

**Katabolitinaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase:
Identifizierung und Charakterisierung neuer, für ihren Ubiquitin-
Proteasom-katalysierten Abbau benötigter Proteine**

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

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Jochen Regelman
geboren in Göppingen

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter H. Wolf
Mitberichter: Priv. Doz. Dr. Wolfgang Hilt
Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.2005

Institut für Biochemie der Universität Stuttgart
2005

Danksagung

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

Herrn Prof. Dr. Michael Thumm, Priv. Doz. Dr. Wolfgang Hilt und Dr. Ulrike D. Epple danke ich für die Unterstützung und die hilfreichen Gespräche während meiner Promotion.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie der Universität Stuttgart – insbesondere der FB Pase-Gruppe - möchte ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums und ihre Geduld.

Veröffentlichungshinweis

Der Großteil der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurde in folgenden Artikeln publiziert und bei Tagungen in Form eines Posters vorgestellt:

- Horak, J., Regelman, J., and Wolf, D. H. (2002). Two distinct proteolytic systems responsible for glucose-induced degradation of fructose-1,6-bisphosphatase and the Gal2p transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* share the same protein components of the glucose signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 8248-8254.
- Regelman, J., Schüle, T., Josupeit, F. S., Horak, J., Rose, M., Entian, K. D., Thumm, M., and Wolf, D. H. (2003). Catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide screen identifies eight novel *GID* genes and indicates the existence of two degradation pathways. *Mol. Biol. Cell* **14**, 1652-1663.
- Mayordomo, I., Regelman, J., Horak, J., and Sanz, P. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins Bmh1 and Bmh2 participate in the process of catabolite inactivation of maltose permease. *FEBS Lett.* **544**, 160-164.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	2
Veröffentlichungshinweis	3
Inhaltsverzeichnis	4
1 Einleitung	9
1.1 Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als Modellorganismus	9
1.2 Proteolytische Systeme des intrazellulären Proteinabbaus	10
1.2.1 Die Vakuole (Lysosom)	11
1.2.2 Das Proteasom: Signalvermittelte Proteolyse	12
1.2.2.1 Das 20S-Proteasom: Aufbau und proteolytische Aktivitäten	13
1.2.2.2 Das 26S-Proteasom: Struktur und <i>in vivo</i> Substrate	14
1.2.2.3 Abbausignale und Ubiquitinsystem	15
1.3 Die Katabolitinaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit	19
2 Material und Methoden	21
2.1 Chemikalien und Bezugsquellen	21
2.2 Antikörper und Bezugsquellen	22
2.3 Medien	22
2.3.1 Medien für Hefekulturen	23
2.3.1.1 Vollmedium (YPD) pH 5,5	23
2.3.1.2 Synthetisches Vollmedium (CM) pH 5,6	23
2.3.1.3 Medien zur Induktion der Gluconeogenese	23
2.3.1.4 Mineralmedium (MV) pH 5,5	23
2.3.1.5 Sporulationsmedium	24
2.3.2 Medien für <i>E. coli</i> -Kulturen	24
2.3.2.1 Vollmedium (LB) pH 7,5	24
2.3.2.2 SOC-Medium pH 7,4	24
2.3.2.3 2xYT-Medium pH 7	25
2.4 Stämme, Plasmide und Oligonucleotide	25
2.4.1 Hefestämme	25
2.4.2 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	30
2.4.3 Plasmide	30
2.4.3.1 p3XHA-HIS5	30
2.4.3.1.1 YJR12	31
2.4.3.2 pUG6	31
2.4.3.2.1 YJR13	31

2.4.3.3 pGEX-4T-3	32
2.4.3.3.1 pJR10	32
2.4.3.3.2 pJR11 und pJR12	32
2.4.3.3.3 pJR13	33
2.4.3.4 YCp50-Genbank	34
2.4.3.4.1 pJR14 (YCp50/I)	34
2.4.3.4.2 YCp50/II und YCp50/III	35
2.4.3.4.3 pJR15	35
2.4.3.5 pJR16 (YEp13/4), pJR17 (YEp13/1-1) und pJR18 (YEp13/6)	36
2.4.3.6 pJR19 (YEp24/8-1) und pJR19/S1	37
2.4.3.7 pYES2 und pYES2HA-C (pL001)	37
2.4.3.7.1 pIV48 und PIV48HA-C	38
2.4.3.8 YEplac195	38
2.4.3.8.1 pAE8-1	38
2.4.4 Oligonucleotide	38
2.5 Wachstumsbedingungen	39
2.5.1 Dauerkulturen	40
2.5.2 Messung der optischen Dichte	40
2.5.3 Wachstumsbedingungen bei <i>E. coli</i> -Kulturen	40
2.5.3.1 Expression von GST-Fusionsproteinen	40
2.5.4 Wachstumsbedingungen der Hefe	41
2.5.4.1 Induktion und Inaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase	41
2.5.4.2 Wachstumsbedingungen bei Ubiquitinierungsexperimenten	42
2.6 Zell- und molekularbiologische Methoden	43
2.6.1 Kreuzung von Hefestämmen	43
2.6.2 Sporulation von Hefestämmen und Tetradendissektion	43
2.6.2.1 Komplementation sporulationsdefizienter Mutanten (Sporulationsscreen)	44
2.6.3 Vesikeltest	45
2.6.4 Bestimmung des Paarungstyps bei Hefestämmen	45
2.6.5 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe	46
2.6.6 Isolierung und Amplifikation von Plasmid-DNA aus Hefe („Plasmid Rescue“)	46
2.6.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	47
2.6.8 Polymerasekettenreaktion	48
2.6.9 Isopropanol-/Ethanol-fällung	48
2.6.10 Restriktionsverdau von DNA	49
2.6.11 Agarose-Gelelektrophorese	49

2.6.12	Klonierung von Plasmid-DNA	50
2.6.12.1	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	50
2.6.12.2	Ligation von DNA-Fragmenten	50
2.6.12.3	Gap Repair	51
2.6.12.4	Subklonierung von Plasmid-DNA	51
2.6.13	Southernblot Analyse	52
2.6.14	Zelltransformationen	53
2.6.14.1	Transformation von Hefezellen	53
2.6.14.2	Genbanktransformation (bzw. Integration eines DNA-Fragments ins Hefegenom)	54
2.6.14.3	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	54
2.6.14.4	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen durch Elektroporation	55
2.6.14.5	Plasmidverlust bei Hefezellen	55
2.7	Biochemische Methoden	56
2.7.1	Ernte und Zellaufschluß von Hefekulturen	56
2.7.1.1	Denaturierende alkalische Lyse	56
2.7.1.2	Nativer Glasperlensaufschluß und Immunopräzipitation	57
2.7.1.3	Denaturierender Glasperlensaufschluß und Immunopräzipitation	58
2.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	58
2.7.2.1	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	59
2.7.3	Westernblot	59
2.7.3.1	Immunodetektion von Proteinen mit dem ECL TM -System	60
2.7.4	Glyceringradient	61
2.7.5	Indirekte Immunofluoreszenz	61
2.7.6	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i>	63
2.7.6.1	Antigenisolierung zur Herstellung eines FB Pase-Antikörpers	63
2.7.7	<i>In situ</i> Aktivitätstest der peptidspaltenden Aktivitäten des Proteasoms auf Agar-Platten („Overlaytest“)	64
2.7.7.1	Nachweis der PGPH-Aktivität	64
2.7.7.2	Nachweis der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität	65
2.7.7.3	Nachweis der Trypsin-ähnlichen Aktivität	66
3	Ergebnisse	67
3.1	Identifikation neuer, für den Ubiquitin-Proteasom-katalysierten Abbau der FB Pase benötigter Gene	68
3.1.1	Komplementation der <i>gid1</i> -Mutante WAY.5-4A/D1	68
3.1.1.1	Genbankscreen	68
3.1.1.2	Charakterisierung des Genbankplasmids YCp50/I (pJR14)	70
3.1.1.3	Komplementation der <i>gid1</i> -Mutante WAY.5-4A/D1 mit dem Plasmid pAE8-1	71
3.1.1.4	Pulse Chase Analyse mit einem <i>gid1</i> -Deletionsstamm	72

3.1.2 Genomweiter Mutantenscreen mit Hilfe der EUROSCARF-Kollektion	74
3.1.2.1 Isolierung von Deletionsmutanten mit einem Defekt im FBPase-Abbau	74
3.1.2.2 Westernblot und Pulse Chase Analysen mit den Deletionsstämmen <i>gid1Δ</i> bis <i>gid8Δ</i>	75
3.1.2.3 Nicht alle Vid-Proteine sind an der Ubiquitin-Proteasom-vermittelten FBPase-Proteolyse beteiligt	80
3.1.2.4 Westernblot und Pulse Chase Analysen mit <i>GID9/FYV10</i> -deletierten Zellen	81
3.1.2.5 Westernblot Analyse mit einer <i>snl1Δ</i> -Mutante	82
3.1.2.6 Westernblot Analyse mit einer <i>grr1Δ</i> -Mutante	83
3.1.3 Immunoblot Analysen von Stämmen mit einem Defekt in glucoseabhängigen <i>S. cerevisiae</i> -Signalwegen	84
3.1.4 2μ-Genbankscreen	86
3.1.4.1 Charakterisierung des Genbankplasmids YEp24/8-1 (pJR19)	87
3.2 Das Protein Gid1p	88
3.2.1 Einfluß von Temperatur und Kohlenstoffquelle auf das Wachstum <i>GID1</i> -deletierter Stämme	90
3.2.2 Untersuchungen bezüglich Autophagozytosephänotypen	91
3.2.2.1 Sporulationstest mit einer homozygot diploiden <i>gid1Δ</i> -Mutante	91
3.2.2.2 Herstellung einer chromosomal deletierten <i>gid1</i> -Mutante im WCG4a-Stammhintergrund (YJR13)	93
3.2.2.3 Vesikeltest mit <i>GID1</i> -deletierten Zellen	94
3.2.2.4 Reifung der Aminopeptidase I in einer <i>gid1Δ</i> -Mutante	95
3.2.2.5 Einfluß von Autophagozytoseproteinen auf den Abbau der FBPase	96
3.2.3 Suche nach genetischen Interaktionspartnern von <i>GID1</i>	98
3.2.3.1 "High Copy Suppressor" Screen mit einer <i>gid1</i> -Mutante	98
3.2.3.1.1 Charakterisierung der Genbankplasmide YEp13/1-1 (pJR16), YEp13/4 (pJR17) und YEp13/6 (pJR18)	99
3.2.3.1.2 Einfluß der Überexpression von <i>GID1</i> auf den FBPase-Turnover	100
3.2.3.2 Westernblot Analyse mit einer <i>cdc73Δ</i> -Mutante	100
3.2.3.3 Einfluß des Tor-Inhibitors Rapamycin auf das Wachstum von Hefezellen	101
3.2.3.3.1 Einfluß von Rapamycin auf den Abbau der FBPase	103
3.2.3.3.2 FBPase-Turnover in einer <i>msn2/4Δ</i> , <i>tap42-11</i> - und <i>sit4Δ</i> -Mutante	106

3.2.4 <i>In situ</i> Tests der peptidspaltenden Aktivitäten des Proteasoms mit einer <i>gid1</i> -Deletionsmutante	107
3.2.5 Überexpression von <i>HEL48-HA₂</i> in <i>GID1</i> -deletierten Zellen	108
3.2.6 <i>In vivo</i> Ubiquitinierung der FBPase in <i>GID1</i> -deletierten Zellen	109
3.2.7 Abhängigkeit des Gid4p/Vid24p-Turnovers von Gid1p	111
3.2.8 <i>HA</i> -Epitopmarkierung von <i>GID1</i>	112
3.2.8.1 Genomische Integration einer <i>HA₃-HIS5</i> -Kassette zur Erzeugung einer C-terminalen Epitopmarkierung von <i>GID1</i> (YJR12)	112
3.2.8.2 Southernblot Analyse zur Überprüfung der <i>HA₃-HIS5</i> -Integration	113
3.2.8.3 Funktionalitätsüberprüfung des erzeugten Gid1-Ha ₃ -Fusionsproteins im Hefestamm YJR12	114
3.2.8.4 Herstellung eines <i>GID1-HA₃</i> -Expressionsplasmids (pJR15)	115
3.2.9 Gid1-Ha ₃ -Turnovermessungen	117
3.2.9.1 Gid1-Ha ₃ -Turnover bei verschiedenen Wachstumsbedingungen	117
3.2.9.2 Gid1-Ha ₃ -Turnover in den Deletionsstämmen <i>gid2Δ</i> bis <i>gid9Δ</i>	119
3.2.10 Gid1p liegt in mindestens zwei verschiedenen Modifikationen in der Zelle vor	122
3.2.11 Lokalisation von Gid1-Ha ₃ in der Hefezelle mit einer indirekten Immunofluoreszenz	123
3.2.12 Untersuchungen zur Interaktion von Gid1p mit der FBPase	125
3.2.13 Sedimentationsverhalten von Gid1-Ha ₃ in einem Glyceringradienten	127
4 Diskussion	130
5 Zusammenfassung	148
6 Abstract	151
7 Abkürzungen	155
8 Literaturverzeichnis	159

1 Einleitung

1.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus

Die einzellige Bier- und Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird seit mehreren tausend Jahren zur Herstellung von Nahrungs- und Genußmitteln (z. B. Brot, Bier, Branntwein) eingesetzt (Michel et al., 1992). Grundlage hierfür ist ein für die Hefe spezifischer Stoffwechselweg: die alkoholische Gärung. Wie alle chemotropen Organismen müssen auch Hefen aus ihrer Nahrung verwertbare Energie in Form von ATP gewinnen (Stryer, 2002). Hierzu wird Glucose - das bevorzugte Brennstoffmolekül - durch die Glykolyse zu Pyruvat metabolisiert. In Abwesenheit von Sauerstoff wird dann Pyruvat zu Ethanol und Kohlendioxid umgesetzt (Abb. 1).



Abb. 1: Nettoreaktion der alkoholischen Gärung

Darüber hinaus hat sich *Saccharomyces cerevisiae* als idealer Modellorganismus zum Studium einer eukaryontischen Zelle etabliert (Guthrie und Fink, 1991). Obwohl die Hefezelle vergleichsweise einfach aufgebaut ist, sind alle wesentlichen Komponenten von höheren Organismen vorhanden. Verglichen mit den Homologen höherer Spezies zeigen viele Hefepoteine bezüglich Aufbau und Funktion eine enge Verwandtschaft.

Mit Hilfe der Hefe lassen sich zahlreiche zelluläre Vorgänge wie u. a. Abbau, Regulation und Transport von Proteinen/Enzymen mit biochemischen, molekularbiologischen und genetischen Methoden untersuchen (Struhl 1983; Guthrie und Fink, 1991). Viele der dabei gewonnenen Erkenntnisse können auf höhere Organismen, wie beispielsweise den Menschen, übertragen werden. *S. cerevisiae* ist kommerziell erhältlich, leicht kultivierbar und nicht pathogen. Aufgrund der Verfügbarkeit von Punkt- und Deletionsmutanten können gezielt *in vivo* Funktionen

untersucht werden, wobei – im Gegensatz zu anderen Eukaryonten – das Hefegenom relativ leicht manipuliert werden kann. Die Verfügbarkeit von genetischen Selektionsmarkern und Plasmiden, die einfache Transformierbarkeit von DNA, sowie eine Vermehrungszeit von etwa 90 Minuten sind weitere erwähnenswerte Vorteile.

Das Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist seit 1996 vollständig sequenziert und der Öffentlichkeit zugänglich (Goffeau et al., 1996; Hieter et al., 1996). Mit einer Größe von 14000 kbp, verteilt auf 16 Chromosomen (200 bis 2200 kbp), ist es etwa um den Faktor 200 kleiner als das des Menschen. Dies kann einerseits auf die geringere genetische Komplexität und andererseits wiederum auf eine höhere Dichte an genetischer Information (nur wenige der ca. 6000 Hefegene enthalten Introns) zurückgeführt werden. Im Gegensatz zu den meisten anderen Mikroorganismen kann sich *Saccharomyces cerevisiae* mit einfachem (haploiden) und doppeltem (diploiden) Chromosomensatz vermehren. Bei haploiden Zellen unterscheidet man zwei Geschlechtsformen, die als a und α bezeichnet werden. Ihre charakteristische Art der asexuellen Fortpflanzung ist die Zellsprossung (Mitose). Zellen mit unterschiedlichem Paarungstyp können durch Verschmelzung in die diploide Form übergehen, die bei ausreichendem Nährstoffangebot erhalten bleibt. Unter bestimmten Hungerbedingungen kann eine Sporulation induziert werden, die eine meiotische Spaltung mit der Bildung von vier haploiden Sporen zu Folge hat. Hierbei verteilen sich die Gene nach den Mendel'schen Gesetzen voneinander unabhängig 2:2.

1.2 Proteolytische Systeme des intrazellulären Proteinabbaus

Der Auf- und Abbau zellulärer Proteine befindet sich in einem dynamischen Gleichgewicht. Die Proteolyse dient einerseits der Rückgewinnung von Aminosäuren, andererseits müssen Proteine abgebaut werden, wenn sie die Zelle im gegenwärtigen Zustand nicht mehr benötigt oder die biologische Funktion durch eine Fehlfaltung oder Anomalie in der Aminosäuresequenz verloren ging (Hilt und Wolf, 1995). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, daß der Proteinabbau auch an essentiellen Steuervorgängen, wie die Regulation von Stoffwechselwegen, der Zelle beteiligt ist (Wolf und Hilt, 2004).

Unkontrollierter Proteinabbau birgt die Gefahr, daß die Zelle schwer geschädigt wird. Die proteolytischen Systeme müssen daher abzubauen Substrate präzise von nicht anzugreifenden Proteinen unterscheiden können. Zu diesem Zweck wurden im Laufe der Evolution hochaktive, aber unspezifisch agierende Proteasen in ein spezielles Organell, das Lysosom (Vakuole), eingeschlossen. Der Proteinabbau kann damit durch Aufnahme der abzubauen Proteine in dieses Kompartiment erreicht werden. Andererseits wurden hochspezifische proteolytische Systeme entwickelt, die ihre Substrate erst nach Markierung erkennen und dann selektiv abbauen. Das vermutlich wichtigste Proteolysesystem dieser Art ist das Proteasom.

1.2.1 Die Vakuole (Lysosom)

Die Vakuole der Hefe *S. cerevisiae* entspricht dem Lysosom höherer Eukaryontenzellen. Sie ist ein saures, membranumschlossenes, Kompartiment und spielt eine wichtige Rolle bei der pH- und Ionenhomeostase (Jones et al., 1997, Thumm 2000). Desweiteren dient sie als Speicher für zahlreiche Ionen (z. B. Ca^{2+} und Phosphat) und Aminosäuren. Die Vakuole beherbergt eine Vielzahl von unspezifisch wirkenden Proteasen (Suarez Rendueles und Wolf, 1988; Jones et al., 1997; van den Hazel et al., 1996; Thumm und Wolf, 1998; Thumm 2000). Die Proteinasen yscA und yscB gehören zu den wichtigsten vakuolären Hydrolasen und sind an der Reifung ihrer eigenen, inaktiven, Vorstufen sowie vieler anderer Proteasen beteiligt.

Neben dem cytosolischen Proteasom ist die Vakuole der wichtigste Ort des intrazellulären Proteinabbaus, vor allem wenn Nährstoffe limitiert vorliegen. Unter diesen Bedingungen finden etwa 85 % des Gesamtproteinabbaus in der Vakuole statt. Unter normalen Wachstumsbedingungen ist die Vakuole für ca. 40 % des Proteinabbaus in der Zelle verantwortlich (Teichert et al., 1989). Neben Proteinen und anderen Makromolekülen (z. B. Polysaccharide oder Lipide) werden in der Vakuole auch ganze Zellorganellen (z. B. Mitochondrien), die über Transportwege wie die Autophagozytose oder Endozytose eingeschleust werden, abgebaut. Der wichtigste Weg, über den cytosolische Proteine in die Vakuole gelangen, ist die

hungerinduzierte Makroautophagozytose (Takeshige et al., 1992; Baba et al., 1994; Klionsky und Ohsumi, 1999; Thumm 2000). Sie beginnt mit der Bildung von sogenannten Autophagosomen, in die cytosolische Komponenten wie Proteine oder Organellen eingeschlossen werden. Nachdem die Autophagosomen die Vakuole erreicht haben, fusioniert die äußere Membran mit der vakuolären Membran. Anschließend gelangen autophagische Vesikel ins Lumen der Vakuole, wo sie letztendlich zusammen mit ihrem cytosolischen Inhalt abgebaut werden. Dieser Abbau ist abhängig von der Aktivität vakuolärer Proteasen, in erster Linie von der Proteinase yscB. Während langlebige Proteine im Wesentlichen in der Vakuole degradiert werden, erfolgt der selektive Abbau kurzlebiger Proteine gewöhnlich über das Proteasom (Thumm und Wolf, 1998).

1.2.2 Das Proteasom: Signalvermittelte Proteolyse

Proteasomen sind hochentwickelte Proteasekomplexe (Hilt und Wolf, 1995; Hilt und Wolf 1996; Wolf und Hilt, 2004), die sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern von eukaryontischen Zellen lokalisiert sind. Gemäß ihrer Größe unterscheidet man zwei Komplexe, die entsprechend ihrem Sedimentationsverhalten als 20S- und 26S-Proteasomen bezeichnet werden. Weitere in der Literatur verwendete Bezeichnungen waren: 20S-Partikel, Prosomen, Multikatalytische Protease, Ingensin, Multipain, 26S-Komplex, 26S-Protease oder Macropain. Es wird angenommen, daß zwischen dem 20S- und 26S-Komplex ein dynamisches Gleichgewicht vorliegt und der 20S-Komplex das Kernstück des 26S-Proteasoms darstellt. Interessanterweise wurden 20S-Proteasomen inzwischen auch als Komponenten anderer höhermolekularer Komplexe identifiziert.

Proteasomen sind für die Zelle lebensnotwendig und stehen im Zentrum der signalvermittelten Proteolyse (Wolf und Hilt, 2004). Eine wichtige Rolle spielen sie bei der Kontrolle des Metabolismus und zeitabhängiger Programme wie dem Zellzyklus durch Abbau von Schlüsselenzymen und regulatorischen Proteinen. Die Proteolyse bietet gegenüber anderen möglichen Regulationsmechanismen gewisse Vorteile,

denn sie verläuft relativ schnell und ermöglicht der Zelle dadurch die Menge eines Proteins rasch zu reduzieren. Außerdem ist der Proteinabbau irreversibel, was einen vollständigen Verlust der Funktion zur Folge hat. Proteasomen operieren außerdem bei der Stressantwort, in dem abnormale Proteine entfernt werden, sowie der Immunantwort durch Bildung antigener Peptide (Kloetzel, 2004).

1.2.2.1 Das 20S-Proteasom: Aufbau und proteolytische Aktivitäten

20S-Proteasomen wurden bisher in den verschiedensten Eukaryonten, von der Hefe bis zum Menschen, gefunden (Hilt und Wolf, 1995; Hilt und Wolf, 1996; Wolf und Hilt, 2004). Hierbei handelt es sich um zylinderförmige Partikel (ca. 11 x 16 nm) mit einem Molekulargewicht von etwa 700 kDa. Durch Elektrophorese lassen sich gereinigte 20S-Proteasomen in mehrere Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 20-35 kDa auftrennen. Durch Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, daß diese Proteinuntereinheiten in vier übereinander gelagerten Ringen, jeder bestehend aus sieben Untereinheiten, angeordnet sind. Außerhalb des Eukaryontenreichs wurde ein dem 20S-Proteasom vergleichbarer Komplex bisher nur im Archaeobakterium *Thermoplasma acidophilum* identifiziert, der quasi als eine Urform des Proteasoms angesehen werden kann. Immunoelektronenmikroskopische Untersuchungen in Kombination mit Röntgenstrukturanalysen des archaeobakteriellen Proteasoms zeigten, daß die äußeren Ringe des Komplexes aus identischen α -Untereinheiten, die beiden inneren aus identischen β -Untereinheiten aufgebaut sind. Damit ergibt sich eine $\alpha_7\beta_7\beta_7\alpha_7$ -Stöchiometrie. Röntgenstrukturanalysen des 20S-Proteasoms der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* haben gezeigt, daß das eukaryontische 20S-Proteasom eine Dimerstruktur aus zwei identischen Subkomplexen mit je sieben verschiedenen α - und β -Untereinheiten bildet. Das Ergebnis korreliert mit dem Befund, daß im *S. cerevisiae* Genom 14 für Untereinheiten des 20S-Proteasoms kodierende Gene gefunden worden sind (Heinemeyer et al., 2004).

Beim 20S-Proteasom handelt es sich um eine sogenannte Threoninprotease. Hierbei katalysiert das N-terminale Threonin der β -Untereinheiten als Nucleophil die Hydrolyse von Peptidbindungen. Gereinigte 20S-Proteasomen von Eukaryontenzellen zeigen mindestens fünf verschiedene peptidspaltende Aktivitäten. Sie können artifizielle Substrate an der Carboxylseite von basischen (Trypsin-ähnliche Aktivität), sauren (PGPH Aktivität) und hydrophoben Aminosäuren (Chymotrypsin-ähnliche Aktivität) spalten. Zwei weitere unabhängige peptidspaltende Aktivitäten schneiden an verzweigten bzw. kleinen hydrophoben Aminosäuren. *In vitro* können 20S-Proteasomen den ATP-unabhängigen Abbau bestimmter denaturierter und oxidierter Proteine katalysieren. Von den sieben verschiedenen β -Untereinheiten der Hefe *S. cerevisiae* sind nur drei proteolytisch aktiv. Die Pup1p-Untereinheit verleiht dem Proteasom seine Trypsin-ähnliche Aktivität, Pre2p die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität und Pre3p die Peptidyl-glutamyl-peptid-spaltende (PGPH) Aktivität (Wolf und Hilt, 2004; Heinemeyer et al., 2004).

1.2.2.2 Das 26S-Proteasom: Struktur und *in vivo* Substrate

Im Gegensatz zu 20S-Proteasomen bauen 26S-Proteasomen ubiquitinmarkierte Proteine unter ATP-Verbrauch ab. Zu den bekannten *in vivo* Substraten gehören die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), eine falsch gefaltene Form der Carboxypeptidase (CPY*), der Transkriptionsrepressor Mat α 2, der Tumorsuppressor p53, die α -Untereinheit der Fettsäuresynthase (Fas2p), die Ionenpumpe CTFR, diverse Zellzyklusregulatoren (Zyklone) und viele andere (Wolf und Hilt, 2004; Willems et al., 2004; Ciechanover und Schwartz, 2004; Hirsch et al., 2004).

Beim 26S-Proteasom handelt es sich um einen hochmolekularen Komplex mit einem Molekulargewicht von ca. 1700 kDa. Elektronenmikroskopische Untersuchungen identifizierten das 20S-Proteasom als integralen Bestandteil mit zwei an beiden Seiten angefügten 19S-Subkomplexen. Durch Untersuchungen von *S. cerevisiae* Mutanten mit Defekten in den peptidspaltenden Aktivitäten des 20S-Proteasoms konnte eine integrale Funktion des 20S-Komplexes innerhalb des 26-Proteasoms

nachgewiesen werden. Diese Punktmutanten zeigen nämlich *in vivo* einen Defekt im Abbau ubiquitiniertes Substrate. Die sogenannten 19S-„caps“ bestehen aus mindestens 17 verschiedenen Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 25-110 kDa. Sie zeigen in grober Näherung eine V-förmige Struktur und sind um ca. 180° gegeneinander verdreht assoziiert. Es wird angenommen, daß die 19S-Subkomplexe für die Erkennung ubiquitiniertes Proteine benötigt werden und außerdem bei der Entfaltung und dem Transport der Substrate zum proteolytisch aktiven 20S-„core“ eine Rolle spielen. Die 19S-„caps“ können wiederum in zwei Bereiche, einen „lid“- und einen „base“-Bereich, unterteilt werden. Der „base“-Bereich ist aus neun Untereinheiten aufgebaut, sechs davon gehören zur Familie der AAA-ATPasen. Bei 13 der insgesamt 14 Untereinheiten des 20S-Proteasoms von *Saccharomyces cerevisiae* ist eine chromosomale Deletion des entsprechenden Gens lethal. Auch die meisten für den 19S-Subkomplex spezifischen Gene sind essentiell (Wolf und Hilt, 2004).

1.2.2.3 Abbausignale und Ubiquitinsystem

In der Zelle variiert die Lebensdauer der einzelnen Proteine sehr stark. Während langlebige Proteine Halbwertszeiten von bis zu 200 Stunden aufweisen, werden kurzlebige innerhalb von wenigen Minuten degradiert. Über die strukturellen Merkmale, die die Halbwertszeit eines Proteins bestimmen, ist bisher nur wenig bekannt. Experimentell konnte für bestimmte Proteine eine Abhängigkeit der Lebensdauer von der Beschaffenheit der N-terminalen Aminosäure nachgewiesen werden („N-end-rule“) (Varshavsky, 1992). Durch Sequenzvergleich einiger kurzlebiger Proteine wurden sogenannte PEST-Sequenzen als Abbausignal postuliert (Rogers et al., 1986; Rechsteiner et al., 1988). Hierbei findet man eine Anhäufung der Aminosäuren Prolin (P), Glutaminsäure (E), Asparaginsäure, Serin (S) und Threonin (T). Andere Proteine sind wiederum aufgrund ganz bestimmter konservierter Bereiche kurzlebig. So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß sogenannte „destruction boxes“ einen großen Einfluß auf die Stabilität von Zyklinen haben (Glutzer et al., 1991).

Das vermutlich wichtigste Signalvermittlungssystem des Proteinabbaus ist das Ubiquitinsystem (Pickart und Eddins, 2004; Walters et al., 2004). Ubiquitin konnte in bisher allen untersuchten eukaryontischen Zellen nachgewiesen werden, fehlt jedoch in Prokaryonten. Es handelt sich hierbei um ein hoch konserviertes Peptid, bestehend aus 76 Aminosäuren. Durch die Markierung mit einer Polyubiquitinkette können Proteine für den Abbau durch das 26S-Proteasom markiert werden. Allerdings spielen ubiquitinabhängige Reaktionen auch bei anderen, von der proteasomalen Hydrolyse unabhängigen, physiologischen Prozessen wie der Genexpression, Endozytose, Biogenese von Organellen oder Chromosomen-segregation eine wichtige Rolle. Die Mono-, Di- oder Triubiquitinierung von plasmamembranlokalisierten Zucker- oder Ionentransportern ist ein Signal für den endozytotischen Transport und die anschließende Degradation in der Vakuole (Horak und Wolf, 1997; Horak, 2003; Dupre et al., 2004).

Katalysiert wird die Ubiquitinierung von einem komplexen Enzymsystem, bestehend aus einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1), einem Ubiquitin-konjugierenden Enzym (E2) und einer substratspezifischen Ubiquitinligase (E3) (Pickart und Eddins, 2004). Im ersten Schritt wird Ubiquitin durch Knüpfung einer energiereichen Thioesterbindung zwischen dem C-terminalen Glycinrest des Ubiquitins und dem E1-Enzym unter ATP-Verbrauch aktiviert. Daraufhin kommt es zu einer Umesterung, wobei das aktivierte Ubiquitin auf eine Cysteinseitenkette des E2-Enzyms übertragen wird. Im Folgenden wird eine isopeptidische Bindung zwischen der ϵ -Aminogruppe eines Lysinrests des Substratproteins mit Ubiquitin ausgebildet. In vielen Fällen wird für den letzten Schritt ein E3-Enzym benötigt, das entweder direkt oder im Zusammenspiel mit einem E2-Enzym Ubiquitin auf das Substrat überträgt.

