, gemischt und dann 10 min lang bei 13000 Upm zentrifugiert. 900 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### 4.2.3.9.3 Immunopräzipitation

Nach Zugabe von 30 µl Protein A Sepharose gekoppeltem HA-Antikörper (gewaschen mit 1 ml HEPES-Puffer, 5 min bei 2500 Upm zentrifugiert und aufgefüllt mit HEPES-Puffer auf die ursprüngliche Flüssigkeitshöhe) wurde die Immunopräzipitation 2 h 45 min lang auf einem Überkopfschüttler bei 4°C durchgeführt. Danach wurde 30 µl 5 % (w/v) Protein A Sepharose in HEPES-Puffer (wurde zuvor mind. 30 min auf einem Überkopfschüttler inkubiert) zugeben und erneut 30 min auf einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 2 min bei 3000 Upm und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 3 Mal mit kaltem HEPES-Puffer gewaschen. Zu den Pellets wurde daraufhin 50 µl 2 x Lämmli-Puffer (siehe 4.2.3.7.2) zugegeben. Nach 5 – 10 minütigem Lösen bei 95°C wurden die Proben kurz vorsichtig geschüttelt und dann 2 min lang bei 13000 Upm zentrifugiert. Mit 10 µl je Probe wurde dann einen SDS-PAGE (siehe 4.2.3.5) und nachfolgend ein Western-Blot (4.2.3.6) durchgeführt.

Alternativ wurde die Immunopräzipitation mit 3 µl FBPase-Antikörper, 3 µl HA-Antikörper oder 40 µl Protein A Sepharose gekoppeltem FBPase-Antikörper (aus 4.2.3.17) über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler durchgeführt.

### 4.2.3.10 Antikörperaufreinigung

#### 4.2.3.10.1 Mit Hilfe des Deletionsstammes

1,5 ml eines Glasperlenaufschlusses (z.B. analog Aufschluss in 4.2.3.14) eines Hefe-Deletionsstammes (z.B. W303-1BKO) wurde 2 Stunden lang in einem 1,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammen mit einer dafür zugeschnittenen Nitrocellulosemembran auf einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Lösung abgeschüttelt, die Membran 3 Mal mit 1 ml TBS-T (siehe 4.2.3.6.2) gewaschen, 1 ml des entsprechenden Antikörper zugegeben und erneut 1 Stunde lang bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Der so aufgereinigte Antikörper wurde abgenommen und für spätere Verwendung bei – 20°C eingefroren.

#### 4.2.3.10.2 Mit Hilfe einer Affinitätssäule

##### 4.2.3.10.2.1 Herstellung der Affinitätssäule

450 mg Epoxy-activated Sepharose 6B wurde in 4,5 ml H<sub>2</sub>O gequollen und mit 90 ml H<sub>2</sub>O in einer Glasfritte gewaschen. Die trockene Sepharose wurde rausgekratzt und in ein 15-ml-Falcontube gefüllt. Die Sepharose-Säule wurde 2 Mal mit CB (20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / NaOH pH 10.2) gewaschen (jeweils 1 min 1000 Upm zentrifugieren). Der Peptid, der aus dem Vid24p stammt und zum Herstellen des Antikörper benutzt worden war, wurde in 160 µl CB gelöst, auf 1600 µl mit CB verdünnt und auf die Säule gegeben. Das Ganze wurde über Nacht auf einem Überkopfschüttler rotiert. Danach wurde 1 min bei 1000 Upm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um nicht gebundene Peptide zu entfernen, wurde die Säule 5 Mal mit 2 ml CB gewaschen und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Von allen Überständen wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (siehe 4.2.3.20) bestimmt, um sicher zu stellen, dass nicht gebundenen Proteine vollständig entfernt worden sind. Anschließend wurde die Säule 3 Mal mit 2 ml Ethanolamin (1 M in H<sub>2</sub>O, pH 8.0) gewaschen und zum Absättigen der verbliebenen reaktiven Gruppen der Säule wurde über Nacht bei 30°C auf einem Überkopfschüttler mit 2 ml Ethanolamin inkubiert. Daraufhin wurde zum vollständigen Waschen die Säule 5 Mal je nacheinander zuerst mit Waschlösung A (0,1 M NaOAc / HOAc pH 4.0, 0,5 M NaCl) und dann mit Waschlösung B (0,1 M Tris / HCl pH 8.0, 0,5 M NaCl) gewaschen. Danach wurde das Säulenmaterial aus dem Falcontube mit Hilfe des Waschpuffers B in ein Econo-Column (BioRad, Hercules, USA) überführt. Nach Äquilibrieren der Säule mit 10 ml PBS (140 mM NaCl, 2, 7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.5) wurde 10 mM NaN<sub>3</sub> zugefügt und die Säule bei 4°C aufbewahrt.

##### 4.2.3.10.2.2 Aufreinigung des Antikörpers

Die auf RT erwärmte Säule wurde mit 70 ml PBS (siehe 4.2.3.10.2.1) gewaschen. 3 ml Vid24p-Antikörper wurde 4 min bei 13000 Upm zentrifugiert und nach Vermischen mit 1,5 ml PBS vorsichtig auf die Säule aufgetropft. Den verdünnten Antikörper ließ man 3 Mal langsam und 1 Mal sehr langsam durch die Säule laufen. Der Durchlauf wurde in 1,5 ml Aliquots bei 4°C für spätere Chromatographien aufbewahrt. Die Säule wurde danach mit 30

ml PBS gewaschen und der Durchlauf in 6 Fraktionen zu je 1 ml und einer finalen 7. zu 24 ml gesammelt. Über eine Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 4.2.3.20) der 7 Durchlaufraktionen wurde sichergestellt, dass sämtliche nicht gebundenen Antikörperbestandteile von der Säule gewaschen worden waren. Der gebundene Antikörper wurde mit 15 ml 0,1 M Glycin pH 2.8 eluiert und in 1 ml Fraktionen gesammelt. Sämtliche Fraktionen wurden sofort durch Zugabe (bzw. Vorlegen) von 80 µl 1 M Tris / HCL pH 8.0 und Mischen neutralisiert. Die gesammelten Fraktionen wurden auf Eis gelagert und mit ihnen eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt, um die Fraktion herauszufinden, welche die höchste Antikörper-Menge beinhaltet. Im Unterschied zum normalen Protokoll der Proteinbestimmung (siehe 4.2.3.20) wurde hier nur 10 µl bzw. 50 µl der Fraktionen zu 1 ml Bradford-Lösung gegeben. Die Fraktionen mit der höchsten Antikörper-Menge wurden dann im Western-Blot (4.2.3.6) getestet. Die Säule wurde wie bei 4.2.3.10.2.1 beschrieben 5 Mal im Wechsel mit Waschpuffer A und B gewaschen, mit PBS äquilibriert, mit 10 mM NaN<sub>3</sub> versetzt und bei 4°C gelagert. Die Säule konnte für weitere Aufreinigungen von Vid24p-Antikörper verwendet werden.

#### 4.2.3.11 Ubiquitinierungsuntersuchungen

Die Proben aus 4.2.1.2.2 wurden 3 min bei 2500 Upm und 4°C abzentrifugiert, mit eiskaltem Wasser gewaschen und in 1 ml eiskaltem Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl 110 % (w/v) TCA und kurzem Mischen wurde die Proben entweder 10 min auf Eis inkubiert oder bei – 80°C eingefroren. Nach evtl. Auftauen wurden die Zellen 15 min bei 13000 Upm zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mit 300 µl Aceton gewaschen und getrocknet. Nach Zugabe von 300 µl BB1-Puffer (siehe 4.2.3.7.2) wurden die Zellen mit Hilfe eines Zahnstochers resuspendiert. Nachdem 300 µl Glasperlen zugegeben worden waren, wurden die Proben 3 Mal je abwechselnd 5 min auf einem Multivortexer gerüttelt und dann 1 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und 900 µl IP-Puffer (siehe 4.2.3.7.2) zugegeben, der folgende Inhibitoren enthielt: Complete™ (25 x Stock in HEPES), 1 mM PMSF (200 mM Stock in Isopropanol) und Ubiquitinaldehyde (1 µl / ml). Nach kurzem Mischen wurde 10 min lang bei 13000 Upm zentrifugiert. 900 µl des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 3 µl FBPase-Antikörper zugegeben. Die Immunpräzipitation wurde 2 Stunden lang auf einem Überkopfschüttler bei RT durchgeführt. Danach wurde 50 µl 5 % (w/v) Protein A Sepharose in IP-Puffer (wurde

zuvor mind. 30 min auf einem Überkopfschüttler inkubiert) zugeben und erneut 1 Stunde auf einem Überkopfschüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurde 2 min bei 3000 Upm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 3 Mal mit IP-Puffer gewaschen. Zu den Pellets wurde daraufhin 50 µl 2 x Lämmli-Puffer (siehe 4.2.3.7.2) zugegeben. Mit 10 µl je Probe wurde dann ein SDS-PAGE (siehe 4.2.3.5) und nachfolgend ein Western-Blot (4.2.3.6) durchgeführt.

#### 4.2.3.12 Zellfraktionierung

Diese Methode wurde in Anlehnung an (Harding et al., 1995) und (Lang et al., 1998) durchgeführt.

10 OD<sub>600</sub> Hefezellen wurden 5 Minuten lang bei 2000 Upm azentrifugiert und mit 1 ml DTT-Puffer (10 mM Tris / NaOH pH 9.4, 10 mM DTT) gewaschen. Das Pellet wurde in 5 ml DTT-Puffer resuspendiert und 30 Minuten lang bei 30°C auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde 5 Minuten lang bei 2000 Upm zentrifugiert und das Pellet in 5 ml Sphäroplasten-Puffer (1 M Sorbitol, 20 mM PIPES, pH 6.8) gelöst. Nach Zugabe von 0,05 mg Zymolyase 100 T in Wasser (Zymolyase wurde 30 Minuten lang in einem Vibrofix bei 37°C gelöst) wurde 20 Minuten lang bei 30°C inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Reaktionsgefäß 4 - 5 mal gewendet. Anschließend wurde bei 800 x g 5 Minuten lang zentrifugiert, vorsichtig mit abgeschnittener Spitze in 1 ml Späroplasten-Puffer resuspendiert und erneut 5 Minuten bei 800 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 700 µl Lyse-Puffer (200 mM Sorbitol, 20 mM PIPES, pH 6.8) ganz vorsichtig innerhalb von 4 Minuten mit abgeschnittener Spitze resuspendiert und 5 - 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert (inklusive Resuspensionszeit). Nach der Hälfte der Standzeit wurde das Reaktionsgefäß einmal gewendet. Daraufhin wurde 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert und 100 µl des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dort so mit TCA versetzt, dass die TCA eine Endkonzentration von 10 % (w/v) erreichte. Dieses Reaktionsgefäß, welche die Gesamtproteinmenge enthielten, wurde mit G gekennzeichnet und auf Eis gestellt. Weiter 400 µl des Überstandes (der restliche Überstand und das Pellet wurden verworfen) wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten bei 6000 x g und 4 °C zentrifugiert. Erneut wurden 100 µl Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt, mit TCA bis zu einer Endkonzentration von 10 % (w/v) versetzt und auf Eis gestellt. Dieses Reaktionsgefäß enthielt die cytosolischen Proteine und wurde mit S<sub>6</sub> gekennzeichnet. Der verbliebene

Überstand wurde abgenommen und das Pellet 2 mal mit Lyse-Puffer gewaschen, in 100 µl Wasser resuspendiert, mit TCA bis zu einer Endkonzentration von 10 % (w/v) versetzt und auf Eis gestellt. Dieses Reaktionsgefäß enthielt die vakuolären Proteine und wurde mit P<sub>6</sub> gekennzeichnet. Nach 10 - 30 Minuten auf Eis wurden sämtlich Proben (G, S<sub>6</sub> und P<sub>6</sub>) 10 Minuten lang bei 14000 Upm zentrifugiert und mit Aceton gewaschen. Das Pellet wurde in 50 µl Harnstoffpuffer (siehe 4.2.3.4) aufgenommen und 10 µl je Probe für eine SDS-PAGE (siehe 4.2.3.5) verwendet.

#### **4.2.3.13 Subzelluläre Fraktionierung (Sucrosedichtegradient)**

Diese Methode wurde in Anlehnung an die von (Antebi and Fink, 1992) publizierte Methode zur Reinigung von Zellkompartimenten angewandt, die jedoch wichtige Modifikationen von (Egner et al., 1995) berücksichtigt.

1000 OD<sub>600</sub>-Zellen der 0- bzw. 30 min-Probe einer nach Standardbedingungen (4.2.1.2.1.1) herangezogenen Hefekultur wurden 10 min bei 3700 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 30 ml kalter 10 mM Natriumazidlösung gewaschen und 10 min bei 500 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 9 ml Sphäroplastenpuffer (1,4 M Sorbitol, 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,5, 10 mM NaN<sub>3</sub>, 40 mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Zu dieser Zellsuspension wurden 3 mg Zymolyase 100-T zugegeben. Diese Enzymmenge wurde 1 h zuvor in 1 ml Sphäroplastenpuffer gelöst, da die Zymolyase sehr schlecht löslich ist. Die Sphäroplastierung erfolgte bei 30°C unter leichtem Schütteln im Wasserbad. Um den Grad der Sphäroplastierung zu verfolgen, wurden sofort nach Zugabe des Enzyms zwei 5 µl Proben entnommen und mit jeweils 995 µl Wasser bzw. Sphäroplastenpuffer versetzt. Von beiden Proben wurde die OD<sub>600</sub> gemessen und der Vorgang nach 10 min wiederholt. Als der OD<sub>600</sub>-Wert in Wasser nur noch 20 % des OD<sub>600</sub>-Wertes in Sphäroplastenpuffer betrug wurde die Sphäroplastierung beendet und die Sphäroplasten bei 4°C zentrifugiert (10 min, 500 x g). Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Das Pellet wurde mit 10 ml kaltem Sphäroplastenpuffer gewaschen, wobei jeder ml einzeln zugegeben und dazwischen mit einem Glasstab resuspendiert wurde. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml kaltem Lysepuffer (0,8 M Sorbitol, 10 mM MOPS pH 7,2, 1 mM EDTA) vorsichtig resuspendiert und 20 µl Complete-Inhibitormix sowie 1 mM PMSF zugegeben. Die Lyse der Sphäroplasten erfolgte im Dounce Homogenisator (Stempel B, 15 ml) durch 30-60 Stöße, wobei eine Schaumbildung vermieden wurde. Danach wurde der Ansatz zur Abtrennung der

Zelltrümmer 10 min bei 2000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellysate (1 ml) wurde dann auf einen 10-stufigen Sucrosegradienten aufgetragen, dessen 1 ml Stufen folgende Dichten besaßen: 18, 22, 26, 30, 34, 38, 42, 46, 50, 54 % (w/v) Sucrose gelöst in HEPES-Puffer (10 mM HEPES, 1 mM Magnesiumchlorid, pH 6.8). Nach der Ultrazentrifugation, die unter Verwendung des SW40Ti-Rotors 3 h lang bei 34000 x g und 4°C durchgeführt wurde, zerlegte man den Gradienten in 18 Fraktionen zu jeweils 610 µl. 200 µl jeder Fraktion wurde mit 10 % (w/v) TCA gefällt und in 50 µl Harnstoffpuffer (siehe 4.2.3.4)) durch 10 minütiges Erhitzen auf 95°C gelöst. Je 10 µl der zentrifugierten Proben (13000 Upm 1 min) wurden für eine SDS-PAGE (4.2.3.5) verwendet.

#### 4.2.3.14 Glyceringradient

Diese Methode wurde in Anlehnung an (Kim et al., 1997) durchgeführt.

Aus einer nach Standardbedingungen herangezogenen Kultur (siehe 4.2.1.2.1.1) wurde 25 min nach Induktion des Abbaus der FBPase eine Probe von 50 OD<sub>600</sub>-Zellen genommen und 3 min bei 2500 Upm und 4°C zentrifugiert. Nach Waschen mit eiskaltem Wasser wurden die Zellen in 520 µl eiskaltem Phosphatpuffer (0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0) resuspendiert. Nach Zugabe von 280 µl Complete™ (25 Mal Stock in Phosphatpuffer), 35 µl PMSF (200 mM in Isopropanol) und 300 µl Glasperlen wurde 30 min lang auf einem Multivortexer bei 4°C gerüttelt. Anschließend wurde 15 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert. 200 µl des Überstandes wurden abgenommen und vorsichtig auf einen Glyceringradienten (jeweils 450 µl 50 %, 40 %, 30 %, 20 % und 10 % (v/v) Glycerin in 20 mM PIPES pH 7.0 vorsichtig übereinander geschichtet in einem Ultrazentrifugenröhrchen) gegeben. Der Gradient wurde danach in einer Tischultrazentrifuge bei 55000 Upm und 15°C in einem TLS-55-Rotor (Beckman Coulter, Fullerton, USA) 4 h lang rotiert. Anschließend wurden von oben beginnend vom Gradienten Fraktionen mit 200 – 220 µl abgenommen. Zu den 9 – 10 Fraktionen wurde jeweils 20 bzw. 22 µl 110 % (w/v) TCA zugegeben, gemischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach 10 minütigem Zentrifugieren bei 13000 Upm wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit Aceton gewaschen und getrocknet. Die Pellets wurde in 50 µl Harnstoffpuffer (siehe 4.2.3.4) resuspendiert, zum Lösen ca. 30 min auf einem Multivortexer bei 37°C gerüttelt und 2 min bei 95°C inkubiert. Nach 1 minütigem Zentrifugieren bei 13000 Upm wurden 10 µl je Probe auf ein SDS-Gel (siehe 4.2.3.5) aufgetragen. Die erhaltene

Membran (4.2.3.6) wurde mit den gewünschten Antikörpern (FBPase-, PGK-, FAS-, API- und HA-Antikörper) angefärbt.

#### **4.2.3.15 FPLC**

##### **4.2.3.15.1 Wachstumsbedingungen und nativer Aufschluss**

Aus einer nach Standardbedingungen (siehe 4.2.1.2.1.1) gewachsenen Kultur wurde eine 200 OD<sub>600</sub>-Zellen große 0-Probe und ebenso große 15-min-Probe entnommen. Die Zellen wurden 3 min bei 2500 Upm und 4°C zentrifugiert, mit eiskaltem Wasser gewaschen, in 1 ml eiskaltem Phosphatpuffer (0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.0) aufgenommen und mit 60 µl Complete™ (25 x Stock in Phosphatpuffer), 7,5 µl PMSF (200 mM in Ethanol) und 500 µl Glasperlen versetzt. Nach 30 minütigem Rütteln auf einem Multivortexer wurde 10 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Zentrifugationschritt wurde so oft wiederholt, bis der Überstand komplett schwebstofffrei war.

##### **4.2.3.15.2 Auftrennung auf der Superose6-Säule**

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde eine Superose6-Säule verwendet. Um die Säule nicht zu verstopfen, wurden ausschließlich schwebstofffreie Puffer und Proben verwendet. Die Säule und die angeschlossene Pumpe wurden vor Versuchsbeginn gründlich mit Phosphatpuffer (siehe 4.2.3.15.1) gespült. Die Flussrate bei allen Experimenten betrug 0,5 ml / min. Nach jedem Durchlauf eines Proteingemisches wurde die Säule mindestens 1 Stunde lang mit Phosphatpuffer gespült.

Zur Eichung der Säule wurden 3 Markerproteine (Aldolase mit 160 kDa, Catalase mit 240 kDa und Ferritin mit 450 kDa) verwendet. Lösungen dieser Proteine in Wasser wurden auf die Säule gegeben und mittels eines am Ende der Säule angeschlossenen Durchflussphotometers, welcher bei 260 nm sämtlich Proteine spektrometrisch messen kann, mit Schreiber konnte die Flüssigkeitsmenge bestimmt werden, nach welcher die Hauptmenge der Proteine die Säule verlassen hatte.

Um die Größe von Hefeproteinen zu bestimmen, wurde 200 µl eines Aufschlusses aus 4.2.3.15.1 auf die Säule aufgetragen und die aus der Säule laufende Flüssigkeit in Fraktionen

zu 333  $\mu\text{l}$  oder 666  $\mu\text{l}$  gesammelt. Das Sammeln der Fraktionen begann 20 min nach Auftragen der Probe auf die Säule und endete nach weiteren 20 min. Somit wurden die ml 11 – 20 in Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen wurden mit 33  $\mu\text{l}$  bzw. 67  $\mu\text{l}$  110 % (w/v) TCA gefällt, 20 min auf Eis inkubiert, 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert, mit Aceton gewaschen, getrocknet und in 50  $\mu\text{l}$  Harnstoffpuffer (siehe 4.2.3.4) aufgenommen. Die Proben wurden durch 30 minütiges Rütteln auf einem Multivortexer und nachfolgendes 2 minütiges Kochen bei 95°C gelöst. Nach 1 min Zentrifugieren bei 13000 Upm wurden 10  $\mu\text{l}$  je Probe für die SDS-PAGE (siehe 4.2.3.5) verwendet.

#### 4.2.3.16 Indirekte Immunfluoreszenz

Alle Lösungen und Medien wurden vor der Verwendung sterilfiltriert, um die Bildung von fluoreszierenden Maillard-Verbindungen zu verhindern. Die Durchführung der Immunfluoreszenz erfolgte in Anlehnung an (Pringle et al., 1989) und (Pringle et al., 1992).

Zu 3 OD<sub>600</sub>-Zellen einer nach Standardbedingungen (siehe 4.2.1.2.1.1) gezogenen Probe wurde 125  $\mu\text{l}$  Formaldehyd (37 % (v/v) in H<sub>2</sub>O) und 125  $\mu\text{l}$  Phosphat-Puffer (1 M Kaliumphosphat pH 6.5) gegeben. Nach wenigstens 2 stündiger Inkubation bei RT rollend auf einem Überkopfschüttler wurde 5 min bei 2000 Upm zentrifugiert und 3 mal mit 1 ml SP-Puffer (1,2 M Sorbitol, 0,1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 6.5) gewaschen. Danach wurden die Zellen in 1 ml SP-Puffer resuspendiert, welcher 20 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol und 22,5  $\mu\text{g}$  Zymolyase T100 / ml enthielt, und 30 min lang bei 30°C ohne Schütteln spheroplastiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1000 Upm, wurde mit 1 ml SP-Puffer gewaschen, in 1 ml SP-Puffer resuspendiert und bei 4°C gelagert.

Damit die Sphäroplasten bei der Immunfluoreszenz auf den verwendeten Objektträgern haften konnten, wurden diese zuerst mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dazu wurden in jede Vertiefung des Objektträgers 3  $\mu\text{l}$  Poly-L-Lysin-Lösung (6 mg /ml) gegeben, ein paar s draufgelassen und wieder abgenommen. Nach 5 maligem Waschen mit 20  $\mu\text{l}$  Wasser ließ man den Objektträger 1 min lang trocknen.

30  $\mu\text{l}$  Sphäroplastenlösung wurden auf einen beschichteten Objektträger getropft und 5 - 30 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Die gebundenen Zellen wurden nun dreimal mit PBS-Puffer (53 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 13 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 75 mM NaCl, pH 7.4) gewaschen und 30 min mit 15  $\mu\text{l}$  PBT-Puffer (PBS-Puffer mit 1 % BSA, 0,5  $\mu\text{l}$  NonidetP40 / ml) behandelt. Dann wurde der erste Antikörper (Maus-Anti-Ha, 1 : 200 in PBT-Puffer) auf die Sphäro-

plasten aufgetragen und der Ansatz 2 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen der Zellen mit PBT-Puffer erfolgte die Inkubation (1,5 h) mit dem zweiten Antikörper (Ziege-Anti-Maus-cy<sup>3</sup>, 1 : 1000 in PBT-Puffer) in einer feuchten Kammer unter Lichtausschluss. Anschließend wurde nochmals fünfmal mit PBS gewaschen. Zur besseren Lokalisierung des Zellkerns wurde die DNA mit dem Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) markiert. Dazu wurden auf die mit PBS-Puffer gewaschenen Sphäroplasten 1 Tropfen DAPI-Lösung (200 µl Citifluor + 8 µl DAPI (1 µg / ml)) gegeben. Der Objektträger wurde anschließend mit einem Deckglas bedeckt und mit Nagellack abgedichtet. Die gelabelten Zellen wurden nun unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

#### **4.2.3.17 Kopplung eines Antikörpers an Protein A Sepharose**

Die im Anschluss beschriebene Methode wurde zur kovalenten Kopplung eines Antikörpers (FBPase-Antikörper) mit Protein A-Sepharose verwendet. Der auf diese Weise gekoppelte Antikörper eignet sich zum Einsatz bei einer Immunopräzipitation, da die störende, breite IgG-Bande, die sonst immer auftritt, dann nicht mehr immunologisch nachweisbar ist.

Vor der Kopplungsreaktion wurden 100 mg Protein A-Sepharose in 400 µl HEPES-Puffer (siehe 4.2.3.9.2.1) 20 min quellen gelassen. Danach wurden 150 µl FBPase-Antikörper zugegeben und 2 h bei RT über Kopf geschüttelt. Nachdem der Antikörper an die Protein A-Sepharose gebunden hatte, wurde der Ansatz 5 min bei 2000 Upm zentrifugiert und das Pellet zum Entfernen des überschüssigen Antikörpers zweimal mit 4 ml 0,2 M Natriumboratlösung (pH 9.0) gewaschen. Anschließend wurde die Protein A Sepharose in 4 ml 0,2 M Natriumboratlösung (pH 9.0) resuspendiert und davon 10 µl als Kontrollprobe entnommen. Der restliche Ansatz wurde zur kovalenten Kopplung mit 20 mM Dimethylpimelimidat versetzt, für 30-60 min unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert und eine zweite Kontrollprobe (10 µl) gezogen. Die Kopplungsreaktion wurde durch Waschen mit 4 ml 0,2 M Ethanolamin (pH 8.0) gestoppt. Daran schloss sich ein zweiter Waschschrift mit 4 ml 0,2 M Ethanolamin (pH 8.0) an, der unter leichtem Schütteln 2 h lang bei RT durchgeführt wurde. Nach diesem letzten Waschschrift wurde die mit FBPase gekoppelte Protein A-Sepharose in 400 µl PBS-Puffer (53 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 13 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 75 mM NaCl, pH 7.4) resuspendiert und davon 40 µl zur Immunopräzipitation (4.2.3.9.3) verwendet. Die beiden Kontrollproben wurden in 40 µl 2 x Lämmli-Puffer (200 mM Tris / HCl pH 6.8, 5 % SDS, 20 % Glycerin, 0,05 % Bromphenolblau, 1,5 % DTT) aufgenommen, 10 min bei 95°C gekocht, 1 min bei

13000 Upm zentrifugiert und zur Überprüfung der Kopplungseffizienz 10 µl für eine SDS-PAGE (siehe 4.2.3.5) eingesetzt.

#### **4.2.3.18 Vesikeltest**

1 ml einer über-Nacht-Kultur in YPD wurden 3 min bei 2500 Upm zentrifugiert, 2 mal mit 1 ml Wasser gewaschen und in 1 ml 1%KAc resuspendiert. Dem 1%KAc wurde zum einen 1 mM PMSF (Kontrollstämme: WCG4a und YMS30) und zum anderen kein PMSF (Kontrollstämme: WCG4a und YMTA) zugegeben. Nach 4 – 5 stündigem Inkubieren bei 30°C auf einem Schüttler, wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop angeschaut und auf das Auftreten von Vesikeln in der Vakuole hin untersucht.

#### **4.2.3.19 Überlebenstest**

Aus einer stationären Vorkultur des zu testenden Stammes in YPD wurde 1 : 1000 in YPKG umgesetzt. Jeweils nach 40, 48, 64 und 72 stündiger Inkubation wurde 10 µl Kultur entnommen, mit 90 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und mit 100-fach konzentrierter Methylenblaulösung versetzt. Nach kurzer Inkubation wurde das Gemisch in einer Mikroskopzählkammer unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Nun wurde die Zellzahl gezählt und die Anzahl der blauen Zellen bestimmt. Das Methylenblau kann nur in tote Zellen nicht aber in lebende Zellen eindringen. Dadurch kann der Anteil der toten bzw. lebenden Zellen bestimmt werden. Pro Stamm und Zeitpunkt wurden ca. 200 – 500 Zellen ausgezählt.

#### **4.2.3.20 Proteinbestimmung nach Bradford**

##### **4.2.3.20.1 Herstellung der Bradford-Lösung:**

100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 wurden über Nacht unter Rühren in 20 ml 95 %igem Ethanol gelöst. Zu dieser Lösung wurde 100 ml 85 %ige Phosphorsäure geben und mit Wasser auf 1 l Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach dem Durchmischen wurde die Lösung solange durch 3 Lagen Filterpapier filtriert bis die Lösung bei 595 nm gegen Wasser eine

Extinktion von gleich oder unter 0,33 aufwies. Die Bradford-Lösung wurde in einer braunen Glasflasche bei 4°C aufbewahrt.

#### 4.2.3.20.2 Erstellung einer Eichgeraden:

Es wurde eine BSA-Lösung mit einer Konzentration von ca.1 mg / ml hergestellt. Durch Extinktionsmessung einer Lösung aus 1 ml Bradford-Lösung, 90 µl Wasser und 10 µl BSA-Lösung bei 280 nm gegen Wasser in einer Quarzküvette wurde der genaue Proteingehalt der BSA-Lösung bestimmt. Die Konzentrationsberechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$c = E / (\epsilon_{280} * d)$$

c: Konzentration der BSA-Lösung [mg / ml]

d: Durchmesser der Küvette, d = 1 cm

E: Extinktion (dimensionslos)

$\epsilon_{280}$  Extinktionskoeffizient bei 280 nm,  $\epsilon_{280} = 0,667 \text{ ml} / (\text{mg} * \text{cm})$

Zur Erstellung der Eichgeraden wurde Verdünnungen der BSA-Lösung mit Proteinkonzentrationen von 0 mg / ml bis 100 mg / ml (6 – 11 Verdünnungen) hergestellt. Von sämtlichen Verdünnungen wurde die Extinktion bei 595 nm gegen Bradford-Lösung gemessen (siehe 4.2.3.20.3) und die erhaltenen Extinktionen in einem Graphen gegen die zugehörigen Proteinkonzentrationen aufgetragen und eine Ausgleichsgerade gezeichnet.

#### 4.2.3.20.3 Messung:

100 µl Probelösung wurden mit 1 ml Bradford-Lösung versetzt, gemischt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurde bei 595 nm die Extinktion gegen Bradford-Lösung in einer Plastikkuvette gemessen. Die Probelösungen wurden bei Bedarf so verdünnt, dass die gemessene Extinktion im Bereich der Messwerte der Eichgeraden lag. Aus der Eichgerade (siehe 4.2.3.20.2) konnte die zugehörige Proteinkonzentration bestimmt werden.

### 4.2.3.21 Anfärben von SDS-Gelen

#### 4.2.3.21.1 Mit Coomassie-Staining

Zu einem SDS-Gel aus Kapitel 4.2.3.5 wurde in einer Glaswanne ca. 50 ml Coomassie-Lösung (0,02% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 25% (v/v) Ethanol, 8% (v/v) Essigsäure) gegeben und 10 min lang auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Coomassie-Lösung wieder abgekippt und das Gel sooft jeweils 5 – 20 min lang mit Coomassieentfärberlösung (5 Teile Methanol, 1 Teil Essigsäure, 5 Teile Wasser) gewaschen, bis die Proteinbanden in der gewünschten Deutlichkeit sichtbar waren. Anschließend wurde das Gel auf ein Filterpapier gelegt und auf einem Gel Trockner mit angeschlossener Vakuumpumpe bei 60°C mindestens 90 min lang getrocknet.

#### 4.2.3.21.2 Mit Silver-Staining

Ein SDS-Gel aus Kapitel 4.2.3.5 wurde nacheinander mit verschiedenen Lösungen auf einem Schüttler bei RT behandelt. Zuerst wurde es 5 min in Fixierlösung (10 % (v/v) HOAC, 40 % (v/v) Methanol, 50 % (v/v) H<sub>2</sub>O), dann 5 min in Waschlösung I (H<sub>2</sub>O), danach 7,5 min in Sensibilisatorlösung (12,5 % (v/v) Glutardialdehyd, 87,5 % (v/v) H<sub>2</sub>O), daraufhin 2 Mal je 5 min in Waschlösung I, anschließend 7,5 min in Waschlösung II (20 % (v/v) Ethanol, 80 % (v/v) H<sub>2</sub>O), dann 7,5 min in Färbelösung (0,2 % (w/v) AgNO<sub>3</sub>, 0,25 % (v/v) Ammoniak, 0,2 % (w/v) NaOH, 18,6 % (v/v) Ethanol, 81,15 % (v/v) H<sub>2</sub>O, frisch zubereitet), und abschließend 2 mal 5 min in Waschlösung II inkubiert. Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wurde Entwicklerlösung (0,037 % (w/v) Formaldehyd und 575 µM Zitronensäure in Waschpuffer II) zugegeben und solange inkubiert, bis die Banden in der gewünschten Deutlichkeit zu sehen waren (ca. 3 – 6 min). Am Schluss wurde der Entwicklungsprozess durch 5 minütiges Waschen mit Stabilisatorlösung (10 % (v/v) HOAC, 5 % (v/v) Glycerin, 85 % (v/v) H<sub>2</sub>O) gestoppt. Das Gel wurde auf ein Filterpapier gelegt und auf einem Gel Trockner mit angeschlossener Vakuumpumpe bei 60°C mindestens 90 min lang getrocknet.

#### 4.2.3.22 Überprüfung der Membranassoziation von Proteinen

Mit dieser Methode kann überprüft werden, ob ein Protein in der Hefezelle membranassoziiert, löslich oder als integrales Membranprotein vorliegt.

40 bzw. 200 OD<sub>600</sub>-Zellen einer nach Standardbedingungen (siehe 4.2.1.2.1.1) angezogenen Hefekultur wurden mit Wasser gewaschen, in 4 ml Tris-Puffer (0,1 M Tris / Schwefelsäure pH 9,4, 20 mM DTT) resuspendiert und 10 – 20 min bei 30°C inkubiert. Nach 5 minütigem Zentrifugieren bei 2500 Upm wurden die Zellen in 4 ml Sorbitol-Puffer (1 M Sorbitol, 50 mM Natriumphosphat pH 7,4) mit 5 µg / OD<sub>600</sub> Oxalyticase (Stock: 5 mg / ml in 50 mM Natriumphosphat pH 7,4 50 % (v/v) Glycerin) aufgenommen. Danach wurde 30 min lang auf einem Wasserbadschüttler bei 30 °C inkubiert und 5 min bei 2500 Upm zentrifugiert. Ab jetzt wurde bei 4°C bzw. auf Eis gearbeitet. Die Zellen wurden sehr vorsichtig in 2 ml eiskaltem PS200-Lyse-Puffer (200 mM Pipes pH 6,8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, Complete™ EDTA frei, 1 mM PMSF, 1 µl / ml Inhibitor-Mix (1000 x Stock: je 1 mg / ml von Antipain, Pepstatin, Chymostatin und Leupeptin)) resuspendiert, 5 min bei 2500 Upm zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, erneut zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Jeweils 300 µl des Überstandes wurde in 5 Ultrazentrifugenröhrchen gefüllt. Dazu wurde jeweils nur in eines der Röhrchen 300 µl PS200, 300 µl 1 % (w/v) Kaliumacetat, 300 µl 0,2 M Natriumcarbonat, 300 µl 5 M Harnstoff bzw. 2 % (w/v) Triton X-100 gegeben. Die gefüllten Zentrifugenröhrchen wurden 5 – 10 min lang in der auf 4°C vorgekühlten Ultrazentrifuge in einem Festwinkelrotor stehen gelassen und danach 1 Stunde lang bei 54000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 60 µl 110 % (w/v) TCA gefällt (10 min auf Eis) und mit Aceton gewaschen. Sowohl die Pellets des Überstandes als auch die Pellets in den Röhrchen wurden in 50 µl Lämmli-Puffer (siehe 4.2.3.7.2) aufgenommen und auf einem Multivortexer bei 37°C gelöst. Mit jeweils 10 µl der 2 min bei 95°C gekochten und zentrifugierten (1 min 13000 Upm) Proben wurde eine SDS-PAGE durchgeführt (4.2.3.5). Beim nachfolgenden Western-Blot (4.2.3.6) wurden als Kontrollen Antikörper gegen PGK (lösliches, cytosolisches Protein), VATPase (integrales Membranprotein) und Vma2p (peripheres Membranprotein) verwendet.

#### 4.2.3.23 Gesamtproteinturnover

Aus einer stationären Hefevorkultur in CM wurde so in 12 ml CM-Met umgeimpft, dass nach 6 stündiger Inkubation bei 30°C auf einem Wasserbadschüttler, nachfolgender Zugabe von 3,7 MBq <sup>35</sup>S-Methionin und anschließender erneuter 16 stündiger Inkubation bei 30°C auf einem Wasserbadschüttler eine OD<sub>600</sub> von 0,8 – 1,5 resultierte. Danach wurde 5 min bei 2500 Upm zentrifugiert, 3 mal mit 10 ml 1%KAc gewaschen und in 12 ml 1%Kac+Met resuspendiert. Sofort nach dem Resuspendieren wurden 3 0-Proben von 1 ml entnommen, mit 100 µl 250 % (w/v) TCA versetzt, gemischt und bei 4°C gelagert. Die restliche Kultur wurde bei 30°C auf einem Wasserbadschüttler inkubiert. Jede Stunde wurde eine 1 ml Probe entnommen und wie oben behandelt. Die letzte Probe wurde nach 8 Stunden entnommen.

Sämtliche Proben wurden 10 min bei 13000 zentrifugiert, die Überstände in ein neue Reaktionsgefäße überführt und bei 4°C gelagert. Mit den Pellets der 0-Proben wurde weitergearbeitet, die restlichen Pellets wurden verworfen. Die Pellets wurden 5 mal mit 10 % (w/v) TCA, 2 mal mit einem 1 : 1 Gemisch aus Ethanol und Diethylether gewaschen, 30 min bei 40°C getrocknet, mit 1 ml NCSII-Lösung (90 % (v/v) in Wasser) versetzt, 5 – 10 min bei 40°C inkubiert, 10 min auf einem Multivortexer gerüttelt und 5 min bei 40°C inkubiert. Danach wurden 900 µl abgenommen und zusammen mit 4 ml Flüssigscintillator in ein Scintillationsröhrchen gegeben. Von den bei 4°C gelagerten Überständen wurde jeweils ebenso 900 µl abgenommen und zusammen mit 4 ml Flüssigscintillator in ein Scintillationsröhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden verschlossen und mindestens 1 Stunde auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Danach wurden die nun durchmischten und schaum- und blasenfreien Proben in einem Scintillationszähler durchgemessen. Die gemessene radioaktive Strahlung der Proben wurde für folgende Formel zur Berechnung der Abbaurate verwendet:

$$Ab(t) = [DPM(t) - DPM(0)] / [DPM(P) + DPM(0)] * 100 \%$$

Ab(t): Prozentsatz der nach t Stunden abgebauten Proteine [%]

t: Zeit [h]

DPM(t): Radioaktivität des Überstandes der Probe nach t Stunden

DPM(0): Durchschnittliche Radioaktivität der Überstände der 0-Proben

DPM(P): Durchschnittliche Radioaktivität der Pellets der 0-Proben

Durch Auftragung der Werte in ein Diagramm (Ab(t) gegen t) kann aus der Steigung die Abbaurate [%/h] bestimmt werden.

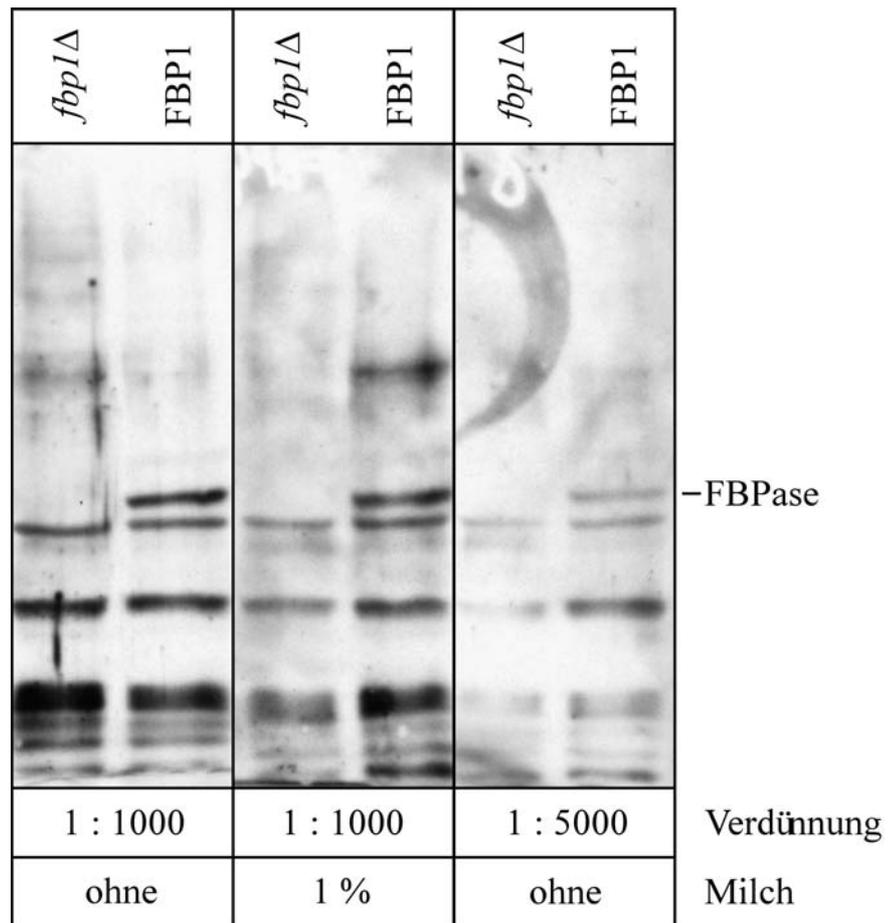
#### 4.2.3.24 Herstellung polyklonaler Peptidantikörper

##### 4.2.3.24.1 Herstellung eines polyklonalen Peptidantikörpers gegen Vid24p

Bei der Firma EUROGENTEC (Herstal, Belgien) wurde eine Kaninchenimmunisierung mit folgendem Peptid in Auftrag gegeben: H<sub>2</sub>N-CGL NST DDN GTT NAA K – CONH<sub>2</sub> (Aminosäuren 237 – 251 des Vid24p). Die erhaltenen Blutchargen wurden auf ein gutes Vid24p-Signal hin getestet. Das beste Antikörper-Signal gab die 1. große Blutung (1. Large Bleeding). Das Antikörper-Signal war in Western Blot-Analysen meistens brauchbar. Es wurde danach versucht, das Antikörper-Signal durch Aufreinigung des Antikörpers zu verbessern. Dazu wurde der Antikörper an eine Affinitätssäule, an welche das zur Immunisierung verwendete Peptid gebunden worden war, gebunden und später wieder eluiert. Der erhaltene, aufgereinigte Antikörper lieferte zwar ein geringfügig besseres Signal, war aber bei – 20°C nicht lange stabil und zeigte nach wenigen Malen Benutzung kein sinnvolles Signal mehr. Aus diesem Grund wurde für die Experimente in den Kapiteln 5.4.5 und 5.4.8 der unaufgereinigte Antikörper verwendet.

##### 4.2.3.24.2 Herstellung eines polyklonalen FBPase-Antikörpers

Da der von K.D. Entian stammende FBPase-Antikörper inzwischen fast aufgebraucht ist, wurde ein neuer FBPase-Antikörper über eine Kaninchenimmunisierung gewonnen. Für diese Immunisierung wurden folgende 2 Peptide verwendet: H<sub>2</sub>N –NGP RRD STE GFD TDI – CONH<sub>2</sub> (Aminosäuren 6 – 20 der FBPase) und H<sub>2</sub>N – CVK QPQ ADN NNK PFS A – CONH<sub>2</sub> (Aminosäuren 240 –254 der FBPase). Das erhaltene Kaninchenblut wurde in Western Blot-Analysen auf das FBPase-Signal hin untersucht. Wie man in Abb. 4-2 erkennen kann, ergibt der neu gewonnene FBPase-Antikörper ein brauchbares Signal. Im *fbp1*-Deletionsstamm ist jeweils kein Signal zu sehen, im Wildtyp-Stamm dagegen ein deutliches Signal. Das beste Signal brachte der 1 : 1000 verdünnte Antikörper ohne Milch.



**Abb. 4-2:** Test des neu gewonnenen FBPase-Antikörpers in verschiedenen Verdünnungen und mit 1 % Milch oder ohne Milch. Mit dem Antikörper wurden Western Blot-Analysen der Stämme W303-1B (*FBP1*) und W303-1BKO (*fbp1Δ*) durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

Das gluconeogenetische Schlüsselenzym Fructose-1,6-bisphosphatase wird exprimiert, wenn Hefezellen auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen, wie Acetat oder Ethanol, wachsen. Innerhalb der ersten 5 –6 h wird die Hauptmenge der FBPase gebildet. Macht man den Zellen Glucose wieder zugänglich, so wird die Katabolitinaktivierung des Enzyms initiiert. Neben der Reduzierung der Enzymaktivität durch Phosphorylierung der FBPase und Regulierung der Enzymmenge auf Transkriptionsebene, beinhaltet die Katabolitinaktivierung auch die Degradation des Proteins. Hierbei gibt es verschiedene Ergebnisse bezüglich des Ortes des Abbaus. Die Ergebnisse der Gruppe um H.L. Chiang favorisieren den vakuolären Abbau (Brown et al., 2001; Brown et al., 2000; Brown et al., 2002; Chiang and Schekman, 1991; Chiang et al., 1996; Chiang and Chiang, 1998), wohingegen die Ergebnisse unseres Labors den Ubiquitin-vermittelten Abbau über das Proteasom nahelegen (Haemmerle et al., 1998; Schork et al., 1994a; Schork et al., 1994b; Schork et al., 1995; Schuele et al., 2000).

### 5.1 Untersuchung des FBPase-Abbaus unter Bedingungen nach H.L. Chiang

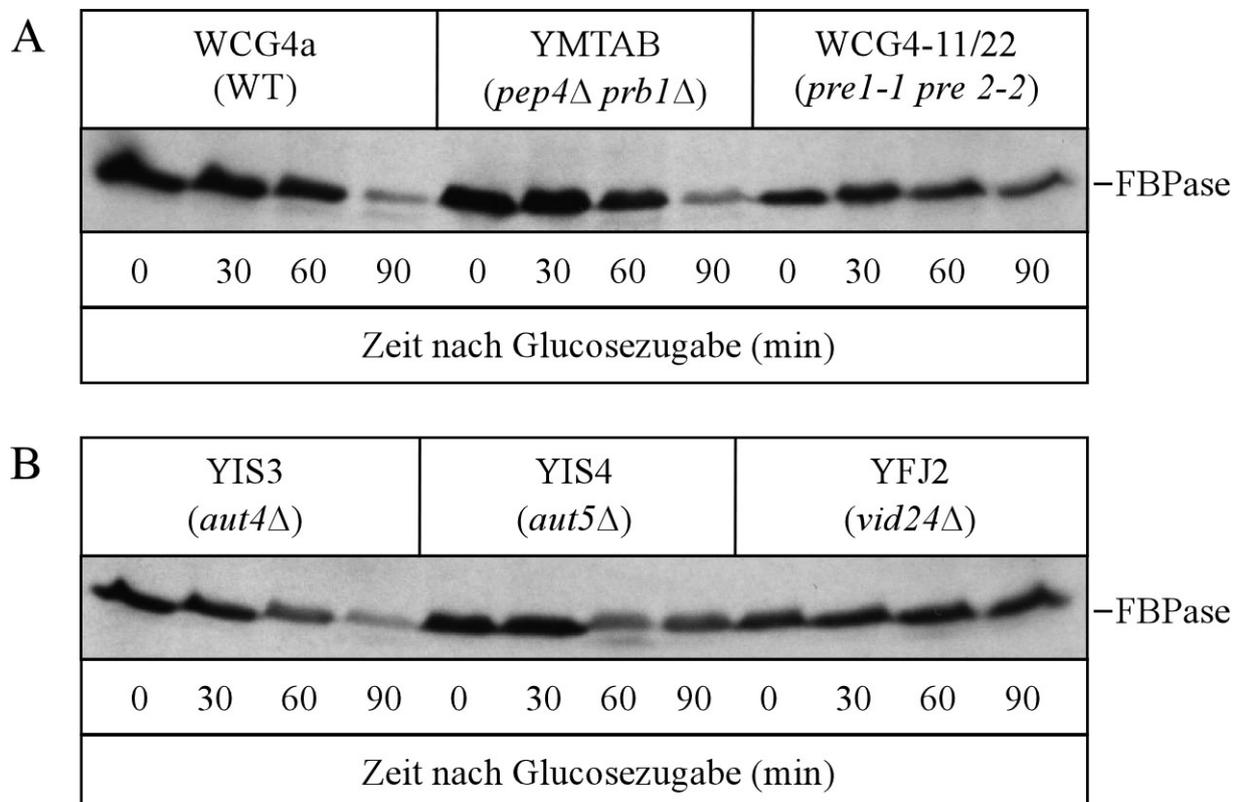
Um diese unterschiedlichen Ergebnisse über den Ort der FBPase-Degradation aufzulösen, sollte versucht werden, die Ergebnisse der Gruppe um Chiang zu reproduzieren. Ein Unterschied zwischen den Experimenten der Gruppe um Chiang und denen in unserem Labor ist die Derepressionszeit. Während bei der Gruppe um Chiang diese 48 h beträgt, wird in unserem Labor nur 5 – 16 h dereprimiert. Ein weiterer Unterschied besteht im verwendeten Derepressionsmedium. Das Hungermedium der Gruppe um Chiang enthält als Kohlenstoffquelle 1 % Kaliumacetat und 0,5 % Glucose, wohingegen unseres 2 % Ethanol enthält. Die nachfolgend angegebenen Stämme wurden soweit nicht anders angegeben analog Kapitel 4.2.1.2.1.2 kultiviert.

