

Unterschiedliche Funktionen der Ionenpumpe Pmr1

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

vorgelegt von
Andrea Zappe
aus Heilbronn

Hauptberichter: PD Dr. H. Rudolph
Mitberichter: Prof. Dr. D. Wolf
Tag der mündlichen Prüfung:
20.5.2003

Institut für Biochemie
der Universität Stuttgart

**Die vorliegende Arbeit wurde am
Institut für Biochemie
der Universität Stuttgart
unter Leitung von
Herrn PD Dr. Hans Rudolph
ausgeführt**

Danksagung:

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer PD. Dr. Hans Rudolph für die Überlassung des Themas, für die hilfreiche Unterstützung während der Arbeit, für die sehr interessanten und lehrreichen Diskussionen, sowie für die ständige Unterstützung bei Computerproblemen.

Des weiteren möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Dieter Wolf für die Aufnahme an seinem Institut und die Möglichkeit zur Promotion bedanken.

Danksagen möchte ich besonders den Kollegen meiner Arbeitsgruppe Saskia, Karin und Regina für die nette Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank geht an Regina, die immer da war wenn es „brannte“. Besonders vermissen werde ich die gemeinsamen Frühstückspausen mit Saskia.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt haben und mir das Studium ermöglichten.

Inhaltsverzeichnis	
1. Zusammenfassung	5
2. Abstract	7
3. Einleitung	12
Funktionen und Phänotypen von Pmr1	12
Funktionen und Phänotypen von Pmc1	13
Der vakuoläre Ca ²⁺ /H ⁺ Antiporter Vcx1	14
Ca ²⁺ - Kanäle in der Plasmamembran	14
Unterschiedliche Ca ²⁺ - Transportsysteme, die einen Ca ²⁺ - Ausstrom vermitteln	14
Beschreibung des Sekretionsweges	15
Beschreibung der Funktion verschiedener <i>sec</i> - Mutanten	16
Zielsetzung der Arbeit	17
Stickstoffmetabolismus	19
Intrazellulärer Transport und posttranslationale Modifikation von Gap1	19
Der Aminosäuretransport in <i>pmr1</i> - Zellen	20
Zielsetzung	21
4. Ergebnisse	22
Ca ²⁺ - Ausstromexperimente	22
Ca ²⁺ - Ausstrom aus Wildtypzellen	22
Ca ²⁺ - Ausstrom aus <i>sec18</i> - Zellen	24
Ca ²⁺ - Ausstrom aus „späten“ <i>sec</i> - Mutanten	25
Ca ²⁺ - Ausstrom aus „frühen“ <i>sec</i> - Mutanten	28
Ca ²⁺ - Ausstrom aus $\Delta pmr1$ - Zellen	30

Ca ²⁺ - Ausstrom nach Blockierung der Proteinsynthese	32
Ca ²⁺ - Ausstrom aus <i>sec6 end3</i> Zellen	33
Ca ²⁺ - Ausstrom aus <i>sec61</i> und <i>sec62</i> - Zellen	34
Citrullintransport in $\Delta pmr1$ - Zellen	37
Citrullintransport in Abhängigkeit vom pH- Wert	39
Lokalisation von Gap1 in $\Delta pmr1$ - Zellen	41
Ubiquitinierung ist essentiell für den Transport von Gap1 zur Vakuole	42
Transportaktivität von Gap1 in $\Delta pmr1$ - Zellen	43
Genetische Interaktionen von <i>PMR1</i>	47
<i>pmr1 bst1</i>	47
<i>pmr1 sac2</i>	49
<i>pmr1 vps24</i>	51
Weitere genetische Interaktionspartner	52
5. Diskussion	53
Ca ²⁺ - Ausstrom aus Zellen ist ein universelles Phänomen	53
Die Organellen des Sekretionsweges sind Ca ²⁺ reich	54
Die Vakuole ist der Hauptspeicher für Ca ²⁺	54
Ca ²⁺ - Ausstrom aus <i>sec18</i> , <i>sec6</i> und <i>sec1</i> ist unter restriktiven Bedingungen blockiert	56
Blockierung der Proteinsynthese hat keinen Einfluss auf den Ca ²⁺ - Ausstrom	57
Der Ca ²⁺ - Ausstrom wird nicht über ein Transportsystem an der Plasmamembran vermittelt	57
Der Ca ²⁺ - Ausstrom aus $\Delta pmr1$ - Zellen	57
Einfluss der Blockierung des „frühen“ Teil des Sekretionswegs	58
Zusammenfassung	58

Genetische Interaktionen von <i>PMR1</i>	59
<i>pmr1 bst1</i>	59
<i>pmr1 sac2</i>	60
<i>pmr1 vps24</i>	61
Funktion von Gap1 in <i>pmr1</i> - Zellen	62
Die Transportaktivität von Gap1 in <i>pmr1</i> - Zellen ist stark reduziert	62
Es liegt keine Fehlfunktion von Pma1 in <i>pmr1</i> - Zellen vor	63
Mögliche Ursachen für die drastisch reduzierte Transportaktivität	64
6. Materialien und Methoden	66
7. Literaturstellen	78

1. Zusammenfassung

Freies cytosolisches Ca^{2+} erfüllt in Eukaryonten für viele zelluläre Prozesse die Funktion eines „second messengers“ und unterliegt daher einer exakten Kontrolle, um eine normale Physiologie der Zelle aufrecht zu erhalten. Auf einen raschen Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration durch das Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen, zB. in der Plasmamembran, folgt ein aktives Entfernen des Ca^{2+} aus dem Cytosol. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* geschieht dies durch die Ca^{2+} -ATPasen Pmc1p (Vakuole) und Pmr1p (Golgi), sowie durch den $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ Antiporter Vxc1p (Vakuole). Der Hauptspeicher für Ca^{2+} ist die Vakuole, in der das Ca^{2+} hauptsächlich gebunden an Polyphosphatreste vorliegt. Der Weg, auf dem überschüssiges Ca^{2+} wieder aus der Zelle ausgeschieden werden kann, ist bisher unbekannt. Eine Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase, wie von Säugerzellen bekannt, scheint in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nicht zu existieren. Da Ca^{2+} in allen Subkompartimenten des Sekretionsweges eine wichtige Rolle spielt und zudem dort im Vergleich zum Cytosol in wesentlich erhöhten Konzentrationen nachgewiesen wurde, liegt es nahe zu vermuten, dass Ca^{2+} verpackt in sekretorische Vesikel die Zelle durch Exocytose verlassen könnte. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Hypothese anhand von Ca^{2+} -Ausstrommessungen an verschiedenen Hefestämmen untersucht. Hierzu wurden die intrazellulären Ca^{2+} -Speicher durch Wachstum in Anwesenheit von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ markiert, so dass ein aus der Zelle erfolgender Ca^{2+} -Ausstrom als Abnahme der Radioaktivität in der Zelle in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt werden konnte. An Hefestämmen, die aufgrund bestimmter *sec*-Mutationen ein temperatursensitives Sekretionsverhalten aufweisen, konnte gezeigt werden, dass das Ca^{2+} , verpackt in sekretorische Vesikel, entlang des Sekretionsweges zur Plasmamembran transportiert und bei der Fusion der post-Golgi Vesikel mit der Plasmamembran aus der Hefezelle freigesetzt wird. Der Ca^{2+} -Ausstrom erfolgt also über Exocytose.

In einem weiteren Projekt wurde der Aminosäuretransport durch die Aminosäurepermease Gap1p („general amino acid permease“) in $\Delta pmr1$ -Zellen untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass $\Delta pmr1$ -Zellen einen drastischen Wachstumsdefekt auf Minimalmedium mit Prolin oder Harnstoff als einziger Stickstoffquelle aufweisen; auch mit Citrullin als Stickstoffquelle ist dieser Wachstumsdefekt zu beobachten. Durch Transportmessungen mit radioaktiv markierten Aminosäuren konnte gezeigt werden, dass dieser Wachstumsdefekt durch eine stark reduzierte Aminosäureaufnahme verursacht wird. Kinetische Messungen ergaben, dass dieser Importdefekt auf einer drastisch verringerten Transportaktivität von Gap1p in $\Delta pmr1$ -Zellen beruht und dass vermutlich eine Form von unkompetitiver Inhibierung in $\Delta pmr1$ -Zellen vorliegt.

In einem dritten Projekt wurde nach genetischen Interaktionspartnern der

Ca²⁺/Mn²⁺- ATPase Pmr1p gesucht. Dabei wurde festgestellt, dass $\Delta pmr1 \Delta bst1$, $\Delta pmr1 \Delta sac2$ und $\Delta pmr1 \Delta vps24$ Doppelmutanten auf YPD- Platten einen starken Wachstumsdefekt aufweisen.

2. Abstract

Introduction

The cytosolic free Ca^{2+} concentration of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is maintained at extremely low levels of about $0.1 \mu\text{M}$ by the activity of the P-Type Ca^{2+} ATPases Pmc1p and Pmr1p, and the antiport Vcx1p. This is of importance because a transient increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration, 10-100- fold over the basal level, regulates a wide variety of cellular processes like exocytosis, gene expression and cell- cycle progression. This increase is mediated by a fast opening of Ca^{2+} channels in the plasma membrane (Mid1p / Cch1p) and certain organellar membranes. The period of massive Ca^{2+} influx into the cytosol is followed by active removal of Ca^{2+} through the antiport and the Ca^{2+} pumps. The main storage site for Ca^{2+} in yeast is the vacuole with a total Ca^{2+} concentration of 2 mM.

Ca^{2+} transport systems

Pmc1p is a P-Typ Ca^{2+} ATPase approximately 40% identical to mammalian plasma membrane Ca^{2+} ATPases (PMCA). It is localized to the vacuole and transports Ca^{2+} into the lumen of the vacuole. Another Ca^{2+} transport system localized to this organelle is the $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiport Vcx1p. It depends in its function on a transmembran pH gradient produced by the vacuolar H^{+} ATPase. Pmr1p is a secretory $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ pump localized to the Golgi complex. $\Delta pmr1$ cells show defects in the maturation of pro- alpha factor and in the sorting of CpY to the vacuole. They are hypersensitive against EGTA and Mn^{2+} and show defects in glycosylation of invertase and chitinase. The Ca^{2+} concentration of $\Delta pmr1$ cells in the ER is 50% lower than that of wild type, and $\Delta pmr1$ cells show defects in the ER- associated degradation (ERAD) of CpY*.

Ca^{2+} efflux out of animal and yeast cells

Animal cells exert tight control of free Ca^{2+} in the cytosol by balancing Ca^{2+} sequestration into internal stores with Ca^{2+} extrusion through well- studied, calmodulin- regulated Ca^{2+} pumps located in the plasma membrane. In yeast, however, little is known about Ca^{2+} efflux from the plasma membrane. Y. Eilam showed in Ca^{2+} efflux experiments with $^{45}\text{Ca}^{2+}$ labelled cells, that a Ca^{2+} efflux is inducible by the addition of monovalent and divalent cations to the media. These cations compete with Ca^{2+} for the polyphosphat binding sites in the vacuole and force Ca^{2+} into the cytosol. Ca^{2+} is then extruded from the cell by an as yet

unknown mechanism.

The organelles of the secretory pathway are rich in Ca²⁺

Very high Ca²⁺ concentrations are found in the organelles of the secretory pathway: therefore, it seems possible that Ca²⁺ is transported along the secretory pathway wrapped into secretory vesicles, which fuse with the plasma membrane to free their content by exocytosis. Here, we studied Ca²⁺ efflux out of different *sec* mutant strains. Ca²⁺ efflux out of „late“ *sec*- mutants should be blocked at restrictive temperature, if the Ca²⁺ efflux is mediated through the secretory pathway.

Result and discussion Ca²⁺ efflux

To examine, whether the secretory pathway is involved in the Ca²⁺ efflux, we studied Ca²⁺ efflux out of different *sec*- mutant strains at permissive and restrictive temperature. Ca²⁺ efflux out of ⁴⁵Ca²⁺ labelled cells was initiated by the addition of 5 mM MgCl₂.

Ca²⁺ efflux out of „late“ *sec* mutant cells is blocked at restrictive temperature

The products of the „late“ *SEC*- genes *SEC6* and *SEC1* are essential for the fusion of transport vesicles with the plasma membrane. In *sec6*- or *sec1*- mutant cells the late secretory pathway is blocked at the restrictive temperature. If Ca²⁺ efflux is mediated by exocytosis, no extrusion of Ca²⁺ should be observed out of these cells at 37°C. At permissive temperature, the Ca²⁺ efflux was found to be 24% in *sec1*- and 23% in *sec6*- cells. At 37°C, the Ca²⁺ efflux out of both mutants was blocked. Also, in *sec18*- cells the Ca²⁺ efflux was blocked at restrictive temperature. Sec18p is a general fusion factor, essential for all fusion processes along the secretory pathway. In comparison, wild- type cells showed no reduction in Ca²⁺ efflux at 37°C. Therefore, the block in the late secretory pathway seems to be the reason for the lack of Ca²⁺ efflux out of „late“ *sec*- mutant cells at 37°C. This might be explained by a Ca²⁺ efflux mediated by exocytosis. Another possible explanation could be the existence of an until now unknown transport system (antiport, Ca²⁺ pump) at the plasma membrane with a short half- life time. Since the transport system has also to reach the plasma membrane by the secretory pathway, this might be a second explanation why the Ca²⁺ efflux out of „late“ *sec*- mutant cells is blocked at 37°C.

A block in protein synthesis leads to no reduction in Ca²⁺ efflux

To test the possibility that a transport system with short a half- life time might exist, Ca²⁺ efflux was studied using yeast cells treated with cycloheximide, a drug which blocks protein synthesis. No reduction in Ca²⁺ efflux was observed. Clearly, Ca²⁺ efflux is not caused by a short- lived transport system. Another possible explanation for the dependence of Ca²⁺ efflux on the „late“ secretory pathway could be the existence of a stable transport system, which cycles between plasma membrane, endosome and TGN. To examine this hypothesis, Ca²⁺ efflux out of *sec6 end3* cells was studied. Since in *end3* cells the endocytotic internalization of plasma membrane proteins is blocked, a possible transport system should stay at the plasma membrane and the Ca²⁺ efflux should therefore no longer dependent on the late secretory pathway. However, in *sec6 end3* cells the same dependence of the Ca²⁺ efflux on the late secretory pathway was observed as in *sec6* cells. So, the sole explanation for the block in Ca²⁺ efflux out of the „late“ *sec*- mutant cells at restrictive temperature is an extrusion of Ca²⁺ out of the yeast cell by exocytosis.

A block in the early part of the secretory pathway also leads to a reduction in Ca²⁺ efflux

Sec12p and Sec13p are proteins essential for the budding of transport vesicle out of the ER. At 25°C Ca²⁺ efflux was 29% in *sec12* cells and 27% in *sec13* cells. At 37°C, Ca²⁺ efflux was drastically reduced in both *sec*- mutant strains (*sec12* 12%, *sec13* 20%). Thus, a certain percentage of the extruded Ca²⁺ seems to come from the ER.

Summary

Ca²⁺ efflux out of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is inducible by the addition of MgCl₂ to the media. Mg²⁺ substitute Ca²⁺ at the polyphosphat binding site and Ca²⁺ is extruded from the vacuole. Ca²⁺ enters the secretory pathway by the function of Pmr1p and other transport systems. Ca²⁺ is packaged into transport vesicles, which transport the Ca²⁺ along the secretory pathway to the plasma membrane. The post- Golgi transport vesicles fuse with the plasma membrane thereby extruding Ca²⁺ by exocytosis.

Nitrogen metabolism:

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* can grow on a great variety of nitrogen sources, but not all nitrogen sources support growth equally well. Good nitrogen sources (glutamine or glutamate) yield higher growth rates than poor nitrogen sources (proline or urea). Yeast chooses the best possible nitrogen source for growth by a mechanism called nitrogen catabolite repression. The transcription of genes, involved in the utilization of poor nitrogen source is repressed, and the corresponding gene products are inactivated and degraded in presence of good nitrogen source.

Intracellular transport and posttranslational modification of Gap1p

The general amino acid permease Gap1p is actively transcribed when yeast cells are grown on the poor nitrogen sources proline and urea. The newly synthesized protein is transported over the secretory pathway to the plasma membrane and accumulates there in an active and stable form. Activated Gap1p is in a phosphorylated state. Npr1 is essential for the posttranslational activation of Gap1p. It belongs to a subgroup protein kinases that exert a positive control on the activity of other permeases. Inactivation of Gap1p by dephosphorylation leads to degradation of the protein. Addition of ammonia to proline grown cells triggers complete loss of Gap1p activity and repression of *GAP1* gene expression. The loss of Gap1p activity is the result of Gap1p internalization by endocytosis and degradation in the vacuole. The down regulation of Gap1p is dependent on ubiquitination as a signal for endocytotic uptake. The ubiquitination of Gap1p is dependent on a Npi/Rsp5 ubiquitin ligase. In cells grown on ammonia or glutamate, Gap1p is directly targeted to the vacuole via the pre- vacuolar compartment without reaching the plasma membrane. $\Delta pmr1$ cells show drastic growth defects when grown on minimal media with proline or urea as nitrogen source. This growth defect seems to be a consequence of a drastic reduced amino acid uptake by the general amino acid permease Gap1p.

Result and discussion Gap1

Citrulline uptake at high affinity uptake conditions of 4 μ M was studied in $\Delta gap1$ cells. The results show that citrulline is taken up under these conditions exclusively by the general amino acid permease Gap1p. Transformation of $\Delta gap1$ cells with a *GAP1*, *GAP1::HA* and *GAP1::GFP* plasmid restores citrulline uptake under high affinity uptake conditions. Under the same conditions, $\Delta pmr1$ cells show no citrulline uptake, even when they are transformed with a *GAP1::HA* Plasmid.

What are the reasons for this observation? One possible explanation could be the mislocalization of Gap1p in $\Delta pmr1$ cells. Localization studies with a Gap1-GFP fusion protein using fluorescence microscopy show no altered distribution of Gap1p in $\Delta pmr1$ cells. Also, subcellular fractionation studies show no drastic difference in the localization of Gap1 in $\Delta pmr1$ and wildtype cells (K. Fiebig, thesis). Another possible explanation for the reduced citrulline uptake in $\Delta pmr1$ cells, could be a drastic reduced transport activity of Gap1p in $\Delta pmr1$ cells. For this purpose, transport kinetics were measured for citrulline import into $\Delta pmr1$ and wild type cells. The citrulline import followed Michaelis–Menten kinetic between the citrulline concentrations of 5–14 μM . The apparent K_M was 110 μM in wildtype cells and 23.8 μM in $\Delta pmr1$ cells, the apparent V_{max} was 14.8 pmol/(min*mg) in wild-type and 3.309 pmol/(min*mg) in $\Delta pmr1$ cells. The K_M and V_{max} values are apparent, as it is not known, if the co-substrate H^+ is present in saturating amounts. Under conditions used, the transport activity of Gap1p in $\Delta pmr1$ cells is approximately 5 times lower than in wild-type cells. In Lineweaver-Burk plot, the lines obtained for wild type and $\Delta pmr1$ cells are parallel. This is a sign for some sort of uncompetitive inhibition occurring after citrulline has been bound, perhaps in conjunction with binding of the second substrate H^+ . A possible explanation for this clear-cut kinetic alteration observation could be a global change in functionality of the plasma membrane in $\Delta pmr1$ cells. Since Gap1p is a H^+ /amino acid symport, depending on a plasma membrane pH-gradient produced by the plasma membrane H^+ ATPase Pma1p, a reduced activity of Pma1p itself might cause the drastically reduced transport activity of Gap1p in $\Delta pmr1$ cells. However, H^+ efflux out of $\Delta pmr1$ and wild-type cells is very similar and shows no signs of a difference in Pma1p activity in both strains (Elbs and Rudolph, unpublished). Interestingly, citrulline uptake in $\Delta pmr1$ and wild-type cells was slightly stimulated with an decrease in pH of the media. But even at pH 4, the citrulline uptake in $\Delta pmr1$ cells was about 10 times lower than in wild-type cells. When the media were buffered with a weak acid, the citrulline uptake in $\Delta pmr1$ cells was strongly stimulated. But even under these conditions, uptake was still 50% lower than in wild-type cells. It is known that weak acids enter a cell more readily, thus decreasing the cytosolic pH more drastically than strong acids at the same pH. A decrease in cytosolic pH leads to a activation of Pma1.

Summary

$\Delta pmr1$ cells show drastic growth defects on MM with proline, urea or citrulline as nitrogen source. The reason for this is a drastically reduced transport activity of Gap1p in $\Delta pmr1$ cells.

3. Einleitung

In Eukaryonten erfüllt die freie cytosolische Ca^{2+} -Konzentration für viele Prozesse die Rolle eines „second messengers“ und ihre exakte Kontrolle ist daher für die normale Physiologie der Zelle essentiell. So reguliert ein vorübergehender Anstieg der freien cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration unter anderem Prozesse wie die Zellteilung, Exocytose, Weiterleitung von Nervenimpulsen, die Muskelkontraktion und den Metabolismus der Zelle (Campbell, 1983). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beträgt die freie cytosolische Ca^{2+} -Konzentration in nicht stimulierten logarithmisch wachsenden Zellen $0.1 \mu\text{M}$. Durch Öffnen von Calciumkanälen in der Plasmamembran und in bestimmten Organellen kann sie vorübergehend auf das 10– 100 fache ansteigen. Nach dem massiven Anstieg erfolgt ein rasches Verschließen von Ca^{2+} -Kanälen und ein aktives Entfernen von Ca^{2+} aus dem Cytosol mittels Antiporter und Ca^{2+} -Pumpen (Cunningham and Fink, 1994). Während in Säugern der Hauptspeicher für Ca^{2+} das Endoplasmatische (ER) bzw. Sarkoplasmatische Retikulum (SR) ist und Ca^{2+} dort in Protein gebundener Form (Calreticulin bzw. Endoplasmin) vorliegt, speichert die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* Ca^{2+} hauptsächlich in der Vakuole. Ca^{2+} ist dort an Polyphosphatreste gebunden. Die Gesamtkonzentration an Ca^{2+} in der Vakuole beträgt etwa 2 mM (Dunn et al., 1994; Beeler et al., 1997). Den wichtigsten Beitrag zur cytoplasmatischen Ca^{2+} -Homöostase leisten P-Typ Ca^{2+} -ATPasen. Diese P-Typ ATPasen besitzen eine sehr ähnliche Anordnung ihrer hydrophoben Segmente mit acht bis zehn Transmembrandomänen und zehn stark konservierten Regionen (Serrano, 1988). Charakteristisch für P-Typ ATPasen ist die Erzeugung eines phosphorylierten Enzymintermediats während der Hydrolyse von ATP. Die bei der ATP Hydrolyse freiwerdende Energie wird genutzt um ein Ion gegen einen Gradienten zu transportieren (Carafoli, 1987).

Funktion und Phänotypen von Pmr1p

Pmr1p ist eine P-Typ ATPase (Rudolph et al., 1989), die hauptsächlich im Golgi lokalisiert ist (Antebi and Fink, 1992) und sowohl Ca^{2+} als auch Mn^{2+} aus dem Cytosol in das Lumen des Golgi transportiert (Dürr et al., 1998). Sie weist, wie alle P-Typ ATPasen (Serrano, 1988), 10 stark konservierte Regionen auf (Rudolph et al., 1989). Der N-Terminus des Proteins enthält das Motiv einer Ca^{2+} -Bindungsstelle ähnlich der Ca^{2+} -Bindungstasche („EF-Hand“) von Calmodulin (Kretsinger, 1980; Rudolph et al., 1989). 2 *PMR1* Homologe existieren im Menschen, *ATP2C1* und *ATP2C2*. *ATP2C1* weist 49% Sequenzidentität zu *PMR1* auf, wobei vor allem die Transmembrandomänen fast vollständig konserviert

sind. Mutationen, die das menschliche Homolog von Pmr1p inaktivieren, findet man in Patienten mit Hailey- Hailey Krankheit (Hu et al., 2000; Sudbrak et al., 2000). $\Delta pmr1$ - Zellen zeigen Defekte im Sorting von CpY und in der Reifung von pro- alpha Faktor; durch Zusatz von Ca^{2+} ins Medium lassen sich diese Defekte wieder vollständig aufheben (Antebi and Fink, 1992). Des Weiteren sind $\Delta pmr1$ - Mutanten hypersensitiv sowohl gegen Mn^{2+} - Ionen (Lapinskas et al., 1995), als auch gegen EGTA, einem Komplexbildner für zweiwertige Kationen (Rudolph et al., 1989). $pmr1$ - Mutanten sezernieren eine Form von Invertase, der die Aussenkettenmannosylierung fehlt. Die N- Glykosylierung von Invertase wird durch Zusatz von Mn^{2+} zum Medium stark stimuliert, während ein Zusatz von Ca^{2+} - Ionen zum Medium nur wenig Einfluss auf die Glykosylierung von Invertase hat. Deletion von $pmr1$ hat aber auch Einfluss auf die O-Glykosylierung von Proteinen, z.B. von Chitinase; auch dieser Glykosylierungsdefekt lässt sich zumindest zum Teil durch Zusatz von Mn^{2+} zum Medium revidieren (Dürr et al., 1998). $\Delta pmr1$ - Zellen weisen einen Defekt in der ER- assoziierten Degradation (ERAD) von CpY* und eine um 50% niedrigere ER Ca^{2+} - Konzentration als die entsprechenden Wildtypzellen auf (Strayle et al., 1999). Zusätzlich ist die freie cytosolische Ca^{2+} - Konzentration bis zum Sechzehnfachen erhöht (Halachmi and Eilam, 1996; Locke et al., 2000).

Funktion und Phänotypen von Pmc1p

Pmc1p ist eine Ca^{2+} - ATPase, die zu 40% identisch ist mit Ca^{2+} - ATPasen der Säugetier-Plasmamembran (PMCA), aber nur sehr geringe Ähnlichkeit zu anderen P- Typ ATPasen aufweist (Cunningham and Fink, 1994). Pmc1p fehlt jedoch, im Gegensatz zu den typischen PMCA Isoformen, eine Calmodulin- Bindungsdomäne am C-Terminus. $\Delta pmc1$ - Zellen weisen eine Ca^{2+} - Konzentration in der Vakuole auf, die um 80% niedriger als die des Wildtyps ist. Sie sind nicht in der Lage in Standardmedien mit einer hohen Ca^{2+} - Konzentration zu wachsen (z.B. in YPD Medium, das mit 200 mM $CaCl_2$ supplementiert wurde). Das Wachstum der Nullmutanten lässt sich allerdings wieder herstellen, indem man entweder eine der Calcineurin- Untereinheiten mutiert (Kuno et al., 1991; Cyert and Thorner, 1992) oder aber die Ca^{2+} - Bindungsstelle von Calmodulin durch Mutation inaktiviert (Cunningham and Fink, 1994). Calcineurin ist eine Proteinphosphatase, deren Aktivität durch Bindung von Ca^{2+} und Calmodulin stimuliert und durch die Drogen Cyclosporin A bzw. FK506 inhibiert wird (Foor et al., 1992; Parent et al., 1993). Calcineurin inhibiert den vakuolären Ca^{2+}/H^+ Austausch *VCX1* vermutlich über einen posttranslationalen Mechanismus (Cunningham and Fink, 1994). Gleichzeitig wird die Transkriptionrate von *PMCI* und *PMRI* durch die Aktivierung von Calcineurin erhöht (Cunningham and Fink, 1996).

Vcx1p ist ein vakuolärer $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ Antiporter

Vcx1p ist der vakuoläre $\text{Ca}^{2+}/2 \text{H}^+$ Antiporter, mit 11 Transmembrandomänen und der höchsten Sequenzähnlichkeit zu dem in der Retina vorkommenden $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, K^+ Antiporter (Reilander et al., 1992) und dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Antiporter aus dem Herz (Nicoll et al., 1990). Die Ca^{2+} - Aufnahmeaktivität von gereinigten Vakuolen ist vollständig abhängig von einem pH- Gradient an der Plasmamembran (innen sauer), der von der vakuolären H^+ - ATPase erzeugt wird (Cunningham and Fink, 1994).

Ca^{2+} - Kanäle in der Plasmamembran

Cch1p und Mid1p sind 2 Proteine, die an der Plasmamembran lokalisiert sind und die vermutlich die katalytische und regulatorische Untereinheit eines hochaffinen Ca^{2+} - Einstrom Kanals bilden (HACS „high affinity calcium influx system“). Die Aktivität dieses Kanals wird stimuliert, wenn die Organellen des Sekretionswegs an Ca^{2+} verarmen (Locke et al., 2000). Mid1p ist ein Glykoprotein, für das bis jetzt kein Homolog in tierischen Zellen bekannt ist. Cch1p hingegen ist ein Homolog der Ca^{2+} - Kanäle, die in der Plasmamembran elektrisch erregbarer tierischer Zellen gefunden werden (VGCC`s) (Locke et al., 2000; Muller et al., 2001). Muller et al. konnten die Existenz eines weiteren nieder- affinen Ca^{2+} - Einstromsystems (LACS „low affinity calcium influx system“) nachweisen. Dieses System ist im Vergleich zum hochaffinen Ca^{2+} -Aufnahmesystem sensitiv gegen Mg^{2+} und wird nicht beim Verarmen der Organellen des Sekretionsweges an Ca^{2+} stimuliert (Locke et al., 2000).

***Saccharomyces cerevisiae* besitzt offenbar keine Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase**

Säugerzellen besitzen eine Plasmamembran Ca^{2+} - ATPase (PMCA), die nach Aktivierung durch Calmodulin, Ca^{2+} aus der Zelle transportiert (James et al., 1988). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte trotz Aufklärung der Sequenz des Genoms bisher kein Homolog dieser Plasmamembran Ca^{2+} - ATPase gefunden werden. Allerdings zeigte Y. Eilam an Hand von Experimenten mit $^{45}\text{Ca}^{2+}$ äquilibrierten Hefezellen, dass sich ein Ca^{2+} - Ausstrom initiieren lässt (Eilam, 1982 a; Eilam, 1982 b). Bis heute ist allerdings der Mechanismus auf dem der Ca^{2+} - Ausstrom beruht unbekannt. Folgende Transportsysteme, die den Ca^{2+} - Transport aus der Zelle vermitteln, konnten bisher nachgewiesen werden: Plasmamembran Ca^{2+} - ATPasen (in Säugerzellen), $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ Antiporter (Herz von

Säugetieren), Ca²⁺/H⁺ Antiporter (*Escherichia coli*) (Blaustein, 1974; Vincenzi F.F., 1976; Brey and Rosen, 1979).

Ca²⁺ spielt in den Kompartimenten des Sekretionsweges eine wichtige Rolle

In Säugetierzellen ist der Hauptspeicher für Ca²⁺ das Endoplasmatische bzw. Sarcoplasmatische Retikulum (ER bzw. SR), im Unterschied zur Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzen sie eine zusätzliche Sarkoplasmatische-Endoplasmatische Ca²⁺-ATPase (Serca), mit deren Hilfe sie hohe Mengen an Ca²⁺ im ER akkumulieren (Moller et al., 1996; MacLennan et al., 1997). Diese hohe Ca²⁺-Konzentration im ER ist wichtig, weil Ca²⁺ mit Chaperonen, sowie mit vielen Enzymen eine direkte Bindung eingeht und so für die Faltung, Glykosylierung, Translokation, Disulfidbrückenbildung, sowie für das „Sorting“ von sekretorischen Proteinen eine wichtige Rolle spielt (Meldolesi and Pozzan, 1998). Inhibiert man Serca oder entleert den Ca²⁺-Pool aus dem ER mit einem Ionophor, so kommt es zu Defekten in der Proteinfaltung, sowie zu einer Aktivierung des UPR (**u**nfolded **p**rotein **r**esponse) (Lamarche et al., 1985; Drummond et al., 1987; Price et al., 1992; Gill et al., 1996). Gleichzeitig wird als Antwort auf die Ca²⁺-Entleerung des ER ein Ca²⁺-Einstrom über Ca²⁺-Kanäle in der Plasmamembran initiiert („capacitative Ca²⁺ entry“ = CCE) (Putney, 1986; Putney, 1990). Dieser Mechanismus aktiviert Ca²⁺-Signalwege und dient zur Wiederauffüllung der Organellen mit Ca²⁺. Bonilla et al. konnten zeigen, dass die Ca²⁺-Konzentration im ER der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* eine wichtige Rolle für Faltung und das Prozessieren von sekretorischen Proteinen spielt. Akkumulation von ungefalteten Proteinen, sowie die Inhibierung der Ergosterolsynthese stimulieren Ca²⁺-Einstrom über den Mid1/Cch1 Ca²⁺-Kanal sowie über andere Kanäle an der Plasmamembran und ermöglicht das Überleben der Zelle durch Aktivierung von Calcineurin (Bonilla et al., 2002). Des Weiteren spielt die Ca²⁺-Konzentration im ER für die Funktion von Chaperonen wie BiP eine wichtige Rolle. BiP assoziiert mit falsch gefalteten sowie nicht assemblierten Proteinen (Haas and Wabl, 1983; Lodish, 1988). Eine hohe Ca²⁺-Konzentration unterstützt zum Beispiel die Assoziation von BiP mit einer mutierten alpha-Kette eines T-Zellen Rezeptors, wohingegen eine Zugabe von EGTA und ATP diesen Prozess unterbindet (Suzuki et al., 1991). In Hefe existiert ein Homolog zu BiP, welches Kar2p genannt wird. Des Weiteren sind verschiedene Homologe Ca²⁺-abhängiger Enzyme bekannt: Im ER die Proteindisulfidisomerasen Pdi1p und Eug1p, das Calnexin und Calreticulin Homolog Cne1p, sowie die UDP-glucose: Glykosyltransferase (Kre5p) und Mannosidase I (Mns1p) (Rose et al., 1989; Meaden et al., 1990; Farquhar et al., 1991; Tachikawa et al., 1991; Tachibana and Stevens, 1992; De Virgilio et al., 1994; Parlati et al., 1995; Lipari and Herscovics, 1999). Die Furin-ähnliche Protease Kex2p ist ebenfalls ein Ca²⁺-abhängiges Enzym, das im trans-Golgi Netzwerk lokalisiert ist (Fuller et al., 1989). Des Weiteren spielen

Ca²⁺- Ionen in Membranfusionen, in der Verpackung sekretorischer Proteine und dem Speichern in Granula eine wichtige Rolle (Chanat et al., 1991; Carnell and Moore, 1994; Canaff et al., 1996). Pezzati et al. fanden mittels „Electron energy loss spectroscopy“ an PC12- Zellen positive Ca²⁺- Signale im ER, in der Kerncisterne, in Sekretionsgranula, im Golgikomplex und in Transportvesikeln (Pezzati et al., 1997). Da die Ca²⁺- Konzentration in den sekretorischen Vesikeln extrem hoch ist, wäre es möglich, dass Ca²⁺- verpackt in sekretorischen Vesikeln entlang des Sekretionsweges in Richtung Plasmamembran transportiert wird und dort bei der Fusion von post- Golgi Vesikeln mit der Plasmamembran freigesetzt wird. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit der Ca²⁺- Ausstrom aus Temperatur- sensitiven *sec*- Mutanten gemessen. In diesen Mutanten ist bei restriktiver Temperatur der Sekretionsweg blockiert.