Eine Monoubiquitinierung ist als Abbausignal für das 26S-Proteasom nicht ausreichend; eine Polyubiquitinierung ist notwendig. Die Wiederholung des oben beschriebenen Prozesses führt zum Aufbau einer Multiubiquitinkette, in dem Lysinreste (meistens Lysin-48) bereits angehängter Ubiquitineinheiten mit aktiviertem Ubiquitin kovalent verbunden werden. Inzwischen konnte gezeigt werden, daß ein weiterer Faktor, genannt E4-Enzym, an der Ausbildung und Verlängerung von Ubiquitinketten beteiligt sein kann (Koegl et al., 1999). Wie die meisten

biochemischen Reaktionen ist auch die Ubiquitinierung reversibel. Die Deubiquitinierung wird von sogenannten Deubiquitinierungsenzymen katalysiert (Amerik und Hochstrasser, 2004). Dies spielt u. a. bei der Wiederverwertung der nach der Proteolyse entstandenen freien Ubiquitinketten eine wichtige Rolle.

1.3 Die Katabolitinaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase)

Der Stoffwechsel, ein komplexes Netzwerk aus anabolen und katabolen Reaktionsfolgen, ist streng reguliert (Stryer, 2002). Für eine Zelle ist die Anpassungsfähigkeit an veränderte Umweltbedingungen, wie z. B. ein wechselndes Nährstoffangebot, lebensnotwendig. Die Stoffwechselregulation beruht auf der Kontrolle der Enzymmenge, -aktivität und der Verfügbarkeit von Substraten. Die Menge eines Enzyms ist abhängig von der Synthesegeschwindigkeit und der Geschwindigkeit seines Abbaus. Meistens wird sie durch Änderungen der Transkriptionsrate bestimmt. Für die Regulation der katalytischen Aktivität gibt es mehrere Mechanismen wie die Feedback-Hemmung, eine reversible kovalente Modifikation (z. B. das Anfügen von Phosphatgruppen an Serin-, Threonin- oder Tyrosinreste), sowie die proteolytische Aktivierung. Zyklisches AMP, Diacylglycerol und Calciumionen dienen als intrazelluläre Botenstoffe, welche die Aktivität vieler Zielproteine koordinieren.

Ein wichtiger Schritt im Kohlenhydratstoffwechsel ist das wechselseitige Umschalten von der Gluconeogenese und der Glykolyse (Stryer, 2002). Beide Wege nutzen größtenteils die selbe Enzymausstattung, die wichtigsten Schaltstellen verwenden jedoch aus thermodynamischen und regulatorischen Gründen unterschiedliche Enzyme. Beispielsweise wird in der Glykolyse die Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat durch die Phosphofruktokinase katalysiert. Die umgekehrte Reaktion, ausgehend von Fructose-1,6-bisphosphat, wird in der Gluconeogenese von der Fructose-1,6-bisphosphatase reguliert.

In Hefezellen, die auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle (z. B. Ethanol, Glycerin oder Acetat) wachsen, ist das gluconeogenetische Schlüsselenzym Fructose-1,6-bisphosphatase ein langlebiges Protein mit einer Halbwertszeit von

ungefähr 90 Stunden (Funayama et al., 1980). Nach Glucosegabe wird die Neusynthese sofort abgeschaltet und das Enzym schnell in zwei Stufen inaktiviert (Funayama et al., 1980; Müller und Holzer, 1981; Mazon et al., 1982; Schork et al., 1995; Hämmerle et al., 1998). Zunächst erfolgt eine Phosphorylierung am Serin-11, die innerhalb der ersten 15-20 Minuten reversibel ist und zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität (ca. 50 %) durch Verschiebung des pH-Wert Optimums führt. Dem folgt der Abbau mit einer Halbwertszeit von 20-30 Minuten. Dieser Vorgang wird als Katabolitinaktivierung bezeichnet und ist einer der zentralen Schritte beim Umschalten von der Gluconeogenese zur Glykolyse (Gancedo, 1971; Holzer, 1976; Wolf, 2004). Für den zweiten Teil dieses Prozesses wird in der Literatur auch die Bezeichnung Katabolitdegradation verwendet. Die Inaktivierung von gluconeogenetischen Enzymen und Enzymen des Glyoxylatzyklus verhindert einen nutzlosen ATP-Verbrauch („futile cycle“) und ist für *Saccharomyces cerevisiae*, die in der Natur in Gegenwart zuckerhaltiger Früchte verbreitet ist, von physiologischer Bedeutung (Minard und Mc Alister-Henn, 1992).

In der Literatur werden für die Katabolitinaktivierung der FBPase zwei unterschiedliche Proteolysemechanismen beschrieben (Schork et al., 1994a,b; Wolf, 2004). In unserem Labor konnte gezeigt werden, daß die FBPase unter Beteiligung der Ubiquitin-konjugierenden Enzyme Ubc1p, Ubc4p, Ubc5p und Ubc8p polyubiquitiniert wird (Schork et al., 1995; Schüle et al., 2000). Bei Überexpression einer mutierten Ubiquitinform (Austausch von Lysin-48 gegen Arginin) wird die Polyubiquitinierung der FBPase beeinträchtigt, was eine deutlich verringerte Proteolyse rate des Enzyms zur Folge hat. Die anschließende Degradation wird vom zytosolischen 26S-Proteasom katalysiert (Schork et al., 1994a; Schork et al., 1995). In Mutanten mit einem Defekt in den 19S-„caps“ bzw. den proteolytisch aktiven Zentren des 20S-Partikels ist die Halbwertszeit des FBPase-Abbaus signifikant erhöht. In *UBC8*-deletierten Zellen konnten keine FBPase-Ubiquitinkonjugate nachgewiesen werden (Schüle et al., 2000). Aus diesem Grund kann das Enzym vom Proteasom nicht mehr erkannt werden, worin die drastische Stabilisierung (Halbwertszeit >10 Stunden) begründet liegt. Desweiteren wurde gezeigt, daß das N-terminale Prolin (Hämmerle et al., 1998) und das Protein Gid2p (Schüle, Dissertation

2000) eine essentielle Rolle für die Hydrolyse spielen. In *gid2Δ*-Zellen ist die Polyubiquitinierung der FBPase ebenfalls blockiert.

Die Arbeitsgruppe von Hui-Ling Chiang (Department of Cellular and Molecular Physiology Hershey, USA) beschreibt dagegen ein Modell, bei dem die FBPase zunächst in Vesikel eingeschlossen, zur Vakuole transportiert und dort Proteinase *yscA*-abhängig degradiert wird (Chiang und Schekman, 1991; Huang und Chiang, 1997). Dieser vakuoläre Mechanismus wurde durch ein *in vitro* System und genetisch durch Isolierung und Charakterisierung von sogenannten *vid*-Mutanten („*v*acuolar *i*mport and *d*egradation“) analysiert (Hoffmann und Chiang, 1996; Chiang und Chiang, 1998; Brown et al., 2001; Brown et al., 2002). Alle Versuche, diese Ergebnisse in unserem Labor zu verifizieren schlugen bisher jedoch fehl. Eine Erklärung für die topologisch verschiedenen Orte der FBPase-Inaktivierung könnte sein, daß von unserem Protokoll abweichende Wachstumsbedingungen andere Proteolysesysteme in der Zelle aktivieren. Da uns die Reaktionsbedingungen der Chiang-Arbeitsgruppe im Detail nicht bekannt sind, konnte diese Hypothese bisher jedoch nicht bestätigt werden. Interessanterweise wurde kürzlich der von uns entdeckte Ubiquitin-Proteasom-abhängige Abbau der FBPase auch von Hui-Ling Chiang und Mitarbeitern bestätigt (Hung et al., 2004).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ein Modellsystem, das sich für die Untersuchung des signalvermittelten, selektiven, Proteinabbaus bestens eignet, ist die Katabolitinaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase in *S. cerevisiae*. Das gluconeogenetische Schlüsselenzym wird bei Wachstum in Gegenwart einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle exprimiert. Durch Zugabe von Glucose zum Nährmedium kann der Abbau gezielt eingeleitet und verfolgt werden.

Um den molekularen Mechanismus der glucoseinduzierten Katabolitinaktivierung besser verstehen zu können, sollten weitere essentielle Komponenten dieses Regulationsweges der FBPase isoliert werden. Hierfür stand zunächst eine *gid1*-Punktmutante („glucose-induced degradation *d*eficient“) mit einem Defekt im

FBPase-Abbau zur Verfügung (Hämmerle et al., 1998). Durch Komplementation des Mutantenphänotyps mit einer Hefegenbank sollte das *GID1*-Gen auf der Grundlage des von Thomas Schüle etablierten Kolonie-Immunoblot Screens (Schüle et al., 2000; Schüle, Dissertation 2000) kloniert werden. Im Folgenden sollte dieser Screen so modifiziert werden, daß mit Hilfe einer Hefe-Deletionsmutantenkollektion (EUROSCARF, Frankfurt) möglichst schnell und effektiv genomweit nach weiteren für den FBPase-Abbau essentiellen Genen gesucht werden konnte. In den isolierten Deletionsstämmen sollte der Abbaufekt der FBPase mit Hilfe von Immunoblot und Pulse Chase Analysen quantifiziert werden.

Im Anschluß sollte das *GID1*-Genprodukt näher charakterisiert und somit Informationen über dessen Funktion erhalten werden. Die Messung der proteasomalen Aktivitäten in *GID1*-deletierten Zellen und ein Ubiquitinierungsexperiment sollte ein erster Hinweis auf den Wirkort von Gid1p in der glucoseinduzierten Reaktionskaskade des FBPase-Abbaus liefern. Zur Detektion mit kommerziell erhältlichen Antikörpern sollte ein biologisch aktives, epitopmarkiertes, Gid1p-Fusionsprotein hergestellt und der Proteinturnover unter verschiedenen Wachstumsbedingungen sowie dessen Abhängigkeit von anderen Gid-Proteinen analysiert werden. Dadurch sollte die Verbindung von Gid1p zu weiteren, in dem genomweiten Mutantenscreen identifizierten, Proteinen der FBPase-Regulation hergestellt werden. Mit etablierten Verfahren sollte die Gid1p-Lokalisation in der Zelle vorgenommen und nach potentiellen Interaktionspartnern gesucht werden. Weitere Erkenntnisse über Gid1p sollten phänotypische Untersuchungen mit vorliegenden bzw. selbst hergestellten Hefemutanten sowie möglichen Inhibitoren des Systems liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Bezugsquellen

Amersham	ECL™-System, ECL-Filme, Protein A Sepharose™ CL-4B, Glutathion Sepharose™ 4B
BIO-RAD	Protein-Längenstandard
Dianova	GENECLEAN II® Kit
Difco	Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Bacto-Yeast Extract Yeast Nitrogen Base w/o Aminoacids,
Merck	Rapamycin
New England BioLabs	Vent DNA-Polymerase, Alkalische Phosphatase (CIP), BSA, Restriktionsenzyme und zugehörige Inkubationspuffer
Roche	T4 DNA-Ligase, Desoxyribonucleosidtriphosphate, DNA-Längenstandard, Klenow-Enzym, RNAse A, Ampilicin, Complete™ Proteaseinhibitor, Restriktionsenzyme und zugehörige Inkubationspuffer
Schleicher & Schuell	Blottingpapier, Nitrocellulosemembranen
Serva	Agarose zur DNA-Elektrophorese
Sigma	Aminosäuren und Nucleinbasen, Glusulase, Cycloheximid, PMSF, Natriumazid,

Alle sonstigen Chemikalien wurden in höchstmöglicher Reinheit bezogen.

2.2 Antikörper und Bezugsquellen

Affiniti	Anti-Ubiquitin, monoklonal, Maus
Babco	Anti-Ha, monoklonal, Maus (Murine A6 Mono HA.11)
Dianova	Ziege Anti-Maus IgG (H+L), Peroxidase-konjugiert Ziege Anti-Maus IgG, Cy3-konjugiert
Diese Arbeit	Anti-FBPase, polyklonal, Hase
Egner et al., 1993	Anti-Fas, polyklonal, Hase
K. D. Entian	Anti-FBPase, polyklonal, Hase
F. Josupeit	Anti-Vid24, polyklonal, Hase (Charge 03/05/01 GP)
Klionsky et al., 1992	Anti-API, polyklonal, Hase
Medac	Ziege Anti-Hase IgG (H+L), Peroxidase-konjugiert
Molecular Probes	Anti-PGK, monoklonal, Maus

2.3 Medien

Für die Kultivierung von Hefe- und *E. coli*-Stämmen wurden Standardmedien verwendet (Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1990; Guthrie und Fink, 1991). Zur Herstellung von Agar-Platten enthielten die Medien 2 % Bacto-Agar.

Alle Nährmedien wurden mit deionisiertem Wasser (MILLIPORE H₂O) angesetzt, der gewünschte pH-Wert mit Natronlauge bzw. Salzsäure eingestellt und autoklaviert. Alle prozentuellen Angaben beziehen sich sofern nicht anders vermerkt auf Gewicht/Volumen. Synthetische Vollmedien und Mineralmedien wurden je nach Bedarf der Stämme mit L-Histidin, L-Leucin, L-Lysin, L-Tryptophan, Adenin und Uracil supplementiert.

2.3.1 Medien für Hefekulturen

2.3.1.1 Vollmedium (YPD) pH 5,5

1 %	Yeast Extract
2 %	Bacto-Pepton
2 %	D-Glucose

2.3.1.2 Synthetisches Vollmedium (CM) pH 5,6

0,67 %	Yeast-Nitrogen Base w/o Aminoacids
0,13 %	Aminosäuremischung („Dropout Powder“)
2 %	D-Glucose

2.3.1.3 Medien zur Induktion der Gluconeogenese

Zur Induktion der FB Pase wurde YPEtOH- bzw. CMEtOH-Medium verwendet, das anstatt Glucose 2 % Ethanol (v/v) als Kohlenstoffquelle enthielt.

2.3.1.4 Mineralmedium (MV) pH 5,5

0,67 %	Yeast-Nitrogen Base w/o Aminoacids
2 %	D-Glucose

Zur Herstellung von 5-FOA-Medium wurden alle unter 2.3 aufgeführten Supplemente (doppelte Menge Uracil) und 1 g/l 5-Fluoroorotat zugesetzt.

2.3.1.5 Sporulationsmedium

1 % Kaliumacetat

2.3.2 Medien für *E. coli*-Kulturen

2.3.2.1 Vollmedium (LB) pH 7,5

1 % Yeast Extract
1 % Bacto-Pepton
0,5 % Natriumchlorid

Sofern die *E. coli*-Zellen ein Plasmid mit einem Ampicillin-Resistenzgen trugen, wurden dem Medium 50-75 mg/l Ampicillin zugesetzt.

2.3.2.2 SOC-Medium pH 7,4

2 % Bacto-Trypton
0,5 % Yeast Extract
0,4 % D-Glucose
10 mM Natriumchlorid
10 mM Magnesiumchlorid
10 mM Magnesiumsulfat
2,5 mM Kaliumchlorid

2.3.2.3 2xYT-Medium pH 7

1 %	Yeast Extract
1,6 %	Bacto-Trypton
0,5 %	Natriumchlorid

Zur Herstellung von 2xYTAG-Medium wurden 2 % Glucose und 100 mg/l Ampicilin zugesetzt.

2.4 Stämme, Plasmide und Oligonucleotide

2.4.1 Hefestämme

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
WCG4a	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3</i>	W. Heinemeyer
YHB4	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 mai1Δ::KAN^R</i>	H. Barth
YHI29-1	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 pre1-1</i>	W. Hilt
YHI29-14	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 pre1-1 pre4-1</i>	W. Hilt
YIS4	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 aut5Δ::KAN^R</i>	I. Suriapranata
YJR13	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 gid1Δ::KAN^R</i>	diese Arbeit
YMS5	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 aut1Δ::URA3</i>	M. Schlumpberger
YMS30	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 aut3Δ::KAN^R</i>	M. Straub
YMTA	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 pep4Δ::HIS3</i>	M. Thumm
YMTAB	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 pep4Δ::HIS3 prb1Δ::URA3</i>	M. Thumm
YKMW7	<i>MATα his3-11,15 leu2-3,112 ura3 ccz1Δ::KAN^R</i>	K. Meiling-Wesse
W3031B	<i>MATα ade2 leu2-3,112 his3 trp1 ura3</i>	H. L. Chiang

W3031BKO	<i>MATα ade2 leu2-3,112 his3 trp1 ura3 fbp1Δ::LEU2</i>	H. L. Chiang
YJR12	<i>MATα ade2 leu2-3,112 his3 trp1 ura3 GID1-HA₃::HIS5^{S. pombe}</i>	diese Arbeit
YTS1	<i>MATα ade2 leu2-3,112 his3 trp1 ura3 gid2Δ::KAN^R</i>	T. Schüle
YTS2	<i>MATα ade2 leu2-3,112 his3 trp1 ura3 ubc8Δ::KAN^R</i>	T. Schüle
YTS3	<i>MATα ade2 leu2-3,112 his3 trp1 ura3 GID2-HA₃::HIS5^{S. pombe}</i>	T. Schüle
YTS4	<i>MATα ade2 leu2-3,112 his3 trp1 ura3 UBC8-HA₃::HIS5^{S. pombe}</i>	T. Schüle
WAY.5-4A	<i>MATα his3Δ1 ura3-52</i>	K. D. Entian
WAY.5-4A/D1	<i>MATα his3Δ1 ura3-52 gid1-3</i>	K. D. Entian
YJR10	<i>MATα/α gid1-3/gid1Δ</i>	diese Arbeit
YJR11	<i>MATα/α gid1-3/GID1</i>	diese Arbeit
JK9-3da	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL+ HMLα</i>	M. N. Hall
JK9-3dα	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL+ HMLα</i>	M. N. Hall
JK9-3da/α	<i>MATα/α leu2-3,112/leu2-3,112 ura3-52/ura3-52 rme1/rme1 trp1/trp1 his4/his4 GAL+/GAL+</i>	M. N. Hall
AE7-6c	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL+ HMLα gid1::URA3-1</i>	M. N. Hall
AE7-6b	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL+ HMLα gid1::URA3-1</i>	M. N. Hall
AE8-1a	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL+ HMLα gid1::URA3-1 tor1::LEU2-4</i>	M. N. Hall
AE12-5a	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL+ HMLα ade2Δ gid1::URA3-1 tor2::ADE2-3 / YCplac111::tor2-21ts</i>	M. N. Hall

AN1-1c	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL+</i> <i>HMLa tor1::LEU2-4 gid1::URA3-1</i>	M. N. Hall
AN1-3c	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL+</i> <i>HMLa tor1::LEU2-4 gid1::URA3-1</i>	M. N. Hall
JC1-1c	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL+</i> <i>HMLa [kanMX]-GALp-GST-TOR1</i>	M. N. Hall
JH11-1c	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL+</i> <i>HMLa tor1-1</i>	M. N. Hall
MH349-3d	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL+</i> <i>HMLa tor1::LEU2-4</i>	M. N. Hall
SH200	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his3 GAL+</i> <i>HMLa ade2Δ tor1::HIS3-3 tor2::ADE2-3 /</i> <i>YCplac111::TOR2</i>	M. N. Hall
SH221	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his3 GAL+</i> <i>HMLa ade2Δ tor1::HIS3-3 tor2::ADE2-3 /</i> <i>YCplac111::tor2-21ts</i>	M. N. Hall
TS64-1a	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL+</i> <i>HMLa sit4::kanMX4</i>	M. N. Hall
TS19-4a	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL+</i> <i>HMLa tap42::kanMX / YCplac111::tap42-11ts</i>	M. N. Hall
YJR14	<i>MATa leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL+</i> <i>HMLa gid1::URA3-1 sit4::KANMX4</i>	diese Arbeit
RRY1	<i>MATa ura3-52 leu2</i>	M. N. Hall/P. Sanz
RRY1063	<i>MATa ura3-52 leu2 his3 bmh1::HIS3</i>	M. N. Hall
RRY1266	<i>MATa ura3-52 leu2 his3 bmh2::HIS3</i>	M. N. Hall
RRY1216	<i>MATa ura3-52 leu2 his3 bmh1::HIS3 bmh2::HIS3</i>	M. N. Hall
RRY1217	Σ 1278 <i>bmh1Δ bmh2Δ</i>	P. Sanz
BY4743	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i>	EUROSCARF
Y35286	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>fbp1Δ::KANMX4/fbp1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF

Y34594	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>gid1Δ::KANMX4/gid1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33614	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>gid2Δ::KANMX4/gid2Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y36577	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>gid3Δ::KANMX4/gid3Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33244	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>gid4Δ::KANMX4/gid4Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y31410	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>gid5Δ::KANMX4/gid5Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33195	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>gid6Δ::KANMX4/gid6Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33446	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>gid7Δ::KANMX4/gid7Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y36576	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>gid8Δ::KANMX4/gid8Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y31488	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>gid9Δ::KANMX4/gid9Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y36902	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>grr1Δ::KANMX4/grr1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33967	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>reg1Δ::KANMX4/reg1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF

Y31409	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>snl1Δ::KANMX4/snl1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y34196	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>vid21Δ::KANMX4/vid21Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y35282	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>vid22Δ::KANMX4/vid22Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y32000	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>vid27Δ::KANMX4/vid27Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y34903	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>vid31Δ::KANMX4/vid31Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y37164	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>ccz1Δ::KANMX4/ccz1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y35326	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>cdc73Δ::KANMX4/cdc73Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y32704	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>nyv1Δ::KANMX4/nyv1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y32362	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>vam3Δ::KANMX4/vam3Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y33774	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>vam6Δ::KANMX4/vam6Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y34578	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>vam7Δ::KANMX4/vam7Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF

Y34015	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>vps41Δ::KANMX4/vps41Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y30575	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1 leu2Δ0/leu2Δ0</i> <i>MET15/met15Δ0 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i> <i>ypt7Δ::KANMX4/ypt7Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y04594	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>gid1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
Y14594	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 gid1Δ::KANMX4</i>	EUROSCARF
YR312	<i>MATa his1</i>	<i>MATα</i> -Testerstamm
YR320	<i>MATα his1</i>	<i>MATa</i> -Testerstamm

2.4.2 *Escherichia coli*-Stämme

Für Klonierungen und zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde der *E. coli*-Stamm DH5α (Hanahan, 1983) eingesetzt. Zur Expression und Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen wurde der proteasedefiziente Stamm BL21 (Studier et al., 1990) verwendet.

2.4.3 Plasmide

2.4.3.1 p3XHA-HIS5

Das 4,6 kbp große Plasmid p3XHA-HIS5 von Munro (Cambridge, England) eignet sich zur Herstellung von chromosomalen Fusionen mit dem Haemagglutinin (Ha)-Epitop des Influenzavirus und dem *HIS5*-Gen aus *S. pombe* als Selektionsmarker. Es basiert auf dem Plasmid pBluescript II SK. Über eine PCR (2.6.8) kann eine Integrationskassette mit dreifachem HA-Epitop und dem *HIS5*-Markergen, flankiert

von homologen Bereichen des gewünschten Gens, hergestellt und durch homologe Rekombination in den Hefestamm integriert werden (2.6.14.2). Daraus ergeben sich C-terminal markierte Fusionsproteine, die mit Ha-Antikörper detektiert werden können.

2.4.3.1.1 YJR12

Zur Herstellung des Hefestammes YJR12 (*W3031B GID1-HA₃::HIS5^{S. pombe}*) wurden die Primer P1/P2 GID1-HA3-HIS5-Int (2.4.4) mit jeweils 50 Basen vor dem Stopp- bzw. nach dem Stoppcodon (Terminatorregion) des *GID1*-Gens verwendet.

2.4.3.2 pUG6

Das Plasmid pUG6 dient zur Herstellung von Deletionsstämmen (Güldener et al., 1996). Es enthält einen Replikationsursprung (ori) und als Deletionskassette das Kanamycinresistenzgen unter Kontrolle von Promotor und Terminator des *TEF*-Gens aus *Ashbya gossypii* (Wach et al., 1994). Außerdem wird das Kanamycinogen von den Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase (loxP) flankiert. Die *loxP-KAN^R-loxP*-Integrationskassette mit flankierenden Bereichen des zu deletierenden Gens wird mittels PCR (2.6.8) synthetisiert.

2.4.3.2.1 YJR13

Zur Herstellung des Hefestammes YJR13 (*WCG4a gid1Δ::KAN^R*) wurden die Primer P1/P2 GID1-KAN-Del (2.4.4) mit 42 komplementären Basen vor dem Start- bzw. nach dem Stoppcodon des *GID1*-Gens verwendet.

2.4.3.3 pGEX-4T-3

Das Glutathion S-Transferase (GST) Genfusionssystem von Pharmacia Biotech eignet sich zur Expression und Aufreinigung von N-terminalen GST-Fusionsproteinen aus *E. coli*. Der in dieser Arbeit verwendete Vektor pGEX-4T-3 enthält einen mit IPTG induzierbaren *Tac*-Promotor, sowie ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli*. Nach Klonierung des gewünschten Genabschnitts in die „Multiple Cloning Site“ wird das GST-Fusionsprotein im *E. coli*-Stamm BL21 exprimiert und anschließend aus dem bakteriellen Lysat durch Affinitätschromatographie mit Glutathion Sepharose 4B aufgereinigt (2.7.6). Mit Hilfe eines Thrombinverdaus kann das gewünschte Protein von der Glutathion S-Transferase abgeschnitten werden.

2.4.3.3.1 pJR10

Das Plasmid pJR10 (diese Arbeit) basiert auf dem Vektor pGEX-4T-3 (2.4.3.3). In der *Bam*HI/*Xho*I-Schnittstelle der „Multiple Cloning Site“ ist das 1,3 kbp große *GID2*-Gen ohne Stoppcodon (Basen 1-1263) inseriert.

Das *GID2*-Gen mit einer *Bam*HI-Schnittstelle am Anfang und einer *Xho*I-Schnittstelle am Ende wurde über eine PCR (2.6.8) unter Verwendung der Primer P1/P2 GST-Gid2-Fusion (2.4.4) und dem Plasmid YCp50/II (2.4.3.4.2) als Template amplifiziert. Mit Hilfe von pJR10 konnte ein 75 kDa großes GST-Gid2-Protein exprimiert werden, allerdings war das Fusionprotein nach dem Zellaufschluß nicht in Lösung zu bringen (Bildung von sogenannten „inclusion bodies“).

2.4.3.3.2 pJR11 und pJR12

Die Plasmide pJR11 und pJR12 (diese Arbeit) basieren auf dem Vektor pGEX-4T-3 (2.4.3.3) und enthalten ein 0,9 kbp Fragment (pJR11) bzw. ein 0,5 kbp Fragment (pJR12) des *GID2*-Gens in der *Bam*HI/*Xho*I-Schnittstelle der „Multiple Cloning Site“.

Zur Herstellung von pJR11 wurden die ersten 918 Basen von *GID2* über eine PCR (2.6.8) mit Hilfe der Primer P1/P3 GST-Gid2-Fusion (2.4.4) und YCp50/II (2.4.3.4.2) als Template amplifiziert. Für pJR12 erfolgte eine Amplifikation der Basen 4-500 mit den Primern P1/P2 GST-Gid2 4-500 (2.4.4). In beiden Fällen befinden sich eine *BamHI*-Schnittstelle am Anfang und eine *XhoI*-Schnittstelle am Ende des Fragments. Bei Verwendung des Expressionsvektors pJR11 traten die gleichen experimentellen Schwierigkeiten, die bei pJR10 (2.4.3.3.1) beschrieben sind, auf. Mit Hilfe von pJR12 konnte ein etwa 44 kDa großes GST-Gid2-Fragment exprimiert werden, das nach Zellaufschluß in Lösung gebracht werden konnte.

2.4.3.3.3 pJR13

Zur Herstellung von pJR13 (diese Arbeit) wurde das komplette *FBP1*-Gen ohne Stoppcodon (Basen 1-1044) in die *Sall/NotI*-Schnittstelle der „Multiple Cloning Site“ von pGEX-4T-3 (2.4.3.3) kloniert (Abb. 2). Das 1 kbp große Gen mit einer *Sall*-Schnittstelle am Anfang bzw. *NotI*-Schnittstelle am Ende wurde über eine PCR (2.6.8) unter Verwendung der Primer P1/P2 GST-Fbp1 1-1044 (2.4.4) und chromosomaler DNA (2.6.5) des Hefestammes W3031B als Template hergestellt. Mit Hilfe von pJR13 konnte ein 64 kDa großes Fusionsprotein von GST und der FB Pase in *E. coli* exprimiert werden, das anschließend über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt wurde (2.7.6). Nach Thrombinverdau (2.7.6.1) und SDS-PAGE (2.7.2) wurde die FB Pase aus dem Gel ausgeschnitten und als Antigen zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers (EUROGENTEC, Belgien) verwendet.

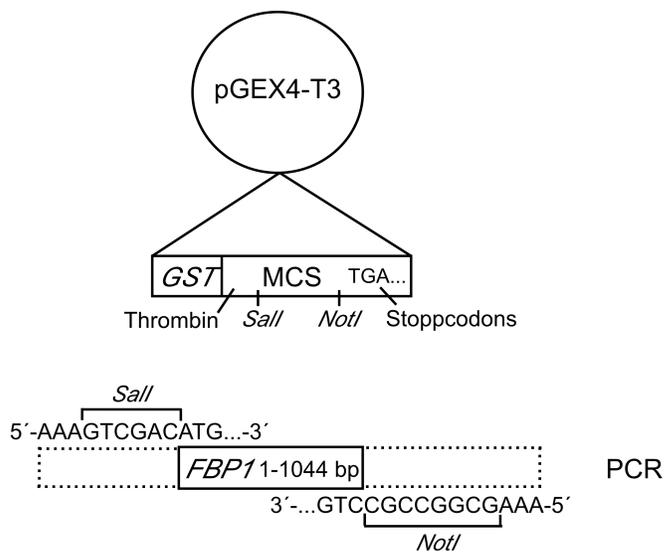


Abb. 2: Vorgehensweise zur Herstellung des *GST-FBP1*-Expressionsvektors pJR13. Die ersten 1044 Basenpaare des *FBP1*-Gens mit einer *SalI*-Schnittstelle am N-Terminus und einer *NotI*-Schnittstelle am C-Terminus wurden über eine PCR amplifiziert und anschließend in die *SalI/NotI*-Schnittstelle der „Multiple Cloning Site (MCS)“ von pGEX4-T3 kloniert.

2.4.3.4 YCp50-Genbank

Die Hefegenbank basiert auf dem 8 kbp großen Vektor YCp50, welcher sich vom Plasmid pBR322 ableitet (Rose et al., 1987). Der „shuttle“-Vektor enthält neben dem *CEN4/ARS1*-Element das *URA3*-Markergen. Außerdem enthält er ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli*. Zur Herstellung der Genbank wurden genomische DNA-Fragmente, die das gesamte Erbgut von *Saccharomyces cerevisiae* repräsentieren, in die *BamHI*-Schnittstelle von YCp50 kloniert.

2.4.3.4.1 pJR14 (YCp50/I)

Bei pJR14 (diese Arbeit) handelt es sich um das Genbankplasmid YCp50/I (ursprüngliche Bezeichnung: YCp50-26 20/06/10) mit einem 27,3 kbp großen Insert (Chromosom VII, Position 54121-81444) in der *BamHI*-Schnittstelle von YCp50

(2.4.3.4). Es beinhaltet 15 vollständige Gene (Abb. 3), u. a. das 2,9 kbp große *GID1/VID30*-Gen.