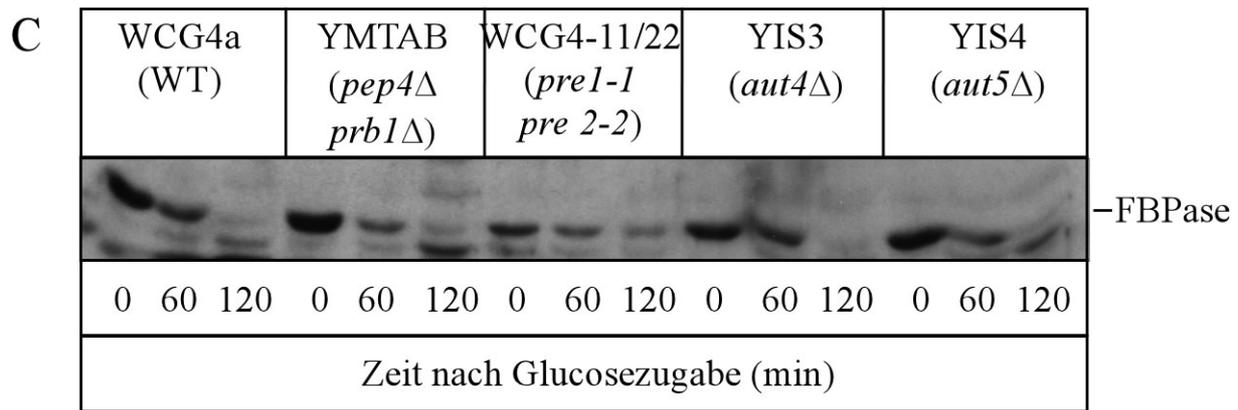
Um das Abbauverhalten unter Bedingungen der Gruppe um Chiang zu testen, wurden verschiedene Mutanten verwendet. Der Abbauort sollte durch die Verwendung von Deletionsmutanten vakuolärer Mutanten als auch Mutanten in proteasomalen Untereinheiten gefunden werden. Im einzelnen wurde der Stamm YMTAB eingesetzt, bei welchem die

Proteasen *yscA* und *yscB* deletiert sind, und der Stamm WCG4-11/22, bei welchem die proteasomalen Untereinheiten Pre1p und Pre2p mutiert sind.

### 5.1.1 Derepressionszeit 48 h

In der Abb. 5-1 sieht man den FBPase-Abbau nach Glucosezugabe in Zellen, die zuvor 48 h lang dereprimiert wurden. Im Stamm YMTAB, welcher in den Proteasen *yscA* und *yscB* deletiert ist, kann man keinen Unterschied zum Abbauverhalten der FBPase in einem Wildtyp-Stamm (WCG4a) erkennen (Abb. 5-1 A und C). Dagegen ist im Stamm WCG4-11/22, welcher Mutationen im Proteasom trägt, der FBPase-Abbau im Vergleich zum Wildtyp verlangsamt (Abb. 5-1 A und C). Die Proteine Aut4p und Aut5p, welche an der Lyse autophagischer Vesikel in der Vakuole beteiligt sind (Epple et al., 2001; Suriapranata et al., 2000), haben keinen Einfluß auf die Degradation der FBPase unter diesen Bedingungen (Abb. 5-1 B und C). In einer *vid24*-Deletionsmutante (YFJ2, Abb. 5-1 B) dagegen ist der Abbau blockiert. Das Vid24p wurde von der Gruppe um Chiang als am vakuolären Abbau der FBPase beteiligt gefunden (Chiang and Chiang, 1998).



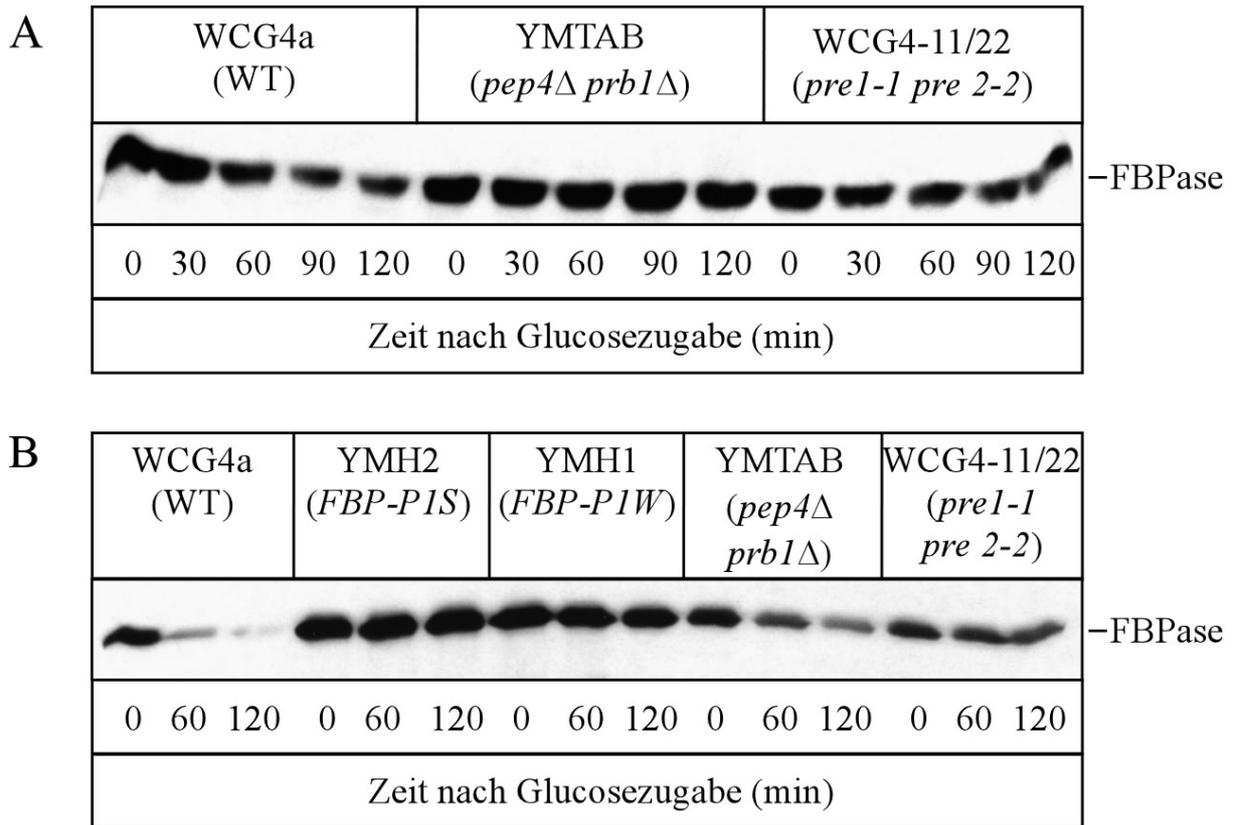


**Abb. 5-1:** Katabolitdegradation der FBPase nach 48 h Derepressionszeit in YPKG und Umsetzung auf glucosehaltiges Medium in folgenden Stämme: WCG4a (Wildtyp), YMTAB (*pep4* $\Delta$  *prb1* $\Delta$ ), WCG4-11/22 (*pre1-1* *pre2-2*), YFJ2 (*vid24* $\Delta$ ), YIS3 (*aut3* $\Delta$ ) und YIS4 (*aut5* $\Delta$ ). Dazu wurde eine Western Blot-Analyse des FBPase-Abbaus in diesen Stämmen durchgeführt.

### 5.1.2 Derepressionszeit 65 h

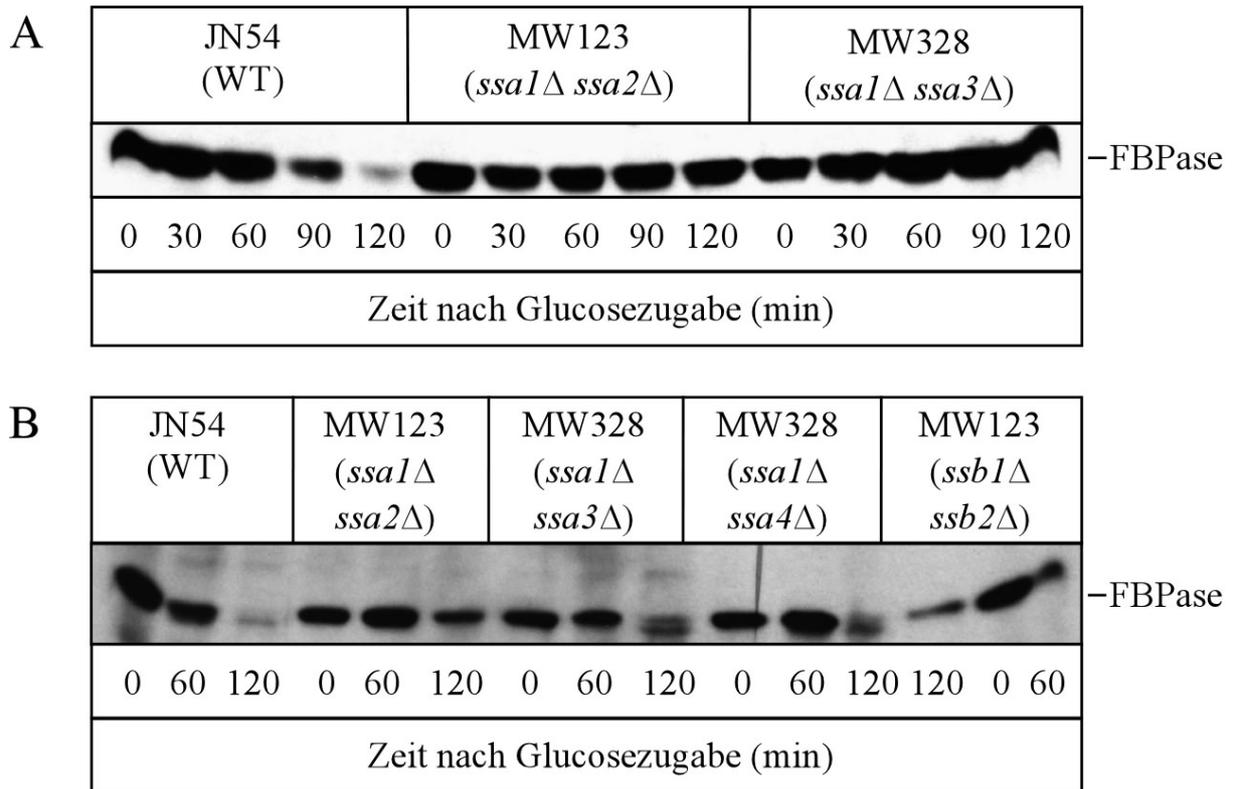
Da nach 48 stündiger Derepression keine Beteiligung der Vakuole am FBPase-Abbau gefunden werden konnte, wurde die Derepressionszeit auf 65 h erhöht.

Nach 65 stündiger Derepressionszeit kann man in Abb. 1 A einen deutlich verlangsamten FBPase-Abbau im Wildtyp-Stamm (WCG4a) erkennen. In diesem Experiment ist die FBPase im Stamm YMTAB, welcher in den Proteasen *yscA* und *yscB* deletiert ist, vollständig und im Stamm WCG4-11/22, in welchem die proteasomalen Untereinheiten Pre1p und Pre2p mutiert sind, fast vollständig stabilisiert (Abb. 5-2 A). Im Gegensatz dazu sieht man in Abb. 5-2 B eine schnellen Abbau der FBPase im Wildtyp-Stamm (WCG4a). In den Stämmen YMTAB, welcher in den Proteasen *yscA* und *yscB* deletiert ist, und WCG4-11/22, der Mutationen im Proteasom trägt, dagegen ist der Abbau verlangsamt, wobei die FBPase in letzterem Stamm deutlich stärker stabilisiert wird (Abb. 5-2 B). Weiterhin sieht man in Abb. 5-2 B, dass in Stämmen, die eine FBPase mit mutiertem aminoterminalen Prolin tragen (YMH1 und YMH2), kein FBPase-Abbau mehr stattfindet.



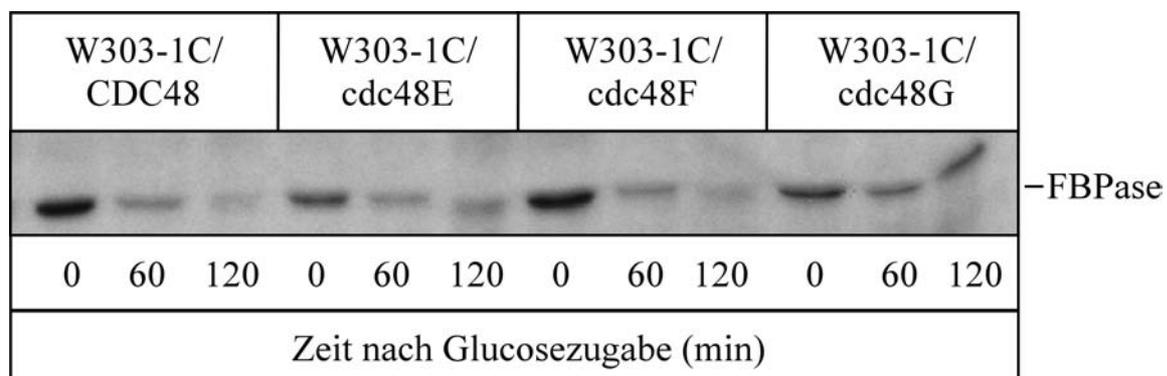
**Abb. 5-2:** Katabolitdegradation der FBPase nach 65 h Derepressionszeit in YPKG und Umsetzung auf glucosehaltiges Medium in folgenden Stämme: WCG4a (Wildtyp), YMTAB (*pep4Δ prb1Δ*), WCG4-11/22 (*pre1-1 pre2-2*), YMH2 (*FBP-P1S*) und YMH1 (*FBP-P1W*). Dazu wurde eine Western Blot-Analyse des FBPase-Abbaus in diesen Stämmen durchgeführt.

Als weiteres wurde überprüft, ob Chaperone der Hsp70-Familie einen Einfluß auf den FBPase-Abbau unter diesen Bedingungen haben. In Abb. 5-3 A sieht man in den Stämmen MW123 und MW328, in welchen die Chaperone Ssa1p und Ssa2p bzw. Ssa1p und Ssa3p deletiert sind, eine komplette Stabilisierung der FBPase. In Abb. 5-3 B sieht man einen verlangsamten FBPase-Abbau in den Stämmen MW123, MW328 und MW329, in welchen die Chaperone Ssa1p und Ssa2p bzw. Ssa1p und Ssa3p bzw. Ssa1p und Ssa4p deletiert sind. Im Stamm JN212, in welchem die Chaperone Ssb1p und Ssb2p deletiert sind, ist der Abbau nur schwach verlangsamt im Vergleich zum Wildtyp (JN54). Berücksichtigt man alle Ergebnisse, so scheint im Stamm MW123, in dem die beiden Chaperone Ssa1p und Ssa2p deletiert sind, der FBPase-Abbau am stärksten verlangsamt zu sein.



**Abb. 5-3:** Katabolitdegradation der FBPase nach 65 h Derepressionszeit in YPKG und Umsetzung auf glucosehaltiges Medium in Hsp70-Chaperone-Mutanten. Dazu wurde eine Western Blot-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: JN54 (Wildtyp), MW123 (*ssa1* $\Delta$  *ssa2* $\Delta$ ), MW328 (*ssa1* $\Delta$  *ssa3* $\Delta$ ), MW329 (*ssa1* $\Delta$  *ssa4* $\Delta$ ) und JN212 (*ssb1* $\Delta$  *ssb2* $\Delta$ ).

Die Stämme mit Mutationen der AAA-ATPase Cdc48p zeigen in Abb. 5-4 außer W303-1C/*cdc48G* keinen Unterschied im FBPase-Abbau im Vergleich zum Wildtyp (W303-1C/CDC48). Im Stamm W303-1C/*cdc48G* ist der FBPase-Abbau etwas verlangsamt.

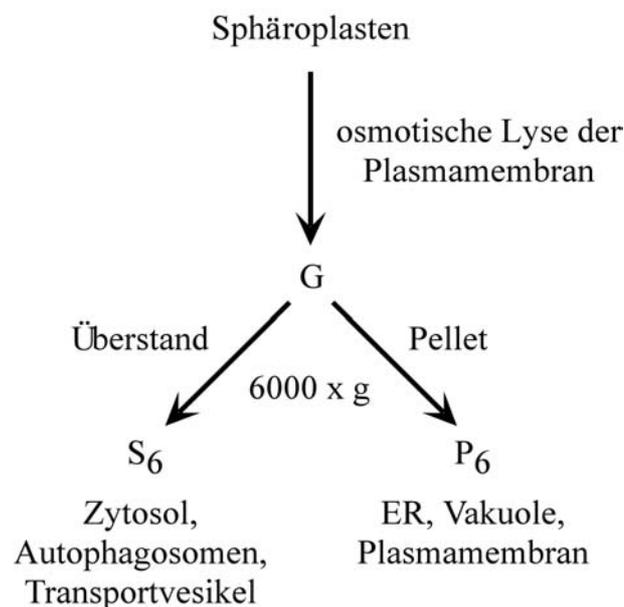


**Abb. 5-4:** Katabolitdegradation der FBPase nach 65 h Derepressionszeit in YPKG und Umsetzung auf glucosehaltiges Medium in Mutanten der AAA-ATPase Cdc48p. Dazu wurde eine Western Blot-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: W303-1C/CDC48, W303-1C/*cdc48E*, W303-1C/*cdc48F* und W303-1C/*cdc48G*. In sämtlichen Stämmen wird eine vorhandene *cdc48*-Deletion durch Überexpression des Wildtyp-*CDC48*-Gens bzw. von mutierten *cdc48*-Genen komplementiert.

### 5.1.3 Zellfraktionierung

Um zu überprüfen, ob nach 65 h Derepressionszeit größere Mengen von FB Pase in der Vakuole nachweisbar sind, wurden Zellfraktionierungsexperimente durchgeführt. Bei einem Abbau über die Vakuole, sollte unter Inaktivierungsbedingungen in einem Stamm ohne die vakuolären Proteinase n yscA und yscB (YMTAB) mit fortschreitender Zeit nach Glucosezugabe die FB Pase-Menge in der Vakuole zunehmen.

Die Zellfraktionierung begann damit, die Zellen zu sphäroplastieren, diese osmotisch zu lysieren und bei 300 x g verbliebene Zellrümmer abzuzentrifugieren. Der Überstand (enthält Gesamtproteine G) wurde dann bei 6000 x g zentrifugiert. Im Überstand (S<sub>6</sub>) findet man cytosolische Proteine, Autophagosomen und Transportvesikel, im Pellet (P<sub>6</sub>) finden sich Proteine aus der Vakuole und dem ER (siehe auch Abb. 5-5). Um zu überprüfen, ob die Vakuole intakt geblieben ist, wurden die Proben S<sub>6</sub> und P<sub>6</sub> auf das Vorhandensein der vakuolären Carboxypeptidase yscY (CPY) hin untersucht. Hat die Zellfraktionierung geklappt, d.h. die Vakuole blieb intakt, so sollte die CPY nur in P<sub>6</sub> und nicht in S<sub>6</sub> nachweisbar sein.



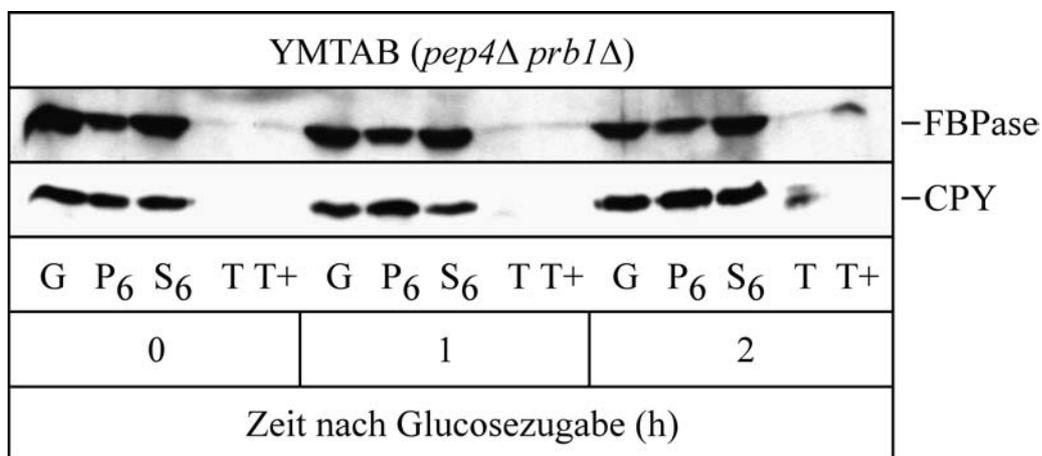
**Abb. 5-5:** Schema der Zellfraktionierung.

YMTAB-Stämme, in welchen die vakuolären Proteinase n yscA und yscB deletiert sind, wurden mehrmals der Zellfraktionierung unterzogen. Das Problem bei sämtlichen Experimenten war, dass die Vakuole jedes Mal zu einem großen Teil geplatzt war. Ein beispielhaftes Zellfraktionierungsexperiment ist in Abb. 5-6 gezeigt. Eine CPY-Bande ist zu

allen 3 Zeitpunkten sowohl in  $P_6$  als auch  $S_6$  zu sehen. Die FBPase befindet sich zu den 3 Zeitpunkten jeweils zu ca. 25 – 30 % im  $P_6$  und zu 70 – 75 % im  $S_6$ . Die FBPase-Menge in den einzelnen Proben (G,  $P_6$  und  $S_6$ ) bleibt über die 3 Zeitpunkte in etwa konstant.

Als weiteres wurde in diesem Experiment noch überprüft, ob die FBPase in Vesikel verpackt vorliegt. Sollte dies der Fall sein, so müsste das Protein vor dem Verdau durch Trypsin geschützt sein und erst in Gegenwart von Triton X-100, welches die Zellmembran zerstört, für den Verdau durch Trypsin zugänglich sein.

In Abb. 5-6 konnte gezeigt werden, dass sowohl FBPase als auch CPY in Gegenwart von Trypsin vollständig verdaut werden.



**Abb. 5-6:** Zellfraktionierung des Stammes YMTAB nach 65 h Derepression in YPKG und Umsetzung auf Glucose. G: Gesamtproteine nach Lyse,  $P_6$ : Pellet der Zentrifugation von G bei 6000 x g,  $S_6$ : Überstand der Zentrifugation von G bei 6000 x g, T: Trypsin-Verdau von G, T+: Trypsin-Verdau von G in Anwesenheit von Triton X-100.

Offenbar ließen diese Bedingungen keine Fraktionierung intakter Vakuolen zu.

#### 5.1.4 Sucrose-Gradienten

In einem Sucrose-Gradienten können Proteine nach ihrer Lokalisation in einem Organell aufgetrennt werden. So kann man unter anderem zwischen cytosolischen bzw. vakuolären Proteinen, Proteinen des Golgi Apparates, Proteinen des ER und Plasmamembranproteinen unterscheiden.

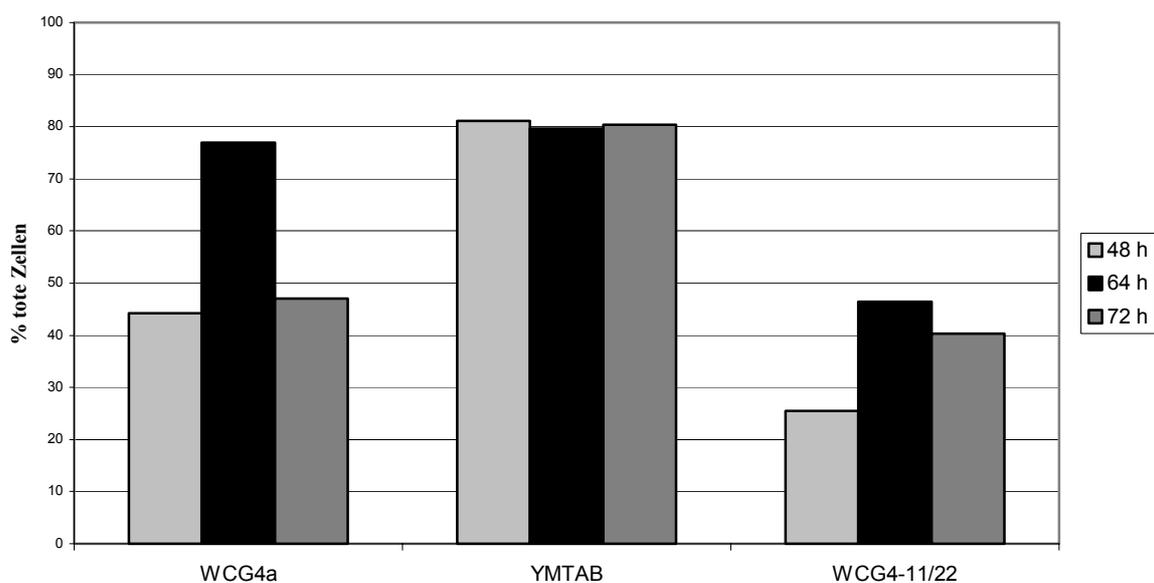
Nach 48 h Derepressionszeit und 1 h nach Umsetzung auf Glucose-haltiges Medium wurde ein Sucrose-Gradient des Stammes YFJ1, in welchem *VID24* deletiert ist, und des Stammes YMH2, in welchem das aminoternale Prolin der FBPase durch Serin ersetzt ist,

durchgeführt. In beiden Stämme kolokalisiert die FBPase mit der cytosolischen 3-Phosphoglyceratkinase (PGK) und der vakuolären Protease CPY in den ersten 5 von 20 Fraktionen (nicht gezeigt).

### 5.1.5 Überlebenstest

Um zu überprüfen, wie sich eine lange Derepressionszeit auf die Zellen auswirkt, wurde eine Überlebenstest durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in YPKG-Medium (enthält 1 % Kaliumacetat und 0,5 % Glucose) herangezogen und nach 16, 24, 48, 65 und 72 h eine Probe entnommen, mit Methylenblau-Lösung versetzt und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Dort erscheinen lebendige Zellen farblos, tote Zellen dagegen blau, da hier der Farbstoff ins Innere der Zelle eindringen kann.

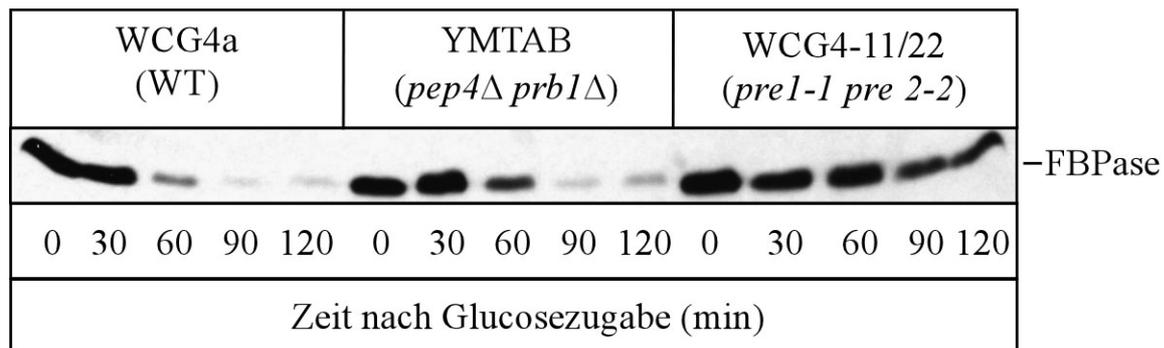
Nach 16 und 24 h Derepressionszeit waren in allen getesteten Stämmen nahezu 100 % der Zellen lebendig. Mit zunehmender Derepressionszeit änderte sich jedoch das Bild. Der Stamm YMTAB, in dem die Proteinasen *yscA* und *yscB* deletiert sind, überstand eine Derepressionszeit von 48 h und länger am schlechtesten (ca. 80 % tote Zellen). Der Wildtyp-Stamm WCG4a und der Stamm WCG4-11/22 mit Mutationen in proteasomalen Untereinheiten überstanden die langen Derepressionszeiten besser und wiesen meist eine Überlebensrate von über 50 % auf (siehe Abb. 5-7).



**Abb. 5-7:** Sterberate der Stämme WCG4a (Wildtyp), YMTAB (*pep4Δ prb1Δ*) und WCG4-11/22 (*pre1-1 pre2-2*) nach 48, 65 und 72 h Derepressionszeit in YPKG.

### 5.1.6 Derepressionszeit 5 h bzw. 16 h

Zum Vergleich wurden auch die Stämme nach den in unserem Labor verwendeten Bedingungen (siehe 4.2.1.2.1.1) kultiviert und der FBPase-Abbau unter Inaktivierungsbedingungen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach 5 stündiger Derepressionszeit in YPEtOH (enthält 2 % Ethanol als Kohlenstoffquelle) nur im Stamm mit Mutationen in proteasomalen Untereinheiten (WCG4-11/22) ein deutlich verlangsamer FBPase-Abbau zu beobachten ist (Abb. 5-8). Der Wildtyp-Stamm (WCG4a) und der YMTAB-Stamm, in welchem die Proteinasen *yscA* und *yscB* deletiert sind, zeigten den gleichen, schnellen FBPase-Abbau. Die Katabolitdegradation der FBPase in diesen Stämme verhält sich nach 16 stündiger Derepressionszeit in YPEtOH genau gleich wie nach 5 stündiger Derepressionszeit in YPEtOH (nicht gezeigt).

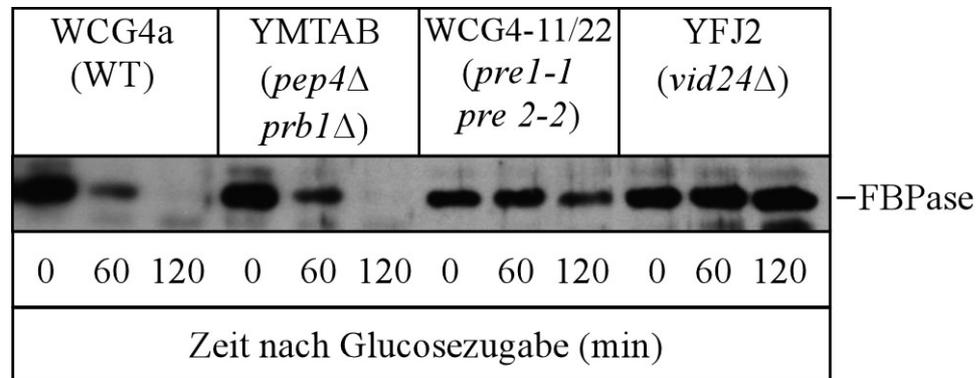


**Abb. 5-8:** Katabolitdegradation der FBPase nach 5 h Derepressionszeit in YPEtOH und Umsetzung auf glucosehaltiges Medium in folgenden Stämme: WCG4a (Wildtyp), YMTAB (*pep4Δ prb1Δ*) und WCG4-11/22 (*pre1-1 pre2-2*). Dazu wurde eine Western Blot-Analyse des FBPase-Abbaus in diesen Stämmen durchgeführt.

Weiterhin wurde auch untersucht, ob die Verwendung von YPKG (1 % Kaliumacetat und 0,5 % Glucose als Kohlenstoffquelle) statt YPEtOH als Derepressionsmedium einen Einfluß auf den FBPase-Abbau hat. Wie in Abb. 5-9 zu sehen ist, ändert ein Wechsel des Mediums bei 16 stündiger Derepressionszeit nichts am Abbauverhalten der FBPase in den Stämme WCG4a (Wildtyp), YMTAB (*pep4Δ prb1Δ*) und WCG4-11/22 (*pre1-1 pre2-2*). Im Stamm YFJ2 mit deletiertem *VID24* ist der FBPase-Abbau komplett blockiert.

Die Verwendung von Ethanol (in YPEtOH) oder Kaliumacetat (in YPKG) als Kohlenstoffquelle während der Derepression hat keinen Einfluß auf den Ort des proteolytischen Abbaus der FBPase unter Katabolitinaktivierungsbedingungen. Unabhängig von der verwendeten Kohlenstoffquelle wird nach 16 stündiger Derepression die FBPase

unter Inaktivierungsbedingungen in proteasomalen Mutantenstämmen deutlich stabilisiert, wohingegen vakuoläre Mutantenstämme einen Abbau wie in Wildtypzellen der FBPase und somit keine Beteiligung am FBPase-Abbau unter diesen Bedingungen zeigen.



**Abb. 5-9:** Katabolitdegradation der FBPase nach 16 h Derepressionszeit in YPKG und Umsetzung auf glucosehaltiges Medium in folgenden Stämme: WCG4a (Wildtyp), YMTAB (*pep4Δ prb1Δ*), WCG4-11/22 (*pre1-1 pre2-2*) und YFJ2 (*vid24Δ*). Dazu wurde eine Western Blot-Analyse des FBPase-Abbaus in diesen Stämmen durchgeführt.

## 5.2 Suche nach neuen Komponenten des proteasomalen FBPase-Abbaus

Ein weiteres Ziel war es, neue Komponenten des proteasomalen Abbaus der FBPase zu finden. Bei diesem wird das Enzym über das Ubiquitinsystem mit Hilfe des E1-Enzyms Uba1p, dem E2-Enzym Ubc8p und höchstwahrscheinlich einem noch unbekanntem E3-Enzym mit einer Polyubiquitinkette markiert, vom 26S-Proteasom erkannt und degradiert.

In allen folgenden Experimenten dieses Kapitels betrug die Derepressionszeit 16 h in YPEtOH bei Western-Blot-Analysen und 6 h in Labelling-Medium CM-MetEtOH (siehe 4.1.4.9.1) bei Pulse Chase-Analysen.

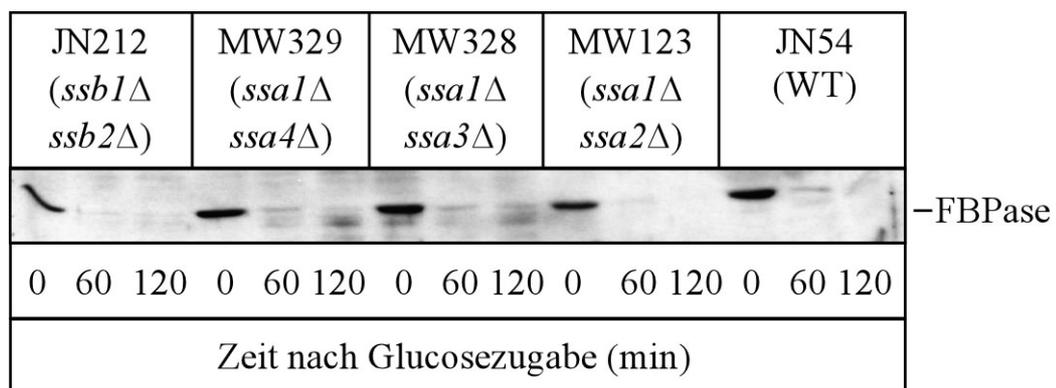
### 5.2.1 Überprüfung des Einflusses von Chaperonen aus der Hsp70-Familie

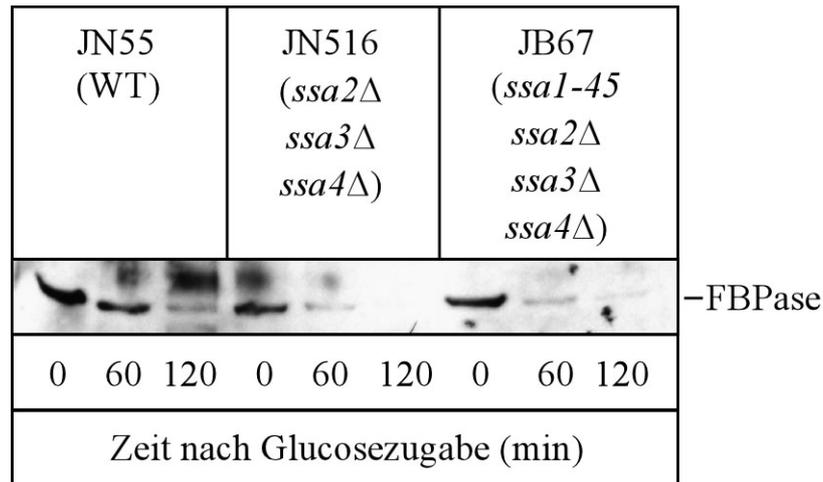
Die Hsp70s (heat shock proteins of 70 kilodaltons) sind eine reichlich in der Zelle vorhandene und hochkonservierte Familie molekularer Chaperone, welche an der Erleichterung einer großen Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind (Baxter and Craig, 1998). In der Hefe *S. cerevisiae* sind die cytosolischen Ssa-Proteine eine der am häufigsten vorkommenden

Unterfamilie der Hsp70s. Es gibt 4 Ssa-Proteine, deren Aminosäuresequenzen zu 80 % untereinander identisch sind (Baxter and Craig, 1998).

Die Ssa-Proteine sind für das vegetative Wachstum der Zellen essentiell; zumindest eines der Ssa-Proteine muss in hohem Maße exprimiert werden, damit die Zellen lebensfähig sind (Werner-Washburne et al., 1987). Die 4 Proteine sind unterschiedlich reguliert. Während der exponentiellen Wachstumsphase sind nur Ssa1p und Ssa2p detektierbar. Die Expression von Ssa3p und Ssa4p benötigt die Induktion durch Hitzeschock oder andere Stressfaktoren (Werner-Washburne et al., 1989). Prozesse mit denen die Ssa-Proteine in Verbindung gebracht werden, sind die Translokation von Substraten in Mitochondrien oder in das ER hinein (Becker et al., 1996; Chirico et al., 1988; Deshaies et al., 1988), die Hitzetoleranz (Sanchez et al., 1993) und die Proteinfaltung (Levy et al., 1995).

Eine Beteiligung der Ssa-Proteine an der Katabolitinaktivierung wurde in verschiedenen Mehrfachmutanten getestet. Im Stamm JB67 sind die Gene *SSA2*, *SSA3* und *SSA4* deletiert und mit *ssal-45* ist eine temperatursensitives *ssal*-Allel vorhanden. Bei 37°C führt die *ssal-45*-Mutation zu einem nicht funktionellen Protein. Aus diesem Grunde wurden die Stämme JN55, JN516 und JB67 bei 30°C 15,5 h lang in YPEtOH dereprimiert, dann für 30 min bei 37°C weiterkultiviert und dann auf Glucose-haltiges Medium (YPD) umgesetzt und bei 37°C inkubiert. In Abb. 5-10 sieht man, dass in sämtlichen Doppelmutanten, Dreifach- als auch Vierfachmutanten der Hsp70-Chaperone der FBPase-Abbau wie in Wildtyp-Zellen erfolgt. Die Chaperone der Hsp70-Familie zeigten keine Beteiligung an der Katabolitdegradation der FBPase.





**Abb. 5-10:** Katabolitdegradation der FBPase in Hsp70-Chaperone-Mutanten. Dazu wurde eine Western Blot-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: JN54 (Wildtyp), MW123 (*ssa1Δ ssa2Δ*), MW328 (*ssa1Δ ssa3Δ*), MW329 (*ssa1Δ ssa4Δ*), JN212 (*ssb1Δ ssb2Δ*), JN55 (WT), JN516 (*ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ*) und JB67 (*ssa1-45 ssa2Δ ssa3Δ ssa4Δ*).

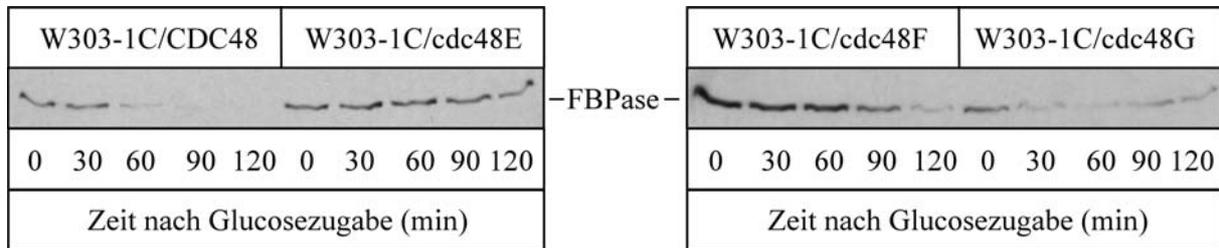
## 5.2.2 Überprüfung des Einflusses von Cdc48p

Die AAA-ATPase CDC48 ist ein Bestandteil des Cdc48-Ufd1-Npl4-Komplexes. Dieser Komplex hat seine Funktion im Erkennen verschiedener polyubiquitinerter Substrate und erleichtert die Präsentation dieser Substrate gegenüber dem 26S-Proteasom zum Abbau (Bays and Hampton, 2002; Jarosch et al., 2002; Tsai et al., 2002). So spielt dieser Komplex z.B. auch bei der Retrotranslokation falsch gefalteter, polyubiquitinerter Substrate bei der ER-assoziierten Degradation (ERAD) eine wichtige Rolle (Bays and Hampton, 2002; Jarosch et al., 2002; Tsai et al., 2002).

Um zu überprüfen, ob CDC48p auch einen Einfluß auf die Katabolitdegradation der FBPase hat, wurde der FBPase-Abbau in *cdc48*-Mutantenstämmen untersucht.

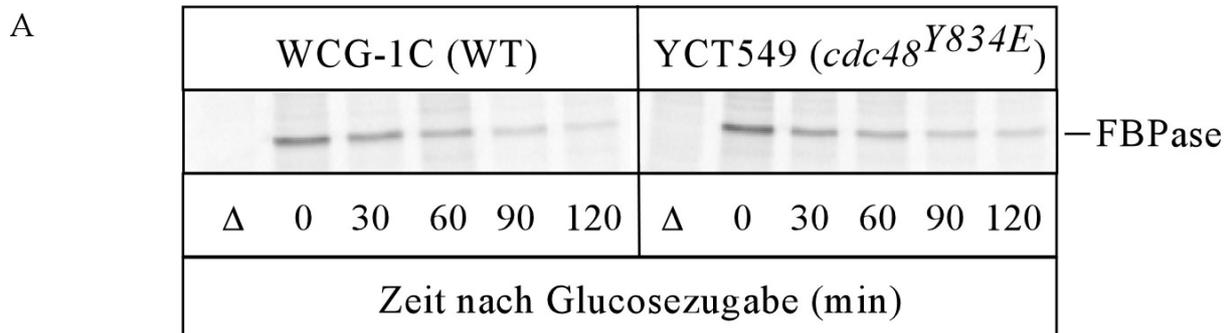
Die in Abb. 5-11 verwendeten Stämme trugen jeweils eine *cdc48*-Deletion. Um diese lethale Deletion zu komplementieren, wurden sie mit Plasmiden, die entweder das *CDC48*-Wildtyp-Gen (W303-1C/CDC48) oder eine mutiertes *cdc48*-Allel trugen, transformiert. Bei den Mutanten ist das Tyr an Position 834 gegen Glu (*cdc48<sup>Y834E</sup>*), Phe (*cdc48<sup>Y834F</sup>*) oder Gly (*cdc48<sup>Y834G</sup>*) ausgetauscht. Zunächst wurde eine Western Blot-Analyse des FBPase-Abbaus durchgeführt. In Abb. 5-11 kann man erkennen, dass im Stamm, welcher das *cdc48<sup>Y834E</sup>*-Allel trägt (W303-1C/*cdc48E*), eine deutliche Stabilisierung der FBPase festzustellen ist. Die *cdc48<sup>Y834F</sup>*-Mutante (W303-1C/*cdc48F*) zeigt einen verlangsamten FBPase-Abbau. In der

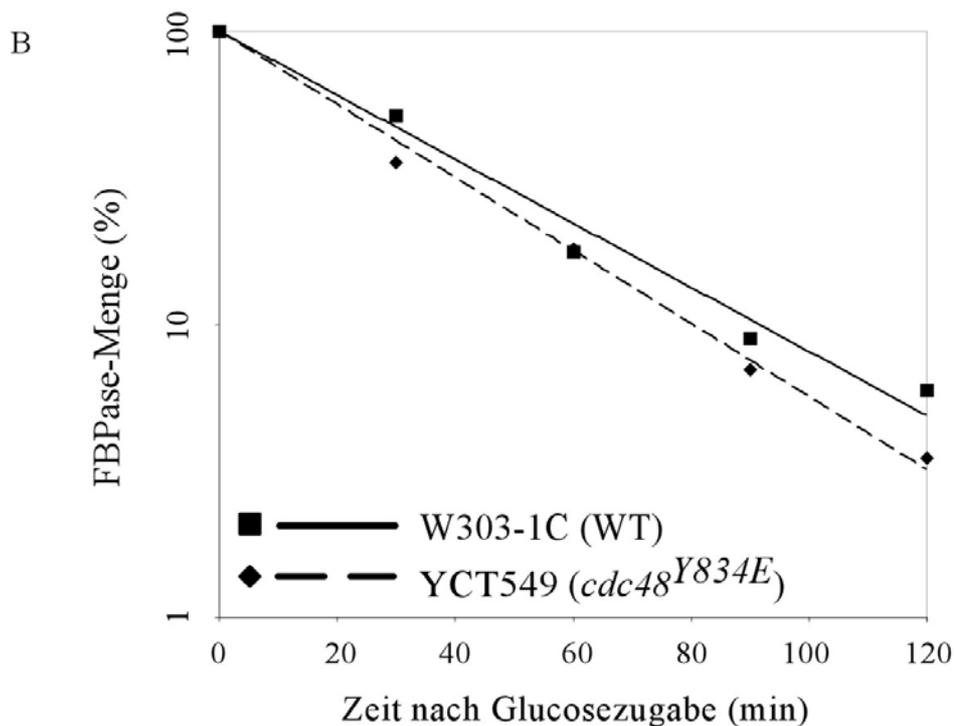
*cdc48<sup>Y834G</sup>*-Mutante (W303-1C/*cdc48F*) scheint der FBPase-Abbau relativ ähnlich wie in Wildtypzellen zu verlaufen.



**Abb. 5-11:** Katabolitdegradation der FBPase in Mutanten der AAA-ATPase Cdc48p. Dazu wurde eine Western Blot-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: W303-1C/CDC48, W303-1C/*cdc48E*, W303-1C/*cdc48F* und W303-1C/*cdc48G*. In sämtlichen Stämmen wird eine vorhandene *cdc48*-Deletion durch Überexpression des Wildtyp-*CDC48*-Gens bzw. von mutierten *cdc48*-Genen komplementiert.