Beschreibung des Sekretionsweges

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* vermehrt sich durch Knospung. Damit die Knospe wachsen kann müssen ständig Proteine und neue Membranbestandteile entlang des Sekretionsweges in Richtung Plasmamembran transportiert werden. Zunächst werden die sekretorischen Proteine aus dem Cytosol in das Lumen des ER transloziert (Deshaies and Schekman, 1987; Rothblatt et al., 1989; Green et al., 1992; Panzner et al., 1995). Im ER erlangen die Proteine dann eine funktionale Konformation (kovalente Modifikationen, Spaltung von Signalpeptiden (Fang et al., 1996; Mullins et al., 1996) N- und O- Glykosylierungen (te Heesen et al., 1992; Herscovics and Orlean, 1993), Bildung von Disulfidbrücken (LaMantia et al., 1991; Tachikawa et al., 1991; Tachibana and Stevens, 1992; Jamsa et al., 1994), anbringen von GPI-Ankern (Doering and Schekman, 1996). Die sekretorischen Proteine werden nun in Transportvesikel gepackt, die sich vom ER abknospen, mit der Golgimembran fusionieren und dabei ihren Inhalt freisetzen (Pryer et al., 1992; Ferro-Novick and Jahn, 1994; Rothman, 1994). ER-Membranproteine, die den „frühen“ Golgi erreicht haben, werden mittels retrograder Transportvesikel, zurück in das ER transportiert (Pagny et al., 2000; Yamamoto et al., 2001). Die sekretorischen Proteine werden dann mittels mehrerer Vesikelbildungs- und Fusionsprozessen durch die Kompartimente des Golgi transportiert, wo weitere Glykosylierungen (Mannosylierung) sowie Reifungen von sekretorischen Proteinen stattfinden (Chapman and Munro, 1994; Graham et al., 1994; Whitters et al., 1994; Lussier et al., 1995; Harris and Waters, 1996). Im trans- Golgi werden dann die vakuolären Proteine von den sekretorischen Proteinen, die zur Plasmamembran gelangen sollen getrennt und in post- Golgi Vesikel verpackt um von dort in Richtung Vakuole bzw. Plasmamembran transportiert zu werden. Die post- Golgi Vesikel fusionieren mit der Plasmamembran und setzen hierbei ihren Inhalt durch Exocytose frei (Chang and Fink, 1995; Novick et al., 1995; TerBush

and Novick, 1995; Deloche and Schekman, 2002). Integrale Membranproteine können auch wieder von der Plasmamembran mittels Endocytose internalisiert und über das Endosom zur Degradation zur Vakuole transportiert werden (Konopka et al., 1988; Reneke et al., 1988; Davis et al., 1993; Egner et al., 1995). Für den Transport von sekretorischen Proteinen über den Sekretionsweg sind verschiedene *SEC*- Gene verantwortlich, von denen die meisten für die Zelle essentiell sind. Anhand von temperatursensitiven *sec*- Mutanten konnte die Aufgabe der einzelnen *SEC*- Gene untersucht werden. Diese temperatursensitiven Mutanten zeigen bei permissiven Temperaturen einen funktionalen Sekretionsweg, unter restriktiven Bedingungen kommt das Zellwachstum aber abrupt zum Stillstand (Novick and Schekman, 1983).

In temperatursensitiven *sec*- Mutanten ist der Sekretionsweg bei restriktiver Temperatur an unterschiedlichen Stellen blockiert

In verschiedenen genetischen Ansätzen konnten 12 Gene identifiziert werden, deren Produkte am Transport zwischen ER und Golgi beteiligt sind (sogenannte „frühe“ *SEC*- Gene). In entsprechenden , temperatursensitiven Mutanten wird bei restriktiven Temperaturen der Sekretionsweg vollständig blockiert (Nakano et al., 1980, 1988; Newman and Ferro-Novick, 1987; Schmitt et al., 1988; Segev et al., 1988). Dabei lassen sich experimentell 2 Schritte gut unterscheiden: die Bildung von Transportvesikeln, sowie die Fusion dieser Vesikel mit der Golgi- Membran. Temperatursensitive *sec*- Mutanten, in denen die Fusion von ER– Vesikeln mit der Golgimembran blockiert ist, akkumulieren bei restriktiver Temperatur Transportvesikel mit einem Durchmesser von 50 nm (*sec17*, *sec18*, *sec22*), wohingegen Mutanten, in denen die Vesikelbildung aus dem ER bei restriktiven Bedingungen blockiert ist, keine Akkumulation dieser Transportvesikel zeigen. Zu der Klasse der *sec*- Mutanten in denen die Bildung von Transportvesikeln aus dem ER bei restriktiver Temperatur blockiert ist gehören *sec12* und *sec13*. Sec12p katalysiert die Transportvesikelbildung aus dem ER, ist aber selbst nicht Bestandteil der Transportvesikel (Nakano et al., 1988; Nishikawa and Nakano, 1993; Barlowe et al., 1994). Hingegen ist Sec13p eine der Hauptkomponenten der Transportvesikel- „Mantelproteine“ (COPII coat) (Kaiser and Schekman, 1990; Barlowe et al., 1994; Bednarek et al., 1995). Zu den späten *SEC*- Genen, deren Genprodukt für die Fusion von post- Golgi Vesikeln mit der Plasmamembran essentiell ist, gehören *SEC1* und *SEC6*. Sec6p ist Bestandteil eines großen Proteinkomplexes, der sowohl im Cytosol, als auch an der Plasmamembran gefunden wird (TerBush and Novick, 1995). *sec6*- Mutanten akkumulieren bei restriktiver Temperatur 100 nm post- Golgi Vesikel (Novick et al., 1980; Novick et al., 1981). *SEC1* ist ein essentielles Gen, dessen Produkt ein 78 kD Protein homolog zu Sly1p darstellt (einer Komponente des Vesikel „docking“ Komplexes, der an der

Anlagerung der aus dem ER stammenden Transportvesikeln an die Golgimembran beteiligt ist) (Aalto et al., 1991). Sec1p ist am Proteintransport zwischen Golgi und Plasmamembran beteiligt (Novick and Schekman, 1979; Novick et al., 1980). In Säugetierzellen konnte gezeigt werden, dass an dem Proteintransport zwischen den Cisternen des Golgikomplexes folgende Unterreaktionen beteiligt sind: die Knospung von ummantelten Transportvesikeln von der Donormembran, der gerichtete Transport, die Anlagerung dieser Vesikel an der betreffenden Akzeptormembran, die Entfernung der Proteinhülle und die Fusion des nackten Membranvesikels mit der Akzeptormembran (Orci et al., 1991). Unter Zusatz von N-Ethylmaleimid konnte eine Akkumulation von nackten Transportvesikeln an der Akzeptormembran beobachtet werden (Balch et al., 1984). Diese Beobachtung führte zur Isolation des N-Ethylmaleimid sensitiven Faktors (NSF), einem Homolog des *Saccharomyces cerevisiae* Proteins Sec18p (Beckers et al., 1989; Diaz et al., 1989). Sec18p zeigt eine zu 48% identische Aminosäuresequenz zu NSF (Eakle et al., 1988; Wilson et al., 1989) und kann NSF im intra-Golgi Transport ersetzen (Wilson et al., 1989). Graham und Emr zeigten, dass Sec18p sowohl für den Proteintransport vom ER zum Golgi als auch für den Transport zwischen den Unterkompartimenten des Golgi und dem Transport vom Golgi zur Zelloberfläche benötigt wird (Graham and Emr, 1991).

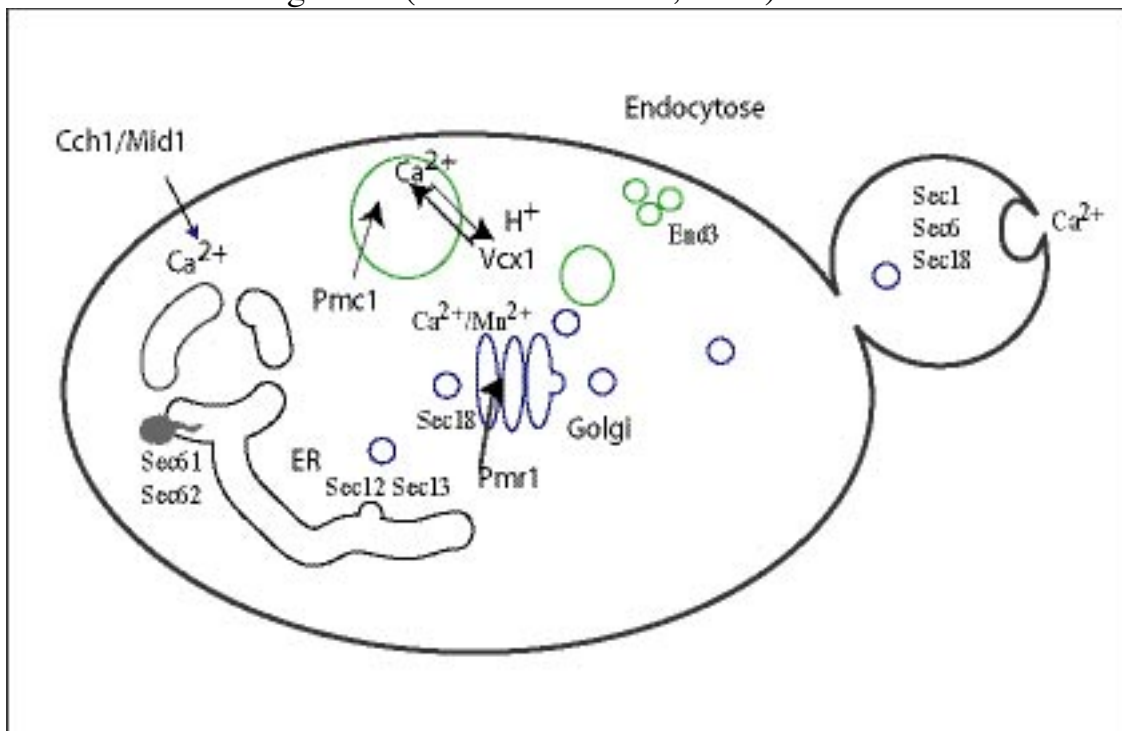


Abbildung 1: Modell einer Hefezelle mit den Ca²⁺-ATPasen Pmr1p und Pmc1p dem vakuolären Ca²⁺/H⁺ Antiporter Vcx1p sowie den Transportrouten zwischen Zellorganellen und der Plasmamembran. Sec6p und Sec1p wird für die Fusion von Transportvesikeln mit der Plasmamembran benötigt. Sec12p und Sec13p sind für die Bildung der Transportvesikel aus dem ER verantwortlich. Sec18p wird für sämtliche Fusionsprozesse von Sekretionsvesikeln mit Akzeptormembranen entlang des Sekretionsweges benötigt.

Zielsetzung der Arbeit :

Durch Messungen des Ca^{2+} - Ausstroms an *sec*- Mutanten sollte geklärt werden, ob der Ca^{2+} - Ausstrom durch Exocytose sekretorischer Vesikel erfolgt oder über ein in der Plasmamembran befindliches bisher nicht identifiziertes Ca^{2+} - Transportsystem. Hierzu wurden Ca^{2+} - Ausstrommessungen an „frühen“ (*sec12*, *sec13*) und „späten“ *sec*- (*sec1*, *sec6*) Mutanten durchgeführt. Sollte der Ca^{2+} - Ausstrom tatsächlich über die Fusion von Sekretionsvesikeln mit der Plasmamembran erfolgen, so sollte insbesondere in den „späten“ *sec*- Mutanten der Ca^{2+} - Ausstrom unter restriktiven Bedingungen völlig zum Erliegen kommen.

Stickstoffmetabolismus :

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kann auf einer großen Bandbreite von Stickstoffquellen wachsen, wobei nicht alle gleich gut für das Wachstum der Zelle geeignet sind. Im Zentrum des Stickstoffmetabolismus stehen Glutamat und Glutamin: soll eine andere Aminosäure als Stickstoffquelle genutzt werden, so muss sie vorher in eine dieser beiden Aminosäuren umgewandelt werden (Wiame et al., 1985; Magasanik, 1992). Als gute Stickstoffquellen gelten z.B. Ammonium, Glutamin und Asparagin, schlechte Stickstoffquellen sind Prolin und Harnstoff (ter Schure et al., 2000). Die Hefezelle wählt unter den jeweils zur Verfügung stehenden Stickstoffquellen diejenige aus, die für das Wachstum am Besten geeignet ist. Dies geschieht indem die Transkription der Gene, die für die Verwertung schlechterer Stickstoffquellen nötig sind, reprimiert wird. Dieser Repressionsmechanismus wird als NCR bezeichnet („nitrogen catabolite repression“)(Wiame et al., 1985; Magasanik, 1992).

Intrazellulärer Transport und posttranslationale Modifikation von Gap1p

Die Aminosäurepermease Gap1p ist in der Lage alle 20 Aminosäuren über die Plasmamembran in die Zelle zu transportieren (Grenson et al., 1970; Courchesne and Magasanik, 1983; Jauniaux and Grenson, 1990). *GAP1* wird bei Wachstum auf schlechten Stickstoffquellen wie zum Beispiel Harnstoff oder Prolin aktiv transkribiert; das neu synthetisierte Protein wird über den Sekretionsweg zur Plasmamembran transportiert um dort in einer aktiven und stabilen Form zu akkumulieren (Roberg et al., 1997). Bei Zusatz der besonders bevorzugten Stickstoffquelle NH_4^+ wird der bereits an der Plasmamembran befindliche „Pool“ von Gap1p durch Endocytose internalisiert und zur Degradation zur Vakuole transportiert. Neu synthetisiertes Gap1p gelangt unter diesen Bedingungen nicht mehr zur Plasmamembran, sondern wird direkt zur Vakuole transportiert

(Grenson, 1983; Jauniaux and Grenson, 1990; Hein et al., 1995; Roberg et al., 1997; Springael and Andre, 1998). Roberg et al. konnten zeigen, dass für den Transport von Gap1p vom Golgi zur Vakuole Pep12p (ein t- SNARE) essentiell ist (Roberg et al., 1997). Gleichzeitig führt der Zusatz von NH_4^+ zur Repression der *GAP1*- Expression. Für den Transport von Gap1p zur Plasmamembran sind hingegen Sec13p, Lst4p, Lst7p und Lst8p essentiell (Roberg et al., 1997). Für die Internalisierung von Gap1p ist eine Ubiquitinierung des Proteins erforderlich (Hochstrasser, 1996; Springael and Andre, 1998). Dafür nötig ist Npi1/Rsp5 eine Ubiquitin- Ligase vom HECT-Typ („Homologous to the E6-associated protein Carboxyl Terminus) (Springael and Andre, 1998). In $\Delta npi1$ - Zellen bleibt Gap1p trotz Zusatz von NH_4^+ zum Medium in einer aktiven Form an der Plasmamembran (Grenson, 1983; Hein et al., 1995). Gap1p wird an 2 Lysinresten, die sich am cytosolischen N- Terminus des Proteins befinden (an Position 9 und 16) ubiquitiniert (Soetens et al., 2001). Mutiert man diese Lysinreste (Gap1^{K9K16}), so kann Gap1p nicht mehr ubiquitiniert werden und bleibt trotz Zusatz von NH_4^+ an der Plasmamembran in einer aktiven und stabilen Form.

Npr1p, eine Proteinkinase mit einem Serin- reichen Aminoterminus, ist an der posttranskriptionalen Regulation von Gap1 beteiligt (Vandenbol et al., 1987; Vandenbol et al., 1990; Hunter and Plowman, 1997). In $\Delta npr1$ - Mutanten, die auf Harnstoff oder Prolin wachsen, ist die Transkriptionsrate von *GAP1* zwar unverändert, aber Gap1p ist inaktiv (Dubois and Grenson, 1979; Grenson, 1983). Soetens et al. konnten an Hand von *npr1*- ts Mutanten zeigen, dass Npr1p einerseits essentiell für die Stabilisierung von Gap1p an der Plasmamembran ist und andererseits auch für das Schicksal des neu synthetisierten Proteins verantwortlich ist. In *npr1*- Mutanten wird Gap1p, ohne die Plasmamembran zu erreichen, direkt zur Vakuole transportiert, ähnlich wie in Wildtypzellen nach Zusatz von NH_4^+ zum Medium. Auch für diesen direkten Transport zur Vakuole ist Ubiquitinierung nötig. In einer $\Delta npr1$ Gap1^{K9K16} Tripelmutante wird Gap1p nicht zur Vakuole transportiert, sondern akkumuliert an der Plasmamembran. Ubiquitinierung ist also nicht nur für die Internalisierung essentiell, sondern auch für den direkten Transport aus dem späten Sekretionsweg zur Vakuole (Soetens et al., 2001). Die Aktivität von Npr1p wird durch Phosphorylierung/ Dephosphorylierung reguliert. Dabei spielen die TOR Proteine eine wichtige Rolle. Bei Wachstum auf guter Stickstoffquelle wird Npr1 phosphoryliert und damit inaktiviert, während es bei Wachstum auf Prolin oder anderen schlechten Stickstoffquellen dephosphoryliert und damit aktiviert wird (Schmidt et al., 1998).

$\Delta pmr1$ - Zellen weisen einen drastischen Defekt im Aminosäuretransport auf

$\Delta pmr1$ - Zellen weisen im Vergleich zum Wildtyp auf Minimalmedium mit Prolin oder Harnstoff als einziger Stickstoffquelle einen drastischen Wachstumsdefekt

auf. Auch mit Citrullin als der einzigen Stickstoffquelle konnte dieser Wachstumsdefekt beobachtet werden. Durch Zusatz von 5- 50 mM Ca^{2+} zum Medium ließ sich das Wachstum allerdings wieder verbessern. Importmessungen mit radioaktiv markierten Aminosäuren zeigten, dass die Transportraten von Citrullin, Glutamat sowie Leucin bei einer Konzentration von 4 μM in $\Delta pmr1$ -Zellen drastisch reduziert sind (Fiebig, Doktorarbeit).

Welche Ursache könnte der drastisch reduzierte Citrullinimport in Δpmr -Zellen haben?

Hierzu wurde zunächst der hochaffine Citrullintransport in Δpmr -, $\Delta gap1$ - und Wildtypzellen bestimmt (4 μM Citrullin) und eine Kinetik für den Citrullinimport bei unterschiedlichen Citrullinkonzentrationen aufgenommen, um zu untersuchen ob die Transportaktivität von Gap1 in $\Delta pmr1$ - Zellen reduziert ist. In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss des pH- Wertes des Mediums auf die Höhe des Citrullinimports in $\Delta pmr1$ - und Wildtypzellen bestimmt. Mit Hilfe eines Gap1-GFP bzw. einem Gap1^{K9K16}-GFP Fusionsproteins wurde die Lokalisation von Gap1p und Gap1^{K9K16} in $\Delta pmr1$ - und Wildtypzellen untersucht.

4. Ergebnisse

Ca²⁺- Ausstromexperimente

Die Experimente zur Bestimmung des Ca²⁺- Ausstroms aus Hefezellen wurden analog der Versuche von Y. Eilam durchgeführt (Eilam, 1982a; Eilam, 1982b). Es wurden Einzelkolonien der jeweiligen Stämme auf SC- Platten gezüchtet (25°C). Dann wurden die Zellen in synthetisches Vollmedium überführt, dem anschließend 1 µCi/ml ⁴⁵CaCl₂ (20 mCi/mg Ca²⁺) zugesetzt wurde. Zur Äquilibration der internen Ca²⁺- Pools wurden die Zellen 24 h bei 25°C inkubiert. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert, gewaschen und in 25 mM MES- Puffer pH 5.8 unter Zusatz von 100 mM Glucose resuspendiert. Nun wurde die Zellsuspension 30 min bei permissiver bzw. restriktiver Temperatur inkubiert und der Ca²⁺- Ausstrom durch Zusatz von Mg²⁺- Ionen initiiert. Die Zellen wurden auf einem Filterpapier (Porendurchmesser 0.45µm) gesammelt und mit 20 mM MgCl₂ Lösung (eiskalt) gewaschen, um das an der Zellmembran gebundene Ca²⁺ zu verdrängen (Boutry et al., 1977; Eilam, 1982). Nach Trocknen der Proben, wurde die Radioaktivität in den Zellen mit Hilfe eines Szintillationszählers bestimmt. In den Bildern wurde das nach der Zeit t in der Zelle vorhandene radioaktive Ca²⁺ (C_t) als Anteil an der Gesamtmenge an radioaktivem Ca²⁺ zu Beginn des Experiments (C₀, t=0) in halblogarithmischem Maßstab dargestellt.

Mg²⁺ Ionen initiieren in Wildtypzellen einen Ca²⁺- Ausstrom

Zunächst wurden Experimente an den beiden Wildtypstämmen (YR1070 und YR990) durchgeführt, um deren Verhalten bezüglich des Ca²⁺- Ausstroms mit den *sec*- Mutanten vergleichen zu können. In diesen Versuchen wurde der Ca²⁺- Ausstrom durch Zugabe von 5mM MgCl₂ induziert: die Hauptmenge an Ca²⁺ ist in der Vakuole an Polyphosphatrester gebunden. Das Mg²⁺ konkurriert mit dem Ca²⁺ um die Bindungsplätze und setzt so Ca²⁺ aus der Vakuole frei (Dunn et al., 1994; Beeler et al., 1997), das dann auf bisher unbekanntem Wege aus der Zelle gelangt. Abbildung 2 zeigt diesen Ca²⁺- Ausstrom für den Wildtyp-Stamm YR1070. Bei 25°C wurden innerhalb 1 h 28% des zum Zeitpunkt t=0 (Zugabe des MgCl₂) in der Zelle vorhandenen Ca²⁺ ausgeschieden, bei 37°C betrug der Ausstrom 28%. Der Stamm YR990 (Abbildung 3) zeigt dagegen bei 37°C mit 34% einen geringfügig höheren Ausstrom von Ca²⁺ als bei 25°C (28%). Damit liegt der in unserem Stammhintergrund gemessene Ca²⁺- Ausstrom in guter Übereinstimmung mit den von Y. Eilam beobachteten Werten (Eilam, 1982) und ist nahezu unabhängig von der Inkubationstemperatur.

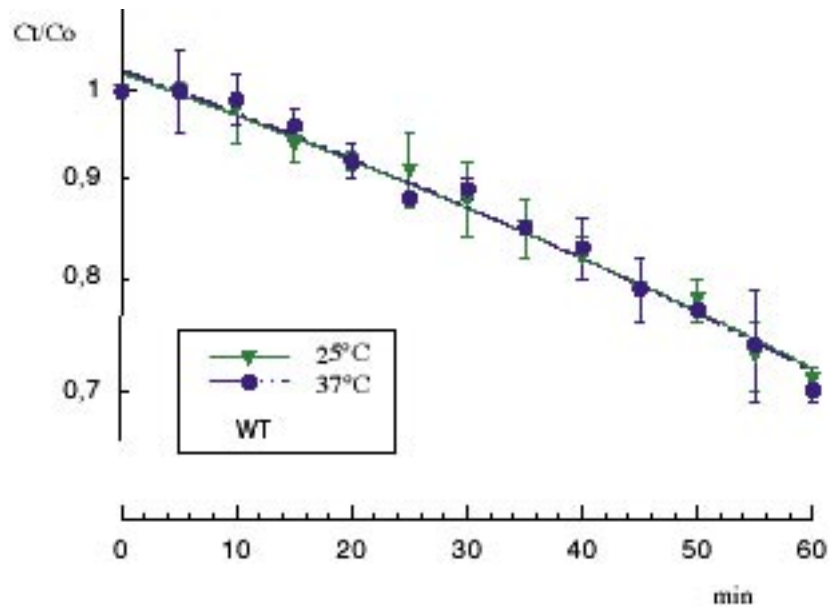


Abbildung 2: Mg²⁺ induzierter Ca²⁺- Ausstrom aus Wildtyp- Zellen (YR1070) bei 25°C und 37°C (nach Induktion mit 5mM Mg²⁺)

Zellen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben mit ⁴⁵Ca²⁺ markiert und die Ausstrommessungen wurden nach der Standardvorschrift durchgeführt. Dargestellt ist in halblogarithmischem Maßstab die Menge an intrazellulärem Ca²⁺ (C_t) zum Zeitpunkt t als Verhältnis C_t/C₀ der zu Beginn des Experiments vorhandenen Gesamtmenge C₀.

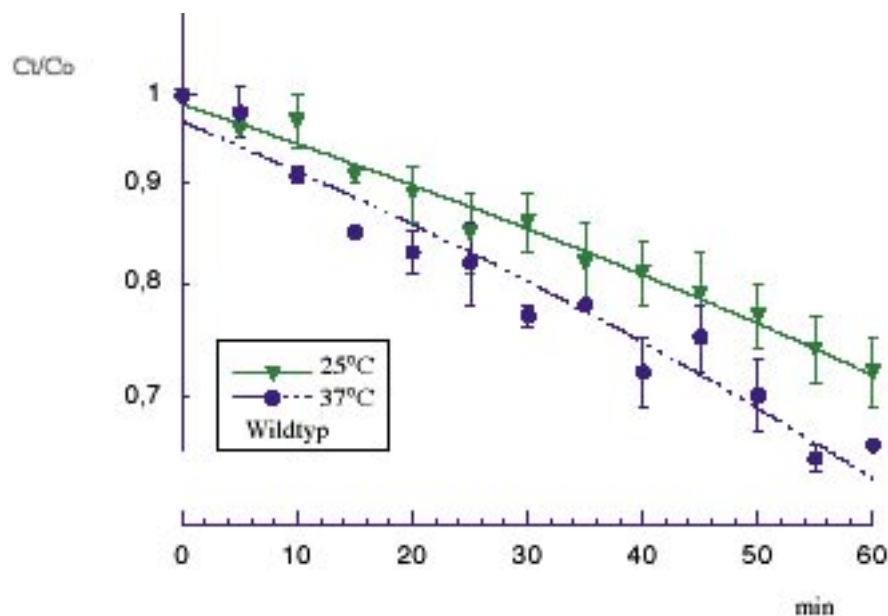


Abbildung 3: Mg²⁺ induzierter Ca²⁺- Ausstrom aus Wildtyp- Zellen (YR990) bei 25°C und 37°C (nach Induktion mit 5mM Mg²⁺)

Zellen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben mit ⁴⁵Ca²⁺ markiert und die Ausstrommessungen wurden nach der Standardvorschrift durchgeführt. Dargestellt ist in halblogarithmischem Maßstab die Menge an intrazellulärem Ca²⁺ (C_t) zum Zeitpunkt t als Verhältnis C_t/C₀ der zu Beginn des Experiments vorhandenen Gesamtmenge C₀.

In *sec18*- Mutanten kommt der Ca^{2+} - Ausstrom bei restriktiver Temperatur zum Erliegen

SEC18 gehört zu der Gruppe von *SEC*- Genen, deren Produkte für sämtliche Fusionen von Transportvesikeln mit zellulären Membranen essentiell sind. Somit wird Sec18p für die Fusion von ER- Vesikeln mit dem Golgi, für den intra- Golgi Transport und für die Fusion von Transportvesikeln mit der Plasmamembran benötigt. Da in einer konditionellen *sec18*- Mutante bei restriktiven Bedingungen sämtliche Fusionsprozesse zum Erliegen kommen, sollte auch der durch Mg^{2+} - Ionen initiierte Ca^{2+} - Ausstrom vollständig blockiert werden, wenn dieser Ausstrom Membranfusionen entlang des Sekretionsweges bis zur Plasmamembran benötigt. Bei 25°C zeigte eine *sec18*- Mutanten (YR992) unter Zusatz von 5 mM MgCl_2 einen Ausstrom von 28%, bei restriktiven Bedingungen kommt der Ca^{2+} - Ausstrom praktisch zum Erliegen (Abbildung 4). Parallel dazu wurde noch eine weitere *sec18*- Mutante (YR1171) untersucht. Hier wurde ein Ausstrom von 30% bei 25°C beobachtet. Bei 37°C war der Ausstrom fast vollständig blockiert. Es war nur noch ein Ausstrom von 6% innerhalb 1 h zu beobachten (Abbildung 5). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass mit einer Blockade sämtlicher Fusionsprozesse im Sekretionsweg auch der Ca^{2+} - Ausstrom zum Erliegen kommt.

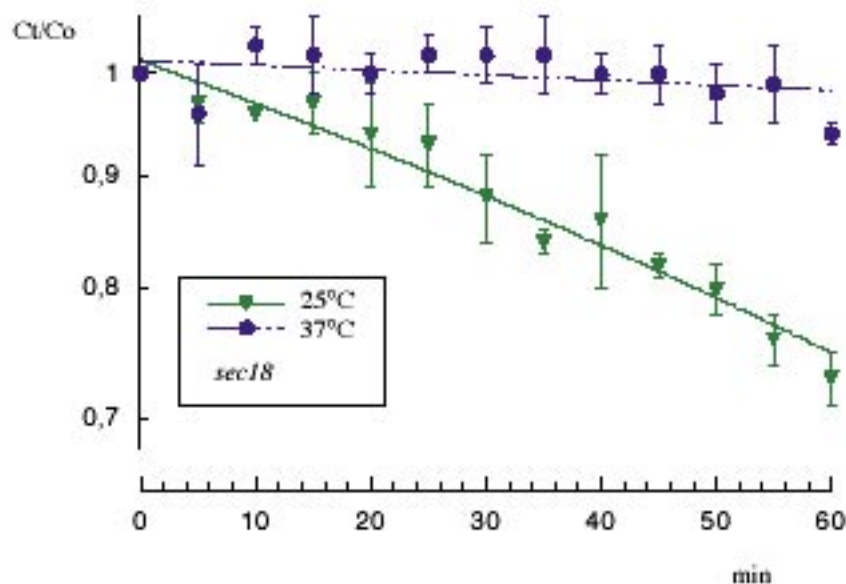


Abbildung 4: Mg^{2+} induzierter Ca^{2+} - Ausstrom aus *sec18*- Zellen (YR992) bei 25°C und 37°C (nach Induktion mit 5mM Mg^{2+})

Zellen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben mit $^{45}\text{Ca}^{2+}$ markiert und die Ausstrommessungen wurden nach der Standardvorschrift Variation 1 durchgeführt. Dargestellt ist in halblogarithmischem Maßstab die Menge an intrazellulärem Ca^{2+} (C_t) zum Zeitpunkt t als Verhältnis C_t/C_0 der zu Beginn des Experiments vorhandenen Gesamtmenge C_0 .