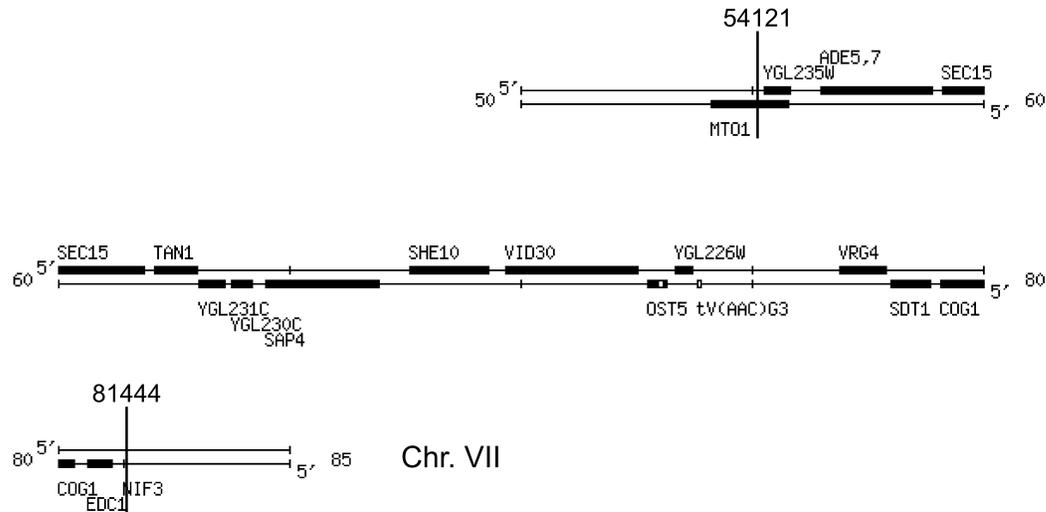


Abb. 3: pJR14 (YCp50/I) enthält 15 vollständige Gene von Chromosom VII (Position 54121-81444) der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in der *Bam*HI-Schnittstelle von YCp50.

2.4.3.4.2 YCp50/II und YCp50/III

Die Genbankplasmide YCp50/II und YCp50/III (Schüle, Dissertation 2000) enthalten ein 5,7 kbp großes Fragment von Chromosom IV (YCp50/II) (Position 966443-972097) bzw. ein 8 kbp Fragment von Chromosom V (YCp50/III) (Position 131043-139059) in der *Bam*HI-Schnittstelle von YCp50 (2.4.3.4).

2.4.3.4.3 pJR15

pJR15 (diese Arbeit) basiert auf dem Ausgangsvektor pJR14 (2.4.3.4.1) und wurde mit Hilfe der „Gap Repair“ Methode (2.6.12.3) hergestellt. Hierzu wurde pJR14 (*URA3*, *GID1*) mit *Sac*I und *Xba*I verdaut (Entfernung der *GID1*-Wildtypversion), in uracilaxotrophe YJR12-Zellen (*W3031B GID1-HA₃::HIS5^{S. pombe}*) transformiert und

auf uracilfreiem CM-Medium selektioniert (Abb. 4). Nach der Plasmidisolierung wurde das Vorhandensein von *GID1-HA₃* und *HIS5* nachgewiesen.

Mit pJR15 kann ein biologisch aktives *Gid1-HA₃*-Fusionsprotein unter Kontrolle des nativen Promotors exprimiert werden.

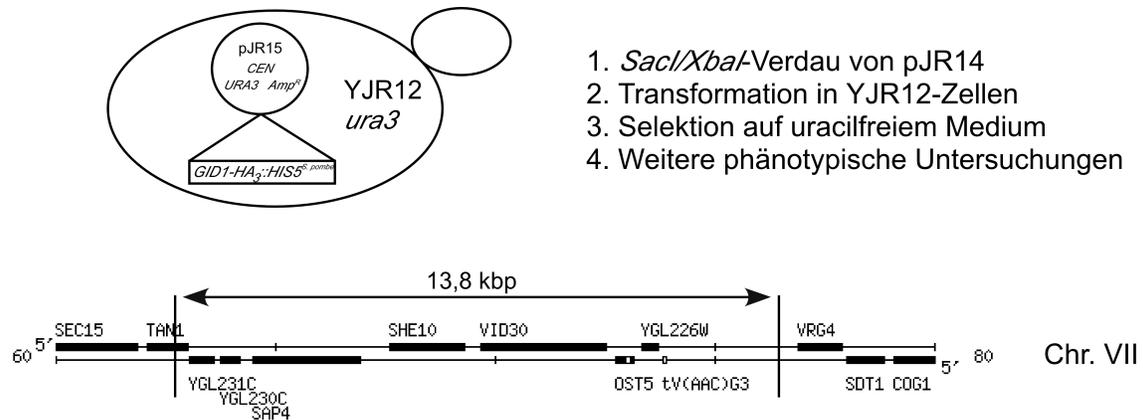


Abb. 4: Zur Herstellung des *GID1-HA₃*-Expressionsvektors pJR15 wurde aus dem pJR14-Genbankplasmid (hier dargestellt ist nur ein Teil des 27,3 kbp Inserts von Chromosom VII) ein 13,8 kbp Fragment mit *SacI/XbaI* entfernt und die Lücke via „Gap Repair“ nach Transformation in den Hefestamm YJR12 (*W3031B GID1-HA₃::HIS5^{S.pombe}*) aufgefüllt. Dabei wurde die *GID1/VID30*-Wildtypversion durch *GID1-HA₃* und das *HIS5*-Markergen ersetzt.

2.4.3.5 pJR16 (YEp13/4), pJR17 (YEp13/1-1) und pJR18 (YEp13/6)

Die Genbankplasmide pJR16 (YEp13/4), pJR17 (YEp13/1-1) und pJR18 (YEp13/6) (diese Arbeit) basieren auf der 2 μ -Genbank YEp13 (10,6 kbp) und können zur Überexpression von *GID1* herangezogen werden. Sie enthalten das *LEU2*-Markergen sowie ein Ampicillin-Resistenzgen. Die Inserts der drei Vektoren sind praktisch identisch und beinhalten das komplette *GID1/VID30*-Gen mit Promotor- und Terminatorregion (Abb. 5).

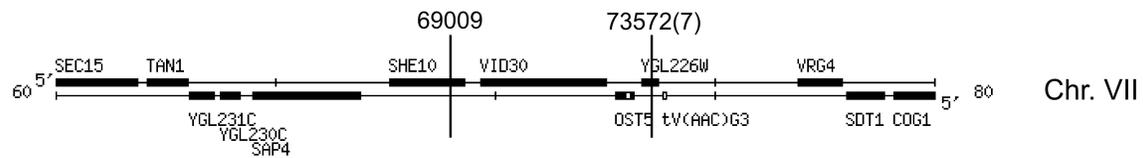


Abb. 5: pJR16, pJR17 und pJR18 sind 2 μ „high copy“-Plasmide und enthalten jeweils einen 4,6 kbp großen DNA-Abschnitt von Chromosom VII (Position 69009 bis 73572 (pJR16) bzw. 73577 (pJR17 und pJR18) der Hefe *S. cerevisiae* in der „Multiple Cloning Site“ von YEp13.

2.4.3.6 pJR19 (YEp24/8-1) und pJR19/S1

pJR19 (diese Arbeit) entspricht dem 2 μ „high copy“-Genbankplasmid YEp24/8-1 und beherbergt ein 7,9 kbp großes Insert (Chromosom XIV, Position 479665-487553) in der „Multiple Cloning Site“ von YEp24 (7,8 kbp, *URA3*, *Amp^R*). Dieser Bereich beinhaltet vier vollständige Gene: *NIS1*, *YNL077w*, *MKS1* und *IMP4*. Außerdem enthält der Vektor das *URA3*-Gen und ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli*.

Bei der anschließenden Subklonierung (2.6.12.4) wurde ein 3,4 kbp großes *KspI/SfiI*-Fragment (inkl. *MKS1* und *IMP4*) entfernt und das „Backbone“ religiert. Das resultierende Plasmid erhielt die Bezeichnung pJR19/S1.

2.4.3.7 pYES2 und pYES2HA-C (pL001)

pYES2 (Invitrogen) und pYES2HA-C (Ligr, Dissertation 1999) sind 2 μ „high copy“-Plasmide. Sie enthalten den Galactose-induzierbaren *GAL1*-Promotor zur Überexpression von Genen in *S. cerevisiae*, die in die „Multiple Cloning Site“ eingeführt werden können. Außerdem enthalten sie das *URA3*-Marker-gen. Das Ampicillin-Resistenzgen dient zur Selektion in *E. coli*.

2.4.3.7.1 pIV48 und pIV48HA-C

Die Plasmide pIV48 und pIV48HA-C (Velten, Dissertation 1999) basieren auf den Vektoren pYES2 bzw. pYES2HA-C (2.4.3.7). In der *SacI/NotI*- bzw. *PvuII/SphI*-Schnittstelle ist das 1,4 kbp große *HEL48/FAR10*-Gen inseriert. pIV48HA-C dient zur Überexpression eines C-terminal markierten Hel48-Ha₂-Fusionsproteins.

2.4.3.8 YEplac195

YEplac195 ist ein 5,2 kbp großer 2 μ -Vektor zur Überexpression von Genen in *S. cerevisiae*, die in die „Multiple Cloning Site“ eingeführt werden können. Er enthält das *URA3*-Marker-gen und das Ampicilin-Resistenzgen zur Selektion in *E. coli*.

2.4.3.8.1 pAE8-1

pAE8-1 (Eugster, Diplomarbeit 1997) enthält ein 4,8 kbp großes *PstI/SpeI-GID1*-Fragment, das in die *PstI/XbaI*-Schnittstelle von YEplac195 (2.4.3.8) kloniert wurde. Dieses Plasmid eignet sich zur Überexpression von *GID1*.

2.4.4 Oligonucleotide

P1 GST-Gid2-Fusion

5'-AAA GGA TCC ATG TCT GAA TTA CTA GAT-3'

P2 GST-Gid2-Fusion

5'-AAA CTC GAG AAG CAT AAC AAA ACG AAC-3'

P3 GST-Gid2-Fusion

5'-AAA CTC GAG AGA GTC AAA GAA AAT ATG-3'

P1 GST-Gid2 4-500

5'-AAA GGA TCC TCT GAA TTA CTA GAT AG-3'

P2 GST-Gid2 4-500

5'-AAA CTC GAG TAG ACA TCT TTT AGA TAC-3'

P1 GST-Fbp1 1-1044

5'-AAA GTC GAC ATG CCA ACT CTA GTA AAT-3'

P2 GST-Fbp1 1-1044

5'-AAA GCG GCC GCC TGT GAC TTG CCA ATA-3'

P1 GID1-HA3-HIS5-Int

5'-ATC CAA GAT ATT ACA AAG CTA TTA ACT TCG ACG AAG ATG TGT TGA
ATT TAG GAG CAG GGG CGG GTG C-3'

P2 GID1-HA3-HIS5-Int

5'-TAA TGA CTG ATA TCA CAT GGC TTT GTT GTT TGA AGG TGC TTG TTT TAT
GCG AGG TCG ACG GTA TCG ATA AG-3'

P1 GID1-KAN-Del

5'-ACG TTA AAG CCA AGC GTC GAA TTT CAG CAT AAT TAA GAG GAA CAG
CTG AAG CTT CGT ACG C-3'

P2 GID1-KAN-Del

5'-GAT ATC ACA TGG CTT TGT TGT TTG AAG GTG CTT GTT TTA TGC AGC
ATA GGC CAC TAG TGG ATC TG-3'

2.5 Wachstumsbedingungen

Für Zellkulturen in flüssigen Nährmedien wurden Reagenzgläser oder Erlenmeyerkolben verwendet, deren Volumen dem fünf bis zehnfachen Volumen der Nährflüssigkeit entsprach. Die Inkubation erfolgte sofern nicht anders vermerkt bei 30 °C (Hefe) bzw. 37 °C (*E. coli*) auf einem Rundschüttler bei 220 Upm.

2.5.1 Dauerkulturen

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

2.5.2 Messung der optischen Dichte

Das Zellwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte der 1:10 (v/v) verdünnten Kultur bei 600 nm (Pharmacia Novaspec II) verfolgt.

2.5.3 Wachstumsbedingungen bei *E. coli*-Kulturen

E. coli-Kulturen wurden mit Zellen von Agar-Platten oder Glycerindauerkulturen angeimpft und über Nacht inkubiert.

2.5.3.1 Expression von GST-Fusionsproteinen

Die Expression von GST-Fusionsproteinen erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21. Die verwendeten Expressionsvektoren sind unter 2.4.3.3. beschrieben, die Bedingungen beziehen sich auf eine 200 ml Hauptkultur.

Eine stationäre 2xYTAG-Vorkultur wurde 1:80 im selben Medium (vorgewärmt auf 30 °C) verdünnt und 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Induktion des *Tac*-Promotors wurden 500 µl IPTG (100 mM) zugesetzt und weitere 2,5 Stunden geschüttelt.

2.5.4 Wachstumsbedingungen der Hefe

Zellkulturen auf Agar-Platten wurden sofern nicht anders vermerkt 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert. Bei Kulturen in flüssigen Nährmedien wurde zunächst eine 2,5 ml Vorkultur in einem Reagenzglas hergestellt und 1-3 Tage geschüttelt. Hauptkulturen wurden dann mit der stationären Vorkultur angeimpft. Plasmidtragende Hefestämme wurden unter Berücksichtigung der Auxotrophiemarker in Selektionsmedien angezogen.

2.5.4.1 Induktion und Inaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase

Die Expression gluconeogenetischer Enzyme (z. B. FB Pase, PEPCK) erfolgt nach Verbrauch der im Medium vorhandenen Glucose und wird bei Wachstum von Zellen auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle (z. B. Ethanol, Glycerin oder Kaliumacetat) verstärkt.

Zur Untersuchung des Proteinturnovers der FB Pase wurden Westernblot Analysen durchgeführt. Hierzu wurde, sofern im Text nicht anders vermerkt, eine stationäre Vorkultur im selben Medium 1:12,5 verdünnt und weitere 6-7 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in ethanolhaltiges Medium (YPEtOH bzw. CMEtOH) so umgesetzt, daß eine Suspension mit einer OD_{600} von 0,25 resultierte und 16 Stunden geschüttelt. Die Katabolitinaktivierung wurde durch Umsetzen in glucosehaltiges Medium (YPD bzw. CM) mit einer OD_{600} von 1,5 induziert und zu den angegebenen Zeiten Proben von je 1 ml entnommen. Die Zellen wurden sofort abzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung (2.7.1.1) bei -20 °C gelagert. Für eine Immunopräzipitation (2.7.1.2) wurden die Stämme in gleicher Weise angezogen, allerdings je 15 OD_{600} Zellen geerntet.

Alternativ zum Standardprotokoll wurde eine YPD-Übernachtskultur ($OD_{600} \geq 1,5$) einmal mit Wasser gewaschen und in YPEtOH-Medium so aufgenommen, daß eine OD_{600} von 1,5 resultierte und 5 Stunden inkubiert. Dann wurde der FB Pase-Abbau

durch Zugabe von 40 %iger Glucose (2 % Endkonzentration) eingeleitet und zu den gewünschten Zeitpunkten Proben von je 1 ml entnommen.

Zur Untersuchung des Abbauverhaltens der FBPase in einem Pulse Chase wurde eine stationäre, in CM-Medium gewachsene, Vorkultur auf methioninfreies CM-Medium ($OD_{600} = 0,01$) umgesetzt und über Nacht inkubiert ($OD_{600} \geq 1,5$). Anschließend wurden je 10 OD Zellen mit 4 ml Wasser gewaschen und zur Induktion der FBPase in 4 ml methioninfreiem CMEtOH-Medium resuspendiert und 2-2,5 Stunden im Wasserbad geschüttelt. Nach Zugabe von je 25 μl ^{35}S -Methionin wurde weitere 3-3,5 Stunden inkubiert. Dann wurden die Zellen 5 Minuten bei 2000 Upm abzentrifugiert und zur Einleitung der Katabolitinaktivierung in 5,5 ml CM-Medium (inkl. 10 mM Methionin) resuspendiert. Anschließend wurden zu den angegebenen Zeiten Proben von je 1 ml entnommen, mit 100 μl 110 % eisgekühlter TCA versetzt und bis zur Aufarbeitung (2.7.1.3) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Bei diversen Deletionsstämmen befand sich die radioaktiv markierte FBPase unter der Nachweisgrenze. In diesen Fällen wurde das Standardprotokoll modifiziert: 0,8 ml einer stationären Vorkultur wurden mit 1 ml Wasser gewaschen, in 8 ml methioninfreiem CM-Medium aufgenommen und 6-7 Stunden geschüttelt. Dann wurde ein Volumen entnommen, das 2 OD_{600} entsprach, mit 1 ml Wasser gewaschen und in 8 ml methioninfreiem CMEtOH-Medium resuspendiert. Jeder Probe wurden 40 μl ^{35}S -Methionin zugesetzt. Nach einer sechzehnständigen Inkubationszeit wurden die Zellen zur Einleitung der Katabolitinaktivierung in 5,5 ml CM-Medium (inkl. 10 mM Methionin) aufgenommen und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben von je 1 ml entnommen.

2.5.4.2 Wachstumsbedingungen bei Ubiquitinierungsexperimenten

50 ml einer YPD-Übernachtskultur ($OD_{600} \geq 1,5$) wurden 4 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert, einmal mit 10 ml Wasser gewaschen und in YPEtOH-Medium so aufgenommen, daß eine OD_{600} von 2,5 resultierte und 6 Stunden inkubiert. Dann wurde die Katabolitinaktivierung durch Zugabe von 40 %iger Glucose (2 % Endkonzentration) eingeleitet, zu den angegebenen Zeiten Proben von je 15 ml

entnommen und kurz auf Eis gestellt. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 3000 Upm (4 °C) wurden die Zellen in 1 ml eisgekühltem Wasser (inkl. 1 mM PMSF, 20 mM Natriumazid und 20 mM NEM) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung (2.7.1.2) bei -80 °C gelagert.

2.6 Zell- und molekularbiologische Methoden

Alle beschriebenen Methoden wurden unter Verwendung steriler Gefäße und Lösungen durchgeführt. Sofern nicht anders vermerkt kamen Standardprotokolle zur Anwendung (Ausubel et al., 1987-1995; Sambrook et al., 1989; Guthrie und Fink, 1991).

2.6.1 Kreuzung von Hefestämmen

Zur Kreuzung von haploiden Stämmen wurden gleiche Zellmengen der beiden Hefestämme unterschiedlichen Paarungstyps auf einer YPD-Platte gemischt und 1 Tag inkubiert. Diploide Zellen wurden sofern möglich mit Hilfe der Auxotrophiemarker selektioniert.

Alternativ wurde jeweils eine Zahnstocherportion der beiden Stämme in 2 ml YPD-Medium angeimpft und bei 30 °C geschüttelt. Nach ca. 5 Stunden waren Zygoten unter dem Mikroskop aufgrund ihrer Morphologie (dreiblättriges Kleeblatt) nachweisbar und dadurch selektionierbar.

2.6.2 Sporulation von Hefestämmen und Tetradendisektion

Eine 10 ml YPD-Übernachtskultur wurde 1:70 im gleichen Medium verdünnt und ca. 5 Stunden bei 30 °C geschüttelt (bis Zellen in log-Phase). Anschließend wurden 2 ml dieser Kultur 4 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert und mit jeweils 1 ml Wasser und 1

%igem Kaliumacetat gewaschen. Die diploiden Hefestämme wurden in 1 ml Sporulationsmedium resuspendiert und bei 23 °C geschüttelt. Nach 3-4 Tagen waren unter dem Mikroskop Tetraden erkennbar.

Zur Tetradendissektion wurden 200 µl der Flüssigkultur zentrifugiert, zwei bis drei Mal mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen und in 200 µl Wasser aufgenommen. Anschließend wurden 2 µl Glusulase zugesetzt und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert um den Ascus anzudauen. Nach Zugabe von 800 µl Wasser wurde die Zellsuspension mindestens 4-5 Stunden bei 4 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Trennung der Tetraden mit einem Mikromanipulator.

2.6.2.1 Komplementation sporulationsdefizienter Mutanten (Sporulationsscreen)

Eine YPD-Übernachtskultur des diploiden Hefestammes wurde im gleichen Medium 1:100 verdünnt und etwa 5 Stunden bei 30 °C geschüttelt (bis Zellen in log-Phase). 10 ml der Kultur wurden 4 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert und mit 1 ml Wasser, anschließend 1 ml Li-Sorb (2.6.14.2) gewaschen. Dann wurden die Zellen in 50 µl Li-Sorb aufgenommen, 15 Minuten bei 30 °C inkubiert und wie unter 2.6.14.1 beschrieben mit der Genbank (ohne DMSO) transformiert. Nach dem Hitzeschock wurde das Pellet in 5 ml Selektionsmedium resuspendiert und die Transformationsrate bestimmt. Die restliche Kultur wurde in 100 ml Selektionsmedium aufgenommen und bis zum übernächsten Morgen bei 30 °C inkubiert. Daraufhin wurden zwei Mal 50 ml zentrifugiert, mit jeweils 10 ml Wasser gewaschen und in 50 ml Sporulationsmedium (inkl. 0,1 % Yeast Extract und 0,05 % Dextrose) aufgenommen. Zur Sporulation wurden die Zellen 7 Tage bei 25 °C geschüttelt und unter dem Lichtmikroskop auf das Vorhandensein von Asci überprüft. Dann wurden 5 ml 5 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert und zwei Mal mit je 5 ml Wasser gewaschen. Die Zellen wurden in 5 ml Wasser (inkl. 100 µl Zymolyase 100-T (1 mg/ml in SP-Puffer (2.7.5)) und 10 µl β-ME, steril filtriert) aufgenommen und über Nacht bei 30 °C in einem 50 ml Kolben inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit jeweils 5 ml Wasser wurde das Pellet in 5 ml 1,5 % Nonidet resuspendiert und in

einem 50 ml Falcongefäß 15 Minuten auf Eiswasser abgekühlt. Nach Ultraschallbehandlung (drei Mal je 30 Sekunden, dazwischen auf Eis) wurde 10 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert, das Pellet in 500 µl Wasser resuspendiert und eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) auf Selektionsmedium ausplattiert. Die so erhaltenen Klone wurden abschließend mit den *MATa/α*-Testerstämmen YR320 und YR312 auf einen haploiden Chromosomensatz überprüft (2.6.4).

2.6.3 Vesikeltest

1 ml einer YPD-Übernachtskultur wurde 5 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert, zwei Mal mit 1 ml Wasser gewaschen, in 1 ml 1 %igem Kaliumacetat (inkl. 1,5 mM PMSF) aufgenommen und 3,5 Stunden bei 30 °C geschüttelt. Dann wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop bezüglich dem Auftreten von Vesikeln in der Vakuole untersucht.

2.6.4 Bestimmung des Paarungstyps bei Hefestämmen

Zur Bestimmung des Paarungstyps von Hefestämmen wurden diese kreuzweise mit den Testerstämmen YR312 (*MATa*) bzw. YR320 (*MATα*) auf MV-Platten ohne Supplemente (inkl. 2 % Glucose) ausgestrichen und 3-4 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Testerstämme tragen als einzigen Auxotrophiemarker das seltene Allel *his1*, das in keinem der sonst verwendeten Hefestämme vorkommt. Aus dem Auftreten bzw. Fehlen diploider Stämme konnte auf den Paarungstyp der untersuchten Stämme geschlossen werden.

2.6.5 Isolierung chromosomaler DNA aus Hefe

1,5-2 ml einer YPD-Übernachtskultur wurden 1 Minute bei 13000 Upm zentrifugiert und mit 500 µl Wasser gewaschen. Danach wurden die Zellen in 200 µl Breaking-Puffer (2.6.6) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl einer 1:1 Mischung Phenol/Chloroform (TE-gesättigtes Rotiphenol) und 200 µl Glasperlen wurden die Zellen 4 Minuten mittels eines Vortexers aufgeschlossen. Nach Zugabe von 200 µl Wasser wurde 10 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. 300 µl der oberen Phase wurden mit 1 ml eisgekühltem 100 %igen Ethanol gemischt und 10 Minuten bei -80 °C gelagert. Nach zehnmütigem Zentrifugieren bei 13000 Upm wurde das Pellet in 400 µl Wasser (inkl. 30 µg RNase A) gelöst und mitisolierte RNA 5 Minuten bei 37 °C verdaut. Zur DNA-Fällung wurden 1 ml eisgekühltes 100 %iges Ethanol und 10 µl 3 M Natriumacetat pH 5 zugesetzt, gemischt und 10 Minuten bei -80 °C gelagert. Im Anschluß wurde 10 Minuten bei 13000 Upm abzentrifugiert, das Pellet getrocknet und in 22 µl Wasser gelöst.

2.6.6 Isolierung und Amplifikation von Plasmid-DNA aus Hefe („Plasmid Rescue“)

Nach dieser Methode erhält man relativ unreine DNA mit einem niedrigen Gehalt an Plasmid-DNA. Die Menge ist jedoch ausreichend, um nach Transformation von *E. coli*-Zellen amplifiziert werden zu können.

Zur Isolierung wurde eine stecknadelkopfgroße Menge frisch ausgestrichener Hefezellen in 200 µl Breaking-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl einer 1:1 Mischung Phenol/Chloroform (TE-gesättigtes Rotiphenol) und 200 µl Glasperlen wurden die Zellen 2 Minuten durch Vortexen aufgeschlossen. Anschließend wurde 5 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. 50 µl des Überstands wurden mit 5 µl 3 M Natriumacetat pH 5 und 140 µl eisgekühltem 100 %igen Ethanol versetzt, vorsichtig gemischt und die DNA 25 Minuten bei -80 °C gefällt. Danach wurde 10 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert, das Pellet mit 250 µl eisgekühltem 70 %igen Ethanol

gewaschen, getrocknet und in 30 μ l Wasser aufgenommen. Für die Transformation wurde 1 μ l eingesetzt.

Breaking-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % SDS,
2 % Triton X-100

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

Zur Plasmidisolierung aus *E. coli* haben sich zwei Methoden etabliert: die alkalische Lyse und die „Boiling“-Methode, die sich in der Art des Zellaufschlusses unterscheiden. Für Präparationen in kleinem Maßstab („Mini Prep“) wurde in dieser Arbeit ausschließlich die alkalische Lyse durchgeführt.

1,5 ml einer stationären *E. coli*-Kultur wurden 1 Minute bei 13000 Upm zentrifugiert und in 100 μ l Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μ l Lösung 2 (frisch hergestellt aus einem Teil Lösung 2A und einem Teil 2B) wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden 300 μ l Lösung 3 zugesetzt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluß wurde 10 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert und 350 μ l des Überstands in ein neues Gefäß überführt. Nach Zugabe von 700 μ l eisgekühltem 100 %igen Ethanol wurde die DNA 15 Minuten bei -80 °C gefällt. Es wurde 10 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert und das Pellet mit 700 μ l eisgekühltem 70 %igen Ethanol gewaschen. Die erhaltene DNA wurde getrocknet und in 40-50 μ l Wasser (inkl. 0,1 mg/ml RNase A) aufgenommen. Mitisolierte RNA wurde ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur verdaut.

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

Lösung 2A: 0,4 M NaOH

Lösung 2B: 2 % SDS

Lösung 3: 5 M KOAc pH 4,8

Die Isolierung großer Mengen hochreiner Plasmid-DNA („Large Prep“) aus *E. coli* erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) bzw. dem Nucleobond AX-100 (Macherey-Nagel) nach den Angaben des Herstellers.

2.6.8 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (PCR) können beliebige DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Ein Reaktionszyklus besteht aus drei Schritten: Strangtrennung (bei 94-95 °C), Hybridisierung der Primer (Abhängig von der optimalen „Annealing“-Temperatur der Primer; rechnerisch oder gegebenenfalls experimentell ermittelt) und DNA-Synthese (bei 72 °C).

Die Durchführung erfolgte in einem RoboCycler Gradient 40 (Stratagene) bzw. einem Pharmacia LKB Gene ATAQ Controller mit einem entsprechend gewählten Temperaturprogramm. Ein 50 µl Standardansatz enthielt 0,5-1 µl chromosomale (2.6.5) bzw. Plasmid-DNA (2.6.7) als „Template“, jeweils 0,5-1 µl der Primer (Oligonucleotide von MWG Biotech), 1 µl eines Gemisches aller vier Desoxyribonucleosidtriphosphate (jeweils 10 mM), 5 µl Vent-Puffer und 0,6-1 µl Vent-Polymerase. Zur Optimierung der Reaktionsbedingungen wurden gegebenenfalls 5 µl DMSO bzw. Magnesiumsulfat in unterschiedlichen Konzentrationen zugesetzt. Die DNA-Polymerase wurde nach dem ersten Denaturierungsschritt zupipettiert („hot start“). Die PCR-Produkte wurden über eine Säule (Böhringer bzw. Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.6.9 Isopropanol-/Ethanol-fällung

Die Isopropanolfällung ist eine Möglichkeit, Plasmid-DNA bei Raumtemperatur zu fällen. Hierzu wurde die DNA-haltige Lösung mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und 10 Minuten gefällt. Danach wurde 10 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert, das Pellet mehrere Minuten getrocknet und in dem gewünschten Volumen Wasser aufgenommen.

Für Sequenzierungszwecke wurden 50 µl (Nucleobond AX-100) bzw. 100 µl (QIAprep Spin Miniprep Kit) DNA (2.6.7) mit der 2,5fachen Menge 100 %igem Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5 gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Im Anschluß wurde 30 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert und das Pellet 30-60 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet.

2.6.10 Restriktionsverdau von DNA

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

In einer Standardreaktion wurden 1-5 µl DNA (2.6.7) mit 1-2 Units Restriktionsenzym in einem Volumen von 10-20 µl bei der für das Enzym erforderlichen Temperatur 1,5 bis 2 Stunden inkubiert. Als Puffer wurden die mit dem Enzym mitgelieferten Inkubationspuffer eingesetzt. Das benötigte Puffersystem wurde anhand einer von der Herstellerfirma mitgelieferten Tabelle ermittelt. Doppelverdaus wurden bei den für beide Restriktionsenzyme optimalen Pufferbedingungen durchgeführt. Für präparative Ansätze wurde die 2-5fache Menge der Standardreaktion eingesetzt.

2.6.11 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Diese wurde in einer Flachbett-Elektrophoresekammer (Biorad) in 0,8 %igen Agarose-Gelen mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid durchgeführt. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Es wurden 10-50 µl der Proben mit der entsprechenden Menge 10x DNA-Probenpuffer versetzt und die Fragmente bei 120 V aufgetrennt. Als Längenstandard diente die „x-kb-Leiter“ (Roche). Anschließend wurden die Gele zur Dokumentation unter UV-Licht (302 nm) fotografiert (Dokumentationssystem der Firma MWG-Biotech).