Da in dem Stamm mit dem *cdc48<sup>Y834E</sup>*-Allel die Stabilisierung der FBPase am größten war, wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in einem Stamm mit chromosomal integrierter *cdc48<sup>Y834E</sup>*-Mutation (YCT549) durchgeführt. Wie in Abb. 5-12 zu sehen ist ergab die Pulse Chase-Analyse hier einen Abbau fast gleicher Kinetik wie im Wildtypstamm. Folglich ist das Cdc48p höchstwahrscheinlich nicht an der Katabolitdegradation der FBPase beteiligt, allerdings könnte das Cdc48p angesichts der Stabilisation der FBPase in der Western Blot-Analyse des FBPase-Abbaus in dem Stamm mit dem *cdc48<sup>Y834E</sup>*-Allel (Abb. 5-11) bei der Expression der FBPase eine Rolle spielen.



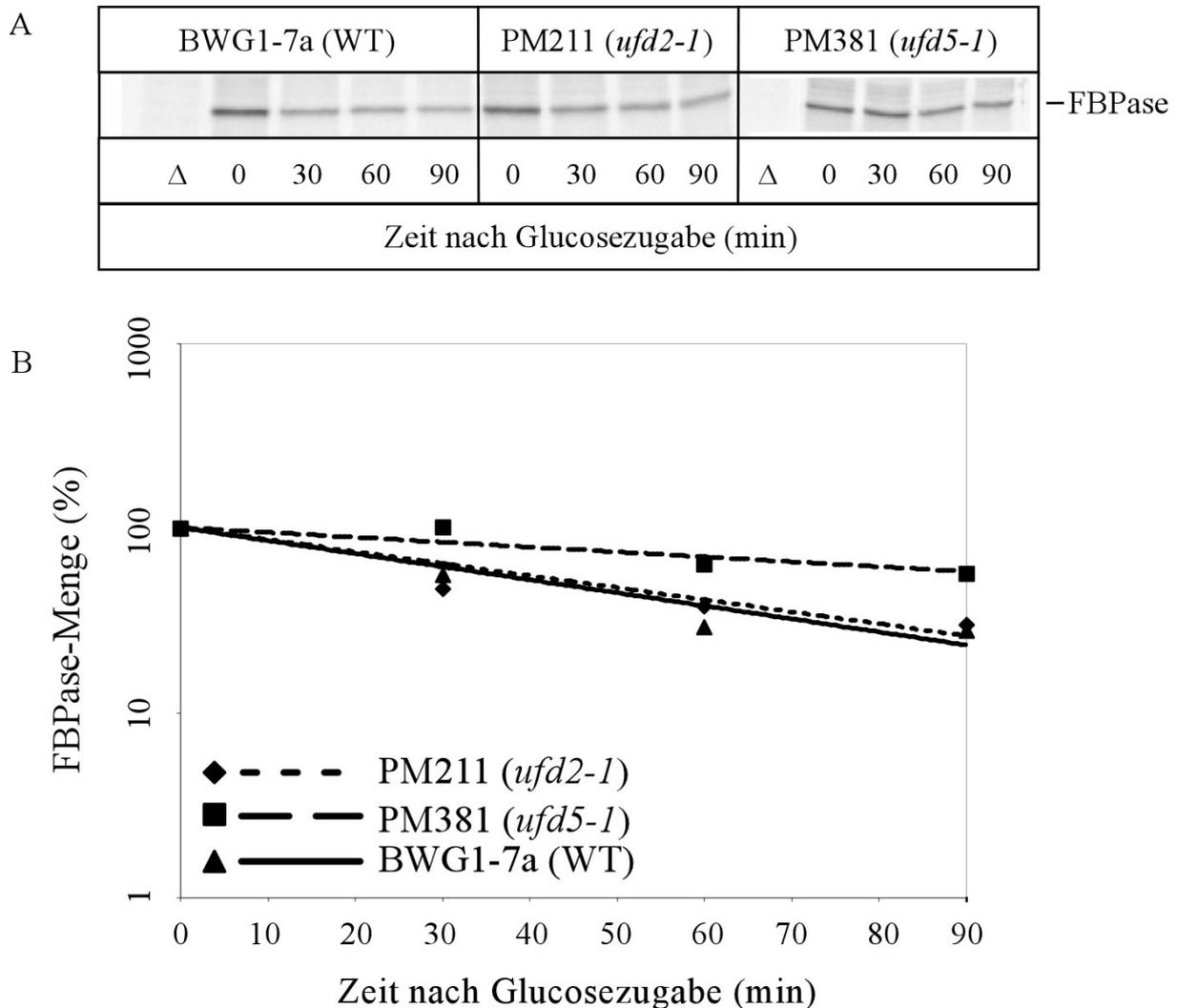


**Abb. 5-12:** Katabolitdegradation der FBPAse in Mutanten der AAA-ATPase Cdc48p. Dazu wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPAse-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: WCG-1C (Wildtyp) und YCT549 (*cdc48<sup>Y834E</sup>*) (A). Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPAse nach Glucosezugabe (B).

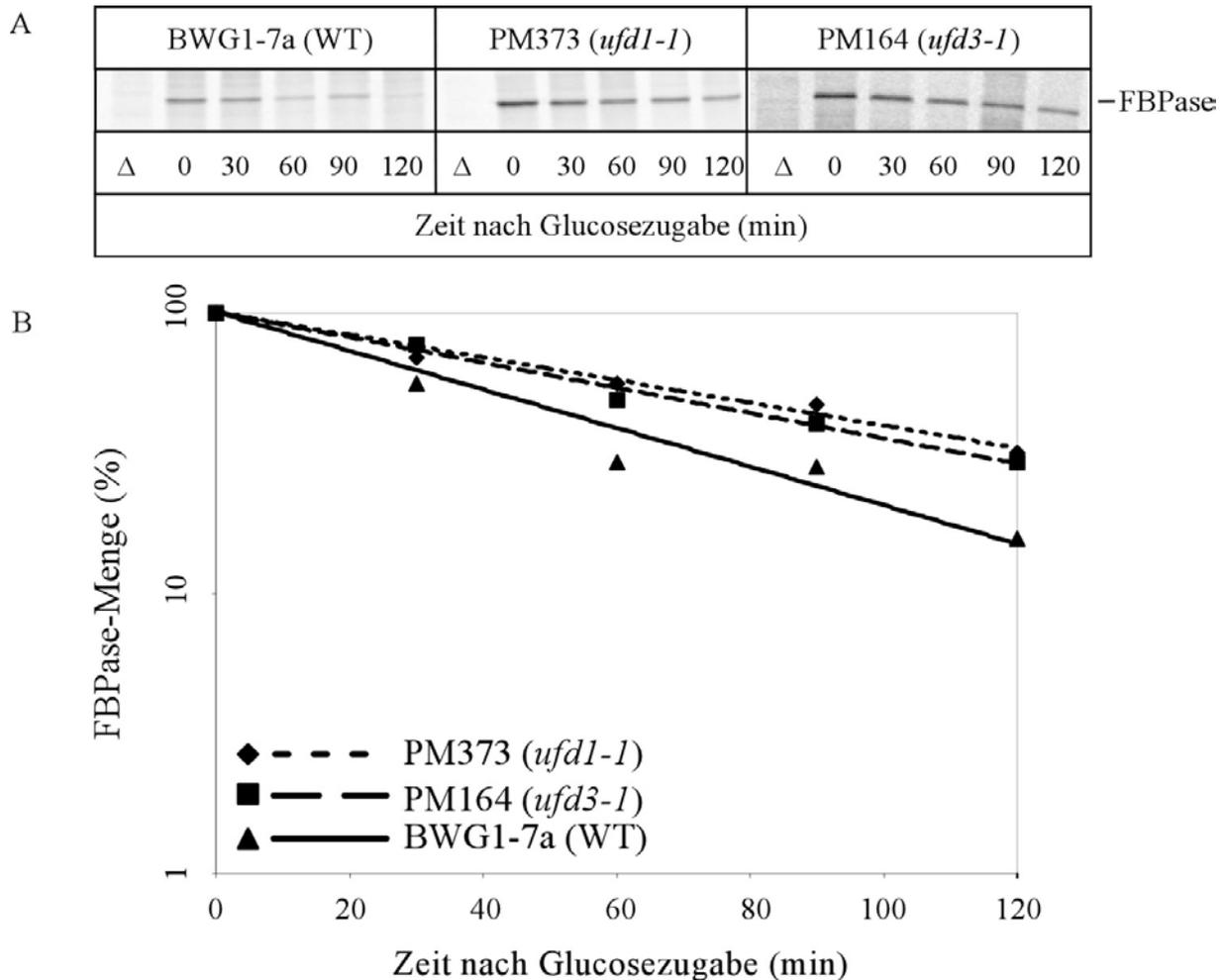
### 5.2.3 Überprüfung des Einflusses von Proteinen des Ufd-Weges

Fusionsproteine, die ein nicht entfernbare N-terminales Ubiquitin-Motiv tragen, sind *in vivo* kurzlebig. Das fusionierte Ub wirkt dabei als Abbausignal (Johnson et al., 1995). Der beteiligte Proteolyseweg wird UFD-Weg (Ub fusion degradation) genannt. In der Hefe *S. cerevisiae* wurden bisher 5 Proteine identifiziert, welche an diesem Abbauweg beteiligt sind (Johnson et al., 1995). Das Protein Ufd1p hat seine Funktion als Teil des Cdc48-Ufd1-Npl4-Komplexes (siehe Kapitel 5.2.2). Das Ufd2p stellt einen Ubiquitin-Konjugierungsfaktor (E4) dar, welcher an Ub-Motive ubiquitiniertes Substrate bindet und zusammen mit den entsprechenden E1-, E2- und E3-Enzymen eine weitere Ubiquitinkettenanhangung katalysiert (Koegl et al., 1999). Doa1p (Ufd3p / Zzz4p) spielt eine Rolle bei der Kontrolle der Konzentration freien Ubiquitins in der Zelle. In *ufd3*-Mutanten ist die Menge freien Ubiquitins drastisch reduziert (Johnson et al., 1995). Ufd4p ist eine Ubiquitin-Protein-Ligase (E3) (Xie and Varshavsky, 2000). Rpn4p (Ufd5p / Son1p) stellt eine Untereinheit des 19S-Kapenkomplexes dar.

Um zu überprüfen, ob diese 5 Ufd-Proteine einen Einfluß auf die Glucose-induzierte Katabolitdegradation der FBPase haben, wurden Pulse Chase-Analysen durchgeführt. Dazu wurden Mutantenstämme dieser Proteine verwendet. Diese wiesen alle, inklusive des zugehörigen Wildtyp-Stammes (BWG1-7a), ein schlechtes Wachstum in CM-Met-Medium auf. Wie in Abb. 5-13 zu sehen, verläuft der FBPase-Abbau in einem *ufd2-1*-Mutantenstamm wie in Wildtyp-Zellen, wohingegen in einem *ufd5-1*-Mutantenstamm eine 2 – 3-fache Stabilisierung beobachtet werden kann. Auch *ufd1-1*- und *ufd3-1*-Mutantenstämme zeigen etwa eine 2-fache Stabilisierung des Abbaus. In dem *ufd4-1*-Mutantenstamm konnte kein detektierbares Signal radioaktiver FBPase gefunden werden. Der FBPase-Abbau in einer *ufd4*-Deletionsmutante wird in Kapitel 5.2.6 untersucht.



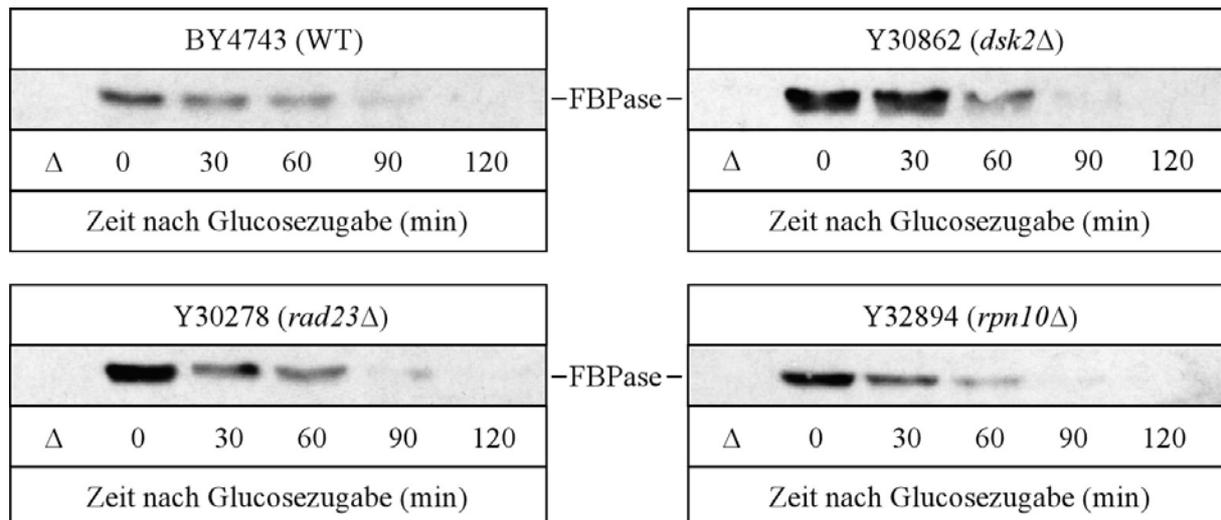
**Abb. 5-13:** Katabolitdegradation der FBPase in *ufd*-Mutanten. Dazu wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: BWG1-7a (Wildtyp), PM211 (*ufd5-1*) und PM381 (*ufd5-1*) (A). Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase nach Glucosezugabe (B).



**Abb. 5-14:** Katabolitdegradation der FBPase in *ufd*-Mutanten. Dazu wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: BWG1-7a (Wildtyp), PM373 (*ufd1-1*) und PM164 (*ufd3-1*) (A). Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase nach Glucosezugabe (B).

#### 5.2.4 Überprüfung des Einflusses von UbA-Domänen-Proteinen

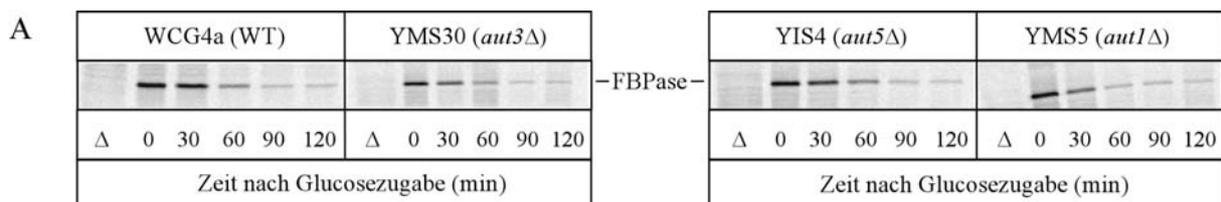
Als nächstes wurde der Einfluß von Proteinen mit UbA-Domänen auf die Katabolitdegradation der FBPase getestet. Mit der UbA-Domäne können Ubiquitinketten gebunden werden. Dsk2p, Rad23p und die Proteasomenuntereinheit Rpn10p tragen solche Domänen. Wie in Abb. 5-15 zu sehen ist, läuft der FBPase-Abbau in *rad23*-, *dsk2*- und *rpn10*-Deletionsmutanten wie in Wildtyp-Zellen ab. In Einfachmutanten könnte kein Einfluß der Proteine Rad23p, Dsk2p und Rpn10p auf den FBPase-Abbau gezeigt werden. Da allerdings diese 3 Proteine in ihrer Funktion redundant sein könnten, müssten zur genauen Identifizierung ihres Einflusses auf den FBPase-Abbau auch Doppelmutantenstämme, z.B. mit sowohl deletiertem *RAD23*- als auch *DSK2*-Gen, auf einen Defekt in der Katabolitdegradation der FBPase getestet werden.

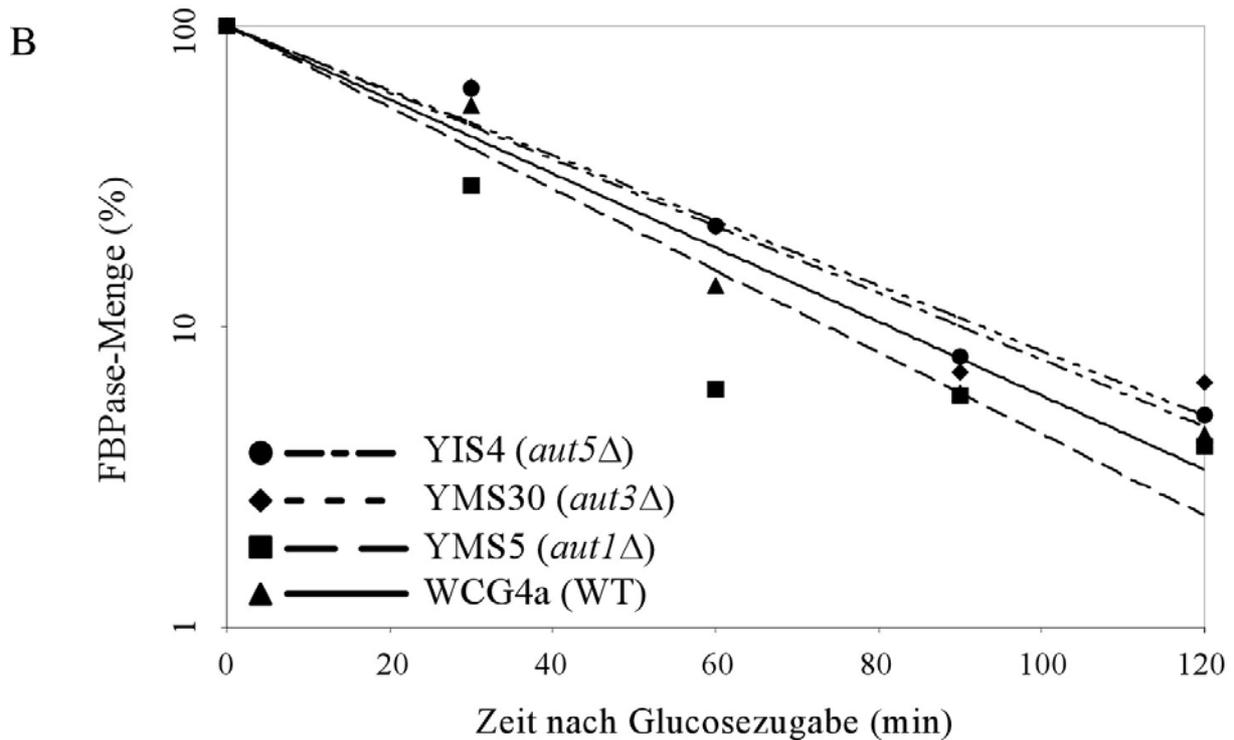


**Abb. 5-15: Katabolitdegradation der FBPase in Mutanten von Proteinen mit UbA-Domänen.** Dazu wurde eine Western Blot-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: BY4743 (Wildtyp), Y30862 (*dsk2Δ*), Y30278 (*rad23Δ*) und Y32894 (*rpn10Δ*).

## 5.2.5 Überprüfung des Einflusses von Autophagozytosemutanten

Ob die Autophagozytose einen Einfluß auf den FBPase-Abbau hat, wurde anhand von Mutanten in verschiedenen Schritten der Autophagozytose überprüft. Aut5p hat seine Funktion in der Lyse autophagischer Vesikel in der Vakuole (Epple et al., 2001), Aut1p ist an der Bildung und Reifung von Autophagosomen beteiligt (Reiche, Dissertation 2002) und die Serin- / Threoninkinase Aut3p ist eine Komponente der Signaltransduktion im Hungersignalweg der Autophagozytose (Kamada et al., 2000). Mit Deletionsmutantenstämmen dieser 3 Proteine wurden Pulse Chase-Analysen des FBPase-Abbaus durchgeführt. In allen 3 verwendeten Stämmen war ein Abbau wie in Wildtypzellen zu beobachten (Abb. 5-16). Die Autophagozytose scheint keinen Einfluß auf die Katabolitdegradation der FBPase zu haben.





**Abb. 5-16:** Katabolitdegradation der FBPase in Autophagozytosemutanten. Dazu wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: WCG4a (Wildtyp), YIS4 (*aut5Δ*), YMS30 (*aut3Δ*) und YMS5 (*aut1Δ*) (A). Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase nach Glucosezugabe (B).

## 5.2.6 Suche nach dem E3-Enzym des proteasomalen Abbaus

Ziel dieser Suche war es, das bisher noch unbekannte E3 der Katabolitdegradation zu finden.

### 5.2.6.1 Vorgehensweise: Datenbanksuche nach möglichen E3-Enzymen

Mögliche E3s der Hefe *S. cerevisiae* wurden durch Literatursuche (Jackson et al., 2000) und Datenbanksuche im Internet durchgeführt. Bei der Datenbanksuche wurde die Yeast Proteome Database (<http://www.proteome.com/databases/YPD/YPDsearch-quick.html>) und die Saccharomyces Genome Database (SGD, <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>) verwendet. Bei ersterer wurde mit dem Suchbegriff „ring finger“ nach Proteinen mit möglicher RING-Finger-Domäne gesucht. Sodann wurde unabhängig davon ein Suchmotiv für RING-Finger verwendet. Mit dem Suchmotiv wurden die Aminosäuresequenzen aller Hefegene verglichen. Als Suchmotiv wurde folgende

Aminosäuresequenz verwendet: Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>n</sub>-Cys-X-His-X<sub>2</sub>-(His oder Cys)-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>n</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys (Saurin et al., 1996). X steht dabei für eine beliebige Aminosäure. X<sub>2</sub> und X<sub>n</sub> steht für 2 bzw. beliebig viele aufeinander folgende beliebige Aminosäuren (siehe auch Abb. 3-1).

Insgesamt wurden 5 HECT-Domänen-E3s, 14 mögliche RING-H<sub>2</sub>-E3s, 16 mögliche RING-HC-E3s, 12 mögliche E3s mit RING-ähnlichen Domänen und 1 F-box-Domänen-Protein gefunden (siehe auch Tabelle 5-1).

**Tabelle 5-1: Zusammenstellung der durch Literatur- und Datenbanksuche gefundenen möglichen E3-Enzyme und ihrer möglichen Domänen. In der Spalte Δ ist dargestellt, ob die Deletionsmutante lebensfähig (V), tödlich (L) oder die Lebensfähigkeit unbekannt (U) ist. Das Wachstum auf Ethanolhaltigem Medium der Deletionsmutanten ist in der Spalte Wa gezeigt. Ist in der Spalte nichts vermerkt, ist das Wachstum gleich dem Wildtypstamm. Ein – bedeutet schlechtes Wachstum, --- sehr schlechtes bzw. kein Wachstum. Die Spalte AB zeigt, ob in den Deletionsmutanten ein Defekt im FBPase-Abbau feststellbar war. + heißt dabei, dass der Abbau wie in einem Wildtyp-Stamm ablief. AD bedeutet, dass dieser Stamm einen Abbaufekt aufweist. N. g. bedeutet, dass dieser Deletionsstamm nicht getestet wurde. Das lag entweder daran, dass der Stamm in der verwendeten EUROSCARF-Collection nicht vorhanden war (f), oder dass der Stamm wegen schlechten Wachstums auf Ethanolhaltigem Medium nicht getestet wurde oder die entsprechende Deletion lethal war. Bei Verfügbarkeit eines entsprechenden Mutantenstammes, wurde dieser verwendet (z.B: *rsp5*).**

Nr	Gen	ORF	Δ	Domäne / Motiv	Funktion	Wa	AB
1	<i>HUL4</i>	YJR036c	V	Hect	E3		+
2	<i>HUL5</i>	YGL141w	V	Hect	E3		+
3	<i>RSP5</i>	YER125w	L	Hect	E3		+
4	<i>TOM1</i>	YDR457w	V	Hect	E3 G2/M transition		+
5	<i>UFD4</i>	YKL010c	V	Hect	E3 ubiquitin fusion degradation pathway		+
6	<i>APC11</i>	YDL008w	L	RING-H2	E3 anaphase-promoting complex		n g
7	<i>DER3</i>	YOL013c	V	RING-H2	E3 ERAD		+
8	<i>FAR1</i>	YJL157c	V	RING-H2	Inhibitor of Cdc28p-Kinase		+
9	<i>PEP3</i>	YLR148w	V	RING-H2	Vacuolar peripheral membrane protein involved in vacuolar protein sorting and required for vacuole	-	n g

					biogenesis		
10	<i>PEP5</i>	YMR231w	V	RING-H2	Vacuolar peripheral membrane protein required for vacuole biogenesis		n g (f)
11	<i>STE5</i>	YDR103w	V	RING-H2	Pheromone pathway scaffolding protein involved in a complex with Fus3p, Ste7p, and Ste11p		n g (f)
12	<i>UBR1</i>	YGR184c	V	RING-H2	E3 N-end rule pathway		n g (f)
13	<i>UBR2</i>	YLR024c	V	RING-H2	E3		+
14	<i>VPS8</i>	YAL002w	V	RING H2	Protein involved in vacuolar sorting		+
15		YHL010c	V	RING-H2			+
16		YHR115c	V	RING-H2			+
17	<i>TUL1</i>	YKL034w	V	RING-H2	E3		+
18		YNL116w	V	RING H2			+
19		YPR093c	V	RING-H2			+
20	<i>SLX1</i>	YBR228w	V	Ring-CH	Subunit of Slx1p-Slx4p complex, required for cell growth in the absence of SGS1 or TOP3		+
21	<i>BRE1</i>	YDL074c	V	RING-HC			+
22	<i>PEX10</i>	YDR265w	V	RING-HC	Peroxisomal biogenesis protein		+
23	<i>RAD5</i>	YLR032w	V	RING-HC	DNA helicase of the Snf2p family and member of the RAD6 epistasis group, involved in error-free DNA repair		+
24	<i>RAD16</i>	YBR114w	V	RING-HC	Nucleotide excision repair protein involved in G2 repair of inactive genes, has DNA helicase domain of Snf2p		+

					family		
25	<i>RAD18</i>	YCR066w	V	RING-HC	Multifunctional DNA repair protein, required for post-replication repair		+
26	<i>RIS1</i>	YOR191w	V	RING-HC	Protein involved in silencing, member of Snf2p DNA-dependent ATPase family		+
27	<i>SLX8</i>	YER116c	V	RING-HC	Subunit of Hex3p-Slx8p complex, required for cell growth in the absence of SGS1 or TOP3	-	n g
28		YKR017c	V	2 RING-HC			+
29	<i>AIR2</i>	YDL175c	V	RING-HC	arginine methyltransferase-interacting RING finger protein		+
30		YDR266c	V	RING-HC			+
31	<i>AIR1</i>	YIL079c	V	RING-HC	arginine methyltransferase-interacting RING finger protein		+
32		YLR247c	V	RING-HC	Protein with similarity to Rad16p	-	n g
33	<i>CWC24</i>	YLR323c	L	RING-HC	Complexed with Cef1p		n g
34		YLR427w	V	RING-HC			+
35	<i>PSH1</i>	YOL054w	V	RING-HC	Pob3/Spt16 Histone associated		+
36	<i>ECM32</i>	YER176w	V	putative RING finger motif	Helicase involved in modulating translation termination efficiency		n g (f)
37	<i>FABI</i>	YFR019w	V	putative zinc-binding RING motif	Phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase involved in orientation or separation of mitotic chromosomes	---	n g
38	<i>HEX3</i>	YDL013w	V	RING finger domains	Protein that forms a complex with Slx8p/Yer116p,		AD

					required for cell growth in the absence of SGS1 or TOP3 Protein involved in hexose metabolism		
39	<i>NAM7</i>	YMR080c	V	zinc finger domain	Protein involved with Nmd2p and Upf3p in decay of mRNA containing nonsense codons		+
40	<i>PEP7</i>	YDR323c	V	C2H2-type N-terminal zinc finger domain two putative zinc-binding RING domains	Vacuolar segregation protein required for vacuole inheritance and vacuole protein sorting		+
41	<i>PIB2</i>	YGL023c	V	FYVE finger motif	Phosphatidylinositol 3-phosphate binding		+
42		YDR034w-b	U	putative RING finger-type zinc finger motif			n g (f)
43	<i>ITT1</i>	YML068w	V	two modified RING finger domains	Inhibitor of Translation Termination		+
44	<i>TFB3</i>	YDR460w	L	zinc-binding motif typical of C3HC4 RING finger domain	Component of RNA polymerase II transcription initiation TFIIH (factor b), 38 kDa subunit		n g
45	<i>VPS27</i>	YNR006w	V	RING zinc-finger domain	Protein involved in vacuolar sorting; mutants develop a prominent novel pre-vacuolar		+

					organelle		
46	<i>PEX12</i>	YMR026c	V	C3HC4 zinc-finger domain	Peroxisomal biogenesis protein		+
47	<i>PEX2</i>	YJL210w	V	C3HC4 zinc finger	Peroxisomal biogenesis protein (peroxin) required for peroxisomal import of some proteins		+
48	<i>SSM4</i>	YIL030c	V		Protein involved in mRNA turnover, inactivation suppresses mRNA instability due to rna14-3 mutation		+
49	<i>GRR1</i>	YJR090c	V	F-box	Skp1-Cullin-F-box ubiquitin protein ligase (SCF) subunit		AD?

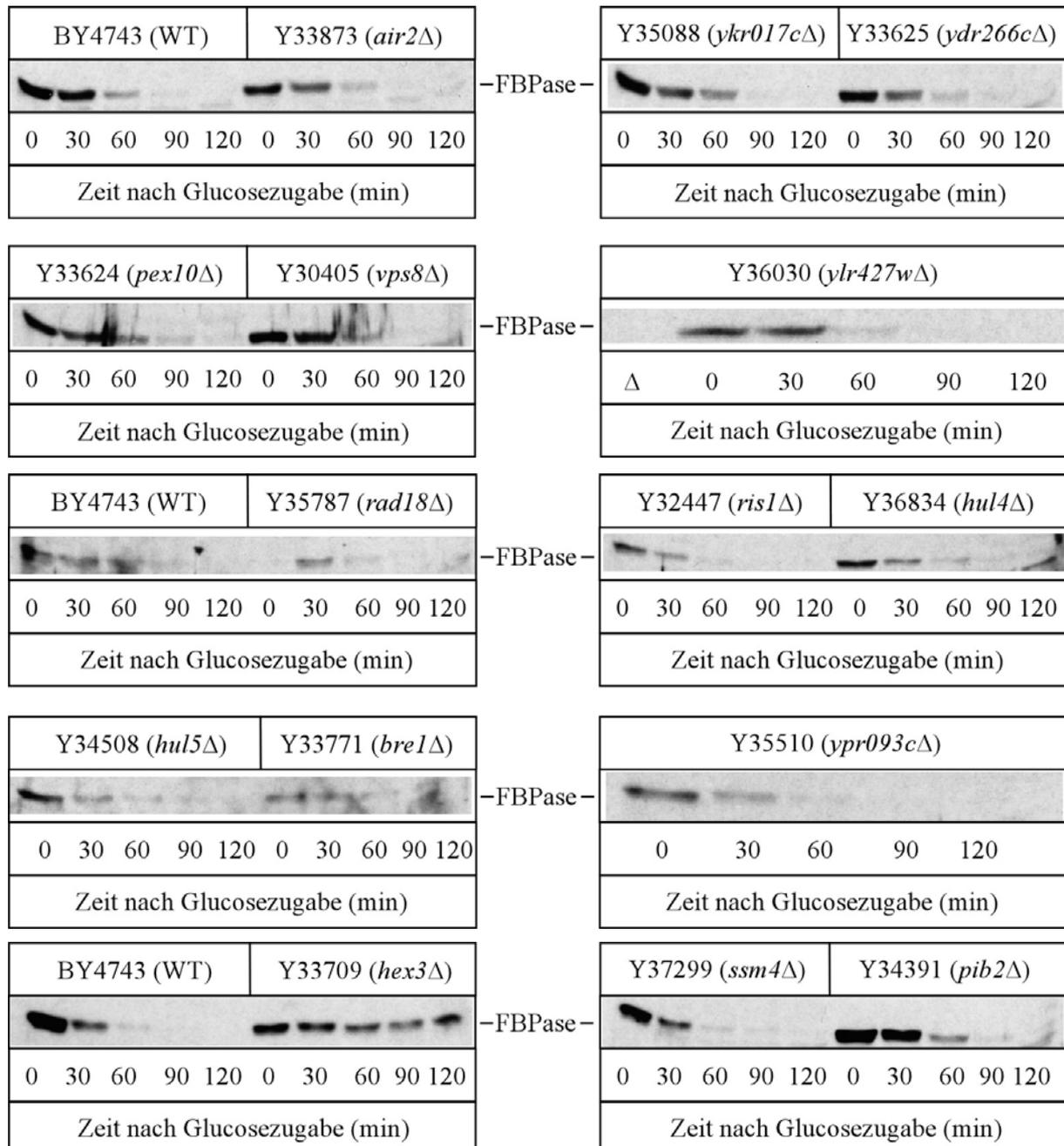
### 5.2.6.2 Überprüfung des FBPase-Abbaus in Deletionsmutanten der möglichen E3-Enzyme

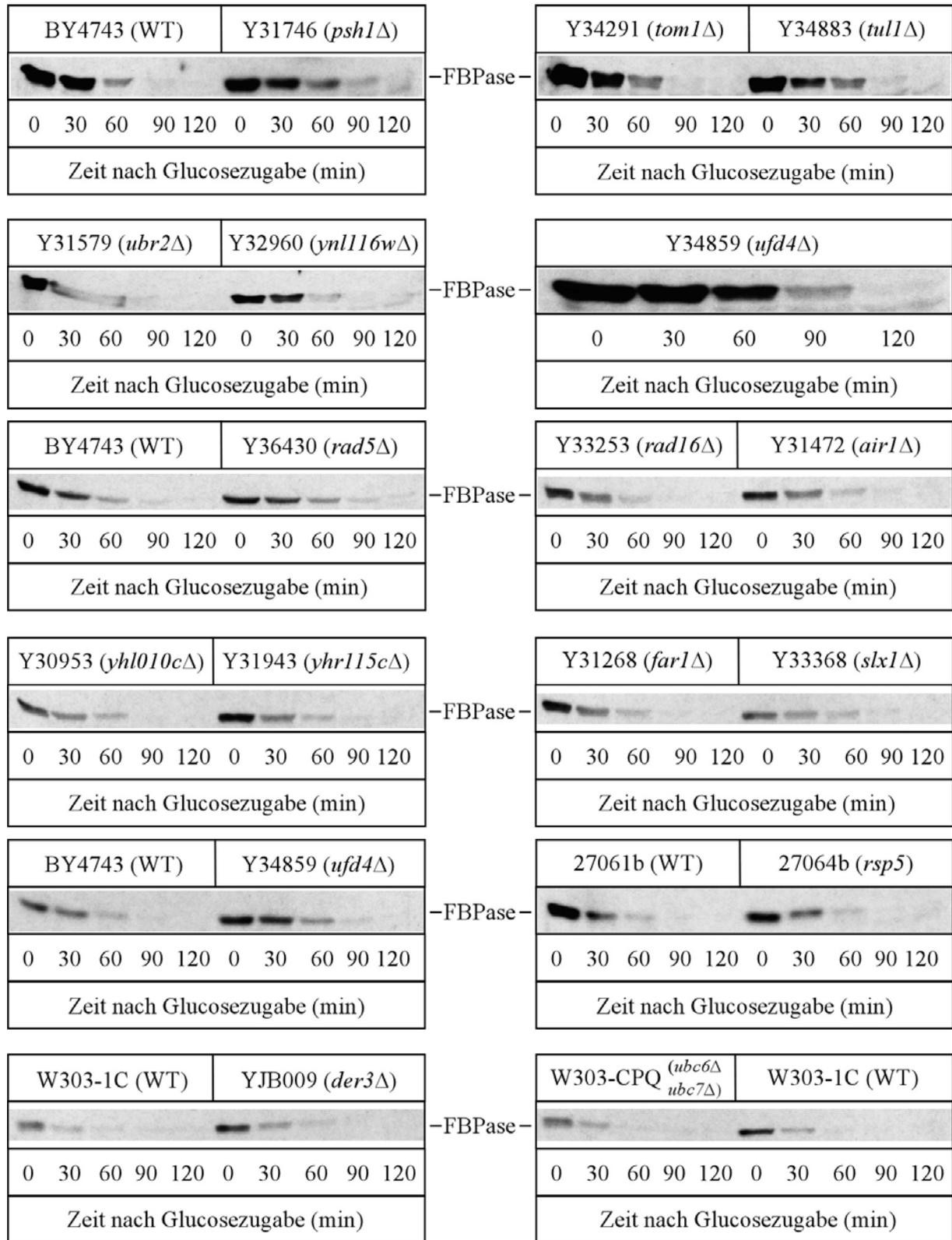
Von den gefundenen möglichen E3-Enzymen wurde eine Western-Blot-Analyse des FBPase-Abbaus in den entsprechenden verfügbaren Deletionsstämmen durchgeführt. Die Deletionsstämme stammten aus der EUROSCARF-Kollektion, welche aus sämtlichen lebensfähigen Deletionsmutanten der ca. 6000 Hefegene in homozygot diploiden Stämmen besteht (ca. 5000). Mögliche E3-Enzyme, deren Deletionen ihres Genes lethal waren, wurden, falls vorhanden, in Form von Stämmen, die ein entsprechendes Mutanten-Allel des Gens trugen, überprüft. In Deletionsstämmen, die nur schlecht auf Ethanol-haltigem Medium wachsen konnten, wurde der FBPase-Abbau nicht untersucht.

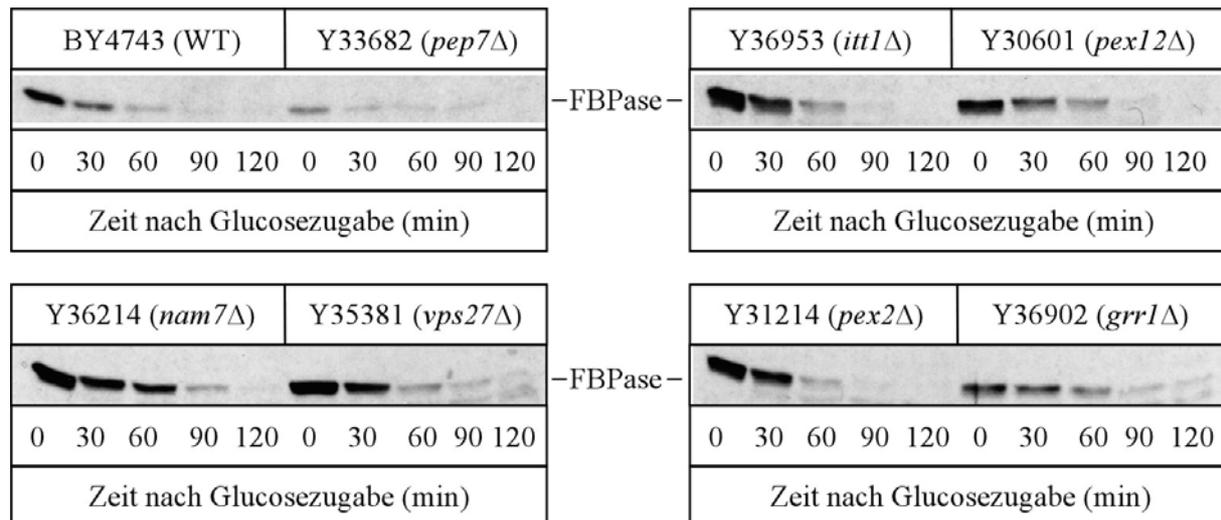
In Abb. 5-17 – 5-23 sind die Western Blot-Analysen des FBPase-Abbaus der getesteten Deletionsmutanten- oder Punktmutantenstämmen dargestellt. In Tabelle 5-1 sind die Untersuchungsergebnisse zusammengestellt.

Von den in Tabelle 5-1 dargestellten 49 möglichen E3s konnten 37 getestet werden. Von 3 Genen war die Deletion lethal, von 5 Genen fehlten die Deletionsmutanten in der EUROSCARF-Collection und die Deletionsmutanten von 4 Stämmen wiesen ein schlechtes Wachstum auf Ethanol-haltigem Medium auf. Von den 37 getesteten Deletionsmutanten wies

nur die *hex3*-Deletionsmutante eine deutliche Stabilisierung des FBPase-Abbaus auf (Abb. 5-23). In der *grr1*-Deletionsmutante kann man evtl. eine schwache Verlangsamung des FBPase-Abbaus erkennen (Abb. 5-22). Außer den möglich E3-Proteinen wurde auch der Einfluß der E2s Ubc6p und Ubc7p untersucht. In einer Doppeldeletionsmutante konnte nur ein Abbau wie in Wildtypzellen festgestellt werden (Abb. 5-21).







**Abb. 5-17:** Katabolitdegradation der FBPase in Mutanten möglicher E3-Enzyme. Dazu wurde eine Western Blot-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: BY4743 (Wildtyp), Y33873 (*air2*Δ), Y35088 (*ykr017c*Δ), Y33625 (*ydr266c*Δ), Y33624 (*pex10*Δ), Y30405 (*vps8*Δ), Y36030 (*ylr427w*Δ), Y35787 (*rad18*Δ), Y32447 (*ris1*Δ), Y36834 (*hul4*Δ), Y34508 (*hul5*Δ), Y33771 (*bre1*Δ), Y35510 (*ypr093c*Δ), Y31746 (*psh1*Δ), Y34291 (*tom1*Δ), Y34883 (*tul1*Δ), Y31579 (*ubr2*Δ), Y32960 (*ynl116w*Δ), Y36430 (*rad5*Δ), Y33253 (*rad16*Δ), Y31472 (*air1*Δ), Y30953 (*yhl010c*Δ), Y31943 (*yhr115c*Δ), Y31268 (*far1*Δ), Y33368 (*slx1*Δ), Y34859 (*ufd4*Δ), 27061b (Wildtyp), 27064b (*rsp5*), W303-1C (Wildtyp), YJB009 (*der3*Δ), W303-CPQ (*ubc6*Δ *ubc7*Δ), Y33682 (*pep7*Δ), Y36953 (*itt1*Δ), Y30601 (*pex12*Δ), Y36214 (*nam7*Δ), Y35381 (*vps27*Δ), Y31214 (*pex2*Δ), Y36902 (*grr1*Δ), Y33709 (*hex3*Δ), Y37299 (*ssm4*Δ) und Y34391 (*pib2*Δ).

### 5.2.6.3 Die Proteine Hex3p und Slx8p

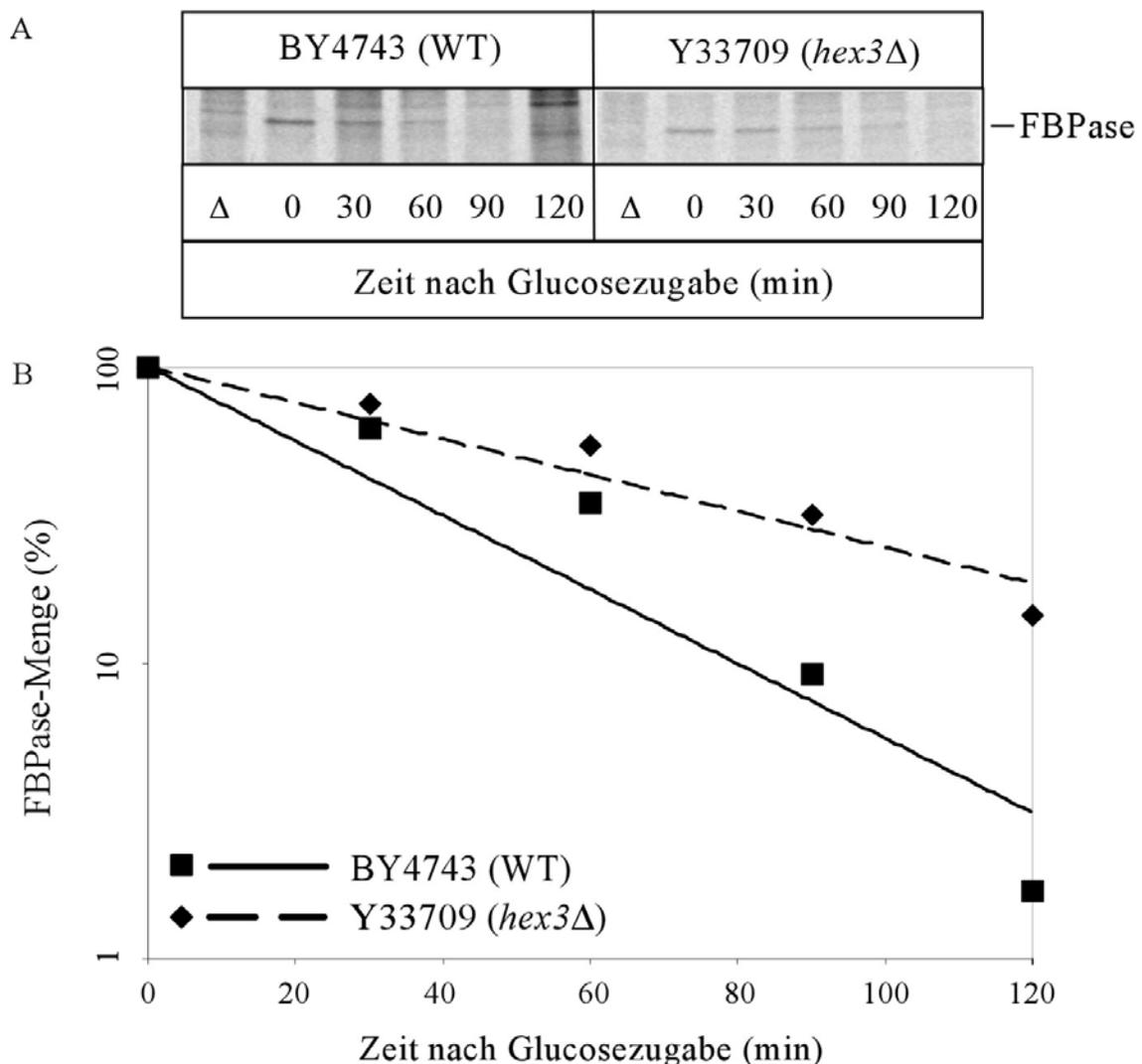
Hex3p / Slx5p ist ein 619 Aminosäuren großes Protein mit einer molekularen Masse von 71 kDa, welches mit dem Hexose-Metabolismus in Verbindung steht und für die Sporulation benötigt wird. Die Deletionsmutante ist lebensfähig, zeichnet sich aber durch langsames Wachstum aus, formt einen Mix aus großen und kleinen Kolonien mit rauhen Ecken und ist hypersensitiv für N-Hydroxyl-Harnstoff. Außerdem sporuliert die homozygot diploide Deletionsmutante schlecht. Die Deletionsmutation ist zusammen mit einer *sgs1*- als auch einer *top3*-Deletion synthetisch lethal. Hex3p coimmunopräzipitiert mit Slx8p (Mullen et al., 2001).

Slx8p ist ein 271 Aminosäuren großes Protein mit einer molekularen Masse von 30,8 kDa. Die Deletionsmutante weist dieselben Phänotypen auf wie die *hex3*-Deletionsmutante und zeigt auch dieselben synthetischen Lethalitäten. Slx8p coimmunopräzipitiert mit Hex3p (Mullen et al., 2001).