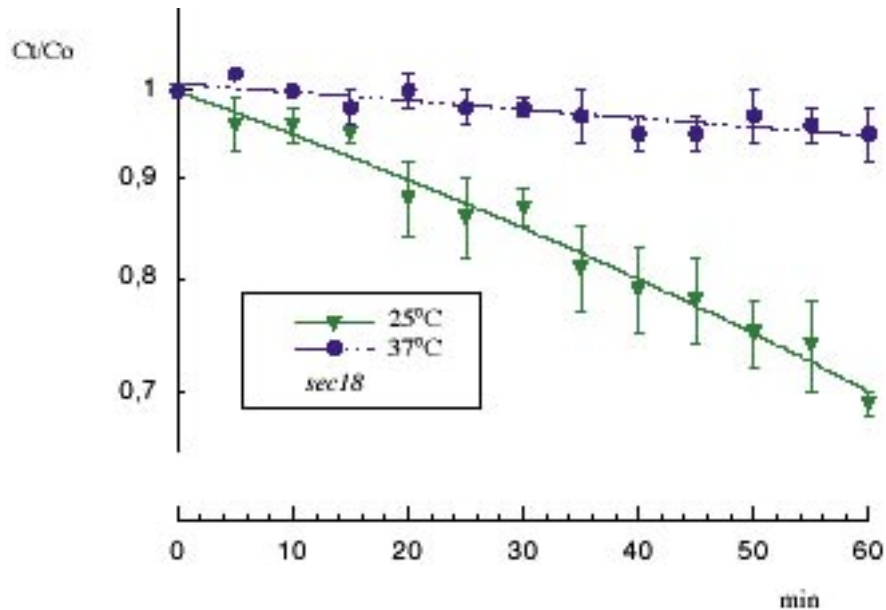


Abbildung 5: Mg^{2+} induzierter Ca^{2+} - Ausstrom aus *sec18*- Zellen (YR1171) bei 25°C und 37°C (nach Induktion mit 5mM Mg^{2+})

Zellen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben mit $^{45}Ca^{2+}$ markiert und die Ausstrommessungen wurden nach der Standardvorschrift durchgeführt. Dargestellt ist in halblogarithmischem Maßstab die Menge an intrazellulärem Ca^{2+} (C_t) zum Zeitpunkt t als Verhältnis C_t/C_0 der zu Beginn des Experiments vorhandenen Gesamtmenge C_0 .

In „späten“ *sec* - Mutanten ist der Ca^{2+} - Ausstrom blockiert

„Späte“ *SEC*- Gene sind für die Fusion von Sekretionsvesikeln mit der Plasmamembran essentiell. Bei restriktiven Bedingungen akkumulieren die entsprechenden *sec*- Mutanten Transportvesikel, die aus dem Golgi stammen und einen Durchmesser von ca. 100 nm aufweisen. Sollte der Ca^{2+} - Ausstrom aus Wildtypzellen durch die Fusion solcher Vesikel mit der Plasmamembran vermittelt werden, so wäre in „späten“ Sekretionsmutanten unter restriktiven Bedingungen kein Ca^{2+} - Ausstrom zu erwarten. Zunächst wurde der Ca^{2+} -Ausstrom aus *sec6*-Mutanten untersucht. Der Ca^{2+} - Ausstrom aus *sec6* (YR993) betrug unter Zusatz von 5 mM $MgCl_2$ 23% innerhalb 1 h. Unter restriktiven Bedingungen konnte kaum noch ein Ca^{2+} - Ausstrom beobachtet werden (2%)(Abbildung 6). Auch ohne Zusatz von $MgCl_2$ lässt sich ein Ca^{2+} - Ausstrom aus *sec6*- Zellen (YR993) beobachten. Bei 25°C wurden innerhalb 1 h 18% des zum Zeitpunkt t=0 in der Zelle vorhandenen Ca^{2+} ausgeschieden, bei restriktiven Bedingungen war der Ca^{2+} - Ausstrom nahezu blockiert (Restausstrom 1%, Abbildung 7).

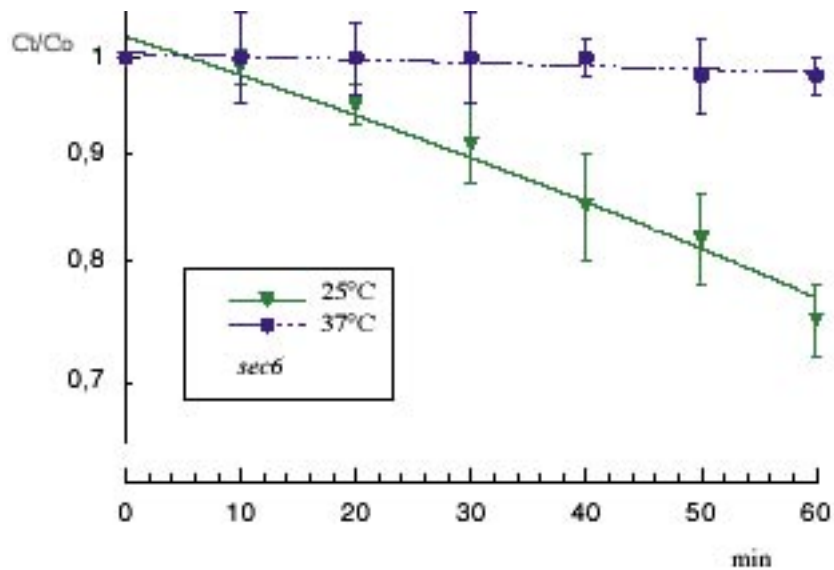


Abbildung 6: Mg^{2+} induzierter Ca^{2+} - Ausstrom aus *sec6*- Zellen (YR993) bei 25°C und 37°C (nach Induktion mit 5mM Mg^{2+})

Zellen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben mit $^{45}Ca^{2+}$ markiert und die Ausstrommessungen wurden nach der Standardvorschrift durchgeführt. Dargestellt ist in halblogarithmischem Maßstab die Menge an intrazellulärem Ca^{2+} (C_t) zum Zeitpunkt t als Verhältnis C_t/C_0 der zu Beginn des Experiments vorhandenen Gesamtmenge C_0 .

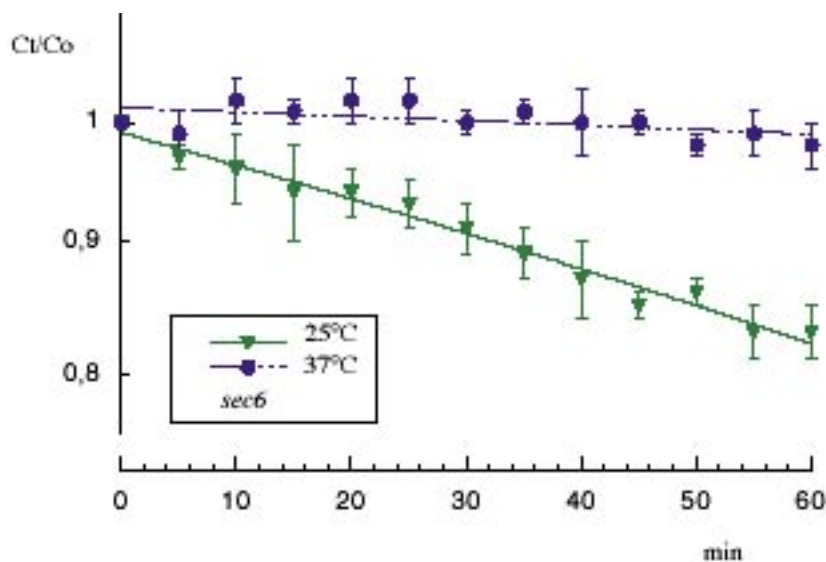


Abbildung 7: Ca^{2+} - Ausstrom aus *sec6*- Zellen (YR993) bei 25°C und 37°C (ohne Mg^{2+} Induktion)

Zellen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben mit $^{45}Ca^{2+}$ markiert und die Ausstrommessungen wurden nach der Standardvorschrift durchgeführt, aber ohne Zusatz von Mg^{2+} . Dargestellt ist in halblogarithmischem Maßstab die Menge an intrazellulärem Ca^{2+} (C_t) zum Zeitpunkt t als Verhältnis C_t/C_0 der zu Beginn des Experiments vorhandenen Gesamtmenge C_0 .

Sec1p ein weiteres Protein, das für die Fusion von post- Golgi Vesikeln mit der Plasmamembran essentiell ist. Es ist ein hydrophiles Protein, dessen genaue Funktion bisher unbekannt ist. Bei 25°C zeigte ein *sec1* Stamm (YR1056) einen Ca²⁺- Ausstrom von 24 %, bei 37°C (restriktive Bedingungen) war der Ca²⁺- Ausstrom ebenfalls vollständig blockiert (1%).

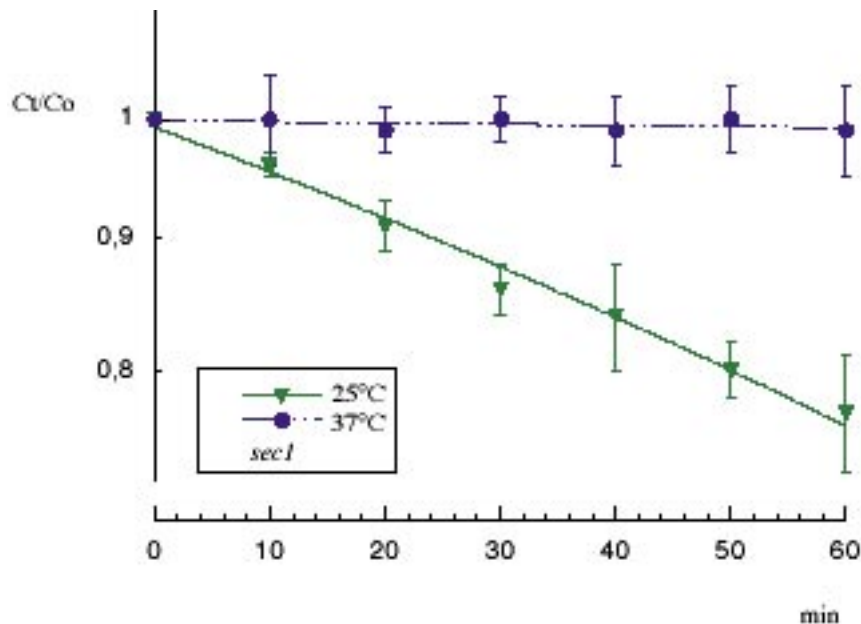


Abbildung 8: Mg²⁺ induzierter Ca²⁺- Ausstrom aus *sec1*- Zellen (YR1056) bei 25°C und 37°C (nach Induktion mit 5mM Mg²⁺)

Zellen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben mit ⁴⁵Ca²⁺ markiert und die Ausstrommessungen wurden nach der Standardvorschrift durchgeführt. Dargestellt ist in halblogarithmischem Maßstab die Menge an intrazellulärem Ca²⁺ (C_i) zum Zeitpunkt t als Verhältnis C_i/C₀ der zu Beginn des Experiments vorhandenen Gesamtmenge C₀.

Wie man aus den Messwerten für die beiden späten *sec*- Mutanten (*sec6*, *sec1*) ersehen kann, führt ein Block der Fusion von post- Golgi Vesikeln mit der Plasmamembran auch zu einer nahezu vollständigen Blockierung des Ca²⁺- Ausstroms. Ein funktionaler Sekretionsweg scheint also essentiell für den Ca²⁺- Ausstrom zu sein.

Interessant war nun die Frage, inwieweit ein Block im „frühen“ Teil des Sekretionsweges zwischen ER und Golgi auch einen Einfluss auf die Höhe des Ca²⁺- Ausstroms hat.

In „frühen“ *sec*- Mutanten ist der Ca^{2+} - Ausstrom bei restriktiven Bedingungen stark reduziert

SEC12 und *SEC13* gehören zu den „frühen“ *SEC*- Genen, deren Produkte für die Vesikelbildung aus dem ER verantwortlich sind. In konditionalen *sec12*- und *sec13*- Mutanten ist der Transport von sekretorischen Proteinen zwischen dem ER und dem Golgi bei restriktiven Temperaturen geblockt. *SEC12* ist ein essentielles Gen, dessen Produkt ein Typ II- Transmembranprotein ist, das im ER lokalisiert ist und die Bildung von sekretorischen Vesikeln aus dem ER beeinflusst, aber selbst kein Bestandteil der Transportvesikel ist (Barlowe et al., 1994; Gimeno et al., 1995). Ein *sec12*- Stamm (YR991) zeigte bei 25°C einen Ca^{2+} - Ausstrom von 29%, bei restriktiven Bedingungen einen Ca^{2+} - Ausstrom von 12%.

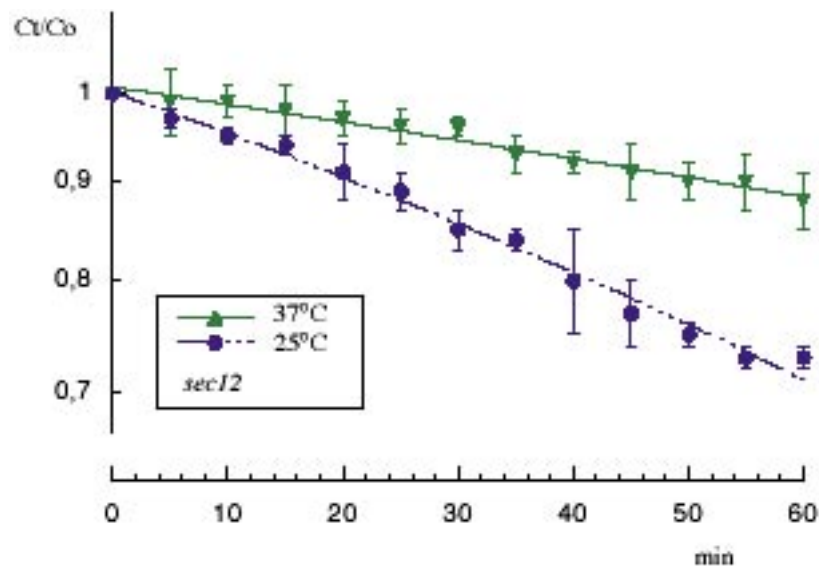


Abbildung 9: Mg^{2+} induzierter Ca^{2+} - Ausstrom aus *sec12*- Zellen (YR991) bei 25°C und 37°C (nach Induktion mit 5mM Mg^{2+})

Zellen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben mit $^{45}\text{Ca}^{2+}$ markiert und die Ausstrommessungen wurden nach Variation 2 der Standardvorschrift durchgeführt. Dargestellt ist in halblogarithmischem Maßstab die Menge an intrazellulärem Ca^{2+} (C_t) zum Zeitpunkt t als Verhältnis C_t/C_0 der zu Beginn des Experiments vorhandenen Gesamtmenge C_0 .

Sec13p ist eine Hauptkomponente des COPII „Coat“ und ist essentiell für seine Bildung (Barlowe et al., 1994; Bednarek et al., 1995). In konditionalen *sec13*-Mutanten ist unter restriktiven Bedingungen die Vesikelbildung aus dem ER blockiert. Ähnlich wie in der *sec12*- Mutante ist im *sec13*- Stamm (YR1071) ein Ca^{2+} - Ausstrom von 27% zu beobachten. unter restriktiven Bedingungen von 37°C ist der Ausstrom jedoch reduziert und beträgt nur 20% innerhalb 1 h.

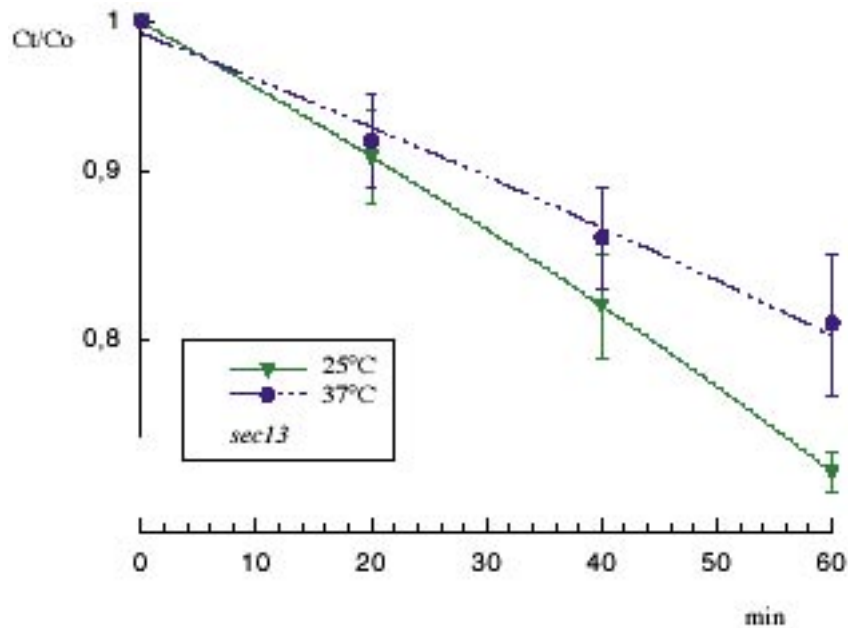


Abbildung 10: Mg^{2+} induzierter Ca^{2+} - Ausstrom aus *sec13*- Zellen (YR1071) bei 25°C und 37°C (nach Induktion mit 5mM Mg^{2+})

Zellen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben mit $^{45}\text{Ca}^{2+}$ markiert und die Ausstrommessungen wurden nach der Standardvorschrift durchgeführt. Dargestellt ist in halblogarithmischem Maßstab die Menge an intrazellulärem Ca^{2+} (C_i) zum Zeitpunkt t als Verhältnis C_i/C_o der zu Beginn des Experiments vorhandenen Gesamtmenge C_o .

Wie man erkennen kann, führt selbst ein Block im „frühen“ Teil des Sekretionswegs zu einer deutlichen Reduktion in der Höhe des Ca^{2+} - Ausstroms. Ein erheblicher Teil des freigesetzten Ca^{2+} scheint also aus dem ER zu stammen. Pmr1 pumpt Ca^{2+} und Mn^{2+} in den Sekretionsweg und ist hauptsächlich im Golgi lokalisiert, eine Deletion von *PMR1* hat aber nicht nur einen Einfluss auf die Ca^{2+} - Konzentration im Golgi sondern auch auf die Ca^{2+} - Konzentration im ER. So weisen $\Delta pmr1$ - Zellen im ER eine um 50% niedrigere Ca^{2+} - Konzentration auf als der entsprechende Wildtyp (Strayle et al., 1999). Welchen Einfluss hat nun eine Deletion von *PMR1* auf die Höhe des Ca^{2+} - Ausstroms?

In $\Delta pmr1$ - Zellen lässt sich kein durch Mg^{2+} initiiertes Ca^{2+} - Ausstrom beobachten

$\Delta pmr1$ - Zellen sollten nach unserer Hypothese- wenn Ca^{2+} tatsächlich in Transportvesikel eingeschlossen entlang des Sekretionsweges zur Plasmamembran gelangen sollte- keinen oder zumindest einen drastisch reduzierten Ca^{2+} - Ausstrom zeigen, sofern nicht die Überexpression von Pmc 1p oder anderer Transportsysteme in $\Delta pmr1$ - Zellen, einen Teil des Ca^{2+} - Transports in den Sekretionsweg übernimmt. Um diese Frage zu klären wurden Ca^{2+} - Ausstromexperimente in 2 verschiedenen Stammhintergründen durchgeführt. Der Wildtypstamm YR98 (S288C) zeigte unter Zusatz von 5 mM $MgCl_2$ einen Ca^{2+} - Ausstrom von 10% innerhalb einer Stunde, während in $\Delta pmr1$ - Zellen (YR122) kein Ca^{2+} - Ausstrom zu beobachten war (Abbildung 11). Auch im W303- Stammhintergrund war in $\Delta pmr1$ - Zellen kein Ca^{2+} - Ausstrom nachzuweisen. Initiiert man allerdings den Ca^{2+} - Ausstrom

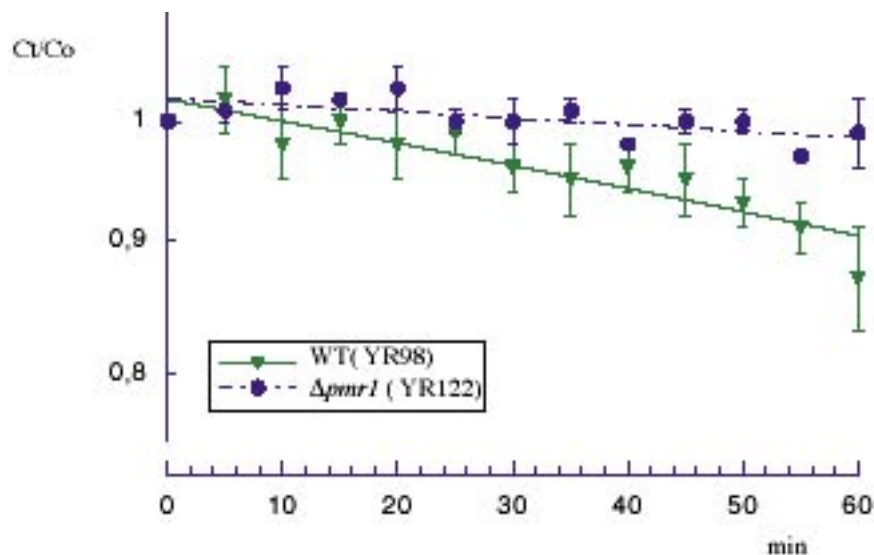


Abbildung 11: Mg^{2+} induzierter Ca^{2+} - Ausstrom aus Wildtyp- Zellen (YR98) und $\Delta pmr1$ - Zellen (YR122) bei 25°C (nach Induktion mit 5mM Mg^{2+})

Zellen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben mit $^{45}Ca^{2+}$ markiert, gewaschen und sofort in 25 mM MES-Puffer pH 5.8 unter Zusatz von 100mM Glucose resuspendiert. Dann wurde der Ausstrom durch Zusatz von 5mM $MgCl_2$ initiiert. Dargestellt ist in halblogarithmischem Maßstab die Menge an intrazellulärem Ca^{2+} (C_t) zum Zeitpunkt t als Verhältnis C_t/C_0 der zu Beginn des Experiments vorhandenen Gesamtmenge C_0 .

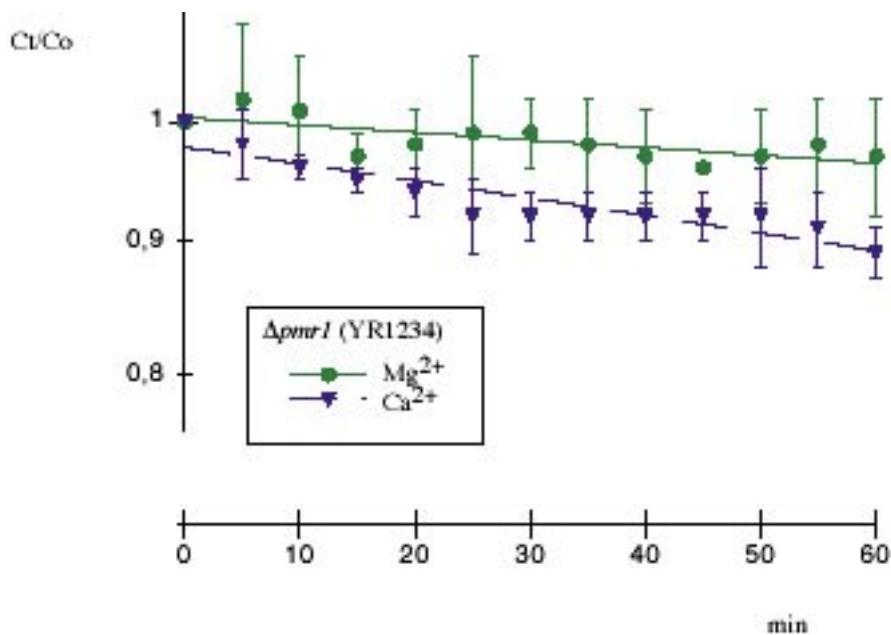


Abbildung 12: Mg^{2+} bzw. Ca^{2+} induzierter Ca^{2+} - Ausstrom aus $\Delta pmr1$ -Zellen (YR1234) bei $25^\circ C$

Zellen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben mit $^{45}Ca^{2+}$ markiert, gewaschen und sofort in 25 mM MES-Puffer pH 5.8 unter Zusatz von 100mM Glucose resuspendiert. Dann wurde der Ausstrom durch Zusatz von 5mM $MgCl_2$ bzw. 5mM $CaCl_2$ initiiert. Dargestellt ist in halblogarithmischem Maßstab die Menge an intrazellulärem Ca^{2+} (C_i) zum Zeitpunkt t als Verhältnis C_i/C_0 der zu Beginn des Experiments vorhandenen Gesamtmenge C_0 .

Aus den Ergebnissen der vorangegangenen Experimente lässt sich zusammenfassend schließen, dass ein funktionaler Sekretionsweg für den Ca^{2+} -Ausstrom essentiell ist. Blockiert man den späten Teil des Sekretionsweges so kommt der Ca^{2+} - Ausstrom völlig zum Erliegen, aber auch ein Block im „frühen“ Teil führt zu einer drastischen Reduktion des Ca^{2+} - Ausstroms. Dies kann zum einen darin begründet sein, dass Ca^{2+} verpackt in sekretorische Vesikel entlang des Sekretionsweges in Richtung Plasmamembran transportiert wird und dann bei der Fusion dieser Vesikel mit der Plasmamembran aus der Zelle freigesetzt wird. Eine andere Erklärung wäre aber auch das Vorliegen eines instabilen oder nur unter bestimmten Bedingungen an der Plasmamembran vorliegenden Ca^{2+} -Transportsystems (Pumpe, Antiporter), das über den Sekretionsweg ständig zur Plasmamembran nachgeliefert werden muss.

Ein Block der Proteinsynthese mittels Cycloheximid führt zu keiner Reduktion in der Höhe des Ca^{2+} - Ausstroms

Sollte tatsächlich ein kurzlebiges Ca^{2+} - Transportsystem an der Plasmamembran vorliegen, so müsste dieses zur Aufrechterhaltung des Ca^{2+} - Ausstroms ständig über den Sekretionsweg nachgeliefert werden. Dies sollte in einem Experiment an dem Wildtypstamm YR990 überprüft werden, in dem die Proteinsynthese durch Zusatz von $180 \mu\text{g/ml}$ Cycloheximid gehemmt wurde. Cycloheximid blockiert die Peptidelongation bei der Translation, indem sie die Petidyltransferase hemmt (Cooper et al., 1967). Die Blockierung der Proteinsynthese sollte zu einer Verarmung der Plasmamembran an Ca^{2+} -Transportsystem führen und damit zu einer Blockierung des Ca^{2+} - Ausstroms. Wie man aber aus Abbildung 13 erkennen kann, hat der Zusatz von Cycloheximid keinen Einfluss auf die Höhe des Ca^{2+} - Ausstroms. Der Wildtypstamm YR 990 zeigte bei 25°C ohne Zusatz von Cycloheximid einen Ca^{2+} - Ausstrom von 29% innerhalb 1 h, unter Zusatz von Cycloheximid betrug der Ausstrom ebenfalls 29%. Die Existenz eines kurzlebigen Transportsystems an der Plasmamembran lässt sich mit diesen Beobachtungen ausschließen.

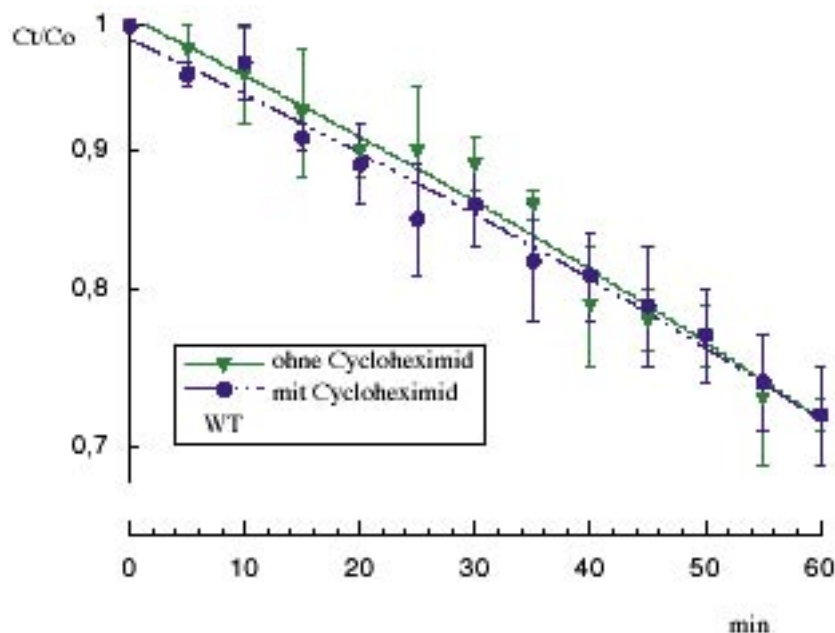


Abbildung 13: Mg^{2+} induzierter Ca^{2+} - Ausstrom aus Wildtyp-Zellen (YR990) unter Blockierung der Proteinneusynthese mit Cycloheximid bei 25°C (nach Induktion mit 5mM Mg^{2+})

Zellen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben mit $^{45}\text{Ca}^{2+}$ markiert und die Ausstrommessungen wurden nach Standardvorschrift durchgeführt unter Zusatz von $180 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ Cycloheximid zum Ausstrompuffer. Dargestellt ist in halblogarithmischem Maßstab die Menge an intrazellulärem Ca^{2+} (C_t) zum Zeitpunkt t als Verhältnis C_t/C_0 der zu Beginn des Experiments vorhandenen Gesamtmenge C_0 .

Auch ein stabiles zwischen Plasmamembran und pre- vakuolärem Kompartiment re- zirkulierendes Transportsystem scheint nicht vorzuliegen

Möglich wäre aber auch das Vorliegen eines stabilen Transportsystems, das über Endocytose internalisiert wird und ständig zwischen pre- vakuolärem Kompartiment und der Plasmamembran re- zirkuliert. Zu diesem Zweck wurden Ca^{2+} - Ausstrommessungen an einer *sec6 end3* Doppelmutante (YR1087) durchgeführt. Da in einer *end3* Mutante die endocytotische Internalisierung blockiert ist, sollte das mögliche Transportsystem an der Plasmamembran verbleiben und damit der Ca^{2+} - Ausstrom unabhängig vom Sekretionsweg sein. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde der Ca^{2+} - Ausstrom durch Zugabe von 5 mM MgCl_2 bei 25°C initialisiert und die Zellen 30 min bei 25°C inkubiert, dann wurde die Temperatur spontan auf 37°C erhöht um den Sekretionsweg zu blockieren.

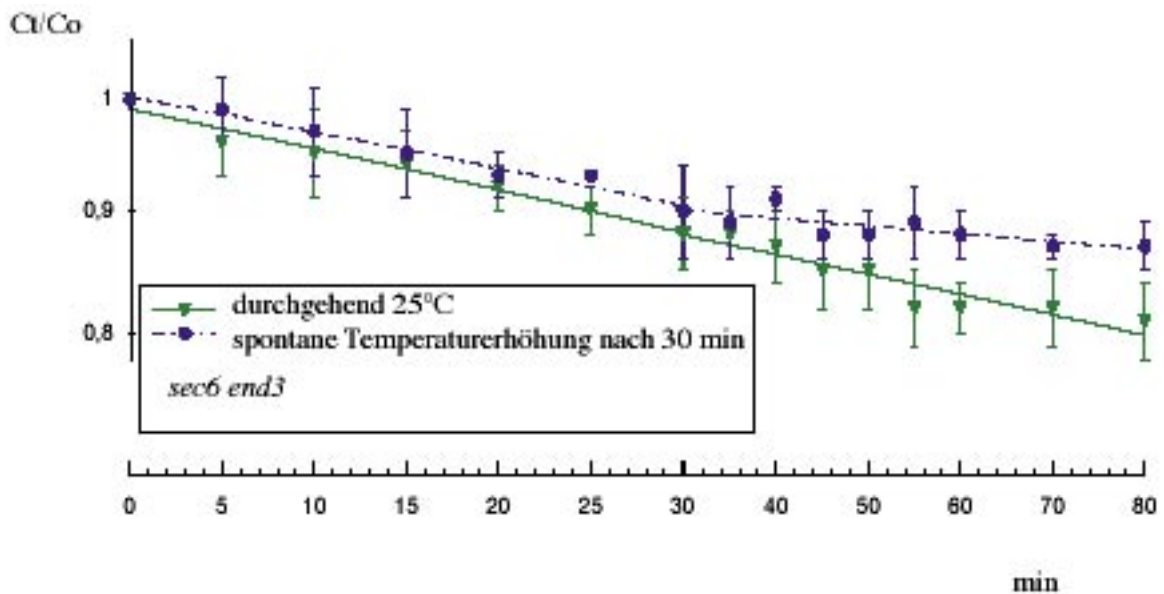


Abbildung 14: Mg^{2+} induzierter Ca^{2+} - Ausstrom aus *sec6 end3*- Zellen (YR 1087). Ausstrom wurde bei 25°C induziert , nach 30 min wurde der „späte“ Teil des Sekretionsweges durch eine spontane Temperaturerhöhung auf 37°C blockiert.

Die Zellen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben mit $^{45}\text{Ca}^{2+}$ markiert, die Ausstrommessungen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben durchgeführt. Dargestellt ist in halblogarithmischem Maßstab die Menge an intrazellulärem Ca^{2+} (C_t) zum Zeitpunkt t als Verhältnis C_t/C_0 der zu Beginn des Experiments vorhandenen Gesamtmenge C_0

Wie man aus Abbildung 14 ersehen kann, findet in den ersten 30 min des Experiments unter permissiven Bedingungen ein Ca^{2+} - Ausstrom von etwa 10% statt, nach Temperaturerhöhung auf 37°C kommt der Ausstrom zum Erliegen, während er bei dem entsprechenden Experiment ohne spontane Temperaturerhöhung weiterhin anhält. Dies zeigt, dass der Ca^{2+} - Ausstrom auch in einer *end3 sec6* Doppelmutante abhängig vom Sekretionsweg ist. Sofern es keinen weiteren, bisher unbekanntem und von End3p unabhängigen Weg gibt, ein Transportprotein von der Plasmamembran zu internalisieren, muß angenommen werden, dass ein Transportsystem, das zwischen pre-vakuolärem Kompartiment und der Plasmamembran re- zirkuliert nicht vorliegt.