TAE-Puffer: 40 mM Tris/Acetat pH 7,5, 2 mM EDTA
10x DNA-Probenpuffer: 1 M Tris/HCl pH 8, 50 % Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau

2.6.12 Klonierung von Plasmid-DNA

2.6.12.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde der GENE CLEAN II® Kit (Dianova) verwendet. Nach der Elektrophorese (2.6.11) wurde das Gel mit dem entsprechenden Fragment ausgeschnitten und 10 Minuten in 6 M Natriumiodid-Lösung bei 42 °C gelöst. Im Anschluß wurden 5 µl GLASSMILK zugefügt, 10 Minuten auf Eis inkubiert, 10 Sekunden bei 13000 Upm zentrifugiert und die überstehende Lösung entfernt. Der Niederschlag wurde zwei Mal mit je 300 µl NEW WASH-Lösung gewaschen, die gebundene DNA zwei Mal mit je 10 µl Wasser 10 Minuten bei 42 °C eluiert und anschließend direkt weiterverarbeitet (2.6.12.2).

Alternativ wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

2.6.12.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit der Hilfe der T4 DNA-Ligase durchgeführt, die sowohl die Ligation von überhängenden als auch glatten Enden katalysieren kann. In einem 10 µl Ansatz wurden das linearisierte Plasmid (2.6.10) und das DNA-Fragment im Verhältnis von etwa 1:5 eingesetzt. Nach Zugabe von 1 µl 10x Ligasepuffer und 1 U T4 DNA-Ligase (Roche) wurde mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt und über Nacht bei 18 °C ligiert. Vor der Amplifizierung in *E. coli* (2.6.14.4) wurde der Ligationsansatz mit Isopropanol gefällt (2.6.9) und in 5 µl Wasser aufgenommen.

10x Ligasepuffer: 200 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT,
6 mM ATP

2.6.12.3 Gap Repair

Mit Hilfe der „Gap Repair“ Methode kann ein beliebiger Abschnitt des Hefegenoms (z. B. ein mutiertes Gen oder die „getaggte“ Version eines Wildtypgens) in ein Plasmid kloniert werden. Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein von 5´- und 3´-flankierenden Bereichen des zu kopierenden Abschnitts auf einem selbstreplizierenden Vektor.

1 µl Plasmid-DNA („Large Prep“, 2.6.7) wurden mit jeweils 1 µl Restriktionsenzym in 20 µl Gesamtvolumen so verdaut (2.6.10), daß nur noch 5´- und 3´-flankierende Bereiche des Wildtypgens übrig blieben. Nach der Hefetransformation (2.6.14.2) mit dem kompletten Ansatz können die flankierenden, homologen, Bereiche des linearisierten Vektors mit der chromosomalen DNA rekombinieren. Hierbei wird die Lücke („gap“) durch DNA-Synthese geschlossen, als „Template“ dient die chromosomale Genkopie. Die Zellen wurden auf Selektionsmedium ausplattiert und im Anschluß ein „Plasmid Rescue“ (2.6.6) durchgeführt.

2.6.12.4 Subklonierung von Plasmid-DNA

Zur Subklonierung von Plasmiden wurde 6 µl DNA (2.6.7) mit jeweils 1 µl Enzym in einem Gesamtvolumen von 30 µl verdaut (2.6.10). Anschließend wurden die Enden des „Backbones“ mit Klenow-Enzym und dNTPs aufgefüllt. Hierzu wurden 15 µl des Restriktionverdaus 15 Minuten auf 30 °C vorgewärmt und nach Zugabe von 4 µl Wasser, 1 µl dNTPs (jeweils 0,5 mM) und 1 U Klenow-Enzym 20 Minuten bei 30 °C in einem Heizblock inkubiert. Daraufhin wurde die Reaktion durch zehnmütiges Erhitzen auf 75 °C gestoppt. Zur Religation wurden 2 µl 10x Ligasepuffer (2.6.12.2) und 2,5 U T4 DNA-Ligase (Roche) zugesetzt und über Nacht bei 18 °C inkubiert. Vor

der Amplifizierung in *E. coli* (2.6.14.4) wurde der Ligationsansatz mit Isopropanol gefällt (2.6.9) und in 5 µl Wasser aufgenommen.

2.6.13 Southernblot Analyse

Bei einem Southernblot werden chromosomale DNA-Fragmente analysiert. Zuerst wurden 5 µl chromosomale DNA der zu untersuchenden Hefestämme (2.6.5) mit jeweils 1 µl Restriktionsenzym in 20 µl Gesamtvolumen über Nacht verdaut und das erhaltene Gemisch durch eine Agarose-Gelelektrophorese (2.6.11) aufgetrennt. Zum Längenvergleich wurde das Gel unter UV-Licht mit einem Lineal fotografiert.

Im Anschluß wurde die DNA via Kapillarblot-Verfahren auf eine Nylonmembran übertragen. Hierzu wurde das Gel zuerst zwei Mal 8 Minuten mit Acid Nicking-Puffer, dann zwei Mal 15 Minuten mit Denaturierungspuffer und zwei Mal 45 Minuten mit Neutralisierungspuffer behandelt. Dann wurden Filterpapiere GB003 (insgesamt 4 cm hoch) und eine HybondTM-N Nylonmembran auf Größe des Gels zugeschnitten, die Membran und 1/4 der Filter in etwa 500 ml 6x SSC-Puffer getränkt, der Blot zusammengebaut und die DNA über Nacht transferiert. Danach wurde die DNA durch fünfminütiges Bestrahlen mit UV-Licht auf der Nylonmembran fixiert.

Zur Vorhybridisierung wurde die Membran in einer Hybridisierungsröhre 4 Stunden im Drehofen bei 60 °C mit 30 ml Hybridisierungspuffer inkubiert. Dann wurde die Sonden-DNA denaturiert (5 Minuten 100 °C, 5 Minuten auf Eis) und damit die Membran im Drehofen bei 60 °C über Nacht behandelt. Es folgten fünfzehnminütige Waschschrte mit jeweils 200 ml auf 60 °C vorgewärmtem 1x SSC-Puffer/0,1 % SDS und 0,5x SSC-Puffer/0,1 % SDS. Anschließend wurde die Membran in eine sterilisierte Plastikwanne überführt, 5 Minuten mit 200 ml sterilem Diluentpuffer gewaschen und zur Absättigung freier Bindungsstellen 1 Stunde mit ca. 90 ml 10 % (v/v) Liquid-Block (in Diluentpuffer) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrte mit Diluentpuffer wurden 50 ml einer Lösung von Anti-Fluorescin-AP-Konjugat (1:5000) und 0,5 % BSA in Diluentpuffer zur immunologischen Detektion zugesetzt und 1 Stunde inkubiert. Es folgten drei zehninütige Waschschrte mit jeweils 200 ml Diluentpuffer/0,3 % Tween-20. Zur Detektion wurde die Membran 5 Minuten mit 3-4 ml Detection Reagenz behandelt

und die Membran luftdicht in einer Southernfolie verschlossen. Abschließend wurde in einer Filmkassette ein ECL-Film aufgelegt und entwickelt.

Acid Nicking-Puffer:	0,25 M HCl
Denaturierungspuffer:	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Neutralisierungspuffer:	0,5 M Tris/HCl pH 7, 3 M NaCl
20x SSC-Puffer:	0,3 M Natriumcitrat pH 7, 3 M NaCl
Hybridisierungspuffer:	5x SSC-Puffer, 0,1 % SDS, 5 % Detransulfat, 5 % Liquid-Block
Diluentpuffer:	0,1 M Tris/HCl pH 9,5, 0,3 M NaCl

2.6.14 Zelltransformationen

2.6.14.1 Transformation von Hefezellen

Die Transformation von Hefezellen erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode. Hierzu wurde eine streichholzkopfgroße Menge frisch ausgestrichener Zellen von einer Agar-Platte mit 1 ml sterilem Wasser, anschließend mit 1 ml 1x TE/LiOAc gewaschen und in 50 µl 1x TE/LiOAc resuspendiert. Zur Transformation wurde die Zellsuspension mit 5 µl Heringsperma-DNA (SS-DNA) und 2-5 µl Plasmid-DNA (2.6.7) versetzt und nach Zugabe von 300 µl frisch hergestellter 40 %igen PEG-Lösung und 10 % DMSO vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde 30 Minuten bei 30 °C und anschließend weitere 15 Minuten bei 42 °C (Hitzeschock) inkubiert. Die Zellen wurden 4 Minuten bei 3000 Upm abzentrifugiert, in 100 µl Wasser aufgenommen und auf Selektionsmedium ausplattiert.

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

2.6.14.2 Genbanktransformation (bzw. Integration eines DNA-Fragments ins Hefegenom)

Für eine Genbanktransformation (bzw. Integration eines DNA-Fragments ins Genom) wurde eine YPD-Übernachtskultur des Hefestammes mit dem selben Medium auf eine OD_{600} von 0,05-0,1 verdünnt und weitere 3-5 Stunden inkubiert (bis Zellen in log-Phase). 10 ml der Kultur wurden 4 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert, mit 1 ml Wasser, anschließend 1 ml Li-Sorb gewaschen und in 500 μ l Li-Sorb (50 μ l bei Integration) resuspendiert. Die Suspension wurde in 50 μ l Aliquots aufgeteilt, 15 Minuten bei 30 °C inkubiert und wie unter 2.6.14.1 beschrieben mit 10-20 μ l Genbank bzw. Integrationskassette (ohne DMSO) transformiert. Vor dem Ausplattieren wurden die Zellen in 250 μ l YPD-Medium aufgenommen und 1-1,5 Stunden bei 30 °C geschüttelt. Nach dem Zentrifugieren wurde das Pellet in 1 ml Wasser aufgenommen und so ausplattiert, daß etwa 100 Kolonien pro Platte resultierten. Bei einer Integration wurden die Zellen in 150-300 μ l Wasser aufgenommen und komplett auf Selektionsmedium ausplattiert.

Li-Sorb: 1x TE, 1x LiOAc, 1 M Sorbitol

2.6.14.3 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

5 ml einer stationären Vorkultur des Stammes DH5 α bzw. BL21 wurden in 500 ml LB-Medium angeimpft und bei 37 °C etwa 2,5 Stunden bis zu einer OD_{600} von 0,2-0,25 geschüttelt. Die Zellen wurden 30 Minuten auf Eis gekühlt und 10 Minuten bei 4000 Upm (4 °C) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen nacheinander mit 500 ml, 250 ml und 20 ml eisgekühlter 10 %igen Glycerinlösung gewaschen. Die Zellen wurden in 2-4 ml 10 %igem Glycerin aufgenommen und in Aliquots zu je 40 μ l bei -80 °C gelagert.

2.6.14.4 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Elektroporation

Zur Transformation wurden 2 µl eines Ligationsansatzes (2.6.12.2) bzw. 0,5-1 µl Plasmid-DNA (2.6.7) eingesetzt. Die DNA wurde auf die unter Eiskühlung aufgetauten *E. coli*-Zellen pipettiert, gemischt und 1 Minute auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt und die DNA mit einem elektrischen Impuls (Gene Pulser, Biorad: 2,25 kV, 400 Ω, 25 µF) transformiert. Unmittelbar danach wurden die Zellen in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 1-1,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion auf plasmidtragende *E. coli*-Zellen wurde die Suspension auf LB-Platten mit Ampicillin (50-75 mg/l) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.6.14.5 Plasmidverlust bei Hefezellen

Für einen Plasmidverlust wurde eine 10-20 ml Kultur des Stammes in YPD hergestellt und 1-2 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Hefezellen auf einer YPD-Platte auf Einzelkolonien ausgestrichen und durch Replika auf Selektionsmedium auf das Vorhandensein eines Plasmids überprüft. Bei Vektoren mit einem *URA3*-Selektionsmarker wurde zusätzlich das Wachstum auf 5-FOA-Platten überprüft. Zellen, die das *URA3*-Gen exprimieren, sind aufgrund der damit verbundenen Metabolisierung von 5-FOA nicht lebensfähig.

2.7 Biochemische Methoden

2.7.1 Ernte und Zellaufschluß von Hefekulturen

2.7.1.1 Denaturierende alkalische Lyse

Für Westernblot Analysen wurden die Zellen unter den gewünschten Wachstumsbedingungen (2.5.4) angezogen und ein Volumen entnommen, welches einer OD_{600} von 1,5 entsprach. Danach wurde zentrifugiert und das Pellet bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zum Aufschluß wurden die Zellen in 1 ml Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von $150\text{ }\mu\text{l}$ $1,85\text{ M NaOH}/7,5\text{ }\%$ β -ME (frisch hergestellt aus 2 M NaOH und β -ME) erfolgte eine zehnmünütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden $150\text{ }\mu\text{l}$ $50\text{ }\%$ TCA zugesetzt und weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann 10 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde mit $500\text{ }\mu\text{l}$ Aceton gewaschen, etwa 10 Minuten bei $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ getrocknet und ca. 45 Minuten unter Schütteln bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in $50\text{ }\mu\text{l}$ Protein-Probenpuffer gelöst. Vor der Elektrophorese (2.7.2) wurden die Proben 3-4 Minuten auf $97\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt und 1 Minute bei 13000 Upm zentrifugiert. Dem Harnstoff- bzw. Lämmli-puffer wurde vor der Verwendung $1\text{ }\%$ β -ME und $1/10$ Volumen $1\text{ M Tris/HCl pH }8$ zugesetzt.

Harnstoffpuffer: $40\text{ mM Tris/HCl pH }6,8$, 8 M Harnstoff , $0,1\text{ M EDTA}$, $5\text{ }\%$ SDS,
 $0,05\text{ }\%$ Bromphenolblau

2x Lämmli-puffer: $200\text{ mM Tris/HCl pH }6,8$, $20\text{ }\%$ Glycerin, $10\text{ }\%$ SDS,
 $0,2\text{ }\%$ Bromphenolblau

2.7.1.2 Nativer Glasperlenaufschluß und Immunopräzipitation

Die Hefestämme wurden wie unter 2.5.4.1 bzw. 2.5.4.2 beschrieben kultiviert und Proben von je 15 OD₆₀₀ (co-Immunopräzipitation bzw. CIP-Dephosphorylierung) geerntet. Die Zellen wurden 4 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert, mit 1 ml Wasser gewaschen und in 500 µl PBS-Puffer (inkl. CompleteTM, 1,1 mM PMSF und 1 µg/ml Antipain, Pepstatin A, Chymostatin, Leupeptin, Pefabloc) resuspendiert. Bei einer *in vivo* Ubiquitinierung (2.5.4.2) wurden die Zellen nach dem Auftauen und Zentrifugieren (4 °C) in 600 µl Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 300 µl Glasperlen wurden die Proben 5 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluß 20-25 Minuten bei 4 °C auf einem Multivortexer geschüttelt. Nach zwei Zentrifugationsschritten (4 Minuten bei 3000 Upm, dann 5 Minuten bei 13000 Upm) und Überführung des klaren Überstands in ein frisches Gefäß, wurde die gewünschte Menge Antikörper (FBPase: 3 µl, Ha: 4 µl) zur Immunopräzipitation zugesetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Überkopfschüttler vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 50 µl (bzw. 60 µl beim Ubiquitinierungsexperiment) 5 % Protein A SepharoseTM CL-4B (Amersham) wurden die Proben weitere 1-1,5 Stunden auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde 4 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert, die Immunopräzipitate vier bis fünf Mal mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen und in 50 µl Lämmli-puffer (2.7.1.1) aufgenommen. Vor der Elektrophorese (2.7.2) wurden die Proben 5 Minuten auf 97 °C erhitzt und 1 Minute bei 13000 Upm abzentrifugiert. Bei einem Dephosphorylierungsexperiment mit alkalischer Phosphatase (CIP) wurden die Proben nach der Immunopräzipitation in zwei Teile aufgeteilt, das Sepharose-Pellet drei Mal mit PBS-Puffer, ein Mal mit NEBuffer 3 (ohne DTT) gewaschen und in 25 µl NEBuffer 3 aufgenommen. Nach einer einstündigen Inkubation mit 1,25 µl CIP (die zweite Probe zur Kontrolle ohne CIP) bei 37 °C wurden 25 µl 2x Lämmli-puffer zugesetzt.

PBS-Puffer pH 7,4: 137 mM NaCl, 1,25 g/l Na₂HPO₄, 0,35 g/l NaH₂PO₄
NEBuffer 3: 50 mM Tris/HCl pH 7,9, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂,
1 mM DTT

2.7.1.3 Denaturierender Glasperlenaufschluß und Immunopräzipitation

Für Pulse Chase Analysen wurden die Zellen unter den bei 2.5.4.1 beschriebenen Wachstumsbedingungen angezogen, ein Volumen entnommen das einer OD_{600} von 2,5 entsprach und bei -80°C bis zur Aufarbeitung gelagert. Nach dem Auftauen (1-2 Minuten bei 95°C) wurde 15 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert, das Pellet mit 100 μl Aceton gewaschen und in 100 μl BB1-Puffer mit einem Zahnstocher resuspendiert. Nach Zugabe von 100 μl Glasperlen wurden die Zellen durch dreimaliges Schütteln für 5 Minuten auf einem Multivortexer (dazwischen je 1 Minute 95°C) aufgeschlossen. Die Proben wurden anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 900 μl IP-Puffer (inkl. 5 μl 1,1 mM PMSF und Complete™) versetzt und gemischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 Minuten bei 13000 Upm) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und eine Immunopräzipitation (2.7.1.2) durchgeführt. Dann wurde 2 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert, das Sepharose-Pellet drei Mal mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen und in 50 μl 2x Lämmli-puffer (2.7.1.1) aufgenommen. Vor der Elektrophorese (2.7.2) wurden die Proben 10 Minuten auf 95°C erhitzt, 1 Minute bei 13000 Upm zentrifugiert und 15 μl pro Bahn aufgetragen.

BB1-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 6 M Harnstoff, 1 mM EDTA, 1 % SDS

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

2.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in 800 ml SDS-Laufpuffer bei einer Spannung von 150 V durchgeführt. Bei diesem Verfahren können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Pro Bahn wurden 7-20 μl Proteinlösung (2.7.1) aufgetragen.

SDS-Puffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS

Je nach Bedarf wurden 7, 7,5 bzw. 10 %ige Trenngele hergestellt, mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet und 75 Minuten polymerisiert. Dann wurde das Sammelgel gegossen und mindestens 1 Stunde polymerisiert.

	Trenngel			Sammelgel
	7 %	7,5 %	10 %	
Wasser (ml)	5,1	4,85	4,02	6,1
1,5 M Tris/HCl pH 8,8 (ml)	2,5	2,5	2,5	-
0,5 M Tris/HCl pH 6,8 (ml)	-	-	-	2,5
10 % SDS (µl)	100	100	100	100
30 % Acrylamidlösung (ml)	2,3	2,5	3,33	1,3
10 % APS (µl)	100	50	50	50
TEMED (µl)	5	5	5	10

2.7.2.1 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Das SDS-Gel (2.7.2) wurde in einer Glaswanne mit Coomassie-Lösung (0,02 % Coomassie Brilliant Blue G250, 25 % Ethanol, 8 % Essigsäure) überschichtet, vorsichtig in der Mikrowelle erwärmt und 10 Minuten geschüttelt. Danach wurde die Lösung entfernt und das Gel mit Coomassie-Entfärber (5 Teile Methanol, 1 Teil Eisessig, 5 Teile Wasser) gewaschen. Anschließend wurde das Gel auf ein Filterpapier überführt und auf einem Geltrockner mit angeschlossener Vakuumpumpe bei 60 °C getrocknet.

2.7.3 Westernblot

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

Zunächst wurden die Proben (2.7.1) einer SDS-PAGE (2.7.2) unterworfen. Die aufgetrennten Proteine wurden dann in einer Semitrockenblotapparatur auf eine Nitrocellulosemembran („Transfer Membrane“, 0,45 µm) überführt. Dazu wurden pro Polyacrylamid-Gel sechs Blatt Filterpapier GB002 und ein Blatt Nitrocellulose in Blottingpuffer (25 ml 5x Blottingpuffer, 20 ml Methanol, 80 ml Wasser) getränkt und zu einem „Sandwich“ aufgebaut. Netzgeräteeinstellung: 1,5 Stunden und 75 mA pro Gel. Im Anschluß erfolgte die Antikörperdetektion (2.7.3.1).

5x Blottingpuffer: 6,5 g/l Tris, 72 g/l Glycin

2.7.3.1 Immunodetektion von Proteinen mit dem ECL™-System

Mit Hilfe hochspezifischer Antikörper können Proteine detektiert werden. Die vom Antikörper erkannte Gruppe bezeichnet man als Epitop.

Zur Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Nitrocellulosemembran (2.7.3) 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C in Coating-Lösung (10 % Milchpulver in TBS-T) geschwenkt, anschließend zwei Mal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und 20-25 ml des 1. Antikörpers (Anti-FBPase: 1:5000, Anti-Ha: 1:10000, Anti-API: 1:5000 (inkl. 1 % Milchpulver), Anti-FAS: 1:5000, Anti-PGK: 1:5000, Anti-Vid24: 1:500, Anti-Ubiquitin: 1:2000; gelöst in TBS-T) zugegeben. Nach 1 Stunde Inkubation (Ubiquitin-Antikörper über Nacht bei 4 °C) wurde drei Mal 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von Peroxidase-markiertem Ziege Anti-Hase- bzw. Ziege anti-Maus-Antikörper (1:5000 Verdünnung, Ziege Anti-Hase inkl. 1 % Milchpulver). Nach 1 Stunde wurde ein Mal 10 Minuten und vier Mal 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und 1 ml ECL-Lösung (500 µl Lösung 1 und 500 µl Lösung 2) gleichmäßig auf der Membran verteilt. Es wurde 1 Minute inkubiert und anschließend sofort ein lichtempfindlicher Film aufgelegt und entwickelt.

Die Immunodetektion des unter 3.1.1.1 beschriebenen Genbankscreens wurde dahingehend modifiziert, daß die Membranen unmittelbar nach Inkubation mit dem 2. Antikörper gewaschen, gecoatet und nochmals wie oben beschrieben mit 1. und 2. Antikörper behandelt wurden.

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

2.7.4 Glyceringradient

Diese Methode zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen wurde in Anlehnung an Kim et al. durchgeführt. Die Zellen wurden unter den gewünschten Bedingungen angezogen (2.5.4.1), jeweils 25 OD₆₀₀ zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und 3 Minuten bei 3000 Upm zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 1 ml eiskaltem Wasser wurden die Hefezellen in 543 µl eiskaltem 0,1 M Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 7,0 (inkl. CompleteTM, 1,1 mM PMSF und 1 µg/ml Antipain, Pepstatin A, Chymostatin, Leupeptin, Pefabloc) resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Glasperlen wurden die Proben 5 Minuten auf Eis inkubiert und 30 Minuten bei 4 °C auf dem Multivortexer aufgeschlossen. Dann wurde 15 Minuten bei 13000 Upm (4 °C) zentrifugiert. 200 µl des Überstandes wurden abgenommen und vorsichtig auf einen Glyceringradienten (jeweils 450 µl 50 % (unten), 40 %, 30 %, 20 %, 10% (oben) Glycerin in sterilem 20 mM PIPES-Puffer pH 7,0) in einem Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert. Der Gradient wurde danach 4 Stunden in einer Tischultrazentrifuge bei 55000 Upm (15 °C) in einem TLS-55-Rotor (Beckmann Instruments) zentrifugiert. Daraufhin wurden von oben nach unten 10-12 gleich große Fraktionen abgenommen und die Proteine mit 1/10 Volumen 110 %iger TCA gefällt (10 Minuten Eis, anschließend 10 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert). Das Pellet wurde mit 500 µl Aceton gewaschen, getrocknet, in 50 µl Harnstoffpuffer (2.7.1.1) gelöst und eine Immunoblot Analyse durchgeführt (2.7.3).

2.7.5 Indirekte Immunofluoreszenz

Die selektive Bindung eines Antikörpers wird bei einer indirekten Immunofluoreszenz zur Lokalisation eines Proteins innerhalb der Zelle ausgenutzt. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Pringle et al., wobei nur sterile Puffer und Lösungen zum

Ensatz kamen. Um die Bildung fluoreszierender Maillard-Verbindungen auszuschließen ist es ratsam, das Medium steril zu filtrieren.

Die Zellen wurden in der gewünschten Wachstumsphase (2.5.4) geerntet (jeweils 1,5 OD₆₀₀) und fixiert. Hierzu wurden jeweils 125 µl/ml 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 und 37 %ige Formaldehydlösung zugesetzt und mindestens 2 Stunden auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten bei 2000 Upm zentrifugiert, drei Mal mit 1 ml SP-Puffer gewaschen und in 1 ml SPβ-Puffer (inkl. 1,4 µl/ml β-ME) resuspendiert. Nach Zugabe von 15 µl Zymolyase 100-T (1,5 mg/ml in SPβ) wurden die Zellen 30 Minuten bei 30 °C sphäroplastiert, abzentrifugiert (5 Minuten bei 1000 Upm) und ein Mal mit 1 ml SP-Puffer gewaschen. Die Sphäroplasten wurden in 1 ml SP-Puffer aufgenommen und bei 4 °C über Nacht gelagert. Damit die Sphäroplasten bei der Immunfluoreszenz auf einem Objektträger haften können, wurden die Vertiefungen mit Poly-L-Lysin (6 mg/ml) beschichtet. Dann wurden jeweils 30 µl der Proben aufgetragen und 5-30 Minuten inkubiert. Die gebundenen Zellen wurden daraufhin drei Mal mit 20 µl PBS-Puffer gewaschen und 20-30 Minuten mit 20 µl PBT-Puffer (PBS-Puffer inkl. 1% BSA und NonidetP40) behandelt. Dann wurden je 15 µl Ha-Antikörper (1:200 in PBT) zugegeben und 2 Stunden in einer „feuchten Kammer“ inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit je 20 µl PBT-Puffer wurde der 2. Antikörper (pro Probe 15 µl Cy3-gekoppelter Ziege Anti-Maus, 1:1000 in PBT) zugesetzt und weitere 1,5 Stunden im dunkeln in einer „feuchten Kammer“ behandelt. Abschließend wurde nochmals fünf Mal mit 20 µl PBS-Puffer gewaschen, jeweils ein Tropfen Citifluor/DAPI aufgetragen, der Objektträger mit einem Deckglas bedeckt und mit Nagellack fixiert. Die „gelabelten“ Zellen konnten nun unter dem Mikroskop untersucht werden. Der Farbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) diente zur Markierung des Zellkerns.

SP-Puffer: 0,1 M K₂HPO₄ pH 6,5, 1,2 M Sorbitol

PBS-Puffer pH 7,4: 53 mM Na₂HPO₄, 13 mM NaH₂PO₄, 75 mM NaCl

2.7.6 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus *E. coli*

Die Zellen wurden wie unter 2.5.3.1 beschrieben angezogen, 10 Minuten bei 8000 Upm (4 °C) abzentrifugiert, in 10 ml gekühltem PBS-Puffer resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Nach Zugabe von 500 µl 20 % Triton X-100 wurde das Lysat 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Überkopfschüttler geschwenkt. Dann wurde 10 Minuten bei 10000 Upm (4 °C) zentrifugiert, dem Überstand 250 µl 50 % Glutathion Sepharose 4B zugesetzt und 30 Minuten auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde 5 Minuten bei 500xg zentrifugiert und das Pellet drei Mal mit 1 ml PBS-Puffer gewaschen.

PBS-Puffer pH 7,3: 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,42 g/l Na₂HPO₄,
 0,25 g/l KH₂PO₄

2.7.6.1 Antigenisolierung zur Herstellung eines FBPase-Antikörpers

Für die Detektion der FBPase ist es notwendig, einen spezifischen Antikörper zu besitzen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich ein von der Entian-Gruppe (Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt) hergestellter FBPase-Antikörper verwendet. Da dieser jedoch in absehbarer Zeit aufgebraucht ist, sollte ein Antiserum gegen die FBPase gewonnen werden.

Die Isolierung des Antigens erfolgte aus dem bakteriellen Lysat des Stammes BL21, der zuvor mit dem *GST-FBP1*-Expressionsvektor pJR13 (2.4.3.3.3) transformiert (2.6.14.4) worden war. Für die Proteinaufreinigung wurden insgesamt zwei 200 ml Kulturen angesetzt (2.7.6). Zur Abspaltung des Antigens (FBPase) von der Glutathion S-Transferase erfolgte ein Thrombin-Verdau in einem Gesamtvolumen von 250 µl pro Säule. Diese wurde ca. 20 Stunden auf einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur mit Thrombin inkubiert, der Überstand mit 4x Lämmli-puffer versetzt und eine SDS-PAGE (2.7.2) durchgeführt. Die 38 kDa Bande der FBPase wurde aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und zur Immunisierung eines Kaninchens

an EUROGENTEC (Belgien) geschickt. Mit dem „large taking of blood“ konnte die FBPase in einem Westernblot (2.5.4.1, 2.7.3) detektiert werden (Abb. 6). Die anschließende Aufreinigung wurde von Jeannette Juretschke im Rahmen ihrer Diplomarbeit vorgenommen.

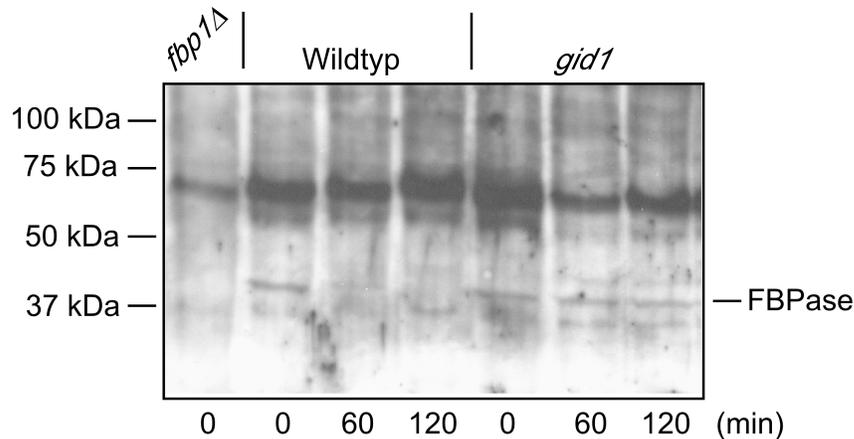


Abb. 6: Immunoblot Analyse zur Untersuchung der von EUROGENTEC (Belgien) gelieferten FBPase-Antisera. Es wurden Rohextrakte von ethanoldereprimierten ($t = 0$ min) Hefestämmen (*fbp1Δ*: keine FBPase exprimiert, *gid1*: FBPase-Proteolyse blockiert) und von verschiedenen Zeitpunkten nach Glucosegabe hergestellt, auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und angefärbt. Hier dargestellt ist eine 1:500 Verdünnung der Charge 28/09/00 GP. Mit den anderen Chargen konnte keine FBPase (38 kDa) detektiert werden.

2.7.7 *In situ* Aktivitätstests der peptidspaltenden Aktivitäten des Proteasoms auf Agar-Platten („Overlaytests“)

2.7.7.1 Nachweis der PGPH-Aktivität

Die zu untersuchenden Hefestämme wurden dünn auf einer YPD-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Parallel dazu wurde ein steriler Rundfilter auf eine frisch hergestellte YPD-Platte gelegt (Aufsaugen der Flüssigkeit), auf den die Zellen anschließend replikaplatziert wurden. Zum Anwachsen der

Kolonien wurde erneut über Nacht inkubiert. Der Filter wurde in einer Glasagar-Platte mit 2-3 Tropfen Agarose fixiert und zur Permeabilisierung der Zellen für 15 Minuten mit 10 ml Chloroform überschichtet. Nach dem Trocknen wurden die permeabilisierten Stämme mit aufgeschmolzenem (60 °C) Tris/Agar (99 mg Agar in 9,9 ml 0,1 M Tris/HCl pH 8) überschichtet und auf 45 °C abgekühlt. Dann wurden 100 µl Substratlösung (50 mM S53 (Cbz-Leu-Leu-Glu-β-NA) in DMSO) zugegeben und 3,5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Zum Anfärben wurde der Filter mit 10 ml Kopplungsreagenz (100 µl Fast Garnet GBC (50 mg/ml in DMSO) in 9,9 ml Kopplungspuffer) überschichtet. Nach 6-7 Minuten wurde die Lösung entfernt. Bei vorhandener PGPH-Aktivität tritt eine deutliche Orangefärbung auf (Hilt et al., 1993). Diese peptidspaltende Aktivität fehlt einer *pre3*-Mutante.