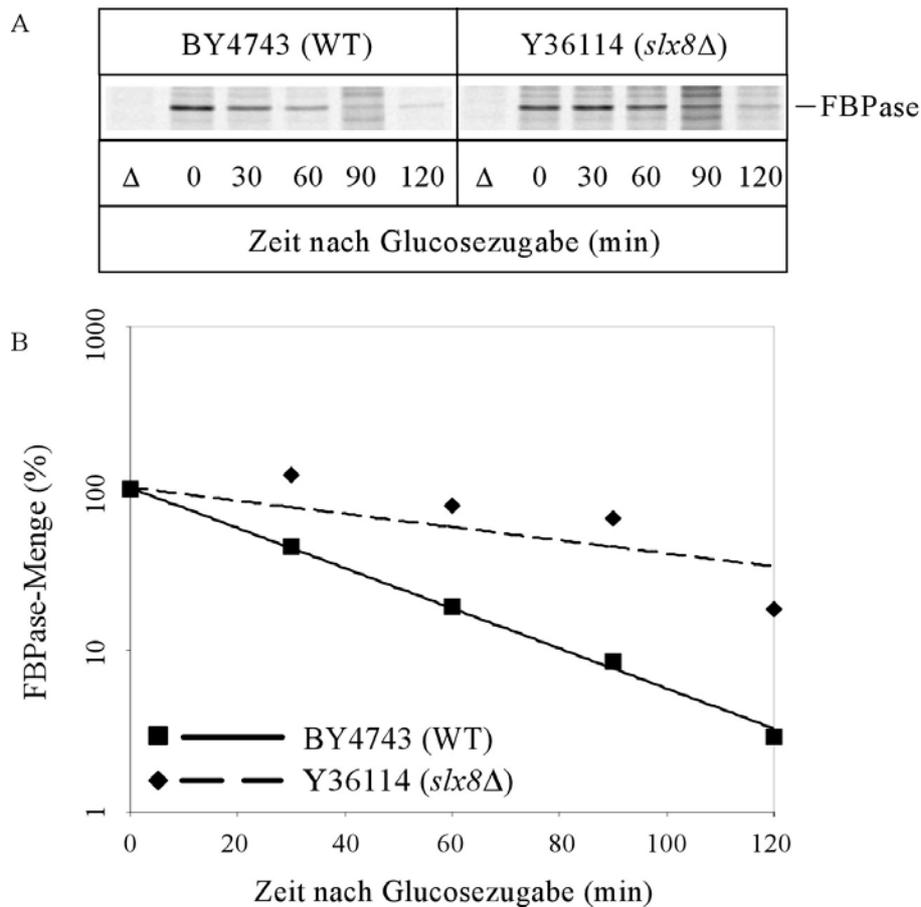
### 5.2.6.4 Analyse der Katabolitdegradation der FBPase in *hex3*- und *slx8*-Deletionsmutanten

Da in einer homozygot diploiden *hex3*-Deletionsmutante ein verzögerter FBPase-Abbau feststellbar war (Abb. 5-17) und das Protein Hex3p mit Slx8p coimmunopräzipitiert, wurden Pulse Chase-Analysen bezüglich des FBPase-Abbaus in homozygot diploiden *hex3*- und *slx8*-Deletionsmutanten durchgeführt.

In Abb. 5-18 kann man sehen, dass in der *hex3*-Deletionsmutante die Halbwertszeit der FBPase etwa doppelt so groß wie im Wildtyp ist. In der *slx8*-Deletionsmutante ist die Halbwertszeit noch größer, nämlich drei Mal so groß wie im Wildtyp (Abb. 5-19).



**Abb. 5-18:** Katabolitdegradation der FBPase in einer *hex3*Δ-Mutante. Dazu wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: BY4743 (Wildtyp) und Y33709 (*hex3*Δ) (A). Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase nach Glucosezugabe (B).



**Abb. 5-19:** Katabolitdegradation der FBPase in einer *slx8Δ*-Mutante. Dazu wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: BY4743 (Wildtyp) und Y36114 (*slx8Δ*) (A). Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase nach Glucosezugabe (B).

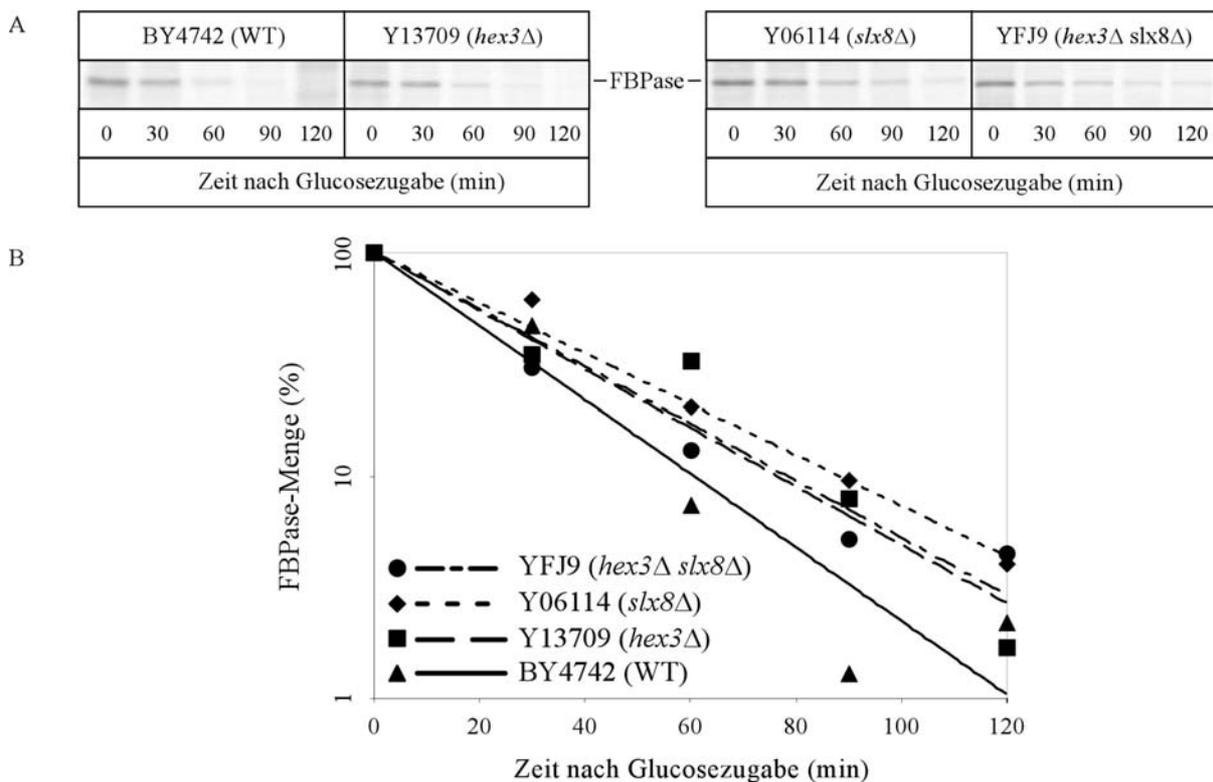
### 5.2.6.5 Herstellung einer *hex3Δ slx8Δ*-Doppelmutante

Da in den homozygot diploiden Deletionsmutantenstämmen der Gene *HEX3* und *SLX8* ein verlangsamter des FBPase-Abbau feststellbar war und zwischen beiden in der Literatur eine Interaktion nachgewiesen worden war, wurde untersucht, ob in einem Doppeldeletionsmutantenstamm eine noch größere Stabilisierung der FBPase unter Inaktivierungsbedingungen feststellbar ist. Deshalb wurde ausgehend von 2 haploiden Deletionsmutanten der Gene *HEX3* und *SLX8* eine haploider Doppeldeletionsstamm hergestellt. Dazu wurden die beiden haploiden Stämme Y13709 (*hex3Δ lys2Δ0*) und Y06114 (*slx8Δ met15Δ0*) gekreuzt und der erhaltenen diploide Stamm sporuliert. Die erhaltenen Tetraden wurden danach einer Dissektion unterzogen. Insgesamt wurden 14 Tetraden erhalten und deren Wachstum auf G418-YPD-, CM ohne Met- und CM ohne Lys-Platten untersucht. Erhalten wurden 5 Tetraden, bei welchen jeweils 2 Sporen *hex3Δ* und 2 Sporen *slx8Δ* waren, in 4 Tetraden

wurde jeweils eine *hex3Δ*-, eine *slx8Δ*-, eine *hex3Δ slx8Δ*- und eine Wildtyp-Spore gefunden und in den anderen 5 Tetraden waren jeweils 2 Wildtyp- und 2 *hex3Δ slx8Δ*-Sporen zu beobachten. Aus letzteren Tetraden wurde dann der Stamm YFJ9 mit folgendem Genotyp ausgewählt: *Mat $\alpha$  his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 hex3 $\Delta$ ::KANMX4 slx8 $\Delta$ ::KANMX4*.

### 5.2.6.6 Analyse der Katabolitdegradation der FBPase in einer *hex3Δ slx8Δ*-Doppelmutante

In dem so erhaltenen haploiden Doppelmutantenstamm YFJ9, in welchem sowohl *HEX3* als auch *SLX8* deletiert sind, als auch in den zugrundeliegenden haploiden Einfachmutantenstämmen Y13709, der eine Deletion des *HEX3*-Gen aufweist, und Y06114, bei welchem *SLX8* deletiert ist, wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus durchgeführt. Erstaunlicherweise zeigten alle 3 Stämme einen Abbau wie in Wildtypzellen (Abb. 5-20).



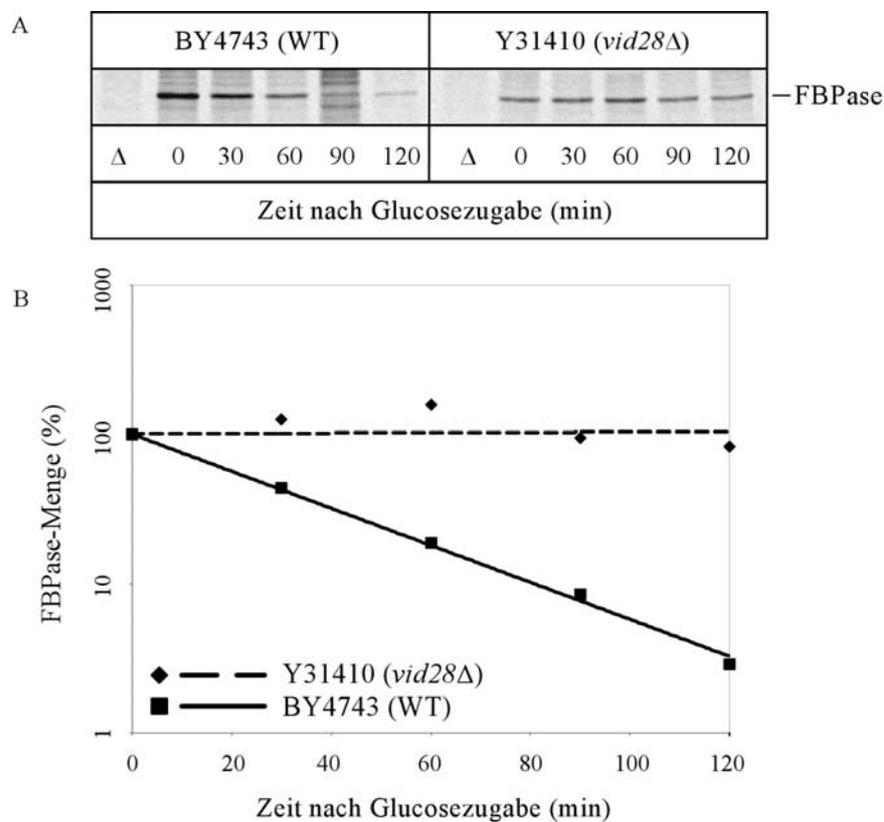
**Abb. 5-20:** Katabolitdegradation der FBPase in einer *hex3Δ slx8Δ*-Doppelmutante. Dazu wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: BY4742 (Wildtyp), Y06114 (*slx8Δ*), Y13709 (*hex3Δ*) und YFJ9 (*hex3Δ slx8Δ*) (A). Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase nach Glucosezugabe (B).

### 5.2.7 Pulse Chase-Analysen des FBPase-Abbaus in Deletionsmutanten neu gefundener *GID*-Gene

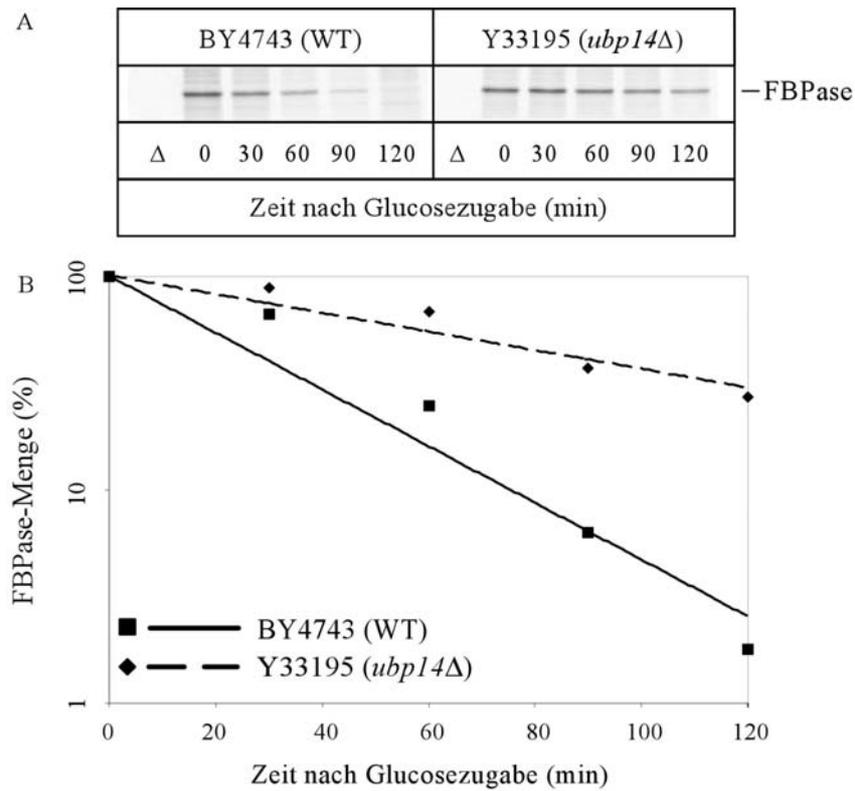
In einem genomweiten Screen wurden von Jochen Regelmann 4 neue *GID*-Gene (glucose induced degradation deficient), also Gene deren Genprodukt an der Katabolitdegradation der FBPase beteiligt sind, gefunden. Zur Überprüfung dieses Befundes, wurden Pulse Chase-Analysen des FBPase-Abbaus in den Deletionsmutanten dieser 4 Gene durchgeführt.

Unter den 4 neuen *Gid*-Proteinen sind das deubiquitinierende Enzym Ubp14p (*Gid6p*), das von der Gruppe um H.L. Chiang als am vakuolären Abbau der FBPase gefundene Protein Vid28p (*Gid5p*) (vacuolar import and degradation) und die Genprodukte von zwei bisher noch unbekannt offenen Leserahmen (YCL039wp / *Gid7p*, YMR135cp / *Gid8p*).

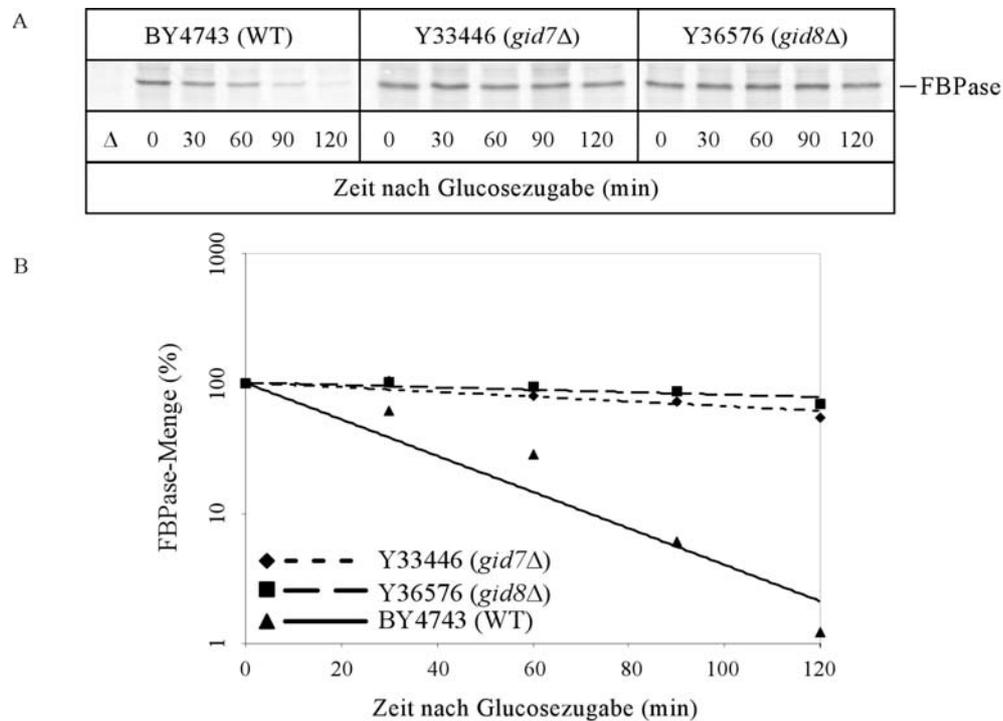
Wie in Abb. 5-27, 5-28 und 5-29 zu sehen ist, ist der FBPase-Abbau in allen untersuchten Deletionsmutantenstämmen der *GID*-Gene *GID5*, *GID6*, *GID7* und *GID8* gegenüber einem Wildtyp-Stamm (BY4743) deutlich verlangsamt. Im *ubp14*-Deletionsstamm ist die Halbwertszeit des FBPase-Abbaus ca. 2,5 Mal so groß wie im Wildtyp.



**Abb. 5-21:** Katabolitdegradation der FBPase in einer *vid28Δ*-Mutante. Dazu wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: BY4743 (Wildtyp) und Y31410 (*vid28Δ*) (A). Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase nach Glucosezugabe (B).



**Abb. 5-22:** Katabolitdegradation der FBPase in einer *ubp14Δ*-Mutante. Dazu wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: BY4743 (Wildtyp) und Y33195 (*ubp14Δ*) (A). Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase nach Glucosezugabe (B).

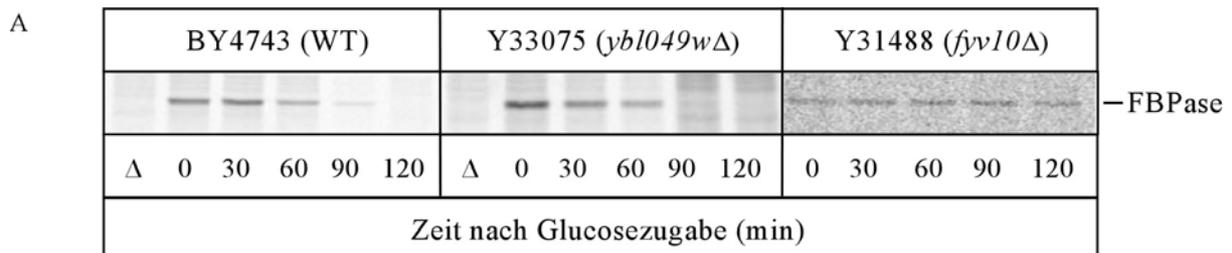


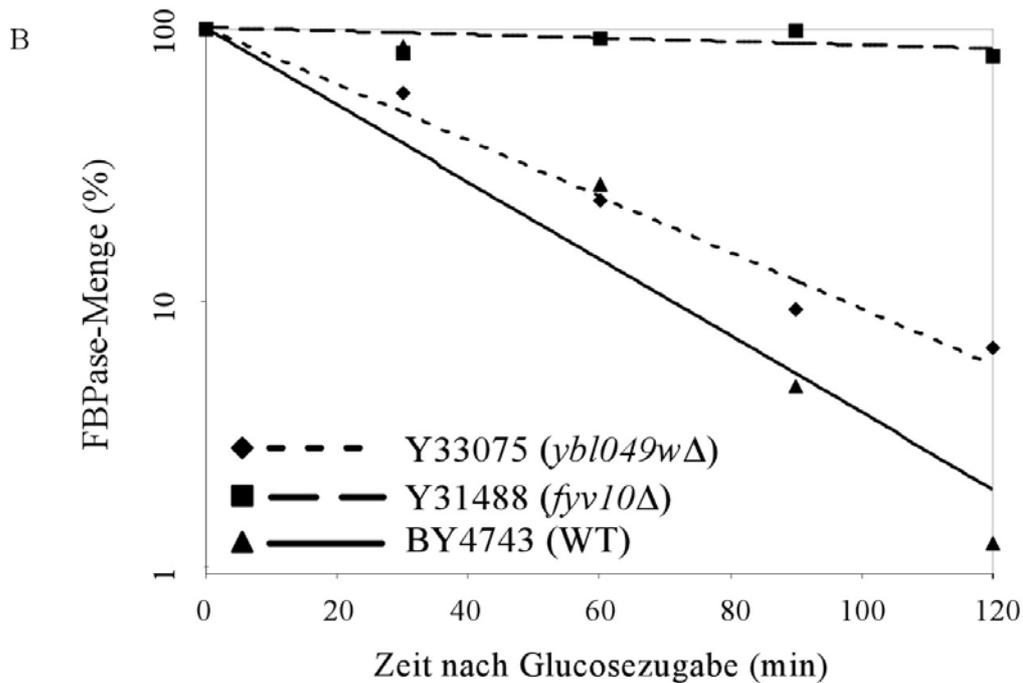
**Abb. 5-23:** Katabolitdegradation der FBPase in einer *gid7Δ*- und *gid8Δ*-Mutante. Dazu wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: BY4743 (Wildtyp), Y33446 (*gid7Δ*) und Y36576 (*gid8Δ*) (A). Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase nach Glucosezugabe (B).

Die in Abb. 5-23 dargestellten Ergebnisse sind der Mittelwert aus mehreren von mir durchgeführten Pulse Chase-Analysen und einer von Jochen Regelmann durchgeführten Pulse Chase-Analyse.

### 5.2.8 Überprüfung des Einflusses der Proteine Fyv10p und YBL049wp auf die Katabolitdegradation der FBPase

Bei einer systematischen Identifikation von Proteinkomplexen in *S. cerevisiae* durch Massenspektroskopie (Ho et al., 2002) wurde ein möglicher Komplex gefunden, in welchem sich 6 von 8 bisher gefundenen Gid-Proteine befinden könnten. Als Angeln wurde zum einen Gid7p und zum anderen YBL049w verwendet. Mit beiden Proteinen interagierten u.a. folgende Proteine: Gid1p / Vid30p / Tin1p, Gid2p, Vid28p / Gid5p, Gid7p, Gid8p, YBL049w und Fyv10p. Nur mit Gid7p interagierte Vid24p / Gid4p. Da in diesen möglichen Komplexen u.a. neben den 6 Gid-Proteine die beiden Proteine YBL049w und Fyv10p unbekannter Funktion gefunden wurden, war es interessant zu überprüfen, ob diese beiden Proteine auch Gid-Proteine sind. Deshalb wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in Deletionsmutanten der beiden Gene durchgeführt. Während in einer *ybl049w*-Deletionsmutante der Abbau der FBPase wie in Wildtypzellen verläuft, ist die FBPase im *fyv10*-Deletionsstamm unter Inaktivierungsbedingungen deutlich stabilisiert (Abb. 5-24). *FYV10* stellt also ein weiteres *GID*-Gen dar und wird *GID9* genannt.

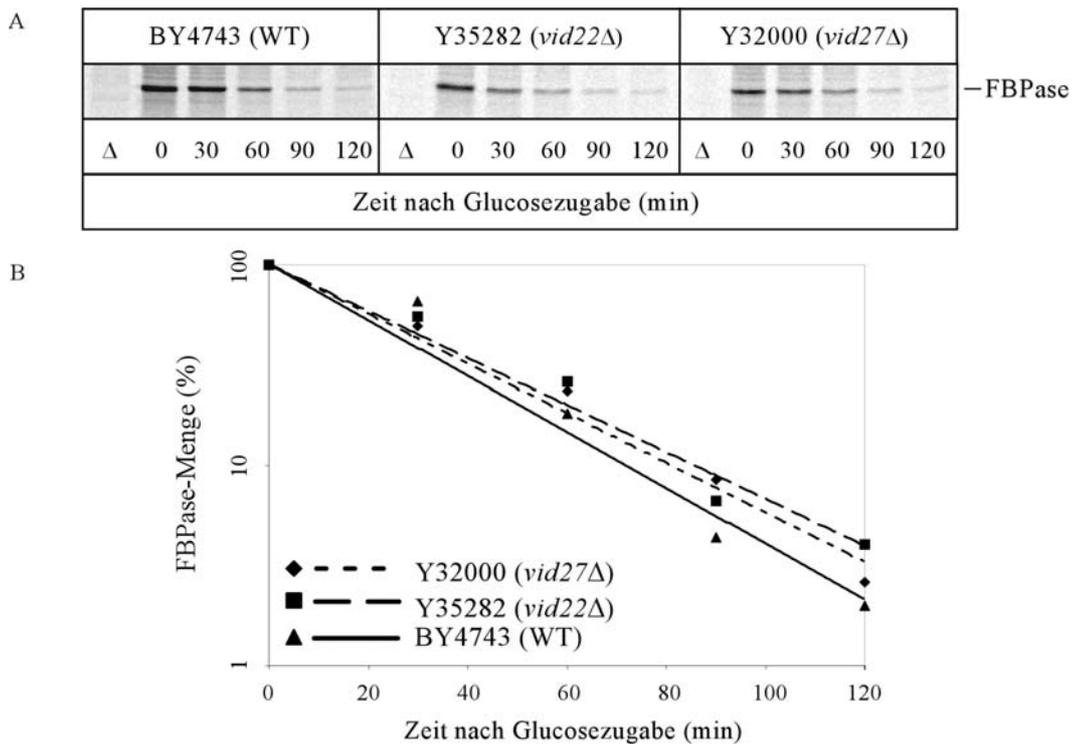




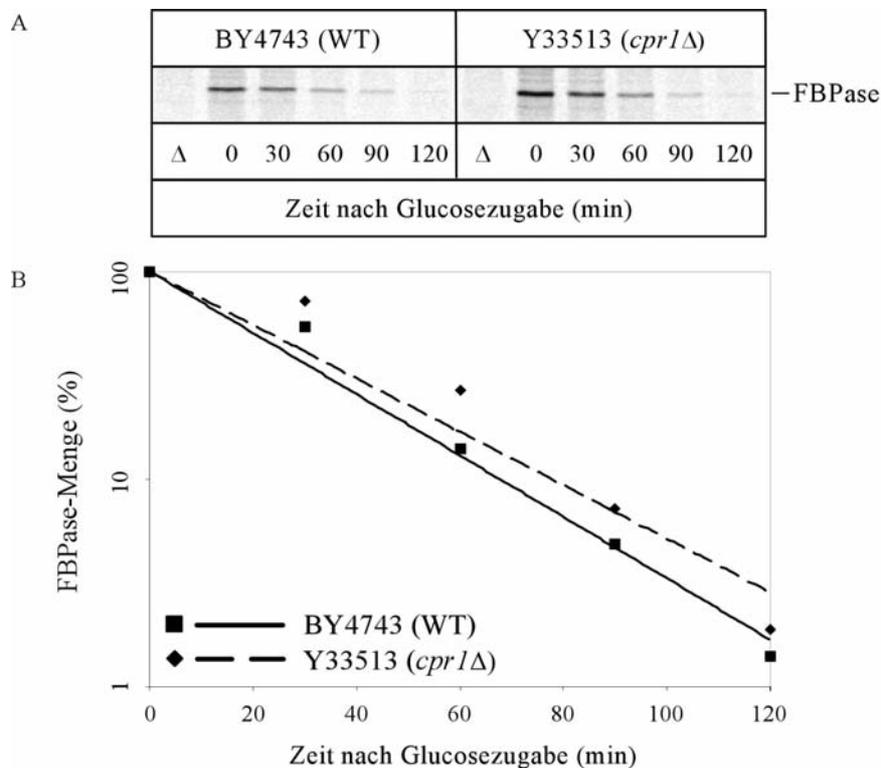
**Abb. 5-24:** Katabolitdegradation der FBPase in einer *ybl049wΔ*- und einer *fyv10Δ*-Mutante. Dazu wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: BY4743 (Wildtyp), Y33075 (*ybl049wΔ*) und Y31488 (*fyv10Δ*) (A). Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase nach Glucosezugabe (B).

### 5.2.9 Überprüfung des Einflusses der von der Gruppe um H.L. Chiang gefundenen Proteine Vid22p, Cpr1p und Vid27p auf den FBPase-Abbau

Da 3 Vid-Proteine sowohl von der Gruppe um Chiang als am vakuolären Abbau beteiligt sowie auch von unserem Labor als am proteasomalen Abbau beteiligt gefunden worden waren (Vid24p, Vid28p und Vid30p), stellte sich die Frage, ob auch andere von der Gruppe um Chiang gefundene Proteine am proteasomalen FBPase-Abbau beteiligt sind. Deshalb wurden folgende von der Gruppe um H.L. Chiang gefundene Proteine auf einen Einfluss hin untersucht: Die beiden am Import der FBPase in Vesikel beteiligten Proteine Vid22p und Cpr1p (Brown et al., 2001; Brown et al., 2002) und das bisher noch unveröffentlichte Protein Vid27p. Es wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in den entsprechenden Deletionsmutantenstämmen durchgeführt. In allen 3 Deletionsstämmen konnte ein FBPase-Abbau wie im Wildtypstamm (BY4743) festgestellt werden (Abb. 5-25 und Abb. 5-26).



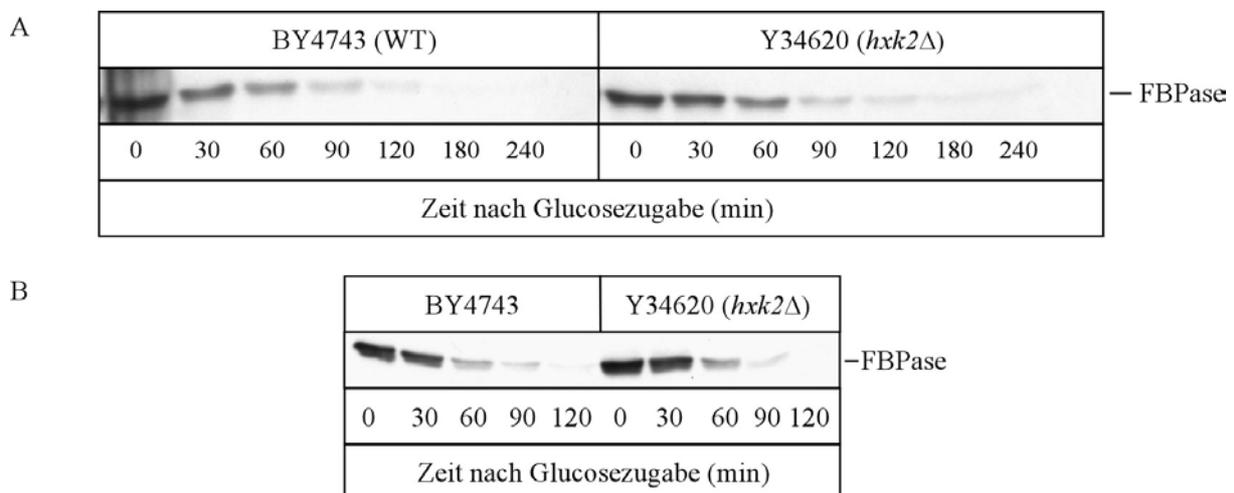
**Abb. 5-25:** Katabolitdegradation der FBPase in einer *vid27* $\Delta$ - und einer *vid22* $\Delta$ -Mutante. Dazu wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: BY4743 (Wildtyp), Y32000 (*vid27* $\Delta$ ) und Y35282 (*vid22* $\Delta$ ) (A). Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase nach Glucosezugabe (B).



**Abb. 5-26:** Katabolitdegradation der FBPase in einer *cpr1* $\Delta$ -Mutante. Dazu wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: BY4743 (Wildtyp) und Y33513 (*cpr1* $\Delta$ ) (A). Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase nach Glucosezugabe (B).

### 5.2.10 Überprüfung des Einflusses des Proteins Hxk2p

Die Hexosekinase Hxk2p wurde von Jaroslav Horak als an der Signaltransduktion der Katabolitdegradation der FBPase und Gal2p beteiligt gefunden (Horak et al., 2002). Der Einfluss dieses Proteins auf den FBPase-Abbau wurde als „Nebenprodukt“ eines anderen Experimentes zufällig von mir überprüft. In einem *hvk2*-Deletionsstamm wurde in einer Western Blot-Analyse der FBPase-Abbau untersucht. In Abb. 5-27 A kann man erkennen, dass der FBPase-Abbau hier nahezu wie im Wildtyp verläuft. Da das in Kontrast zum Befund von J. Horak stand, wurde der entsprechende Deletionsstamm bei EUROSCARF neu bestellt und der Abbau der FBPase erneut getestet. Auch in diesem Stamm verlief der Abbau nahezu wie im Wildtyp (Abb. 5-27 B).



**Abb. 5-27:** Katabolitdegradation der FBPase in einer *hvk2Δ*-Mutante. Dazu wurde eine Western Blot-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: BY4743 (Wildtyp) und Y34620 (*hvk2Δ*).

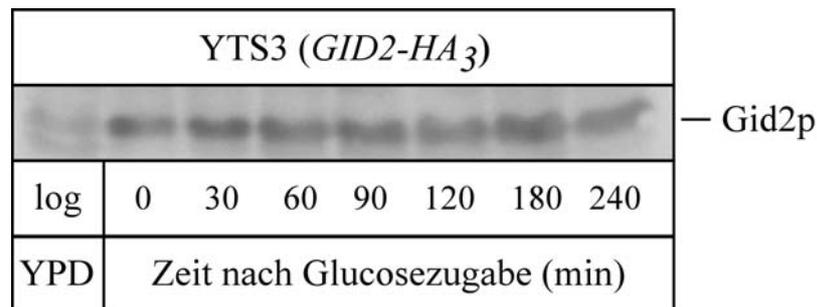
## 5.3 Das Protein Gid2p

Der ORF *YDR255c* ist identisch mit dem Gen *GID2*. Das cytosolisch lokalisierte Gid2p ist 421 Aminosäuren groß und besitzt ein Molekulargewicht von 49,2 kDa. Gid2p ist an der Katabolitdegradation der FBPase beteiligt und hat seine Funktion vor oder während der Ubiquitinierung der FBPase

### 5.3.1 Der Turnover von Gid2p

In einem Stamm mit Ha<sub>3</sub>-getagtem *GID2* (YTS3) sollte die Expression und der Turnover von Gid2p getestet werden. Die Funktionalität dieses Stammes war von Thomas Schüle durch eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in diesem Stamm nachgewiesen worden (Schüle, Dissertation 2000). Mit diesem Experiment sollte ein Ergebnis der Expressionsuntersuchung von Gid2p von Thomas Schüle bestätigt werden (Schüle, Dissertation 2000).

Die Konzentration von Gid2p ist in Zellen, die bis zur logarithmischen Phase in YPD heranwachsen, relativ niedrig. In bis zur stationären Phase in YPEtOH herangewachsenen Zellen ist Gid2p deutlich höher exprimiert. Nachdem diesen Zellen Glucose zugegeben wurde, blieb der Gid2p-Level über 4 h in etwa konstant (Abb. 5-28). Die erhaltenen Ergebnisse stimmen mit denen der Expressionsuntersuchung von Thomas Schüle überein (Schüle, Dissertation 2000).



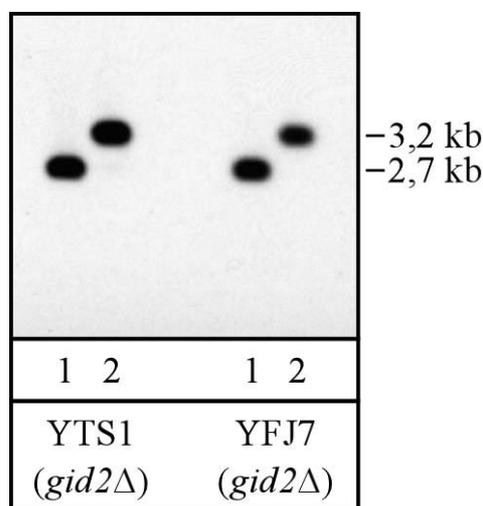
**Abb. 5-28:** Gid2p-Turnover in dereprimierten Zellen nach Glucosezugabe und die Gid2p-Konzentration in bis zur logarithmischen Phase in YPD gewachsenen Zellen des Stammes YTS3 (*GID2-HA<sub>3</sub>*).

### 5.3.2 Herstellung eines *gid2*-Deletionsstammes im WCG4a-Hintergrund

Um überprüfen zu können, ob ein *gid2*-Deletionsstamm einen Autophagozytosephänotyp aufweist, musste ein *gid2*-Deletionsstamm im Stammhintergrund WCG4a hergestellt werden. Nur in diesem Stammhintergrund liefert ein Vesikeltest (siehe 5.3.3) ein gutes und aussagekräftiges Ergebnis. Sowohl im BY4743- als auch im W303-1B-Stammhintergrund liefert ein Vesikeltest keine aussagekräftigen Ergebnisse.

Mit Hilfe der beiden Oligonukleotide Kan\_Gid2\_1 und Kan\_Gid2\_2 sowie dem Plasmid pUG6 wurde eine Deletionskassette erzeugt, mit welcher es möglich war, das komplette *GID2*-Gen zu deletieren und durch das *KAN<sup>R</sup>*-Gen zu ersetzen. Die Deletionskassette war ein

ca. 1,6 kb großes DNA-Fragment, welches neben der loxP-*KAN<sup>R</sup>*-loxP-Kassette auch flankierende Sequenzen des *GID2*-Gen enthielt. Mit der Deletionskassette wurde ein Wildtyp-Stamm (WCG4a) transformiert und auf G418 (Geneticin, diese Substanz kann mit dem vom *KAN<sup>R</sup>* erzeugten Genprodukt abgebaut werden und führt so nicht zum Zelltod) selektioniert. Die erhaltenen Transformanten wurden anschließend nochmals auf G418 selektioniert. In den nun erhaltenen Transformanten wurde die korrekte Integration des *KAN<sup>R</sup>*-Gens bzw. die Deletion des *GID2*-Gens durch eine Southern Blot-Analyse überprüft. Dazu wurde aus den Transformanten isolierte chromosomale DNA mit den Restriktionsenzymen EcoRV und BamHI oder nur mit EcoRV verdaut und einer Southern Blot-Analyse unterzogen. EcoRV schneidet ca. 1,6 kb vor dem *GID2*-Gen und am Ende des *KAN<sup>R</sup>*-Gen. Bei korrekter Integration ergibt sich ein DNA-Fragment von ca. 3,2 kb Größe, welches mittels der gegen das *KAN<sup>R</sup>*-Gen gerichteten Sonde erkannt werden kann. Verdaut man zusätzlich auch noch mit BamHI so erhält man ein nur ca. 2,7 kb großes Fragment, da BamHI 1,1 kb vor dem *GID2*-Gen schneidet. Wie man in Abb. 5-29 sehen kann, ist in dem untersuchten Stamm (YFJ7) das *GID2*-Gen korrekt deletiert worden. Es sind nur die zwei zu erwartenden Banden bei 2,7 kb (BamHI und EcoRV-Verdau, 1) und 3,2 kb (EcoRV-Verdau, 2) zu sehen. Zur Kontrolle wurde ein schon überprüfter *gid2*-Deletionsstamm (YTS1) verwendet.



**Abb. 5-29:** Southern Blot-Analyse der Stämme YTS1 (*gid2Δ*) und YFJ7 (*gid2Δ*) auf korrekte Deletion des *GID2*-Gens. Die chromosomale DNA der beiden Stämme wurde zum einen mit BamHI und EcoRV (1) und zum anderen mit EcoRV (2) verdaut.

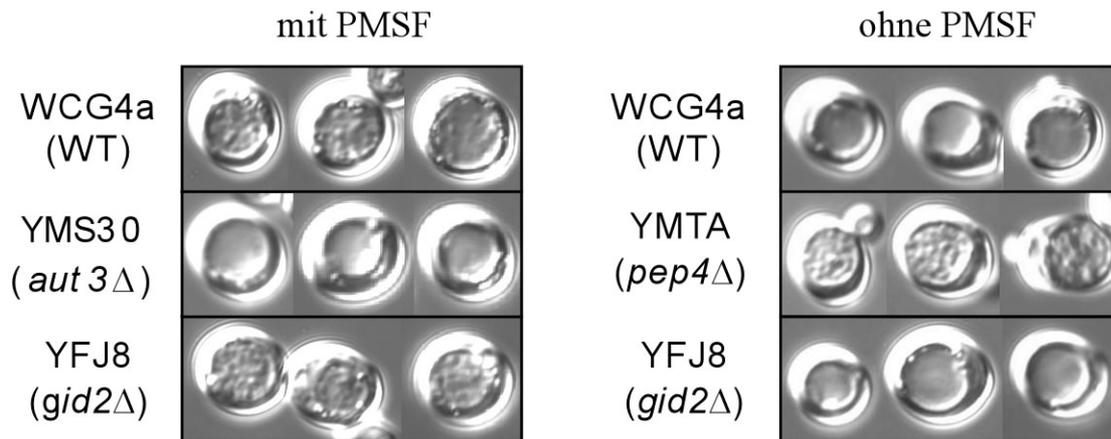
Da im Stamm YFJ7 das *GID2*-Gen zwar korrekt deletiert war, aber dieser auf Ethanolhaltigem Medium nicht mehr wachsen konnte und so wahrscheinlich eine Mutation in einem für die Mitochondrienfunktion relevanten Gen enthielt, wurde YFJ7 mit einem Wildtyp-

Stamm (WCG4a) gekreuzt, der erhaltene diploide Stamm sporuliert und einer Tetradisdissektion unterzogen. So wurde der Stamm YFJ8 erhalten, in welchem das *GID2*-Gen deletiert war und welcher normal auf Ethanol-haltigem Medium wachsen konnte.

### 5.3.3 Test der *gid2* $\Delta$ -Mutante auf den Autophagozytosephänotyp

Um zu überprüfen, ob Gid2p an der Autophagozytose beteiligt ist, wurde ein Vesikeltest mit dem *gid2*-Deletionsstamm (YFJ8) durchgeführt. Dabei wurden die Zellen einer stationären über Nacht-Kultur in YPD zur Induktion der Autophagozytose für ca. 4 h in 1 % Kaliumacetat in der Anwesenheit oder Abwesenheit von PMSF gehungert. Nach dieser Zeit wurde die Zellen unter dem Lichtmikroskop betrachtet. PMSF wirkt als Inhibitor der vakuolären Proteinase yscB. Dies führt dazu, dass bei Induktion der Autophagozytose in Anwesenheit von PMSF die in die Vakuole gelangten autophagischen Vesikel nicht mehr lysiert werden können und so unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden können. Hat der verwendete Stamm eine Mutation in der Hungerinduktion der Autophagozytose, in der Bildung / Reifung von Autophagosomen oder deren Transport zur Vakuole, so sind unter dem Mikroskop keine Vesikel erkennbar. Als Kontrollstämme wurden ein Wildtyp-Stamm (Vesikel sichtbar) und ein *aut3*-Deletionsstamm (YMS30) (keine Vesikel sichtbar) verwendet. Wird die Autophagozytose ohne PMSF induziert, so läuft die Lyse autophagischer Vesikel normal ab. In einem Wildtyp-Stamm sind also unter dem Lichtmikroskop keine Vesikel erkennbar. Sollten doch Vesikel sichtbar sein, so muß der verwendete Stamm einen Defekt in der Lyse autophagischer Vesikel haben. So können z.B. in einem Stamm mit deletierter Proteinase yscA (YMTA) keine autophagischen Vesikel lysiert werden und so kann man unter dem Lichtmikroskop Vesikel in der Vakuole erkennen.

In Abb. 5-30 sind die Ergebnisse des Vesikeltests des *gid2*-Deletionsstammes YFJ8 und der entsprechenden Kontrollstämme gezeigt. Die Deletionsmutante verhält sich bei der Induktion der Autophagozytose sowohl bei Vorhandensein als auch bei Fehlen von PMSF wie der Wildtyp.



**Abb. 5-30:** Test der *gid2*-Deletionsmutante auf einen Autophagozytosephänotyp. Dazu wurde ein Vesikeltest mit den Stämmen WCG4a (Wildtyp), YMS30 (*aut3Δ*), YFJ8 (*gid2Δ*) und YMTA (*pep4Δ*) durchgeführt. Die Stämme wurden zum einen in 1 % Kaliumacetat (alle außer YMTA) mit PMSF und zum anderen in 1 % Kaliumacetat ohne PMSF (alle außer YMS30) ca. 4 h lang inkubiert und dann die Zellen unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

### 5.3.4 Gesamtproteinturnover in einem *gid2*-Deletionsstamm

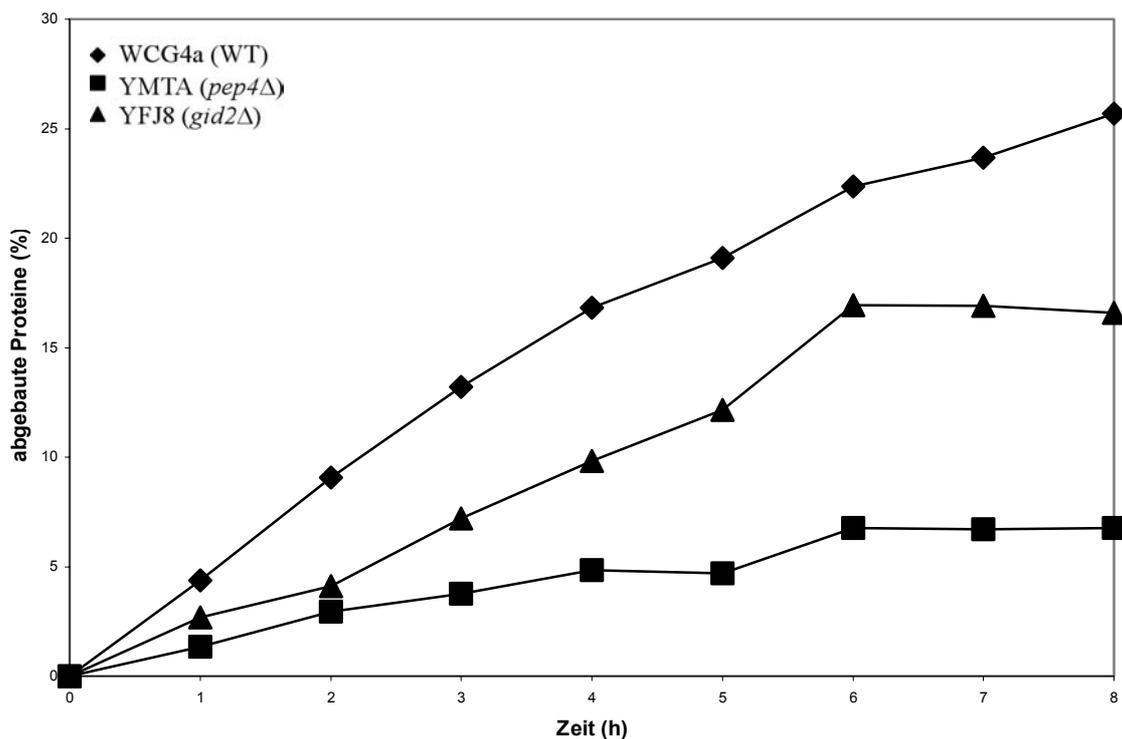
In einem Gesamtproteinturnover-Experiment kann bestimmt werden, wie groß der Gesamtproteinabbau pro h in der Zelle unter Hungerbedingungen (1 % Kaliumacetat) ist. In einem Stamm mit einem Defekt in der vakuolären Proteolyse (z.B. YMTA, in welchem die vakuoläre Proteinase *yscA* deletiert ist) kann nur die proteasomale Proteolyse ablaufen und der Stamm zeigt so einen deutlich verringerten Gesamtproteinturnover. Im Vergleich zu einem Wildtypstamm ist hier der Gesamtproteinturnover nur ca. 20 – 25 % des Wildtypwertes.

Mit diesem Experiment kann ein Autophagozytosephänotyp bestätigt werden. Autophagozytosemutanten weisen einen gegenüber dem Wildtypstamm deutlich reduzierten Proteinturnover auf. Da es möglich war, dass der *gid2*-Deletionsstamm einen Autophagozytosephänotyp zeigt, wurde dieses Experiment zur Bestätigung durchgeführt.