***sec61* und *sec62* Stämme zeigen einen Ca^{2+} - Ausstrom, der bei restriktiven Bedingungen nicht reduziert ist**

Sowohl an „späten“, also auch an „frühen“ *sec*- Mutanten konnte eine Abhängigkeit des Ca^{2+} - Ausstroms vom Sekretionsweg beobachtet werden. In *sec*- Mutanten kommt die Expansion der Zelloberfläche bei restriktiven Bedingungen abrupt zum Stillstand, obwohl die Proteinsynthese noch einige Stunden weiter anhält (Novick and Schekman, 1983). Ist das Erliegen bzw. die drastische Reduktion des Ca^{2+} - Ausstroms eventuell eine Konsequenz eines Nichtwachstums? Zeigen Zellen die aufgrund einer Blockierung des Sekretionsweges nicht wachsen können grundsätzlich einen reduzierten Ca^{2+} - Ausstrom? Um dieser Frage zu klären, wurde der Ca^{2+} - Ausstrom aus Zellen untersucht, in denen der Proteinimport in das ER bei restriktiven Temperaturen blockiert ist. Sec61p ist ein 52 kDa ER Protein (Stirling et al., 1992), das das Kernstück der zentralen Translokationspore in das ER bildet (Müsch et al., 1992; Sanders et al., 1992; Stirling et al., 1992). *sec61*- Zellen zeigten bei 25°C einen Ca^{2+} - Ausstrom von 16% innerhalb 1 h, bei restriktiver Temperatur betrug der Ausstrom 17% (Abbildung 15).

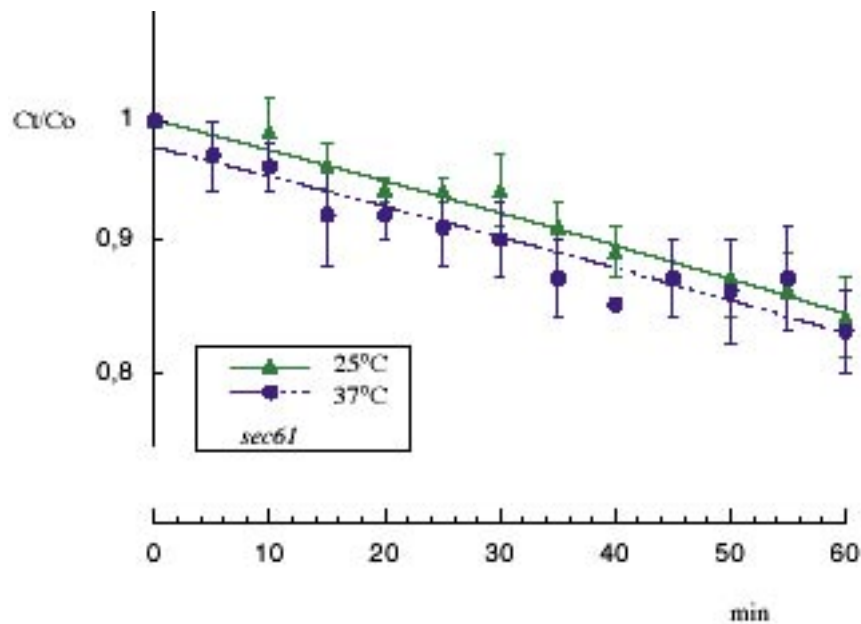


Abbildung 15: Mg^{2+} induzierter Ca^{2+} - Ausstrom aus *sec61*- Zellen (YR1065) bei 25°C und 37°C (nach Induktion mit 5mM Mg^{2+})

Zellen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben mit $^{45}Ca^{2+}$ markiert und die Ausstrommessungen wurden nach Variation 2 der Standardvorschrift durchgeführt. Dargestellt ist in halblogarithmischem Maßstab die Menge an intrazellulärem Ca^{2+} (C_t) zum Zeitpunkt t als Verhältnis C_t/C_0 der zu Beginn des Experiments vorhandenen Gesamtmenge C_0 .

Sec62p ist ebenfalls ein integrales Membranprotein im ER, es ist Bestandteil des SEC63- Komplexes und wird für die Proteintranslokation in das ER benötigt. (Deshaies and Schekman, 1989; Rothblatt et al., 1989; Sadler et al., 1989). Auch die *sec62*- Mutante zeigte bei restriktiven Bedingungen keine Blockierung des Ca^{2+} - Ausstroms. So war ein Ausstrom von 16% bei 25°C und ein Ausstrom von 17% bei 37°C zu beobachten (Abbildung 16). Eine Blockierung des Sekretionsweges hat also nicht automatisch eine Reduktion oder den Verlust des Ca^{2+} - Ausstroms zur Folge.

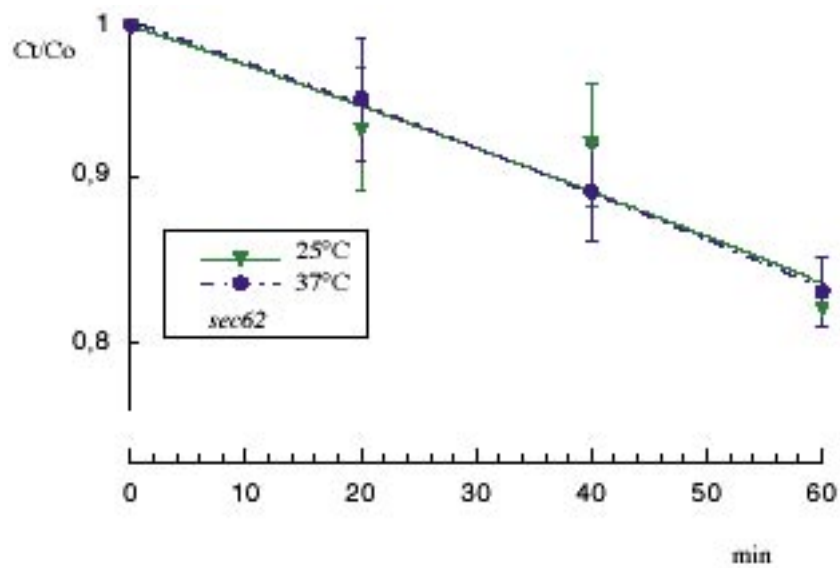


Abbildung 16: Mg^{2+} induzierter Ca^{2+} - Ausstrom aus *sec62*- Zellen (YR1260) bei 25°C und 37°C (nach Induktion mit 5mM Mg^{2+})

Zellen wurden wie in Materialien und Methoden beschrieben mit $^{45}Ca^{2+}$ markiert und die Ausstrommessungen wurden nach der Standardvorschrift durchgeführt. Dargestellt ist in halblogarithmischem Maßstab die Menge an intrazellulärem Ca^{2+} (C_t) zum Zeitpunkt t als Verhältnis C_t/C_0 der zu Beginn des Experiments vorhandenen Gesamtmenge C_0 .

Citrullintransport in *pmr1*- Mutanten

Ausgangspunkt der folgenden Untersuchungen war die Feststellung, dass *pmr1*- Mutanten auf Minimalmedium mit Prolin oder Harnstoff als einzige Stickstoffquelle einen drastischen Wachstumsdefekt aufweisen (Bandzuchova und Rudolph, unveröffentlicht). Ein Wachstumsdefekt wurde auch beobachtet, wenn Citrullin als einzige Stickstoffquelle zugesetzt wurde (Fiebig, Doktorarbeit). Anhand von Aminosäure- Transportexperimenten mit radioaktiv markiertem Citrullin, Glutamat und Leucin konnte gezeigt werden, dass die hochaffine Aufnahme bei niederen Konzentrationen an Aminosäuren in *pmr1*- Mutanten im Vergleich zum Wildtyp drastisch reduziert ist und insbesondere die Fähigkeit zur Aufnahme von Citrullin fast völlig fehlt (Fiebig, Doktorarbeit). Um zu überprüfen ob die hochaffine Citrullinaufnahme (4 μ M Citrullin) ausschließlich über Gap1p („general aminoacid permease“), einer Aminosäurepermease mit breiter Substratspezifität erfolgt, wurden Aminosäureaufnahmeexperimente in Δ *gap1*- Mutanten durchgeführt. In diesen Experimenten wurden zunächst Wildtyp-, Δ *gap1*- und Δ *pmr1*- Zellen mit einem leeren *URA3*- Plasmid bzw. mit einem *GAP1*, *GAP1::HA* bzw. *GAP1::GFP* Plasmid transformiert. Die Zellen wurden über Nacht in einem synthetischen Kompletmedium unter Selektion auf das Plasmid kultiviert und 3 h in Minimalmedium mit Prolin als einziger Stickstoffquelle inkubiert. Dies führt sowohl in Wildtypzellen als auch in *pmr1*- Zellen zu einer vollständigen Expression von Gap1p (Fiebig, Doktorarbeit). Unter Zusatz von 4 μ M Citrullin, konnte in Δ *gap1*- Zellen keine Citrullinaufnahme beobachtet werden, die Citrullinaufnahme erreichte allerdings wieder fast die Aufnahmemenge des Wildtyps in den mit *GAP1*- Plasmiden (*GAP1::HA*, *GAP1* und *GAP1::GFP*) transformierten Zellen. Dies zeigt einerseits, dass die Citrullinaufnahme bei einer Konzentration von 4 μ M ausschließlich über die Aminosäurepermease Gap1p erfolgt und andererseits, dass ein GAP1-HA bzw. GAP-GFP Fusionsprotein voll funktional ist. Δ *pmr1*- Zellen zeigen eine ähnlich niedrige Citrullinaufnahme wie Δ *gap1*- Mutanten. Allerdings lässt sich im Gegensatz zu Δ *gap1*- Zellen die Citrullinaufnahme durch Transformation mit einem *GAP1::HA* Plasmid nicht wieder herstellen. Die Aminosäurepermease Gap1p ist also in *pmr1*- Mutanten für die hochaffine Aufnahme von Citrullin inaktiv

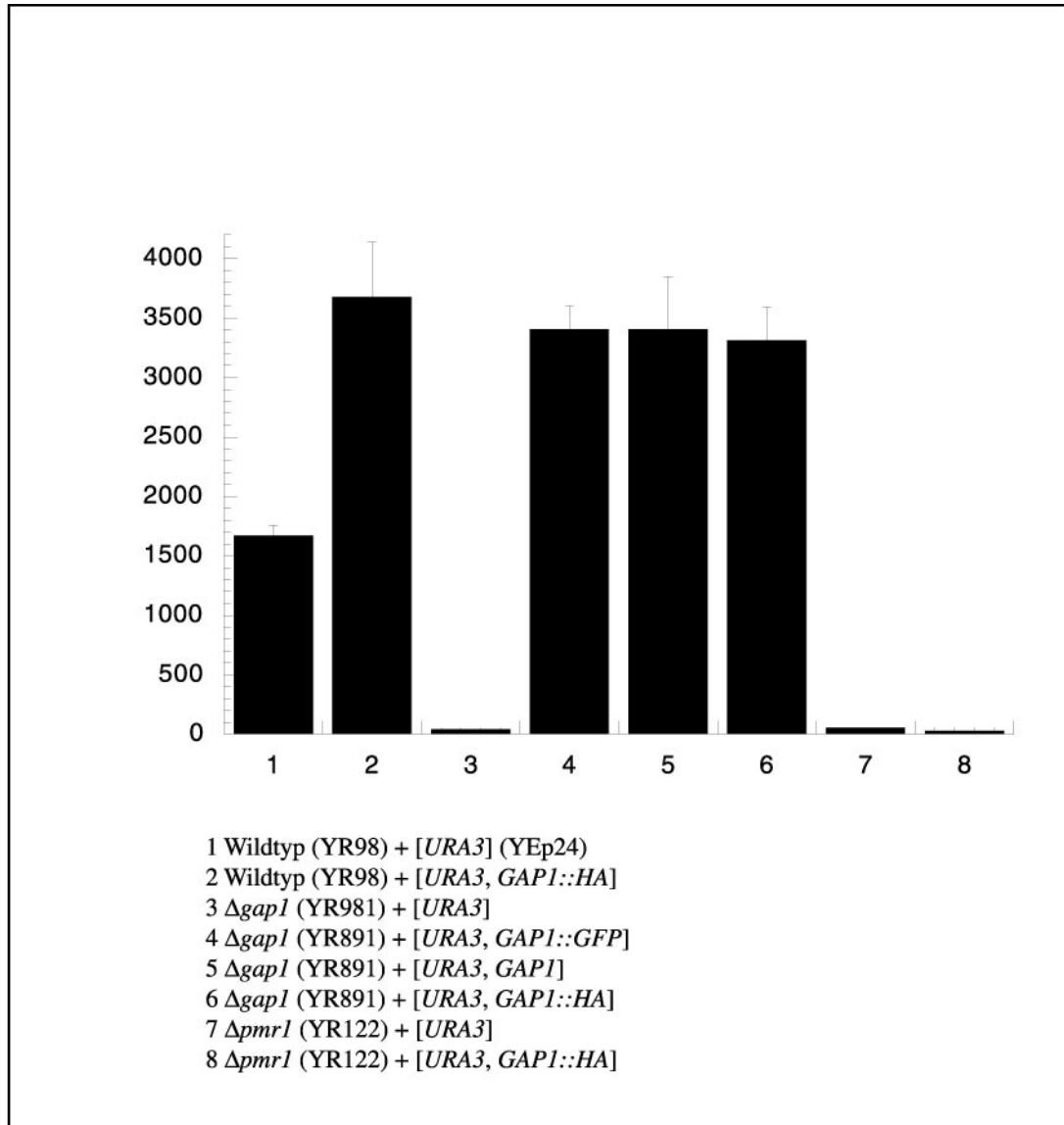


Abbildung 17: Citrullinaufnahme bei einer Citrullinkonzentration von 4 μ M (hochaffine Aufnahmebedingungen)

Wildtyp- (YR98), $\Delta gap1$ - (YR891) und $\Delta pmr1$ - Zellen (YR122) wurden mit einem 2 μ , URA3 bzw. GAPI, GAPI::HA, GAPI::GFP Plasmiden transformiert. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ 0.3 in CM-Medium unter Selektion auf das Plasmid kultiviert, dann für 3h in SMM-Medium mit Prolin als einziger N-Quelle inkubiert und die Citrullinaufnahme wurde wie in Materialien und Methoden beschrieben bei einer Citrullin-Konzentration von 4 μ M bestimmt. (Plasmide BR708, BR711, BR720)

Unter gepufferten Bedingungen erhöht sich die Citrullinaufnahme von $\Delta pmr1$ - Zellen leicht

Da der Aminosäuretransport über die Plasmamembran von einem elektrochemischen Membranpotential angetrieben wird, das durch die Plasmamembran H^+ -ATPase Pma1p erzeugt wird, wäre es möglich, dass das fast völlige Fehlen einer Citrullinaufnahme in $\Delta pmr1$ - Zellen durch eine reduzierte Funktion von Pma1p verursacht wird. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden Citrullinaufnahme- Experimente bei einer Citrullinkonzentration von $4 \mu M$ bei unterschiedlichem pH in gepuffertem und ungepuffertem Medium unternommen. Unter ungepufferten Bedingungen läßt sich sowohl im Wildtyp als auch in der $pmr1$ - Mutante eine leichte Zunahme der Importmenge beobachten bei einer Abnahme des pH von 5.4 auf 4.0, aber die aufgenommene Citrullinmenge in $\Delta pmr1$ - Zellen ist weiterhin drastisch reduziert im Vergleich zum Wildtyp. Unter gepufferten Bedingungen sind die aufgenommenen Citrullinmengen im Wildtyp bei pH 4, 4.6 und 5.4 annähernd gleich und im Vergleich zu den entsprechenden ungepufferten Bedingungen nur leicht erhöht. In der $\Delta pmr1$ - Mutante erhöht sich die aufgenommene Menge an Citrullin im Vergleich zu den ungepufferten Bedingungen jedoch drastisch, wobei aber die aufgenommenen Mengen an Citrullin immer noch um den Faktor 2 niedriger liegen als im Wildtyp. Das Puffern des Mediums scheint also den Aminosäuretransport von $\Delta pmr1$ - Mutanten zu stimulieren.

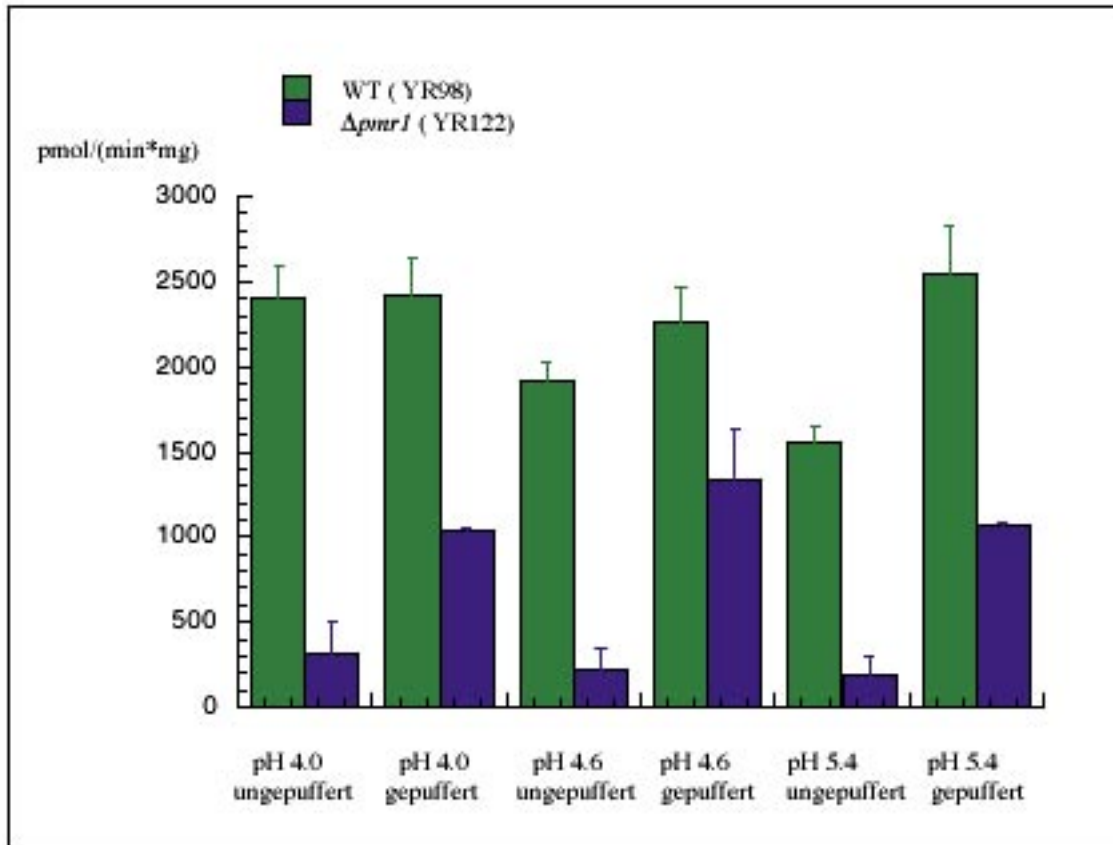


Abbildung 18: Citrullinaufnahme bei einer Citrullinkonzentration von 4 μ M in Abhängigkeit vom pH (hochaffine Aufnahmebedingungen)

Wildtyp- (YR98) und $\Delta pmr1$ - Zellen (YR122) wurden bis zu einer OD_{600} 0.3 in YPD Medium kultiviert, dann 3h in SMM- Medium mit Prolin als einziger N- Quelle inkubiert. Die Citrullinaufnahme wurde bei einer Citrullinkonzentration von 4 μ M in MM-Medium bei pH 4.0, pH 4.6, pH 5.4 (ungepuffert und gepuffert) wie in Materialien und Methoden beschrieben bestimmt.

Um zu überprüfen, ob die Pma1p- Aktivität in $pmr1$ - Zellen tatsächlich reduziert ist, wurden Protonenausstrommessungen an gehungerten Wildtyp- und $pmr1$ - Zellen durchgeführt. Dieser Assay korreliert mit der H^+ - ATPase Aktivität (Goossens et al., 2000). Es konnte allerdings kein Unterschied zwischen $pmr1$ - Mutanten und den entsprechenden Wildtypzellen beobachtet werden (Elbs und Rudolph, unveröffentlicht). Eine reduzierte Aktivität der Plasmamembran H^+ - ATPase ist also nicht die Ursache für die stark reduzierte Citrullinaufnahme Menge in $pmr1$ - Zellen.

Ist Gap1p in $\Delta pmr1$ - Zellen mislokalisiert?

Eine andere mögliche Erklärung für die stark reduzierte Citrullinaufnahme könnte eine Mislokalisierung von Gap1p in *pmr1*- Zellen sein. Um die Lokalisation von Gap1p zu untersuchen wurden Wildtyp- und *pmr1*- Zellen mit einem Plasmid transformiert auf dem Gap1::GFP unter dem induzierbaren Galactosepromotor steht. Die Zellen wurden bis zu einer OD_{600} 0.6 in SC- Medium kultiviert und für die Expression von Gap1::GFP über Nacht in einem Minimalmedium mit Prolin als die einzige Stickstoffquelle und Zusatz von Galactose und Selektion auf das Plasmid inkubiert. Dann wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 488 nm betrachtet. Bei dieser Wellenlänge zeigen Zellen, die Gap1::GFP nicht exprimieren keine Fluoreszenzfärbung (nicht gezeigt). Beim Wildtyp erkennt man deutlich eine ringförmige Färbung um die Plasmamembran, sowie viele punktförmige Strukturen im Cytosol, eine Färbung der Vakuole erkennt man in einzelnen Zellen. In der *pmr1*- Mutante erkennt man ebenfalls die ringförmige Färbung entlang der Plasmamembran und zusätzlich eine kräftige Färbung der Vakuole, die punktförmigen Strukturen im Cytosol fehlen fast gänzlich. Die Hauptmenge von Gap1-GFP scheint sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante intrazellulär lokalisiert zu sein, der Anteil von Gap1-GFP an der Plasmamembran scheint jedoch in $\Delta pmr1$ - Zellen nicht reduziert zu sein.

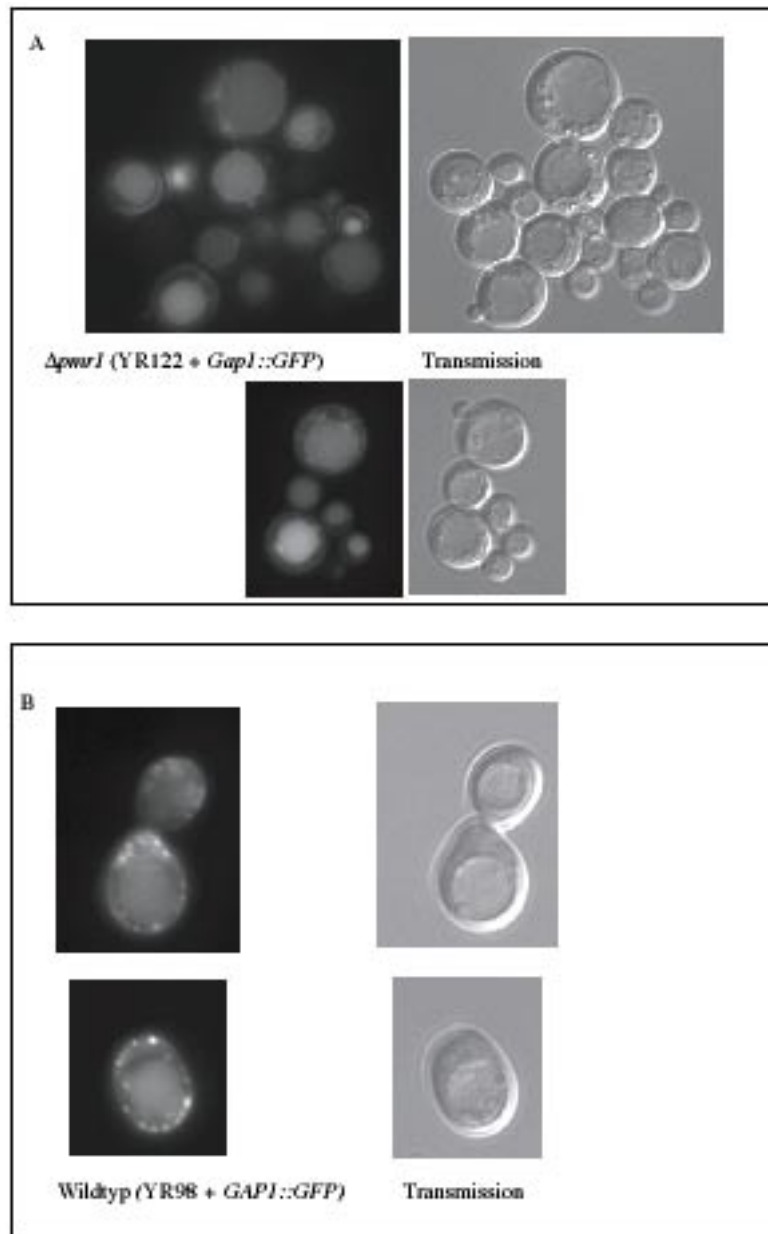


Abbildung 19: Lokalisation von Gap1 in $\Delta pmr1$ - (YR122) und Wildtypzellen (YR98), die mit einem *GALI::GAPI::GFP* Plasmid transformiert wurden. Gap1p gelangt sowohl in Wildtypzellen (B) als auch in $\Delta pmr1$ - Zellen (A) zu einem Teil an die Plasmamembran. Im Unterschied zum Wildtyp ist ein grosser Teil von Gap1 in der Vakuole lokalisiert. Zellen wurden bis zu einer OD_{600} 0.6 in CM- Medium unter Selektion auf das Plasmid kultiviert und über Nacht in SMM mit Prolin als einziger N-Quelle sowie unter Zusatz von Galaktose inkubiert. Zellen wurden bei 488 nm im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Ebenfalls gezeigt sind die Transmissionsbilder.

Ist Ubiquitinierung für den Transport von Gap1p zur Vakuole auch in $\Delta pmr1$ - Zellen essentiell?

Als nächstes wurden Wildtyp- und *pmr1*- Zellen mit einem *GAP1^{K9K16}::GFP* Plasmid transformiert. Das Protein Gap1^{K9K16}, kann nicht ubiquitiniert werden, da die Ubiquitinierungsstellen (2 Lysinreste am Aminoterminus) fehlen. Ubiquitinierung ist essentiell für die endocytotische Internalisierung von Gap1p von der Plasmamembran und damit für die Degradation von Gap1p in der Vakuole. Unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennt man deutlich eine kräftige ringförmige Färbung entlang der Plasmamembran, sowohl im Wildtyp als auch in der *pmr1*- Mutante. Die punktförmigen Strukturen im Cytosol fehlen gänzlich, ebenso ist keinerlei Färbung der Vakuole zu beobachten. *Gap1^{K9K16}::GFP* scheint also im Wildtyp als auch in der Mutante ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiert zu sein. Ubiquitinierung von Gap1p ist also auch in $\Delta pmr1$ - Zellen für die endocytotische Internalisierung essentiell.

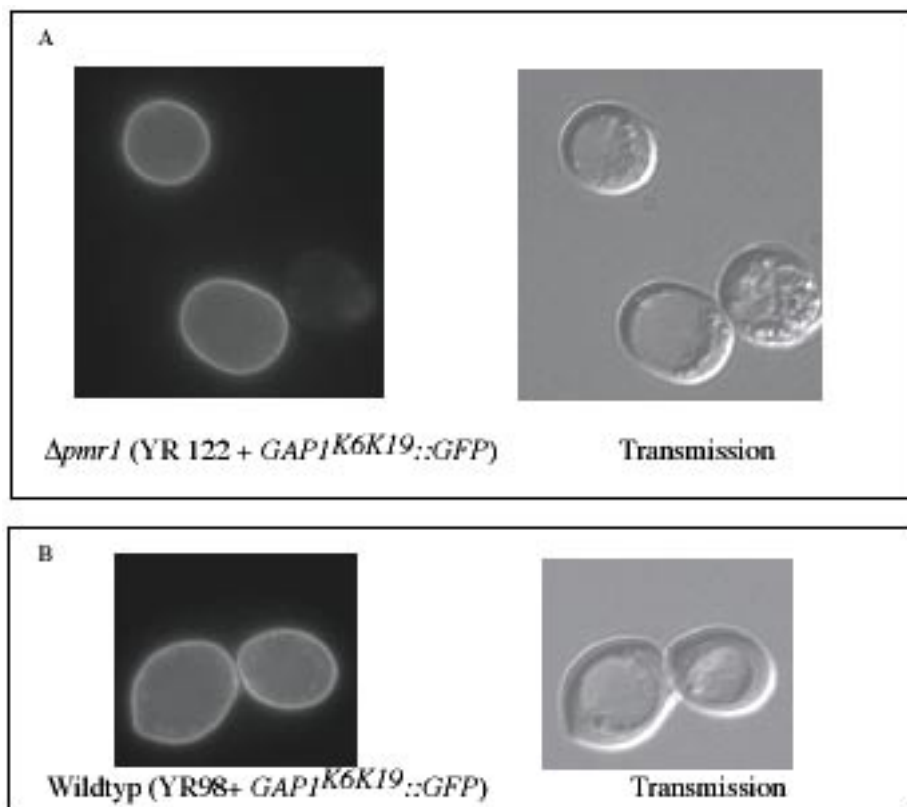


Abbildung 20: Gap1p dem die Ubiquitinierungsstellen fehlen ist sowohl im Wildtyp als auch $\Delta pmr1$ - Zellen, die mit einem *GAL1::GAP1^{K9K16}::GFP* Plasmid transformiert wurden, ausschliesslich an der Plasmamembran lokalisiert. Zellen wurden bis zu einer OD600 0.6 in CM- Medium unter Selektion auf das Plasmid kultiviert und über Nacht in SMM mit Prolin als einziger N-Quelle sowie unter Zusatz von Galaktose inkubiert. Zellen wurden bei 488 nm im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Ebenfalls gezeigt sind die Transmissionselektronenmikroskop-Bilder.

Intressant ist nun die Frage ob *pmr1*- Zellen, bei denen Gap1^{K9K16} ausschließlich an der Plasmamembran lokalisiert ist, wieder eine Citrullinaufnahme zeigen? Wie man aus Abbildung 21 erkennt, erhöht sich die Citrullinaufnahme zwar stark in $\Delta pmr1$ - Zellen, die mit dem *GAP1^{K9K16}::GFP* transformiert wurden, jedoch ist die Citrullinaufnahme aber immer noch um 30 % niedriger als beim Wildtyp.

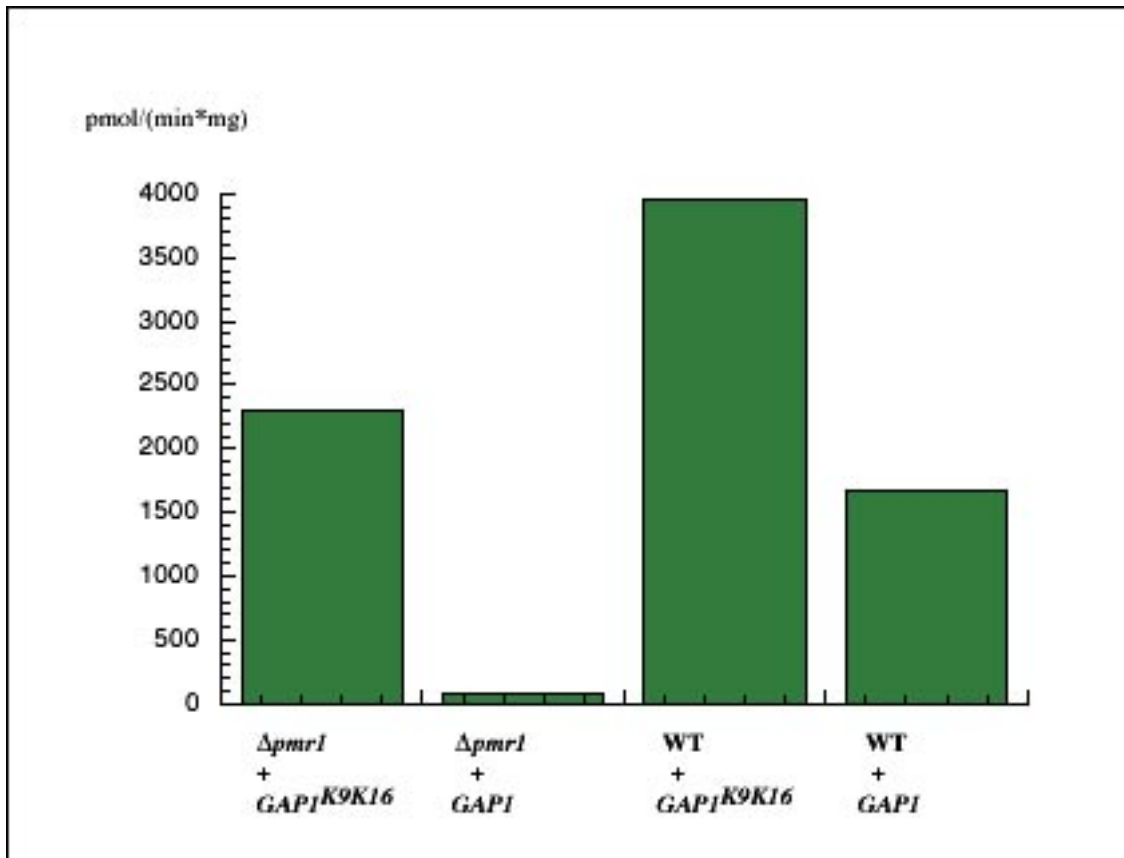


Abbildung 21: Citrullinaufnahme von Wildtyp- bzw. $\Delta pmr1$ - Zellen nach Transformation mit einem *Gall::GAP1::GFP* (BR725) bzw. *Gall::GAP1^{K9K16}::GFP* (BR727) Plasmid Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ 0.6 in CM- Medium unter Selektion auf das Plasmid kultiviert und über Nacht in SMM mit Prolin als einziger N-Quelle sowie unter Zusatz von Galaktose inkubiert. Citrullinaufnahme wurde dann wie in Materialien und Methoden beschrieben bei einer Citrullinkonzentration von 4 μ M bestimmt.