Kopplungspuffer: 0,2 M Natriumcitrat pH 4,4, 4 % Tween-20

2.7.7.2 Nachweis der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität

Die Durchführung erfolgte analog zu 2.7.7.1. Nach dem Trocknen wurden die Stämme mit aufgeschmolzenem (60 °C) Tris/Agar (97 mg Agar in 9,7 ml 50 mM Tris/HCl pH 8) überschichtet und auf 45 °C abgekühlt. Als Substrat wurden 300 µl S12 (Cbz-Gly-Gly-Leu-p-NA, 50 mM in DMSO) eingesetzt. Die Anfärbung der Kolonien erfolgte durch Azokupplung des abgespaltenen p-Nitroanilins mit Naphtylethylendiamin. Hierzu wurde der Filter jeweils 5 Minuten mit 10 ml 0,1 % Natriumnitrit (in 1 M HCl), 10 ml 0,5 % Ammoniumsulfamat (in 1 M HCl) und abschließend mit 10 ml 0,05 % Naphtylethylendiamin (in 47 % Ethanol) behandelt. Nach wenigen Sekunden lieferte die Reaktion eine Violettfärbung (Heinemeyer et al., 1991), die bei einer *pre2*-Mutante jedoch ausbleibt.

2.7.7.3 Nachweis der Trypsin-ähnlichen Aktivität

Die zu testenden Stämme wurden wie unter 2.7.7.1 beschrieben angezogen. Anschließend wurde ein frischer Rundfilter in einer Glasagar-Platte mit 3 ml Permeabilisierungslösung versetzt, der Filter mit den angewachsenen Zellen aufgelegt und 20 Minuten inkubiert. Nach dem Trocknen wurden die Stämme mit aufgeschmolzenem (60 °C) Tris/Agar (99 mg Agar in 9,9 ml 50 mM Tris/HCl pH 9,3 (inkl. 0,5 mM EDTA/EGTA)) überschichtet und auf 45 °C abgekühlt. Dann wurden 100 µl Substratlösung (S54 (Cbz-Ala-Arg-Arg-β-MoNA), 50 mM in DMSO) zugegeben und 5 Stunden bei 50 °C inkubiert. Zum Anfärben wurde der Filter mit 10 ml des unter 2.7.7.1 beschriebenen Kopplungsreagenz übersichtet. Nach etwa 8 Minuten wurde die Lösung entfernt. Bei einer vorhandenen Trypsin-ähnlichen Aktivität (fehlt einer *pup1*-Mutante) tritt eine Rot/Orangefärbung auf.

Permeabilisierungslösung: 50 mM Tris/HCl pH 9,3, 0,5 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1 % Toluol, 4 % Ethanol

3 Ergebnisse

Das gluconeogenetische Schlüsselenzym Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) wird exprimiert, wenn Hefezellen auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle angezogen werden. Nach Glucosegabe zu dereprimierten Zellen wird die Neusynthese sofort eingestellt und die enzymatische Aktivität auf etwa die Hälfte reduziert. Dem folgt der irreversible proteolytische Abbau mit einer Halbwertszeit von 20 bis 30 Minuten (Funayama et al., 1980; Müller und Holzer, 1981; Mazon et al., 1982; Schork et al., 1995). Dieser Prozeß wird als Katabolitinaktivierung bezeichnet und ist einer der zentralen Schritte im Kohlenhydratstoffwechsel (Gancedo, 1971; Holzer, 1976).

Der Abbauort bzw. -mechanismus der FBPase ist seit längerer Zeit Gegenstand zahlreicher Untersuchungen und kontroverser Diskussionen (Schork et al., 1994a,b). Während die Daten von unserem Labor eine vom Ubiquitin-Proteasomsystem vermittelte Hydrolyse des Enzyms nahe legen (Schork et al., 1994a,b; Schork et al., 1995; Hämmerle et al., 1998; Schüle et al., 2000), beschrieb eine amerikanische Arbeitsgruppe bisher ein davon unabhängiges Modell, bei dem die FBPase zunächst in Vesikel eingeschlossen, zur Vakuole transportiert und dort Proteinase yscA-abhängig degradiert wird (Chiang und Schekman, 1991; Huang und Chiang, 1997; Chiang und Chiang, 1998). Interessanterweise wurde der von uns gefundene Ubiquitin-Proteasom-katalysierte Abbau der FBPase von Hui-Ling Chiang (Department of Cellular and Molecular Physiology Hershey, USA) kürzlich bestätigt (Hung et al., 2004). Eine mögliche Erklärung für die teilweise sehr widersprüchlichen Resultate könnten die unterschiedlich langen FBPase-Derepressionszeiten sein, so daß die Zelle in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen (kurze/lange Derepressionzeiten) unterschiedliche Mechanismen zum Abbau des Enzyms verwendet. Allerdings ist es sehr wahrscheinlich, daß unter den von der Chiang-Arbeitsgruppe gewählten Reaktionsbedingungen (Derepressionzeiten ≥ 48 Stunden) unspezifische und überlappende Programme wie beispielsweise die Autophagozytose aktiviert werden, was zu einem erhöhten, aber nicht selektiven, Gesamtproteinabbau in der Vakuole führt. Bei den von uns verwendeten

Induktionszeiten von 5 bis 16 Stunden bei Westernblot und Pulse Chase Analysen (2.5.4.1) kann von einer selektiven, proteasomalen, FBPase-Proteolyse ausgegangen werden.

Um weitere Informationen über die Katabolitinaktivierungsmaschinerie zu erhalten, wurden in einer früheren Arbeit durch EMS-Mutagenese Mutanten mit einem Defekt im FBPase-Abbau erzeugt (Hämmerle et al., 1998). Die dabei isolierten *gid*-Mutanten („glucose-induced degradation deficient“) gehören drei Komplementationsgruppen (*gid1*, *gid2* und *gid3*) an. Nachdem Thomas Schüle im Rahmen seiner Doktorarbeit mit Hilfe eines Kolonie-Immunoblot Screens (Schüle et al., 2000; Schüle, Dissertation 2000) das *GID2*- und *GID3*-Gen identifizieren konnte, bestand meine Aufgabe darin, die *gid1*-Punktmutante zu komplementieren und das Genprodukt näher zu charakterisieren. Außerdem sollte in einem genomweiten Ansatz nach weiteren für die proteasomale FBPase-Degradation essentiellen *GID*-Genen gesucht werden.

3.1 Identifizierung neuer, für den Ubiquitin-Proteasom-katalysierten Abbau der FBPase benötigter Gene

3.1.1 Komplementation der *gid1*-Mutante WAY.5-4A/D1

3.1.1.1 Genbankscreen

Die Identifizierung mutierter Gene kann in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* leicht durch Komplementation des Mutantenphänotyps mit Hilfe einer Hefegenbank durchgeführt werden. Die Klonierung des *GID1*-Gens wurde in Anlehnung an den von Thomas Schüle in seiner Doktorarbeit beschriebenen Kolonie-Immunoblot Screen vorgenommen.

Zunächst wurde die *gid1*-Mutante WAY.5-4A/D1 mit der YCp50-Genbank (2.4.3.4) transformiert und die Transformanten auf CM-Platten ohne Uracil mit Glucose als

Kohlenstoffquelle selektioniert. Zur Derepression der FBPase erfolgte eine Replikplattierung auf CM-Platten ohne Uracil mit Ethanol als Kohlenstoffquelle; als Kontrolle wurde zusätzlich ein isogener Wildtypstamm (WAY.5-4A) aufgetragen. Die Zellen wurden ca. 30 Stunden bei 30 °C inkubiert und die Transformanten anschließend auf ihr Abbauverhalten der FBPase im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Hierzu erfolgte eine Replika auf eine Nitrocellulosemembran, die 2,5 Stunden auf einem mit YPD-Medium gesättigten Rundfilter inkubiert wurde. Die Zellen wurden daraufhin sofort lysiert, die Zelltrümmer abgewaschen und das antigene Material mit spezifischem FBPase-Antikörper detektiert. Nichtkomplementierte Kolonien erscheinen wegen des blockierten FBPase-Abbaus und der damit verbundenen erhöhten FBPase-Konzentration dunkel. Im Gegensatz dazu sind Wildtypzellen und Klone, die ein komplementierendes Plasmid tragen, deutlich heller. In diesen Zellen ist die Menge des Enzyms aufgrund der ungestörten Proteolyse wesentlich niedriger.

Unter ca. 10000 Transformanten konnte ein komplementierter Klon identifiziert werden (Abb. 7A). Dieser wurde isoliert und die Kinetik der FBPase-Hydrolyse im Vergleich zum Wildtyp mit Hilfe einer Immunoblot Analyse untersucht (Abb. 7B). Dadurch konnte das Ergebnis des Kolonie-Immunoblot Screens bestätigt werden.

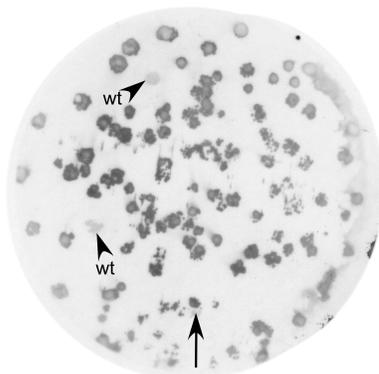


Abb. 7A: Kolonie-Immunoblot Screen zur Identifizierung des *GID1*-Gens durch Komplementation des *gid1*-Mutantenphänotyps mit einer Hefegenbank. Das antigene Material wurde mit spezifischem FBPase-Antikörper detektiert. Die Kolonien des Wildtyps (wt) und des komplementierten Klons (Pfeil) sind 2,5 h nach Glucosegabe zu ethanoldereprimierten Zellen aufgrund der ungestörten FBPase-Degradation deutlich heller als die Kolonien einer nichtkomplementierten *gid1*-Mutante.

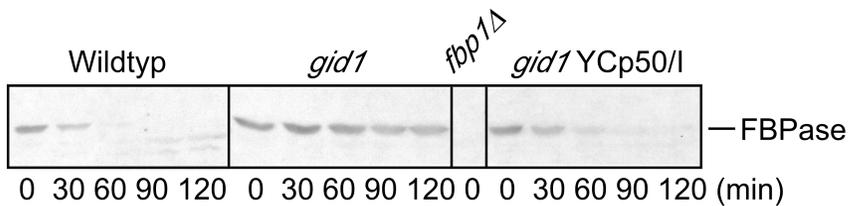


Abb. 7B: Kinetik des FBPase-Abbaus im isolierten Genbankklon *gid1* [YCp50/I] im Vergleich zum Wildtyp (WAY.5-4A) und einer nichtkomplementierten *gid1*-Mutante (WAY.5-4A/D1).

Um zu überprüfen, ob die Komplementation bei der *gid1*-Mutante WAY.5-4A/D1 durch das Genbankplasmid YCp50/I bzw. einen davon unabhängigen Effekt begründet ist, wurde ein Plasmidverlust durchgeführt. Nach Plasmidverlust konnte wieder der *gid1*-Mutantenphänotyp (blockierter FBPase-Abbau) beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Das über einen „Plasmid Rescue“ isolierte Genbankplasmid wurde in die *gid1*-Punktmutante WAY.5-4A/D1 retransformiert und die Kinetik der FBPase-Degradation in einem Westernblot untersucht. Der Abbau war in den retransformierten *gid1*-Zellen mit dem des Wildtypstammes vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Folglich handelt es sich um eine plasmidabhängige Komplementation. Das Genbankplasmid YCp50/I erhielt die Bezeichnung pJR14 (2.4.3.4.1).

3.1.1.2 Charakterisierung des Genbankplasmids YCp50/I (pJR14)

Zur weiteren Charakterisierung des Genbankplasmids pJR14 (3.1.1.1) wurde das sich in der *Bam*HI-Schnittstelle befindende Insert von beiden Seiten ansequenziert (MWG Biotech AG, Ebersberg). Die erhaltene Sequenz wurde mit der Datenbank der Hefe *S. cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org>) verglichen. Der Sequenzvergleich ergab eine 100 %ige Übereinstimmung mit einem 27,3 kbp großen DNA-Abschnitt zwischen den Positionen 54121 und 81444 auf Chromosom VII (2.4.3.4.1). Dieser Bereich beinhaltet 15 vollständige Gene: *YGL235w*, *ADE5,7*, *SEC15*, *YGL232w*, *YGL231c*, *YGL230c*, *SAP4*, *SHE10*, *VID30*, *OST5*, *YGL226w*, *VRG4*, *SDT1*, *COG1* und *EDC1*. Aufgrund der Größe des Inserts wurde auf eine zeitaufwendige Subklonierung verzichtet.

Bei einer dieser Komponenten handelte es sich um das Gen *VID30* (*YGL227w*). Laut eines Datenbankeintrags in der „*Saccharomyces* Genome Database“ wird Vid30p für den Import der FBPase in Vid-Vesikel benötigt (Daten bisher nicht publiziert). Es lag somit die Vermutung nahe, daß dieser Genabschnitt für die Komplementation der *gid1*-Punktmutante verantwortlich ist. Um dies zu überprüfen wurde eine *ygl227w*-Deletionsmutante (Y14594) bei EUROSCARF (Frankfurt) bestellt und mit der *gid1*-Punktmutante WAY.5-4A/D1 sowie dem isogenen Wildtypstamm WAY.5-4A gekreuzt. In den dabei erhaltenen diploiden Stämmen YJR10 (*ygl227wΔ* x *gid1*) und YJR11 (*ygl227wΔ* x Wildtyp) wurde die Kinetik der FBPase-Proteolyse in einer Immunoblot Analyse untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 8 dargestellt.

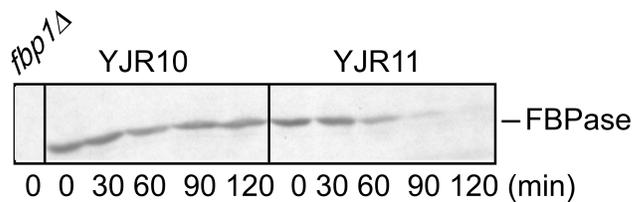


Abb. 8: Westernblot Analyse der durch Kreuzung hergestellten diploiden Stämme YJR10 (*ygl227wΔ* x *gid1*) und YJR11 (*ygl227wΔ* x Wildtyp).

Diploide Zellen, die durch Kreuzung von der *gid1*-Mutante WAY.5-4A/D1 und dem *ygl227w*-Deletionsstamm Y14594 entstanden waren (YJR10), zeigten wie die beiden haploiden Ausgangsstämme einen blockierten FBPase-Abbau (Abb. 8). Bei YJR11 konnte dagegen keine Beeinträchtigung in der Katabolitdegradation festgestellt werden. Damit war eindeutig bewiesen, daß der Genlocus des Mutantenallels dem Gen *YGL227w* entspricht.

3.1.1.3 Komplementation der *gid1*-Mutante WAY.5-4A/D1 mit dem Plasmid pAE8-1

Als zusätzliche Kontrolle sollte der *gid1*-Mutantenphänotyp (blockierter FBPase-Abbau) mit dem *YGL227w*-Überexpressionsplasmid pAE8-1 (2.4.3.8.1)

komplementiert werden. Hierzu wurde der Stamm WAY.5-4A/D1 mit pAE8-1 und zum Vergleich mit dem Ausgangsvektor ohne Insert (YEplac195) transformiert und die Kinetik der FBPase-Proteolyse in einem Westernblot untersucht (Abb. 9). Die Expressionsvektoren wurden von Michael N. Hall (Biozentrum Universität Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

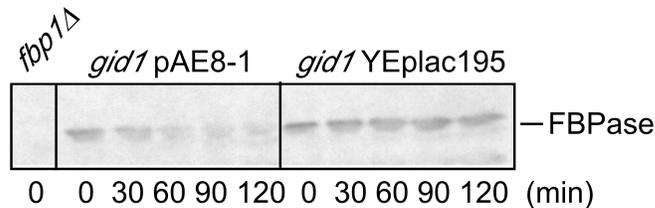


Abb. 9: Komplementation des *gid1*-Mutantenphänotyps mit dem *YGL227w*-Überexpressionsplasmid pAE8-1. Die Transformanten wurden unter Standardbedingungen angezogen und die Kinetik der FBPase-Hydrolyse nach Umsetzen in glucosehaltiges Medium verfolgt. Zum Vergleich wurde der Abbau in einer mit dem Ausgangsvektor YEplac195 transformierten *gid1*-Mutante (WAY.5-4A/D1) untersucht.

Erwartungsgemäß hatte die Überexpression von *YGL227w* die Komplementation des *gid1*-Mutantenphänotyps zur Folge (Abb. 9).

3.1.1.4 Pulse Chase Analyse mit einem *gid1*-Deletionsstamm

Um den Defekt im FBPase-Abbau zu quantifizieren wurde mit der *gid1Δ*-Mutante AE7-6c und dem isogenen Wildtyp (JK9-3da) eine Pulse Chase Analyse durchgeführt (Abb. 10A,B). Die Hefestämme wurden von Michael N. Hall (Biozentrum Universität Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Die Stämme JK9-3da und AE7-6c wurden während der Derepression der FBPase mit ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert (Pulse) und anschließend zur Inaktivierung des Enzyms auf nichtradioaktives, glucosehaltiges Medium umgesetzt (Chase). Daraufhin wurden zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen und die FBPase nach dem Zellaufschluß mit FBPase-Antikörper immunopräzipitiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der erhaltenen Präzipitate (Abb. 10A), wurde der

FBPase-Abbau durch Detektion des radioaktiv markierten Proteins mit einem Phosphorimager (Molecular Dynamics) quantifiziert (Abb. 10B).

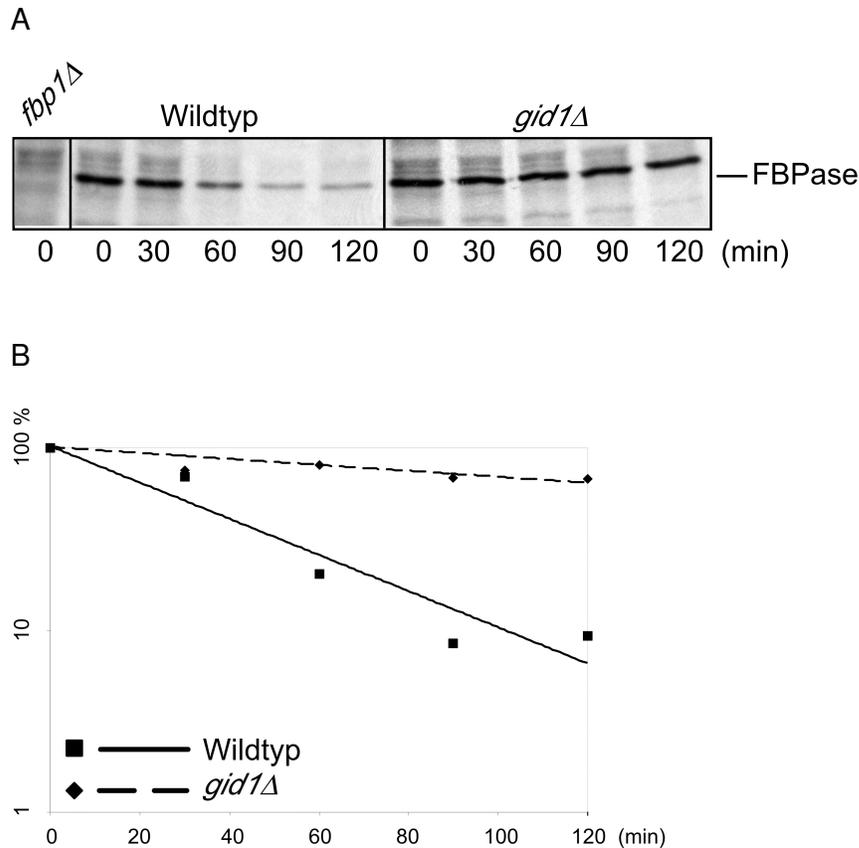


Abb. 10: Pulse Chase Analyse der glucoseinduzierten Katabolitdegradation der FBPase mit dem *gid1*-Deletionsstamm AE7-6c und dem isogenen Wildtyp (JK9-3da) (10A). Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase nach Glucosegabe zu ethanoldereprimierten Zellen (10B).

Während im Wildtypstamm die FBPase mit einer Halbwertszeit von 25-30 Minuten degradiert wurde, zeigte die *gid1*-Deletionsmutante AE7-6c einen vollständig blockierten FBPase-Abbau (Halbwertszeit 3-3,5 Stunden) (Abb. 10A,B). Aufgrund der drastischen Stabilisierung muß für das Protein Gid1p eine bedeutende Rolle bei der Katabolitinaktivierung der FBPase angenommen werden. Zur weiteren Charakterisierung von Gid1p siehe Kapitel 3.2.

3.1.2 Genomweiter Mutantenscreen mit Hilfe der EUROSCARF-Kollektion

Aufgrund der Nichtverfügbarkeit weiterer Punktmutanten wurde ein genomweiter Screen zur Isolierung von FBPase-proteolysedefekten *gid*-Mutanten durchgeführt. Das Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besteht aus etwas mehr als 6000 Genen. Ca. 85 % der Hefegene sind nichtessentiell und können deletiert werden. Dank des „Hefe-Genomprojekts“ sind diese Deletionsmutanten inzwischen kommerziell erhältlich (EUROSCARF, Frankfurt) und standen somit für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

3.1.2.1 Isolierung von Deletionsmutanten mit einem Defekt im FBPase-Abbau

Zuerst wurde der in 3.1.1.1 beschriebene Kolonie-Immunoblot Screen so modifiziert, daß die gesamte EUROSCARF-Kollektion schnell und effektiv nach Nullmutanten mit einem Defekt in der FBPase-Hydrolyse durchsucht werden konnte. Der Vorteil gegenüber dem eingangs beschriebenen Genbankscreen bestand darin, daß keine zeitaufwendige Komplementation vorgenommen werden mußte und sofort Rückschlüsse auf das identifizierte Gen/Protein (deletierter ORF = Gen) möglich war. Essentielle Hefegene waren über dieses Verfahren jedoch nicht zugänglich.

Die in „96-well“-Mikrotiterplatten gelieferten EUROSCARF-Deletionsmutanten wurden zunächst 5,5 Stunden bei 30 °C in YPD-Flüssigmedium geschüttelt. Zur FBPase-Derepression wurden die Zellen anschließend auf YPEtOH-Platten getropft und ein Tag bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle/Vergleich wurde ein BY4743-Wildtypstamm und eine *gid1Δ*-Mutante (Y34594) aufgetragen. Anschließend wurden die Zellen auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und weitere 2,5 Stunden auf einem mit YPD-Medium gesättigten Filter inkubiert. Nach der Zelllyse konnte das antigene Material mit einem spezifischen FBPase-Antikörper detektiert werden. Während man für Mutanten mit einem Defekt im FBPase-Abbau dunkle Kolonien erwartet, sollten die Kolonien des Wildtyps und von Mutanten mit ungestörter Katabolitdegradation wesentlich heller erscheinen (Abb. 11).

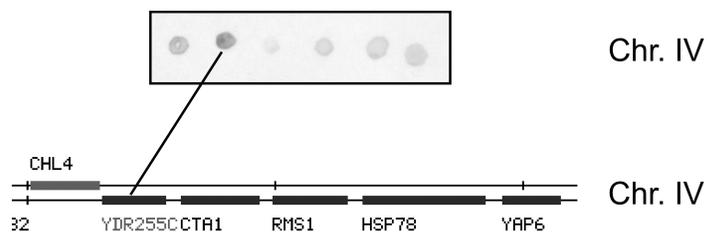


Abb. 11: Genomweiter Kolonie-Immunoblot Screen (Ausschnitt von Chromosom IV) zur Identifizierung von Deletionsmutanten mit einem Defekt im FBPase-Abbau. Das antigene Material wurde mit spezifischem FBPase-Antikörper 2,5 h nach Glucosegabe zu ethanoldereprimierten Zellen detektiert. Die Kolonien von Mutanten mit gestörter FBPase-Proteolyse erscheinen aufgrund der hohen Enzymmenge vergleichsweise dunkel (zweite Kolonie von links).

Mit diesem Verfahren konnten mehr als 100 potentielle Kandidaten isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Als nächstes erfolgte eine Auswertung mit Hilfe von Datenbankvergleichen („*Saccharomyces* Genome Database“ und „YPD™ *Saccharomyces cerevisiae*“). Mutanten, bei denen das Fehlen des Gens/Proteins keine direkte Beteiligung bei der FBPase-Degradation vermuten ließen (z. B. Mutanten mit einem Defekt in der Funktion des Mitochondriums), wurden aussortiert. Die anschließenden Westernblot und Pulse Chase Analysen zur Messung der Abbaukinetiken sind in den Folgekapiteln beschrieben. Da es sehr wahrscheinlich war, daß bei einem genomweiten Ansatz FBPase-abbaudefiziente Mutanten übersehen werden, wurde nach dessen Beendigung ein „Nachscreen“ auf Grundlage von Literaturrecherchen durchgeführt.

3.1.2.2 Westernblot und Pulse Chase Analysen mit den Deletionsstämmen *gid1*Δ bis *gid8*Δ

Erwartungsgemäß konnten bei diesem genomweiten Mutantenscreen (3.1.2.1) die bereits bekannten *gid*-Deletionsmutanten *gid1*Δ (3.1.1), *gid2*Δ und *gid3*Δ (Schüle, Dissertation 2000) gefunden werden. Außerdem wurden zunächst fünf weitere Gene/Proteine identifiziert, deren Fehlen mit einem stark verzögerten FBPase-Abbau verbunden sind. Die Deletionsstämme erhielten die Bezeichnungen *gid4*Δ bis *gid8*Δ. Die Ergebnisse der Immunoblot Analysen sind in Abb. 12 und Tab. 1 zusammengefaßt.

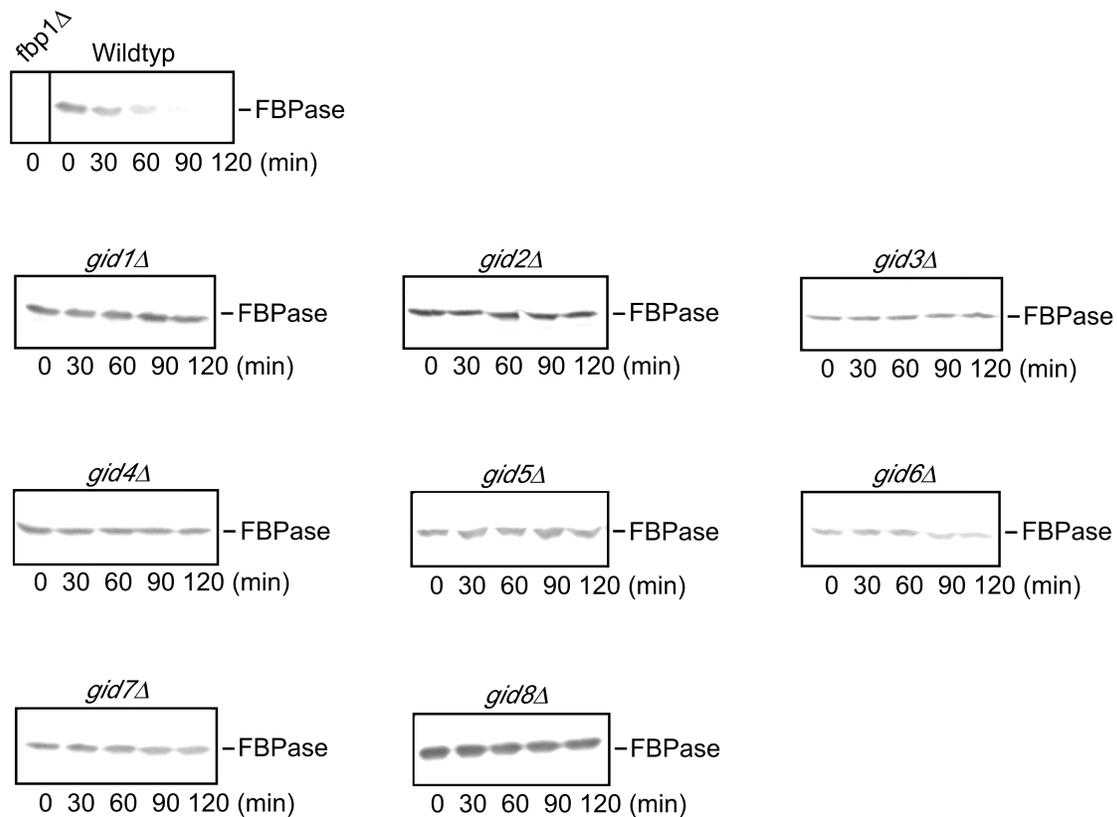


Abb. 12: Westernblot Analysen mit den Deletionsstämmen *gid1Δ* bis *gid8Δ* (vgl. Tab. 1) und dem isogenen Wildtyp (BY4743). Die Zellen wurden unter Standardbedingungen angezogen und die Kinetik der FBPase-Hydrolyse nach Umsetzen in glucosehaltiges Medium gemessen.

	ORF	Standard-Name
<i>GID1</i>	<i>YGL227w</i>	<i>VID30</i>
<i>GID2</i>	<i>YDR255c</i>	<i>RMD5</i>
<i>GID3</i>	<i>YEL012w</i>	<i>UBC8</i>
<i>GID4</i>	<i>YBR105c</i>	<i>VID24</i>
<i>GID5</i>	<i>YIL017c</i>	<i>VID28</i>
<i>GID6</i>	<i>YBR058c</i>	<i>UBP14</i>
<i>GID7</i>	<i>YCL039w</i>	<i>GID7</i>
<i>GID8</i>	<i>YMR135c</i>	<i>GID8</i>

Tab. 1: *GID*-Gene: Essentielle Komponenten der proteasomalen Katabolitinaktivierung der FBPase.

Da bei den Mutanten *gid4* Δ bis *gid8* Δ eine Beeinträchtigung der FBPase-Repression (bei ungestörter Katabolitdegradation) - die in einem Westernblot einen verzögerten FBPase-Abbau vortäuschen könnte - nicht auszuschließen war, wurde in Zusammenarbeit mit Frank Josupeit eine Quantifizierung durch Pulse Chase Messungen durchgeführt. Die Deletionsstämme und der isogene Wildtyp wurden während der Derepression der FBPase mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert (Pulse) und anschließend zur Inaktivierung des Enzyms auf nichtradioaktives, glucosehaltiges Medium umgesetzt (Chase). Daraufhin wurden zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen und die FBPase nach dem Zellaufschluß immunopräzipitiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Präzipitate wurde der FBPase-Abbau durch Detektion des radioaktiv markierten Proteins mit einem Phosphoimager (Molecular Dynamics) quantifiziert.