Die Proteine der zu untersuchenden Stämme wurden radioaktiv markiert und danach in 1 % Kaliumacetat umgesetzt. Ab diesem Zeitpunkt wurde jede Stunde eine Probe gezogen (letzte nach 8 h) und mit 10 % (w/v) Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Da mit TCA nur Proteine und keine kleinen Peptidfragmente ausgefällt werden können, können so die noch nicht hydrolysierten Proteine (nach Zentrifugation im Pellet) von den abgebauten Proteinen (nach Zentrifugation im Überstand) abgetrennt werden. So wird über die Zeit der Anstieg der Radioaktivität des Überstands und damit der Anstieg des Prozentsatzes an abgebauten

Proteine verfolgt. In der Probe nach Zugabe des Kaliumacetats (0-Probe) wurde im Pellet und Überstand die Radioaktivität zu Beginn des Experiments bestimmt. Der Prozentsatz der zum Zeitpunkt  $t$  abgebauten Proteine kann man dadurch errechnen, dass man von der Radioaktivität des Überstandes zum Zeitpunkt  $t$  die Radioaktivität des Überstandes zum Zeitpunkt 0 abzieht und das Ergebnis durch die Gesamtradioaktivität zum Zeitpunkt 0 (Summe aus Radioaktivität des Überstandes und Pellets) teilt. Die einzelnen Werte sind in Abb. 5-31 gegen die Zeit aufgetragen.

Wie man in Abb. 5-31 sehen kann, ist der Turnover im YMTA-Stamm, in welchem die vakuoläre Proteinase *yscA* deletiert ist, nur ca. 25 % des Turnovers des Wildtyp-Stammes (WCG4a). Der Turnover im *gid2*-Deletionsstamm lag in etwa zwischen dem Turnovers der beiden anderen Stämme. Der YMTA-Stamm, in welchem die vakuoläre Proteinase *yscA* deletiert ist, verhielt sich so, wie es zu erwarten war. Der *gid2*-Deletionsstamm scheint dagegen einen Defekt in der vakuolären und oder proteasomalen Proteolyse zu haben.

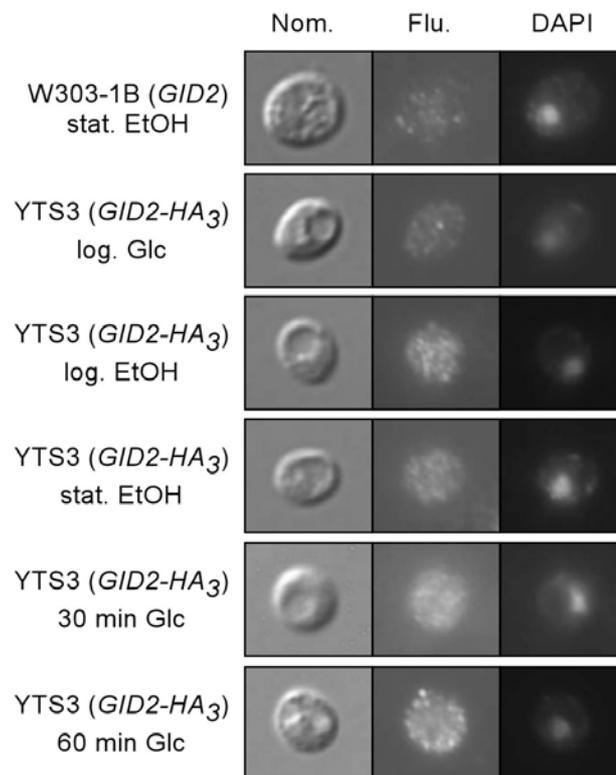


**Abb. 5-31:** Gesamtproteinturnover der Stämme WCG4a (Wildtyp), YMTA (*pep4*Δ) und YFJ8 (*gid2*Δ).

### 5.3.5 Lokalisierung von Gid2p durch indirekte Immunfluoreszenz

Gid2p wurde bisher cytosolisch lokalisiert gefunden (Schüle, Dissertation 2000). Um dies nochmals zu bestätigen, wurde Gid2p durch indirekte Immunfluoreszenz lokalisiert. Verwendet wurde dafür der Stamm YTS3, in welchem das Gid2p als dreifach Ha-getaggte Version exprimiert wird.

In Abb. 5-32 kann man erkennen, dass das im Fluoreszenz-Kanal (Flu.) erkennbare Gid2-Ha<sub>3</sub> als punktierte Strukturen überall in der Zelle zu allen untersuchten Zeiten vorliegt und nicht in signifikanter Menge im Zellkern vorliegt, welcher im DAPI-Kanal (DAPI) gezielt angefärbt wurde. In angefärbten Zellen, die in Glucose-haltigem Medium bis zur logarithmischen Phase herangezogen wurden (log. Glc), ist nur wenig Gid2-Ha<sub>3</sub> sichtbar. In den in Ethanol-haltigem Medium bis zur logarithmischen (log. EtOH) oder stationären (stat. EtOH) Wachstumsphase herangezogenen Zellen und den nach Derepression 30 (30 min Glc) oder 60 min (60 min Glc) in Glucose-haltigem Medium gewachsenen Zellen ist das Gid2-Ha<sub>3</sub> in deutlich größerer Menge vorhanden. Im Stamm W303-1B (Wildtyp) kann man das Hintergrundsignal im Fluoreszenz-Kanal ohne vorhandenes Ha-getaggtetes Protein sehen.



**Abb. 5-32:** Lokalisierung von Gid2-Ha<sub>3</sub> im Stamm YTS3 (*GID2-HA3*) und W303-1B (Wildtyp) durch Immunfluoreszenz. Gezeigt sind die Aufnahmen mit der Nomarski-Optik (Nom.), mit einem Fluoreszenz-Kanal (Flu.) und im DAPI-Kanal (DAPI).

### 5.3.6 Liegt Gid2p in einem Komplex vor?

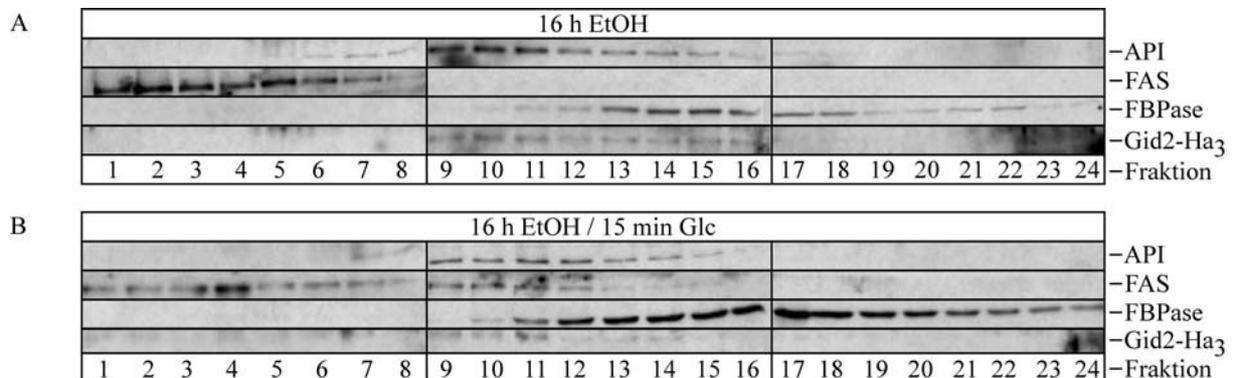
In einem Sucrose-Dichtgradientenradienten erscheinen monomere, cytosolische Proteine wie FBPase und PGK in der Regel in den ersten 5 von 14 Fraktionen. In einem von Thomas Schüle durchgeführten Sucrose-Dichtgradientenradienten erschien das cytosolische Protein Gid2p in den Fraktionen 2 – 7 (Schüle, Dissertation 2000). Da das Gid2p im Vergleich zu FBPase und PGK in etwas höheren Fraktionen auftrat und mit der cytosolischen Aminopeptidase I kolokalisierte, welche im Cytosol der Zelle als Dodecamer mit einer molekularen Masse von ca. 600 kDa vorliegt, stellt sich die Frage, ob Gid2p in einem Komplex oder als Multimer vorliegen könnte. Um diese Vermutung zu überprüfen wurde mit Hilfe einer Superose-6-Säule und eines Glycerin-Gradienten die molekulare Masse des in der Hefezelle nativ vorkommenden Gid2-Ha<sub>3</sub> bestimmt.

#### 5.3.6.1 Bestimmung der Größe von Gid2p mit Hilfe einer Superose6-Säule

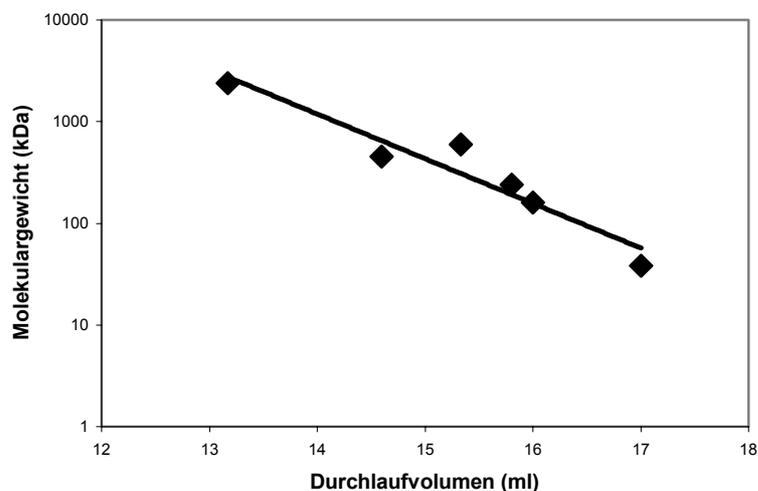
Mit Hilfe der fluid phase liquid chromatography (FPLC) an einer Superose-6-Säule kann ein Proteingemisch nach seiner Größe bzw. seiner molekularen Masse aufgetrennt werden. Das Proteingemisch wird auf die Säule aufgetragen und danach die Säule solange mit Puffer gespült (konstante Flussrate von 0,5 ml / min), bis die Proteine die Säule wieder verlassen. Der die Säule verlassende Puffer mit den enthaltenen Proteinen wird in kleinen Fraktionen (333 oder 666 µl) gesammelt. Durch eine nachfolgende Western Blot-Analyse der Fraktionen wird bestimmt, in welchen Fraktionen (also nach welchem Durchlaufvolumen) die interessierenden Proteine auftauchen. Die Säule kann vor dem eigentlichen Experiment dadurch geeicht werden, dass das Durchlaufvolumen von Proteinen bekannten Gewichts bestimmt und mit den erhaltenen Werten eine Eichgerade erstellt wird.

Als Eichproteine wurden Aldolase, Catalase und Ferritin verwendet. Die Aldolase (160 kDa) verließ nach 16 ml, die Katalase (240 kDa) nach 15,8 ml und das Ferritin (450 kDa) nach 14,6 ml die Säule. Als weitere Eichproteine wurden Proteine verwendet, welche in größeren, löslichen Komplexen vorliegen. Dies war zum einen die Fettsäuresynthase (FAS, ca. 2,4 Mda (Egner et al., 1993)) und zum anderen die Aminopeptidase I (API, ca. 600 kDa (Kim et al., 1997)). Als kleines, monomeres Eichprotein wurde die FBPase (38 kDa) verwendet. Die letzteren 3 Eichproteine wurden im eigentlichen Experiment mit einem nativen Heferohextrakt angefärbt.

Wie in Abb. 5-33 zu sehen ist, sind die Verteilungen der Proteine API, FAS, FBPase und Gid2-Ha<sub>3</sub> zu beiden untersuchten Zeitpunkten ähnlich. Die FAS hat ihr Maximum in Fraktion 4 (13 – 13,33 ml), API und Gid2-Ha<sub>3</sub> in Fraktion 10 und 11 (15 – 15,67 ml) und die FBPase in Fraktion 15 – 17 (16,67 – 17,33 ml). Trägt man die ermittelten Durchlaufvolumina der einzelnen Eichproteine gegen ihr Molekulargewicht auf, so erhält man die in Abb. 5-34 dargestellte Eichgerade. Aus dieser kann man für die molekulare Masse des Gid2-Ha<sub>3</sub> etwa 300 kDa ermitteln. Da Gid2-Ha<sub>3</sub> mit API (ca. 600 kDa) kolokalisiert, sollten beide Proteine ein ähnliche molekulare Masse aufweisen. Problematisch bei diesem Experiment war das schwache Gid2-Ha<sub>3</sub>-Signal. Aus diesem Grunde wurde mit dem Glycerin-Gradienten ein weiteres Experiment zur Bestimmung der molekularen Masse durchgeführt.



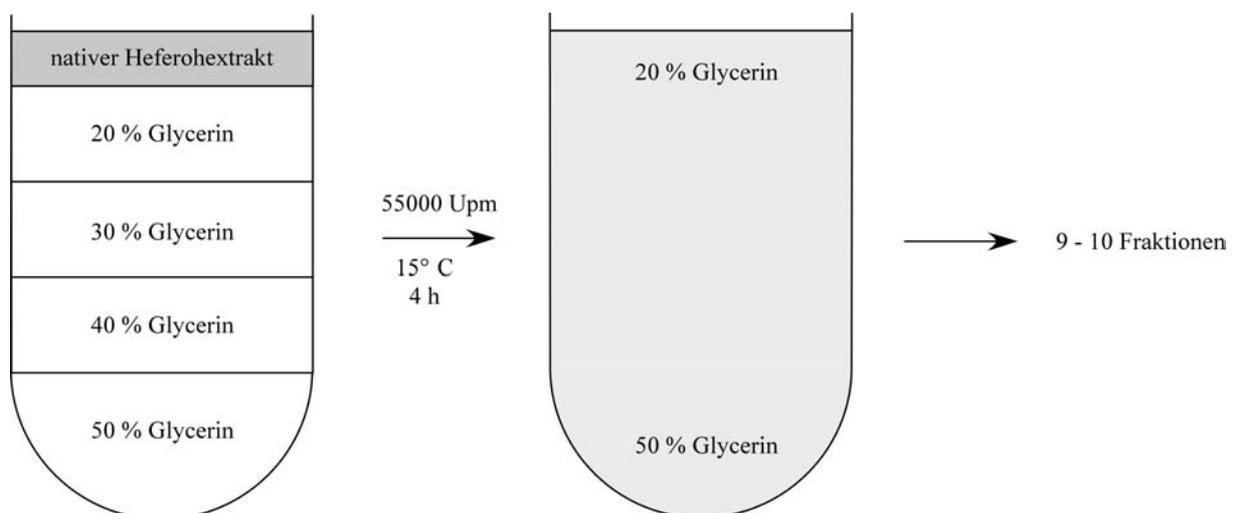
**Abb. 5-33:** Auftrennung von Proteinen eines nativen Heferohextraktes nach dem Molekulargewicht mittels einer Superose-6-Säule. Die Hefezellen wurden nach 16 h Derepression (A) oder nach anschließender 15 minütiger Inkubation mit Glucose (B) aufgeschlossen und die nativen Rohextrakte auf die Säule aufgetragen. Jede Fraktion entspricht 333  $\mu$ l und Fraktion 1 wurde genommen, nachdem 12 ml Puffer aus der Säule gelaufen waren.



**Abb. 5-34:** Eichgerade der Molekulargewichtsbestimmung durch eine Superose-6-Säule.

### 5.3.6.2 Bestimmung der molekularen Masse von $Gid2-Ha_3$ mit Hilfe eines Glycerin-Gradienten

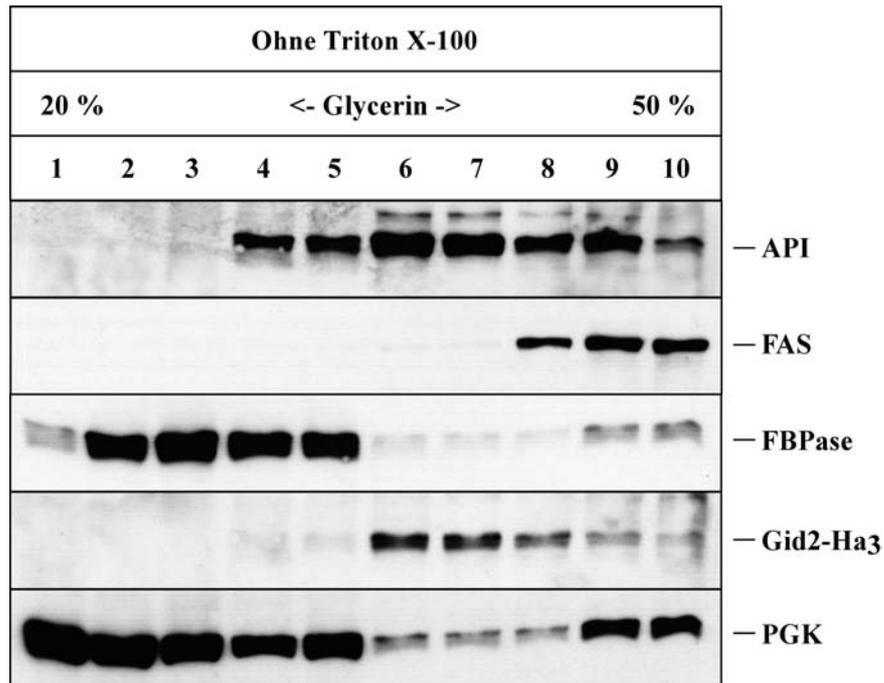
Bei der Bestimmung der Masse durch den Glycerin-Gradienten wird ein nativer Heferohextrakt oben auf einen Stufengradienten mit gleichen Mengen von 50, 40, 30 und 20 % Glycerin gegeben. Während einer nachfolgenden Zentrifugation bei 55000 Upm sedimentieren die Proteine nach ihrer Größe / Masse im Gradienten. Große Proteine wandern zum Boden des Gradienten, leichte Proteine bleiben im oberen Teil des Gradienten zurück. Nach der Zentrifugation werden Fraktionen von oben genommen und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Eine schematische Darstellung der Vorgehensweise beim Glycerin-Gradienten ist in Abb. 5-35 dargestellt.



**Abb. 5-35:** Schematische Darstellung der Vorgehensweise beim Glycerin-Gradienten

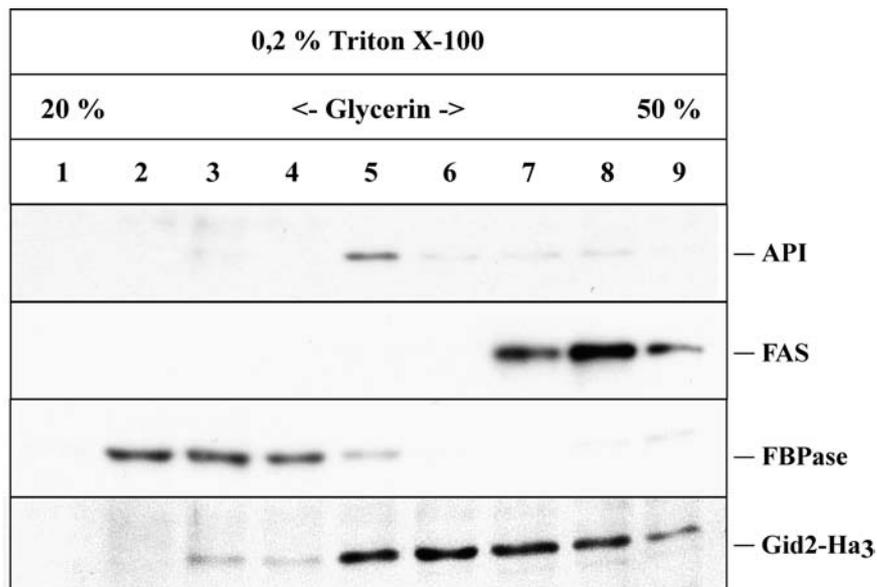
In Abb. 5-36 ist das Ergebnis eines Glycerin-Gradienten dargestellt, bei welchem der Rohextrakt kein Triton X-100 enthielt. Die 3-Phosphoglyceratkinase (PGK, 44,7 kDa) und die FBPase (38,1 kDa) waren hauptsächlich in Fraktion 1 – 5 enthalten. Die Aminopeptidase I (API, ca. 600 kDa) und das  $Gid2-Ha_3$  haben ihr Maximum in Fraktion 6 und 7 und die Fettsäuresynthase (FAS, ca. 2,4 MDa) in Fraktion 9 und 10. Erneut kann man eine Kolo-kalisierung von  $Gid2-Ha_3$  und API feststellen. Dies spricht erneut für eine ähnliche molekulare Masse der beiden Proteine.

Um zu überprüfen, ob das gegenüber einem monomeren  $Gid2-Ha_3$  (ca. 51 kDa) erhöhte Molekulargewicht des  $Gid2-Ha_3$  im Glycerin-Gradienten darauf zurückzuführen ist, dass das Protein membrangeschützt vorliegt (z.B. in einem Vesikel), wurde Triton X-100 zum Rohextrakt zugegeben und das Experiment erneut durchgeführt.

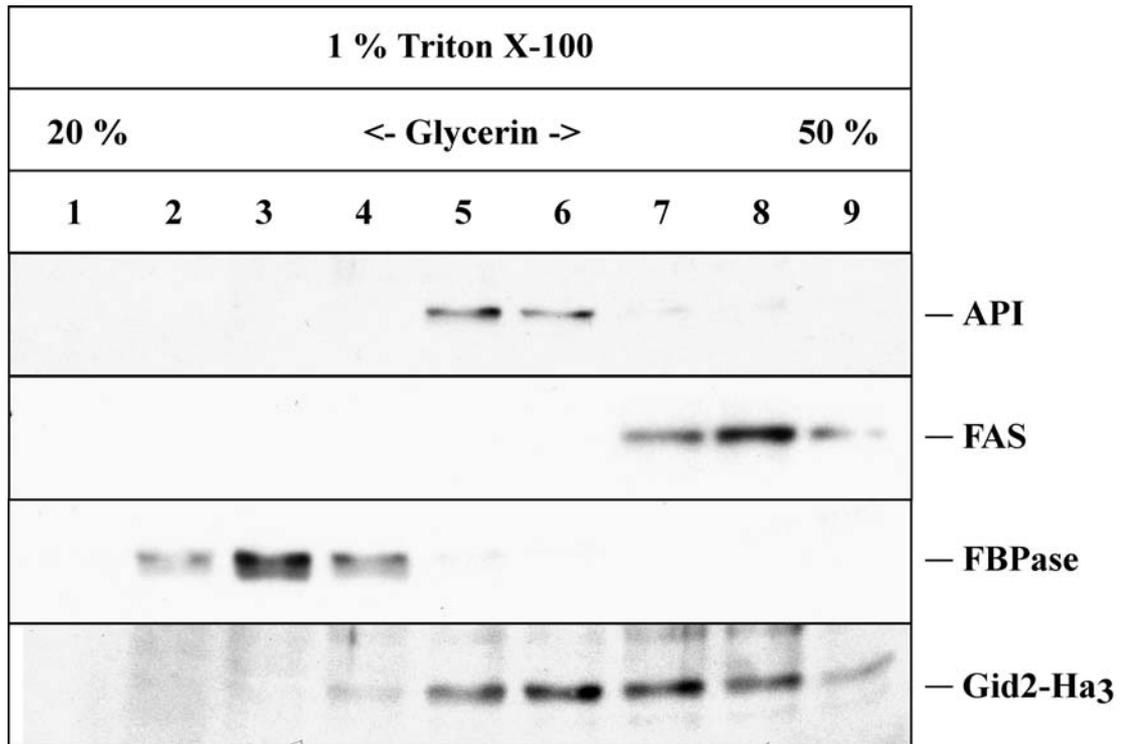


**Abb. 5-36:** Bestimmung der molekularen Masse von Gid2-Ha<sub>3</sub> mit Hilfe eines Glyceringradienten. Auf den Gradienten wurde ein Rohextrakt des Stammes YTS3 (*GID2-HA<sub>3</sub>*), welcher kein Triton X-100 enthielt, aufgetragen.

In den Abb. 5-37 und 5-38 kann man erkennen, dass auch wenn der Rohextrakt 0,2 oder 1 % Triton X-100 enthält API und Gid2-Ha<sub>3</sub> kolokalisieren. Das Maximum des Gid2-Ha<sub>3</sub> liegt etwa in Fraktion 6, das von API in Fraktion 5. Gid2-Ha<sub>3</sub> scheint in diesen Experimenten eine noch etwas höhere molekulare Masse als API zu haben.



**Abb. 5-37:** Bestimmung der molekularen Masse von Gid2-Ha<sub>3</sub> mit Hilfe eines Glyceringradienten. Auf den Gradienten wurde ein Rohextrakt des Stammes YTS3 (*GID2-HA<sub>3</sub>*), welcher 0,2 % Triton X-100 enthielt, aufgetragen.



**Abb. 5-38:** Bestimmung der molekularen Masse von Gid2-Ha<sub>3</sub> mit Hilfe eines Glyceringradienten. Auf den Gradienten wurde ein Rohextrakt des Stammes YTS3 (*GID2-HA<sub>3</sub>*), welcher 1 % Triton X-100 enthielt, aufgetragen.

## 5.4 Das Protein Vid24p

Das 621 Aminosäuren große Protein, das eine molekulare Masse von 42 kDa aufweist, ist am vakuolären Abbau der FBPase beteiligt und vermittelt hierbei als peripheres Membranprotein der FBPase-enthaltenden Vid-Vesikel (*vacuolar import and degradation*) den Transport dieser zur Vakuole (Chiang and Chiang, 1998). In meiner Diplomarbeit habe ich den Einfluß dieses Proteins auf den proteasomalen Abbau überprüft. Western-Blot-Analysen eines *vid24*-Deletionstamms zeigten eine deutliche Stabilisierung der FBPase. Vid24p hat also eine wichtige Aufgabe im proteasomalen FBPase-Abbau und zählt somit auch zu den Gid-Proteinen. Das Synonym für Vid24p ist Gid4p.

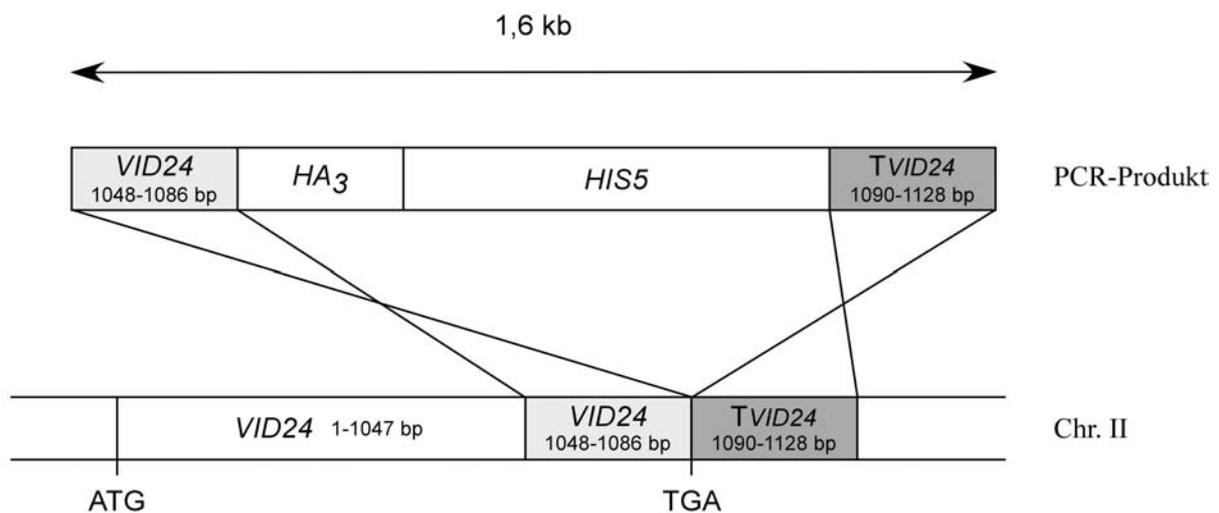
## 5.4.1 Herstellung chromosomal getaggtter Versionen von Vid24p

Um mehr über die Funktion des Vid24p herauszufinden, wurden zur Detektion des Proteins chromosomal getaggte Versionen angefertigt.

### 5.4.1.1 Einführung eines C-terminalen Ha-Tags

#### 5.4.1.1.1 Herstellung eines C-terminalen Ha-Tags

In den Wildtyp-Stämmen W303-1B und WCG4a wurde das Stop-Codon des *VID24*-Gen durch ein HA-Tridem und das *HIS5*-Gen aus *S. pombe* über homologe Rekombination ersetzt. Um dies zu erhalten, wurde zuerst mit den Oligonukleotiden HA-VID-1 und HA-VID-2 (siehe 4.1.3) sowie dem Plasmid p3XHA-*HIS5* (siehe 4.1.2) über PCR ein Tag-Konstrukt (*HA<sub>3</sub>-HIS5*-Kassette) hergestellt, welches 39 Basen vor dem Stopcodon des *VID24*, ein *HA<sub>3</sub>*, das *HIS5* aus *S. pombe* und 39 Basen der Terminatorregion im Anschluss an das Stopcodon des *VID24* enthält (siehe auch Abb. 5-39). Mit diesem Konstrukt wurden die Wildtyp-Stämme W303-1B und WCG4a transformiert und auf Platten ohne Histidin selektioniert. Die erhaltenen Transformanten wurden danach in einer Southern Blot-Analyse auf die richtige Integration des Konstruktes hin untersucht.



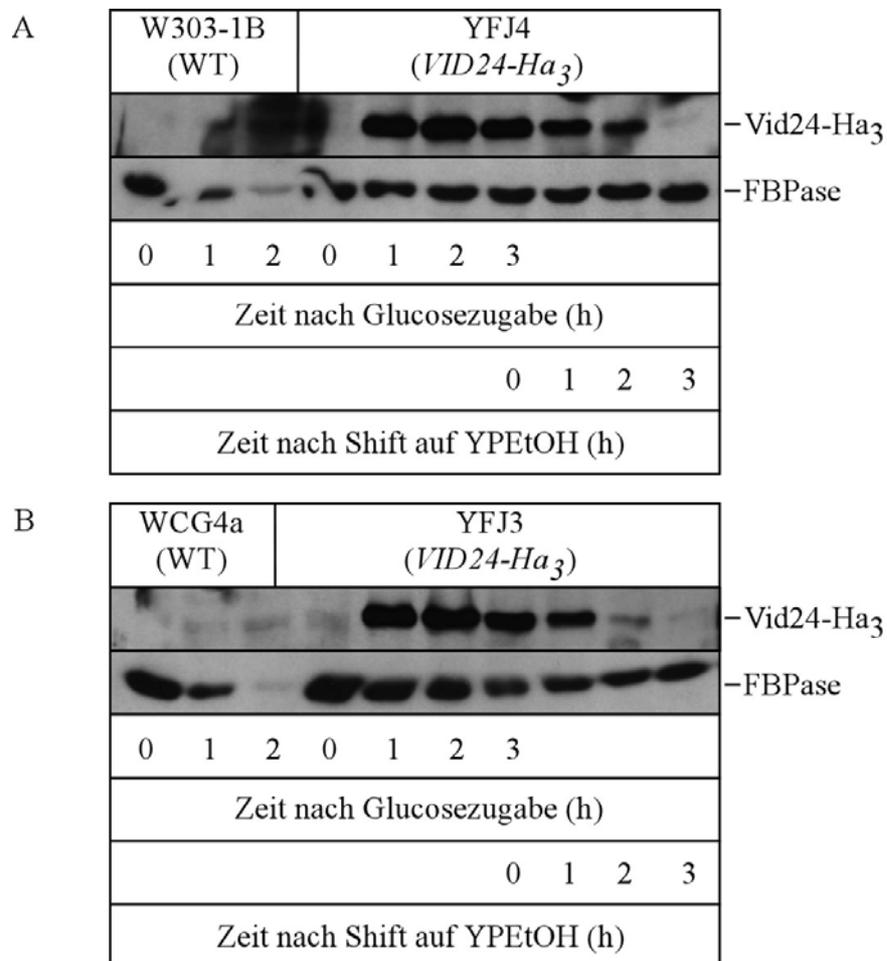
**Abb. 5-39:** Konstruktion des dreifach Ha-getaggtten Vid24p. Die Integration des PCR-Produktes in das Wildtypgen erfolgt durch zwei homologe Rekombinationsprozesse. Hierbei wird das Stopcodon (TGA) durch die *HA<sub>3</sub>-HIS5*-Kassette ersetzt und dadurch ein *HIS5*-Markergen eingeführt.



### 5.4.1.1.3 Funktionalitäts- und Expressionsprüfung von Vid24-Ha<sub>3</sub>

Als nächstes wurde getestet, ob die hergestellten Stämme YFJ3 und YFJ4 das Vid24-Ha<sub>3</sub> exprimieren und ob der Tag die Funktion des Vid24p in der Katabolitdegradation der FB Pase stört.

In Abb 5-41 kann man erkennen, dass Vid24-Ha<sub>3</sub> in den Stämmen YFJ3 und YFJ4 nach Glucosezugabe zu dereprimierten Zellen exprimiert wird und nach erneutem Umsetzung in YPEtOH wieder abgebaut wird. Allerdings zeigen beide Stämme einen deutlichen Defekt im FB Pase-Abbau. Im Gegensatz zu den ebenfalls verwendeten Wildtyp-Stämmen W303-1B und WCG4a wird die FB Pase nicht mehr abgebaut (Abb. 5-41). Dies deutet darauf hin, dass das C-terminal getaggte Vid24-Ha<sub>3</sub> nicht funktionell ist.



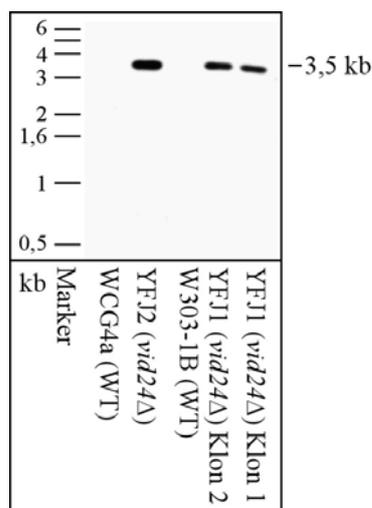
**Abb. 5-41:** Expression von Vid24-Ha<sub>3</sub> und FB Pase-Abbau in den Stämmen YFJ4 (*VID24-HA<sub>3</sub>*) (A) und YFJ3 (*VID24-HA<sub>3</sub>*) (B).

#### 5.4.1.2 Konstruktion eines N-terminalen HA-Tags an Vid24p

Da der C-terminale Tag nicht funktionell war, wurde versucht das Vid24p N-terminal 2 Mal Ha zu taggen. Dazu wurde auf einem integrativen Plasmid ein Konstrukt erzeugt, das die Promotorregion des *VID24*-Gens und ein *HA*<sub>2</sub>-getaggttes *VID24*-Gen enthielt (pRS306\_Vid24). Zum einen wurde mit Hilfe der Oligonukleotide NotI-Promotor und BamHI-HA-Promotor (siehe 4.1.3) und chromosomaler DNA des Stammes W303-1B (Wildtyp) durch PCR ein DNA-Fragment erhalten, welches 589 Basen vor dem Startcodon des *VID24* und einen *HA*-Tag enthielt. Zusätzlich besaß das Fragment am 5'-Ende eine NotI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine BamHI-Schnittstelle. Zum anderen wurde mit Hilfe der Oligonukleotide BamHI-HA-Vid24 und ClaI-Vid24 (siehe 4.1.3) sowie chromosomaler DNA des Stammes W303-1B (Wildtyp) durch PCR ein DNA-Fragment gewonnen, welches einen *HA*-Tag und das *VID24*-Gen enthielt. Zusätzlich besaß das Fragment am 5'-Ende eine BamHI-Schnittstelle und am 3'-Ende eine ClaI-Schnittstelle. Die beiden Fragmente wurden mit NotI und BamHI bzw. BamHI und ClaI geschnitten und in einen mit NotI und ClaI aufgeschnittenen pRS306-Plasmid (siehe 4.1.2) ligiert. Das erhaltene Plasmid pRS306\_Vid24, welches einen *URA3*-Marker enthielt, wurde im Promotorbereich des *VID24* aufgeschnitten, der Wildtyp-Stamm W303-1B mit dem linearisierten Plasmid transformiert und auf Platten ohne Uracil selektioniert. Die erhaltenen Transformanten enthielten einmal das Wildtyp-Gen (*VID24*) und einmal das 2 Mal Ha-getaggte *VID24*-Gen sowie das Backbone des Plasmiden inklusive *URA3*-Marker. Um eine Kopie des *VID24*-Gens (entweder das getaggte oder ungetaggte, Verteilung ca. 50 : 50) inklusive des Backbones wieder Isozuwerden, wurden die Transformanten über Nacht in YPD kultiviert und danach auf 5-FOA-Platten selektioniert. Die in den Platten enthaltene 5-Fluoro-orotsäure kann vom Genprodukt des *URA3* zu einem für die Hefezelle toxischen Produkt umgesetzt werden. Deshalb können auf den 5-FOA-Platten nur solche Zellen wachsen, die das *URA3*-Gen und damit das Backbone und eine Kopie des *VID24*-Gens verloren haben. Die erhaltenen Transformanten wurden auf eine Expression des Ha<sub>2</sub>-Vid24 überprüft. Leider konnte in mehreren Experimenten keine Transformanten gefunden werden, die Ha<sub>2</sub>-Vid24 exprimierten.

### 5.4.2 Herstellung einer *vid24*-Deletionsmutante

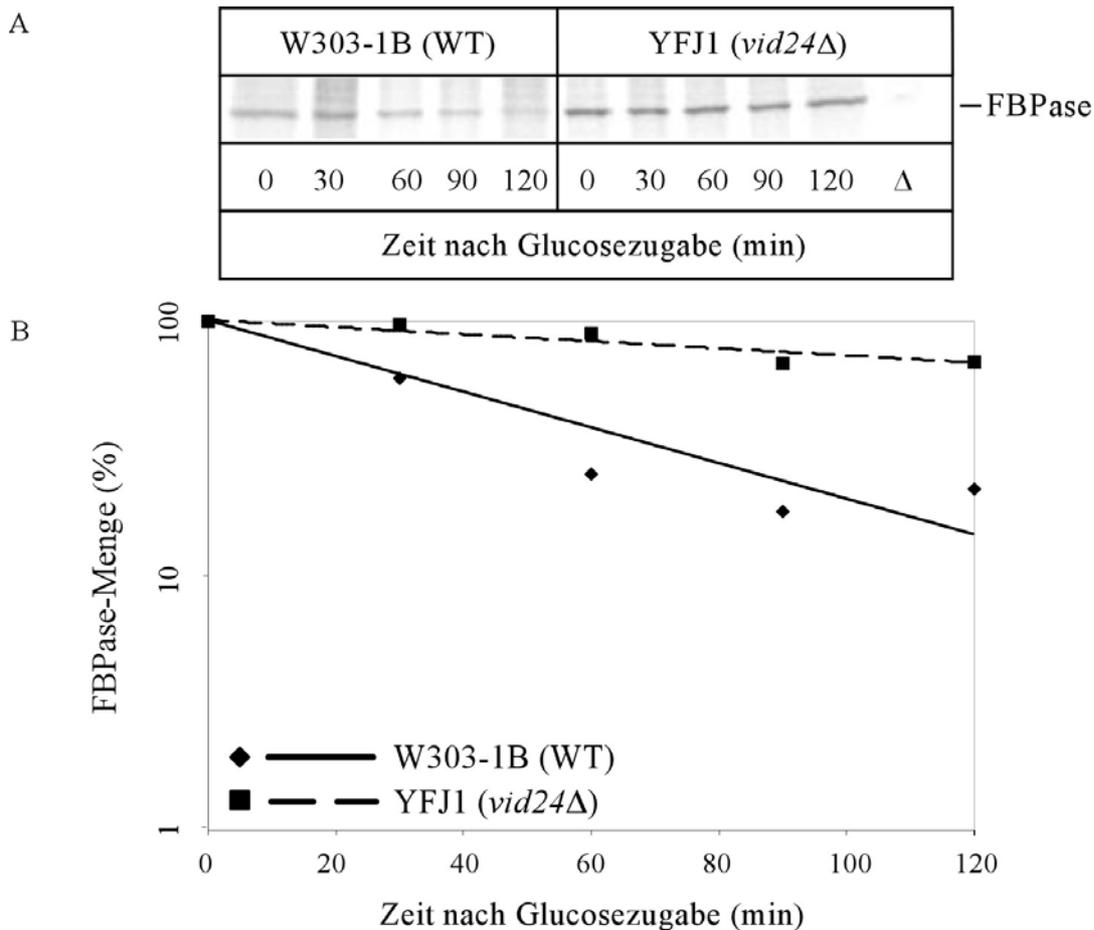
Mit Hilfe der beiden Oligonukleotide Del1 und Del2 (siehe 4.1.3) sowie dem Plasmid pUG6 (siehe 4.1.2) wurde eine Deletionskassette erzeugt, mit welcher es möglich war, das komplette *VID24*-Gen zu deletieren und durch das *KAN<sup>R</sup>*-Gen zu ersetzen. Die Deletionskassette war ein ca. 1,6 kb großes DNA-Fragment, welches neben der *loxP-KAN<sup>R</sup>-loxP*-Kassette auch flankierende Sequenzen des *VID24*-Gens enthielt. Mit der Deletionskassette wurde ein Wildtyp-Stamm (W303-1B) transformiert und auf G418 (diese Substanz kann mit dem vom *KAN<sup>R</sup>* erzeugten Genprodukt abgebaut werden und führt so nicht zum Zelltod) selektioniert. Die erhaltenen Transformanten wurden anschließend nochmals auf G418 selektioniert. In den nun erhaltenen Transformanten wurde die korrekte Integration des *KAN<sup>R</sup>*-Gens bzw. die Deletion des *VID24*-Gens über eine Southern Blot-Analyse überprüft. Dazu wurde aus den Transformanten isolierte chromosomale DNA mit dem Restriktionsenzym *EagI* verdaut und einer Southern Blot-Analyse unterzogen. *EagI* schneidet ca. 0,5 kb vor und ca. 1,4 kb nach dem *VID24*-ORF. Bei korrekter Integration ergibt sich ein DNA-Fragment von ca. 3,5 kb Größe, welches Mittels der gegen *KAN<sup>R</sup>* gerichteten Sonde erkannt werden kann. Wie man in Abb. 5-42 sehen kann, wurde in dem untersuchten Stamm (YFJ1) das *VID24*-Gen korrekt deletiert. Es ist nur die zu erwartende Bande bei 3,5 kb zu sehen. Zur Kontrolle wurde ein schon überprüfter *vid24*-Deletionsstamm (YFJ2) und 2 Wildtypstämme (WCG4a und W303-1B), in welchen keine Bande erwartet wurde, verwendet.



**Abb. 5-42:** Southern Blot-Analyse der Stämme YFJ1 (*vid24Δ*) und YFJ2 (*vid24Δ*) auf korrekte Deletion des *VID24*-Gens. Die chromosomale DNA der beiden Stämme sowie der Wildtypstämme W303-1B und WCG4a wurde mit *EagI* verdaut.

### 5.4.3 Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus im *vid24*-Deletionsstamm

Um die Beteiligung des Vid24p an der Katabolitdegradation der FBPase nochmals zu bestätigen, wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus im *vid24*-Deletionsstamm YFJ1 durchgeführt. Wie in Abb. 5-43 zu sehen ist, ist die FBPase im Deletionsstamm im Vergleich zum Wildtyp-Stamm (W303-1B) deutlich stabilisiert.



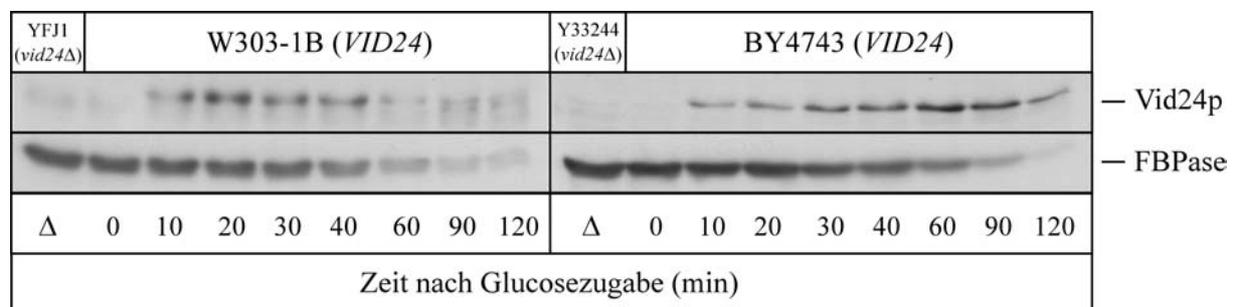
**Abb. 5-43:** Katabolitdegradation der FBPase in einer *vid24*Δ-Mutante. Dazu wurde eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus in folgenden Stämmen durchgeführt: W303-1B (Wildtyp) und YFJ1 (*vid24*Δ) (A). Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase nach Glucosezugabe (B).

### 5.4.4 Vid24p-Turnover

Der in Kapitel 4.2.3.24.1 hergestellte Antikörper gegen Vid24p wurde dazu verwendet, den Turnover von Vid24p in Wildtyp-Stämmen und verschiedenen Mutantenstämmen zu untersuchen.

#### 5.4.4.1 Turnover-Messung in Wildtyp-Stämmen

In den Wildtypstämmen BY4743 und W303-1B wurde die Expression von Vid24p in Hefezellen, denen nach 16 h Derepression Glucose zugegeben worden war, untersucht. In Abb. 5-49 kann man erkennen, dass das Vid24p 10 min nach Glucosezugabe das erste Mal detektierbar ist, nach 20 (W303-1B) bzw. 60 min (BY4743) seine maximale Menge erreicht hat und danach wieder abgebaut wird. Die genaue Kinetik verläuft je nach Wildtypstamm (W303-1B oder BY4743) unterschiedlich. Wie in Abb. 5-44 auch zu erkennen ist, läuft der Vid24p-Abbau mit einer ähnlichen Kinetik ab wie der FBPase-Abbau. Dies ist insbesondere im W303-1B-Wildtypstamm der Fall.



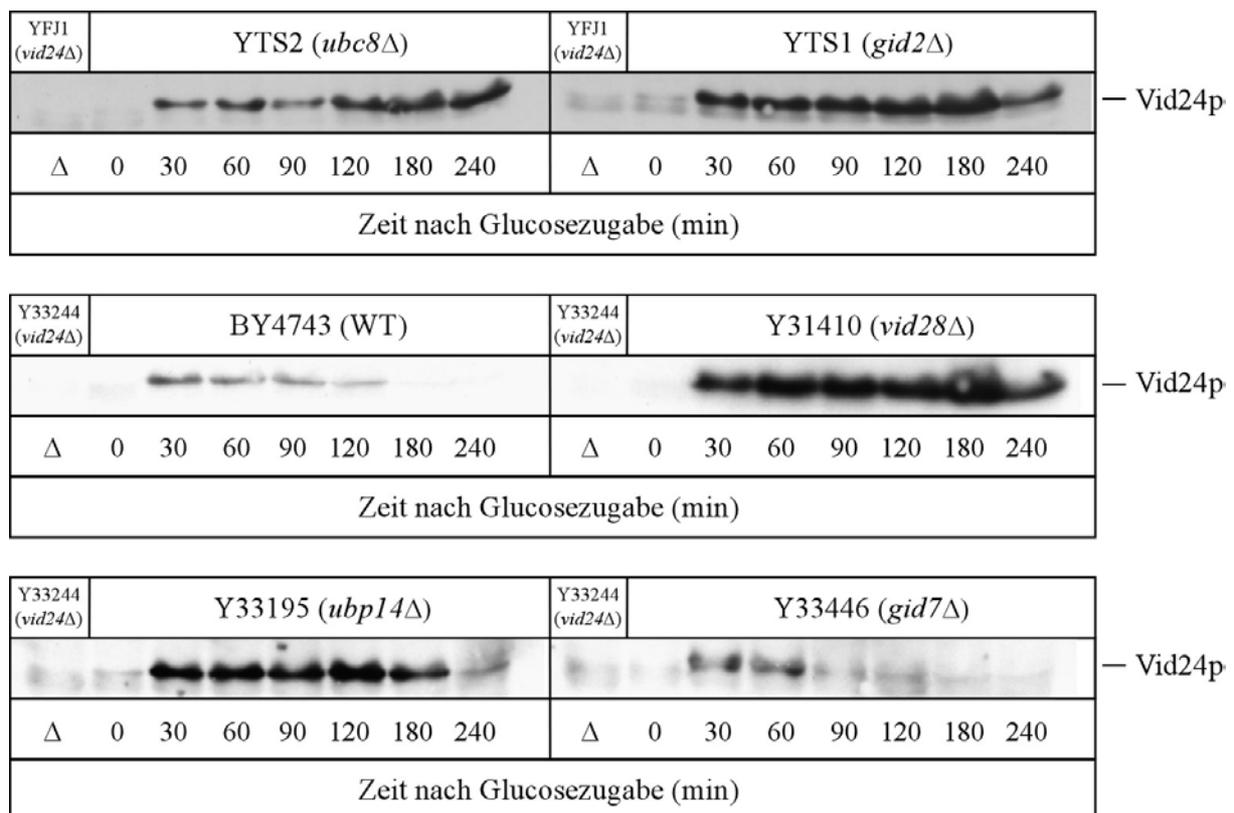
**Abb. 5-44:** Western Blot-Analyse des FBPase-Abbaus und des Vid24p-Abbaus in den Wildtypstämmen W303-1B und BY4743.