Die Transportaktivität von Gap1p in $\Delta pmr1$ - Zellen ist drastisch reduziert

Eine mögliche Erklärung für die geringe Citrullinaufnahme in $\Delta pmr1$ - Zellen könnte eine drastisch reduzierte Transportaktivität von Gap1p sein. Um diese Hypothese zu überprüfen wurde eine Kinetik für den Citrullinimport in $\Delta pmr1$ - und Wildtypzellen aufgenommen. Zellen wurden in gepuffertem YPD- Medium (75 mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 , pH5.4) bis zu einer OD_{600} 0.3 kultiviert und dann in Minimalmedium mit Prolin als einziger Stickstoffquelle ohne Zusatz von Supplementen 3h inkubiert (gepuffert 75 mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 , pH5.4), anschließend wurden die Zellen in Minimalmedium ohne Stickstoffquelle und ohne Supplemente (gepuffert 75 mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 , pH5.4) resuspendiert und der Citrullinimport bei Citrullinkonzentrationen von 5 μM - 14 μM bestimmt.

Abbildung 22 zeigt einen Lineweaver- Burk- Plot. Aufgetragen ist der reziproke Wert der Reaktionsgeschwindigkeit ($(\mu\text{mol}/(\text{min}*\text{mg}))^{-1}$) über den reziproken Wert der Citrullinkonzentration (μmol^{-1}). Wie man erkennen kann, folgt der Citrullinimport zwischen 5 μM - 14 μM Citrullin einer Michaelis- Menten Kinetik. Aus dem Schnittpunkt der Ausgleichsgeraden mit der Abzisse ergibt sich daher $-K_M^{-1}$. Der K_M - Wert für Wildtyp- Zellen beträgt damit 110 μM , bei $\Delta pmr1$ - Zellen 23.8 μM . Aus den Ordinatenwerten ergibt sich ein $V_{\text{max}} = 14.8 \text{ pmol}/(\text{min}*\text{mg})$ für Wildtypzellen und $V_{\text{max}} = 3.309 \text{ pmol}/(\text{min}*\text{mg})$ für $\Delta pmr1$ - Zellen. Die Transportaktivität von Gap1p in $\Delta pmr1$ - Zellen ist damit drastisch reduziert.

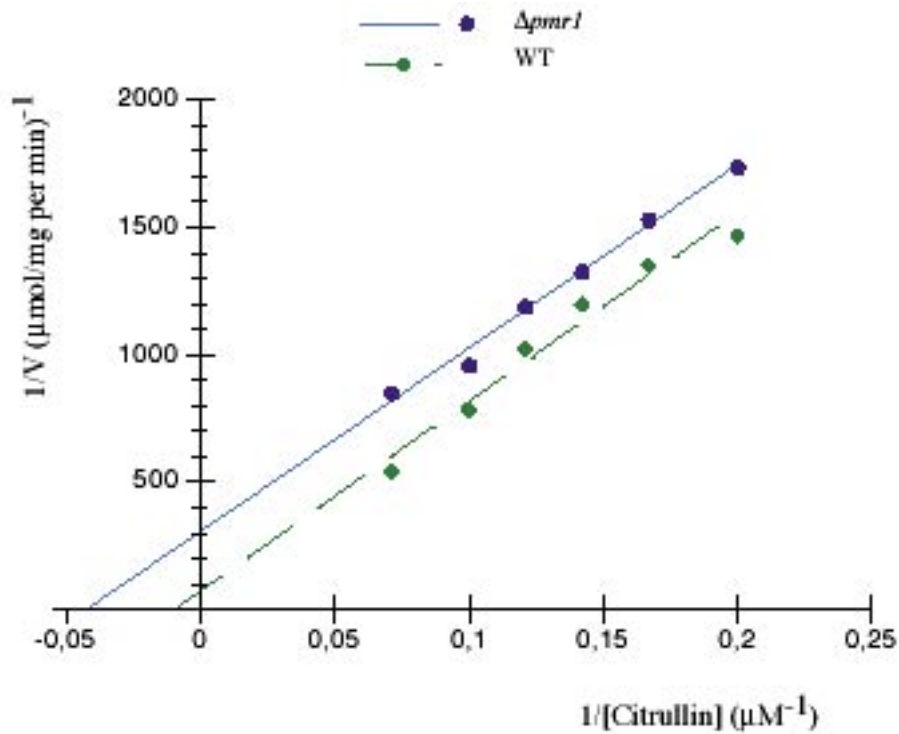


Abbildung 22: Michaelis- Menten Kinetik zur Bestimmung der Transportaktivität von Gap1p in Wildtyp- und $\Delta pmr1$ - Zellen

Die Citrullinaufnahme von Wildtyp (YR98) und $\Delta pmr1$ (YR122) Zellen wurde wie in Materialien und Methoden beschrieben bei Citrullinkonzentrationen zwischen 5 μM und 14 μM bestimmt. Dargestellt ist der Lineweaver- Burk- Blot. Aufgetragen wurde V^{-1} über $1/[Citrullin]^{-1}$.

Genetische Interaktionen von *PMR1*

Um genetische Interaktionspartner der $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase *PMR1* zu finden wurde ein „Screen“ nach synthetisch letalen Mutationen in Δpmr -Zellen durchgeführt (Elbs, Diplomarbeit 1997).

In diesem „Screen“ wurden verschiedene Gene als mögliche genetische Interaktionspartner identifiziert: *YND1*, *VAN1*, *SAC2*, *BST1*, *VPS24*, *VPS3*, *LIP3*, *TUB3*, *PMC1*, *SLA1*, *ROM2*, *SEC35*, *TOM1*, *SIR4*, *PAC2*, *AKR1*

In der folgenden Arbeit sollte überprüft werden, ob tatsächlich eine genetische Interaktion mit *PMR1* vorliegt, eine Doppeldeletion von *PMR1* und einem der oben genannten Gene also nicht lebensfähig ist. Hierzu wurden mittels PCR Deletionskonstrukte der einzelnen Gene amplifiziert. Zur Deletion der Gene wurde die *HIS3*-Deletionskassette pFA6a-His3MX6 (Wach et al., 1997) verwendet. Diese Deletionskonstrukte wurden in den Stamm YR122 ($\Delta pmr1$), der ein [*PMR1*, *URA3*]-Plasmid (BR5) trägt, transformiert. Die Transformanden wurden mittels Southern Blot analysiert und mit dem Stamm YR101 (*PMR1*), der ein [*ADE2*]-Plasmid (BR172) trägt, gekreuzt. Diploide-Zellen wurden auf die Marker selektioniert. Die Diploide wurden zweimal auf YPD Platten ausgestrichen um das [*ADE2*]-Plasmid zu verlieren und anschließend auf 5-FOA Platten um das [*PMR1*, *URA3*]-Plasmid zu verlieren. Dann wurden die Diploide sporuliert und die Sporen in einem Mikromanipulator voneinander getrennt. Die Sporen wurden dann anschließend auf Mating type und Marker getestet.

***pmr1 bst1* Mutanten zeigen einen starken Wachstumsdefekt**

BST1 („bypass supressor of *sec-thirteen*“) ist ein ER Membranprotein. Eine Mutation von *bst1* führt dazu, dass das COPII Membran Protein Sec13p nicht mehr essentiell ist. *bst1*-Mutanten zeigen im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Sekretion der ER residenten Proteine Kar2p und Pdi1p. Gleichzeitig ist die Sekretionsrate für sekretorische Proteine, wie z.B. Invertase jedoch stark reduziert. Elrod-Erickson und Kaiser haben ein Modell aufgestellt, wonach Bst1p die Fertigstellung der ER-Transportvesikel so lange verzögert, bis die sekretorischen Proteinen säuberlich von den ER-residenten Proteinen aussortiert sind (Elrod-Erickson and Kaiser, 1996). Wie man aus Abbildung 23 erkennen kann sind *bst1 pmr1* Doppelmutanten nicht synthetisch letal, weisen aber einen drastischen Wachstumsdefekt auf YPD Platten auf.

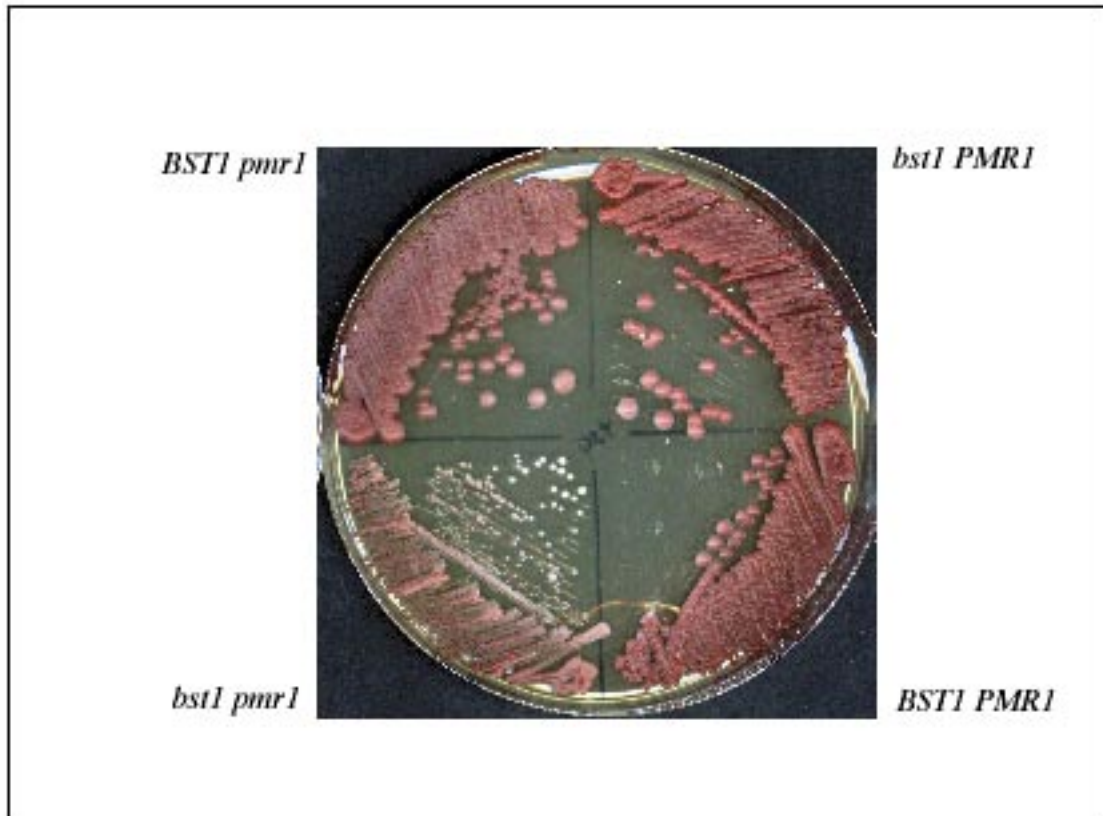


Abbildung 23: Wachstum von $\Delta pmr1 \Delta bst1$ Doppelmutanten auf YPD- Platten.

$\Delta pmr1$ - Zellen (YR122) wurden mit einem [2μ , *URA3*, *PMR1*] Plasmid (BR5) und einem *bst1::His3* Deletionskonstrukt transformiert. Transformanten wurden mittels Southern Blot Analysis untersucht. Positive Klone wurde mit dem Wildtypstamm YR101 gekreuzt, der zuvor mit einem [2μ , *ADE2*] Plasmid (BR172) transformiert wurde. Diploide wurden auf Marker selektioniert, zweimal auf YPD Platten und einmal auf 5-FOA Platten ausgestrichen um die beiden Plasmide zu verlieren. Dann wurde der Diploid sporuliert und die Sporen mit Hilfe eines Mikromanipulators voneinander getrennt. Sporen wurden auf Marker und Mating Type untersucht. Abgebildet ist der Ausstrich einer Tetrade auf YPD-Platten. Man erkennt einen deutlichen Wachstumsdefekt der $\Delta pmr1 \Delta bst1$ Doppelmутanten im Vergleich zu den Einzelmutanten.

***pmr1 sac2* Doppelmutanten zeigen einen drastischen Wachstumsdefekt**

VPS52p (Sac2p) bildet zusammen mit VPS53p und VPS54p einen Komplex, der für das Protein- Sorting aus dem „späten“ Golgi benötigt wird. Eine Deletion von *VPS52* führt zur Mislokalisierung einiger trans- Golgi Membranproteine in die Vakuole, hat aber keinen Einfluss auf den Proteintransport durch den „frühen“ Teil des Golgis. *VPS52* ist vermutlich für den retrograden Transport von Golgi Membranproteinen aus dem endosomalen Kompartiment verantwortlich (Conibear and Stevens, 2000). Eine Deletion von *VPS52* führt zu einer Mislokalisierung und Degradation von VPS10p, dem Rezeptor für CpY, der vermutlich auch am „Sorting“ anderer falsch gefalteter sekretorischer Proteine zur Vakuole beteiligt ist. In $\Delta pmr1$ - Zellen hebt eine Überexpression von *VPS10* den Wachstumsdefekt auf 6,5 mM EGTA Platten auf (Dürr et al., 1998). Die Mislokalisierung von Vps10p in $\Delta vps52$ - Zellen führt zu einer Sekretion von CpY. Wie man aus Abbildung 24 erkennen kann weisen $\Delta pmr1 \Delta sac2$ - Zellen einen drastischen Wachstumsdefekt auf YPD Platten auf.

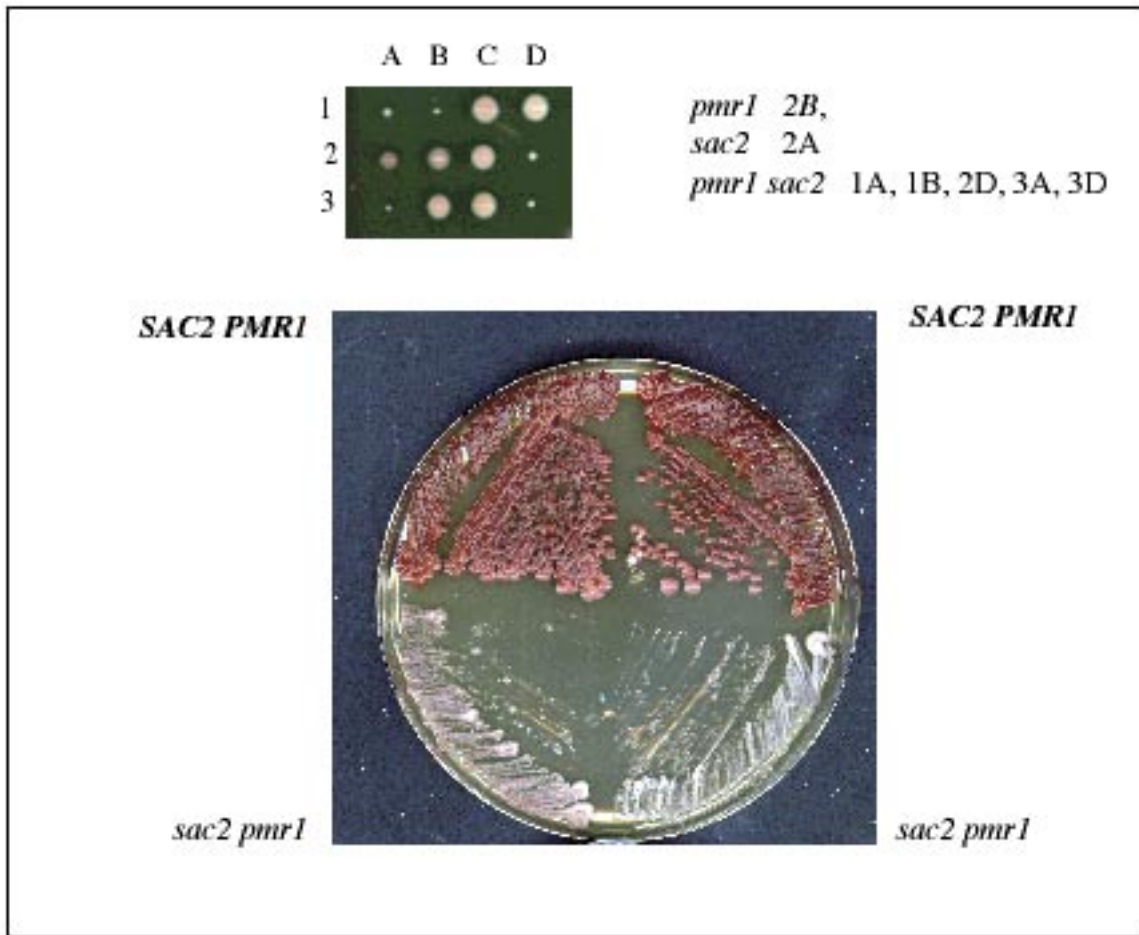


Abbildung 24: Wachstum von $\Delta pmr1 \Delta sac2$ Doppelmutanten auf YPD- Platten.

$\Delta pmr1$ Zellen (YR122) wurden mit einem [*URA3*, *PMR1*] Plasmid (BR5) und *sac2::His3* Deletionskonstrukt transformiert. Transformanten wurden mittels Southern Blot Analysis untersucht. Positive Klone wurde mit dem Wildtypstamm YR101 gekreuzt, der zuvor mit einem [*2 μ* , *ADE2*] Plasmid (BR172) transformiert wurde. Diploide wurden auf Marker selektioniert, zweimal auf YPD Platten und einmal auf 5-FOA Platten ausgestrichen um die beiden Plasmide zu verlieren. Dann wurde der Diploid sporuliert und die Sporen mit Hilfe eines Mikromanipulators voneinander getrennt. Sporen wurden auf Marker und Mating Type untersucht. Abgebildet ist der Ausstrich einer Tetrade auf YPD-Platten, sowie die Sporen von 3 Tetraden. Man erkennt einen drastischen Wachstumsdefekt der $\Delta pmr1 \Delta sac2$ Doppelmutanten im Vergleich zu den Einzelmutanten.

pmr1 vps24 Doppelmutanten zeigen einen Wachstumsdefekt

Vps24p ist Bestandteil des ESCRT-III Komplexes („endosomal sorting complex required for transport“). Dieser Komplex besteht aus den 4 Vps Proteinen (Klasse E) Vps24p, Snf7p, Vps2p und Vps20p. Diese Proteine sind hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert und werden zeitweise an das endosomale Kompartiment rekrutiert um dort das „Sorting“ der endosomalen Fracht und die Bildung der „Multi vesicular bodies“ (MVBs) durchzuführen (Babst et al., 2002). Die vps-Mutanten (Klasse E) akkumulieren Frachtpoteine wie vakuoläre Hydrolasen oder vakuoläre ATPasen in Klasse E Kompartimenten, dies führt zur Ansäuerung dieses Kompartiments und zur Aktivierung hydrolytischer Enzyme. Die luminale Domäne von VPS10p dem Sortierungsrezeptor für CpY, der darüber hinaus auch am Sorting falsch gefalteter Proteine zur Vakuole beteiligt sein soll, wird in Klasse E Mutanten proteolytisch abgespalten und und das Protein wird rapide abgebaut. Wie man aus Abbildung 26 erkennen kann haben *pmr1 vps24*- Doppelmutanten einen deutlichen Wachstumsdefekt auf YPD Platten.

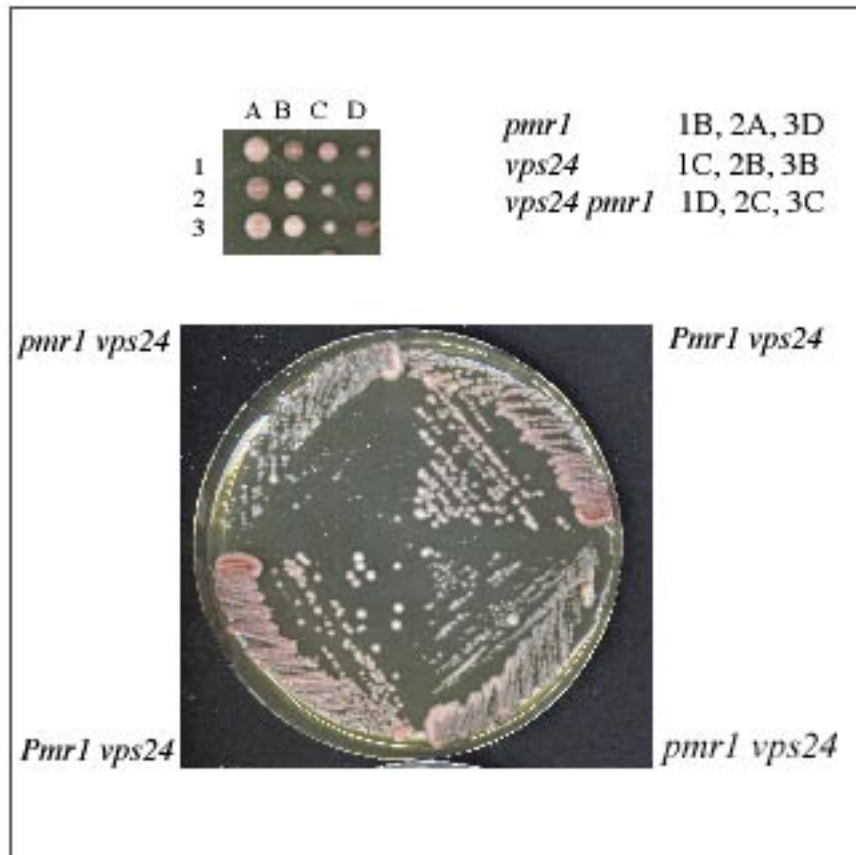


Abbildung 25: Wachstum von $\Delta pmr1 \Delta vps24$ Doppelmutanten auf YPD- Platten.

$\Delta pmr1$ Zellen (YR122) wurden mit einem [*URA3, PMR1*] Plasmid (BR5) und *vps24::His3* Deletionskonstrukt transformiert. Transformanten wurden mittels Southern Blot Analysis untersucht. Positive Klone wurde mit dem Wildtypstamm YR101 gekreuzt, der zuvor mit einem [*2 μ , ADE2*] Plasmid (BR172) transformiert wurde. Diploide wurden auf Marker selektioniert, zweimal auf YPD Platten und einmal auf 5-FOA Platten ausgestrichen um die beiden Plasmide zu verlieren. Dann wurde der Diploid sporuliert und die Sporen mit Hilfe eines Mikromanipulators voneinander getrennt. Sporen wurden auf Marker und Mating Type untersucht. Abgebildet ist der Ausstrich einer Tetrade, auf YPD-Platten, sowie die Sporen von 3 Tetraden. Man erkennt einen deutlichen Wachstumsdefekt der $\Delta pmr1 \Delta vps24$ Doppelmutanten im Vergleich zu den Einzelmutanten.

Weitere genetische Interaktionspartner :

Weitere genetische Interaktionen von *PMR1* wurden gefunden mit *YND1* und *VAN1*. $\Delta pmr1 \Delta ynd1$ und $\Delta pmr1 \Delta van1$ Zellen weisen einen sehr starken Wachstumsdefekt auf YPD Platten auf (Elbs und Rudolph, unveröffentlicht).

5. Diskussion

Ca²⁺- Ausstrom aus Zellen ist ein universelles Phänomen

Ca²⁺- Ausstrom wurde bisher sowohl an tierischen Zellen (Sarkadi, 1980), als auch an Bakterien (Tsuchiya and Rosen, 1975; Kobayashi et al., 1978; Kumar et al., 1979) und an Pilzen z.B. *Neurospora crassa* (Stroobant and Scarborough, 1979; Stroobant et al., 1980) beobachtet und untersucht. Folgende grundlegende Mechanismen, mit denen ein Ca²⁺- Ausstrom vermittelt werden kann, sind bis heute bekannt: 1.) Plasmamembran Ca²⁺- ATPasen (PMCA's) (Vincenzi F.F., 1976) 2.) Ca²⁺/H⁺ Austausch (Brey and Rosen, 1979), 3.) Ca²⁺/Na⁺ Austausch (Blaustein, 1974). Y. Eilam untersuchte 1980 und 1982 den Ca²⁺- Ausstrom aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, indem sie die Hefezellen über Nacht in einem YPD- Medium mit 1 $\mu\text{Ci/ml}$ ⁴⁵CaCl₂ inkubierte. Die so mit ⁴⁵Ca²⁺ äquilibrierten Zellen wurden gewaschen und anschließend in Puffern bei unterschiedlichem pH unter Zusatz von 100 mM Glucose resuspendiert. Im Verlauf der weiteren Inkubation beobachtete sie einen stark vom pH- Wert des Mediums abhängigen Ca²⁺- Ausstrom. Bei pH 5.2 (20 mM Hepes) wurden in den ersten 120 Minuten des Experiments 20 % des zum Zeitpunkt t=0 in der Zelle vorhandenen Ca²⁺ ausgeschieden. In den folgenden 23 h des Experiments war kein weiterer Ca²⁺- Ausstrom mehr zu beobachten. Bei Erhöhung des pH- Wertes auf 6.2 reduzierte sich der Ca²⁺- Ausstrom auf 15%, bei drastischer Erhöhung des pH- Wertes auf 7.8 kam der Ca²⁺- Ausstrom fast völlig zum Erliegen. Y. Eilam schloss aus der Abnahme des Ca²⁺- Ausstroms mit steigendem pH- Wert des Mediums auf die Existenz eines Ca²⁺/H⁺ Antiporters an der Plasmamembran, der für den pH- abhängigen Anteil des Ca²⁺- Ausstroms verantwortlich sein soll. Der zur Funktion des Ca²⁺/H⁺ Antiporter notwendige pH- Gradient an der Plasmamembran, der *in vivo* mittels einer H⁺- ATPase aufrechterhalten wird (Serrano, 1988), würde sowohl die pH- Abhängigkeit als auch den Energiebedarf des Ca²⁺- Ausstroms erklären (Eilam, 1982a, Eilam, 1982b). Weiterhin konnte Y. Eilam auch beobachten, dass sich ein nur wenig vom pH- Wert abhängiger Ca²⁺- Ausstrom durch den Zusatz von Mg²⁺, Ca²⁺ sowie K⁺ und Na⁺ induzieren lässt. Y. Eilam schloss hieraus auf die Existenz eines weiteren Ca²⁺- Transportmechanismus, der einen Ca²⁺- Ausstrom bewerkstelligen kann.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun der Mechanismus dieses Ca²⁺- Ausstromes untersucht werden. Bevor die Ergebnisse dieser Untersuchungen eingehend diskutiert werden, sollen zunächst ein paar grundlegende Aspekte des intrazellulären Ca²⁺- Haushalts von Eukaryonten und die für Hefe besonders wichtigen Gesichtspunkte dargelegt werden.

Die Organellen des Sekretionswegs sind sehr Ca²⁺- reich

Der Sekretionsweg einer Eukaryonten- Zelle verläuft vom ER über den Golgi zur Plasmamembran bzw. zum Lysosom. Der Transport zwischen diesen Kompartimenten wird über die Knospung von Transportvesikel, die sich von der Donormembran abschnüren und mit der Akzeptormembran des nächsten Kompartiments fusionieren vermittelt (Rothman and Orci, 1992). Im Endoplasmatischen Retikulum werden Proteine gefaltet, zu Komplexen zusammengelagert und kovalent modifiziert (Ausbildung von Disulfidbrücken, Glykosylierungen, etc.). An der Faltung von Proteinen sind unter anderem Ca²⁺-abhängige Chaperone wie BiP (Kar2p in Hefe) beteiligt, das zum einen Ca²⁺ bindet und zum anderen mit falsch gefalteten sowie noch nicht assemblierten Proteinen assoziiert (Haas and Wabl, 1983; Lodish, 1988; Macer and Koch, 1988). Der Golgi besteht aus 3 Kompartimenten: cis-, medial- und trans- Golgi. Der cis- Golgi fungiert als Filter für ER- residente Proteine, die über Transportvesikel wieder zurück zum Golgi transportiert werden müssen. Im Golgi finden umfangreiche, weitere Mannosylierungen der sekretorischen Proteine statt. Sortierungsprozesse im trans- Golgi trennen dann die Proteine, welche zur Plasmamembran transportiert werden sollen von den Proteinen, die für den Transport zur Vakuole bestimmt sind, ab. Ca²⁺ spielt in den Organellen des Sekretionsweges eine wichtige Rolle. Zahlreiche Ca²⁺- abhängige Enzyme wie z.B. die Furin- ähnliche Protease Kex2p, Mannosidase I (Mns1p), Calnexin (Cne1p) und die Proteindisulfidisomerasen Pdi1p und Eug1p sind bis heute bekannt. Huttner et al. konnten zeigen, dass für die Anreicherung von Sekretogranin und Chromogranin in Transportvesikeln Ca²⁺ erforderlich ist (Huttner et al., 1991), desweiteren ist ein Ca²⁺- Ausstrom aus dem Lumen der Vakuole für die Fusion von Vakuolenmembranen essentiell (Peters and Mayer, 1998). In Eukaryonten wurden steigende Ca²⁺- Konzentrationen vom frühen zum späten Teil des Sekretionsweges nachgewiesen: im ER bis zu 3 mM, im Golgi bis zu 13 mM und in den Sekretionsvesikeln sogar bis zu 19 mM (Carafoli, 1987; Roos, 1988; Sambrook, 1989; Tsien, 1989). In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden ob Ca²⁺- Ausstrom aus der Hefezelle über Exocytose vermittelt wird.

Der Hauptspeicher für Ca²⁺ ist die Vakuole

Die Vakuole der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein großes Organell, das ungefähr 25% des gesamten Zellvolumens ausmacht (Wiemken and Durr, 1974). Sie teilt viele Gemeinsamkeiten mit dem Lysosom von Säugetierzellen: so enthält sie unter anderem zahlreiche Hydrolasen wie Proteasen, Ribonucleasen und alkalische Phosphatasen (Wiemken, 1979). Eine bedeutsame Unterscheidung zum

Lysosom liegt in der Fähigkeit der Vakuole, große Mengen an kleinen Molekülen und Ionen zu speichern, wie z.B. Aminosäuren, Purine, Polyamine, Allantoin sowie Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Li^+ , K^+ , Cl^- , Phosphat und Cd^{2+} (Svihla, 1963; Nakamura and Schlenk, 1974; Wiemken and Durr, 1974; Okorokov et al., 1978; Urech et al., 1978; Zacharski and Cooper, 1978; Wiemken, 1979; Nieuwenhuis et al., 1981; Ohsumi and Anraku, 1981; Bilinski and Miller, 1983; Eilam et al., 1985; Ohsumi et al., 1988; Raguzzi et al., 1988; Kakinuma et al., 1992; Wada et al., 1992; Perkins and Gadd, 1993; Dunn et al., 1994; Li et al., 1996). Phosphat wird in der Vakuole in Form von freiem Phosphat und auch als Polyphosphat gespeichert. Dunn et al. zeigten, dass vakuoläres Ca^{2+} sowohl frei als auch an Polyphosphat gebunden vorliegt. Der Gehalt an Polyphosphat in der Vakuole ist vom Phosphatgehalt im Medium abhängig. In YPD- Medium mit einer Ca^{2+} -Konzentration von 0.3 mM bindet etwa jeder hundertste Polyphosphatrest ein Ca^{2+} , bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 50 mM jeder fünfte. Bei Zusatz von Mg^{2+} zum Medium konkurriert Mg^{2+} mit Ca^{2+} um Bindungsplätze an den Polyphosphatresten und setzt je nach Besetzung der Polyphosphate mit Ca^{2+} unterschiedliche Mengen an Ca^{2+} frei. Bei hoher cytosolischer Mg^{2+} -Konzentration konkurriert Mg^{2+} mit Ca^{2+} um den Transport in die Vakuole. Das aus der Vakuole verdrängte Ca^{2+} wird von der Zelle auf bisher unbekanntem Wege ausgeschieden (Dunn et al., 1994; Beeler et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Verdrängung von vakuolärem $^{45}\text{Ca}^{2+}$ durch Mg^{2+} zur gezielten Auslösung eines Ca^{2+} - Ausstroms benutzt. Die Höhe des Ca^{2+} -Ausstroms wurde über die Abnahme der Radioaktivität in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt.