Die Quantifizierung von *gid4* Δ /*vid24* Δ und *gid6* Δ /*ubp14* Δ wurde von Frank Josupeit durchgeführt. Die Ergebnisse sind in seiner Doktorarbeit ausführlich beschrieben (Josupeit, Dissertation 2003). Während für *gid4* Δ ein vollständig retardierter FBPase-Abbau beobachtet werden konnte, war die Katabolitdegradation bei *GID6*-deletierten Zellen im Vergleich zum Wildtyp etwa dreifach verzögert. Bei der *gid7* Δ - (Y33446) und *gid8* Δ - (Y36576) Mutante konnte eine vollständig blockierte FBPase-Proteolyse nachgewiesen werden (Abb. 13A,B).

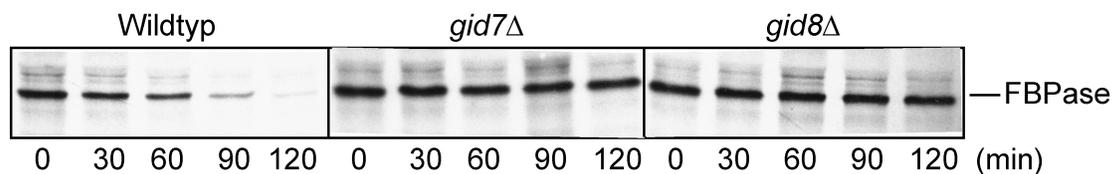


Abb. 13A: Pulse Chase Analyse der Katabolitdegradation der FBPase mit den Deletionsstämmen *gid7* Δ (Y33446) und *gid8* Δ (Y36576) sowie dem isogenen Wildtyp (BY4743).

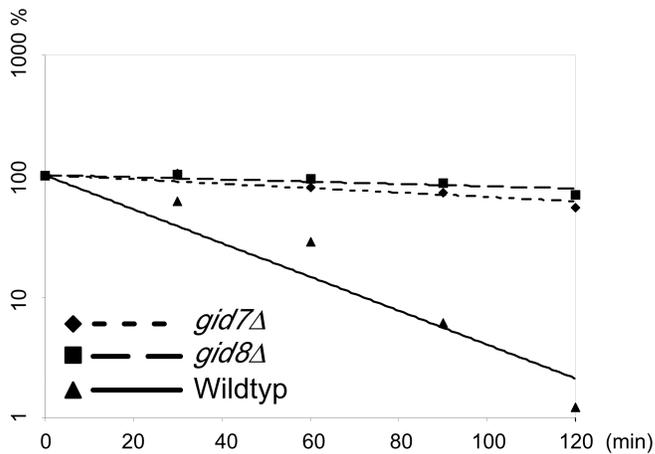


Abb. 13B: Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase nach Glucosegabe zu ethanoldereprimierten *gid7*Δ- bzw. *gid8*Δ-Zellen.

Bei der Analyse der *gid5*Δ/*vid28*Δ-Mutante Y31410 traten experimentelle Schwierigkeiten auf. Bei Verwendung des Standardprotokolls befand sich die Konzentration der radioaktiv markierten FBPase unter der Nachweisgrenze. Nach mehreren Optimierungsversuchen wurde die Einbauzeit des ³⁵S-Methionins schließlich von 3,5 auf 16 Stunden ausgedehnt. Diese Bedingungen führten zwar in den BY4743-Wildtypzellen zu einer leicht verzögerten Kinetik der FBPase-Degradation (Halbwertszeit ca. 60 Minuten), jedoch konnte auf diese Weise für die *gid5*-Deletionsmutante ein im Vergleich zum isogenen Wildtyp vollständig blockierter Abbau des Enzyms nachgewiesen werden (Abb. 14A,B).

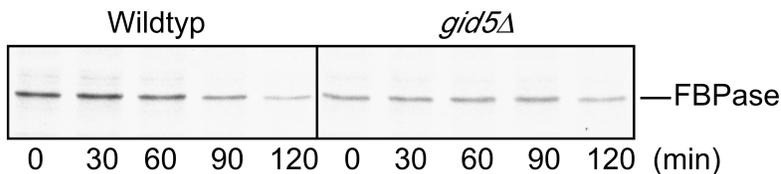


Abb. 14A: Pulse Chase Analyse der Katabolitdegradation der FBPase mit dem Deletionsstamm *gid5*Δ/*vid28*Δ (Y31410) und dem isogenen Wildtyp (BY4743). Aufgrund experimenteller Schwierigkeiten mit den Y31410-Zellen, mußte die Einbauzeit des ³⁵S-Methionins auf 16 h ausgedehnt werden. Dadurch ist die verlangsamte FBPase-Proteolyse im Wildtyp (Halbwertszeit: ca. 60 min) begründet.

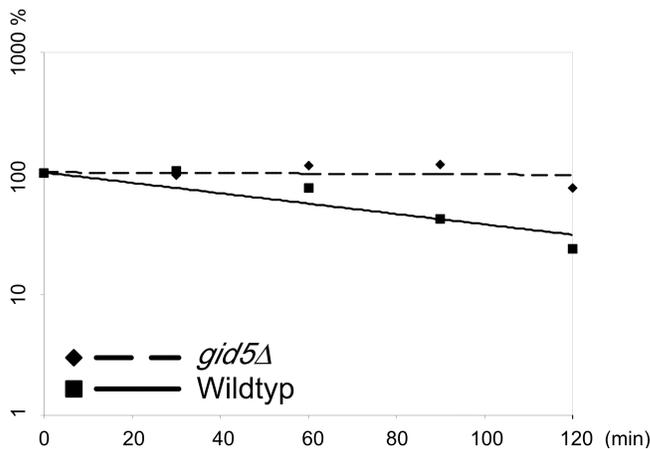


Abb. 14B: Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase nach Glucosegabe zu ethanoldereprimierten *gid5Δ*-Zellen.

Über die Funktion der Proteine Gid7p und Gid8p ist momentan noch nichts bekannt. Bei Gid6p/Ubp14p handelt es sich um ein sogenanntes Deubiquitinierungsenzym. Es konnte gezeigt werden, daß das Fehlen von Ubp14p den Abbau bestimmter proteasomaler Substrate (z. B. Mat α 2) inhibiert, da nicht gespaltene Ubiquitinketten mit ubiquitinierten Substratmolekülen um die Bindung am 26S-Proteasom konkurrieren (Amerik et al., 1997). Dieser Befund ist ein weiterer Hinweis für eine Beteiligung des Ubiquitin-Proteasomsystems bei der FBPase-Hydrolyse.

Interessanterweise konnten mit Gid4p/Vid24p (Chiang und Chiang, 1998) und Gid5p/Vid28p (Datenbankeintrag in der „*Saccharomyces* Genome Database“) zwei weitere, für den proteasomalen FBPase-Abbau essentielle, Vid-Proteine identifiziert werden. Wie eingangs bereits erwähnt, wird nach Veröffentlichungen von Hui-Ling Chiang und Mitarbeitern die FBPase in sogenannte Vid-Vesikel mit einem Durchmesser von 30-40 nm aufgenommen. Diese Vesikel werden im Anschluß zur Vakuole transportiert und der Inhalt von unspezifisch agierenden Proteasen degradiert (Chiang und Schekman, 1991; Huang und Chiang, 1997). Grundlage für die Untersuchung dieses vakuolären Degradationsmechanismus der FBPase war die Isolierung und Charakterisierung von sogenannten *vid*-Mutanten („*v*acular *i*mport and *d*egradation“) (Hoffman und Chiang, 1996).

3.1.2.3 Nicht alle Vid-Proteine sind an der Ubiquitin-Proteasom-vermittelten FBPase-Proteolyse beteiligt

Da die Vid-Proteine Vid24p (Gid4p), Vid28p (Gid5p) und Vid30p (Gid1p) als essentielle Komponenten des proteasomalen FBPase-Abbaus identifiziert werden konnten (3.1.1, 3.1.2.2), lag die Vermutung nahe, daß noch andere Vid-Proteine für diesen Prozeß benötigt werden und eine generelle Überlappung von *GID*- und *VID*-Genen vorliegt. Um dies zu überprüfen wurde von Frank Josupeit im Rahmen seiner Doktorarbeit die FBPase-Proteolyserate in den Deletionsstämmen *vid27Δ*, *vid22Δ* und *cpr1Δ* (Brown et al., 2002) mit Hilfe von Pulse Chase Analysen quantifiziert. Bei Verwendung unseres Standardprotokolls konnte eine Beteiligung von Vid22p, Vid27p und Cpr1p bei der proteasomalen FBPase-Inaktivierung eindeutig ausgeschlossen werden.

Ergänzend wurden Westernblot Analysen mit den *vid*-Deletionsstämmen *vid21Δ* (Y34196), *vid22Δ* (Y35282), *vid27Δ* (Y32000) und *vid31Δ* (Y34903) sowie *NYV1*- (Y32704), *VAM3*- (Y32362), *VAM6*- (Y33774), *VAM7*- (Y34578), *VPS41*- (Y34015) und *YPT7*- (Y30575) deletierten Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Im Falle von *vid22Δ* und *vid27Δ* konnten die Ergebnisse von Frank Josupeit bestätigt werden. In den Deletionsstämmen *vid21Δ* und *vid31Δ* wurde eine geringfügig verzögerte Proteolyse des Enzyms beobachtet. Da *VID31*-deletierte Zellen äußerst schlecht in Gegenwart von Ethanol als Kohlenstoffquelle wachsen, muß hier jedoch von einem indirekten Einfluß auf den Abbau ausgegangen werden. Laut einer Publikation von Brown und Mitarbeitern sind die Proteine Nyv1p, Vam3p, Vam6p, Vam7p, Vps41p und Ypt7p ebenfalls für die vakuoläre FBPase-Degradation essentiell (Brown et al., 2003). Unter unseren Wachstumsbedingungen konnte jedoch keine Stabilisierung der FBPase in den entsprechenden Nullmutanten beobachtet werden.

Diese Ergebnisse bestätigen die schon früher angestellten Vermutungen, daß die FBPase in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen über zwei verschiedene Wege abgebaut werden könnte, und dazu ein spezifischer Satz von Gid- und/oder Vid-Proteinen benötigt wird. Kurze Derepressionszeiten führen zu einem Abbau über das zytosolische Ubiquitin-Proteasomsystem, lange Derepressionszeiten möglicherweise

zu einem Abbau, der von der Vakuole vermittelt wird. Versuche, die Ergebnisse der Chiang-Arbeitsgruppe unter den publizierten Bedingungen zu reproduzieren waren bisher in unserem Labor jedoch nicht möglich (Josupeit, Dissertation 2003). Es ist somit momentan noch nicht endgültig geklärt, ob die Zelle tatsächlich unterschiedliche Abbaumechanismen verwendet und welche Bedingungen zu einer vakuolären Proteolyse führen könnten.

3.1.2.4 Westernblot und Pulse Chase Analysen mit *GID9*-deletierten Zellen

Die Untersuchungen von Thomas Schüle und Frank Josupeit ergaben, daß *Gid2p* die Komponente eines zytosolischen Proteinkomplexes mit einem Molekulargewicht von mindestens 600 kDa darstellt (Schüle, Dissertation 2000; Josupeit, Dissertation 2003). In einer Studie von Ho und Mitarbeitern wurde gezeigt, daß *Gid1p*, *Gid2p*, *Gid5p*, *Gid7p* und *Gid8p* sowohl mit *Gid7p* als auch *Moh1p* (Funktion bisher nicht bekannt) interagieren (Ho et al., 2002). Außerdem wurde *Gid4p* als Interaktionspartner von *Gid7p* identifiziert. Es kann somit spekuliert werden, daß die bisher bekannten *Gid*-Proteine - oder zumindest ein Teil davon - in einem höhermolekularen Komplex vorliegen und noch weitere, bisher unbekannte, Komponenten der *FBPase*-Inaktivierung existieren könnten.

Ein weiteres Protein, das bei dieser systematischen Interaktionsstudie mit den Angelproteinen *Gid7p* und *Moh1p* gefunden wurde, ist *Fyv10p*. Die Funktion dieses Proteins ist bisher unbekannt. Um eine mögliche Beteiligung von *Fyv10p* bei der Katabolitinaktivierung der *FBPase* zu überprüfen, wurde mit der *fyv10Δ*-Mutante Y31488 eine Westernblot Analyse durchgeführt (Abb. 15). Dabei konnte eine deutlich verzögerte Abnahme des Enzyms nachgewiesen werden. Um ein Signal zu erhalten mußte beim Pulse Chase die Einbauzeit des radioaktiv markierten Methionins von 3,5 auf 16 Stunden ausgedehnt werden (vgl. *gid5*-Deletionsstamm, 3.1.2.2). Diese Bedingungen führten wiederum im Wildtyp zu einer verlangsamten *FBPase*-Proteolyse (Halbwertszeit ca. 60 Minuten), jedoch konnte auf diese Weise ein vollständig blockierter Abbau des Enzyms in *FYV10*-deletierten Zellen nachgewiesen werden, da sich Halbwertszeiten von Wildtyp und Mutante signifikant unterscheiden

(Daten nicht gezeigt). Bei Fyv10p handelt es sich somit um ein weiteres Gid-Protein, das die Bezeichnung Gid9p erhielt.

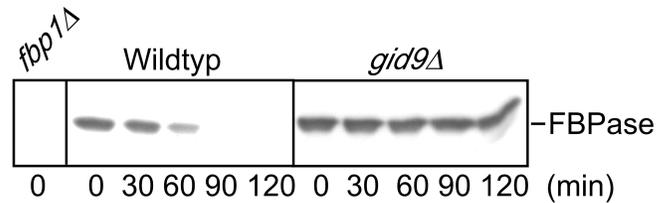


Abb. 15: Immunoblot Analyse des Deletionsstammes *gid9Δ/fyv10Δ* (Y31488) und des isogenen Wildtyps (BY4743). Die Zellen wurden unter Standardbedingungen angezogen und die Kinetik der FBPase-Degradation nach Umsetzen in glucosehaltiges Medium gemessen.

3.1.2.5 Westernblot Analyse mit einer *sn1Δ*-Mutante

Einen weiteren interessanten Befund lieferte eine Datenbankanalyse („YPD™ *Saccharomyces cerevisiae*“) mit den Gid-Proteinen Gid4p/Vid24p und Gid7p. In einem 2-Hybrid Screen konnte nämlich eine Interaktion zwischen Nup116p und Gid4p bzw. Nup116p und Gid7p nachgewiesen werden. Bei Nup116p handelt es sich um ein essentielles Nucleoporin. Snl1p wurde als ein „High Copy Suppressor“ einer *nup116*-Mutante identifiziert, was auf eine genetische Interaktion zwischen den beiden Proteinen schließen lässt. *sn1Δ* wurde beim genomweiten Mutantenscreen mit der EUROSCARF-Kollektion (3.1.2.1) zwar identifiziert, aber zunächst war auf eine weitere Charakterisierung verzichtet worden, da ein indirekter Effekt auf die FBPase-Proteolyse angenommen wurde. Da aufgrund dieser Informationen ein funktioneller Zusammenhang nun doch sehr wahrscheinlich war, wurde mit dem Deletionsstamm Y31409 eine Immunoblot Analyse durchgeführt (Abb. 16).

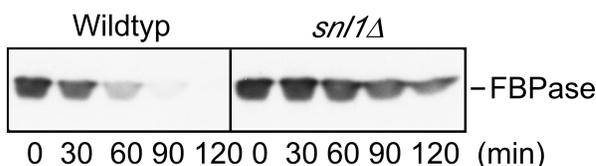


Abb. 16: Westernblot Analyse mit der *sn1*-Nullmutante Y31409 und dem isogenen Wildtyp (BY4743) zur Bestimmung der FBPase-Abbaukinetik.

Snl1p ist ein co-Chaperon mit einer Bag-Domäne, welcher bei der Regulation von Hitzeschockproteinen beteiligt ist (Sondermann et al., 2002). Wie Abb. 16 zeigt, ist bei der *snl1*-Nullmutante Y31409 die Abnahme der FBPase nach Glucosegabe zu ethanoldereprimierten Zellen signifikant verzögert. Snl1p gehört somit vermutlich auch zur Familie der Gid-Proteine. Dies muß jedoch in einer weiterführenden Arbeit durch einen Pulse Chase bestätigt werden.

3.1.2.6 Westernblot Analyse mit einer *grr1* Δ -Mutante

Bei den in den vorigen Kapiteln beschriebenen Deletionsstämmen (*gid1* Δ bis *gid9* Δ) handelte es sich um Mutanten, bei denen das Fehlen des Gens/Proteins einen drastischen Einfluß auf die Halbwertszeit der FBPase-Hydrolyse hat. Außerdem identifiziert werden konnte die *grr1* Δ -Mutante Y36902, wobei hier der Abbaudefekt nur als geringfügig bezeichnet werden kann (Abb. 17). In Hinblick auf ein späteres Projekt, dessen Ziel die Charakterisierung der glucosevermittelten Signaltransduktion der Katabolitinaktivierung war (3.1.3), erwies sich dieser Befund jedoch als sehr interessant.

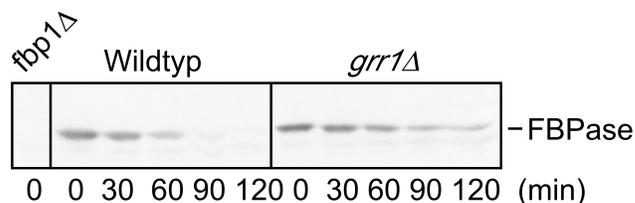


Abb. 17: Immunoblot Analyse mit dem Deletionsstamm *grr1* Δ (Y36902) und dem isogenen Wildtyp (BY4743).

Es wird angenommen, daß *GRR1* eine zentrale Rolle bei der Transkriptionskontrolle durch Glucose einnimmt. Da *grr1*-Mutanten bekannterweise pleiotrope Phänotypen aufweisen, könnte Grr1p auch nur indirekt bei der FBPase-Inaktivierung beteiligt sein.

3.1.3 Immunoblot Analysen von Stämmen mit einem Defekt in glucoseabhängigen *S. cerevisiae*-Signalwegen

Inzwischen gut charakterisierte glucoseabhängige Signalwege in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind der Katabolit-Repressionsweg (Gancedo, 1998; Carlson, 1999; Johnston, 1999; Rolland et al., 2001), der cAMP/Proteinkinase A-Weg (Thevelein und de Winde, 1999; Thevelein et al., 2000; Rolland et al. 2001), sowie der Stoffwechselweg zur Induktion von Hexose-Transportergenen (Özcan et al., 1996; Kruckeberg et al., 1998; Johnston, 1999; Rolland, 2001). In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, daß bestimmte Komponenten dieser Stoffwechselwege (Grr1p, Rgt1p, Rgt2p, Reg1p und Hxk2p) für die Katabolitinaktivierung der Maltosepermease (Mal61p) essentiell sind (Jiang et al., 1997; Jiang et al., 2000a,b).

In Zusammenarbeit mit Jaroslav Horak (Akademie der Wissenschaften, Physiologisches Institut Prag, Tschechien) wurde die FBPase-Degradation in allen verfügbaren Mutanten mit einem Defekt in den oben beschriebenen Signaltransduktionswegen anhand von Westernblot Analysen untersucht (Horak et al., 2002). In den meisten Fällen war die Proteolyserate des Enzyms mit der des Wildtypstammes vergleichbar, wodurch eine Beteiligung des entsprechenden Genprodukts bei der Katabolitinaktivierung der FBPase ausgeschlossen werden konnte. Eine Stabilisierung war dagegen in *GRR1*- (3.1.2.6) und *REG1*-deletierten Zellen (Abb. 18) zu beobachten.

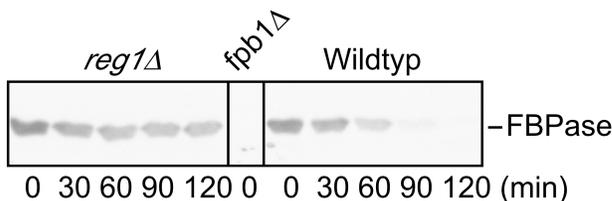
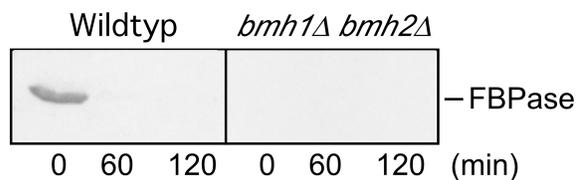


Abb. 18: Westernblot Analyse des Deletionsstammes *reg1Δ* (Y33967) und des isogenen Wildtyps (BY4743). Die Zellen wurden unter Standardbedingungen angezogen und die Kinetik des FBPase-Abbaus nach Umsetzen in glucosehaltiges Medium verfolgt.

Reg1p ist die regulatorische Untereinheit des Glc7p/Reg1p-Proteinphosphatasekomplexes (PP1). Dieser Komplex spielt bei der Glucose-Repression, dem Glykogenmetabolismus und wie hier gezeigt auch bei der proteasomalen Katabolitdegradation der FBPase eine entscheidende Rolle. Desweiteren wurde Glc7p/Reg1p als Komponente der vakuolären FBPase-Inaktivierung identifiziert (Dong-Ying Cui et al., 2004). Auf der Suche nach Reg1p-Interaktionspartnern wurde eine direkte Wechselwirkung mit den 14-3-3-Proteinen Bmh1p und Bmh2p nachgewiesen (Mayordomo et al., 2003). Komponenten der *S. cerevisiae*-14-3-3-Proteinfamilie sind bekanntermaßen bei der Regulation von zahlreichen physiologischen Prozessen, wie dem proteasomalen Proteinabbau oder der Tor-abhängigen Signaltransduktion, beteiligt. Da der Mal61p-Abbau im *bmh1Δ bmh2Δ*-Deletionsstamm RRY1217 blockiert ist, sollte für die Arbeitsgruppe von Pascual Sanz (Institut für Biomedizin Valencia, Spanien) in dieser Doppelmutante die FBPase-Abbaukinetik in einem Westernblot gemessen werden (Abb. 19). Hierbei wurden unterschiedliche Derepressionsbedingungen angewendet, da das Fehlen von *BMH1* und *BMH2* ein stark verlangsamtes Zellwachstum - vor allem in Gegenwart einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle - zur Folge hat.

A



B

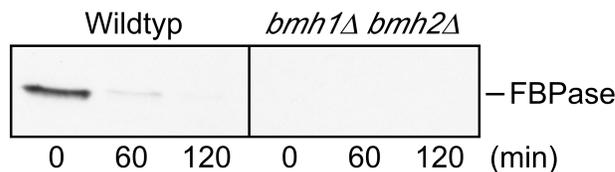


Abb. 19: Immunoblot Analysen mit dem Deletionsstamm *bmh1Δ bmh2Δ* (RRY1217) und dem isogenen Wildtyp RRY1. Zur Derepression der FBPase wurden die Zellen 5 h (19A) bzw. 16 h (19B) in YPEtOH-Medium angezogen. Nach Umsetzen in glucosehaltiges Medium wurde zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen und das antigene Material mit spezifischem FBPase-Antikörper detektiert. Zur Ladekontrolle wurde die Blots mit PGK-Antikörpern gegengefärbt (Daten nicht gezeigt).

Wie in Abb. 19 ersichtlich, konnte in der *bmh1 bmh2*-Doppeldelation weder bei sehr kurzen (5 Stunden) noch bei längeren Derepressionzeiten (16 Stunden) antigenes FBPase-Material nachgewiesen werden. Das gleiche Resultat wurde bei Verwendung von YPGlycerin als Derepressionsmedium erhalten (Daten nicht gezeigt). Das Fehlen des gluconeogenetischen Schlüsselenzyms Fructose-1,6-bisphosphatase erklärt das extrem schlechte Wachstum der Doppelmutante in Gegenwart einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle. Hierzu ist anzumerken, daß die Mutante selbst in Vollmedium einen beträchtlichen Wachstumsdefekt (Bildung von Zellklumpen) aufweist.

3.1.4 2 μ -Genbankscreen

Die bisherigen Befunde basierten auf der Grundlage, daß eine Punktmutation bzw. Deletion den Verlust der Funktion des entsprechenden Genprodukts zur Folge hat, als Konsequenz dessen sich eine deutlich erhöhte FBPase-Halbwertszeit einstellt. Im folgenden Ansatz wurde nach Genen gesucht, deren Überexpression eine gestörte FBPase-Degradation hervorrufen. In Anlehnung an den unter 3.1.1.1 beschriebenen Kolonie-Immunoblot Screen wurden BY4743-Wildtypzellen mit der 2 μ -Genbank YEp24 (2.4.3.6) transformiert und analog aufgearbeitet. Als Kontrolle/Vergleich wurde ein mit dem leeren Ausgangsvektor transformierter Wildtypstamm aufgetragen. Gesucht wurde nach dunklen Klonen mit einer reduzierten FBPase-Proteolyserate.

Unter ca. 1000 Transformanten konnten fünf potentielle Kandidaten identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die Kinetik des FBPase-Abbaus in einer Immunoblot Analyse untersucht. In drei Fällen konnte ein verlangsamer Abbau beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Um zu überprüfen, ob der Effekt durch das jeweilige Überexpressionsplasmid begründet ist, wurde ein Plasmidverlust und ein „Plasmid Rescue“ mit anschließender Retransformation durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Letztendlich blieb ein Klon übrig, bei dem der Plasmidverlust bzw. die Retransformation die gewünschten Phänotypen zeigte. Der durch die

Überexpression des Genbankinserts von Klon 8-1 hervorgerufene Einfluß auf die FBPase-Inaktivierung ist in Abb. 20 dargestellt.

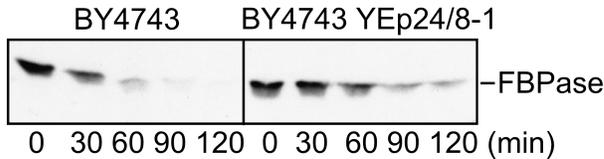


Abb. 20: Einfluß des 2 μ -Genbankplasmids YEp24/8-1 auf die Katabolitdegradation der FBPase im BY4743-Wildtypstamm.

3.1.4.1 Charakterisierung des Genbankplasmids YEp24/8-1 (pJR19)

Zur weiteren Charakterisierung des Genbankplasmids YEp24/8-1 (pJR19) (3.1.4) wurde das sich in der *Bam*HI-Schnittstelle befindende Insert von beiden Seiten ansequenziert (MWG Biotech AG, Ebersberg). Die erhaltene Sequenz wurde mit der Datenbank der Hefe *S. cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org>) verglichen. Der Sequenzvergleich ergab eine 100 %ige Übereinstimmung mit einem 7,9 kbp großen DNA-Abschnitt zwischen den Positionen 479665 und 487553 auf Chromosom XIV. Dieser Bereich beinhaltet vier vollständige Gene: *NIS1*, *YNL077w*, *MKS1* und *IMP4*. Zur Subklonierung wurde durch einen Restriktionsverdau ein 3,4 kbp großes *KspI/SfiI*-Fragment entfernt und das „backbone“ religiert. Das resultierende Plasmid, dessen Insert jetzt nur noch die Gene *NIS1* und *YNL077w* enthielt, wurde als pJR19/S1 bezeichnet. Nach Transformation von BY4743-Zellen mit pJR19/S1 wurde die Kinetik des FBPase-Abbaus in einem Westernblot gemessen (Daten nicht gezeigt). Damit konnte gezeigt werden, daß die Überexpression der Gene *NIS1* und *YNL077w* keinen Einfluß auf die Katabolitinaktivierung haben, und der beobachtete Phänotyp auf die Überexpression des Gens *MKS1* oder *IMP4* zurückgeführt werden muß. Aufgrund der Nichtverfügbarkeit zusätzlicher passender Schnittstellen konnte keine weitere Subklonierung durchgeführt werden. Auf eine abschließende Charakterisierung (z. B. Herstellung von *MKS1*- und/oder *IMP4*-Überexpressionsplasmiden) wurde verzichtet. Dies könnte jedoch Gegenstand einer weiterführenden Arbeit darstellen.

3.2 Das Protein Gid1p

Das auf Chromosom VII der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* lokalisierte *GID1/VID30*-Gen (systematischer Name: *YGL227w*) besteht aus 2877 bp und wurde im Rahmen dieser Dissertation in zwei voneinander unabhängigen Ansätzen identifiziert (3.1.1, 3.1.2). Das Molekulargewicht des aus 958 Aminosäuren bestehenden Genprodukts (Abb. 21) beträgt 108 kDa, der isoelektrische Punkt ist mit 4.54 angegeben.

```
1  MSEYMDDVDR EFINCLFPSY LLQQPVAYDL WILYLQHRKL FHKLKNTNLI
51  NADENPTGVG MGRTKLTALT RKEIWSKLMN LGVLGTISFE AVNDDYLIQV
101 YKYFYDPVND FTLRFGVKDS NKNSVRVMKA SSDMRKNAQE LLEPVLSERE
151 MALNSNTSLE NDRNDDDDDD DDDDDDDDDD DDDDESLE SLEGEVDTDT
201 DDNNEG DGSD NHEEGGEEGS RGADADVSSA QQRAERVADP WIYQRSRSAI
251 NIETESRNLW DTSDKNGLQ YPPDQSPSS SFSSPRVSSG NDKNDNEATN
301 VLSNSGSKKK NSMIPDIYKI LGYFLPSRWQ AQPNNLQLS QDGITHLQPN
351 PDYHSYMTYE RSSASSASTR NRLRTSFENS GKVDFAVTTA NKSLPDNKLT
401 IFYYEIKVLS VTSTESAENS NIVIGYKLV E NELMEATTK SVSRSSVAGS
451 SSSLGGSNNM SSNRVPSTSF TMEGTQRRDY IYEGGVSAMS LNVDGSINKC
501 QKYGFDLNVF GYCGFDGLIT NSTEQSKEYA KPFGRDDVIG CGINFIDGSI
551 FFTKNGIHLG NAFTDLNDLE FVPYVALRPG NSIKTNFGLN EDFVFDIIGY
601 QDKWKSLEYE HICRGRQMDV SIEEFDSDES EEDETENGPE ENKSTNVNED
651 LMDIDQEDGA AGNKDTKKLN DEKDNNLKFL LGEDNRFIDG KLVRPDVNNI
701 NNLVDDGSL PNTLNMIND YLIHEGLVDV AKGFLKDLQK DAVNVNGQHS
751 ESKDVIRHNE RQIMKEERMV KIRQELRYLI NKGQISKIN YIDNEIPDLL
801 KNNLELVFEL KLANYLVMIK KSSSKDDEI ENLILKGQEL SNEFIYDTKI
851 PQSLRDRFSG QLSNVSALLA YSNPLVEAPK EISGYLSDEY LQERLFQVSN
901 NTILTFLHKD SECALENVIS NTRAMLSTLL EYNAFGSTNS SDPRYYKAIN
951 FDEDVLNL*
```

Abb. 21: Aminosäuresequenz von Gid1p. Quelle: „*Saccharomyces* Genome Database“.

In *GID1*-deletierten Zellen ist die vom 26S-Proteasom katalysierte FBPase-Proteolyse vollständig blockiert (3.1.1.4). Es wurde eine Halbwertszeit von 3-3,5 Stunden gemessen, was einer etwa siebenfachen Stabilisierung im Vergleich zum isogenen Wildtyp entspricht. Außerdem ist die Katabolitinaktivierung der Phosphoenolpyruvat Carboxykinase, der cytosolischen Malatdehydrogenase und der Isocitrat Lyase bei einer *gid1*-Punktmutante beeinträchtigt (Hämmerle et al., 1998). Im Gegensatz dazu hat das Fehlen von Gid1p keinen Einfluß auf die Degradation des Galactosetransporters Gal2p (Abb. 22).