#### 5.4.4.2 Abbau von Vid24p in Mutantenstämmen

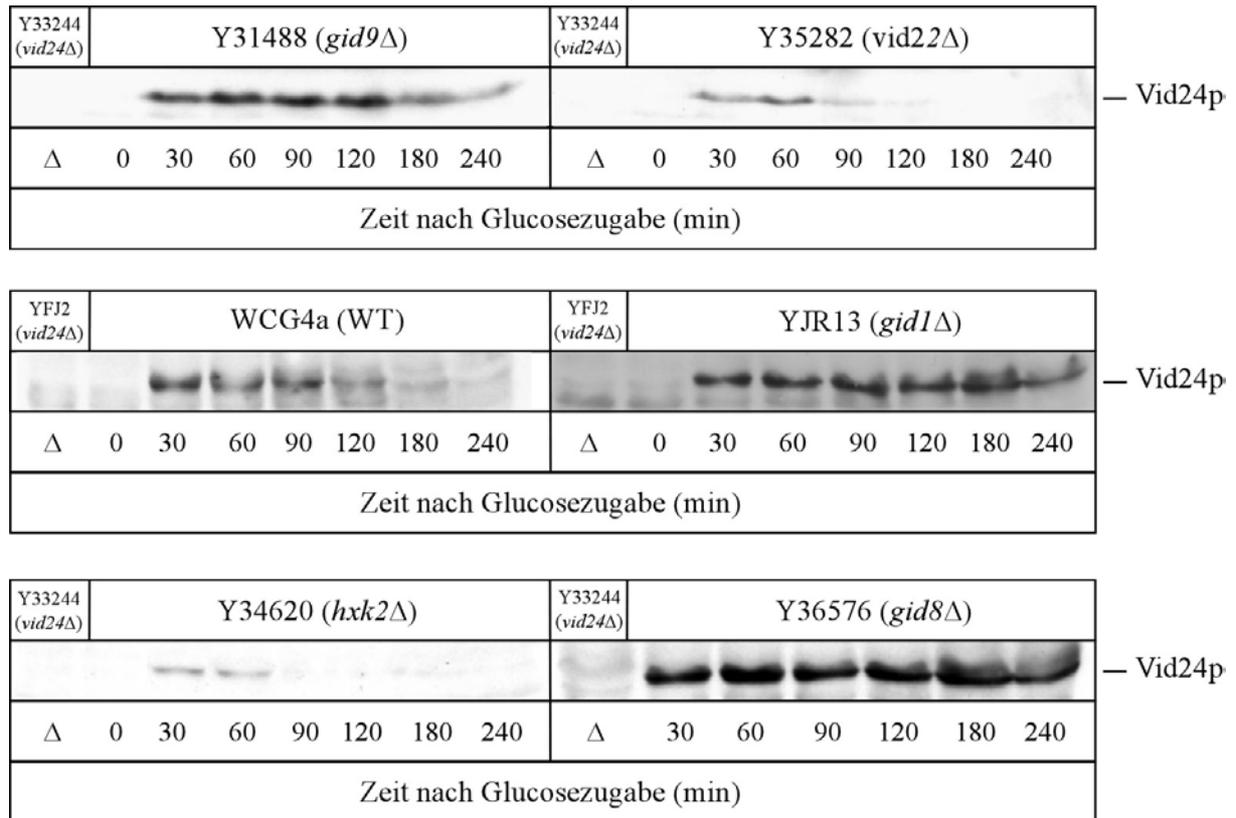
Als nächstes wurde untersucht, ob die 8 anderen bisher gefundenen Gid-Proteine einen Einfluss auf den Vid24p-Abbau haben. In Abb. 5-45 und 5-46 sind Western Blot-Analysen des Vid24p-Abbaus in Deletionsmutanten dieser *GID*-Gene gezeigt. In sieben dieser Deletionsmutanten ist zum einen der Spiegel an Vid24p gegenüber einem Wildtyp-Stamm erhöht als auch der Abbau blockiert (*vid30/gid1/tin1*, *gid2*-, *ubc8/gid3*-, *vid28/gid5*- und *gid8*-Deletionsstamm) oder zumindest deutlich verlangsamt (*ubp14/gid6*- und *gid9/fyv10*-Deletionsstamm). Die Ausnahme stellt der *gid7*-Deletionsstamm dar. Hier läuft der Vid24p-Turnover wie im Wildtypstamm ab. Ebenfalls wie im Wildtypstamm verläuft der Vid24p-Abbau in den *vid22*- und *hvk2*-Deletionsstämmen.

Da Vid24p nach Synthese schnell wieder abgebaut wird, stellt sich die Frage, welches Proteolysesystem für den Abbau des Proteins verantwortlich ist. Analog zu den Untersuchungen zum Ort des FBPase-Abbaus wurden wieder Stämme mit Defekten in der

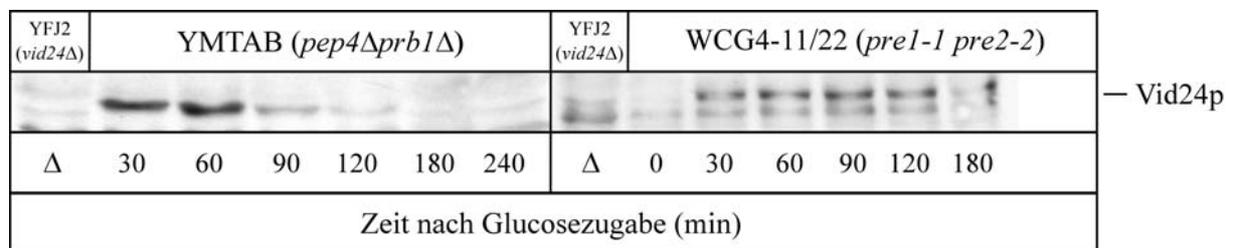
vakuolären Proteolyse (YMTAB, in welchem die vakuolären Proteinase *yscA* und *yscB* deletiert sind) als auch der proteasomalen Proteolyse (WCG4-11/22, in welchem die proteasomalen Untereinheiten Pre1p und Pre2p Mutationen tragen) verwendet. Während im YMTAB-Stamm, in welchem die vakuolären Proteinase *yscA* und *yscB* deletiert sind, der Vid24p-Turnover wie im Wildtypstamm abläuft, scheint das Vid24p im Stamm WCG4-11/22, der Mutationen im Proteasom trägt, über 180 min stabil (Abb. 5-47). In den hier verwendeten Stämmen aus dem WCG4a-Stammhintergrund war es immer ein Problem, das Vid24p in einer Western Blot-Analyse in ausreichender Deutlichkeit zu erkennen. Der Wildtyp-mäßige Abbau im Stamm YMTAB, in welchem die vakuolären Proteinase *yscA* und *yscB* deletiert sind, konnte zwar mehrmals bestätigt werden, aber im Stamm WCG4-11/22, welcher Mutationen im Proteasom trägt, war nur in einem Experiment der Vid24p-Spiegel hoch genug, um eine Aussage über den Vid24p-Abbau treffen zu können.



**Abb. 5-45:** Western Blot-Analyse des Vid24p-Abbaus in den Stämmen YTS2 (*ubc8Δ*), YTS1 (*gid2Δ*), BY4743 (Wildtyp), Y31410 (*vid28Δ*), Y33195 (*ubp14Δ*) und Y33446 (*gid7Δ*).



**Abb. 5-46:** Western Blot-Analyse des Vid24p-Turnovers in den Stämmen Y31488 (*gid7Δ*), Y35282 (*vid22Δ*), WCG4a (Wildtyp), YJR13 (*gid1Δ*), Y34620 (*hvk2Δ*) und Y36576 (*gid8Δ*).



**Abb. 5-47:** Western Blot-Analyse des Vid24p-Turnovers in den Stämmen YMTAB (*pep4Δ prb1Δ*) und WCG4-11/22 (*pre1-1 pre2-2*).

#### 5.4.4.3 In einer Pulse Chase-Analyse

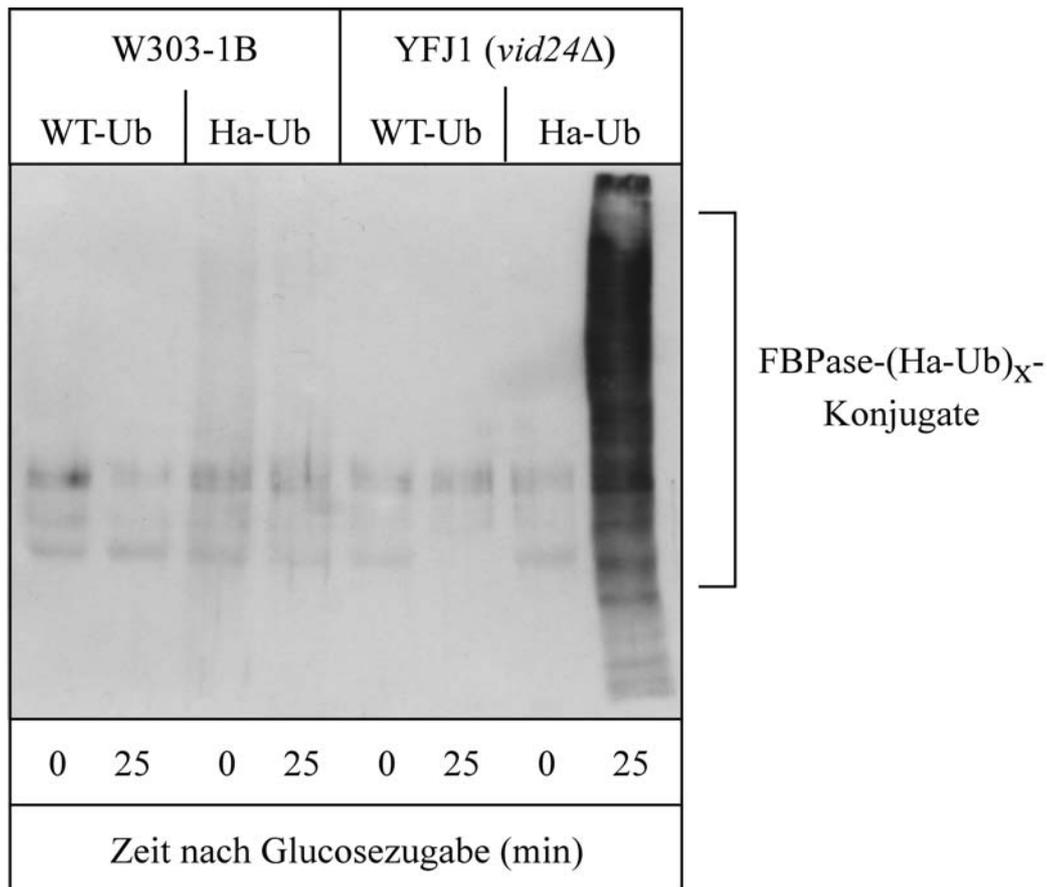
Um genauere Aussagen über den zellulären Ort des proteolytischen Abbaus des Vid24ps machen zu können, wurde eine Pulse Chase-Analyse des Vid24p-Turnovers in einem Wildtypstamm (W303-1B) durchgeführt. W303-1B (Wildtyp) wurde gewählt, da hier in Western Blot-Analysen das Vid24p relativ gut sichtbar war (Abb. 5-44). Bei dem Experiment wurden die Proteine der dereprimierten Zellen des W303-1B-Stammes (Wildtyp) mit der Glucosezugabe radioaktiv mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. 30 min nach Glucosezugabe wurde die

radioaktive Markierung der Proteine durch Zugabe eines großen Überschusses an nicht radioaktivem Methionin gestoppt. Jetzt, nach 15, 30, 60 und 90 min wurden Proben entnommen. Die Lyse der Proben, die Immunpräzipitation des Vid24p und die Detektion des radioaktiven Vid24p-Signals wurden danach analog 4.2.3.7.2 und 4.2.3.7.3 durchgeführt. Leider gingen die evtl. vorhandenen Vid24p-Signale in der Hintergrundstrahlung unter und so konnte auf diesem Wege der Vid24p-Turnover nicht verfolgt werden.

#### 5.4.5 Ubiquitinierung der FBPase im *vid24*-Deletionsstamm

In diesem Experiment wurde überprüft, ob in einem *vid24*-Deletionsstamm die FBPase unter Katabolitinaktivierungsbedingungen ubiquitiniert vorliegt oder nicht. Dazu wurde der *vid24*-Deletionsstamm YFJ1 und der Wildtypstamm W303-1B mit einem Plasmiden transformiert, der entweder ein Ha-getagtes Ubiquitin (YEp112) oder ein Wildtyp-Ubiquitin (YEp96) unter der Kontrolle des *CUPI*-Promotors exprimiert. Die verwendeten, plasmidhaltenden Stämme wurden 16 h lang in Gegenwart von Kupfersulfat (zur Expression von Wildtyp-Ub bzw. Ha-Ub) dereprimiert und danach für 25 min in Glucose-haltiges Medium überführt. Die 0 bzw. 25 min nach Glucosezugabe entnommenen Proben wurden aufgeschlossen und einer Immunpräzipitation mit FBPase-Antikörpern unterzogen. Die mit dem FBPase-Antikörper gefällten Proteine wurden per SDS-PAGE und nachfolgender Western Blot-Analyse mit Ha-Antikörper angefärbt. Während, wie erwartet, zum Zeitpunkt 0 nach Glucosegabe im *vid24*-Deletionsstamm YFJ1, in welchem Ha-Ub überexprimiert wurde, noch keine Konjugate zu erkennen waren, zeigten sich 25 min nach Glucosezugabe deutliche FBPase-(Ha-Ub)<sub>x</sub>-Konjugate (Abb. 5-48). Im Stamm W303-1B (Wildtyp), in welchem Ha-Ub überexprimiert wurde, kann man 0 und 25 min nach Glucosezugabe schwache Konjugatenbanden erkennen. Der Wildtypstamm W303-1B und der *vid24*-Deletionsstamm YFJ1, in welchen Wildtyp-Ub überexprimiert wurde, zeigten wie erwartet keine FBPase-(Ha-Ub)<sub>x</sub>-Konjugate.

Die obigen Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass Vid24p seine Funktion in der Katabolitdegradation der FBPase nach der Ubiquitinierung der FBPase hat.

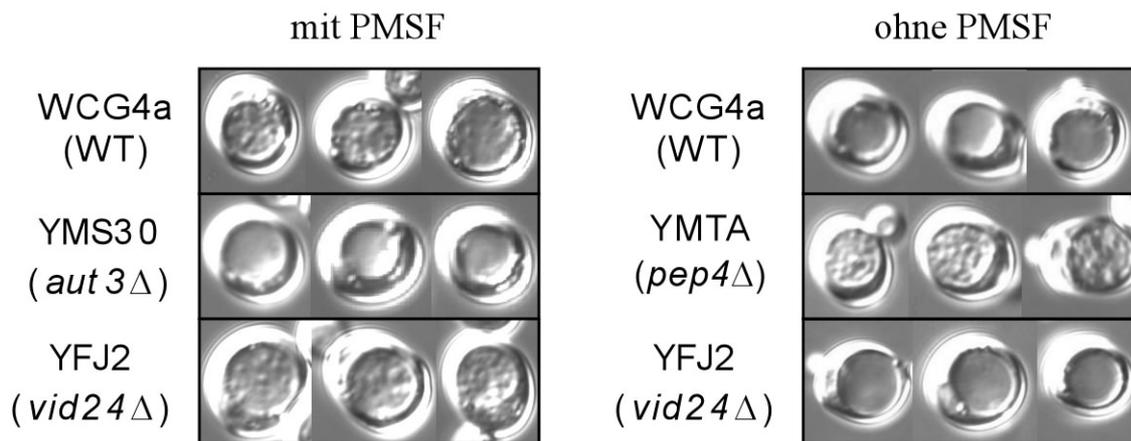


**Abb. 5-48:** Ubiquitinierung der FBPase 0 bzw. 25 min nach Glucosezugabe in den Stämmen W303-1B (Wildtyp) und YFJ1 (*vid24*Δ), in welchen durch einen Plasmiden Wildtyp-Ub (WT-Ub) oder Ha-Ub überexprimiert worden waren.

#### 5.4.6 Test der *vid24*-Deletionsmutante auf einen Autophagozytosephänotyp

Um zu überprüfen, ob Vid24p an der Autophagozytose beteiligt ist, wurde ein Vesikeltest analog zu 5.3.3 mit dem *vid24*-Deletionsstamm YFJ2 durchgeführt.

In Abb. 5-49 sind die Ergebnisse des Vesikeltests des *vid24*-Deletionsstammes YFJ2 und der entsprechenden Kontrollstämme gezeigt. Die *vid24*-Deletionsmutante verhält sich bei der Induktion der Autophagozytose sowohl bei Vorhandensein als auch bei Fehlen von PMSF wie der Wildtypstamm. Dies bedeutet, dass Vid24p nicht an der Autophagozytose beteiligt ist.



**Abb. 5-49:** Test der *vid24*-Deletionsmutante auf einen Autophagozytosephänotyp. Dazu wurde ein Vesikeltest mit den Stämmen WCG4a (Wildtyp), YMS30 (*aut3Δ*), YFJ2 (*vid24Δ*) und YMTA (*pep4Δ*) durchgeführt. Die Stämme wurden zum einen in 1 % Kaliumacetat (alle außer YMTA) mit PMSF und zum anderen in 1 % Kaliumacetat ohne PMSF (alle außer YMS30) ca. 4 h lang inkubiert und dann die Zellen unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

#### 5.4.7 Überprüfung der Membranassoziation

Es sollte geprüft werden, ob Vid24p als peripheres Membranprotein vorliegt. Der Versuch wurde analog 4.2.3.22 durchgeführt. Leider war in der Western Blot-Analyse mit dem Vid24p-Antikörper kein Vid24p-Signal detektierbar.

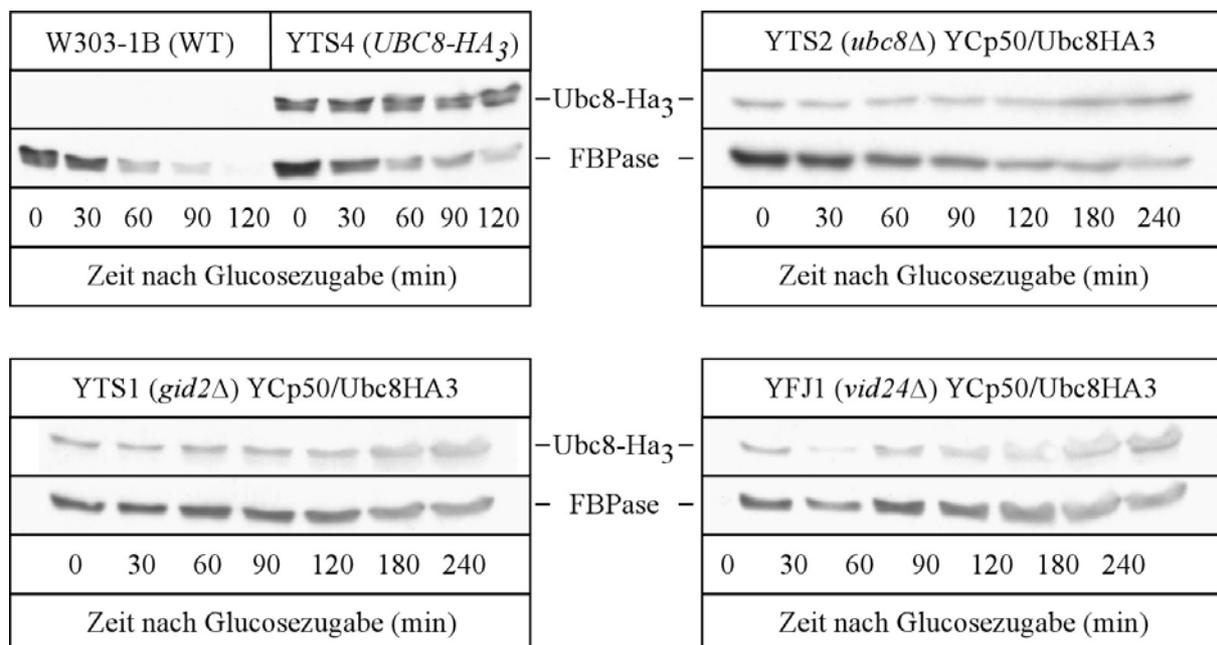
### 5.5 Das Protein Ubc8p

Das cytosolisch lokalisierte Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc8p ist 218 Aminosäuren groß und besitzt eine molekulare Masse von 24,6 kDa. Ubc8p wird für die Ubiquitinierung der FB Pase benötigt (Schuele et al., 2000). Das Protein wird wie die FB Pase während des Wachstums von Hefezellen auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen exprimiert und nach Glucosezugabe wieder abgebaut (Schuele et al., 2000).

#### 5.5.1 Messung des Ubc8p-Abbaus

Da Ubc8p und Gid2p am Vid24p-Abbau beteiligt sind, sollte überprüft werden, ob Vid24p und Gid2p auch einen Einfluß auf den Ubc8p-Abbau haben. Dazu wurden ein Plasmid

(Ycp50/Ubc8HA<sub>3</sub>) erzeugt, welcher u.a. eine 3 x Ha-getaggte Version von *UBC8* sowie dessen Promotor- und Terminatorregion enthielt. Ausgangen wurde von dem Genbakplasmid Ycp50/III mit *URA3*-Marker, welches ein ca. 8 kb großen DNA-Abschnitt des Chromosoms V (zwischen den Positionen 131043 und 139059) enthält. Innerhalb des 8 kb großen DNA-Abschnittes befindet sich auch das *UBC8*-Gen inklusive seiner Promotor- und Terminatorregion. Das Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym BfrI so aufgeschnitten, dass das *UBC8* inklusive Promotor- und Terminatorregion herausgeschnitten wurden. Das linearisierte Plasmid wurde in einen Stamm mit *UBC8-HA<sub>3</sub>* (YTS4) transformiert und durch Selektion auf Medium ohne Uracil komplementiert. Die erhaltenen Transformanten enthielten dann das gewünscht Plasmid Ycp50/Ubc8HA<sub>3</sub>. Mit diesem Plasmid wurden dann *ubc8*-, *gid2*- und *vid24*-Deletionsmutanten transformiert und der FBPase- und Ubc8p-Abbau untersucht.



**Abb. 5-50:** Funktionalitätstest des vom Plasmiden Ycp50/Ubc8HA<sub>3</sub> aus exprimierten Ubc8-Ha<sub>3</sub>. Dazu wurden Western Blot-Analysen des FBPase-Abbaus und des Ubc8-Ha<sub>3</sub>-Abbaus in den Stämmen W303-1B (Wildtyp) und YTS4 (*UBC8-HA<sub>3</sub>*) sowie in den Stämmen YTS2 (*ubc8Δ*), YTS1 (*gid2Δ*) und YFJ1 (*vid24Δ*), in welchen Ubc8-Ha<sub>3</sub> durch den Plasmiden Ycp50/Ubc8HA<sub>3</sub> exprimiert wurde, durchgeführt.

In Abb. 5-50 kann man sehen, dass im Stamm mit chromosomal 3 x Ha-getaggttem *UBC8* (YTS4) selbst nach Glucosezugabe über 120 min der Ubc8-Ha<sub>3</sub>-Level relativ konstant bleibt. In allen 3 Stämmen, in welchen Ubc8-Ha<sub>3</sub> über das Plasmid Ycp50/Ubc8HA<sub>3</sub> exprimiert wurde, bleibt der Ubc8p-Spiegel über 240 min relativ konstant. Der FBPase-Abbau im YTS4-Stamm, in welchem Ubc8p dreifach Ha-getaggt vorliegt, ist etwas langsamer als im Wildtyp-

Stamm W303-1B. Im *ubc8*-Deletionsstamm YTS2, dessen *ubc8*-Deletion durch das Plasmid YCp50/Ubc8HA<sub>3</sub> komplementiert wird, zeigt einen verlangsamten FBPase-Abbau.

Im Gegensatz zu einem früheren Ergebnis von Thomas Schüle (Schuele et al., 2000) scheint in dem getesteten Ubc8-HA<sub>3</sub>-exprimierenden Stamm YTS4 die Ubc8p-Konzentration unter Katabolitinaktivierungsbedingungen relativ konstant zu bleiben. Um diese Diskrepanz des Ubc8p-Abbaus im Ubc8-HA<sub>3</sub>-exprimierenden Stamm YTS4 zwischen obigem Ergebnis und dem Ergebnis von Thomas Schüle (Schuele et al., 2000) aufzulösen, wurde versucht den Ubc8p-Turnover radioaktiv zu verfolgen. Dazu wurde eine Pulse Chase-Analyse analog Kapitel 4.2.3.7 durchgeführt. Leider konnte kein radioaktives Ubc8p-Signal detektiert werden.

## 5.6 Interaktionsstudien

Mit Hilfe von Interaktionsstudien sollten mögliche Interaktionspartner der Proteine Gid2p, Ubc8p und Vid24p gefunden werden.

### 5.6.1 GST-Pulldown-Experimente

Eine Möglichkeit Interaktionen zwischen Proteinen zu erkennen, stellen GST-Pulldown-Experimente dar. Hierbei wird zuerst das Glutathion-S-Transferase fusionierte („getaggte“) Protein (GST-Fusionsprotein) an das Säulenmaterial gebunden und in einem weiteren Schritt wird ein Heferohextrakt auf die Säule gegeben und überprüft, welche Proteine durch Interaktion mit dem Fusionsprotein an der Säule nach mehreren Waschschritten noch gebunden sind. Zur Kontrolle wird das ganze Experiment auch mit einer Säule durchgeführt, an welche nur GST gebunden wurde. Die Proteine, die nach Elution von der Säule, an welche das GST-getaggte Protein gebunden wurde, erkennbar sind, stammen von möglichen Interaktionspartnern des GST-Fusionsproteins. Proteine, die an beide Säulen binden, binden unspezifisch an das Säulenmaterial oder an GST und stellen keine potentiellen Interaktionspartner des untersuchten Proteins dar.

Für die Expression von GST-Fusionproteinen wurden 2 verschiedene Möglichkeiten verwendet. Zum einen wurde mit Hilfe der pGEX-Vektoren (pGEX-4T-1 oder pGEX-4T-3) ein GST-Fusionsprotein erzeugt, welches in *E. coli* exprimiert werden kann. Zum anderen

---

werden mit Hilfe des pYEX4T-1-Vektors GST-Fusionsproteine unter Kontrolle des *CUP1*-Promotors in *S. cerevisiae* exprimiert.

### **5.6.1.1 Expression von GST-Gid2p in *E. coli***

Mit dem Plasmid pJR10 (siehe 4.1.2), welches eine GST-Gid2p-Fusion exprimieren kann (Ausgangsplasmid pGEX-4T-3), wurde versucht GST-Gid2p in *E. coli* zu exprimieren und nach dem Aufschluss in Lösung zu bringen. Leider gelang nur die Expression des Fusionsproteins. GST-Gid2p konnte trotz mehrerer Versuche nie in Lösung gebracht werden. Auch Variationen beim Aufschluss (z.B. unterschiedliche Einwirkzeit des Ultraschalls oder Zusatz von 6 M Harnstoff zum Aufschlusspuffer) konnten das Fusionsprotein nicht in Lösung bringen. Aus diesem Grund konnte kein GST-Pulldown-Experiment mit GST-Gid2p durchgeführt werden.

### **5.6.1.2 Expression von GST-Vid24p in *E. coli***

#### **5.6.1.2.1 Herstellung des GST-Vid24p-Expressionsplasmids**

Um ein GST-Vid24p exprimierendes Plasmid zu erhalten, wurde mit Hilfe einer PCR unter Verwendung der Oligonukleotide GST\_VID24\_1\_BamHI und GST\_VID24\_2\_NotI sowie Wildtyp-DNA als Template ein DNA-Fragment erhalten, welches das *VID24* und am 5'- bzw. 3'-Ende eine BamHI- bzw. NotI-Schnittstelle enthielt, und über die Schnittstellen BamHI und NotI in das Plasmid pGEX-4T-1 integriert. Das resultierende Plasmid wurde pGEX-4T-1\_Vid24 genannt.

#### **5.6.1.2.2 Expression von GST-Vid24p in *E. coli***

Auch mit diesem Plasmid wurde die Expression in *E. coli* und die Löslichkeit des Fusionsproteins nach dem Aufschluss überprüft. Ebenso wie das GST-Gid2p konnte das GST-Vid24p zwar exprimiert, aber nicht in Lösung gebracht werden. Genauso wie beim GST-Gid2p wurden auch hier die Aufschlussbedingungen variiert. Mit 6 M Harnstoff konnte

GST-Vid24p zwar in Lösung gehalten werden, allerdings fiel das Fusionsprotein nach Entfernen des Harnstoffes, der beim eigentlichen GST-Pulldown-Experiment durch seine denaturierende Wirkung stören würde, per Dialyse wieder aus. Aus diesem Grund konnte kein GST-Pulldown-Experiment durchgeführt werden.

### 5.6.1.3 Expression von GST-Ubc8p in *E. coli*

#### 5.6.1.3.1 Herstellung des GST-Ubc8p-Expressionsplasmids

Insgesamt wurden 3 verschiedene Plasmide hergestellt, die GST-Ubc8p exprimierten. Als erstes wurde die Basensequenz des gereiften *UBC8* (Basensequenz des *UBC8*-Gens ohne die Basenpaare 1 – 162, siehe auch Kapitel 4.1.2) in Frame C-terminal an das GST in das Plasmid pGEX-4T-1 integriert. Dazu wurde zuerst über PCR ein DNA-Fragment mit Hilfe der Oligonukleotide Ubc8\_GST\_1\_EcoRI und Ubc8\_GST\_2\_NotI sowie Wildtyp-DNA als Template erzeugt, welches die Basensequenz des gereiften *UBC8* (ab Basenpaar 163) und am 5'- bzw. 3'-Ende eine EcoRI- bzw. NotI-Schnittstelle enthielt, und dann über die Schnittstellen EcoRI und NotI in das Plasmid pGEX-4T-1 integriert. Dies ergab das Plasmid pGEX-4T-1\_Ubc8 (gereifte Form).

Die anderen beiden Plasmide (pGEX-4T-1\_C125S-Ubc8 und pGEX-4T-1\_Ubc8) enthielten jeweils das komplette *UBC8*, wobei in einem dieser das Cystein an Position 126 des Ubc8p gegen Serin ausgetauscht wurde. Die über die Schnittstellen EcoRI und NotI in das Plasmid pGEX-4T-1 integrierten DNA-Fragmente wurden ebenfalls per PCR gewonnen, wobei hierbei die Oligonukleotide pGEX4T-1\_Ubc8\_1\_EcoRI, Ubc8\_Cys-Ser\_Primer1, Ubc8\_Cys-Ser\_Primer2 und pGEX4T-1\_Ubc8\_2\_NotI (pGEX-4T-1\_C125S-Ubc8, insgesamt in 3 PCR-Reaktionen) bzw. pGEX4T-1\_Ubc8\_1\_EcoRI und pGEX4T-1\_Ubc8\_2\_NotI (pGEX-4T-1\_Ubc8) verwendet wurden.

#### 5.6.1.3.2 Expression von GST-Ubc8p

Im Gegensatz zu den bisher untersuchten GST-Fusionsproteinen konnte das Fusionsprotein aus GST und gereiftem Ubc8p sowohl mit Hilfe des Plasmids pGEX-4T-1\_Ubc8 (gereifte

Form) in *E. coli* exprimiert als auch nach dem Aufschluss in Lösung gebracht werden. Das so exprimierte GST-Ubc8p wurde für die GST-Pulldowns im nächsten Kapitel verwendet.

Mit den beiden anderen Plasmiden mit kompletter *UBC8*-Basensequenz konnte kein GST-Ubc8p-Fusionsprotein sondern nur GST mit etwas erhöhtem Molekulargewicht exprimiert werden. Diese beiden Proteine wurden nicht weiter verwendet.

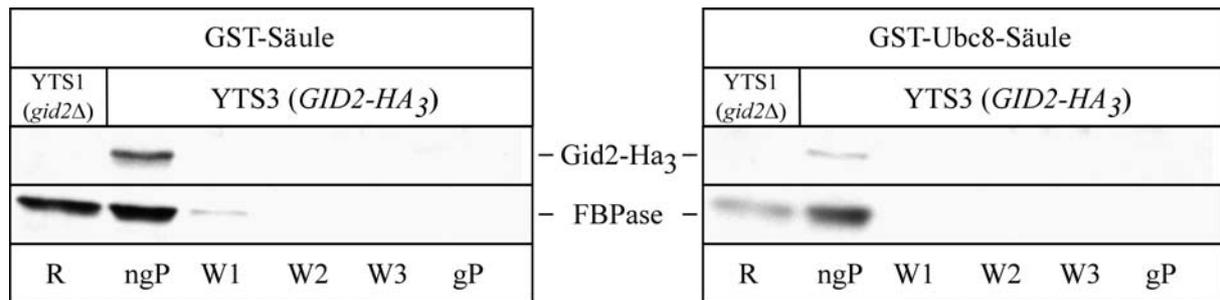
### 5.6.1.3.3 GST-Pulldown

Durch Bindung von GST-Ubc8p an das Säulenmaterial wurde eine GSTp-Ubc8p-Säule erzeugt. Zum Vergleich wurde auch eine GST-Säule erzeugt. Dazu wurde mit Hilfe des Plasmids pGEX-4T-1 in *E. coli* exprimiertes GST an das Säulenmaterial gebunden.

Auf beide Säulen wurde ein nativer Aufschluss des Stammes YTS3, der Gid2-Ha<sub>3</sub> exprimiert, gegeben und über Nacht bei 4°C über Kopf geschüttelt. Danach wurde zentrifugiert und der Überstand, welcher die nicht an die Säule gebundenen Proteine (ngP) enthält, abgenommen. Das Säulenmaterial wurde 3 Mal mit PBS mit steigender NaCl-Konzentration gewaschen (260, 380 und 500 mM). Die Waschpufferüberstände wurden mit W1, W2 und W3 bezeichnet. Durch diese 3 Waschschritte können schwach an das Säulenmaterial gebundene Proteine abgelöst werden. Die in den Proben ngP, W1, W2 und W3 enthaltenen sowie die an das Säulenmaterial gebundenen Proteine (gP) wurden über eine Western Blot-Analyse bestimmt bzw. nach SDS-PAGE über Coomassie-Staining sichtbar gemacht.

In Abb. 5-51 kann man das Ergebnis der Western Blot-Analyse des GST-Pulldown-Experimentes sehen. Gid2-Ha<sub>3</sub> und FBPase konnten nur in den ngP-Fractionen nachgewiesen werden und nicht in den Wasch- oder gP-Fractionen. Eine Verwendung einer GST- oder GST-Ubc8p-Säule zeigt keinen Unterschied.

Das Coomassie-Staining des GST-Pulldown-Experimentes mit einer GST-Säule zeigte im Vergleich zu einer GST-Ubc8-Säule keine unterschiedliches Bandenmuster (außer natürlich GST bzw. GST-Ubc8p). Potentielle nur an die GST-Ubc8p-Säule bindende Proteine waren nicht zu erkennen.



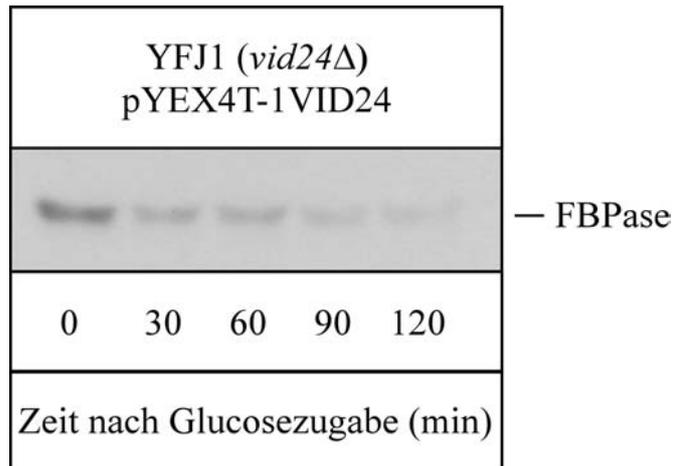
**Abb. 5-51:** GST-Pulldown-Experiment mit einer GST- bzw. GST-Ubc8-Säule. Ein nativer Rohextrakt des Stammes YTS3 (*GID2-HA<sub>3</sub>*) wurde mit dem Säulematerial inkubiert und wieder abgenommen („nicht gebundene Proteine“ ngP). Das resultierende Säulematerial wurde 3 Mal mit PBS mit steigender NaCl-Konzentration gewaschen (260, 380 und 500 mM, Waschritt 1 – 3 [W1, W2, W3]) und dann in Puffer aufgenommen („gebundene Proteine“ gP). Zur Kontrolle wurde der Rohextrakt eines *gid2*-Deletionsstammes mit aufgetragen.

#### 5.6.1.4 Expression von GST-Vid24p in *S. cerevisiae*

##### 5.6.1.4.1 Funktionalitätsprüfung des Plasmids

Mit dem käuflich erwerbbaaren Plasmid pYEX4T-1Vid24 konnte eine Quelle für die Expression von GST-Vid24p in *S. cerevisiae* gefunden werden. Da für das Plasmid keine Garantie vom Hersteller übernommen wurde, musste das Insert (*VID24*) zuerst auf Richtigkeit und Expression hin überprüft werden. Hierzu wurde mit den Oligonukleotiden pYEX4T-1\_P1 und pYEX4T-1\_P2 sowie dem Plasmid über PCR und nachfolgende Elektrophorese die Größe des Inserts bestimmt. Diese stimmte mit der Größe des *VID24*-Gens (1089 Basenpaare) überein.

Als weiteren Test wurde die Funktionalität des GST-Vid24p überprüft. Dazu sollte der FBPase-Abbaufekt in einem *vid24*-Deletionsstamm (YFJ1) durch die Expression des GST-Vid24p vom Plasmid pYEX4T-1Vid24 wieder komplementiert werden können. Wie in Abb. 5-52 zu erkennen ist, zeigt der *vid24*-Deletionsstamm YFJ1 mit dem Plasmid pYEX4T-1Vid24 einen Wildtyp-mäßigen FBPase-Abbau. Das exprimierte GST-Vid24p ist demnach funktionell.



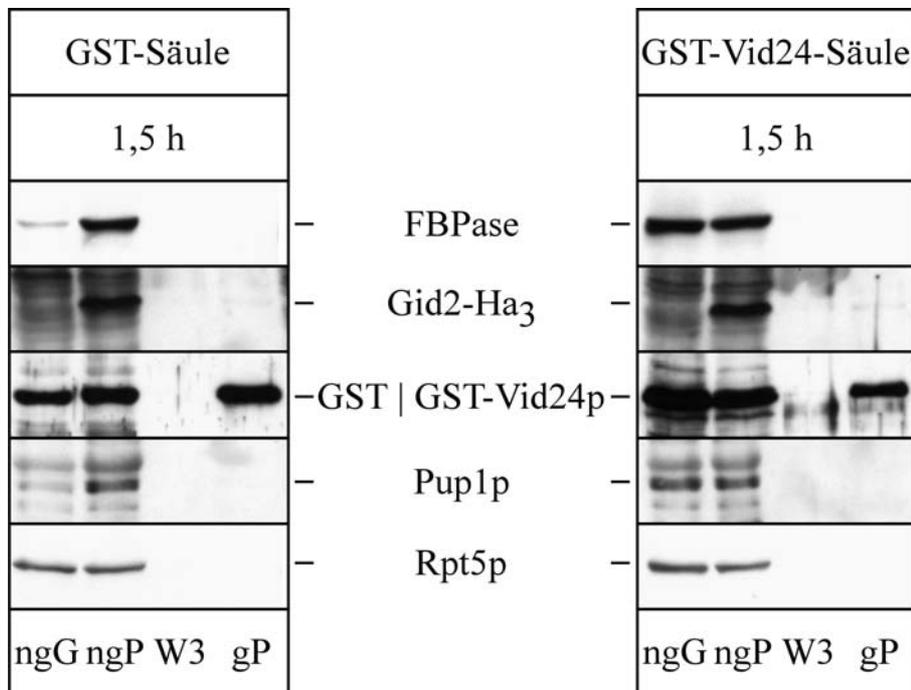
**Abb. 5-52:** Funktionalitätsprüfung des mit Hilfe des Plasmids pYEX4T-1Vid24 exprimierten GST-Vid24p. Dazu wurde eine Western Blot-Analyse des FBPAse-Abbaus im Stamm YFJ1 (*vid24Δ*) mit pYEX4T-1Vid24 durchgeführt. Die Expression von GST-Vid24p wurde mit der Glucosezugabe durch Zugabe von Kupfersulfat gestartet.

#### 5.6.1.4.2 Resultate des GST-Pulldown

Zur Durchführung des Experimentes wurde zuerst GST bzw. GST-Vid24p in *S. cerevisiae* exprimiert. Dafür wurde der *gid2*-Deletionstamm YTS1, in welchem GST bzw. GST-Vid24p über die Plasmide pHIT128 bzw. pYEX4T-1Vid24 exprimiert wurde, und YFJ6, welcher ein dreifach Ha-getaggtes Gid2p und eine *vid24*-Deletion trägt, (Expression von GST-Vid24p über pYEX4T-1Vid24, Herstellung des Stammes im Kapitel 5.7.2.1) verwendet.

Die im *gid2*-Deletionstamm YTS1 über die Plasmide pHIT128 bzw. pYEX4T-1Vid24 exprimierten GST- bzw. GST-Vid24p-Proteine wurden durch 1,5 oder 3 stündige Inkubation bei 4°C an das Säulenmaterial (Glutathion Sepharose 4B) gebunden (diese Zeit wird „Inkubationszeit\_1“ genannt). Nach dieser Inkubationszeit wurde zentrifugiert und der Überstand (enthält nicht gebundene GST-Proteine „ngG“) abgenommen. Zum verbliebenen Säulenmaterial wurde ein nativer Rohextrakt des Stammes YTS3, welcher Gid2-Ha<sub>3</sub> exprimiert, gegeben. Nach 1,5, 3 oder 16 stündigem über Kopf-Schütteln bei 4°C (diese Zeit wird „Inkubationszeit\_2“ genannt), wurde zentrifugiert und der Überstand abgenommen (enthält nicht gebundene Proteine „ngP“). Das Säulenmaterial wurde danach nacheinander mit Waschpuffer W1 (PBS mit 260 mM NaCl), W2 (PBS mit 380 mM NaCl) und W3 (PBS mit 500 mM NaCl) gewaschen. Der Überstand des Waschrittes mit Waschpuffer W3 wird aufgehoben und zusammen mit den Proben „ngG“, „ngP“ sowie dem verbliebenen Säulenmaterial auf enthaltene Proteine über eine Western Blot-Analyse getestet.

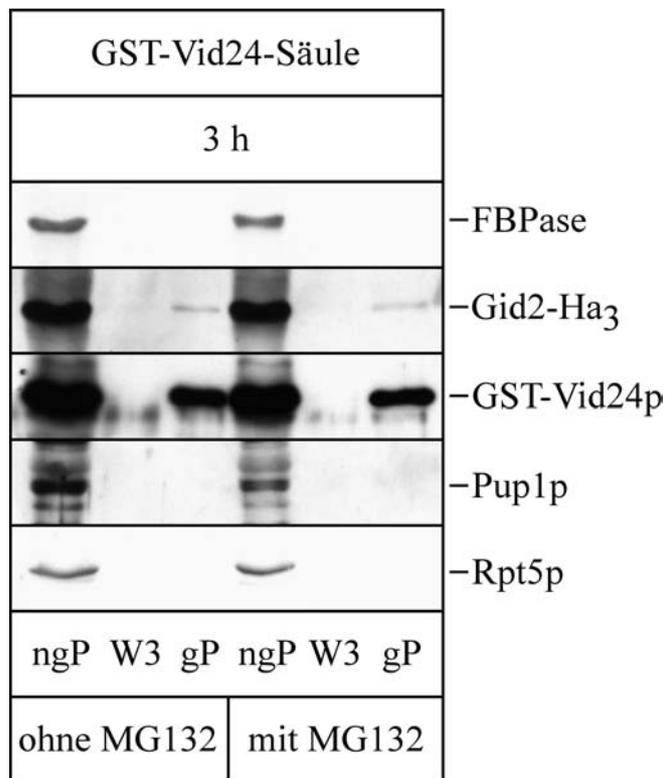
In den Experimenten, in denen die „Inkubationszeit\_1“ 3 h und die „Inkubationszeit\_2“ 3 oder 16 h betrug, wurde das GST-Vid24p jedes Mal trotz Verwendung von Inhibitoren gegen proteolytischen Abbau fast vollständig degradiert. Allerdings konnte durch Verwendung des proteasomalen Inhibitors MG132 die nicht degradierte GST-Vid24p-Menge vergrößert werden. Betrug die Inkubationszeiten jeweils 1,5 h, so war ein deutliches Signal des GST-Vid24p in der Probe „gP“ zu erkennen (Abb. 5-53). In diesem Experiment konnten weder ein FBPase- noch Pup1- noch Rpt5-Signal in der „gP“-Probe nachgewiesen werden. Dagegen ist ein schwaches Gid2-Ha<sub>3</sub>-Signal in dieser Probe erkennbar. Allerdings ist dieses Signal sowohl bei der GST-Säule als auch der GST-Vid24-Säule zu sehen. Dies deutet darauf hin, dass nur eine unspezifische Bindung des Gid2-Ha<sub>3</sub> an GST vorliegt.



**Abb. 5-53:** Suche nach Interaktionspartnern von Vid24p. Dazu wurde ein GST-Pulldown-Experiment mit einer GST- bzw. GST-Vid24-Säule durchgeführt. ngG: nicht an die Säule gebundene GST-Proteine, ngP: nicht an die Säule gebundene Proteine, W3: Waschschrift mit PBS, das 500 mM NaCl enthält, gP: an die Säule gebundene Proteine. GST wurde im Stamm YTS1 (*gid2Δ*) mit Hilfe des Plasmids pHIT128, GST-Vid24 im Stamm YTS1 (*gid2Δ*) mit Hilfe des Plasmids pYEX4T-1Vid24 exprimiert und an das Säulenmaterial gebunden. Inkubationszeit\_1 und Inkubationszeit\_2 betrug jeweils 1,5 h.

Wurde das GST-Vid24p im Stamm YFJ6 mit Hilfe des Plasmids pYEX4T-1Vid24 exprimiert, so erfolgte die Bindung des GST-Vid24p an das Säulenmaterial und die Bindung der mit GST-Vid24p interagierenden Partner an dieses zeitgleich (3 h lang bei 4°C). Die weitere Fortführung des Experimentes erfolgte analog oben. In der Probe gP konnte eine

genügend große Menge GST-Vid24p nachgewiesen werden (Abb. 5-54). Von den Proteinen FBPase, Pup1 und Rpt5 konnte jeweils in der Probe „gP“ kein Signal detektiert werden. Gid2-Ha<sub>3</sub> konnte in dieser Probe erneut detektiert werden, wobei die Menge größer als diejenige in Abb. 5-53 war. Die Verwendung des proteasomalen Inhibitors MG132 brachte kein besseres Signal.