Der Ca^{2+} - Ausstrom aus *sec1*- , *sec6*- und *sec18*- Mutanten ist bei restriktiver Temperatur blockiert

Zunächst wurden Ca^{2+} - Ausstrommessungen an den beiden Wildtypstämmen YR990 und YR1070 durchgeführt. Hierzu wurde ein Ca^{2+} - Ausstrom durch Zusatz von 5 mM MgCl_2 bei 25°C bzw. 37°C initiiert. Der Stamm YR1070 zeigt keine Unterschiede in der Höhe des Ca^{2+} - Ausstroms bei 25°C bzw. 37°C (28%). Beim Stamm YR990 hingegen war der Ca^{2+} - Ausstrom bei 37°C sogar leicht erhöht (25°C 18%, 37°C 34%). Der Ca^{2+} - Ausstrom scheint relativ unabhängig von der Temperatur zu sein und entspricht von der Höhe den bereits von Y. Eilam beobachteten Werten (20% in 1 h). Unter denselben Bedingungen wurden nun Experimente an den „späten“ *sec*- Mutanten *sec6* und *sec1* durchgeführt. In diesen Mutanten ist unter restriktiven Bedingungen die Fusion von post- Golgi Vesikeln mit der Plasmamembran blockiert, so dass diese bei 37°C Vesikel mit einem Durchmesser von 100 nm akkumulieren. Sowohl in *sec6*- als auch in *sec1*- Mutanten ist der durch 5 mM MgCl_2 initiierte Ca^{2+} - Ausstrom bei restriktiven Bedingungen

vollständig blockiert. Auch der nicht durch Mg^{2+} - Ionen initiierte Ca^{2+} - Ausstrom kommt in späten *sec*- Mutanten bei $37^{\circ}C$ vollständig zum Erliegen. Entsprechend zeigen auch *sec18*- Zellen, in denen bei $37^{\circ}C$ sämtliche Fusionsprozesse von Sekretionsvesikeln mit Akzeptormembranen blockiert sind, unter restriktiven Temperaturen ebenfalls nur noch einen geringen Restausstrom von 5%. Da in den entsprechenden Wildtypstämmen bei $37^{\circ}C$ keine Reduktion des Ca^{2+} - Ausstroms im Vergleich zu $25^{\circ}C$ zu beobachten ist, scheint in den *sec*- Mutanten die Blockierung des späten Teil des Sekretionsweges für das fast vollständige Erliegen des Ca^{2+} - Ausstroms verantwortlich zu sein. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Ca^{2+} - Ionen, verpackt in Transportvesikel, entlang des Sekretionsweges zur Plasmamembran transportiert und bei der Fusion der Transportvesikel mit der Plasmamembran freigesetzt werden. Nach eine andere Hypothese könnte aber auch ein an der Plasmamembran aktives Ca^{2+} - Transportsystem (Antiporter, Pumpe) vorliegen, das eine kurze Halbwertszeit besitzt und daher ständig über den Sekretionsweg zur Plasmamembran nachgeliefert werden muss, damit ein anhaltender Ca^{2+} -Ausstrom an der Plasmamembran zustande kommt.

Block der Proteinsynthese mit Cycloheximid hat keinen Einfluss auf die Höhe des Ca^{2+} - Ausstroms

Um zu überprüfen, ob ein Ca^{2+} - Transportsystem mit kurzer Halbwertszeit am Ca^{2+} - Ausstrom beteiligt ist, wurde der Ca^{2+} - Ausstrom bei $25^{\circ}C$ in Wildtypzellen unter dem Zusatz von $180 \mu g/ml$ Cycloheximid gemessen. (Cycloheximid ist eine Droge, die die Peptidyltransferase der Ribosomen hemmt und somit die Proteinneusynthese blockiert (Cooper et al., 1967)). Dabei zeigte der Wildtypstamm YR990 bei $25^{\circ}C$ auch nach Zusatz von Cycloheximid keine Reduktion im Ca^{2+} - Ausstroms. Da die Blockierung der Proteinsynthese offensichtlich keinen Effekt zeigt, kann ein instabiles Transportsystem, das ständig über den Sekretionsweg zur Plasmamembran transportiert werden muß, als Verursacher des Ca^{2+} - Ausstrom ausgeschlossen werden.

Existiert ein Transportsystem, das ständig zwischen Plasmamembran, Endosom und trans- Golgi Netzwerk (TGN) zirkuliert?

Eine weitere mögliche Ursache für einen *sec*- abhängigen Ca^{2+} - Ausstrom könnte das Vorliegen eines zwar stabilen, aber nicht ständig an der Plasmamembran befindlichen Transportsystems sein, das zur Rezirkulation an die Plasmamembran den „späten“- Sekretionsweg benötigt. Um diese Hypothese zu untersuchen wurden Ca^{2+} - Ausstrommessungen an *end3 sec6* - Doppelmutanten durchgeführt. End3p ist unter anderem für die endocytotische Internalisierung von alpha-Faktor, aber auch für „fluid- Phase“ Endocytose essentiell (Chvatchko et al., 1986; Singer

and Riezman, 1990; Raths et al., 1993). Ein rezirkulierendes Transportsystem würde in einer *end3* Mutante nicht mehr endocytotisch internalisiert werden und sollte an der Plasmamembran verbleiben, so dass die Blockierung des späten Sekretionsweges dann keinen Einfluss auf die Höhe des Ca^{2+} - Ausstroms haben sollte. Um zu gewährleisten, dass der potentielle Transporter sich vor Setzen des Blocks im Sekretionsweg an der Plasmamembran befindet wurde der Ca^{2+} - Ausstrom zunächst bei 25°C initiiert. Nach 30 min wurde durch eine sehr rasche Temperaturerhöhung die Fusion weiterer Transportvesikel mit der Plasmamembran blockiert. Dabei zeigte sich, dass der Ca^{2+} - Ausstrom kurz nach Einsetzen der restriktiven Bedingungen zum Erliegen kommt, während in den ersten 30 min des Experiments ein Ca^{2+} - Ausstrom zu beobachten ist. Hinweise auf einen weiteren, von End3p unabhängigen Weg, ein Plasmamembranprotein endocytotisch zu internalisieren, gibt bis heute keine. Somit läßt sich mit ziemlicher Sicherheit die Existenz eines zwischen Plasmamembran, pre- vakuolärem Kompartiment und TGN zirkulierenden Transportsystems ausschliessen.

Zeigen $\Delta pmr1$ - Zellen einen Ca^{2+} - Ausstrom?

Pmr1p ist eine P-Typ ATPase, welche Ca^{2+} und Mn^{2+} aus dem Cytosol in das Lumen des Golgi transportiert. Eine Deletion von *PMR1* führt unter anderem auch zu einer drastischen Reduktion der Ca^{2+} - Konzentration im ER (Strayle et al., 1999), zu einer bis zu 16fach höheren cytosolischen Ca^{2+} - Konzentration im Vergleich zum Wildtyp (Halachmi and Eilam, 1996; Locke et al., 2000), sowie zu einer 7-fach erhöhten Gesamtcalciumkonzentration in der Zelle (Halachmi and Eilam, 1996). Hefe besitzt im Gegensatz zu Säugetierzellen keine zusätzliche Sarkoplasmatische Endoplasmatische Ca^{2+} - ATPase, so ist die Ca^{2+} - Aufnahme in das ER Thapsigargin insensitiv (Strayle et al., 1999). Da $\Delta pmr1$ - Zellen eine drastisch reduzierte Ca^{2+} - Konzentration im ER aufweisen und die Ca^{2+} - Aufnahme in das ER zu einem Teil Vanadat- sensitiv ist, scheint Pmr1p auch ein wichtiger Ca^{2+} - Transporter im ER zu sein. Allerdings konnte in subzellulären Fraktionierungen nur eine kleine Fraktion von Pmr1p nachgewiesen werden, die mit ER- Markern kofraktioniert (Antebi and Fink, 1992; Sorin et al., 1997). Strayle et al. konnten allerdings feststellen, dass die Ca^{2+} - Aufnahme im ER nach Behandlung der Zellen mit Cycloheximid oder nach Blockierung des retrograden Sekretionsweges zwischen Golgi und ER (in *ret2-1*- Mutanten) ununterbrochen anhält, so dass es wahrscheinlich scheint, dass ein Teil von Pmr1p auch im ER lokalisiert ist. Die Ca^{2+} -Aufnahme in das ER in $\Delta pmr1$ - Mutanten könnte über einen ER- „Pool“ von Pmc1p und Vcx1p erfolgen (Strayle et al., 1999). Welche Auswirkungen hat nun der Verlust von Pmr1p auf die Höhe des Ca^{2+} - Ausstroms? Unter den üblichen Bedingungen zeigen *pmr1*- Mutanten, sowohl in S288C als

auch in W303 Stammhintergrund innerhalb einer Stunde keinen Ca^{2+} - Ausstrom. Dies ist aber vermutlich darin begründet, dass in $\Delta pmr1$ - Zellen parallel zum Ca^{2+} - Ausstrom ein Ca^{2+} - Einstrom zu beobachten ist. Wurde nämlich der Ca^{2+} - Ausstrom statt mit Mg^{2+} mit Ca^{2+} - Ionen initiiert, so konnte ein 11% Ca^{2+} - Ausstrom beobachtet werden, da nun das ausgeströmte $^{45}\text{Ca}^{2+}$ vor der Wiederaufnahme durch überschüssiges, nicht radioaktives Ca^{2+} verdünnt wurde. Verursacht wird die erhöhte Rate an Ca^{2+} - Einstrom, durch die Aktivierung des hochaffinen Ca^{2+} - Kanals *Mid1/Cch1* bei Verarmung der sekretorischen Organellen an Ca^{2+} (Locke et al., 2000).

Auch die Blockierung des „frühen“ Teils des Sekretionsweges hat einen Einfluss auf die Höhe des Ca^{2+} - Ausstroms

SEC12 und *SEC13* gehören zu den *SEC* Genen, die für den frühen Teil des Sekretionsweges essentiell sind. In *sec12*- und *sec13*- Mutanten ist bei restriktiver Temperatur die Transportvesikelbildung aus dem ER blockiert. *Sec12p* reguliert zwar die Vesikelbildung, ist aber selbst kein Bestandteil der Transportvesikel, wohingegen *Sec13p* eine Hauptkomponente der Proteinhülle der Transportvesikel („COPII coat“) ist. Sowohl in *sec12*- als auch in *sec13*- Zellen ist der Ca^{2+} - Ausstrom unter restriktiven Temperaturen stark reduziert. Dies deutet daraufhin, dass ein gewisser Prozentsatz des aus der Zelle ausgeschiedenen Ca^{2+} aus dem ER stammt.

Zusammenfassung:

Ein Ca^{2+} - Ausstrom lässt sich durch Zusatz von Mg^{2+} bzw. Ca^{2+} zum Medium initiieren. Hierbei wird in der Vakuole gespeichertes Ca^{2+} von seinen Polyphosphatbindungsstellen verdrängt und aus der Vakuole freigesetzt. Das Ca^{2+} gelangt in die Organellen des Sekretionsweges unter anderem mittels der Ca^{2+} - ATPase *Pmr1p*, wird in Transportvesikel gepackt und entlang des Sekretionsweges in Richtung Plasmamembran transportiert. Dort fusionieren die post- Golgi Vesikel mit der Plasmamembran, setzen ihren Inhalt frei und vermitteln so den Ca^{2+} - Ausstrom. Auch der nicht durch den Zusatz von Kationen induzierte Ca^{2+} - Ausstrom wird durch die Fusion von Transportvesikeln mit der Plasmamembran vermittelt, stellt aber vermutlich kein gezieltes Ausscheiden von überschüssigem Ca^{2+} da. Wahrscheinlich werden hohe Ca^{2+} - Konzentrationen in den sekretorischen Vesikeln benötigt um Fusionprozesse der Transportvesikel mit der Akzeptormembran zu initiieren. So konnte zum Beispiel bei der Fusion von Vakuolenmembranen gezeigt werden, dass nach der Anlagerung der Membranen ein Ca^{2+} - Ausstrom aus der Vakuole initiiert wird, der für den Fusionsprozeß essentiell ist. Das aus der Vakuole ausgeschiedene Ca^{2+} bindet an Calmodulin und dieser Ca^{2+} - Calmodulin

Komplex initiiert dann die Fusion der Vakuolenmembranen (Peters and Mayer, 1998). In ähnlicher Weise könnte ein Freisetzen von Ca^{2+} aus den sekretorischen Vesikeln die Fusion dieser Vesikel mit der Plasmamembran initiieren.

Genetische Interaktionen von *PMR1*

***Δpmr1 Δbst1* Doppelmutanten zeigen einen drastischen Wachstumsdefekt**

BST1 („bypass supressor of *sec-thirteen*“) ist ein ER Membranprotein. Eine Mutation von *bst1*, *bst2* oder *bst3* führt dazu, dass das COPII Membran Protein Sec13p nicht mehr essentiell für die Zelle ist. Elrod-Erickson und Kaiser schlugen ein Modell zur Funktion der *BST*- Gene vor, wonach diese die Fertigstellung von Transportvesikeln aus dem ER solange verzögern, bis eine ausreichende Sortierung der sekretorischen Proteine von den ER- residenten Proteinen erreicht ist. In *Δbst1*- Zellen ist die Fähigkeit des ER, zwischen residenten Proteinen und sekretorischen Proteinen zu unterscheiden erniedrigt. Elrod-Erickson und Kaiser konnten zeigen, dass s11-Invertase, die aufgrund einer Mutation eine nicht abspaltbare Signalsequenz besitzt und normalerweise im ER zurückgehalten wird, zu einem erhöhten Prozentsatz in *Δbst1* Zellen sekretiert wird. Desweiteren sezernieren *bst1*- Zellen die ER- residenten Proteine Kar2p sowie Pdi1p zu einem viel höheren Prozentsatz als Wildtypzellen. An *Δpmr1*- Zellen konnte beobachtet werden, dass diese CpY* im ER stabilisieren (Dürr et al., 1998). CpY*, eine mutierte Form von CpY, wird normalerweise aus dem ER zurück („retrograd“) ins Cytosol transportiert, ubiquitiniert und schließlich durch das Proteasom abgebaut. Für den Export von CpY* aus dem ER wird unter anderem das Chaperon Kar2p benötigt (Plemper et al., 1997). Die Ursache für die Stabilisierung von CpY* in *Δpmr1*- Zellen liegt wahrscheinlich in einer Unterversorgung des ER mit Ca^{2+} - Ionen. An Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass BiP das Homolog zu Kar2p, eine Autophosphorylierung eingeht, die durch Ca^{2+} - Ionen stimuliert wird. Die phosphorylierten Isoformen von Bip besitzen andere Proteinbindungs-eigenschaften als unphosphoryliertes Bip (Hendershot and Kearney, 1988; Leustek et al., 1991; Carlino et al., 1992). Eine um 50 % niedere Ca^{2+} - Konzentration im ER von *Δpmr1*- Zellen (Strayle et al., 1999) könnte so auch auf eine Phosphorylierung von Kar2p Einfluss haben und damit sowohl auf den Export von CpY* also auch auf die generelle Funktion von Kar2p in der Proteinfaltung. Die im ER lokalisierte α - Mannosidase (Mns1), die für die CpY* Degradation benötigt wird, ist ebenfalls Ca^{2+} - abhängig (Knop et al., 1996). Da *bst1*- Mutanten zudem in erheblichen Ausmaß Kar2p sezernieren, könnten in

Δpmr1 Δbst1- Doppelmutanten, die Probleme mit der Proteinfaltung und dem Abbau falschgefalteter Proteine verstärkt werden. Dies könnte den erheblichen Wachstumsdefekt in einer *Δpmr1 Δbst1* Doppelmutante erklären.

***Δpmr1 Δsac2* Doppelmutanten**

Auch eine *Δpmr1 Δsac2* Doppelmutante weist auf YPD-Medium einen drastischen Wachstumsdefekt auf. Sac2p/Vps52p ist Bestandteil des „Vps fifty three tethering Komplexes“. Dieser VFT Komplex wird benötigt, um Transportvesikel aus dem frühen Endosom an die Golgimembran zu binden. *Δvps52*- Mutanten sezernieren CpY (ca. 70 %) in der Golgi- modifizierten p2 Form. Die Ursache hierfür liegt in einer Destabilisierung von Vps10p, dem Rezeptor für CpY, der normalerweise zwischen dem TGN und dem pre-vakuolären Kompartiment re- zirkuliert. Da in *Δvps52*- Zellen der Rücktransport aus dem Endosom blockiert ist, gelangt Vps10p vermehrt in die Vakuole und wird dort abgebaut (Conibear and Stevens, 2000). Hong et al. konnten zeigen, dass Vps10p auch am „Sorting“ falsch gefalteter luminaler Proteine zur Vakuole beteiligt ist. Da *pmr1*- Zellen aufgrund der reduzierten Ca²⁺- Konzentration im ER Probleme in der ER- assoziierten Degradation falsch gefalteter Proteine haben, könnte die Funktion von Vps10 im Sorting solcher Proteine zur Vakuole, von besonderer Bedeutung sein (Hong et al., 1996). So konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine Überexpression von *VPS10* in *Δpmr1*- Zellen den Wachstumsdefekt auf EGTA Platten supprimiert. Siniosoglou und Pelham konnten zeigen, dass Zellen, die eine Mutation in den VFT- Genen tragen, fragmentierte Vakuolen besitzen und einen Defekt im Recycling von Snc1 aufweisen. Snc1 ist ein v-Snare, der an der Fusion von Sekretionsvesikeln mit der Plasmamembran beteiligt ist und normalerweise mittels Endocytose internalisiert und über das frühe Endosom zurück zum Golgi transportiert wird (Lewis et al., 2000; Siniosoglou and Pelham, 2002). Anhand von temperatursensitiven Allelen von Snc1p konnte gezeigt werden, dass diese Mutanten Defekte in der endocytotischen Aufnahme von Komponenten aus der Zelloberfläche besitzen und dass die alpha-Faktor stimulierten Endocytose des alpha- Faktor Rezeptors Ste2 blockiert ist. Gurunathan et al. schlossen aus diesen Beobachtungen auf eine direkte Beteiligung von Snc1 am Rücktransport von Membranproteinen von der Zelloberfläche (Gurunathan et al., 2000). Eine funktionale Endocytose ist aber für *Δpmr1*- Zellen essentiell: *Δpmr1Δend3* bzw. *Δpmr1 Δend4* Doppelmutationen sind nicht lebensfähig. Dies könnte vielleicht darin begründet sein, dass in *Δpmr1*- Zellen in erhöhtem Masse falsch gefaltete, nichtfunktionale Proteine an die Plasmamembran gelangen, die über Endocytose wieder internalisiert werden müssen. Nach diesem Modell könnte eine Beeinträchtigung der endocytotischen Internalisierung in *pmr*- Mutanten- ausgelöst durch den Verlust von *sac2/ vps52* und die beschriebenen Auswirkungen auf Snc1- den Wachstumsdefekt einer *Δpmr1 Δvps52* Doppelmutante erklären.

***Δpmr1 Δvps24*- Zellen zeigen reduziertes Wachstum auf YPD**

Das endosomale System eukaryontischer Zellen koordiniert den Proteintransport zwischen Plasmamembran, dem TGN und der Vakuole/Lysosom (Lemmon and Traub, 2000). Zwei Transportwege zwischen Endosom und Vakuole wurden bisher beschrieben, zum einen der biosynthetische Transportweg (Transport von Proteinen vom ER, durch den Golgi- Komplex zur Vakuole über die endosomalen Kompartimente), sowie der endocytotische Transportweg (Internalisierung von Rezeptoren und anderen Membran- Proteinen) von der Plasmamembran zur Vakuole über die endosomalen Kompartimente. Im endosomalen System treffen also beide Transportwege zusammen. Die Vakuole enthält zahlreiche Hydrolasen, die als inaktive Vorstufen über den biosynthetischen Transportweg zur Vakuole gelangen und dort durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Diese Proteasen dienen der Degradation der zum Abbau bestimmten Proteine und Lipide. Damit Proteine, Lipide bzw. Hydrolasen die Vakuole erreichen können, müssen sie im endosomalen Kompartiment in „Multi- Vesicular Bodies“ (MVB`s) gepackt werden. „Reife“ MVB`s fusionieren dann mit der Vakuolenmembran und setzen die Fracht ins Lumen der Vakuole frei (Felder et al., 1990; Futter et al., 1996). Das Sorting in die MVB`s spielt eine kritische Rolle ob Proteine re- zirkuliert oder degradiert werden. Vps24p ist Bestandteil des ESCRT-III Komplexes („endosomal sorting complex required for transport“). Dieser Komplex besteht aus den Vps Proteinen Vps24p, Snf7p, Vps2p und Vps20p (alle Klasse E). Diese Proteine sind hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert und werden zeitweise an das endosomale Kompartiment rekrutiert um dort das „Aufkonzentrieren“ und „Sorting“ der endosomalen Fracht und die Bildung der MVB`s durchzuführen (Babst et al., 2002). Ubiquitinierung dient hierbei als Erkennungssignal für die Frachtproteine (Katzmann et al., 2001), die allerdings vor ihrer Verpackung in die MVB`s wieder deubiquitiniert werden (Swaminathan et al., 1999). Unter Mitwirkung von Vps24p wird Doa4p, ein Deubiquitinierungsenzym, an die Endosomenmembran gebunden (Amerik et al., 2000). Ein Vps24- Vps2 Unterkomplex interagiert desweiteren mit Vps4p, einer AAA-Typ ATPase, welche die Dissoziation des ESCRT-III Komplexes nach MVB- Bildung katalysiert (Babst et al., 2002). Die Deletion eines der *VPS*- Gene der Klasse E führt zu einer Akkumulation der endosomalen Fracht in einem endosomalen Kompartiment der Klasse E (Raymond et al., 1992; Piper et al., 1995) sowie zu einer Mislokalisierung der Fracht in die Vakuolenmembran (Babst et al., 2002). Der Wachstumsdefekt von *Δpmr1 Δvps24*- Doppelmutanten könnte wie im Fall der *Δpmr1 Δsac2* Mutante, in der fehlerhaften Degradation falschgefalteter Proteine in der Vakuole begründet sein.

Funktion von Gap1p in $\Delta pmr1$ Zellen

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzt 23 Aminosäurepermeasen (Nelissen et al., 1997). Nach der Art ihrer Regulation als Antwort auf die im Medium enthaltene Stickstoffquelle können sie in 2 Klassen aufgeteilt werden (Sophianopoulou and Diallinas, 1995). Die erste Klasse von Permeasen, wie z.B. Can1p (Argininimport) oder Hip1p (Histidintransport), wird unter Stickstoffmangel kaum exprimiert (Horak, 1986). Diese Klasse von Permeasen importiert hauptsächlich Aminosäuren für die Proteinsynthese. Eine zweite Klasse von Aminosäurepermeasen wird bei Wachstum auf schlechten Stickstoffquellen exprimiert, wie zum Beispiel die Aminosäurepermease Gap1p („general amino acid permease“; (Grenson et al., 1970; Jauniaux and Grenson, 1990) und die Prolin spezifische Permease Put4p (Vandenbol et al., 1989). Diese Permeasen dienen vermutlich dem Import von Aminosäuren, die als Stickstoffquelle benutzt werden sollen (Jauniaux and Grenson, 1990). Die Aminosäurepermease Gap1p ist in der Lage, alle natürlich vorkommenden Aminosäuren zu transportieren. Bei Wachstum auf „schlechten“ Stickstoffquellen wie z.B. Harnstoff und Prolin, wird sie zur Plasmamembran transportiert, während sie bei Wachstum auf „guten“ Stickstoffquellen direkt über das pre-vakuoläre Kompartiment zur Vakuole transportiert und dort abgebaut wird. An $\Delta pmr1$ - Zellen konnte beobachtet werden, dass diese einen Wachstumsdefekt auf MM- Medium mit Prolin bzw. Harnstoff als einziger Stickstoffquelle aufweisen. Auch auf Citrullin konnte dieser Wachstumsdefekt beobachtet werden. Transportstudien mit radioaktiv markiertem Citrullin ergaben, dass $\Delta pmr1$ - Zellen unter Wachstumsbedingungen, bei denen *GAP1* exprimiert wird, einen Defekt im hochaffinen Import von Citrullin (4 μ M Citrullin) aufweisen. An $\Delta gap1$ - Zellen konnte gezeigt werden, dass die Citrullinaufnahme unter diesen Bedingungen fast ausschließlich durch die Aminosäurepermease Gap1p erfolgt. Während sich die Citrullinaufnahme in $\Delta gap1$ - Zellen durch Transformation mit *GAP1::HA*, *GAP1* oder *GAP1::GFPI* Plasmiden wiederherstellen lässt, zeigen $\Delta pmr1$ - Zellen, auch mit einem *GAP1::HA* Plasmid keine verbesserte Citrullinaufnahme. Welche Ursachen könnte die drastische Reduktion des Citrullinimports in $\Delta pmr1$ - Zellen haben?

Die Transportaktivität von Gap1p in $\Delta pmr1$ - Zellen ist stark reduziert

Subzelluläre Fraktionierungen konnten zeigen, dass Gap1p sowohl in $\Delta pmr1$ - als auch in Wildtypzellen nur zu einem recht geringen Teil an die Plasmamembran gelangt. Die überwiegende Mengen von Gap1p kofraktioniert mit den

intrazellulären Markerproteinen Pep12, Alp und Vps10, wobei eine genaue Quantifizierung der in einem bestimmten Organell befindlichen Menge nicht möglich ist (Fiebig, Doktorarbeit). Auch die Analyse der Lokalisation eines Gap1-GFP Fusionsproteins mittels Fluoreszenzmikroskopie, ergab keine wesentlichen Unterschiede zwischen Wildtyp- und $\Delta pmr1$ - Zellen (Fiebig, Doktorarbeit). Beruht also der stark reduzierte Citrullinimport in $\Delta pmr1$ - Zellen möglicherweise auf einer verringerten Transportaktivität von korrekt lokalisiertem Gap1p? Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine Kinetik für den Citrullinimport in Wildtyp- und $\Delta pmr1$ - Zellen bei einer Reihe verschiedener Citrullinkonzentrationen aufgenommen. Die Messungen wurden unter gepufferten Bedingungen durchgeführt (pH 5.4 75mM $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ Puffer), die erhaltenen Messwerte wurden reziprok in einem Lineweaver- Burk Plot aufgetragen. Ganz offensichtlich folgt der Citrullin- Transport im Konzentrationsbereich von 5 μM - 14 μM einer Michaelis-Menten Kinetik. Bei höheren Citrullinkonzentrationen scheint der Citrullinimport in die Zelle nicht mehr ausschließlich über Gap1p zu erfolgen. Aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abzisse konnte ein scheinbarer $K_M = 110 \mu\text{M}$ für Wildtypzellen und ein $K_M = 23.8 \mu\text{M}$ für $\Delta pmr1$ - Zellen ermittelt werden. Da nicht bekannt ist, bei welchem pH Sättigung in Bezug auf das zweite Substrat (H^+) vorliegt, muß der ermittelte K_M als scheinbar bezeichnet werden. Hieraus ergab sich ein $V_{\max} = 14.8 \text{ pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ für Wildtypzellen und $V_{\max} = 3.309 \text{ pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ für $\Delta pmr1$ - Zellen. Die Transportaktivität von Gap1p ist in $\Delta pmr1$ - Zellen also drastisch reduziert. Es fällt auf, dass die Lineweaver-Burk Gerade für Wildtyp und $pmr1$ - Mutante annähernd parallel verlaufen. Eine derartige Kinetik beobachtet man unter anderem bei unkompetitiver Inhibierung, einer Form von Inhibierung, bei der ein Inhibitor ausschließlich an den Enzym-Substrat- Komplex bindet. Häufig kommt diese Art von Inhibierung bei bi-Substrat Reaktionen vor, wenn der Inhibitor nicht mit Substrat 1 konkurriert, sondern ausschließlich mit Substrat 2. So wäre es zum Beispiel im Falle der Aminosäurepermease Gap1p möglich, dass zunächst Citrullin an die Permease bindet und erst dann durch Konformationsänderungen eine Bindungsstelle für den Inhibitor frei wird. Der Inhibitor könnte dann entweder direkt um die Bindung des zweiten Substrats (H^+) konkurrieren oder aber diese allosterisch beeinflussen.

Fehlfunktion von Pma1 in $\Delta pmr1$ Zellen ?

Die H^+ - ATPase Pma1 spielt eine essentielle Rolle in der Physiologie von Pflanzen und Pilzen (Serrano, 1988). Pma1 hydrolysiert ATP und nutzt die dabei freiwerdende Energie um Protonen aus der Zelle zu pumpen. Hierbei erzeugt sie ein Membranpotential, das andere Transportsysteme als treibende Kraft nutzen. Dies gilt z.B. für Gap1p, einem H^+ - Symporter, der parallel zu der Aminosäureaufnahme H^+ in die Zelle transportiert. Die Aktivität dieser

elektrogenen Pumpe Pma1 muss also exakt reguliert werden, damit das Membranpotential an der Plasmamembran und somit die Transportaktivität vieler Transportproteine aufrechterhalten bleibt. Wäre nun die Aktivität von Pma1 in $\Delta pmr1$ - Zellen reduziert- verursacht durch eine gestörte Ca^{2+}/Mn^{2+} - Homöostase- so könnte dies auch Auswirkungen auf die Transportaktivität von Gap1p haben. Allerdings ergaben H^+ - Ausstrommessungen an gehungerten Wildtyp- und $\Delta pmr1$ - Zellen keinen Hinweis auf eine reduzierte Aktivität der H^+ - ATPase Pma1p in $\Delta pmr1$ - Zellen (Elbs und Rudolph, unveröffentlicht). Die Ursache für die reduzierte Citrullinaufnahme scheint also nicht in einer generellen Fehlfunktion von Pma1p zu liegen. Das Ausmaß des Transportdefekts in $pmr1$ - Zellen ist aber stark vom pH- Wert des Mediums abhängig. Sowohl im Wildtyp als auch in $\Delta pmr1$ - Zellen wird die Citrullinaufnahme bei Abnahme des pH- Wertes von 5.4 auf 4.0 leicht stimuliert. Durch Abnahme des pH- Wertes des Medium wird der Transmembrangradient größer und damit wird der Transport von Citrullin in die Zelle erleichtert. Entsprechende Messungen wurden auch bei gleichen pH- Werten in einem mit schwachen organischen Säuren gepuffertem Medium durchgeführt. Schwache organische Säuren sind in der Lage den cytosolischen pH- Wert stärker zu erniedrigen als starke Säuren beim gleichen pH des Mediums (Holyoak et al., 1996; Carmelo et al., 1997; Viegas et al., 1998). So ist unter anderem bekannt, dass die Aktivität von Pma1p bei abnehmendem cytosolischem pH- Wert stark stimuliert wird. Unter Pufferung mit schwachen organischen Säuren konnte in $\Delta pmr1$ - Zellen eine kräftige Stimulierung des Citrullinimports, die relativ unabhängig vom pH- Wert des Mediums war, beobachtet werden. Im Vergleich dazu wurde der Citrullinimport in Wildtypzellen nur leicht bzw. nicht stimuliert. Die aufgenommenen Mengen an Citrullin lagen aber auch unter gepufferten Bedingungen in $\Delta pmr1$ - Zellen noch deutlich unter den Werten der Wildtypzellen. Offenbar wirkt sich die Pufferung des Mediums lediglich stimulierend auf die Aktivität von Pma1 aus, kann aber den Defekt in $\Delta pmr1$ - Zellen nicht völlig kompensieren.

Mögliche Ursachen für die drastisch reduzierte Transportaktivität von Gap1p in $\Delta pmr1$ - Zellen?

Eine mögliche Ursache für die drastisch reduzierte Transportaktivität von Gap1p in $\Delta pmr1$ - Zellen könnte zum Beispiel in einer fehlenden post- translationalen Modifikation von Gap1p liegen. So ist unter anderem bekannt, dass Gap1p durch Phosphorylierung aktiviert bzw. durch Dephosphorylierung inaktiviert wird (Stanbrough and Magasanik, 1995). Involviert in diesen Phosphorylierungsprozess ist die Proteinkinase Npr1 (Vandenbol et al., 1987; Vandenbol et al., 1990; Hunter and Plowman, 1997). Npr1 selbst wird durch Phosphorylierung deaktiviert

und durch Dephosphorylierung aktiviert (Schmidt et al., 1998). Interessant wäre es in diesem Zusammenhang, den Phosphorylierungsgrad von Gap1p und der Proteinkinase Npr1 in $\Delta pmr1$ - und Wildtyp- Zellen zu untersuchen. Möglicherweise könnte aufgrund gestörter Ionenhomöostase in $\Delta pmr1$ - Zellen ein Regulationsdefekt in der TOR Signalkaskade vorliegen. Tor2 besitzt zwei essentielle Signalfunktionen: zum einen kontrolliert es die Zellzyklus- abhängige Organisation des Aktincytoskeletts (Schmidt et al., 1996; Bickle et al., 1998). Eine weitere Funktion von Tor2 (und Tor1) ist die Translationsinitiierung als Antwort auf Nährstoffe (Kunz et al., 1993; Helliwell et al., 1994; Barbet et al., 1996). Schmidt et al. konnten zeigen, dass die Phosphorylierung der Ser/Thr-Kinase Npr1 durch die beiden TOR- Proteine sowie durch Tap42p kontrolliert wird und stellten folgendes Modell auf: in Anwesenheit von Nährstoffen aktiviert TOR Tap42, dies führt dann zu einer Phosphorylierung und Inaktivierung von Npr1p. In Abwesenheit von Nährstoffen hingegen sind TOR und Tap42p inaktiv und bewirken so die schnelle Dephosphorylierung und Aktivierung von Npr1p. Sollte nun in $\Delta pmr1$ - Zellen aufgrund veränderter Ionenhomöostase ein Defekt in der Regulation von TOR bzw. Tap42 vorliegen, so könnten dies auch zu falscher Regulation von Npr1p bzw. Gap1p führen (Schmidt et al., 1998). Da die Inaktivierung von Npr1 endocytotische Internalisierung von Gap1p initiiert, wäre es in diesem Zusammenhang sehr interessant die Halbwertszeit von Gap1p in $\Delta pmr1$ - und Wildtypzellen zu studieren.