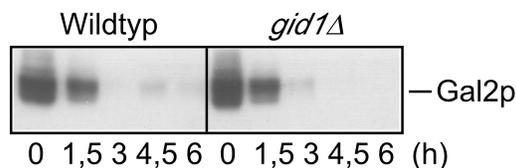


Abb. 22: Glucoseinduzierte Katabolitinaktivierung der Galactosepermease (Gal2p) im *gid1*-Deletionsstamm Y34594 und dem isogenen Wildtyp (BY4743). Die Abbildung wurde von Jaroslav Horak (Akademie der Wissenschaften, Physiologisches Institut Prag, Tschechien) zur Verfügung gestellt. Vergleichbare Proteolyseraten wurden in den Mutanten *gid2Δ* bis *gid9Δ* sowie *vid22Δ* und *vid27Δ* gemessen (Daten nicht gezeigt).

Gemäß eines Datenbankeintrags in der „*Saccharomyces* Genome Database“ ist Gid1p/Vid30p ein membranassoziertes Protein, das den Import der FBPase in Vid-Vesikel reguliert und wird somit möglicherweise auch für den von der Chiang-Arbeitsgruppe beschriebenen vakuolären Degradationsmechanismus der FBPase benötigt. Außerdem wird dem Protein eine wichtige Funktion im Stickstoffmetabolismus zugeschrieben (Van der Merwe et al., 2001).

Sequenzvergleiche mit Hilfe der SMART-Datenbank (<http://smart.embl-heidelberg.de>) identifizierten innerhalb von Gid1p eine sogenannte SPRY-Domäne, sowie ein LisH- und CTLH-Motiv (Abb. 23). Über die Funktion der SPRY-Domäne (benannt nach dem Spla und Ryanodin Rezeptor) ist bisher nichts bekannt. Das α -helikale LisH-Motiv findet man in vielen eukaryontischen Proteinen (u. a. beim Hefeprotein Gid8p), die bei der Dynamik von Mikrotubuli, Zellmigration, Nucleokinese und Chromosomensegregation beteiligt sind. In der Regel ist das „LIS1 homology motif“ mit anderen Proteinabschnitten wie WD40, SPRY, RasGEF, HEAT, Kelch oder

AAA-ATPase assoziiert. In manchen Proteinen findet man C-terminal zu LisH das α -helikale CTLH-Motiv, über dessen Funktion es bisher ebenfalls keine Hinweise gibt. Interessanterweise enthalten diesen Abschnitt neben Gid1p die *S. cerevisiae*-Proteine Gid2p, Gid8p und Gid9p. Der C-Terminus von Gid1p zeigt außerdem eine etwa 30 %ige Sequenzidentität zum menschlichen RanBP9, einem Interaktionspartner des Ran-Proteins, welchem u. a. eine wichtige Funktion im Kern-Ex-/Import zugeschrieben wird (Nakamura et al., 1998).

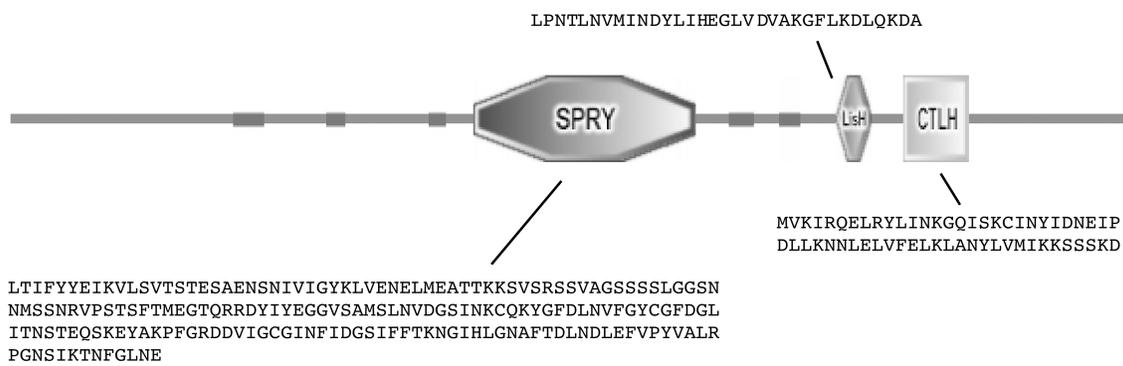


Abb. 23: Sequenzanalyse von Gid1p mit Hilfe der SMART-Datenbank.

3.2.1 Einfluß von Temperatur und Kohlenstoffquelle auf das Wachstum *GID1*-deletierter Stämme

Für wachstumsphänotypische Untersuchungen wurden *gid1*-Deletionsmutanten in zwei verschiedenen Stammhintergründen (BY4743, JK9-3da) ausgewählt. Hierbei konnte im Vergleich zum isogenen Wildtyp bei 18 °C, 25 °C, 30 °C und 37 °C keine Beeinträchtigung des Wachstums und somit keine Temperatursensitivität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). In Gegenwart von Glucose, Galactose oder Ethanol als Kohlenstoffquelle wurden ebenfalls keine vom Wildtyp abweichenden Wachstumsphänotypen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Untersuchungen bezüglich Autophagozytosephänotypen

Die Autophagozytose ist ein hungerinduzierter Stoffwechselweg, bei dem Proteine und ganze Organellen ins Lumen der Vakuole transportiert und anschließend abgebaut werden. Autophagozytosemutanten (sogenannte *aut*- bzw. *apg*-Mutanten; neuste Nomenklatur: *atg*-Mutanten) weisen bei Hungerung eine deutlich reduzierte Überlebensrate auf (Thumm, 1994). Dieser Phänotyp kann durch Wachstum auf SD(-N)-Platten, welche mit dem roten Farbstoff Phloxin B supplementiert wurden, leicht nachgewiesen werden (Bonneu et al., 1991, Tsukada und Ohsumi, 1993). Abgestorbene Zellen nehmen diesen Farbstoff auf und werden rot.

Bei einer genomweiten Suche nach neuen *aut*-Mutanten wurde für die *gid1Δ*-Mutante Y34594 bei Wachstum auf SD(-N)-Platten mit Phloxin B eine im Vergleich zum Wildtyp reduzierte Überlebensrate festgestellt (Michael Thumm, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund wurden *GID1*-deletierte Zellen auf weitere typische Autophagozytosephänotypen hin untersucht. Gewöhnlich können *aut*-Mutanten nicht sporulieren und zeigen mit wenigen Ausnahmen einen Defekt in der Reifung der Aminopeptidase I. Weitere Informationen sollte ein sogenannter Vesikeltest liefern.

3.2.2.1 Sporulationstest mit einer homozygot diploiden *gid1Δ*-Mutante

Um die Sporulationsfähigkeit einer homozygot diploiden *gid1*-Nullmutante zu untersuchen, wurden logarithmische YPD-Kulturen der Stämme Y34594 (*gid1Δ/gid1Δ*), BY4743 (Wildtyp) und Y33357 (*apg12Δ/apg12Δ*) (Sporulation vollständig blockiert) nach mehreren Waschschritten in Sporulationsmedium aufgenommen und bei 23 °C geschüttelt. Zur Quantifizierung wurden die Tetraden (Asci) nach 4, 5, 6 und 12 Tagen unter dem Lichtmikroskop gezählt (Abb. 24). Um ein verlässliches Resultat zu erhalten wurde dieses Experiment drei Mal wiederholt und dabei von jedem Stamm 200-300 Zellen beobachtet.

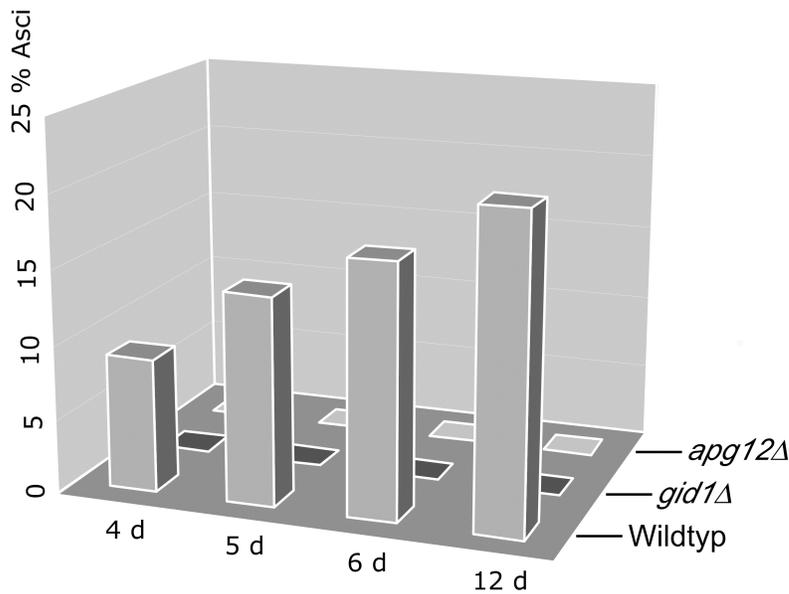


Abb. 24: Sporulationstest mit der homozygot diploiden *gid1*-Deletionsmutante Y34594 bei 23 °C in 1 % KOAc. Kontrollstämme: BY4743-Wildtyp und *apg12Δ* (Y33357).

Wie Abb. 24 zeigt ist bei einer homozygot diploiden *gid1Δ*-Mutante wie bei *APG12*-deletierten Zellen die Fähigkeit zur Ausbildung von Asci vollständig blockiert. Der isogene Wildtyp war dagegen wie zu erwarten in seiner Sporulationsfähigkeit nicht eingeschränkt.

Im Folgenden wurden alle weiteren vorliegenden homozygot diploiden *gid*-Nullmutanten (*gid2Δ/gid2Δ* bis *gid9Δ/gid9Δ*) bezüglich ihres Sporulationsverhaltens untersucht (Daten nicht gezeigt). Wie *gid1Δ* konnten folgende Deletionsstämme keine Tetraden ausbilden: *gid2Δ*, *gid3Δ/ubc8Δ*, *gid5Δ/vid28Δ*, *gid6Δ/ubp14Δ*, *gid8Δ* und *gid9Δ*. Bei *GID4/VID24*-deletierten Zellen wurde dagegen keine Beeinträchtigung der Sporulation festgestellt. Eine *gid7Δ*-Mutante weist im Vergleich zum Wildtyp eine deutlich reduzierte Menge an Asci auf. Diese beträgt nach 12 Tagen etwa 6 %, wobei außerdem das Auftreten von Diaden auffiel.

3.2.2.2 Herstellung einer chromosomal deletierten *gid1*-Mutante im WCG4a-Stammhintergrund (YJR13)

Für einen Vesikelttest (3.2.2.3) sind die meisten Hefestämme (z. B. BY4743, JK9-3da oder W303) ungeeignet (Michael Thumm, persönliche Mitteilung). Um eindeutige Ergebnisse erzielen zu können sollte deshalb eine *gid1*Δ-Mutante im WCG4a-Hintergrund hergestellt werden.

Zur Herstellung einer chromosomal deletierten *gid1*-Mutante wurde mittels PCR eine Deletionskassette synthetisiert, die aus dem Kanamycinresistenzgen (*loxP-KAN^R-loxP*), flankiert von angrenzenden Sequenzen des *GID1*-Gens, besteht. Als Template für das ca. 1,6 kbp große DNA-Fragment diente das Plasmid pUG6 (2.4.3.2), als Primer wurden die Oligonucleotide P1 *GID1-KAN-Del* und P2 *GID1-KAN-Del* (2.4.4) eingesetzt. Mit der Deletionskassette wurde der haploide Wildtypstamm WCG4a transformiert und auf G418-sulfat-haltigen YPD-Platten (geneticinhaltiges Medium) selektioniert. Nur Zellen, die durch eine homologe Rekombination das DNA-Fragment ins Genom integriert haben, können bei Anwesenheit von Geneticin wachsen. Die so erhaltenen Klone wurden auf eine frische mit G418-sulfat supplementierte YPD-Platte replikaplatziert und damit einer weiteren Selektion unterworfen. Daraufhin wurden 10 überdurchschnittlich große Kolonien isoliert und die Katabolitdegradation der FBPase in einem Westernblot untersucht. Bei sieben dieser Klone (Nr. 1, 2, 3, 6, 8, 9 und 10) konnte ein vollständig blockierter FBPase-Abbau festgestellt werden (Daten nicht gezeigt), was auf eine korrekte Integration und damit die Deletion des *GID1*-Gens schließen läßt. Um dies zu verifizieren und eine mögliche Mehrfachintegration der Deletionskassette auszuschließen, wurde eine Southernblot Analyse durchgeführt. Dazu wurde aus den sieben Klonen sowie dem Ausgangsstamm WCG4a (Kontrolle) chromosomale DNA isoliert und mit *SnaBI* verdaut. Für einen zweiten Ansatz wurde das Restriktionsenzym *XmnI* ausgewählt. Beide Enzyme schneiden jeweils vor bzw. hinter dem *GID1*-Gen und erzeugen - sofern eine korrekte Integration der Deletionskassette erfolgt war - ein 3,7 kbp (*SnaBI*) bzw. 2,8 kbp (*XmnI*) großes DNA-Fragment, welches nach Hybridisierung mit einer gegen das *KAN^R*-Gen gerichteten Sonde nachgewiesen werden kann. Wie in Abb. 25 zu sehen ist, konnte für alle Klone beim *SnaBI*-Verdau ein 3,7 kbp großes

Fragment nachgewiesen werden. Im Falle des *XmnI*-Verdau wurde in allen Fällen ein 2,8 kbp großes Fragment detektiert, was auf eine erfolgreiche Deletion des *GID1*-Gens schließen lässt. Beim Wildtyp waren erwartungsgemäß keine Banden sichtbar. Für alle weiterführenden Experimente wurde Klon 1 mit der Bezeichnung YJR13 (*WCG4a gid1Δ::KAN^R*) verwendet.

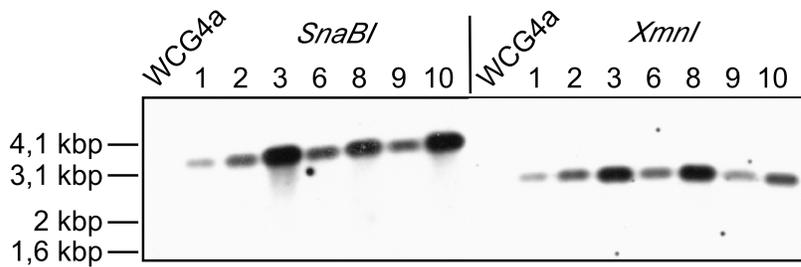


Abb. 25: Southernblot Analyse des *gid1*-Deletionsstammes YJR13 (Klon 1, 2, 3, 6, 8, 9 und 10) und des isogenen Wildtyps WCG4a (Kontrolle). Hierzu wurde chromosomale DNA isoliert, mit *SnaBI* bzw. *XmnI* verdaut und die Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Nylonmembran geblotet. Die Detektion erfolgte mit einer *KAN^R*-Sonde.

3.2.2.3 Vesikeltest mit *GID1*-deletierten Zellen

Bei einem Vesikeltest werden die Zellen unter speziellen Hungerbedingungen angezogen und unter dem Lichtmikroskop bezüglich der Ausbildung autophagischer Vesikel in der Vakuole untersucht.

Stationäre YPD-Kulturen der *gid1*-Deletionsmutante YJR13, des isogenen Wildtyps (WCG4a) und einer *aut3Δ*-Mutante (YMS30) (Vesikelbildung vollständig blockiert) wurden nach mehreren Waschschritten in 1 % Kaliumacetat inkl. dem Proteinase *yscB*-Inhibitor PMSF aufgenommen, weitere 3,5 Stunden bei 30 °C geschüttelt und unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Unter diesen Bedingungen wird die Autophagozytose induziert. In Gegenwart von PMSF erwartet man in Wildtypzellen die Akkumulation autophagischer Vesikel in der Vakuole, da die für die Lyse essentielle Proteinase *yscB* durch diesen Inhibitor blockiert wird. Eine *aut3*-Nullmutante ist in der Signaltransduktion der Autophagozytose gestört (Kamada et

al., 2000). Deshalb sollten in dieser Mutante unter dem Lichtmikroskop keine Vesikel beobachtet werden können.

Unter den oben beschriebenen Wachstumsbedingungen wurde in der *gid1Δ*-Mutante und dem isogenen Wildtyp eine Akkumulation autophagischer Vesikel in der Vakuole nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). In der *aut3Δ*-Mutante waren erwartungsgemäß keine Vesikel detektierbar. Dies zeigt, daß Gid1p keine Komponente des autophagischen Prozesses ist.

3.2.2.4 Reifung der Aminopeptidase I in einer *gid1Δ*-Mutante

Die Aminopeptidase I (API) wird im Cytosol der Zelle synthetisiert (pAPI). Anschließend kommt es zu einer proteolytischen Reifung in der Vakuole (mAPI). Das Protein gelangt über zwei Transportwege zur Vakuole: Unter nährstoffreichen Bedingungen über den Cvt-Weg („cytoplasm to vacuole targeting pathway“), unter Hungerbedingungen hauptsächlich via Autophagozytose. Beide Wege nutzen größtenteils die gleichen Komponenten.

Eine *gid1*-Deletionsmutante (YJR13), der isogene Wildtyp sowie die Kontrollstämme *ape1Δ*, *pep4Δ* (YMTA) und *mai1Δ* (YHB4) wurden über Nacht in YPD-Medium angezogen. Dann wurden Proben für eine Westernblot Analyse entnommen. Die Übernachtskultur wurde nach mehreren Waschschritten in SD(-N)-Medium aufgenommen, weitere 4,5-5 Stunden geschüttelt und erneut Proben gezogen. In der YPD-Übernachtskultur gelangt ein Teil der Aminopeptidase I über die Autophagozytose, ein wesentlicher Anteil jedoch über den Cvt-Weg in die Vakuole. Im *mai1*-Deletionsstamm ist der Cvt-Weg vollständig blockiert, die Autophagozytose ist jedoch nicht beeinträchtigt. Aus diesem Grund erwartet man hier ungeriffte API (pAPI). Nach Inkubation in SD(-N)-Medium wird die Aminopeptidase I im Wesentlichen über die Autophagozytose zur Vakuole transportiert. Deshalb kann bei einer *mai1Δ*-Mutante unter diesen Bedingungen von einer Reifung der API (mAPI) ausgegangen werden, in einem *PEP4*-defizienten Stamm (Lyse der autophagischen Vesikel gestört) jedoch nicht. Wie in Abb. 26 ersichtlich konnte bei einer *gid1Δ*-

Mutante unter den oben beschriebenen Bedingungen gereifte API (mAPI) nachgewiesen werden. Die Reifung dieser vakuolären Proteinase ist somit in *GID1*-deletierten Zellen nicht gestört.

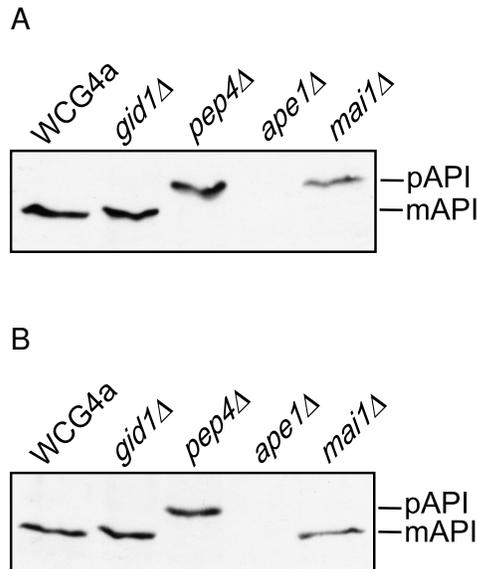


Abb. 26: Reifung der Aminopeptidase I (API) in den Stämmen WCG4a (Wildtyp), YJR13 (*gid1Δ*), YMTA (*pep4Δ*), YHB4 (*mai1Δ*) und der API-Deletionsmutante *ape1Δ* in einer YPD-Übernachtskultur (26A) bzw. nach Wachstum in SD(-N)-Medium (26B). mAPI: gereift, pAPI: ungereift. Die Detektion erfolgte mit spezifischem API-Antikörper.

Diese Ergebnisse unterstreichen, daß *Gid1p* weder eine Komponente der Autophagozytose noch ein Baustein des Cvt-Weges ist.

3.2.2.5 Einfluß von Autophagozytoseproteinen auf den Abbau der FBPase

Eine mögliche Beteiligung von Autophagozytoseproteinen bei der proteasomalen Katabolitinaktivierung der FBPase wurde bereits in früheren Arbeiten mit Hilfe von Westernblot und Pulse Chase Analysen untersucht (Schüle, Dissertation 2000; Josupeit, Dissertation 2003). In allen bisher getesteten *aut-/apg*-Deletionsstämmen war keine Beeinträchtigung in der FBPase-Degradation zu beobachten.

Ergänzend wurden die Stämme YMS5 (*aut1Δ*), YMS30 (*aut3Δ*) und YIS4 (*aut5Δ*) ausgewählt und die FBPase-Proteolyserate in einer Immunoblot Analyse gemessen (Abb. 27). Aut1p ist ein Protein, das bei der Entstehung und Reifung von Autophagosomen beteiligt ist (Schlumpberger et al., 1997). Die Serin-/Threoninkinase Aut3p ist eine Komponente in der Signaltransduktion der Autophagozytose (Kamada et al., 2000). Aut5p wird für die Lyse autophagischer Vesikel in der Vakuole benötigt (Epple et al., 2001).

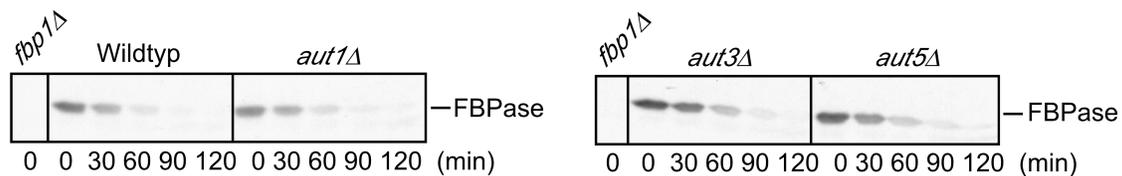


Abb. 27: Glucoseinduzierte FBPase-Proteolyse in *AUT1*-, *AUT3*- und *AUT5*-deletierten Zellen. Die Stämme WCG4a (Wildtyp), YMS5 (*aut1Δ*), YMS30 (*aut3Δ*) und YIS4 (*aut5Δ*) wurden unter Standardbedingungen kultiviert und eine Westernblot Analyse durchgeführt.

Wie in Abb. 27 zu sehen ist, hatte eine Deletion der Gene *AUT1*, *AUT3* oder *AUT5* unter unseren Wachstumsbedingungen keinen Einfluß auf den Abbau der FBPase, womit die Resultate (Schüle, Dissertation 2000; Josupeit, Dissertation 2003) erwartungsgemäß bestätigt werden konnten.

Gid1p wurde von einer polnischen Arbeitsgruppe in einem 2-Hybrid Screen mit Ccz1p als Angelprotein identifiziert (Roza Kucharczyk, persönliche Mitteilung). Ccz1p/Cvt16p/Aut11p ist eine essentielle Komponente sowohl im Cvt-Weg als auch in der Autophagozytose (Wesse et al., 2002). Um eine mögliche Beteiligung dieses Proteins bei der FBPase-Hydrolyse zu überprüfen, wurde die Abbaukinetik in *CCZ1*-defizienten Zellen untersucht (Abb. 28).

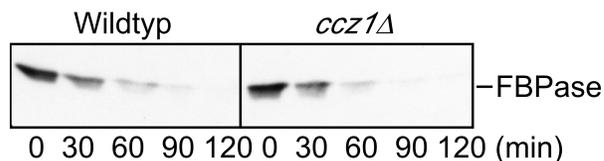


Abb. 28: Immunoblot Analyse mit der *ccz1Δ*-Mutante YKMW7.

In den *ccz1*-Deletionsstämmen YKMW7 (Abb. 28) und Y37164 (Daten nicht gezeigt) konnte keine Beeinträchtigung der FBPase-Inaktivierung festgestellt werden.

3.2.3 Suche nach genetischen Interaktionspartnern von *GID1*

3.2.3.1 „High Copy Suppressor“ Screen mit einer *gid1*-Mutante

Eine Möglichkeit zur Identifikation von genetischen Interaktionspartnern ist ein sogenannter „High Copy Suppressor“ Screen. Mit Hilfe einer 2 μ -Genbank sollte auf der Grundlage des eingangs beschriebenen Kolonie-Immunoblot Screens (3.1.1.1) nach Genen gesucht werden, deren Überexpression den *gid1*-Mutantenphänotyp (vollständig retardierter FBPase-Abbau) komplementieren können. Die so identifizierten Genprodukte könnten in einem funktionellen Zusammenhang mit Gid1p stehen und damit weitere Hinweise zu dessen Funktion liefern.

In einem ersten Versuch wurde die *gid1*-Punktmutante WAY.5-4A/D1 mit der 2 μ -Genbank YEp24 (2.4.3.6) transformiert und wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben aufgearbeitet. Als Kontrolle/Vergleich wurde ein mit leerem Plasmid transformierter Wildtypstamm (WAY.5-4A) aufgetragen. Gesucht wurde nach hellen Kolonien, bei denen die Überexpression des Genbankinserts zu einer Wiederherstellung des FBPase-Abbaus in den *GID1*-defizienten Zellen führt. Unter ca. 1000 Transformanten konnte kein positiver Klon identifiziert werden. Da diese Vorgehensweise sehr zeitaufwendig ist, wurde im Folgenden eine Modifikation vorgenommen: Beim zweiten Ansatz sollte die Tatsache ausgenutzt werden, daß eine homozygot diploide *gid1 Δ* -Mutante nicht sporulieren kann (3.2.2.1). Es wurde also nach Klonen gesucht, bei denen der Sporulationsdefekt komplementiert wird. Da die so identifizierten Gene bei Überexpression möglicherweise - aber nicht zwangsläufig - auch den Defekt in der FBPase-Proteolyse komplementieren, mußte anschließend noch das FBPase-Abbauverhalten untersucht werden.

Nach Transformation mit der 2 μ -Genbank YEp13 (2.4.3.5) wurden die Zellen des Stammes Y34594 (*gid1 Δ /gid1 Δ*) in Sporulationsmedium aufgenommen und 7 Tage bei 25 °C geschüttelt. Nach Behandlung mit Zymolyase 100-T und β -ME wurden die Zellen Ultraschall ausgesetzt und anschließend auf CM-Platten ohne Leucin selektioniert. Für nicht sporulierende diploide Zellen ist diese Prozedur tödlich. *GID1*-deletierte Klone, die aufgrund des vorhandenen Genbankplasmids Asci ausbilden konnten (Komplementation des Sporulationsdefekts), überleben die Ultraschallbehandlung. Es wurden ca. 3000 wachstumsfähige, haploide, Klone isoliert und anschließend das FBPase-Abbauverhalten untersucht. Dabei konnten drei Transformanten identifiziert werden, bei denen der Proteolysedefekt durch das 2 μ -Genbankplasmid komplementiert wurde (Daten nicht gezeigt). Die isolierten Vektoren erhielten die Bezeichnung pJR16 (YEp13/1-1), pJR17 (YEp13/4) und pJR18 (YEp13/6).

3.2.3.1.1 Charakterisierung der Genbankplasmide YEp13/1-1 (pJR16), YEp13/4 (pJR17) und YEp13/6 (pJR18)

Zur weiteren Charakterisierung der in 3.2.3.1 isolierten Genbankplasmide wurde das sich in der *Bam*HI-Schnittstelle befindende Insert von beiden Seiten ansequenziert (MWG Biotech AG, Ebersberg). Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Datenbank der Hefe *S. cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org>) verglichen. Der Vergleich ergab für pJR16 eine 100 %ige Übereinstimmung mit einem 4,6 kbp großen DNA-Fragment zwischen den Positionen 69009 und 73572 auf Chromosom VII (2.4.3.5). Für die Plasmide pJR17 und pJR18 ergab der Sequenzvergleich eine 100 %ige Übereinstimmung mit einem 4,6 kbp großen Abschnitt auf Chromosom VII zwischen den Positionen 69009 und 73577. Die drei Plasmide sind somit fast identisch und beinhalten das vollständige *GID1*-Gen mit Promotor- und Terminatorregion.

3.2.3.1.2 Einfluß der Überexpression von *GID1* auf den FB Pase-Turnover

Um den Einfluß der Überexpression von *GID1* auf den FB Pase-Turnover zu untersuchen, wurde der Wildtypstamm BY4743 mit dem Genbankplasmid pJR16 (3.2.3.1.1) transformiert und die Kinetik des FB Pase-Abbaus in einer Immunoblot Analyse untersucht (Abb. 29).

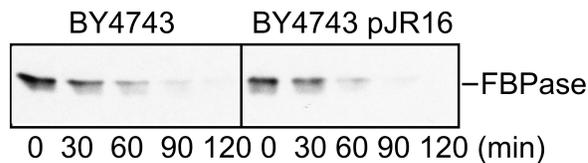


Abb. 29: FB Pase-Turnover bei Überexpression von *GID1*. BY4743-Wildtypzellen wurden mit dem *GID1*-Überexpressionsplasmid pJR16 bzw. einem leeren Vektor (Kontrolle) transformiert, unter Standardbedingungen angezogen und einer Westernblot Analyse unterzogen.

Wie in Abb. 29 ersichtlich, hatte die Überexpression des *GID1*-Gens mit pJR16 keinen Einfluß auf den FB Pase-Turnover in BY4743-Zellen. Die gleichen Befunde wurden mit den Stämmen JK9-3da und W303 erzielt (Daten nicht gezeigt).

Bei Verwendung des *GID1*-Überexpressionsplasmids pAE8-1 (2.4.3.8.1) wurde in den Hefestämmen BY4743 und JK9-3da eine leicht verzögerte Kinetik der FB Pase-Turnovers beobachtet (Daten nicht gezeigt), die jedoch auf einen geringfügig erhöhten FB Pase-„steady-state level“ in ethanoldereprimierten Zellen ($t = 0$ min) zurückgeführt werden könnte. Die Überexpression von *GID1* mit pAE8-1 hatte keinen Einfluß auf den FB Pase-Turnover in den Deletionsstämmen *gid2* Δ bis *gid7* Δ (Daten nicht gezeigt). Analoge Messungen mit *gid8* Δ [pAE8-1] und *gid9* Δ [pAE8-1] wurden nicht durchgeführt.

3.2.3.2 Westernblot Analyse mit einer *cdc73* Δ -Mutante

Eine *gid1 cdc73*-Doppeldelation ist synthetisch letal (Tong et al., 2004), was auf eine potentielle genetische Interaktion von *GID1* und dem *CDC73*-Gen schließen läßt.

Cdc73p wird u. a. eine Funktion als Transkriptionsfaktor zugeschrieben. Um eine mögliche Beteiligung von Cdc73p beim FBPase-Abbau zu untersuchen, wurde die Proteolyserate des Enzyms in der *cdc73*-Nullmutante Y35326 gemessen (Daten nicht gezeigt). In einem Westernblot konnte bei diesem Stamm keine Beeinträchtigung der FBPase-Hydrolyse festgestellt werden.