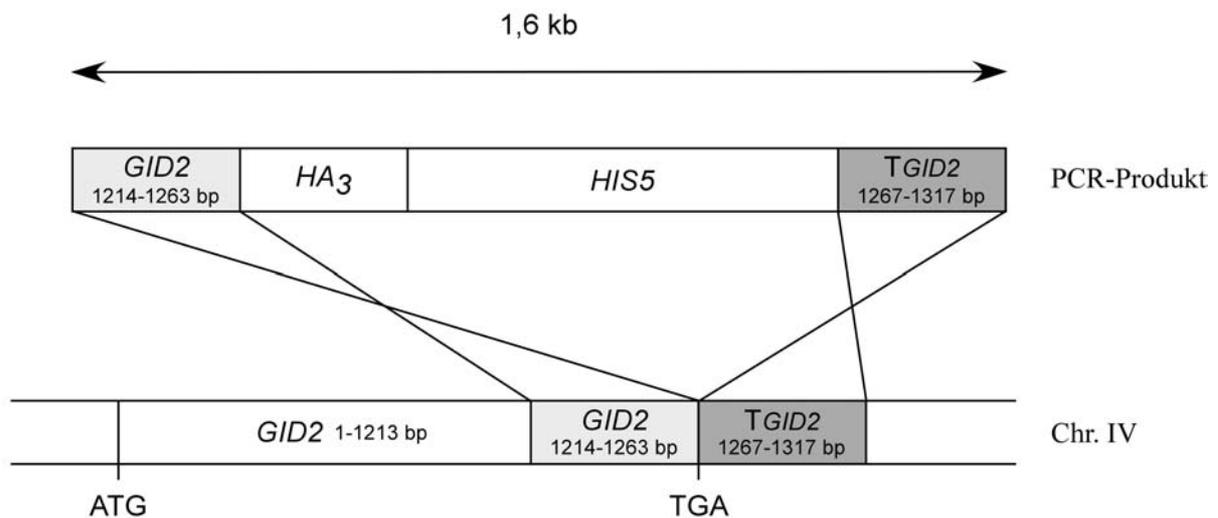
**Abb. 5-54:** Suche nach Interaktionspartnern von Vid24p. Dazu wurde ein GST-Pulldown-Experiment mit einer GST-Vid24-Säule durchgeführt. ngP: nicht an die Säule gebundene Proteine, W3: Waschschrift mit PBS, das 500 mM NaCl enthält, gP: an die Säule gebundene Proteine. GST-Vid24 wurde im Stamm YFJ6 (*vid24Δ GID2-HA<sub>3</sub>*) mit Hilfe des Plasmids pYEX4T-1Vid24 exprimiert und an das Säulenmaterial gebunden (Inkubationszeit: 3 h).

## 5.6.2 Co-Immunopräzipitationen

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen stellen Co-Immunopräzipitationen (Co-IPs) dar. Dabei wird das zu untersuchende Protein (hier Gid2-Ha<sub>3</sub>) mit spezifischen Antikörpern (hier Ha-Antikörper) gefällt. Potentielle interagierende Proteine können dabei mitgefällt werden und in einer Western Blot-Analyse sichtbar gemacht werden.

### 5.6.2.1 Herstellung der benötigten Stämme

Für diese Co-IPs wurden Stämme benötigt, welche eine chromosomal integriertes *GID2-HA<sub>3</sub>* besaßen. Zur Herstellung dieser Stämme wurde über PCR ein DNA-Fragment erzeugt (mit Hilfe der Oligonukleotide *Gid2\_HA3\_1* und *Gid2\_HA3\_2* sowie dem Plasmiden *p3XHA-HIS5*), mit welchem es möglich war, das Stopcodon des *GID2* (TGA) durch ein Ha-Tridem und das *HIS5* aus *S. pombe* zu ersetzen (siehe auch Abb. 5-55).



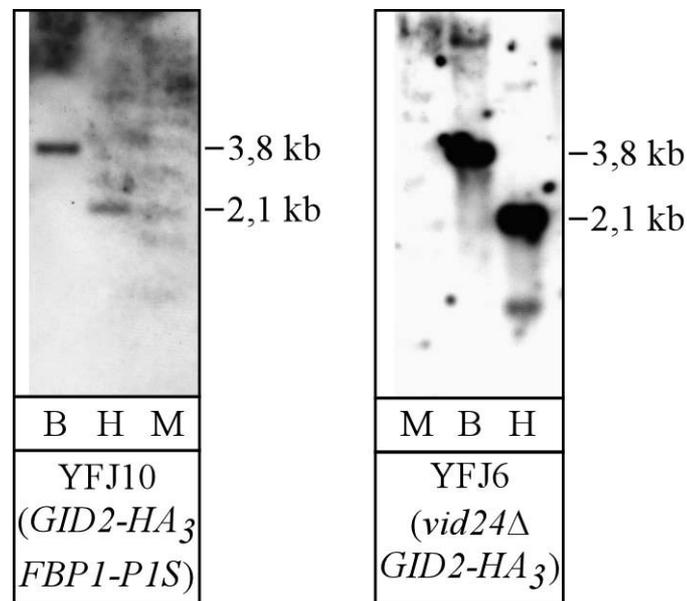
**Abb. 5-55:** Konstruktion des dreifach Ha-getaggten *Gid2p*. Die Integration des PCR-Produktes in das Wildtypgen erfolgt durch zwei homologe Rekombinationsprozesse. Hierbei wird das Stopcodon (TGA) durch die *HA<sub>3</sub>-HIS5*-Kassette ersetzt und dadurch ein *HIS5*-Markergen eingeführt.

Auf diese Methode wurden die Stämme YFJ6 (Ausgangsstamm YFJ1, welcher eine *vid24*-Deletion enthält), YFJ10 (Ausgangsstamm YMH2 (*FBP1-PIS*)) und YFJ11 (Ausgangsstamm YMH1 (*FBP1-PIW*)) erzeugt, die alle *Gid2-Ha<sub>3</sub>* exprimieren.

### 5.6.2.2 Überprüfung der Stämme mit Hilfe eines Southern-Blots

Die richtige Integration ins Genom der Hefe wurde mittels einer Southern Blot-Analyse überprüft. Dazu wurde chromosomale DNA der Stämme YFJ6, bei welchem das *VID24*-Gen deletiert ist und der *Gid2-Ha<sub>3</sub>* exprimiert, YFJ10 und YFJ11, bei welchen das aminotermine Prolin der *FBPase* mutiert ist und die *Gid2-Ha<sub>3</sub>* exprimieren, mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI bzw. *Hind*III verdaut. Bei korrekter Integration erhält man mit *Bam*HI ein ca. 3,8 kb großes (*Bam*HI schneidet ca. 2,3 kb vor dem *GID2*-Gen und am Ende des *HIS5*-Gens) und

mit HindIII ein ca. 2,1 kb großes DNA-Fragment (HindIII schneidet ca. 0,6 kb vor dem *GID2*-Gen und am Ende des *HIS5*-Gens).



**Abb. 5-56:** Southern Blot-Analyse der Stämme YFJ10 (*FBP1-P1S GID2-HA<sub>3</sub>*) und YFJ6 (*vid24Δ GID2-HA<sub>3</sub>*). Die chromosomale DNA wurde mit BamHI (B) bzw. HindIII (H) verdaut und anschließend mit einer *HIS5*-Sonde detektiert. M ist eine Markerbande.

In Abb. 5-56 kann man sehen, dass in den Southern Blot-Analysen der Stämme YFJ10, bei welchem das aminotermine Prolin der FB Pase gegen Serin ausgetauscht ist und der *Gid2-Ha<sub>3</sub>* exprimiert, und YFJ6, bei welchem das *VID24*-Gen deletiert ist und der *Gid2-Ha<sub>3</sub>* exprimiert, die mit BamHI bzw. HindIII verdaute chromosomalen DNA die zu erwartenden Banden ergaben. Die Southern Blot-Analyse des Stammes YFJ11, bei welchem das aminotermine Prolin der FB Pase gegen Tryptophan ausgetauscht ist und der *Gid2-Ha<sub>3</sub>* exprimiert, zeigt ebenfalls die erwarteten Banden (Abbildung nicht gezeigt). Der Stamm YFJ6, bei welchem das *VID24*-Gen deletiert ist und der *Gid2-Ha<sub>3</sub>* exprimiert, wurde auch für die Experimente im Kapitel 5.6.1.4 verwendet.

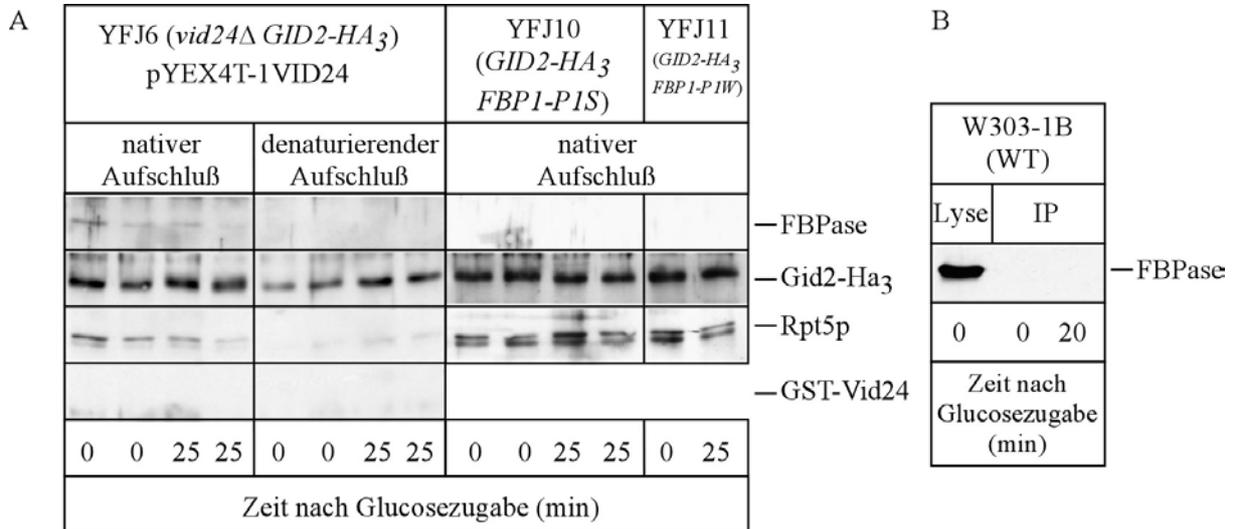
### 5.6.2.3 Resultate der Co-Immunopräzipitationen

Von dem Stamm YFJ6 (*vid24Δ GID2-HA<sub>3</sub>*), in welchem über das Plasmid pYEX4T-1VID24 GST-Vid24p exprimiert wurde, wurden 0 und 25 min nach Glucosezugabe zu dereprimierten Zellen Proben genommen und nativ bzw. denaturierend aufgeschlossen. Zu den gleichen Zeitpunkten wurden auch Proben der Stämme YFJ10 (*FBP1-PIS GID2-HA<sub>3</sub>*), YFJ11 und W303-1B (Wildtyp) genommen und nativ aufgeschlossen. Sämtlich Proben wurden danach mit Ha-Antikörper, welcher kovalent an Protein A Sepharose gebunden vorlag, immunopräzipitiert (die Aufschlüsse des Stammes W303-1B (Wildtyp) wurden mit Ha-Antikörper immunopräzipitiert). Die immunopräzipitierten Proben wurden danach einer Western Blot-Analyse unterzogen.

In Abb. 5-57 ist das Ergebnis der Co-IP-Experimente dargestellt. Durch Anfärben mit Ha-Antikörper kann gezeigt werden, ob *Gid2-HA<sub>3</sub>* auch wirklich bei der Immunopräzipitation ausgefällt wurde. In den Stämmen YFJ6 (*vid24Δ GID2-HA<sub>3</sub>*), YFJ10 (*FBP1-PIS GID2-HA<sub>3</sub>*) und YFJ11 (*FBP1-PIW GID2-HA<sub>3</sub>*) kann man in allen Proben jeweils eine *Gid2-HA<sub>3</sub>*-Bande erkennen (Abb. 5-57 A). Eine GST-Vid24p-Bande ist in sämtlichen Proben des Stammes YFJ6 (*vid24Δ GID2-HA<sub>3</sub>*) nicht zu erkennen. In den nativ aufgeschlossenen Proben des Stammes kann man eine FBPase-Bande sehen, die zum Zeitpunkt 0 min stärker als zum Zeitpunkt 25 min ist. Im Gegensatz dazu kann in den denaturierend aufgeschlossenen Proben des Stammes YFJ6 (*vid24Δ GID2-HA<sub>3</sub>*) sowie den Proben der Stämme YFJ10 (*FBP1-PIS GID2-HA<sub>3</sub>*) und YFJ11 (*FBP1-PIW GID2-HA<sub>3</sub>*) kein FBPase-Signal beobachtet werden (Abb. 5-57 A). Auch im Wildtypstamm W303-1B (Wildtyp) kann nach IP mit Ha-Antikörper kein FBPase-Signal detektiert werden (Abb. 5-57 B). Nur im zur Kontrolle aufgetragenen durch alkalische Lyse aufgeschlossenen und keiner IP unterzogenen Rohextrakt des Stammes W303-1B ist ein FBPase-Signal zu sehen. In sämtlichen nativ aufgeschlossenen Proben der Stämme YFJ6 (*vid24Δ GID2-HA<sub>3</sub>*), YFJ10 (*FBP1-PIS GID2-HA<sub>3</sub>*) und YFJ11 (*FBP1-PIW GID2-HA<sub>3</sub>*) kann jeweils ein Rpt5-Signal detektiert werden (Abb. 5-57 A, obere Bande). In den denaturierend aufgeschlossenen Proben des Stammes YFJ6 (*vid24Δ GID2-HA<sub>3</sub>*) ist keine Rpt5-Bande zu sehen. Die in allen Stämme sichtbare untere „Rpt5p“-Bande könnte eine Kreuzreaktion darstellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *Gid2-HA<sub>3</sub>* höchstwahrscheinlich mit FBPase und Rpt5p (bzw. dem 26S-Proteasom) zu den untersuchten Zeitpunkten interagiert. Eine Interaktion zwischen *Gid2-HA<sub>3</sub>* und GST-Vid24p konnte dagegen nicht gezeigt werden.

In analog durchgeführten Co-IP-Experimenten, bei welchen Ubc8-Ha<sub>3</sub> mit Ha-Antikörpern gefällt wurde, konnten keine mit diesem Protein interagierende Partner (FBPase, GST-Vid24p, Rpt5p) gefunden werden.



**Abb. 5-57:** Suche nach Interaktionspartnern von Gid2p. Dazu wurden Co-Immunopräzipitationen durchgeführt. Native Aufschlüsse der Stämme YFJ6 (*vid24Δ GID2-HA<sub>3</sub>*)/pYEX4T-1VID24, YFJ10 (*FBP1-PIS GID2-HA<sub>3</sub>*), YFJ11 (*FBP1-P1W GID2-HA<sub>3</sub>*) bzw. denaturierend aufgeschlossene Rohextrakte des Stammes YFJ6 (*vid24Δ GID2-HA<sub>3</sub>*)/pYEX4T-1VID24 wurden mit kovalent an Protein A Sepharose gebundenen Ha-Antikörper immunopräzipitiert (A). Native Aufschlüsse des Stammes W303-1B (Wildtyp) wurden mit Ha-Antikörper immunopräzipitiert (B).

## 6 Diskussion

Wachsen Zellen der Hefe *S. cerevisiae* auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen, so wird das gluconeogenetische Schlüsselenzym Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) exprimiert, um die zum Überleben nötige Glucose aus vorhandenen Kohlenstoffquellen zu synthetisieren. Diese Derepression, meist in Medien, die Ethanol oder Acetat als Kohlenstoffquellen enthalten, muß hierbei mindestens 5 h lang erfolgen, damit die Hauptmenge der FBPase synthetisiert werden kann. Wird den Zellen nach der Derepression Glucose wieder zugänglich gemacht, so setzt die Katabolitinaktivierung der FBPase ein. Diese besteht aus einer Abschaltung der Expression auf Transkriptionsebene, einer Reduzierung der Enzymaktivität durch Phosphorylierung am Serinrest 11 der FBPase und eines davon unabhängigen proteolytischen Abbaus. Bei all diesen Prozessen dient die Glucose als Signal. Der proteolytische FBPase-Abbau wird als Glucose-induzierte Katabolitdegradation bezeichnet. Der Zweck der Katabolitinaktivierung besteht für die Zelle darin, einen unnötigen ATP-Verbrauch durch gleichzeitige Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat und Dephosphorylierung von Fructose-1,6-bisphosphat zu Fructose-6-phosphat zu verhindern.

Über den Ort der Katabolitdegradation der FBPase gibt es nach wie vor in der Literatur unterschiedliche Ansichten. Während Arbeiten in unserem Labor gezeigt haben, dass die FBPase durch Polyubiquitinierung als proteasomales Substrat markiert und vom 26S-Proteasom erkannt und abgebaut wird (Schork et al., 1994a; Schork et al., 1994b; Schork et al., 1995; Schuele et al., 2000), wird in Arbeiten der Gruppe um H.L. Chiang eine Verpackung der FBPase in Vesikel u.a. mit Hilfe der Proteine Vid22p und Cpr1p, ein nachfolgender Transport dieser sogenannten Vid-Vesikel (*vacuolar import and degradation*) unter Beteiligung des Vid24p zur Vakuole und eine dort erfolgende Proteolyse favorisiert (Brown et al., 2001; Brown et al., 2000; Brown et al., 2002; Chiang and Schekman, 1991; Chiang et al., 1996; Chiang and Chiang, 1998).

Um zu überprüfen, ob eine unterschiedliche Derepressionszeit einen Grund für einen veränderten Ort des FBPase-Abbaus darstellen könnte, wurde der Abbau nach 48 stündiger Derepressionszeit untersucht. Dies entspricht der von der Gruppe um H.L. Chiang verwendeten Derepressionszeit, wohingegen in unserem Labor nur 5 – 16 h lang dereprimiert wird. Zudem wurde auch das von der Gruppe um Chiang verwendete Medium zur

Derepression benutzt, welches Acetat als Kohlenstoffquelle statt des bei uns verwendeten Ethanolis enthielt. Nach dieser Derepressionszeit (48 h) konnte nur eine Beteiligung des Proteasoms an der Katabolitdegradation gezeigt werden (Abb. 5-1), wobei insgesamt der Abbau auch im Wildtyp langsamer verlief als nach nur 5 – 16 stündiger Derepressionszeit. Während in einem Stamm, in welchem die vakuolären Proteasen *yscA* und *yscB* deletiert waren (YMTAB), kein Unterschied zum Abbau in einem Wildtyp-Stamm zu sehen war, konnte in einem Stamm mit Mutationen in proteasomalen Untereinheiten (WCG4-11/22) ein verlangsamter Abbau gegenüber dem Wildtypstamm beobachtet werden. Unter diesen Bedingungen ist Vid24p essentiell, wohingegen die Autophagozytoseproteine Aut4p und Aut5p für den Abbau nicht benötigt werden.

Da nach 48 stündiger Derepression noch kein vakuolärer FBPase-Abbau feststellbar war, wurde die Derepressionszeit auf 65 h erhöht. Auch unter diesen Bedingungen ist der FBPase-Abbau in einem Wildtypstamm gegenüber einem nur 5 – 16 h dereprimierten Wildtypstamm (Halbwertszeit 20 – 30 min) stark verlangsamt (Abb. 5-2). Insgesamt konnten 2 verschiedene Abbaumechanismen beobachtet werden. Zum einen war in Experimenten, in welchen der Wildtypstamm die FBPase sehr langsam abbaute, der FBPase-Abbau in den Stämmen YMTAB, in welchem die vakuolären Proteinase *yscA* und *yscB* deletiert sind, und WCG4-11/22, der Mutationen im Proteasom trägt, ebenfalls fast vollständig blockiert. In Experimenten, in welchen der Wildtypstamm eine relativ normale Halbwertszeit der FBPase aufwies, konnte eine deutliche Beteiligung des Proteasoms, aber nur eine geringe Beteiligung (etwas verzögerter Abbau im Stamm YMTAB, in welchem die vakuolären Proteinase *yscA* und *yscB* deletiert sind, im Vergleich zum Wildtypstamm) der Vakuole gezeigt werden. Wie sich in Überlebenstests zeigte, überlebte sowohl ein Wildtypstamm als auch ein proteasomaler Mutantenstamm eine lange Derepressionszeit deutlich besser als ein Stamm mit Defekten in der vakuolären Proteolyse (YMTAB) (Abb. 5-7). Dies kann daran liegen, dass die Vakuole bei zunehmender Hungerungszeit immer wichtiger für das Überleben der Zelle wird, da durch den unspezifischen Abbau cytosolischer Proteine oder ganzer Organellen in der Vakuole sowohl Energie als auch wichtige Biomoleküle gewonnen werden. Die schlechte Überlebensrate des Stammes YMTAB, in welchem die vakuolären Proteinase *yscA* und *yscB* deletiert sind, könnte ein Grund dafür sein, dass der FBPase-Abbau nach 65 stündiger Derepressionszeit im Vergleich zum Wildtypstamm verlangsamt ist. Tote Zellen können hierbei einen verlangsamten FBPase-Abbau vortäuschen. Und je größer der Anteil an toten Zellen ist, desto stärker scheint der FBPase-Abbau blockiert zu sein.

Stämme mit mutiertem aminoterminalen Prolin der FBPase zeigen nach 65 h Derepression einen fast vollständig blockierten FBPase-Abbau.

Weiterhin wurde nach 65 stündiger Derepression untersucht, ob und in welcher Menge FBPase zu unterschiedlichen Zeiten der Inaktivierung in dem Stamm YMTAB, in welchem die vakuolären Proteinasen *yscA* und *yscB* deletiert sind, in der Vakuole zu finden ist. Da in diesem Stamm ein vakuolärer Abbau nicht stattfinden kann, sollte nach Chiangs-Abbaumodell die FBPase-Menge in der Vakuole nach Glucosezugabe ansteigen. Leider konnte in Zellfraktionierungsexperimenten die Vakuole in der Mehrzahl der untersuchten Zellen nie intakt gehalten werden, wodurch eine quantitative Aussage über die Menge der FBPase in der Vakuole im Vergleich zum Zytosol nicht getroffen werden konnte (Abb. 5-6). Was man allerdings aussagen konnte, ist, dass vor, eine Stunde nach und zwei Stunden nach Glucosezugabe eine deutliche Menge an FBPase in der Vakuole vorlag. Da sich eine vergleichbare Menge aber schon während der Derepression in der Vakuole befand, wurde diese FBPase-Menge eher durch Autophagozytose in die Vakuole befördert und hat wahrscheinlich nichts mit der Katabolitdegradation zu tun.

Insgesamt konnte durch die Untersuchung des FBPase-Abbaus nach 48 bzw. 65 stündiger Derepressionszeit die Ergebnisse unseres Labors, die das Proteasom als FBPase-Abbauort belegen, bestätigt werden. Ein vermeintlicher vakuolärer Einfluss auf den Abbau wird wohl eher durch die geringere Überlebensrate des YMTAB-Stammes vorgetäuscht, da tote Zellen die FBPase nicht mehr abbauen können.

Die Verwendung von Acetat- statt Ethanol-haltigem Derepressionsmedium hat bei 16 stündiger Derepressionszeit keinen Einfluß auf den zellulären Ort des FBPase-Abbaus (Abb. 5-8 und 5-9). Mit beiden Medien kann eine Beteiligung des Proteasoms bestätigt und eine Beteiligung der Vakuole ausgeschlossen werden.

Um weitere Informationen über den proteasomalen Abbau der FBPase zu erhalten wurde versucht neue Komponenten dieses Abbauweges zu finden. Am proteasomalen Abbau der FBPase beteiligte Proteine werden *Gid*-Proteine genannt (*glucose induced degradation deficient*).

Den getesteten Chaperonen der Hsp70-Familie *Ssa1p*, *Ssa2p*, *Ssa3p*, *Ssa4p*, *Ssb1* und *Ssb2* (Abb. 5-10), die für das vegetative Wachstum der Zellen essentiell und an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt sind, sowie der AAA ATPase *Cdc48p* (Abb. 5-12), welche als Bestandteil des *Cdc48-Ufd1-Npl4*-Komplexes am Erkennen polyubiquitinerter Substrate und an der

Präsentation dieser Substrate gegenüber dem 26S-Proteasom beteiligt ist, den 3 getesteten Proteinen mit UbA-Domäne (Rad23, Dsk2 und Rpn10) (Abb. 5-15), welche über diese UbA-Domäne Ubiquitinketten binden können, und den getesteten Autophagozytoseproteinen Aut1p, Aut3p und Aut5p (Abb. 5-16) konnte dabei keine Beteiligung am Abbau der FB Pase nachgewiesen werden. Dagegen zeigten drei Ufd-Proteine, namentlich Ufd1p, Ufd3p/Doa1p und Ufd5p/Rpn4p, eine Beteiligung am FB Pase-Abbau (Abb. 5-13 und 5-14). In Pulse Chase-Analysen der Katabolitdegradation der FB Pase in Mutantenstämmen dieser Proteine konnte in allen drei Stämmen eine mindestens zweifache Stabilisierung der FB Pase beobachtet werden. Ein *ufd2-1*-Mutantenstamm dagegen zeigte keinen Defekt im FB Pase-Abbau. Auffällig bei diesen Mutantenstämmen war, dass diese Stämme ein relativ schlechtes Wachstum zeigten. So kann dieser Befund evtl. auch auf dieses schlechte Wachstum zurückzuführen sein. Im verwendeten Wildtyp (BWG1-7a) war die Halbwertszeit der FB Pase etwa doppelt so groß wie in einem W303-1B- oder WCG4a-Wildtyp. Dagegen würde eine Stabilisierung der FB Pase im *ufd3-1*-Mutantenstamm Sinn ergeben, da hier die Menge des für den FB Pase-Abbau benötigten Ubiquitins geringer als im Wildtyp ist. Gegen eine Beteiligung des Ufd1p am Abbau spricht, dass in einem *cdc48<sup>Y834E</sup>*-Mutantenstamm kein verzögerter FB Pase-Abbau feststellbar war. Da beide Proteine ihre Funktion im Cdc48-Ufd1-Npl4-Komplex haben, sollte eigentlich ein Defekt in beiden Mutantenstämmen oder in keinem der beiden zu erwarten sein.

Durch eine Pulse Chase-Analyse des FB Pase-Abbaus in einem *vid24*-Deletionsstamm wurde die wichtige Rolle des Vid24p im Abbau bestätigt (Abb. 5-43). Die Analyse zeigte einen im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlangsamten FB Pase-Abbau. Vid24p / Gid4p kann somit zu Recht zu den Gid-Proteinen gezählt werden.

Weiterhin wurde ebenfalls in Pulse Chase-Analysen der Katabolitdegradation der FB Pase in Deletionsmutanten der von Jochen Regelmann gefundenen neuen *Gid*-Gene *GID5* / *VID28*, *GID6* / *UBP14*, *GID7* und *GID8* der Status dieser Gene als *GID*-Gene bestätigt (Abb. 5-21, 5-22 und 5-23). In sämtlichen Deletionsmutanten ist die FB Pase unter Inaktivierungsbedingungen deutlich stabilisiert. Die geringste Stabilisierung der FB Pase zeigte der *ubp14*-Deletionsstamm mit ca. 2,5-fach. Somit sind inzwischen 8 Gid-Proteine bekannt.

Als 9. *GID*-Gen wurde *FYV10* indentifiziert. In einer Pulse Chase-Analyse des FB Pase-Abbaus in einem entsprechenden Deletionsstamm war der FB Pase-Abbau fast vollständig blockiert (Abb. 5-24). Fyv10p wurde deshalb auf einen Einfluss auf die Katabolitdegradation der FB Pase hin getestet, da bei einer systematischen Identifikation von Proteinkomplexen in

*S. cerevisiae* durch Massenspektroskopie (Ho et al., 2002) ein möglicher Komplex indentifiziert wurde, welcher 6 der 8 bisher bekannten Gid-Proteine enthalten könnte und u.a. auch Fyv10p. Bei der Identifikation des Komplexes diente zum einen Gid7p und zum anderen das bisher unbekannte Protein Ybl049wp als Angeln. Mit beiden Proteinen konnten eine Interaktion mit Gid1p, Gid2p, Gid5p, Gid8p und Fyv10p gefunden werden. Gid7p und Ybl049wp interagierten ebenfalls wechselseitig miteinander. Außerdem gab es noch weitere Proteine, die nur mit einem der beiden Proteine interagierten, u.a. Vid24p mit Gid7p. Da nun außer Fyv10p auch Ybl049wp jeweils 5 Gid-Proteine im möglichen Komplex nachgewiesen wurden, sollte auch der Einfluß dieser beiden Proteine auf den FBPase-Abbau untersucht werden. Während für das Fyv10p eine deutliche Beteiligung an der Katabolitdegradation der FBPase gefunden wurde und somit Gid9p genannt wurde, zeigte Ybl049wp keine Beteiligung am FBPase-Abbau (Abb. 5-24).

Da inzwischen auch 3 Vid-Proteine, also 3 von der Gruppe um H.L. Chiang gefundene, am vakuolären FBPase-Abbau beteiligte Proteine, als Gid-Proteine identifiziert wurden (Vid30p / Gid1p, Vid24p / Gid4p und Vid28p / Gid5p), sollte überprüft werden, ob noch weitere von der Gruppe um H.L. Chiang gefundene Proteine am proteasomale Abbau der FBPase beteiligt sind. Untersucht wurde ein Einfluss der Proteine Vid22p, Vid27p und Cpr1p auf die Katabolitdegradation der FBPase. Keines der drei Proteine zeigte eine Beteiligung an der Katabolitdegradation der FBPase. In allen 3 entsprechenden Deletionsstämmen zeigte eine Pulse Chase-Analyse der Katabolitdegradation der FBPase einen dem Wildtypstamm vergleichbaren FBPase-Abbau (Abb. 5-25 und 5-26). Somit zeigten alle 3 Proteine keinen Einfluss auf die Ubiquitin-Proteasom-vermittelte Katabolitdegradation der FBPase.

In Abb. 6-1 ist dargestellt, welche Komponenten des Abbaus der FBPase über das Ubiquitin-Proteasom-System sich mit den Komponenten des Abbaus der FBPase über die Vakuole überschneiden und welche Komponenten für einen der beiden FBPase-Abbauwege spezifisch sind.

Insgesamt gibt es 4 Komponenten (Gid1p, Gid4p, Gid5p und Ubc1p), die an beiden FBPase-Abbauwegen beteiligt sind. 8 Komponenten sind bisher spezifisch für den proteasomalen, 4 spezifisch für den vakuolären Abbau der FBPase. Die Proteine Vid27p und Vid28p sind bisher nur in der Saccharomyces Genome Database (SGD) zu finden, Veröffentlichen dazu von der Gruppe um H.L. Chiang gibt es zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht. Es gibt noch weiter Vid-Proteine in der SGD-Datenbank, welche allerdings bisher von uns noch nicht untersucht wurden. Insgesamt kann man sagen, dass es 2 Wege des FBPase-Abbaus geben

könnte, wenngleich von uns bisher die Existenz des Abbaues über die Vakuole nicht nachgewiesen werden konnte. Die Existenz sowohl sich überschneidender als auch singular für einen Abbaueg der FBPase zuständige Komponenten stützt die Vermutung, dass diese 2 verschiedenen FBPase-Abbauege auch wirklich existieren.

Gid1p / Vid30p	● ●	Gid9p / Fyv10p	○ ●
Gid2p / Ydr255cp	○ ●	Ubc1p	● ●
Gid3p / Ubc8	○ ●	Ubc4p	○ ●
Gid4p / Vid24p	● ●	Ubc5p	○ ●
Gid5p / Vid28p	● ●	Vid22p	● ○
Gid6p / Ubp14	○ ●	Vid27p	● ○
Gid7p / Ycl039wp	○ ●	Cpr1p	● ○
Gid8p / Ymr135cp	○ ●	Ssa2p	● ○

- beteiligt an Chiangs FBPase-Abbau über die Vakuole
- nicht beteiligt an Chiangs FBPase-Abbau über die Vakuole
- beteiligt am proteasomalen FBPase-Abbau
- nicht beteiligt am proteasomalen FBPase-Abbau

**Abb. 6-1:** Vergleich der gleichen und unterschiedlichen Komponenten des vakuolären und proteasomalen FBPase-Abbaus.

Um das E3-Enzym des FBPase-Abbaus zu finden, wurden durch Literatur- und Datenbanksuche mögliche E3-Enzyme mit HECT- oder RING-Finger-Domänen identifiziert. Sowohl HECT- als auch RING-Finger-Domänen sind Motive, die bei vielen E3s gefunden wurden. Deshalb bestand eine berechtigte Hoffnung, dass ein Protein mit einem dieser Motive eine Funktion als E3 haben könnte. In Deletionsmutantenstämmen oder Stämmen mit Mutantenallelen der gefundenen, möglichen E3-Enzyme wurde der FBPase-Abbau untersucht. Von den untersuchten 37 verschiedenen, möglichen E3-Enzymen zeigte nur das Hex3p eine deutliche Beteiligung an der Katabolitdegradation der FBPase (Abb. 5-17). Das F-box-Protein Grr1p, welches eine Komponente des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes darstellt, wurde ebenso auf seinen Einfluß auf den FBPase-Abbau hin überprüft. In einer entsprechenden Deletionsmutante war ein gegenüber einem Wildtypstamm etwas verlangsamter FBPase-Abbau zu beobachten (Abb. 5-17).

Da als einziges der möglichen E3-Enzyme das Hex3p einen deutlichen Einfluss auf den FBPase-Abbau zeigte, wurde dieser Befund durch eine Pulse Chase-Analyse des FBPase-

Abbaus in einer *hex3*-Deletionsmutante überprüft. In dieser Analyse war die Halbwertszeit der FBPase unter Inaktivierungsbedingungen ca. zweimal so groß wie in einem Wildtypstamm (Abb. 5-18). Da für das Hex3p mit Slx8p ein Interaktionspartner gefunden worden war, der auch eine RING-Finger-Domäne besitzt, wurde mit einer *slx8*-Deletionsmutante ebenfalls eine Pulse Chase-Analyse der Katabolitdegradation der FBPase durchgeführt. Diese erbrachte eine etwa dreifache Stabilisierung der FBPase (Abb. 5-19). Die hier verwendeten Deletionsmutanten waren jeweils homozygot diploid. Da beide Deletionsmutanten einen Defekt im FBPase-Abbau zeigten, wurde eine haploide Doppeldeletionsmutante erzeugt und einer Pulse Chase-Analyse des FBPase-Abbaus unterzogen. Ebenso analysiert wurde die Katabolitdegradation der FBPase in den haploiden Einfachdeletionsstämmen. Erstaunlicherweise wiesen sämtlichen haploiden Einfach- und Doppeldeletionsstämmen ein FBPase-Abbauverhalten wie ein Wildtypstamm auf (Abb. 5-20). Somit zeigten die Analysen der Katabolitdegradation der FBPase der haploiden Deletionsstämmen im Gegensatz zu den Analysen der diploiden Deletionsstämmen, dass Hex3p und Slx8p keinen Einfluß auf den FBPase-Abbau hatten. Diese unterschiedlichen Ergebnisse in den diploiden und haploiden Stämmen könnten evtl. darauf zurückzuführen sein, dass die haploiden Stämme frisch bei EUROSCARF (Frankfurt) bestellt worden waren und die diploiden Stämme dagegen schon lange Zeit im Kühlraum gelagert worden waren und inzwischen unbekannte Mutationen erfahren haben könnten.

Im Gegensatz zu Ergebnissen von Jaroslav Horak (Horak et al., 2002) konnte ich keine Beteiligung von Hxk2p an der Katabolitaktivierung der FBPase feststellen (Abb. 5-27). Getestet wurden zwei verschiedene homozygot diploide *hxk2*-Deletionsmutantenstämmen, von welchen der eine aus der EUROSCARF-Collection, die unser Labor als Gesamtheit aller nicht lethalen Hefedeletionsstämmen bezogen hatte (ca. 5000 verschiedene Gene), und der andere unabhängig davon einzeln von EUROSCARF bezogen worden war.

Das Protein Gid2p wurde einer genaueren Untersuchung unterzogen. Die cytosolische Lokalisation des Proteins (Schüle, Dissertation 2000) konnte durch eine indirekte Immunfluoreszenz des Gid2-Ha<sub>3</sub> bestätigt werden (Abb. 5-32). Das getaggte Protein, welches vollständig funktionell ist (Schüle, Dissertation 2000), ist in der Immunfluoreszenz als punktierte Struktur im Zytoplasma erkennbar. Das Gid2-Ha<sub>3</sub> wird bei Nährstoffmangel (z.B. Wachstum auf Ethanol-haltigem Medium oder Erreichen der stationären Wachstumsphase in Glucose-haltigem Medium) exprimiert und bleibt nach Glucosezugabe zumindest 4 h lang relativ stabil, ist aber bei Vorhandensein von Glucose in sich in der logarithmischen

Wachstumsphase befindlichen Zellen (nach ca. 16 h) nur in geringem Maße vorhanden (Abb. 5-28).

Ein *gid2*-Deletionsstamm zeigte keinen Autophagozytosephänotyp (Abb. 5-30). Sowohl beim Transport von Autophagosomen zur Vakuole als auch bei der Lyse autophagischer Vesikel in der Vakuole zeigt ein *gid2*-Deletionsstamm keinerlei Defekte. Aus diesem Grund ist Gid2p höchstwahrscheinlich nicht an der Autophagozytose beteiligt. Allerdings zeigt der *gid2*-Deletionsstamm einen verminderten Gesamtproteinturnover (Abb. 5-31). Der Gesamtproteinurnover liegt in etwa zwischen dem eines Wildtypstammes und einer Mutanten im vakuolären Abbau (YMTA, vakuoläre Proteinase *yscA* deletiert, ca. 20 – 25 % des Turnovers des Wildtypstammes). Bei der Mutante im vakuolären Abbau funktioniert nur noch der proteasomale Abbau und somit können die verbliebenen 20 – 25 % des Gesamtproteinturnovers eines Wildtypstammes, die dieser Stamm nur noch aufweist, der proteasomalen Proteolyse zugeschrieben werden. Die fehlenden 75 – 80 % sollten demnach der vakuolären Proteolyse zugeschrieben werden können. Die Größenordnung des Wertes des Gesamtproteinurnovers im *gid2*-Deletionsstamm von ca. 60 – 65 % könnte darauf hindeuten, dass in diesem Stamm die vakuoläre Proteolyse auf 50 % im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist, also 35 – 40 % des Gesamtproteinturnoverwertes eines Wildtypstammes fehlen. Alternativ kann auch sowohl die vakuoläre als auch proteasomale Proteolyse im *gid2*-Deletionsstamm einen Defekt aufweisen.

Untersuchungen, ob Gid2p in der Zelle in einem größeren Komplex oder als Homomultimer vorliegt, wurden mit Hilfe von FPLC und Glycerin-Gradienten durchgeführt. Mit beiden Methoden können Proteine nach ihrer Größe bzw. ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden. In beiden Experimenten kolokalisierte das eine molekulare von 51 kDa aufweisende Gid2-Ha<sub>3</sub> nicht mit Proteinen ähnlicher molekularer Masse wie FBPase (38 kDa) oder 3-Phosphoglyceratkinase (PGK, 44,7 kDa), sondern mit der als Dodecamer vorliegenden Aminopeptidase I (API, als Komplex ca. 600 kDa) (Abb. 5-33, 5-36, 5-37 und 5-38). Teilweise erscheint das Gid2-Ha<sub>3</sub> im Glyceringradienten in noch höheren Fraktionen als die API, sollte also demnach eine molekulare Masse von 600 kDa oder mehr aufweisen. Diese erhöhte molekulare Masse könnte dadurch erklärt werden, dass das Gid2-Ha<sub>3</sub> in einem größeren Komplex vorliegt, selber ein Multimer aus mehreren Gid2-Ha<sub>3</sub> analog dem API bildet oder durch eine Membran geschützt vorliegt und so ein höheres Molekulargewicht vorgetäuscht wird. Letztere Möglichkeit wurde durch die Verwendung von Triton X-100 (0,2 oder 1 %) beim Glyceringradienten ausgeschlossen. Durch das Triton X-100 werden Membranen zerstört und so sollte das Gid2-Ha<sub>3</sub> ohne mögliche Membranschutzhülle bei

seiner tatsächlichen Masse erscheinen. Allerdings kolokalisiert in diesem Experiment das Gid2-Ha<sub>3</sub> wiederum mit API und somit stammt die hohe Masse nicht von einem membran-geschützten Gid2-Ha<sub>3</sub>. Damit liegt Gid2-Ha<sub>3</sub> also entweder in einem größeren Komplex oder als Homomultimer vor. Dieser Komplex könnte z.B. der bei der systematischen Identifikation von Proteinkomplexen in *S. cerevisiae* durch Massenspektroskopie (Ho et al., 2002) gefundene mögliche Komplex sein, welcher 7 von 9-Gid-Proteinen enthalten könnte.

Ebenso einer näheren Betrachtung unterzogen wurde das Protein Vid24p / Gid4p. Vid24p wird erst nach Glucosegabe zu dereprimierten Zellen exprimiert, ist 10 min nach Glucosegabe detektierbar und erreicht ca. 20 – 60 min nach Glucosezugabe seine maximale Menge. 90 – 120 min nach Glucosegabe wurde das Protein wieder komplett abgebaut (Abb. 5-44). Somit ist es bisher das einzige Gid-Protein, welches nur während der Katabolitinaktivierung vorhanden ist. Es ist nur solange da, bis die FBPase abgebaut ist. Dies lässt sich daran erkennen, dass der Abbau des Vid24p mit etwa der gleichen Kinetik verläuft wie der FBPase-Abbau. Untersucht man nun den Abbau des Vid24p in verschiedenen *gid*-Deletionsmutanten, so stellt sich heraus, dass in sämtlichen Deletionsmutanten mit Ausnahme der *gid7*-Deletion das Vid24p nicht mehr oder deutlich verzögert abgebaut wird (Abb. 5-45 und 5-46). Dies könnte bedeuten, dass die Gid-Proteine außer Vid24p und Gid7p gewisse Funktionen beim FBPase-Abbau erfüllen und erst durch eine nachfolgende Funktion des Vid24p die FBPase abgebaut werden kann und dabei das Vid24p gleich mit abgebaut wird. Für Gid7p könnte das bedeuten, dass seine zentrale Funktion im FBPase-Abbau erst nach der Funktion des Vid24p erfolgt.

In weiteren Deletionsstämmen wurde der Vid24p-Abbau ebenfalls untersucht. Dabei konnte sowohl für Vid22p als auch Hxk2p keine Funktion im Vid24p-Abbau nachgewiesen werden (Abb. 5-46). Bei der Suche nach dem zellulären Ort des Vid24p-Abbaus konnte eine Beteiligung der Vakuole ausgeschlossen und eine wahrscheinliche Beteiligung des Proteasoms gezeigt werden (Abb. 5-47). Dieser Befund würde die These bestätigen, dass Vid24p evtl. zusammen mit der FBPase abgebaut wird.

Zur Untersuchung des Vid24p-Abbaus wurde ein polyklonaler Peptid-Antikörper gegen Vid24p durch eine Kaninchenimmunisierung gewonnen. Dieser konnte für die Detektierung von Vid24p in Western Blot-Analysen von durch alkalische Lyse aufgeschlossenen Proben gut verwendet werden. Für Immunpräzipitationen oder das Anfärben der Ergebnisse eines Glyceringradienten oder einer Membranassoziation war der Antikörper absolut ungeeignet. In diesen Experimenten konnte kein Vid24p-Signal detektiert werden. Auch für Pulse Chase-

Analysen des Vid24p-Abbaus war der Antikörper nicht brauchbar. Hier konnte ebenfalls kein Vid24p-Signal gesehen werden.

Vor der Immunisierung wurde versucht Ha-getaggte Versionen von Vid24p zu erzeugen. Eine C-terminale Fusion erwies sich als nicht funktionell bezüglich der Katabolitdegradation von FBPase (Abb. 5-41), eine N-terminale Fusion konnte mit einem integrativen Plasmid, welcher ein zweifach N-terminal Ha-getaggtes *VID24*-Gen enthielt, nicht erzeugt werden. Die nicht funktionelle C-terminale dreifache Ha-Fusion des Vid24p könnte ein Indiz dafür sein, dass der C-Terminus des Vid24p eine wichtige Funktion beim FBPase-Abbau erfüllt.

Auch der *vid24*-Deletionsstamm wurde auf einen Autophagozytosephänotyp hin untersucht. Ebenso wie der *gid2*-Deletionsstamm verhält sich der Stamm beim Transport von Autophagosomen zur Vakuole als auch bei der Lyse autophagischer Vesikel in der Vakuole wie ein Wildtypstamm (Abb. 5-49). Eine Beteiligung des Vid24p an der Autophagozytose kann wie beim Gid2p mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Als weiteres wurde untersucht, ob in einer *vid24*-Deletionsmutante eine ubiquitinierte FBPase nach Glucosezugabe detektiert werden kann. Hierzu wurde Ha-getaggtes Ubiquitin (Ha-Ub) mit Hilfe eines Plasmids überexprimiert und die erhaltenen Proben mit FBPase-Antikörper immunopräzipitiert und anschließend mit Ha-Antikörper auf das Vorhandensein von FBPase-(Ha-Ub)<sub>x</sub>-Konjugaten hin untersucht. Während vor Glucosezugabe (0-Probe) im *vid24*-Deletionsstamm noch keine FBPase-(Ha-Ub)<sub>x</sub>-Konjugate detektierbar waren, konnten 25 min nach Glucosezugabe viele Konjugate deutlich erkannt werden (Abb. 5-48). Im im Vergleich dazu ebenfalls durchgeführten Experiment mit einem Wildtyp-Stamm (W303-1B), konnten in der 0- und 25 min-Probe nur ganz schwache Konjugate-Banden detektiert werden. Diese fehlenden oder sehr schwachen Konjugate-Banden im Wildtyp könnten daher kommen, dass hier der FBPase-Abbau normal ablaufen kann und so die Menge an ubiquitiniertes FBPase sehr gering ist, wohingegen im *vid24*-Deletionsstamm der FBPase-Abbau blockiert ist und somit sich größere Mengen ubiquitiniertes FBPase ansammeln können. Zur Überprüfung, dass die detektierten Banden auch wirklich von FBPase-(Ha-Ub)<sub>x</sub>-Konjugaten stammen, wurde das Experiment sowohl im Wildtyp als auch im *vid24*-Deletionsstamm mit einem Plasmid durchgeführt, der Wildtyp-Ubiquitin (WT-Ub) statt Ha-Ub überexprimierte. In den Stämme mit überexprimiertem WT-Ub dürfen keine FBPase-(Ha-Ub)<sub>x</sub>-Konjugate detektiert werden können. Und wie erwartet konnten in sämtlichen Proben dieser Stämme mit exprimiertem Wildtyp-Ubiquitin keine FBPase-(Ha-Ub)<sub>x</sub>-Konjugate detektiert werden. Dies bestätigt, dass die detektierten FBPase-(Ha-Ub)<sub>x</sub>-Konjugate wirklich solche sind. Die Beobachtung von vielen FBPase-(Ha-Ub)<sub>x</sub>-Konjugaten im *vid24*-Deletionsstamm, in welchem Ha-Ub

überexprimiert worden war, deutet darauf hin, dass Vid24p seine Funktion erst nach der Ubiquitinierung der FBPase hat. Seine Funktion könnte darin bestehen, den Transport der ubiquitinierte FBPase zum Proteasom zu vermitteln.