6. Materialien und Methoden

Saccharomyces cerevisiae Stämme

YR98	<i>MATα ade2 his3-Δ200 leu2-3,112 lys2-Δ201 ura3-52</i>	A. Antebi
YR101	<i>MATα ade2 his3-Δ200 leu2-3,112 lys2-Δ201 ura3-52</i>	A. Antebi
YR122	<i>MATα ade2 his3-Δ200 leu2-3,112 lys2-Δ201 ura3-52 pmr1::<i>LEU2</i></i>	A. Antebi
YR891	<i>MATα ade2 his3-Δ200 leu2-3,112 lys2-Δ201 ura3-52 gap1-Δ2::<i>LEU2</i></i>	P. Ljungdahl
YR990	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112</i>	C. Kaiser
YR991	<i>MATα ura3-52 his4-619 sec12-4</i>	C. Kaiser
YR992	<i>MATα ura3-52 his4-619 sec18-1</i>	C. Kaiser
YR993	<i>MATα ura3-52 sec6-4</i>	C. Kaiser
YR1056	<i>MATα sec1 ura3 leu2 his4 lys2 bar1</i>	B. Singer-Krüger
YR1065	<i>MATα ade2-loc ura3-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 prc1-1 Δder3::<i>HIS3</i> can1-100 sec61-2</i>	R. Plemper
YR1070	<i>MATα ura3-52</i>	P. Ljungdahl
YR1071	<i>MATα ura3-52 sec13-1</i>	P. Ljungdahl
YR1087	<i>MATα ura3-52 sec6-4 end3::<i>URA3</i></i>	diese Arbeit
YR1171	<i>MATα sec18-1 suc2 mal mel gal2 CUP1</i>	A. Mayer
YR1260	<i>MATα ura3-52 leu2-3,112 sec62-1 his4</i>	P. Ljungdahl
YR1420	<i>MATα ade2 his3-Δ200 leu2-3,112 lys2-Δ201 ura3-52 bst1::<i>HIS3</i> pmr1::<i>LEU2</i></i>	diese Arbeit
YR1423	<i>MATα ade2 his3-Δ200 leu2-3,112 lys2-Δ201 ura3-52 bst1::<i>HIS3</i></i>	diese Arbeit

YR1425	<i>MATα ade2 his3-Δ200 leu2-3,112 lys2-Δ201 ura3-52 sac2::<i>HIS3</i> pmr1::<i>LEU2</i></i>	diese Arbeit
YR1462	<i>MATα ade2 his3-Δ200 leu2-3,112 lys2-Δ201 ura3-52 vps24::<i>HIS3</i> pmr1::<i>LEU2</i></i>	diese Arbeit

Plasmide:

BR5	<i>CEN, URA3, PMR1</i>	A. Antebi
BR13	2 μ , <i>URA3</i>	H. Rudolph
BR172	<i>CEN, TRP1, ADE2</i>	Lindner
BR424	<i>end3::<ura3< i=""></ura3<></i>	H. Riezman
BR708	<i>CEN, URA3, GAP1</i>	P. Ljungdahl
BR711	<i>CEN, URA3, GAP1::<ha< i=""></ha<></i>	P. Ljungdahl
BR720	<i>CEN, URA3, GAP1::<gfp< i=""></gfp<></i>	K. Fiebig
BR725	<i>CEN6, URA, GAL1::<gap1::<gfp< i=""></gap1::<gfp<></i>	B. Andre
BR 727	<i>CEN6, URA, GAL1::<gap1<sup>K9K16::GFP</gap1<sup></i>	B. Andre

Medien:

Zur Aufzucht von *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* Stämmen wurden Standardmedien verwendet (Sambrook, 1989; Guthrie, 1991).

SC- Medium für Ca²⁺- Ausstrommessungen:

300 ml 2x CM, 300 ml Wasser, 30 ml 40% Glucose, 3 ml Histidin, 6 ml Uracil, 6 ml Leucin, 6 ml Tryptophan, 6 ml Lysin, 6 ml Adenin

Minimalmedium (MM) für Citrullinaufnahmemessungen:

1.7 g/l Yeast Nitrogen Base w/o Ammoniumsulfat and Aminoacids (Difco)

Supplementiertes Minimalmedium (SMM)

Minimalmedium mit 1 g/l Prolin als Stickstoffquelle, 100 mM Glucose, sowie

Aminosäuren entsprechend der Auxotrophien der verwendeten Stämme.

Supplementiertes Minimalmedium gepuffert :

Minimalmedium supplementiert mit 100 mM Glucose gepuffert bei pH 4 mit 1.2 g/l Citronensäure/ 1.1 g/l Citrat, gepuffert bei pH 4.6 mit Succinat 1% (pH eingestellt mit NaOH), gepuffert bei pH 5.4 mit 1% Succinat und 0.6% NaOH.

Agarplatten enthielten 2% Bacto-Agar

Synthetische Medien wurden je nach Auxotrophien der betreffenden Stämme mit Aminosäuren supplementiert.

Prespoplatten: 1% Bacto yeast extract, 3% Bacto peptone, 5% Glucose, 2% Bacto Agar

Sporulationsmedium: 1% KAc

5-FOA Platten: 300 ml MV- Medium, 3 ml Histidin, 6 ml Adenin, 15 ml Uracil, 6 ml Lysin, 300 ml Agar, 30 ml Glucose (40%), 0.6 g 5-Fluoroorotsäure
MV- Medium wurde zusammen mit den Supplementen, Glucose und dem geschmolzenen Agar vermischt und im Wärmeschrank auf 60°C temperiert, dann wurde das 5-FOA zugegeben und unter Rühren gelöst.

Zellkulturen:

S. cerevisiae Kulturen auf Agarplatten wurden falls nicht anders angegeben, zwei bis drei Tage bei 30°C inkubiert, anschließend luftdicht verschlossen und bei 4°C gelagert. Plasmidhaltige Hefestämme wurden in Selektionsmedien kultiviert. Vorkulturen wurden über Nacht in 2 ml Medium bei 220 Upm inkubiert. Daraus wurden Hauptkulturen angeimpft, die auf einem Schüttler bis zu den im Protokoll angegebenen Optischen Dichten inkubiert wurden. Die Zelldichte der Hefekulturen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) bestimmt ($1OD_{600} = 1-2 \times 10^6$ Zellen).

E.coli Kulturen wurden in LB flüssig Medium bei 37°C über Nacht inkubiert. Bei plasmidhaltigen *E. coli* Kulturen wurde zusätzlich Ampicillin (20mg/400ml) zur Selektion zugesetzt.

Zur Sporulationen wurden die Hefekulturen zunächst bei 30°C über Nacht auf Prespoplatten ausgestrichen und anschließend bei Raumtemperatur in 2 ml

Sporulationsmedium bei 220 Upm 4 –5 Tage bei Raumtemperatur inkubiert.

Klonierungen und DNA Transformation:

Alle molekularbiologischen Methoden wurden mit sterilen Lösungen und Gefäßen durchgeführt und soweit nicht anders erwähnt mit molekularbiologischen Grundmethoden nach entsprechenden Standardprotokollen durchgeführt (Asubel, 1990; Sambrook et al., 1989). Plasmidpräparationen wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Quiagen; Hilden), Gelextraktionen mit dem Qiaex II Gel Extraction Kit (Quiagen, Hilden) durchgeführt. Zur Deletion von Genen wurde die *HIS3* Deletionskassette pFA6a-His3MX6 (Wach et al., 1997) verwendet. Die Deletionskonstrukte wurden mittels PCR amplifiziert. Primer wurden von MWG hergestellt. Die Amplifikation wurde in 50 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Zusammensetzung: 200 ng Plasmid- DNA, 0.5 µl Primer, 1 µl dNTP, 5 µl Reaktionspuffer, sowie 1 µl einer Taq/ Vent Mischung im Verhältnis (10 : 1), hotstart. 1. Zyklus 5 min 94°C, 45 s bei 56°C, 1 min 30 s bei 72°C, dann 17 Zyklen 30 s bei 94°C, 30 s bei 56 °C, 1 Zyklus 10 min bei 72°C. DNA Fragmente (ca. 1000 bp) für Southern Blot Sonden wurden ebenfalls mittels PCR amplifiziert. Dazu wurde 200 µg chromosomale DNA als Template verwendet. 1. Zyklus 5 min 94°C, 45 s bei 56°C, 1 min 30 s bei 72°C, dann 25 Zyklen 30 s bei 94°C, 30 s bei 56 °C, 1 Zyklus 10 min bei 72°C. *S. cerevisiae* Stämme wurden mittels Lithiumacetat Methode (Ito et al., 1983), *E. coli* Stämme mittels Elektroporation transformiert. Homologe Rekombinationsereignisse wurden mittels Southern Blot Analysis überprüft.

Isolierung chromosomaler DNA:

5 ml einer stationären Zellkultur wurden 3 min bei 2500 rpm abzentrifugiert, mit 500 µl demin. Wasser gewaschen. Dann wurden 200 µl Breaking Buffer (2% Triton X 100, 1% SDS, 100 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris pH 8, 1mM EDTA pH 8), 200 µl Glasperlen, sowie 200 µl einer Phenol/Chloroform (Verhältnis 1: 1) zugesetzt. Die Proben wurden 4 x 1 min intensiv geschüttelt (im Vortexer) und zwischendurch wurden die Proben jeweils 1 min auf Eis inkubiert. Jeder Probe wurden 200 µl demin. Wasser zugesetzt und die Proben wurden bei 14000 rpm und einer Temperatur von 4°C 10 min abzentrifugiert. 300 µl Überstand wurden entnommen und die DNA durch Zugabe von 1 ml eiskaltem absolutem Ethanol gefällt. Die Proben wurden 10 min bei –25°C inkubiert. Dann wurde die DNA abzentrifugiert bei 14000 rpm, 4°C, 10 min. Der Überstand wurde entfernt und die DNA in 400 µl demin. Wasser aufgenommen. Es wurden 3 µl einer RNase Lösung

(10 mg/ml) zugesetzt und die Proben wurden für 20 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden 10 µl einer 5 M Ammoniumacetatlösung zugesetzt und die DNA erneut mit 1ml abs. Ethanol bei -25°C gefällt. Proben wurden 10 min bei 4°C und 14000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Proben nochmals 5 min bei 14000 rpm und einer Temperatur von 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Proben wurden getrocknet. Dann wurde die DNA in 30 µl demin. Wasser aufgenommen.

Southern Blot Analysis :

1. Verdau der chromosomalen DNA für Southern Blot

1 µg chromosomaler DNA wurde in einem Volumen von 25 µl über Nacht bei 37°C mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (20 U) verdaut. Der gesamte Verdauansatz wurde auf ein 0.8% Agarosegel aufgetragen zusammen mit einem 1 kB- DNA Marker. Die verdauten Fragmente wurden einer Gelelektrophorese unterworfen. Anschließend wurde das Gel zusammen mit einem Längenvergleich photographiert .

2. Transfer der DNA nach dem Vacuumblot-Verfahren

Eine Hybond-N Nylonmembran (Amersham) wurde in 2-fach SSC- Puffer (20 x SSC: 3 M Natriumchlorid, 0.3 M Natriumcitrat pH 7,0) äquilibriert und auf die mit demin. Wasser getränkte Trägerfläche der Blottingkammer gelegt. Anschließend wurde die freie Trägerfläche mit einer Folie bedeckt, so dass die Nylonmembran ausgespart bleibt. Das Agarosegel wurde vorsichtig auf die Membran gelegt, so dass es auch einen Teil der Folie bedeckt. Ein Vakuum wurde an die Blottingapparatur angelegt und das Gel wurde mit Denaturierungspuffer (1,5 M Natriumchlorid, 0.5 M Natriumhydroxid) überschichtet. Nach 10 min wurde dieser Puffer mittels einer Pipette entfernt und der Blot wurde nun mit Neutralisierungspuffer (0.5 M Tris /HCl, 3M Natriumchlorid, pH 7.0) bedeckt. Anschließend wurde die DNA 1 h lang auf die Nylonmembran transferiert mittels 20 x SSC Puffer. Die Nylonmembran wurde getrocknet und die DNA 5 min unter dem UV Licht an die Membran fixiert. Die Membran wurde in eine Hybridisierungsröhre überführt.

3. Herstellen der Sonde

Nach Verdau eines Plasmids oder nach Amplifikation des DNA Stückes mittels PCR, wurde die DNA zur Aufreinigung auf ein 0.8%iges Agarosegel aufgetragen

und die Fragmente mittels Gelelektrophorese voneinander getrennt. Nun wurde das gesuchte DNA Fragment unter dem UV Licht mittels eines Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Gelextraktionskit Qiaex II Gel Extraction Kit (Quiagen, Hilden) aus dem Gel isoliert. Die Sonde wurde mittels AlkPhos direct Kit (Amersham) hergestellt. Dazu wurde die DNA (10 ng / μ l) für 5 min auf 96 °C erhitzt und sofort in einem Eisbad für 5 min gekühlt. 10 μ l wurden entnommen und in ein Eppendorfhütchen überführt. Nun wurden 10 μ l Reaktionspuffer , 2 μ l Labelling Reagenz sowie 10 μ l Crosslinker Lösung hinzugefügt und die Reaktionsmischung 30 min bei 37°C inkubiert.

4. Hybridisierung und Entwicklung

Der AlkPhos Direct Hybridisierungspuffer (30 ml) wurde auf 55 °C erhitzt und zum Blot in der Hybridisierungsröhre zugefügt. Der Blot wurde 30 min bei 55°C in einem Hybridisierungssofen prehybridisiert anschließend wurden 32 μ l Sonde hinzugefügt und der Blot wurde über Nacht bei 55 °C hybridisiert. Der Hybridisierungspuffer wurde entfernt und der Blot wurde 2x für 15 min mit 50 ml 55°C warmen Primary wash buffer (120 g Harnstoff, 1 g SDS , 0,5 M Natriumphosphatpuffer pH 7.0 100 ml, 8.7g Natriumchlorid, 1ml 1.0 M Magnesiumchlorid, 2 g Blocking reagent auf 1000 ml) in der Hybridisierungsröhre gewaschen. Dann wurde die Nylonmembran aus der Röhre entfernt und 2x 5 min mit 1x secondary wash buffer (20x secondary wash buffer: 112g Tris, 112g Natriumchlorid pH 10 /11) 250ml und 0.5 ml 1M Magnesiumchloridlösung gewaschen. Nun wurde die Membran für 3 min mit Detektion Reagenz überschichtet. Überschüssiges Detektions Reagenz wurde entfernt und die Membran wurde in eine durchsichtige Folie verpackt. Der Blot wurde in einer Entwicklungskassette befestigt und in der Dunkelkammer wurde ein ECL- Hyperfilm (Amersham) auf die Membran gelegt. Dann wurde der Film entwickelt.

Herstellung kompetenter *E. coli*

Zellen wurden aus -80°C Dauerkultur in 5ml LB- Medium angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert. Diese Kultur wurde in 500 ml LB- Medium umgeimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von 0.4- 0.5 inkubiert. Dann wurden die Zellen 30 min in Eis gekühlt. Alle folgenden Schritte wurden unter Eiskühlung durchgeführt. 10% Glycerinlösung (steril) wurde im Kühlschrank vorgekühlt. Zellen wurden geerntet (15 min, 5000 rpm, 4°C), in 500 ml 10% Glycerin resuspendiert, erneut abzentrifugiert, aufgenommen in 250 ml 10% Glycerin, erneut abzentrifugiert, in 50 ml 10 % Glycerin resuspendiert, abzentrifugiert und in 2 ml 10 % Glycerin aufgenommen. 50 μ l Zellsuspension wurde in Eppendorfhütchen überführt und

sofort in Trockeneis schockgefrosten. Kompetente Zellen wurden bei -80°C aufbewahrt.

Elektroporation kompetenter *E. coli*

Alliquots kompetenter Zellen wurden auf Eis langsam aufgetaut. Dann wurde 0.1-1 μl Plasmid- DNA zugefügt, die Mischung wurde 5 min auf Eis inkubiert, in eine eisgekühlte Elektroporationsküvetten überführt (Elektroporation bei 2 kV, 400 Ohm, 25 μF). Zellen wurden sofort in 1 ml SOC- Medium aufgenommen, in ein Eppendorfhütchen überführt und 1 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert, in 100 μl Wasser aufgenommen und auf LB- Ampicillin Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Kreuzung von Hefestämmen

Zellen beider Stämme wurden über Nacht in 2 ml YPD kultiviert auf der selben YPD Platten ausplattiert und über Nacht bei 30°C inkubiert, dann wurde auf SC-Platten unter Zusatz der benötigten Supplemente auf Diploide selektioniert und zusätzlich noch auf Mating Type getestet.

Sporulation

Hefekulturen wurden auf Presporulationsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Dann wurden die Zellen in 2 ml Sporulationsmedium (1% Kaliumacetat) suspendiert und 4-5 Tage bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurden 200 μl Zellkultur geerntet. 3 x mit 1 ml demin. Wasser gewaschen, das Pellet wurde in 200 μl Wasser resuspendiert und 3 μl Glusulase zugesetzt. Nach 3 min wurden 800 μl eiskaltes Wasser zugesetzt und die Zellen wurden über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die Sporen wurden mittels eines Mikromanipulators voneinander getrennt, 3 Tage auf YPD- Platten inkubiert und anschließend auf Marker und Mating Type getestet.

Calciumausstromexperimente

Standardvorschrift

Es wurden Einzelkolonien der verschiedenen *S. cerevisiae* Stämme auf YPD-Platten bei 25°C gezüchtet. Von diesen Einzelkolonien wurden Vorkulturen (5ml

SC) über Nacht inkubiert. Hauptkulturen wurden unter Zusatz von 1 $\mu\text{Ci/ml}$ $^{45}\text{CaCl}_2$ (20 mCi/ mg Calcium) in SC bei 25°C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Bei einer OD_{600} 0.8 wurden die Zellen geerntet. (20 ml Zellkultur pro Experiment) mit 1 mM EGTA- Lösung (pH 8) und anschließend mit Wasser gewaschen, in 20 ml 25mM MES-Puffer pH 5.8 resuspendiert unter Zusatz von 100 mM Glucose und 30 min bei 25°C bzw. 37°C inkubiert. Dann wurden 5mM MgCl_2 (1 M MgCl_2 -Stammlösung) zugesetzt und sofort eine Probe von 1 ml entnommen, durch ein Membranfilter mit einer Porenweite von 0.45 μm filtriert (Milipore) und mit 15 ml eiskalter 20 mM MgCl_2 Lösung gewaschen. Falls nicht anders angegeben wurden weitere Proben im Abstand von 5 min entnommen. Die Filter wurde über Nacht in Szintillationsröhrchen getrocknet, mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit überschichtet und der Gehalt an ^{45}Ca wurde im Szintillationszähler bestimmt.

1. Variation: Zellen wurden nur 15 min bei 25°C bzw. 37°C in 25 mM MES-Puffer pH 5.8 unter Zusatz von 100 mM Glucose inkubiert und dann wurden sofort 5 mM MgCl_2 zugesetzt.
2. Variation : Zellen wurden noch im Wachstumsmedium 30 min bei 25 °C bzw. 37°C inkubiert, dann nach obiger Vorschrift gewaschen und sofort in vorgewärmten 25 mM MES- Puffer pH 5.8 unter Zusatz von 100 mM Glucose inkubiert, dann wurden 5mM MgCl_2 zugesetzt und sofort die erste Probe entnommen.

Für die Calciumausstrommessung mit spontaner Temperaturerhöhung wurden die Zellen zunächst 30 min in 13 ml MES- Puffer bei 25°C inkubiert. Dann wurde 5 mM MgCl_2 zugesetzt und im Abstand von jeweils 5min Proben von 500 μl entnommen. Nach 30 min wurden der Zellsuspension 10 ml MES / 5mM MgCl_2 einer Temperatur von 50 °C zugesetzt um die Temperatur der Zellsuspension spontan von 25°C auf 37°C zu erhöhen. Nun wurden weitere 40 min Proben (1 ml) entnommen und zwischen den Probeentnahmen die Zellsuspension in einem 37°C Wasserbad inkubiert.

Um Proteinneusynthese zu Blockieren wurden die Zellen gewaschen, im MES-Puffer resuspendiert unter Zusatz von 180 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Cycloheximid. Die Zellen wurden 30 min bei 25°C inkubiert. Dann wurden 5 mM MgCl_2 zugesetzt und sofort die erste Probe entnommen.

Citrullin -Aufnahme Experimente:

Citrullinaufnahme in Abhängigkeit vom pH

Es wurden Einzelkolonien der Stämme auf YPD- Platten bei 30 °C gezüchtet und davon Vorkulturen (5ml) ebenfalls in YPD- Medium inkubiert. Hauptkulturen wurden über Nacht in YPD- Medium bis zu einer OD_{600} 0.3 kultiviert. Dann wurden die Zellen geerntet (3min, 2500 rpm), mit Wasser gewaschen und im

selben Volumen SMM resuspendiert und weitere 3 h bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (3min, 2500 rpm), mit Wasser gewaschen und in gepuffertem und ungepuffertem MM- Medium bei unterschiedlichem pH mit 10mM Glucose resuspendiert. Es wurden folgende Bedingungen gewählt: MM/ 10 mM Glucose pH 4.0 (HCl), MM/ 10mM Glucose pH 4.6, MM/ 10 mM Glucose pH 5.4 (KOH), MM/ 10 mM Glucose pH 4 gepuffert (1.1 g Natriumcitrat, 1.2 g Citronensäure pro 1000 ml), MM/ 10 mM Glucose pH 4.6 gepuffert (1% Natriumsuccinat, 0.6 % NaOH, pH 4.6 eingestellt mit KOH), MM/ 10 mM Glucose pH 5.4 gepuffert (1% Natriumsuccinat, 0.6 % NaOH). 40ml Zellkultur (YR 122) bzw. 20 ml Zellkultur (YR 98) wurden in 8 ml Aufnahmemedium resuspendiert. Es wurde eine Citrullinstammlösung hergestellt. Hierzu wurden 45 µl Citrullin (2083.1 MBq/mmol Citrullin; 3.7 MBq/ml; NEN Life Science) in 455 µl Wasser resuspendiert. Pro Citrullinaufnahmeexperiment wurden 500 µl Zellkultur entnommen (parallel hierzu wurden 500 µl Zellkultur, abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet für eine spätere Proteinbestimmung nach Bradford bei – 25°C eingefroren) und 10 µl der Citrullinstammlösung zugesetzt, dann wurde im Abstand von 1 min 4 Probe entnommen (100 µl), durch ein Membranfilter filtriert und mit 15 ml eiskaltem Wasser gewaschen. Filter wurden über Nacht in Szintillationsröhrchen getrocknet, mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit überschichtet und der Gehalt an Citrullin wurde im Szintillationszähler bestimmt.

Variation 1 : Citrullinaufnahme der plasmidhaltigen Stämme

Vorkultur in Synthetischem Komplettmedium unter Selektion auf das Plasmid, davon wurden Hauptkulturen angeimpft ebenfalls in Synthetischem Komplettmedium unter Plasmidselektion und diese über Nacht bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ 0.3 inkubiert. Zellen wurden 3h in SMM mit 100 mM Glucose inkubiert, dann gewaschen. Die Citrullinaufnahme wurde in MM Medium (pH 4.6) unter Zusatz von 100 mM Glucose durchgeführt.

Bestimmung der Transportaktivität von Gap1p

Es wurden Einzelkolonien auf YPD Platten bei 25 °C gezüchtet. Vorkulturen (2 ml YPD + 75 mM KH₂PO₄ / 75 mM K₂HPO₄ pH 5.4) wurden bei 30°C über Nacht inkubiert. Davon wurden Hauptkulturen angeimpft (YPD + 75 mM KH₂PO₄ / 75 mM K₂HPO₄ pH 5.4). Zellen wurden über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ 0.3 inkubiert. Dann wurden die Zellen geerntet, mit Wasser gewaschen und im selben Volumen MM/ 100 mM Glucose gepuffert mit 75mM KH₂PO₄/ K₂HPO₄ resuspendiert (ohne Zusatz von Supplementen). Zellen wurden 3 h in diesem Medium inkubiert, geerntet, mit Wasser gewaschen und in MM/ 100 mM Glucose pH 5.4 (75mM K₂HPO₄/ KH₂PO₄) resuspendiert 500 µl Zellkultur

wurden abzentrifugiert und für spätere Proteinmengenbestimmung eingefroren. Stammlösungen unterschiedlicher Citrullinkonzentrationen wurden hergestellt. Hiervon wurden jeweils 10 µl entnommen und zu 500 µl Zellsuspension gegeben (Citrullinkonzentrationen von 5 µM – 14 µM) und 100 µl Proben im Abstand von 1 min entnommen, mit eiskaltem Wasser gewaschen, Filter wurden getrocknet und der Gehalt an Citrullin im Szintillationszähler bestimmt.

Proteinbestimmung

Das eingefrorene Zellpellet wurde in 200 µl 0.2 M NaOH Lösung resuspendiert und 10 min bei 96°C (im Heizblock) erhitzt. Dann wurden 300 µl Wasser hinzugefügt und die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert. Anschließend wurde die Proteinmenge nach Bradford bestimmt.

Induktion von Gal::Gap1::GFP

Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ 0.6 in Synthetischem Kompletmedium unter

Bennennung von Genen

Die Nomenklatur der Gene der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt nach Demerc et al. (1996). Jedes Gen wird durch drei kursive Buchstaben beschrieben. Dominante Allele werden durch Großbuchstaben- rezessive werden durch Kleinbuchstaben symbolisiert. Eine nachgestellte Zahl kennzeichnet ein spezifisches Allel oder eine spezifische Mutation (*ade2*). Das Symbol Δ steht für eine partielle oder vollständige Deletion eines Gens (*his3- Δ 200*). Eine Insertion eines Gens in ein anderes Gen wird mit dem Symbol $::$ gekennzeichnet (*pmr1::*HIS3**). Proteine werden durch den Gennamen, dem ein klein geschriebenes p nachgestellt wird beschrieben. Hierbei wird nur der erste Buchstabe groß geschrieben (Pmr1p).

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphat spaltendes Enzym
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
Ci	Curie
Da	Dalton
demin	demineralisiert
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
5-FOA	5-Fluoroorotsäure
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
KAc	Kaliumacetat
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MAT	Mating type

MES	2-[N- Morpholino]ethansulfonsäure
MM	Minimalmedium
MVB	Multi Vesicular Body
OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglykol
SC	Synthetisches Komplettmedium

7. Literaturstellen

- Aalto, M. K., Ruohonen, L., Hosono, K., Keranen, S. (1991). „Cloning and sequencing of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* SEC1 gene localized on chromosome IV.“ *Yeast* **7**(6): 643-50.
- Amerik, A. Y., Nowak, J., Swaminathan, S., Hochstrasser, M. (2000). „The Doa4 deubiquitinating enzyme is functionally linked to the vacuolar protein-sorting and endocytic pathways.“ *Mol Biol Cell* **11**(10): 3365-80.
- 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**(6): 633-54.
- Babst, M., Katzmann, D. J., Estepa-Sabal, E. J., Meerloo, T., Emr, S. D. (2002). „Escrt-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting.“ *Dev Cell* **3**(2): 271-82.
- Barbet, N. C., Schneider, U., Helliwell, S. B., Stansfield, I., Tuite, M. F., Hall, M. N. (1996). „TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast.“ *Mol Biol Cell* **7**(1): 25-42.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., Rexaxh, M. F., Ravazzola, M., Arnherdt, M., Schekman, R. (1994). „COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum.“ *Cell* **77**(6): 895-907.
- Beckers, C. J., Block, M. R., Glick, B. S., Rothman, J. e., Balch, W. E. (1989). „Vesicular transport between the endoplasmic reticulum and the Golgi stack requires the NEM-sensitive fusion protein.“ *Nature* **339**(6223): 397-8.
- Bednarek, S. Y., Ravazzola, M., Hosobuchi, M., Amherdt, M., Perrelet, A., Schekman, R., Orci, L. (1995). „COPI- and COPII-coated vesicles bud directly from the endoplasmic reticulum in yeast.“ *Cell* **83**(7): 1183-96.
- Beeler, T., Bruce, K., Dunn, T. (1997). „Regulation of cellular Mg²⁺ by *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Biochim Biophys Acta* **1323**(2): 310-8.
- Bickle, M., Delley, P. A., Schmidt, A., Hall, M. N. (1998). „Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2.“ *Embo J* **17**(8): 2235-45.
- Bilinski, C. A. and Miller, J. J. (1983). „Translocation of zinc from vacuole to nucleus during yeast meiosis.“ *Can J Genet Cytol* **25**(5): 415-9.
- Blaustein, M. P. (1974). „The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes.“ *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **70**: 33-82.
- Bonilla, M., Nastase, K. K., Cunningham, K. W. (2002). „Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress.“ *Embo J* **21**(10): 2343-53.
- Boutry, M., Foury, F., Goffeau, A. (1977). „Energy-dependent uptake of calcium by the yeast *Schizosaccharomyces pombe*.“ *Biochim Biophys Acta* **464**(3): 602-12.
- Brey, R. N. and Rosen, B. P. (1979). „Cation/proton antiport systems in *Escherichia coli*. Properties of the calcium/proton antiporter.“ *J Biol Chem* **254**(6): 1957-63.
- Campbell (1983). *Intracellular Calcium, its universal role as regulator*. Chichester, John Wiley & Sons Limited.
- Canaff, L., Brechler, V., Reudelhuber, T. L., Thibault, G. (1996). „Secretory granule targeting of atrial natriuretic peptide correlates with its calcium-mediated aggregation.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9483-7.

- Carafoli, E. (1987). „Intracellular calcium homeostasis.“ *Annu Rev Biochem* **56**: 395-433.
- Carafoli, P. A. (1987). „Ion motive ATPase. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function.“ *Trends in Biochem* **12**: 146- 149.
- Carlino, A., Toledo, H., Skaleris, D., DeLisio, R., Weissbach, H., Brot, N. (1992). „Interactions of liver Grp78 and Escherichia coli recombinant Grp78 with ATP: multiple species and disaggregation.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(6): 2081-5.
- Carmelo, V., Santos, H., Sa-Correia, I. (1997). „Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Biochim Biophys Acta* **1325**(1): 63-70.
- Carnell, L. and Moore, H. P. (1994). „Transport via the regulated secretory pathway in semi-intact PC12 cells: role of intra-cisternal calcium and pH in the transport and sorting of secretogranin II.“ *J Cell Biol* **127**(3): 693-705.
- Chanat, E., Pimplikar, S. W., Stinchcombe, J. C., Hutter, W. B. (1991). „What the granins tell us about the formation of secretory granules in neuroendocrine cells.“ *Cell Biophys* **19**(1-3): 85-91.
- Chang, A. and Fink, G. R. (1995). „Targeting of the yeast plasma membrane [H⁺]ATPase: a novel gene AST1 prevents mislocalization of mutant ATPase to the vacuole.“ *J Cell Biol* **128**(1-2): 39-49.
- Chapman, R. E. and Munro, S. (1994). „The functioning of the yeast Golgi apparatus requires an ER protein encoded by ANP1, a member of a new family of genes affecting the secretory pathway.“ *Embo J* **13**(20): 4896-907.
- Chvatchko, Y., Howald, I., Riezman, H. (1986). „Two yeast mutants defective in endocytosis are defective in pheromone response.“ *Cell* **46**(3): 355-64.
- Conibear, E. and Stevens, T. H. (2000). „Vps52p, Vps53p, and Vps54p form a novel multisubunit complex required for protein sorting at the yeast late Golgi.“ *Mol Biol Cell* **11**(1): 305-23.
- Cooper, D., Banthorpe, D. V., Wilkie, D. (1967). „Modified ribosomes conferring resistance to cycloheximide in mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.“ *J Mol Biol* **26**(2): 347-50.
- Courchesne, W. E. and Magasanik, B. (1983). „Ammonia regulation of amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Mol Cell Biol* **3**(4): 672-83.
- Cunningham, K. W. and Fink, G. R. (1994). „Ca²⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*.“ *J Exp Biol* **196**: 157-66.
- Cunningham, K. W. and Fink, G. R. (1996). „Calcineurin inhibits VCX1-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Mol Cell Biol* **16**(5): 2226-37.
- Cyert, M. S. and Thorner, J. (1992). „Regulatory subunit (CNB1 gene product) of yeast Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to pheromone.“ *Mol Cell Biol* **12**(8): 3460-9.
- Davis, N. G., Horecka, J. L., Sprague, G. F., Jr. (1993). „Cis- and trans-acting functions required for endocytosis of the yeast pheromone receptors.“ *J Cell Biol* **122**(1): 53-65.
- De Virgilio, C., Hottiger, T., Dominguez, J., Boller, T., Wiemken, A. (1994). „The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant.“ *Eur J Biochem* **219**(1-2): 179-86.
- Deloche, O. and Schekman, R. W. (2002). „Vps10p Cycles between the TGN and the Late Endosome via the Plasma Membrane in Clathrin Mutants.“ *Mol Biol Cell* **13**(12): 4296-307.
- Demerec, M., Adelberg, E. A., Clark, A. J., Hartman, P. E. (1966). „A proposal for a uniform

- nomenclature in bacterial genetics.“ *Genetics* **54**(1): 61-76.
- Deshaies, R. J. and Schekman, R. (1987). „A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum.“ *J Cell Biol* **105**(2): 633-45.
- Deshaies, R. J. and Schekman, R. (1989). „SEC62 encodes a putative membrane protein required for protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum.“ *J Cell Biol* **109**(6 Pt 1): 2653-64.
- Diaz, R., Mayorga, L. S., Weidman, P. J., Rothman, J. E., Stahl, P. D. (1989). „Vesicle fusion following receptor-mediated endocytosis requires a protein active in Golgi transport.“ *Nature* **339**(6223): 398-400.
- Doering, T. L. and Schekman, R. (1996). „GPI anchor attachment is required for Gas1p transport from the endoplasmic reticulum in COP II vesicles.“ *Embo J* **15**(1): 182-91.
- Drummond, I. A., Lee, A. S., Resendez, E., Jr., Steinhardt, R. A. (1987). „Depletion of intracellular calcium stores by calcium ionophore A23187 induces the genes for glucose-regulated proteins in hamster fibroblasts.“ *J Biol Chem* **262**(26): 12801-5.
- Dubois, E. and Grenson, M. (1979). „Methylamine/ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: multiplicity and regulation.“ *Mol Gen Genet* **175**(1): 67-76.
- Dunn, T., Gable, K., Beeler, T. (1994). „Regulation of cellular Ca²⁺ by yeast vacuoles.“ *J Biol Chem* **269**(10): 7273-8.
- Dürr, G., Strayle, J., Plemper, R., Elbs, S., Klee, S. K., Catty, P., Wolf, D. H., Rudolph, H. K. (1998). „The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca²⁺ and Mn²⁺ required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation.“ *Mol Biol Cell* **9**(5): 1149-62.
- Eakle, K. A., Bernstein, M., Emr, S. D. (1988). „Characterization of a component of the yeast secretion machinery: identification of the SEC18 gene product.“ *Mol Cell Biol* **8**(10): 4098-109.
- Egner, R., Mahe, Y., Pandjaitan, R., 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**(11): 5879-87.
- Eilam, Y. (1982). „The effect of monovalent cations on calcium efflux in yeasts.“ *Biochim Biophys Acta* **687**(1): 8-16.
- Eilam, Y. (1982). „Studies on calcium efflux in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Microbios* **35**(140): 99-110.
- Eilam, Y., Lavi, H., Grossowicz, N. (1985). „Active extrusion of potassium in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* induced by low concentrations of trifluoperazine.“ *J Gen Microbiol* **131** (Pt 10): 2555-64.
- Elrod-Erickson, M. J. and Kaiser, C. A. (1996). „Genes that control the fidelity of endoplasmic reticulum to Golgi transport identified as suppressors of vesicle budding mutations.“ *Mol Biol Cell* **7**(7): 1043-58.
- Fang, H., Panzner, S., Mullins, C., Hartmann, E., Green, N. (1996). „The homologue of mammalian SPC12 is important for efficient signal peptidase activity in *Saccharomyces cerevisiae*.“ *J Biol Chem* **271**(28): 16460-5.
- Farquhar, R., Honey, N., Murrant, S. J., Bossier, P., Schultz, I., Montgomery, D., Ellis, R. W., Freedman, R. B., Tuite, M. F. (1991). „Protein disulfide isomerase is essential for viability in *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Gene* **108**(1): 81-9.
- Felder, S., Miller, K., Moehren, G., Schlessinger, J., Hopkins, C. R. (1990). „Kinase activity controls the sorting of the epidermal growth factor receptor within the multivesicular body.“ *Cell* **61**(4): 623-34.

- Ferro-Novick, S. and Jahn, R. (1994). „Vesicle fusion from yeast to man.“ *Nature* **370**(6486): 191-3.
- Foor, F., Parent, S. A., Morin, N., Dahl, A. M., Ramadan, N., Chrebet, G., Bostian, K. A., Nielsen, J. B. (1992). „Calcineurin mediates inhibition by FK506 and cyclosporin of recovery from alpha-factor arrest in yeast.“ *Nature* **360**(6405): 682-4.
- Fuller, R. S., Brake, A., Thorner, J. (1989). „Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca²⁺-dependent serine protease.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(5): 1434-8.
- Futter, C. E., Pearse, A., Hewlett, L. J., Hopkins, C. R. (1996). „Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes.“ *J Cell Biol* **132**(6): 1011-23.
- Gill, D. L., Waldron, R. T., Rys-Sikora, K. E., Ufret-Vincenty, C. A., Graber, M. N., Favre, C. J., Alfonso, A. (1996). „Calcium pools, calcium entry, and cell growth.“ *Biosci Rep* **16**(2): 139-57.
- Gimeno, R. E., Espenshade, P., Kaiser, C. A. (1995). „SED4 encodes a yeast endoplasmic reticulum protein that binds Sec16p and participates in vesicle formation.“ *J Cell Biol* **131**(2): 325-38.
- Goossens, A., de La Fuente, N., Forment, J., Serrano, R., Portillo, F. (2000). „Regulation of yeast H(+)-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters.“ *Mol Cell Biol* **20**(20): 7654-61.
- Graham, T. R. and Emr, S. D. (1991). „Compartmental organization of Golgi-specific protein modification and vacuolar protein sorting events defined in a yeast sec18 (NSF) mutant.“ *J Cell Biol* **114**(2): 207-18.
- Graham, T. R., Seeger, M., Payne, G. S., MacKay, V. L., Emr, S. D. (1994). „Clathrin-dependent localization of alpha 1,3 mannosyltransferase to the Golgi complex of *Saccharomyces cerevisiae*.“ *J Cell Biol* **127**(3): 667-78.
- Green, N., Fang, H., Walter, P. (1992). „Mutants in three novel complementation groups inhibit membrane protein insertion into and soluble protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane of *Saccharomyces cerevisiae*.“ *J Cell Biol* **116**(3): 597-604.
- Grenson, M. (1983). „Inactivation-reactivation process and repression of permease formation regulate several ammonia-sensitive permeases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Eur J Biochem* **133**(1): 135-9.
- Grenson, M. (1983). „Study of the positive control of the general amino-acid permease and other ammonia-sensitive uptake systems by the product of the NPR1 gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Eur J Biochem* **133**(1): 141-4.
- Grenson, M., Hou, C., Crabeel, M. (1970). „Multiplicity of the amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. IV. Evidence for a general amino acid permease.“ *J Bacteriol* **103**(3): 770-7.
- Gurunathan, S., Chapman-Shimshoni, D., Trajkovic, S., Gerst, J. E. (2000). „Yeast exocytic v-SNAREs confer endocytosis.“ *Mol Biol Cell* **11**(10): 3629-43.
- Guthrie, C. and Fink, G. R. (1991). *Guide to Yeast genetics and Molecular biology*. San Diego.
- Haas, I. G. and Wabl, M. (1983). „Immunoglobulin heavy chain binding protein.“ *Nature* **306**(5941): 387-9.
- Halachmi, D. and Eilam, Y. (1996). „Elevated cytosolic free Ca²⁺ concentrations and massive Ca²⁺ accumulation within vacuoles, in yeast mutant lacking PMR1, a homolog of Ca²⁺ -ATPase.“ *FEBS Lett* **392**(2): 194-200.

- Harris, S. L. and Waters, M. G. (1996). „Localization of a yeast early Golgi mannosyltransferase, Och1p, involves retrograde transport.“ *J Cell Biol* **132**(6): 985-98.
- Hein, C., Springael, J. Y., Volland, C., Haguenaer-Tsapis, R., Andre, B. (1995). „NP11, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase.“ *Mol Microbiol* **18**(1): 77-87.
- Helliwell, S. B., Wagner, P., Kunz, J., Deuter-Reinhard, M., Henriquez, R., Hall, M. N. (1994). „TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast.“ *Mol Biol Cell* **5**(1): 105-18.
- Hendershot, L. M. and Kearney, J. F. (1988). „A role for human heavy chain binding protein in the developmental regulation of immunoglobulin transport.“ *Mol Immunol* **25**(6): 585-95.
- Herscovics, A. and Orlean, P. (1993). „Glycoprotein biosynthesis in yeast.“ *Faseb J* **7**(6): 540-50.
- Hochstrasser, M. (1996). „Ubiquitin-dependent protein degradation.“ *Annu Rev Genet* **30**: 405-39.
- Holyoak, C. D., Stratford, M., McMullin, Z., Cole, M. B., Crimmins, K., Brown, A. J., Coote, P. J. (1996). „Activity of the plasma membrane H(+)-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid.“ *Appl Environ Microbiol* **62**(9): 3158-64.
- Hong, E., Davidson, A. R., Kaiser, C. A. (1996). „A pathway for targeting soluble misfolded proteins to the yeast vacuole.“ *J Cell Biol* **135**(3): 623-33.
- Horak, J. (1986). „Amino acid transport in eucaryotic microorganisms.“ *Biochim Biophys Acta* **864**(3-4): 223-56.
- Hu, Z., Bonifas, J. M., Beech, J., Bench, G., Shigihara, T., Ogawa, H., Ikeda, S., Mauro, T., Epstein, E. H., Jr. (2000). „Mutations in ATP2C1, encoding a calcium pump, cause Hailey-Hailey disease.“ *Nat Genet* **24**(1): 61-5.
- Hunter, T. and Plowman, G. D. (1997). „The protein kinases of budding yeast: six score and more.“ *Trends Biochem Sci* **22**(1): 18-22.
- Huttner, W. B., Gerdes, H. H. (1991). „The granin (chromogranin/secretogranin) family.“ *Trends Biochem Sci* **16**(1): 27-30.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., Kimura, A. (1983). „Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations.“ *J Bacteriol* **153**(1): 163-8.
- James, P., Maeda, M., Fischer, R., Verma, A. K., Krebs, J., Penniston, J. T., Carafoli, E. (1988). „Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca²⁺ pump of human erythrocytes.“ *J Biol Chem* **263**(6): 2905-10.
- Jamsa, E., Simonen, M., Makarow, M. (1994). „Selective retention of secretory proteins in the yeast endoplasmic reticulum by treatment of cells with a reducing agent.“ *Yeast* **10**(3): 355-70.
- Jauniaux, J. C. and Grenson, M. (1990). „GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression.“ *Eur J Biochem* **190**(1): 39-44.
- Kaiser, C. A. and Schekman, R. (1990). „Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway.“ *Cell* **61**(4): 723-33.
- Kakinuma, Y., Masuda, N., Igarashi, K. (1992). „Proton potential-dependent polyamine transport by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Biochim*

- Biophys Acta **1107**(1): 126-30.
- Katzmann, D. J., Babst, M., Emr, S. D. (2001). „Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I.“ *Cell* **106**(2): 145-55.
- Knop, M., Hauser, N., Wolf, D. H. (1996). „N-Glycosylation affects endoplasmic reticulum degradation of carboxypeptidase yscY in yeast.“ *Yeast* **12**(12): 1229-38
- Kobayashi, H., Van Brunt, J., Harold, F. M. (1978). „ATP-linked calcium transport in cells and membrane vesicles of *Streptococcus faecalis*.“ *J Biol Chem* **253**(7): 2085-92.
- Konopka, J. B., Jenness, D. D., Hartwell, L. H. (1988). „The C-terminus of the *S. cerevisiae* alpha-pheromone receptor mediates an adaptive response to pheromone.“ *Cell* **54**(5): 609-20.
- Kretsinger, R. H. (1980). „Structure and evolution of calcium-modulated proteins.“ *CRC Crit Rev Biochem* **8**(2): 119-74.
- Kumar, G., Deves, R., Brodie, A. F. (1979). „Active transport of calcium in membrane vesicles from *Mycobacterium phlei*.“ *Eur J Biochem* **100**(2): 365-75.
- Kuno, T., Tanaka, H., Mukai, H., Chang, C. D., Hiraga, K., Miyakawa, T., Tanaka, C. (1991). „cDNA cloning of a calcineurin B homolog in *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Biochem Biophys Res Commun* **180**(2): 1159-63.
- Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N. R., Hall, M. N. (1993). „Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression.“ *Cell* **73**(3): 585-96.
- LaMantia, M., Miura, T., Tachikawa, H., Kaplan, H. A., Lennarz, W. J., Mizunaga, T. (1991). „Glycosylation site binding protein and protein disulfide isomerase are identical and essential for cell viability in yeast.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(10): 4453-7.
- Lamarche, S., Chretien, P., Landry, J. (1985). „Inhibition of the heat shock response and synthesis of glucose-regulated proteins in Ca²⁺-deprived rat hepatoma cells.“ *Biochem Biophys Res Commun* **131**(2): 868-76.
- Lapinskas, P. J., Cunningham, K. W., Liu, X. F., Fink, G. R., Culotta, V. C. (1995). „Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase.“ *Mol Cell Biol* **15**(3): 1382-8.
- Lemmon, S. K. and Traub, L. M. (2000). „Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells.“ *Curr Opin Cell Biol* **12**(4): 457-66.
- Leustek, T., Toledo, H., Brot, N., Weissbach, H. (1991). „Calcium-dependent autophosphorylation of the glucose-regulated protein, Grp78.“ *Arch Biochem Biophys* **289**(2): 256-61.
- Lewis, M. J., Nichols, B. J., Prescianotto-Baschong, C. (2000). „Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes.“ *Mol Biol Cell* **11**(1): 23-38.
- Li, Z. S., Szczyepka, M., Lu, Y. P., Thiele, D. J., Rea, P. A. (1996). „The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump.“ *J Biol Chem* **271**(11): 6509-17.
- Lipari, F. and Herscovics, A. (1999). „Calcium binding to the class I alpha-1,2-mannosidase from *Saccharomyces cerevisiae* occurs outside the EF hand motif.“ *Biochemistry* **38**(3): 1111-8.
- Locke, E. G., Bonilla, M., Liang, L., Takita, Y., Cunningham, K. W. (2000). „A homolog of voltage-gated Ca(2+) channels stimulated by depletion of secretory Ca(2+) in yeast.“ *Mol Cell Biol* **20**(18): 6686-94.
- Lodish, H. F. (1988). „Transport of secretory and membrane glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi. A rate-limiting step in protein maturation and

- secretion." *J Biol Chem* **263**(5): 2107-10.
- Lussier, M., Sdicu, A. M., Ketela, T., Bussey, H. (1995). „Localization and targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* Kre2p/Mnt1p alpha 1,2-mannosyltransferase to a medial-Golgi compartment." *J Cell Biol* **131**(4): 913-27.
- Macer, D. R. and Koch, G. L. (1988). „Identification of a set of calcium-binding proteins in reticuloplasm, the luminal content of the endoplasmic reticulum." *J Cell Sci* **91** (Pt 1): 61-70.
- MacLennan, D. H., Rice, W. J., Green, N. M. (1997). „The mechanism of Ca²⁺ transport by sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPases." *J Biol Chem* **272**(46): 28815-8.
- Magasanik, B. (1992). „Regulation of Nitrogen Utilization."
- Meaden, P., Hill, K., Wagner, J., Slipetz, D., Sommer, S. S., Bussey, H. (1990). „The yeast KRE5 gene encodes a probable endoplasmic reticulum protein required for (1----6)-beta-D-glucan synthesis and normal cell growth." *Mol Cell Biol* **10**(6): 3013-9.
- Meldolesi, J. and Pozzan, T. (1998). „The endoplasmic reticulum Ca²⁺ store: a view from the lumen." *Trends Biochem Sci* **23**(1): 10-4.
- Moller, J. V., Juul, B., le Maire, M. (1996). „Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases." *Biochim Biophys Acta* **1286**(1): 1-51.
- Muller, E. M., Locke, E. G., Cunningham, C. W. (2001). „Differential regulation of two Ca(2+) influx systems by pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* **159**(4): 1527-38.
- Mullins, C., Meyer, H. A., Hartmann, E., Green, N., Fang, H. (1996). „Structurally related Spc1p and Spc2p of yeast signal peptidase complex are functionally distinct." *J Biol Chem* **271**(46): 29094-9.
- Müsch, A., Wiedmann, M., Rapoport, T. A. (1992), „Yeast Sec proteins interact with polypeptides traversing the endoplasmic reticulum membrane." *Cell* **69**(2): 343-52.
- Nakamura, K. D. and Schlenk, F. (1974). „Active transport of exogenous S-adenosylmethionine and related compounds into cells and vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Bacteriol* **120**(1): 482-7.
- Nakano, A., Brada, D., Schekman, R. (1988). „A membrane glycoprotein, Sec12p, required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in yeast." *J Cell Biol* **107**(3): 851-63.
- Nelissen, B., De Wachter, R., Goffeau, A. (1997). „Classification of all putative permeases and other membrane plurispansers of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*." *FEMS Microbiol Rev* **21**(2): 113-34.
- Newman, A. P. and Ferro-Novick, S. (1987). „Characterization of new mutants in the early part of the yeast secretory pathway isolated by a [3H]mannose suicide selection." *J Cell Biol* **105**(4): 1587-94.
- Nicoll, D. A., Longoni, S., Philipson, K. D. (1990). „Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na(+)-Ca²⁺ exchanger." *Science* **250**(4980): 562-5.
- Nieuwenhuis, B. J., Weijers, C. A., Borst-Pauwels, G. W. (1981). „Uptake and accumulation of Mn²⁺ and Sr²⁺ in *Saccharomyces cerevisiae*." *Biochim Biophys Acta* **649**(1): 83-8.
- Nishikawa, S. and Nakano, A. (1993). „Identification of a gene required for membrane protein retention in the early secretory pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(17): 8179-83.
- Novick, P., Ferro, S., Schekman, R. (1981). „Order of events in the yeast secretory pathway." *Cell* **25**(2): 461-9.
- Novick, P., Field, C., Schekman, R. (1980). „Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway." *Cell* **21**(1): 205-

- 15.
- Novick, P., Garrett, M. D., Brennwald, P., Lauring, A., Finger, F. P., Collins, R., TerBush, D. R. (1995). „Control of exocytosis in yeast.“ *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**: 171-7.
- Novick, P. and Schekman, R. (1979). „Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(4): 1858-62.
- Novick, P. and Schekman, R. (1983). „Export of major cell surface proteins is blocked in yeast secretory mutants.“ *J Cell Biol* **96**(2): 541-7.
- Ohsumi, Y. and Anraku, Y. (1981). „Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*.“ *J Biol Chem* **256**(5): 2079-82.
- Ohsumi, Y., Kitamoto, K., Anraku, Y. (1988). „Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion.“ *J Bacteriol* **170**(6): 2676-82.
- Okorokov, L. A., Letrikevich, S. B., Lichko, L. P., Mel'nikova, E.V. (1978). „Vacuolar pool of magnesium in cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Biol Bull Acad Sci USSR* **5**(5): 638-40.
- Orci, L., Ravazzola, M., Meda, P., Holcomb, C., Moore, H. P., Hicke, L., Schekman, R. (1991). „Mammalian Sec23p homologue is restricted to the endoplasmic reticulum transitional cytoplasm.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(19): 8611-5.
- Pagny, S., Cabanes-Macheteau, M., Gillikin, J. W., Leborgne-Castel, N., Lerouge, P., Boston, R. S., Faye, L., Gomord, V. (2000). „Protein recycling from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum in plants and its minor contribution to calreticulin retention.“ *Plant Cell* **12**(5): 739-56.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S., Rapoport, T. A. (1995). „Posttranslational protein transport into the endoplasmic reticulum.“ *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**: 31-40.
- Parent, S. A., Nielsen, J. B., Morin, N., Chrebet, G., Ramadan, N., Dahl, A. M., Hsu, M. J., Bostian, K. A., Foor, F. (1993). „Calcineurin-dependent growth of an FK506- and CsA-hypersensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*.“ *J Gen Microbiol* **139** (Pt **12**): 2973-84.
- Parlati, F., Dominguez, M., Bergeron, J. J., Thomas, D. Y. (1995). „*Saccharomyces cerevisiae* CNE1 encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus.“ *J Biol Chem* **270**(1): 244-53.
- Perkins, J. and Gadd, G. M. (1993). „Accumulation and intracellular compartmentation of lithium ions in *Saccharomyces cerevisiae*.“ *FEMS Microbiol Lett* **107**(2-3): 255-60.
- Peters, C. and Mayer, A. (1998). „Ca²⁺/calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion.“ *Nature* **396**(6711): 575-80.
- Pezzati, R., Bossi, M., Podini, P., Meldolesi, J., Grohovaz, F. (1997). „High-resolution calcium mapping of the endoplasmic reticulum-Golgi-exocytic membrane system. Electron energy loss imaging analysis of quick frozen-freeze dried PC12 cells.“ *Mol Biol Cell* **8**(8): 1501-12.
- Piper, R. C., Cooper, A. A. (1995). „VPS27 controls vacuolar and endocytic traffic through a prevacuolar compartment in *Saccharomyces cerevisiae*.“ *J Cell Biol* **131**(3): 603-17.
- Plempner, R. K., Bohmler, S., Bordallo, J., Sommer, T., Wolf, D. H. (1997). „Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation.“ *Nature* **388**(6645): 891-5.

- Price, B. D., Mannheim-Rodman, L. A., Calderwood, S. K. (1992). „Brefeldin A, thapsigargin, and AIF4- stimulate the accumulation of GRP78 mRNA in a cycloheximide dependent manner, whilst induction by hypoxia is independent of protein synthesis.“ *J Cell Physiol* **152**(3): 545-52.
- Pryer, N. K., Wuestehube, L. J., Schekman, R. (1992). „Vesicle-mediated protein sorting.“ *Annu Rev Biochem* **61**: 471-516.
- Putney, J. W., Jr. (1986). „A model for receptor-regulated calcium entry.“ *Cell Calcium* **7**(1): 1-12.
- Putney, J. W., Jr. (1990). „Capacitative calcium entry revisited.“ *Cell Calcium* **11**(10): 611-24.
- Raguzzi, F., Lesuisse, Crichton, R. R. (1988). „Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*.“ *FEBS Lett* **231**(1): 253-8.
- Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F., Riezman, H. (1993). „end3 and end4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*.“ *J Cell Biol* **120**(1): 55-65.
- Raymond, C. K., Howald-Stevenson, I., Vater, C. A., Stevens, T. H. (1992). „Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants.“ *Mol Biol Cell* **3**(12): 1389-402.
- Reilander, H., Achilles, A., Friedel, U., Maul, G., Lottspeich, F., Cook, N. J. (1992). „Primary structure and functional expression of the Na/Ca,K-exchanger from bovine rod photoreceptors.“ *Embo J* **11**(5): 1689-95.
- Reneke, J. E., Blumer, K. J., Courchesne, W. E., Thorner, J. (1988). „The carboxy-terminal segment of the yeast alpha-factor receptor is a regulatory domain.“ *Cell* **55**(2): 221-34.
- Roberg, K. J., Bickel, S., Rowley, N., Kaiser, C. A. (1997). „Control of amino acid permease sorting in the late secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by SEC13, LST4, LST7 and LST8.“ *Genetics* **147**(4): 1569-84.
- Roberg, K. J., Rowley, N., Kaiser, C. A. (1997). „Physiological regulation of membrane protein sorting late in the secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae*.“ *J Cell Biol* **137**(7): 1469-82.
- Roos, N. (1988). „A possible site of calcium regulation in rat exocrine pancreas cells: an X-ray microanalytical study.“ *Scanning Microsc* **2**(1): 323-9.
- Rose, M. D., Misra, L. M., Vogel, J. P. (1989). „KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene.“ *Cell* **57**(7): 1211-21.
- Rothblatt, J. A., Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Daum, G., Schekman, R. (1989). „Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast.“ *J Cell Biol* **109**(6 Pt 1): 2641-52.
- Rothman, J. E. (1994). „Mechanisms of intracellular protein transport.“ *Nature* **372**(6501): 55-63.
- Rothman, J. E. and Orci, L. (1992). „Molecular dissection of the secretory pathway.“ *Nature* **355**(6359): 409-15.
- Rudolph, H. K., Antebi, A., Fink, G. R., Buckley, C. M., Dorman, T. E., LeVitre, J., Davidow, L. S., Mao, J. I., Moir, D. T. (1989). „The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca²⁺ ATPase family.“ *Cell* **58**(1): 133-45.
- Sadler, I., Chiang, A., Kurihara, T., Rothblatt, J., Way, J., Silver, P. (1989). „A yeast gene important for protein assembly into the endoplasmic reticulum and the nucleus has homology to DnaJ, an *Escherichia coli* heat shock protein.“ *J Cell Biol* **109**(6 Pt 1): 2665-75.
- Sambrook, J. F. M., T. and Fritsch, E.F. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor.

- Sanders, S. L., Whitfield, K. M., Vogel, J. P., Rose, M. D., Schekman, R. W. (1992). „Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER.“ *Cell* **69**(2): 353-65.
- Sarkadi, B. (1980). „Active calcium transport in human red cells.“ *Biochim Biophys Acta* **604**(2): 159-90.
- Schmidt, A., Beck, T., Koller, A. Kunz, J., Hall, M. N. (1998). „The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease.“ *Embo J* **17**(23): 6924-31.
- Schmidt, A., Kunz, J., Hall, M. N. (1996). „TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 13780-5.
- Schmitt, H. D., Puzicha, M., Gallwitz, D. (1988). „Study of a temperature-sensitive mutant of the ras-related YPT1 gene product in yeast suggests a role in the regulation of intracellular calcium.“ *Cell* **53**(4): 635-47.
- Segev, N., Mulholland, J., Botstein, D. (1988). „The yeast GTP-binding YPT1 protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery.“ *Cell* **52**(6): 915-24.
- Serrano, R. (1988). „Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi.“ *Biochim Biophys Acta* **947**(1): 1-28.
- Singer, B. and Riezman, H. (1990). „Detection of an intermediate compartment involved in transport of alpha-factor from the plasma membrane to the vacuole in yeast.“ *J Cell Biol* **110**(6): 1911-22.
- Siniossoglou, S. and Pelham, H. R. (2002). „Vps51p links the VFT complex to the SNARE Tlg1p.“ *J Biol Chem* **277**(50): 48318-24.
- Soetens, O., De Craene, J. O., Andre, B. (2001). „Ubiquitin is required for sorting to the vacuole of the yeast general amino acid permease, Gap1.“ *J Biol Chem* **276**(47): 43949-57.
- Sophianopoulou, V. and Diallynas, G. (1995). „Amino acid transporters of lower eukaryotes: regulation, structure and topogenesis.“ *FEMS Microbiol Rev* **16**(1): 53-75.
- Sorin, A., Rosas, G., Rao, R. (1997). „PMR1, a Ca²⁺-ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps.“ *J Biol Chem* **272**(15): 9895-901.
- Springael, J. Y. and Andre, B. (1998). „Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Mol Biol Cell* **9**(6): 1253-63.
- Stanbrough, M. and Magasanik, B. (1995). „Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*.“ *J Bacteriol* **177**(1): 94-102.
- Stirling, C. J., Rothblatt, J., Hosobuchi, M., Deshaies, R., Schekman, R. (1992). „Protein translocation mutants defective in the insertion of integral membrane proteins into the endoplasmic reticulum.“ *Mol Biol Cell* **3**(2): 129-42.
- Strayle, J., Pozzan, T., Rudolph, H. K. (1999). „Steady-state free Ca(2+) in the yeast endoplasmic reticulum reaches only 10 microM and is mainly controlled by the secretory pathway pump pmr1.“ *Embo J* **18**(17): 4733-43.
- Stroobant, P., Dame, J. B., Scarborough, G. A. (1980). „The *Neurospora* plasma membrane Ca²⁺ pump.“ *Fed Proc* **39**(7): 2437-41.
- Stroobant, P. and Scarborough, G. A. (1979). „Active transport of calcium in *Neurospora* plasma membrane vesicles.“ *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(7): 3102-6.
- Sudbrak, R., Brown, J., Dobson-Stone, C., Carter, S., Ramser, J., White, J., Healy, E., Dissanayake, M., Larregue, M., Perrussel, M., Lehrach, H., Munro, C. S., Strachan, T., Burge, S., Hovnanian, A., Monaco, A. P. (2000). „Hailey-Hailey disease is caused by

- mutations in ATP2C1 encoding a novel Ca(2+) pump.“ *Hum Mol Genet* **9**(7): 1131-40.
- Suzuki, C. K., Bonifacino, J. S., Lin, A. Y., Davis, M. M., Klausner, R. D. (1991). „Regulating the retention of T-cell receptor alpha chain variants within the endoplasmic reticulum: Ca(2+)-dependent association with BiP.“ *J Cell Biol* **114**(2): 189-205.
- Svihla, G., Dainko, J.L., Schlenk, F. (1963). „Ultraviolet microscopy in purine compounds in yeast vacuole.“ *J. Bacteriol.* **85**: 399.
- Swaminathan, S., Amerik, A. Y., Hochstrasser, M. (1999). „The Doa4 deubiquitinating enzyme is required for ubiquitin homeostasis in yeast.“ *Mol Biol Cell* **10**(8): 2583-94.
- Tachibana, C. and Stevens, T. H. (1992). „The yeast EUG1 gene encodes an endoplasmic reticulum protein that is functionally related to protein disulfide isomerase.“ *Mol Cell Biol* **12**(10): 4601-11.
- Tachikawa, H., Miura, T., Katakura, Y., Mizunaga, T. (1991). „Molecular structure of a yeast gene, PDI1, encoding protein disulfide isomerase that is essential for cell growth.“ *J Biochem (Tokyo)* **110**(2): 306-13.
- te Heesen, S., Janetzky, B., Lehle, L., Aebi, M. (1992). „The yeast WBP1 is essential for oligosaccharyl transferase activity in vivo and in vitro.“ *Embo J* **11**(6): 2071-5.
- ter Schure, E. G., van Riel, N. A., Verrips, C. T. (2000). „The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*.“ *FEMS Microbiol Rev* **24**(1): 67-83.
- TerBush, D. R. and Novick, P. (1995). „Sec6, Sec8, and Sec15 are components of a multisubunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*.“ *J Cell Biol* **130**(2): 299-312.
- Tsien, R. Y. (1989). „Fluorescent probes of cell signaling.“ *Annu Rev Neurosci* **12**: 227-53.
- Tsuchiya, T. and Rosen, B. P. (1975). „Characterization of an active transport system for calcium in inverted membrane vesicles of *Escherichia coli*.“ *J Biol Chem* **250**(19): 7687-92.
- Urech, K., Durr, M., Boller, T., Wiemken, A., Schwencke, J. (1978). „Localization of polyphosphate in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Arch Microbiol* **116**(3): 275-8.
- Vandenbol, M., Jauniaux, J. C., Grenson, M. (1989). „Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* PUT4 proline-permease-encoding gene: similarities between CAN1, HIP1 and PUT4 permeases.“ *Gene* **83**(1): 153-9.
- Vandenbol, M., Jauniaux, J. C., Grenson, M. (1990). „The *Saccharomyces cerevisiae* NPR1 gene required for the activity of ammonia-sensitive amino acid permeases encodes a protein kinase homologue.“ *Mol Gen Genet* **222**(2-3): 393-9.
- Vandenbol, M., Jauniaux, J. C., Vissers, V., Grenson, M. (1987). „Isolation of the NPR1 gene responsible for the reactivation of ammonia-sensitive amino-acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. RNA analysis and gene dosage effects.“ *Eur J Biochem* **164**(3): 607-12.
- Viegas, C. A., Almeida, P. F., Cavaco, M., Sa-Correia, I. (1998). „The H(+)-ATPase in the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae* is activated during growth latency in octanoic acid-supplemented medium accompanying the decrease in intracellular pH and cell viability.“ *Appl Environ Microbiol* **64**(2): 779-83.
- Vincenzi, F. F., Hinds, T. R. (1976). *Plasma membran calcium transport and membran- bound enzymes*. New York, Plenum.
- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C., Philippsen, P. (1997). „Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces*

- cerevisiae.“ *Yeast* **13**(11): 1065-75.
- Wada, Y., Ohsumi, Y., Anraku, Y. (1992). „Chloride transport of yeast vacuolar membrane vesicles: a study of in vitro vacuolar acidification.“ *Biochim Biophys Acta* **1101**(3): 296-302.
- Whitters, E. A., McGee, T. P., Bankaitis, V. A. (1994). „Purification and characterization of a late Golgi compartment from *Saccharomyces cerevisiae*.“ *J Biol Chem* **269**(45): 28106-17.
- Wiame, J. M., Grenson, M., Arst, H. N., Jr. (1985). „Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi.“ *Adv Microb Physiol* **26**: 1-88.
- Wiemken, A. and Durr, M. (1974). „Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Arch Microbiol* **101**(1): 45-57.
- Wiemken, A., Schellenberg, M., Urech U. (1979). „Vacuoles: The sole compartments of digestive enzymes in yeast.“ *Arch. Microbiol.* **123**: 23.
- Wilson, D. W., Wilcox, C. A., Flynn, G. C., Chen, E., Kuang, W. J., Block, M. R., Ullrich, A., Rothman, J. E. (1989). „A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast.“ *Nature* **339**(6223): 355-9.
- Yamamoto, K., Fujii, R., Toyofuku, Y., Saito, T., Koeki, H., Hsu, V. W., Aoe, T. (2001). „The KDEL receptor mediates a retrieval mechanism that contributes to quality control at the endoplasmic reticulum.“ *Embo J* **20**(12): 3082-91.
- Zacharski, C. A. and Cooper, T. G. (1978). „Metabolite compartmentation in *Saccharomyces cerevisiae*.“ *J Bacteriol* **135**(2): 490-7.