Um obige Aussage weiter zu stützen, wurde getestet, ob das Vid24p mit dem Proteasom interagiert. In einem GST-Pulldown-Experiment konnten weder die 20S-Untereinheit Pup1p noch die 19S-Cap-Untereinheit Rpt5p an eine GST-Vid24p-Säule gebunden werden. Als einziges der untersuchten Proteine konnte Gid2-Ha<sub>3</sub> an das Säulenmaterial gebunden gefunden werden (Abb. 5-53 und 5-54). Allerdings wurde das Protein, wenn auch in geringerem Maße, auch an eine GST-Säule gebunden detektiert. Dies deutet eher auf eine unspezifische Bindung an das Säulenmaterial oder das GST hin. Dieses Ergebnis wurde auch auf umgekehrte Weise in einer Co-Immunopräzipitation überprüft. Dazu wurde Gid2-Ha<sub>3</sub> mit Ha-Antikörpern immunopräzipitiert und darauf untersucht, ob GST-Vid24p mit ausgefällt werden konnte. Dies war nicht der Fall. Somit scheint es keine Interaktion zwischen Gid2-Ha<sub>3</sub> und GST-Vid24p zu geben.

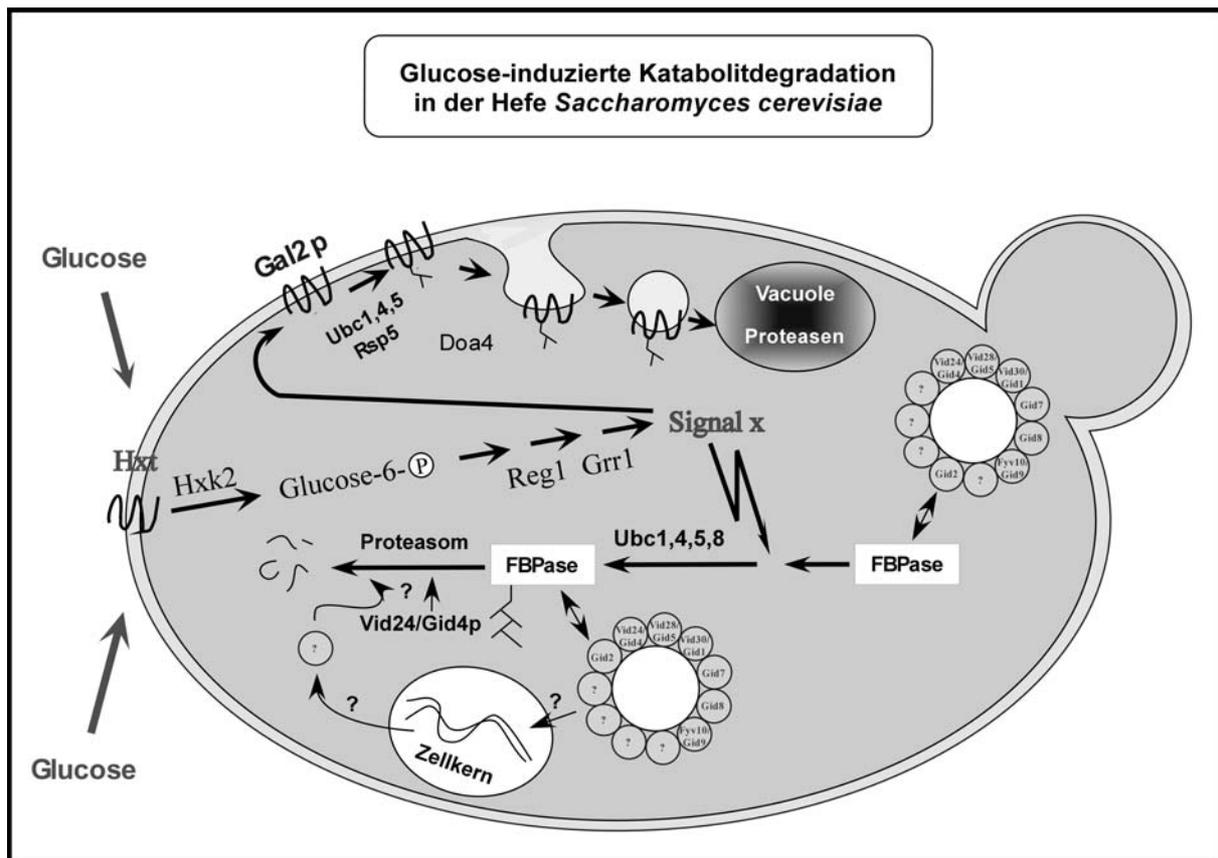
Eine Interaktion konnte dafür zwischen Gid2-Ha<sub>3</sub> und FBPase sowie Gid2-Ha<sub>3</sub> und Rpt5p gezeigt werden. In Co-Immunopräzipitationen wurden Rohextrakte von Gid2-Ha<sub>3</sub>-exprimierenden Stämmen mit Ha-Antikörpern immunopräzipitiert und auf mit Gid2-Ha<sub>3</sub> mitgefällte (interagierende) Proteine hin untersucht (Abb. 5-57). FBPase und Rpt5p interagierten jeweils vor und 25 min nach Glucosezugabe zu dereprimierten Zellen mit Gid2-Ha<sub>3</sub>. Dies galt allerdings nur für nativ aufgeschlossene Zellen. In denaturierend aufgeschlossenen Zellen konnte diese Interaktionen nicht beobachtet werden. So scheint für die Interaktion zwischen den Proteinen die korrekte Faltung essentiell zu sein. Weiterhin wurde mit einem Wildtyp-Stamm gezeigt, dass die Interaktion zwischen Gid2-Ha<sub>3</sub> und FBPase nicht ein unspezifisches Binden der FBPase an den Ha-Antikörper ist, da in diesem Stamm nach Immunpräzipitation mit Ha-Antikörper kein FBPase-Signal detektierbar sein darf, da ohne das Vorhandensein von Gid2-Ha<sub>3</sub> der Ha-Antikörper auch nichts fällen können sollte. Und wie erwartet zeigte der Wildtypstamm nach Immunpräzipitation mit Ha-Antikörper kein FBPase-Signal. Weiterhin wurde getestet, ob eine am Aminoterminus mutierte FBPase auch mit Gid2-Ha<sub>3</sub> interagieren kann. Von den Mutantenstämmen, in denen das aminoterminal Prolin der FBPase mutiert ist, ist bekannt, dass der Abbau und die Ubiquitinierung der FBPase in ihnen nicht mehr stattfinden kann. Eine genaue Funktion des aminoterminalen Prolins ist bisher noch nicht bekannt. Deshalb sollte überprüft werden, ob das aminoterminal Prolin für die Interaktion zwischen Gid2p und FBPase verantwortlich ist.

Die nachfolgenden Experimente zeigten, dass mit den FBPasen, in welchen das aminoterminal Prolin entweder gegen Serin oder Tryptophan ausgetauscht war, keine Interaktion mit Gid2-Ha<sub>3</sub> mehr möglich war. Das aminoterminal Prolin der FBPase scheint also eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit Gid2-Ha<sub>3</sub> zu spielen. Die Interaktion zwischen Gid2-Ha<sub>3</sub> und Rpt5p wurde dagegen in einem aminoterminal mutierten FBPase-Stamm nicht beeinflusst. Diese gefundene Interaktion bedeutet nicht zwingend, dass Gid2-Ha<sub>3</sub> direkt mit Rpt5p interagiert, sondern dass Gid2-Ha<sub>3</sub> mit dem 26S-Proteasom an sich interagieren könnte.

So ergibt sich nun das Bild, dass Gid2p und damit wohl auch der mögliche Komplex, in welchem sich Gid2p befindet, schon vor Glucosezugabe mit der FBPase interagiert und diese Interaktion auch nach Glucosezugabe und damit während der Katabolitdegradation bestehen bleibt. Höchstwahrscheinlich wird durch das Glucosesignal die Funktion des Gid2p enthaltenen Komplexes gesteuert und dieser könnte nun eine Funktion erfüllen, die letztendlich zur Ubiquitinierung der FBPase führt. Nach der Ubiquitinierung der FBPase könnte das Vid24p den Transport dieser zum Proteasom vermitteln. Dabei kann auch der Gid2p-enthaltende Komplex wieder eine Rolle spielen, gerade durch die Interaktion von Gid2p mit dem 26S-Proteasom. Vid24p könnte der auslösende Faktor dafür sein, dass der Komplex die gebundene FBPase zum Proteasom befördert und diese dann dort als Substrat erkannt und abgebaut werden kann. Mit diesem Abbau könnte auch der Abbau des Vid24p erfolgen.

Eine weitere mögliche Funktion des Gid2p-enthaltenden Komplex könnte auch die Funktion als Transkriptionsfaktor sein. Hierzu könnten Teile des Komplexes oder der ganze Komplex in den Zellkern wandern und dort die Expression eines noch unbekanntes Faktors steuern, der nachfolgend eine wichtige Rolle bei der Katabolitdegradation spielen könnte. Diese Möglichkeit ergab sich dadurch, dass ein im möglichen Komplex mit Gid2p vorliegendes Protein sich teilweise unter Katabolitinaktivierungsbedingungen im Zellkern befand (unveröffentlichte Daten von Jochen Regelman).

Welche Proteine in dem Gid2p-enthaltenden Komplex enthalten sind, kann bisher nur spekuliert werden. Es kann sein, dass die über die systematische Identifikation von Proteinkomplexen in *S. cerevisiae* durch Massenspektroskopie (Ho et al., 2002) mit u.a. Gid2p gefundenen interagierenden Proteine Gid1p, Gid4p, Gid5p, Gid7p, Gid8p und Gid9p in diesem Komplex gemeinsam vorliegen. Es ist natürlich ebenso möglich, dass weitere Komponenten oder Komponenten nur zeitweise im Gid2p-enthaltenden Komplex vorliegen.



**Abb. 6-2:** Schema der Glucose-induzierten Katabolitdegradation der FBPase und Gal2p in der Hefe *S. cerevisiae*.

In Abb. 6-2 sind die bisherigen Erkenntnisse und Vermutungen über die Katabolitdegradation zusammengestellt. In Tabelle 10-1 ist eine Übersicht über die bisher entdeckten Gid-Proteine dargestellt.

Bemerkenswert an den in den Gid-Proteinen vorkommenden Motiven ist die CTLH-Domäne, welcher bisher noch keine Funktion zugeordnet werden konnte (Tabelle 10-1). Dieses Motif gibt es in *S. cerevisiae* nur in 4 Proteinen und alle diese sind Gid-Proteine. Somit könnte diese Domäne eine für Gid-Proteine typische Domäne sein. Ein weiteres interessantes Motiv weist Gid7p mit 5 WD-40-Domänen auf. Diese Domäne dient in den meisten Fällen für Protein-Protein-Wechselwirkungen. Gid7p könnte in dem Gid2p-enthaltenden Komplex als „Andockstation“ für andere Proteine des Komplexes dienen.

## 7 Zusammenfassung

Die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) ist ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese. In Hefezellen, die auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen wachsen, wird die FBPase exprimiert und die Gluconeogenese liefert Glucose. Nach externer Glucosegabe zu den Hefezellen muss die Gluconeogenese abgeschaltet werden und das Protein wird über das Ubiquitin-Proteasom-System schnell abgebaut.

Gene, deren Deletionsmutantenstämme einen Defekt im glucoseinduzierten Abbau der FBPase aufweisen, werden *GID*- (*glucose induced degradation deficient*) Gene genannt. Mit den Genen *GID4 / VID24* und *GID9 / FYV10* wurden 2 neue Komponenten des proteasomalen FBPase-Abbauweges identifiziert. In Pulse Chase-Analysen des Glucose-induzierten FBPase-Abbaus wiesen Deletionsmutantenstämme der beiden Gene sowie der von Jochen Regelman gefundenen *GID*-Gene *GID5 / VID28*, *GID6 / UBP14*, *GID7* und *GID8* deutliche Defekte in der Degradation der FBPase auf. Mit diesem Befund konnte alle 6 Gene als *GID*-Gene bestätigt werden. Zwei dieser Gene (*GID4/VID24* und *GID5/Vid28*) wurden zuvor auch von der Gruppe um H.L. Chiang gefunden. Im Unterschied zu unseren Ergebnissen findet Chiang die Vakuole als Abbauort der FBPase. Dieser Befund konnte allerdings trotz des Tests des FBPase-Abbaus in Zellen, die längeren Derepressionszeiten (48 oder 65 h statt 5 – 16 h) ausgesetzt waren, nicht bestätigt werden. Dennoch ist es möglich, daß es zwei Abbauwege der FBPase gibt. Da nun mit Gid4p und Gid5p zwei Komponenten gefunden wurden, die an beiden Wegen beteiligt sind, sollten auch andere Komponenten untersucht werden, die von der Gruppe Chiang als am Abbau der FBPase über die Vakuole beteiligt gefunden wurden. Die drei untersuchten Gene *VID22*, *VID27* und *CPR1* zeigten allerdings keine Beteiligung am proteasomalen Abbau des Proteins. Dies zeigt, daß diese möglichen zwei Abbauwege der FBPase gemeinsame und abweichende Komponenten besitzen. Da über Autophagozytose Proteine unspezifisch in die Vakuole gelangen können, wurde als mögliche Erklärung für Chiangs Befund des vakuolären FBPase-Abbaus auch Autophagozytosemutanten auf eine Beteiligung am Abbau des Enzyms untersucht. Dadurch, dass die Gene *AUT1*, *AUT3* und *AUT5* keinen Einfluß auf den FBPase-Abbau zeigten, konnte bewiesen werden, daß die Autophagozytose nicht am Abbau des Proteins beteiligt ist

Das Protein Gid4p/Vid24p wurde näher untersucht. Hefezellen, die auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen wuchsen, exprimierten erst nach Glucosezugabe Vid24p. Die Hauptmenge war nach ca. 20 – 60 min vorhanden. Innerhalb dieses Zeitfensters war es für

den Abbau der FBPase absolut notwendig. Danach wurde das Protein innerhalb von ca. 90 – 120 min nach Glucosezugabe wieder abgebaut. In Mutantenzellen, in denen die Gene *GID1*, *GID2*, *GID3*, *GID5*, *GID6*, *GID8* oder *GID9* deletiert sind, wurde es verlangsamt abgebaut, was den Schluß zulässt, dass diese Gene auch für die Degradation von Vid24p nötig sind. Dagegen wird *Gid7p* nicht für den Vid24p-Abbau benötigt. Vid24p ist wahrscheinlich ein proteasomales Substrat. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Vid24p seine Funktion im FBPase-Abbau erst nach der Ubiquitinierung der FBPase ausübt. Das Protein könnte den Transport der ubiquitinierten FBPase zum 26S-Proteasom vermitteln. Eine mögliche Interaktion des Vid24p mit dem Proteasom konnte in GST-Pulldown-Experimenten ausgeschlossen werden.

Ein weiteres am FBPase-Abbau beteiligtes Protein ist *Gid2p*. In einem Glyceringradienten trat das Protein unter Katabolitinaktivierungsbedingungen bei einer molekularen Masse von ca. 600 kDa auf. Da *Gid2p* monomer nur eine molekulare Masse von 49 kDa besitzt, muss *Gid2p* in einem größeren Komplex in der Hefezelle vorliegen. In diesem Komplex könnte das Protein mehrfach und / oder mit anderen Proteinen zusammen vorhanden sein. Nachfolgend durchgeführte Interaktionsstudien zeigten eine Interaktion zwischen *Gid2p* und der FBPase sowie *Gid2p* und dem 26S-Proteasom. Dagegen wurde keine Interaktion zwischen *Gid2p* und Vid24p gefunden. Für die Interaktion von *Gid2p* und FBPase ist das aminoterminal Prolin essentiell. Wurde eine am Aminoterminus mutierte FBPase verwendet, so konnte keine Interaktion mehr beobachtet werden.

## 8 Abstract

Metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* cells from a non-fermentable carbon source to glucose induces selective, rapid breakdown of the gluconeogenic key enzyme fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), a process called catabolite degradation.

The site of catabolite degradation has been controversial till now. Two FBPase degradation pathways have been described, one dependent on the cytosolic ubiquitin-proteasome machinery, the other dependent on vacuolar proteolysis.

Genes, whose deletion mutants show an defect in the catabolite degradation of FBPase, are called *GID*- (glucose induced degradation deficient) genes. Two novel *GID*-genes, *GID4 / VID24* and *GID9 / FYV10*, of the proteasome dependent degradation pathway were identified. The status as *GID*-genes of the genes *GID5 / VID28*, *GID6 / UBP14*, *GID7* and *GID8* found bei Jochen Regelman were confirmed through pulse chase analysis of the FBPase-degradation in the appropriate deletion strains.

Two of the above genes (*GID4 / VID24* and *GID5 / VID28*) were also found by the group of H.L. Chiang. Both have a function in the vacuolar degradation pathway of FBPase. Because of this finding, that those genes are necessary for both FBPase-degradation pathways, more genes found by the group of H.L. Chiang were checked for involvement in the proteasome dependent degradation pathway. All 3 checked genes (*VID22*, *VID27* and *CPRI*) showed no involvement in the proteasomal FBPase-degradation. Looking at the above findings you can conclude, that there are 2 possible pathways for FBPase-degradation, which share some components.

Yeast cells, which were grown on non-fermentable carbon sources, express Vid24p after addition of glucose. The main amount is present 20 – 60 min after addition of glucose. 90 – 120 min after addition of glucose Vid24p is completely degraded. The Vid24p-degradation is Gid1p, Gid2p, Gid3p, Gid5p, Gid6p, Gid8p and Gid9p dependent. Vid24p is most likely a proteasomal substrate and acts in the FBPase-degradation after the ubiquitination of FBPase. Because of this you could predict, that Vid24p acts in the targeting of the ubiquitinated FBPase to the proteasome. A possible interaction between Vid24p and the proteasome could be ruled out.

Gid2p is a member of a protein complex with a molecular mass of 600 kDa or more. This was shown in a glycerol gradient. In this experiment the Gid2p was detected with a molecular mass of 600 kDa or more (monomeric Gid2p has 49 kDa).

---

In interaction studies an interaction between Gid2p and FBPase was found, for which the aminoterminal prolin of FBPase is essential. Another interaction was found between Gid2p and the proteasome.

## 9 Literaturverzeichnis

- Alberts, B. (2002) *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York, London.
- Antebi, A. and Fink, G.R. (1992) The yeast Ca(2+)-ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution. *Mol Biol Cell*, **3**, 633-654.
- Baba, M., Osumi, M., Scott, S.V., Klionsky, D.J. and Ohsumi, Y. (1997) Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J Cell Biol*, **139**, 1687-1695.
- Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemuller, E. (1998) The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, **92**, 367-380.
- Baxter, B.K. and Craig, E.A. (1998) Suppression of an Hsp70 mutant phenotype in *Saccharomyces cerevisiae* through loss of function of the chromatin component Sin1p/Spt2p. *J Bacteriol*, **180**, 6484-6492.
- Bays, N.W. and Hampton, R.Y. (2002) Cdc48-Ufd1-Npl4: stuck in the middle with Ub. *Curr Biol*, **12**, R366-371.
- Becker, J., Walter, W., Yan, W. and Craig, E.A. (1996) Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation in vivo. *Mol Cell Biol*, **16**, 4378-4386.
- Bignell, G.R., Warren, W., Seal, S., Takahashi, M., Rapley, E., Barfoot, R., Green, H., Brown, C., Biggs, P.J., Lakhani, S.R., Jones, C., Hansen, J., Blair, E., Hofmann, B., Siebert, R., Turner, G., Evans, D.G., Schrandt-Stumpel, C., Beemer, F.A., van Den Ouweland, A., Halley, D., Delpuch, B., Cleveland, M.G., Leigh, I., Leisti, J. and Rasmussen, S. (2000) Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet*, **25**, 160-165.
- Brown, C.R., Cui, D.Y., Hung, G.G. and Chiang, H.L. (2001) Cyclophilin A mediates Vid22p function in the import of fructose-1,6- biphosphatase into Vid vesicles. *J Biol Chem*, **276**, 48017-48026.
- Brown, C.R., McCann, J.A. and Chiang, H.L. (2000) The heat shock protein Ssa2p is required for import of fructose-1, 6-bisphosphatase into Vid vesicles. *J Cell Biol*, **150**, 65-76.
- Brown, C.R., McCann, J.A., Hung, G.G., Elco, C.P. and Chiang, H.L. (2002) Vid22p, a novel plasma membrane protein, is required for the fructose- 1,6-bisphosphatase degradation pathway. *J Cell Sci*, **115**, 655-666.
- 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, P., Johnson, P., Sommer, T., Jentsch, S. and Hochstrasser, M. (1993) Multiple ubiquitin-conjugating enzymes participate in the in vivo degradation of the yeast MAT alpha 2 repressor. *Cell*, **74**, 357-369.
- Chiang, H.L. and Dice, J.F. (1988) Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J Biol Chem*, **263**, 6797-6805.
- Chiang, H.L. and Schekman, R. (1991) Regulated import and degradation of a cytosolic protein in the yeast vacuole. *Nature*, **350**, 313-318.
- Chiang, H.L., Schekman, R. and Hamamoto, S. (1996) Selective Uptake of Cytosolic, Peroxisomal, and Plasma Membrane Proteins into the Yeast Lysosome for Degradation. *J.Biol.Chem.*, **17**, 9934-9941.

- 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.
- Chirico, W.J., Waters, M.G. and Blobel, G. (1988) 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, **332**, 805-810.
- Coux, O., Tanaka, K. and Goldberg, A.L. (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 801-847.
- Deak, P.M. and Wolf, D.H. (2001) Membrane topology and function of Der3/Hrd1p as a ubiquitin-protein ligase (E3) involved in endoplasmic reticulum degradation. *J Biol Chem*, **276**, 10663-10669.
- DeMartino, G.N., Moomaw, C.R., Zagnitko, O.P., Proske, R.J., Chu-Ping, M., Afendis, S.J., Swaffield, J.C. and Slaughter, C.A. (1994) PA700, an ATP-dependent activator of the 20 S proteasome, is an ATPase containing multiple members of a nucleotide-binding protein family. *J Biol Chem*, **269**, 20878-20884.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C. and Chen, Z.J. (2000) Activation of the I $\kappa$ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*, **103**, 351-361.
- Deshaies, R.J. (1999) SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 435-467.
- Deshaies, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A. and Schekman, R. (1988) A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature*, **332**, 800-805.
- Dice, J.F. (1990) Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci*, **15**, 305-309.
- Dice, J.F. (1992) Selective degradation of cytosolic proteins by lysosomes. *Ann N Y Acad Sci*, **674**, 58-64.
- Egner, R., Mahe, Y., Pandjaitan, R. and Kuchler, K. (1995) Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane-localized Pdr5 ATP-binding cassette multidrug transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 5879-5887.
- 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.
- Epple, U.D., Suriapranata, I., Eskelinen, E.L. and Thumm, M. (2001) Aut5/Cvt17p, a Putative Lipase Essential for Disintegration of Autophagic Bodies inside the Vacuole. *J Bacteriol*, **183**, 5942-5955.
- Freemont, P.S. (1993) The RING finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger. *Ann N Y Acad Sci*, **684**, 174-192.
- Funayama, S., Gancedo, J.M. and Gancedo, C. (1980) Turnover of yeast fructose-bisphosphatase in different metabolic conditions. *Eur J Biochem*, **109**, 61-66.
- Furukawa, M., Zhang, Y., McCarville, J., Ohta, T. and Xiong, Y. (2000) The CUL1 C-terminal sequence and ROC1 are required for efficient nuclear accumulation, NEDD8 modification, and ubiquitin ligase activity of CUL1. *Mol Cell Biol*, **20**, 8185-8197.
- Gancedo, C. (1971) Inactivation of fructose-1,6-diphosphatase by glucose in yeast. *J Bacteriol*, **107**, 401-405.
- Gerards, W.L., de Jong, W.W., Boelens, W. and Bloemendal, H. (1998) Structure and assembly of the 20S proteasome. *Cell Mol Life Sci*, **54**, 253-262.
- Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B. (1998) NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, **16**, 225-260.

- 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.
- Gmachl, M., Gieffers, C., Podtelejnikov, A.V., Mann, M. and Peters, J.M. (2000) The RING-H2 finger protein APC11 and the E2 enzyme UBC4 are sufficient to ubiquitinate substrates of the anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 8973-8978.
- Goffeau, A. et al. (1997) The yeast genome directory. *Nature*, **387**, 5.
- Groll, M., Ditzel, L., Lowe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D. and Huber, R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature*, **386**, 463-471.
- Groll, M., Heinemeyer, W., Jager, 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 U S A*, **96**, 10976-10983.
- 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.
- Guthrie, C. and Fink, G.R. (eds.). (1991) *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*. Academic Press, San Diego.
- Haarasilta, S. and Oura, E. (1975a) Effect of aeration on the activity of gluconeogenic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* growing under glucose limitation. *Arch Microbiol*, **106**, 271-273.
- Haarasilta, S. and Oura, E. (1975b) On the activity and regulation of anaplerotic and gluconeogenic enzymes during the growth process of baker's yeast. The biphasic growth. *Eur J Biochem*, **52**, 1-7.
- Haemmerle, M., Bauer, J., Rose, M., Szallies, A., Thumm, M., Dusterhus, S., Mecke, D., Entian, K.D. and Wolf, D.H. (1998) Proteins of newly isolated mutants and the amino-terminal proline are essential for ubiquitin-proteasome-catalyzed catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 25000-25005.
- Hagele, E., Neeff, J. and Mecke, D. (1978) The malate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, characterisation and studies on their regulation. *Eur J Biochem*, **83**, 67-76.
- Hammerle, M., Bauer, J., Rose, M., Szallies, A., Thumm, M., Dusterhus, S., Mecke, D., Entian, K.D. and Wolf, D.H. (1998) Proteins of newly isolated mutants and the amino-terminal proline are essential for ubiquitin-proteasome-catalyzed catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 25000-25005.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Harding, T.M., Morano, K.A., Scott, S.V. and Klionsky, D.J. (1995) Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J. Cell Biol.*, **131**, 591-602.
- 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., Simeon, A., Hirsch, H.H., Schiffer, H.H., Teichert, U. and Wolf, D.H. (1991) Lysosomal and non-lysosomal proteolysis in the eukaryotic cell: studies on yeast. *Biochem Soc Trans*, **19**, 724-725.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, **67**, 425-479.
- Hicke, L. (1999) Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol*, **9**, 107-112.
- Hiller, M.M., Finger, A., Schweiger, M. and Wolf, D.H. (1996) ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science*, **273**, 1725-1728.
- Hilt, W., Enenkel, C., Gruhler, A., Singer, T. and Wolf, D.H. (1993) The PRE4 gene codes for a subunit of the yeast proteasome necessary for peptidylglutamyl-peptide-hydrolyzing activity. Mutations link the proteasome to stress- and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Biol Chem*, **268**, 3479-3486.
- Hilt, W. and Wolf, D.H. (1995) Proteasomes of the yeast *S. cerevisiae*: genes, structure and functions. *Mol. Biol. Rep.*, **21**, 3-10.
- Hilt, W. and Wolf, D.H. (1996) Proteasomes: destruction as a programme. *Trend. Biochem. Sci.*, **21**, 96-101.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Millar, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K., Yang, L., Wolting, C., Donaldson, I., Schandorff, S., Shewnarane, J., Vo, M., Taggart, J., Goudreault, M., Muskat, B., Alfarano, C., Dewar, D., Lin, Z., Michalickova, K., Willems, A.R., Sassi, H., Nielsen, P.A., Rasmussen, K.J., Andersen, J.R., Johansen, L.E., Hansen, L.H., Jaspersen, H., Podtelejnikov, A., Nielsen, E., Crawford, J., Poulsen, V., Sorensen, B.D., Matthiesen, J., Hendrickson, R.C., Gleeson, F., Pawson, T., Moran, M.F., Durocher, D., Mann, M., Hogue, C.W., Figeys, D. and Tyers, M. (2002) Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, **415**, 180-183.
- Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*, **30**, 405-439.
- Hochstrasser, M. (2000) Evolution and function of ubiquitin-like protein-conjugation systems. *Nat Cell Biol*, **2**, E153-157.
- Hochstrasser, M., Ellison, M.J., Chau, V. and Varshavsky, A. (1991) The short-lived MAT alpha 2 transcriptional regulator is ubiquitinated in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 4606-4610.
- Hoffman, L. and Rechsteiner, M. (1994) Activation of the multicatalytic protease. The 11 S regulator and 20 S ATPase complexes contain distinct 30-kilodalton subunits. *J Biol Chem*, **269**, 16890-16895.
- Hofmann, R.M. and Pickart, C.M. (1999) Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell*, **96**, 645-653.
- 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.
- Horak, J., Regelman, J. and Wolf, D.H. (2002) Two distinct proteolytic systems responsible for glucose-induced degradation of fructose-1,6-bisphosphatase and the Gal2p transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* share the same protein components of the glucose signaling pathway. *J Biol Chem*, **277**, 8248-8254.
- Horak, J. and Wolf, D.H. (1997) Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endocytosis, and degradation in the vacuole. *J Bacteriol*, **179**, 1541-1549.

- Horak, J. and Wolf, D.H. (2001) Glucose-induced monoubiquitination of the *Saccharomyces cerevisiae* galactose transporter is sufficient to signal its internalization. *J Bacteriol*, **183**, 3083-3088.
- 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.
- Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K. and Reimann, J.D. (2000) The lore of the RINGS: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol*, **10**, 429-439.
- James, P., Halladay, J. and Craig, E.A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-1436.
- Jarosch, E., Taxis, C., Volkwein, C., Bordallo, J., Finley, D., Wolf, D.H. and Sommer, T. (2002) Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol*, **4**, 134-139.
- Jentsch, S. and Pyrowolakis, G. (2000) Ubiquitin and its kin: how close are the family ties? *Trends Cell Biol*, **10**, 335-342.
- Jentsch, S., Seufert, W., Sommer, T. and Reins, H.A. (1990) Ubiquitin-conjugating enzymes: novel regulators of eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci*, **15**, 195-198.
- Joazeiro, C.A. and Hunter, T. (2000) Biochemistry. Ubiquitination--more than two to tango. *Science*, **289**, 2061-2062.
- Joazeiro, C.A. and Weissman, A.M. (2000) RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell*, **102**, 549-552.
- Joazeiro, C.A., Wing, S.S., Huang, H., Levenson, J.D., Hunter, T. and Liu, Y.C. (1999) The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science*, **286**, 309-312.
- Johnson, E.S., Ma, P.C., Ota, I.M. and Varshavsky, A. (1995) A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal. *J Biol Chem*, **270**, 17442-17456.
- Jones, E.W. (1984) The synthesis and function of proteases in *Saccharomyces*: genetic approaches. *Annu. Rev. Genet.*, **18**, 233-270.
- Kaelin, W.G., Jr. and Maher, E.R. (1998) The VHL tumour-suppressor gene paradigm. *Trends Genet*, **14**, 423-426.
- Kaiser, P., Flick, K., Wittenberg, C. and Reed, S.I. (2000) Regulation of transcription by ubiquitination without proteolysis: Cdc34/SCF(Met30)-mediated inactivation of the transcription factor Met4. *Cell*, **102**, 303-314.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M. and Ohsumi, Y. (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*, **150**, 1507-1513.
- Kim, J., Scott, S.V., Oda, M.N. and Klionsky, D.J. (1997) Transport of a large oligomeric protein by the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol*, **137**, 609-618.
- Kishino, T., Lalonde, M. and Wagstaff, J. (1997) UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet*, **15**, 70-73.
- Klionsky, D.J., Cueva, R. and Yaver, D.S. (1992) Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J. Cell Biol.*, **119**, 287-299.
- Klionsky, D.J. and Emr, S.D. (1990) A new class of lysosomal/vacuolar protein sorting signals. *J Biol Chem*, **265**, 5349-5352.
- Klionsky, D.J., Herman, P.K. and Emr, S.D. (1990) The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.*, **54**, 266-292.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U. and Jentsch, S. (1999) A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*, **96**, 635-644.

- Koepp, D.M., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (1999) How the cyclin became a cyclin: regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*, **97**, 431-434.
- 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.
- Lam, Y.A., Pickart, C.M., Alban, A., Landon, M., Jamieson, C., Ramage, R., Mayer, R.J. and Layfield, R. (2000) Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9902-9906.
- Lam, Y.A., Xu, W., DeMartino, G.N. and Cohen, R.E. (1997) Editing of ubiquitin conjugates by an isopeptidase in the 26S proteasome. *Nature*, **385**, 737-740.
- Lammer, D., Mathias, N., Laplaza, J.M., Jiang, W., Liu, Y., Callis, J., Goebel, M. and Estelle, M. (1998) Modification of yeast Cdc53p by the ubiquitin-related protein rub1p affects function of the SCFCdc4 complex. *Genes Dev*, **12**, 914-926.
- Lämmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of *Bacteriophage T4*. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lang, T., Schaeffeler, E., Bernreuther, D., Bredschneider, M., Wolf, D.H. and Thumm, M. (1998) Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *Embo J*, **17**, 3597-3607.
- Levy, E.J., McCarty, J., Bukau, B. and Chirico, W.J. (1995) Conserved ATPase and luciferase refolding activities between bacteria and yeast Hsp70 chaperones and modulators. *FEBS Lett*, **368**, 435-440.
- Loda, M., Cukor, B., Tam, S.W., Lavin, P., Fiorentino, M., Draetta, G.F., Jessup, J.M. and Pagano, M. (1997) Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med*, **3**, 231-234.
- Lopez-Boado, Y.S., Herrero, P., Gascon, S. and Moreno, F. (1987) Catabolite inactivation of isocitrate lyase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*, **147**, 231-234.
- 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 U S A*, **96**, 11364-11369.
- Lowe, J., Stock, D., Jap, B., Zwickl, P., Baumeister, W. and Huber, R. (1995) Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*, **268**, 533-539.
- Martzen, M.R., McCraith, S.M., Spinelli, S.L., Torres, F.M., Fields, S., Grayhack, E.J. and Phizicky, E.M. (1999) A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. *Science*, **286**, 1153-1155.
- Matsuura, T., Sutcliffe, J.S., Fang, P., Galjaard, R.J., Jiang, Y.H., Benton, C.S., Rommens, J.M. and Beaudet, A.L. (1997) De novo truncating mutations in E6-AP ubiquitin-protein ligase gene (UBE3A) in Angelman syndrome. *Nat Genet*, **15**, 74-77.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. and Ratcliffe, P.J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, **399**, 271-275.
- Mazon, M.J. (1985) Regulation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase by phosphorylation-dephosphorylation. *Curr Top Cell Regul*, **27**, 159-169.
- Mazon, M.J., Gancedo, J.M. and Gancedo, C. (1982) Inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. In vivo phosphorylation of the enzyme. *J Biol Chem*, **257**, 1128-1130.
- McGrath, J.P., Jentsch, S. and Varshavsky, A. (1991) UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *Embo J*, **10**, 227-236.
- Melchior, F. and Hengst, L. (2000) Mdm2-SUMO1: is bigger better? *Nat Cell Biol*, **2**, E161-E163.

- Mullen, J.R., Kaliraman, V., Ibrahim, S.S. and Brill, S.J. (2001) Requirement for three novel protein complexes in the absence of the Sgs1 DNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **157**, 103-118.
- Müller, D. and Holzer, H. (1981) Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast by phosphorylation/dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun*, **103**, 926-933.
- Nasmyth, K. (1993) Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Curr Opin Cell Biol*, **5**, 166-179.
- Navas, M.A. and Gancedo, J.M. (1996) The regulatory characteristics of yeast fructose-1,6-bisphosphatase confer only a small selective advantage. *J Bacteriol*, **178**, 1809-1812.
- Ordiz, I., Herrero, P., Rodicio, R. and Moreno, F. (1995) Glucose-induced inactivation of isocitrate lyase in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by an internal decapeptide sequence. *FEBS Lett*, **367**, 219-222.
- Ordiz, I., Herrero, P., Rodicio, R. and Moreno, F. (1996) Glucose-induced inactivation of isocitrate lyase in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by the cAMP-dependent protein kinase catalytic subunits Tpk1 and Tpk2. *FEBS Lett*, **385**, 43-46.
- Pickart, C.M. (2000) Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci*, **25**, 544-548.
- Pickart, C.M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, **70**, 503-533.
- Plempner, R.K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T. and Wolf, D.H. (1997) Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature*, **388**, 891-895.
- Plempner, R.K., Egner, R., Kuchler, K. and Wolf, D.H. (1998) Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J Biol Chem*, **273**, 32848-32856.
- Plempner, R.K. and Wolf, D.H. (1999) Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem Sci*, **24**, 266-270.
- Pringle, J.R., Adams, A.E.M., Drubin, D.G. and Haarer, B.K. (1992) Immunofluorescence methods for yeast. in *Methods in Enzymology*, **194**, 565-602.
- Pringle, J.R., Preston, R.A., Adams, A.E., Stearns, T., Drubin, D.G., Haarer, B.K. and Jones, E.W. (1989) Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol*, **31**, 357-435.
- 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.
- Reiche, S. (2002) Charakterisierung der Autophagozytosegene *AUT9* und *AUT1* in der Hefe *S. cerevisiae*. Dissertation, Universität Stuttgart, Institut für Biochemie.
- Richter-Ruoff, B. and Wolf, D.H. (1993) Proteasome and cell cycle. Evidence for a regulatory role of the protease on mitotic cyclins in yeast. *Febs Lett*, **336**, 34-36.
- Richter-Ruoff, B., Wolf, D.H. and Hochstrasser, M. (1994) Degradation of the yeast MAT alpha 2 transcriptional regulator is mediated by the proteasome [published erratum appears in *FEBS Lett* 1995 Jan 16; 358(1):104]. *Febs Lett*, **354**, 50-52.
- Riezman, H. (1985) Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis. *Cell*, **40**, 1001-1009.
- Riezman, H. (1993) Yeast endocytosis. *Trends Cell Biol.*, **3**, 273-277.
- Rittenhouse, J., Harsch, P.B., Kim, J.N. and Marcus, F. (1986) Amino acid sequence of the phosphorylation site of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) fructose-1,6-bisphosphatase. *J Biol Chem*, **261**, 3939-3943.
- 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.
- Rock, K.L. and Goldberg, A.L. (1999) Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol*, **17**, 739-779.
- Rose, A.H. and Harrison, J.S. (eds.). (1987) *Biology of Yeasts*. Academic Press, London.

- Saigoh, K., Wang, Y.L., Suh, J.G., Yamanishi, T., Sakai, Y., Kiyosawa, H., Harada, T., Ichihara, N., Wakana, S., Kikuchi, T. and Wada, K. (1999) Intragenic deletion in the gene encoding ubiquitin carboxy-terminal hydrolase in gad mice. *Nat Genet*, **23**, 47-51.
- Sanchez, Y., Parsell, D.A., Taulien, J., Vogel, J.L., Craig, E.A. and Lindquist, S. (1993) Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70. *J Bacteriol*, **175**, 6484-6491.
- Saurin, A.J., Borden, K.L., Boddy, M.N. and Freemont, P.S. (1996) Does this have a familiar RING? *Trends Biochem Sci*, **21**, 208-214.
- Schauber, C., Chen, L., Tongaonkar, P., Vega, I., Lambertson, D., Potts, W. and Madura, K. (1998) Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway. *Nature*, **391**, 715-718.
- Scheffner, M. (1998) Ubiquitin, E6-AP, and their role in p53 inactivation. *Pharmacol Ther*, **78**, 129-139.
- Scheffner, M., Werness, B.A., Huibregtse, J.M., Levine, A.J. and Howley, P.M. (1990) The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, **63**, 1129-1136.
- Schorck, S., Bee, G., Thumm, M. and Wolf, D.H. (1994a) Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast is mediated by the proteasome. *FEBS Lett.*, **349**, 270-274.
- Schorck, S., Bee, G., Thumm, M. and Wolf, D.H. (1994b) Site of catabolite inactivation. *Nature*, **369**, 283-284.
- Schorck, 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.
- Schorck, S. M. (1995) Die Katabolitinaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*: Aufklärung ihres Ubiquitin-Proteasom vermittelten Abbaus. Dissertation, Universität Stuttgart, Institut für Biochemie.
- Schuele, 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.
- Schüle, T. (2000) Gid2p und Gid3p, zwei neue, an der Katabolitinaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beteiligte Proteine. Dissertation, Universität Stuttgart, Institut für Biochemie.
- Scott, S.V., Baba, M., Ohsumi, Y. and Klionsky, D.J. (1997) Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism. *J Cell Biol*, **138**, 37-44.
- Seeger, M., Ferrell, K. and Dubiel, W. (1997) The 26S proteasome: a dynamic structure. *Mol Biol Rep*, **24**, 83-88.
- Seemuller, E., Lupas, A., Stock, D., Lowe, J., Huber, R. and Baumeister, W. (1995) Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science*, **268**, 579-582.
- Shieh, H.L., Chen, Y., Brown, C.R. and Chiang, H.L. (2001) Biochemical analysis of fructose-1,6-bisphosphatase import into vacuole import and degradation vesicles reveals a role for UBC1 in vesicle biogenesis. *J Biol Chem*, **276**, 10398-10406.
- Shimura, H., Hattori, N., Kubo, S., Mizuno, Y., Asakawa, S., Minoshima, S., Shimizu, N., Iwai, K., Chiba, T., Tanaka, K. and Suzuki, T. (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet*, **25**, 302-305.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
- Smith, S.E., Koegl, M. and Jentsch, S. (1996) Role of the ubiquitin/proteasome system in regulated protein degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem*, **377**, 437-446.

- Spence, J., Gali, R.R., Dittmar, G., Sherman, F., Karin, M. and Finley, D. (2000) Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell*, **102**, 67-76.
- Spence, J., Sadis, S., Haas, A.L. and Finley, D. (1995) A ubiquitin mutant with specific defects in DNA repair and multiubiquitination. *Mol Cell Biol*, **15**, 1265-1273.
- Staub, O., Gautschi, I., Ishikawa, T., Breitschopf, K., Ciechanover, A., Schild, L. and Rotin, D. (1997) Regulation of stability and function of the epithelial Na<sup>+</sup> channel (ENaC) by ubiquitination. *Embo J*, **16**, 6325-6336.
- Stryer, L. (1995) *Biochemistry*. W.H. Freeman, New York.
- Suriapranata, I., Epple, U.D., Bernreuther, D., Bredschneider, M., Sovarasteanu, K. and Thumm, M. (2000) The breakdown of autophagic vesicles inside the vacuole depends on Aut4p. *J Cell Sci*, **113**, 4025-4033.
- Takehige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol*, **119**, 301-311.
- Teichert, U., Mechler, B., Muller, H. and Wolf, D.H. (1989) Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J. Biol. Chem.*, **264**, 16037-16045.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M. and Pickart, C.M. (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *Embo J*, **19**, 94-102.
- Thumm, M. (2000) Structure and function of the yeast vacuole and its role in autophagy. *Microsc Res Tech*, **51**, 563-572.
- Thumm, M. and Wolf, D.H. (1998) From Proteasome to Lysosome: Studies on Yeast Demonstrate the Principles of Protein Degradation in the Eukaryote Cell. In Rivett, A.J. (ed.), *Adv. Mol. Cell Biol*. JAI Press, Greenwich, Vol. 27, pp. 41-67.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- Tsai, B., Ye, Y. and Rapoport, T.A. (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **3**, 246-255.
- Tyers, M. and Willems, A.R. (1999) One ring to rule a superfamily of E3 ubiquitin ligases. *Science*, **284**, 601, 603-604.
- van Leeuwen, F.W., de Kleijn, D.P., van den Hurk, H.H., Neubauer, A., Sonnemans, M.A., Sluijs, J.A., Koycu, S., Ramdjielal, R.D., Salehi, A., Martens, G.J., Grosveld, F.G., Peter, J., Burbach, H. and Hol, E.M. (1998) Frameshift mutants of beta amyloid precursor protein and ubiquitin-B in Alzheimer's and Down patients. *Science*, **279**, 242-247.
- Vassarotti, A. and Colson, A.M. (1979) A novel class of *Schizosaccharomyces pombe* mutants, phenotypically unable to grow on glycerol, a respiratory substrate, but still able to oxidize glycerol aerobically [proceedings]. *Arch Int Physiol Biochim*, **87**, 641-642.
- Vassarotti, A. and Friesen, J.D. (1985) Isolation of the fructose-1,6-bisphosphatase gene of the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Evidence for transcriptional regulation. *J Biol Chem*, **260**, 6348-6353.
- Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I. and Yarden, Y. (1999) The RING finger of c-Cbl mediates desensitization of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, **274**, 22151-22154.
- Werner-Washburne, M., Becker, J., Kasic-Smithers, J. and Craig, E.A. (1989) Yeast Hsp70 RNA levels vary in response to the physiological status of the cell. *J Bacteriol*, **171**, 2680-2688.

- 
- Werner-Washburne, M., Stone, D.E. and Craig, E.A. (1987) Complex interactions among members of an essential subfamily of hsp70 genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **7**, 2568-2577.
- 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.
- Xie, Y. and Varshavsky, A. (2000) Physical association of ubiquitin ligases and the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2497-2502.
- Zachariae, W. and Nasmyth, K. (1999) Whose end is destruction: cell division and the anaphase-promoting complex. *Genes Dev*, **13**, 2039-2058.
- Zheng, N., Wang, P., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. (2000) Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin- protein ligases. *Cell*, **102**, 533-539.
- Zubenko, G.S. and Jones, E.W. (1981) Protein degradation, meiosis and sporulation in proteinase-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **97**, 45-64.

## 10 Anhang

**Tabelle 10-1:** Übersicht über die 9 bisher gefundenen Gid-Proteine.

Name	ORF	Gewicht	Domänen	Bisherige Erkenntnisse
Gid1p / Tin1p / Vid30p	YGL227w	108 kDa	SPRY LISH CTLH	- reguliert die Transkription von Genen, die am Stickstoffmetabolismus beteiligt sind - "TOR-interactor" Tin1p interagiert mit den Kinasen Tor1p and Tor2p in einem Two Hybrid Screen.
Gid2p	YDR255c	49 kDa	CTLH	- wird während des Wachstums auf Ethanolhaltigem Medium exprimiert - hat seine Funktion vor oder während der Ubiquitinierung der FBpase - ist ein lösliches cytosolisches Protein und ist nicht membrangeschützt - interagiert mit FBpase and dem Proteasom - liegt in einem mindestens 600 kDa großen Komplex in der Zelle vor
Gid3p / Ubc8p	YEL012w	25 kDa	UBCc	- E2-Enzym - wird während des Wachstums auf Ethanolhaltigem Medium exprimiert - wird nach Glucosezugabe wieder abgebaut
Gid4p / Vid24p	YBR105c	41 kDa		- wird nach Glucosezugabe zu dereprimierten Zellen exprimiert und anschließend schnell wieder abgebaut - hat seine Funktion nach der Ubiquitinierung der FBpase - Der Abbau ist Gid1p, Gid2p, Ubc8p, Vid28p, Ubp14p, Gid8 and Gid9p abhängig
Gid5p / Vid28p	YIL017c	105 kDa	ARM repeat	
Gid6p / Ubp14	YBR058c	91 kDa	2 x UBA ZnF_UBP	- Deubiquitinierendes Enzym

---

			UCH-1 UCH-2	
Gid7p	YCL039w	84 kDa	5 x WD-40	
Gid8p	YMR135c	51 kDa	LisH CTLH	
Gid9p / Fyv10p	YIL097w	60 kDa	CTLH	

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Dieter H. Wolf danke ich für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis, für die Überlassung dieses hochinteressanten und spannenden Themas, für seine ständige Diskussionsbereitschaft sowie für die Ermöglichung eines selbständigen, wissenschaftlichen Arbeitens.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Michael Thumm danke ich für seine Unterstützung während meiner Promotion, sowie für hilfreiche Anregungen und lehrreiche Diskussionen.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie der Universität Stuttgart möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, anregende Diskussionen, gegenseitige Hilfeleistungen und die freundliche und motivierende Arbeitsatmosphäre bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern dafür, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben und mich während meiner Promotion immer unterstützt haben. Ebenso gilt mein Dank meiner restlichen Familie, die mich seelisch und moralisch unterstützt hat.

## Veröffentlichungshinweis

Teile der vorliegenden Arbeit sind in folgendem Artikel publiziert worden:

Josupeit, F.S., Regelman, J., Schüle, T., 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.