3.2.3.3 Einfluß des Tor-Inhibitors Rapamycin auf das Wachstum von Hefezellen

Die Tor-Proteine („*target of rapamycin*“) gehören zu einer evolutionär hoch konservierten Klasse von Phosphatidylinositol-verwandten Proteinkinasen (Schmelzle und Hall, 2000; Raught et al., 2001). In Abhängigkeit des Nährstoffangebots koordinieren sie das Gleichgewicht von Proteinsynthese und Proteinabbau und kontrollieren dadurch das Zellwachstum. Die Hefegene *TOR1* und *TOR2* kodieren für zwei homologe Proteine (70 % Identität) mit einem Molekulargewicht von etwa 280 kDa. Mit der Droge Rapamycin (isoliert aus *Streptomyces hygroscopicus*) können die Tor-Kinasen selektiv inhibiert werden. In der Zelle bindet das makrocyclische Lacton an einen Rezeptor (in der Hefe: Fpr1p) unter Ausbildung eines Fpr1p-Rapamycin Komplexes, welcher mit der Fpr1p-Rapamycin Bindedomäne der Tor-Proteine interagieren und dadurch ihre Funktion unterdrücken kann. Die Hefemutanten *tor1-1* und *tor2-1* tragen eine Punktmutation in der Fpr1p-Rapamycin-Bindedomäne, wodurch eine Wechselwirkung mit dem Komplex nicht mehr möglich ist. Diese Stämme sind deshalb rapamycinresistent.

Gid1p wurde in mehreren voneinander unabhängigen 2-Hybrid Studien von der Hall-Arbeitsgruppe (Biozentrum Universität Basel, Schweiz) als Interaktionspartner von Tor1p und Tor2p identifiziert (Michael N. Hall, persönliche Mitteilung). Eine Wechselwirkung konnte durch eine co-Immunopräzipitation jedoch nicht bestätigt werden. Hierzu ist anzumerken, daß keine geeigneten Konstrukte vorlagen, um dies unter physiologischen Bedingungen der FBPase-Inaktivierung zu überprüfen. Weiterführende Experimente (Eugster, Diplomarbeit 1997), bei denen die Überexpression von *GID1* in den rapamycinresistenten Hefestämmen *tor1-1* und *tor2-1* sowie der Einfluß von Rapamycin (und Coffein) auf das Wachstum einer *tor1Δ*

gid1Δ-Doppelmutante untersucht wurden, führten zu der Annahme, daß eine genetische Interaktion zwischen *GID1* und den *TOR*-Genen vorliegen könnte. Dies wurde durch folgende Beobachtungen begründet:

a) Auf YPD-Platten können Zellen der Stämme JK9-3da (Wildtyp) und AE7-6c (*gid1Δ*) in Gegenwart von bis zu 5 ng/ml Rapamycin bzw. 3 mM Coffein bei 30 °C ohne größere Schwierigkeiten wachsen. *tor*-Mutanten zeichnen sich dagegen durch eine Rapamycin- bzw. Coffeinsensitivität aus. Diese äußert sich dadurch, daß z. B. *TOR1*-deletierte Zellen bei einer Rapamycinkonzentration von 2,5 ng/ml bzw. einer Coffeinkonzentration von 3 mmol/l nicht mehr lebensfähig sind. Im Gegensatz dazu verhielt sich eine *tor1Δ gid1Δ*-Doppelmutante bei Wachstumstests wie der isogene Wildtyp.

b) Die rapamycinresistenten Mutanten *tor1-1* und *tor2-1* wurden bei Überexpression von *GID1* rapamycinsensitiv. Während diese Stämme normalerweise Rapamycinkonzentrationen von 50 ng/ml überleben können, führte die Überexpression von *GID1* bereits bei einer Konzentration von 10 ng/ml zu einem stark verlangsamten Zellwachstum.

Um diese Befunde zu verifizieren wurden die von Anne C. Eugster verwendeten Hefestämme unter den beschriebenen Bedingungen untersucht (Daten nicht gezeigt):

a) Die Stämme JK9-3da (Wildtyp), AE7-6c (*gid1Δ*), MH349-3d (*tor1Δ*) und AN1-3C (*tor1Δ gid1Δ*) wurden auf YPD-Platten mit steigenden Rapamycinkonzentrationen (1-10 ng/ml) bzw. Coffeinkonzentrationen (3-13 mmol/l) auf Einzelkolonien ausgestrichen und 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Bei *TOR1*-deletierten Zellen wurde bei einer Rapamycinkonzentration von 2,5 ng/ml ein stark reduziertes Wachstum festgestellt. Ein vergleichbarer Phänotyp trat beim Wildtyp und der *gid1Δ*-Mutante erst bei einer Konzentration von 5 ng/ml auf. Der oben beschriebene Phänotyp für die *tor1Δ gid1Δ*-Mutante konnte jedoch nicht bestätigt werden. Bei der Doppelmutante wurde bereits bei einer Rapamycinkonzentration von 2,5 ng/ml ein starker Wachstumsdefekt festgestellt. Die Wachstumstests mit Coffein führten ebenfalls zu widersprüchlichen Resultaten. Die *tor1Δ gid1Δ*-Doppelmutante verhielt sich auch hier nicht wie der isogene Wildtyp, sondern wie *TOR1*-deletierte Zellen.

b) Der Stamm JH11-1c (*tor1-1*) wurde mit dem *GID1*-Überexpressionsplasmid pAE8-1 (2.4.3.8.1) und dem Ausgangsvektor ohne Insert (YEplac195) transformiert und auf CM-Platten ohne Uracil mit steigenden Rapamycinkonzentrationen (bis 40 ng/ml) auf Einzelkolonien ausgestrichen. Selbst bei einer Konzentration von 40 ng/ml hatte die Überexpression von *GID1* keinen Einfluß auf das Wachstum der *tor1-1*-Mutante.

Die in der Diplomarbeit von Anne C. Eugster beschriebenen Wachstumsphänotypen und die daraus abgeleiteten Schlußfolgerungen erwiesen sich somit als falsch. Dies wurde von der Hall-Gruppe nochmals überprüft und bestätigt (Michael N. Hall, persönliche Mitteilung).

3.2.3.3.1 Einfluß von Rapamycin auf den Abbau der FBPase

Um eine potentielle Beteiligung der Tor-Kinasen bei der Katabolitinaktivierung der FBPase zu überprüfen, wurde die Kinetik des FBPase-Abbaus in Gegenwart der Droge Rapamycin in einer Immunoblot Analyse untersucht. Hierzu wurden Kulturen der Stämme JK9-3da (Wildtyp) und JH11-1c (*tor1-1*) 10-15 Minuten vor dem Umsetzen in glucosehaltiges Medium in zwei Hälften aufgeteilt und jeweils einer Probe 0,4 µg/ml Rapamycin (+ Rap.) zugesetzt. Nach Einleitung der Degradation wurde zu den angegebenen Zeiten Proben gezogen und die FBPase mit spezifischem FBPase-Antikörper detektiert (Abb. 30A,B).

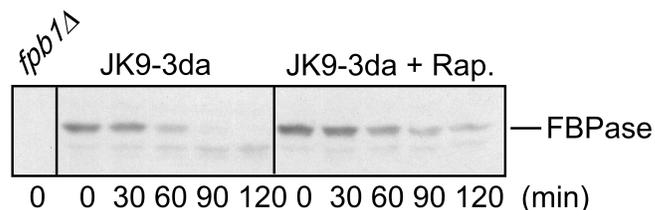


Abb. 30A: Einfluß der Droge Rapamycin auf die FBPase-Proteolyse im Wildtypstamm JK9-3da. Die Zellen wurden unter Standardbedingungen angezogen, 10-15 min vor dem Umsetzen in glucosehaltiges Medium ($t = 0$ min) in zwei Hälften aufgeteilt und einer Probe 0,4 µg/ml Rapamycin (+ Rap.) zugesetzt. Dann wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen und eine Westernblot Analyse durchgeführt.

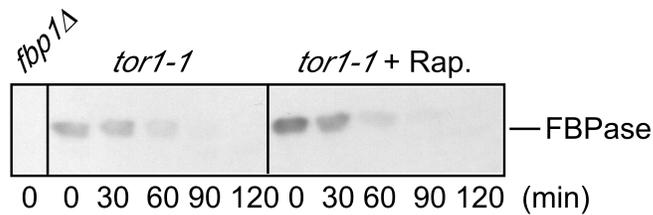


Abb. 30B: Einfluß von Rapamycin (+ Rap.) auf die FBPase-Proteolyserate in der rapamycinresistenten *tor1-1*-Mutante JH11-1c.

Wie in Abb. 30A ersichtlich, hatte die Zugabe von Rapamycin zu JK9-3da-Wildtypzellen eine verzögerte FBPase-Hydrolyse zur Folge. Bei der rapamycinresistenten *tor1-1*-Mutante JH11-1c war dies jedoch nicht der Fall (Abb. 30B). Damit konnte gezeigt werden, daß der durch Rapamycin hervorgerufene Effekt durch eine spezifische Inhibierung der Tor-Proteine begründet ist.

Um eine Fehlinterpretation der Immunoblot Analysen auszuschließen, erfolgte eine Pulse Chase Quantifizierung (Abb. 31A,B). Es war nämlich nicht auszuschließen, daß Rapamycin lediglich die FBPase-Repression beeinflusst, die Degradation des Enzyms jedoch nicht beeinträchtigt ist. Dies könnte in einem Westernblot eine verzögerte Kinetik der FBPase-Proteolyse vortäuschen. Zellen des Stammes JK9-3da wurden während der Derepression der FBPase mit ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert (Pulse). 10-15 Minuten vor dem Umsetzen in nichtradioaktives, glucosehaltiges Medium (Chase) wurde die Kultur in zwei Hälften aufgeteilt und einer Probe 0,4 $\mu\text{g/ml}$ Rapamycin zugesetzt. Nach Einleitung der Katabolitinaktivierung wurde zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen, die Zellen unter denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen und die FBPase mit FBPase-Antikörper immunopräzipitiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der erhaltenen Präzipitate, wurde der FBPase-Abbau durch Detektion des radioaktiv markierten Proteins mit einem Phosphorimager (Molecular Dynamics) quantifiziert (Abb. 31B).

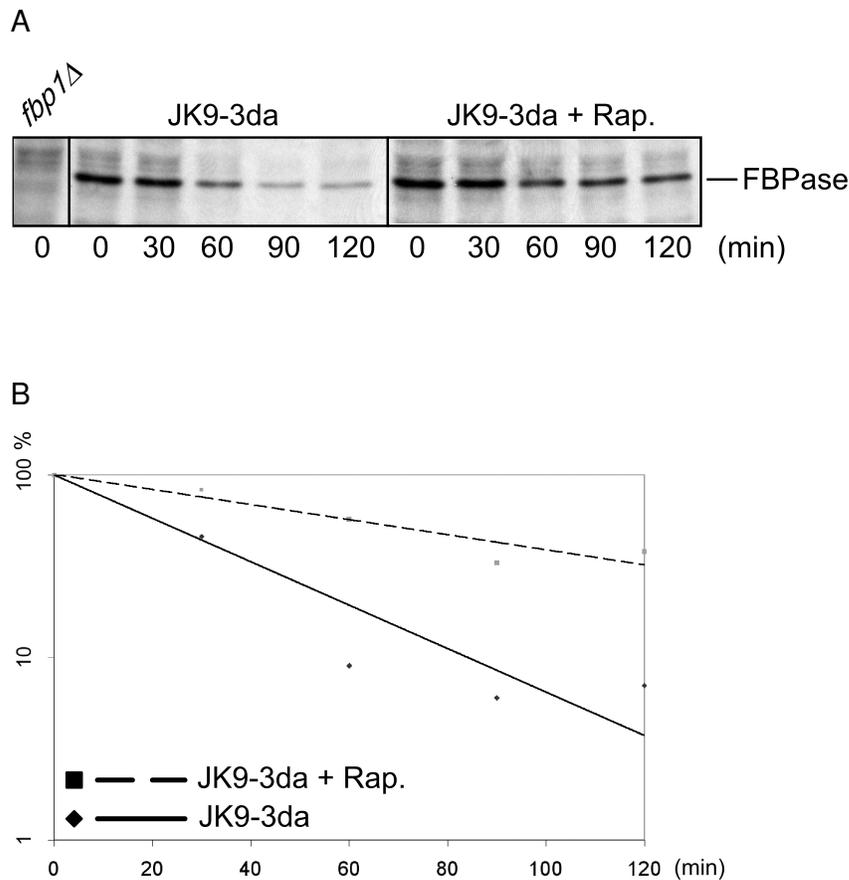


Abb. 31: Pulse Chase Analyse der glucoseinduzierten Katabolitinaktivierung der FBPase von rapamycinbehandelten Wildtypzellen. Zellen des Stammes JK9-3da wurden unter Standardbedingungen angezogen, 10-15 min vor dem Umsetzen ins Chase-Medium in zwei Hälften aufgeteilt und einer Probe 0,4 µg/ml Rapamycin (+ Rap.) zugesetzt (31A). Quantifizierte Abnahme der radioaktiv markierten FBPase (31B).

In JK9-3da-Zellen, die wenige Minuten vor Einleitung der Katabolitinaktivierung mit Rapamycin supplementiert wurden, wurde eine FBPase-Halbwertszeit von etwa 60-65 Minuten gemessen (Abb. 31A,B). Dies entspricht einer zwei- bis zweieinhalbfach verlangsamten Proteolyserate im Vergleich zu Wildtypzellen, die der Droge nicht ausgesetzt waren (Halbwertszeit 25-30 Minuten). Durch die selektive Inhibierung der Tor-Proteine mit Rapamycin konnte damit eine Beteiligung dieser Proteinkinasen am Ubiquitin-Proteasom-katalysierten FBPase-Abbau eindeutig nachgewiesen werden.

3.2.3.3.2 FBPase-Turnover in einer *msn2/4*Δ, *tap42-11*- und *sit4*Δ-Mutante

Die Tor-Proteine regulieren u. a. die Phosphatase Sit4p, was über eine Assoziation mit dem Inhibitor Tap42p kontrolliert wird. Die Aktivität der Tor-Kinase bzw. Sit4p-Phosphatase spielt beispielsweise eine wichtige Rolle bei der Kerntranslokation des GATA-Transkriptionsfaktors Gln3p, wodurch die Transkription unter Stickstofflimitierung kontrolliert wird. Auch die kohlenstoffquellenabhängige Expression von Genen wird vom Tor-Weg beeinflusst, was durch eine Bindung der Transkriptionsaktivatoren Msn2p und Msn4p an Bmh2p stimuliert wird.

Der Einfluß einer *bmh1 bmh2*-Doppeldelektion auf den FBPase-„steady-state-level“ wurde in Kapitel 3.1.3 bereits beschrieben. Ergänzend wurden Westernblot Analysen mit einer *msn2*Δ-, *msn4*Δ- und einer *msn2*Δ *msn4*Δ-Mutante durchgeführt. In diesen Stämmen konnte ein mit dem Wildtyp vergleichbarer FBPase-Turnover beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Interessante Phänotypen lieferten die temperatursensitive *tap42-11*-Mutante TS19-4a und der *sit4*-Deletionsstamm TS64-1a (Abb. 32). In *tap42-11*-Zellen war sowohl bei permissiver (25 °C) als auch bei restriktiver Temperatur (37°C) der FBPase-„steady-state level“ im Vergleich zum isogenen Wildtyp (JK9-3da) drastisch reduziert. Dadurch kann das extrem schlechte Wachstum dieser Punktmutante in Gegenwart von Ethanol als Kohlenstoffquelle erklärt werden. Bei der *sit4*Δ-Mutante TS64-1a war die FBPase-Menge in ethanoldereprimierten Zellen (t = 0 min) ebenfalls signifikant erniedrigt, was sich wiederum durch einen Wachstumsdefekt in Gegenwart einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle bemerkbar machte. Außerdem könnte man den Eindruck gewinnen, daß die FBPase in *SIT4*-deletierten Zellen nach Glucosegabe verlangsamt abgebaut wird, wobei dies aber möglicherweise einen indirekten Effekt darstellt.

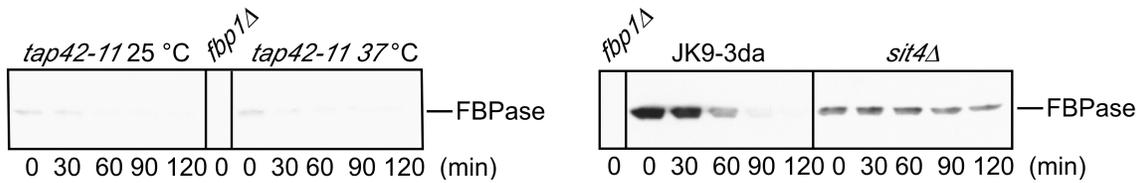


Abb. 32: Immunoblot Analysen mit den Stämmen TS19-4a (*tap42-11^{ts}*), JK9-3da (Wildtyp) und TS64-1a (*sit4Δ*). Die Zellen wurden unter Standardbedingungen (*) angezogen und die Kinetik des FBPase-Abbaus nach Umsetzen in glucosehaltiges Medium verfolgt.

*: Die temperatursensitive *tap42-11*-Mutante wurde 16 h in YPEtOH bei 25 °C geschüttelt. 30 min vor Einleitung der Katabolitinaktivierung wurde die Hälfte der Kultur bei permissiver (25 °C), die andere Hälfte bei restriktiver Temperatur (37 °C) inkubiert. Nach Umsetzen in YPD-Medium wurden die Zellen bei den oben angegebenen Temperaturen kultiviert.

3.2.4 *In situ* Tests der peptidspaltenden Aktivitäten des Proteasoms mit einer *gid1*-Deletionsmutante

In einer früheren Arbeit wurden die peptidspaltenden Aktivitäten des Proteasoms in Rohextraktion einer *gid1*-, *gid2*- bzw. *gid3*-Punktmutante gemessen (Hämmerle et al., 1998). Für diese Stämme wurde nachgewiesen, daß der Defekt im FBPase-Abbau nicht auf eine Reduktion in der Trypsin-ähnlichen, Chymotrypsin-ähnlichen oder PGPH-Aktivität des 20S-Proteasoms zurückgeführt werden kann. Diese Befunde sollte mit einem *in situ* Overlaytest bestätigt werden. Hierbei werden die zu testenden Stämme mit artifiziellen, proteasomalen, Testsubstraten überschichtet (Overlay). Das Ausbleiben einer Farbreaktion ist ein Hinweis auf eine reduzierte/fehlende proteasomale Aktivität.

Die *gid1Δ*-Mutante Y34594, der isogene Wildtypstamm BY4743 und alle weiteren *gid*-Nullmutanten (*gid2Δ* bis *gid9Δ*) wurden auf drei YPD-Platten angezogen und für die drei peptidspaltenden Aktivitäten ein Overlaytest durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Als Kontrollen wurden eine *pup1*- (Defekt in der Trypsin-ähnlichen Aktivität), *pre2*- (Defekt in der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität) bzw. *pre3*-Mutante (Defekt in der PGPH-Aktivität) verwendet. In allen Fällen konnte beim Wildtyp und den Deletionsstämmen *gid1Δ* bis *gid9Δ* das Auftreten einer Farbreaktionen beobachtet werden, wodurch ein Defekt in den peptidspaltenden Aktivitäten des 20S-

Proteasoms ausgeschlossen werden konnte. Die Kontrollstämme *pup1*, *pre2* und *pre3* können die artifizialen Testsubstrate nicht spalten, so daß erwartungsgemäß keine Farbreaktion stattfand.

3.2.5 Überexpression von *HEL48-HA₂* in *GID1*-deletierten Zellen

Hel48p/Far10p wurde in einem sogenannten „High Expression Lethality (HEL)“ Screen als ein Substrat des 26S-Proteasoms identifiziert (Velten, Dissertation 2000). In Wildtypzellen ist Hel48p proteolytisch instabil, dagegen wird es in einer *pre1-1 pre4-1*-Doppelmutante stabilisiert. Bei Mutanten, bei denen das 26S-Proteasom nicht intakt ist, führt die Überexpression von *HEL48* aufgrund der Anreicherung des Genprodukts in der Zelle zu einem stark verlangsamten Wachstum bzw. im Extremfall zum Zelltod (sogenannter „HEL-Effekt“).

Im Folgenden wurde eine *gid1Δ*-Mutante bezüglich eines „HEL“-Phänotyps untersucht. Hierzu wurden die Stämme WCG4a, YJR13 (*gid1Δ*), YHI29-1 (*pre1-1*) und YHI29-14 (*pre1-1 pre4-1*) mit den Plasmiden pYES2-HAC (2.4.3.7) bzw. pIV48-HAC (2.4.3.7.1) transformiert und das Wachstum auf galactose- und glucosehaltigen CM-Platten ohne Uracil untersucht (Daten nicht gezeigt). pIV48-HAC enthält die Sequenz für ein Ha-Epitop-markiertes, biologisch aktives, Hel48p-Fusionsprotein (Hel48-Ha₂), das sich in der „Multiple Cloning Site“ des Ausgangsvektors pYES2-HAC befindet. *HEL48-HA₂* ist unter Kontrolle des galactoseinduzierbaren *GAL1*-Promotors und wird in Gegenwart von Glucose reprimiert.

Die Überexpression von *HEL48-HA₂* führte im Wildtyp und in der *gid1*-Deletionsmutante zu einem vergleichbaren, lediglich geringfügig verlangsamten, Wachstum. Dies kann dadurch erklärt werden, daß sich auch für Zellen mit intakter Proteinabbaumaschinerie die erhöhte Konzentration von Hel48-Ha₂ negativ auswirkt. Für die Proteasomenmutanten *pre1-1* und *pre1-1 pre4-1* war die Überexpression jedoch letal.

Weiterführend wurde ein Promotor „shut-off“ Experiment (Velten, Dissertation 2000) durchgeführt. Logarithmische Flüssigkulturen der Stämme WCG4a [pYES2-HAC] (Kontrolle), WCG4a [pIV48-HAC] und *gid1Δ* [pIV48-HAC] wurden nach mehreren Waschschritten in galactosehaltigem Selektionsmedium aufgenommen und zur Induktion des *GAL1*-Promotors 3,5 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die Transformanten in glucosehaltiges CM-Medium inkl. 100 µg/ml Cycloheximid umgesetzt (Promotor „shut-off“) und zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen. Die Zellen wurden denaturierend aufgeschlossen und Hel48-Ha₂ in einer Westernblot Analyse mit spezifischem Ha-Antikörper detektiert (Abb. 33).

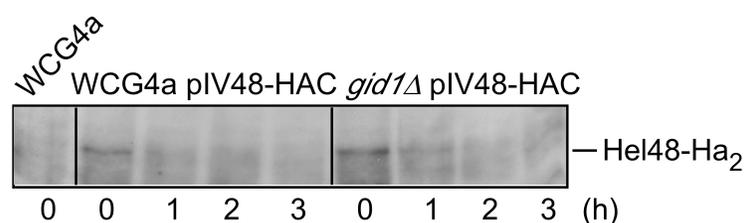


Abb. 33: Messung des Hel48-Ha₂-Abbaus in der *gid1*-Nullmutante YJR13 und dem isogenen Wildtyp (WCG4a) in einem Promotor „shut-off“ Experiment. Das Plasmid pIV48-HAC kodiert für ein funktionelles Hel48-Ha₂-Fusionsprotein unter Kontrolle des *GAL1*-Promotors, welcher durch Galactose induziert und Glucose reprimiert wird. Kontrolle: WCG4a [pYES2-HAC]-Zellen.

Wie Abb. 33 zeigt, ist die Kinetik der Hel48-Ha₂-Proteolyse in der *gid1Δ*-Mutante mit der des isogenen Wildtyps vergleichbar. In einem mit dem leeren Ausgangsvektor transformierten Wildtypstamm war erwartungsgemäß keine Bande detektierbar. In *GID1*-defizienten Zellen ist die Aktivität des 26S-Proteasoms somit aller Wahrscheinlichkeit nicht beeinträchtigt.

3.2.6 *In vivo* Ubiquitinierung der FB Pase in *GID1*-deletierten Zellen

Die Ubiquitinmarkierung der FB Pase ist Voraussetzung für die Erkennung und den proteolytischen Abbau durch das 26S-Proteasom (Schork et al., 1995; Schüle et al., 2000). Um einen weiteren Hinweis bezüglich des Wirkorts von Gid1p bei der

glucoseinduzierten Katabolitinaktivierung zu erhalten, wurde die *in vivo* Ubiquitinierung der FBPase in einer *gid1Δ*-Mutante untersucht.

YPD-Übernachtskulturen des *gid1*-Deletionsstammes Y34594 und des isogenen Wildtyps (BY4743) wurden mit Wasser gewaschen und zur Derepression der FBPase in YPEtOH-Medium aufgenommen. Nach sechs Stunden Inkubation wurde die Katabolitinaktivierung durch Zugabe von Glucose (2 % Endkonzentration) eingeleitet und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Nach Aufschluß der Zellen wurde die FBPase mit spezifischem FBPase-Antikörper immunopräzipitiert und die erhaltenen Präzipitate elektrophoretisch aufgetrennt. Der immunologische Nachweis von FBPase-Ubiquitinkonjugaten erfolgte nach Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mit spezifischem Ubiquitin-Antikörper (Abb. 34).

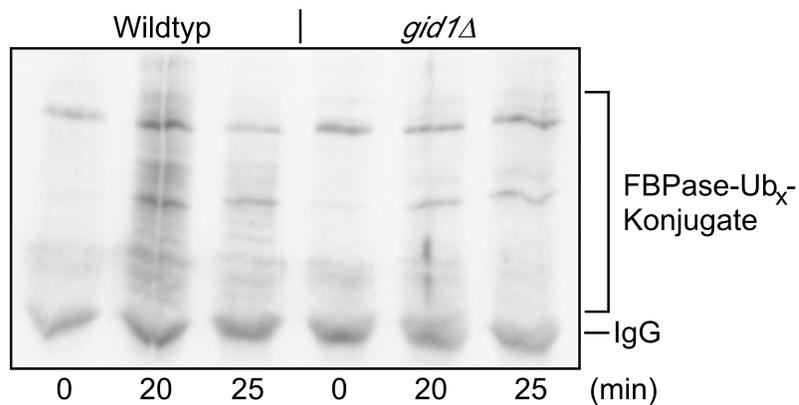


Abb. 34: *In vivo* Ubiquitinierung der FBPase nach Glucosegabe zu ethanoldereprimierten Zellen ($t = 0$ min). Elektrophoretisch aufgetretene FBPase-Immunopräzipitate der *gid1Δ*-Mutante Y34594 und des isogenen Wildtyps (BY4743) wurden mit spezifischem Ubiquitin-Antikörper detektiert.

In BY4743-Wildtypzellen konnte 20 Minuten nach Einleitung der Katabolitinaktivierung eine Anreicherung von FBPase-Ubiquitinkonjugaten nachgewiesen werden (Abb. 34). Bereits 25 Minuten nach Glucosegabe zu ethanoldereprimierten Zellen ($t = 0$ min) ist eine merkliche Abnahme aufgrund der Hydrolyse des Enzyms zu erkennen (Halbwertszeit: 20-30 Minuten). In *GID1*-

deletierten Zellen konnte kein mit dem Wildtyp vergleichbares Bandenmuster festgestellt werden. Die Konzentration der Konjugate ist drastisch reduziert, was auf direkte oder indirekte Beteiligung von Gid1p bei der Ubiquitinmarkierung der FBPase schließen läßt.

3.2.7 Abhängigkeit des Gid4p/Vid24p-Turnovers von Gid1p

Gid4p/Vid24p ist für die Katabolitinaktivierung der FBPase essentiell (3.1.2). Turnovermessungen zeigten, daß das Protein ca. 10 bis 20 Minuten nach Glucosegabe zu dereprimierten Zellen synthetisiert wird und die Konzentration nach etwa 60 Minuten drastisch abnimmt (Chiang und Chiang, 1998; Josupeit, Dissertation 2003). Aufgrund der Verfügbarkeit eines polyklonalen Vid24-Antikörpers (Josupeit, Dissertation 2003) wurde ein möglicher Einfluß von Gid1p auf den Gid4p/Vid24p-Turnover untersucht. Hierzu wurden Zellen der *gid1* Δ -Mutante Y34594 und des isogenen Wildtyps (BY4743) unter Standardbedingungen angezogen, nach Glucosegabe zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen und einer Westernblot Analyse unterworfen. Das antigene Material wurde mit Vid24-Antikörper detektiert (Abb. 35).

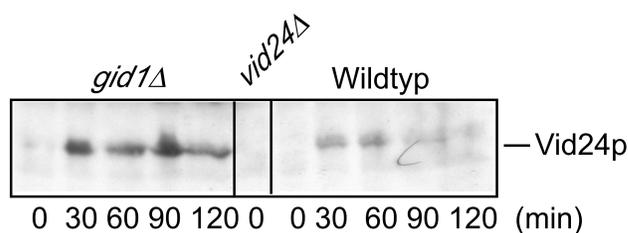


Abb. 35: Gid4p/Vid24p-Turnover in *GID1*-deletierten Zellen (Y34594) und im BY4743-Wildtypstamm. Es wurden Rohextrakte von ethanol-dereprimierten Zellen ($t = 0$ min) und von verschiedenen Zeitpunkten nach Glucosegabe hergestellt, auf Nitrocellulose transferiert und mit Vid24-Antikörper angefärbt.

Wie in Abb. 35 ersichtlich ist der Gid4p/Vid24p-Turnover in der *gid1*-Nullmutante Y34594 nicht mit dem des Wildtyps vergleichbar. Zum einen ist der „steady-state

level“ von Gid4p/Vid24p im *gid1Δ*-Stamm deutlich erhöht, auf der anderen Seite ist selbst 120 Minuten nach Glucosegabe zu ethanoldereprimierten Zellen ($t = 0$ min) keine merkliche Abnahme des antigenen Materials zu beobachten. Dieser Phänotyp konnte mit Hilfe des *GID1*-Überexpressionsplasmids pAE8-1 (2.4.3.8.1) komplementiert werden (Daten nicht gezeigt). Analoge Ergebnisse wurden im JK9-3da-Stammhintergrund erhalten (Daten nicht gezeigt).

3.2.8 HA-Epitopmarkierung von *GID1*

Zur Detektion von Gid1p sollten Ha-epitopmarkierte Fusionsproteine (Gid1-Ha₃, Ha-Epitop des Influenzavirus), gegen die ein kommerziell erhältlicher Antikörper verfügbar ist, hergestellt werden. Da sich die Fusion mit einem Peptid unter Umständen negativ auf die Aktivität eines Proteins auswirken kann, wurden die hergestellten Konstrukte im Anschluß auf ihre biologische Funktionalität überprüft.

3.2.8.1 Genomische Integration einer HA₃-HIS5-Kassette zur Erzeugung einer C-terminalen Epitopmarkierung von *GID1* (YJR12)

Da bereits mehrere funktionelle Ha-„getaggte“ Gid-Fusionsproteine im W303-Stammhintergrund zur Verfügung standen (Schüle, Dissertation 2000), wurde dieser Hefestamm zur C-terminalen Epitopmarkierung von *GID1* ausgewählt. Als Template zur Synthese der 1,6 kbp großen HA₃-HIS5-Integrationskassette diente das Plasmid p3XHA-HIS5 (2.4.3.1). Dieser Vektor enthält u. a. ein HA-Tridem und das aus *Schizosaccharomyces pombe* stammende HIS5-Markergen, welches HIS3 in *Saccharomyces cerevisiae* entspricht. Für die PCR wurden die Oligonucleotide P1 GID1-HA3-HIS5-Int und P2 GID1-HA3-HIS5-Int (2.4.4) so gewählt, daß die HA₃-HIS5-Kassette flankierende Bereiche von *GID1* enthielt. Damit sollte das Stoppcodon des *GID1*-Gens in einer homologen Rekombination durch das HA-Tridem und das HIS5-Markergen ersetzt werden (Abb. 36).

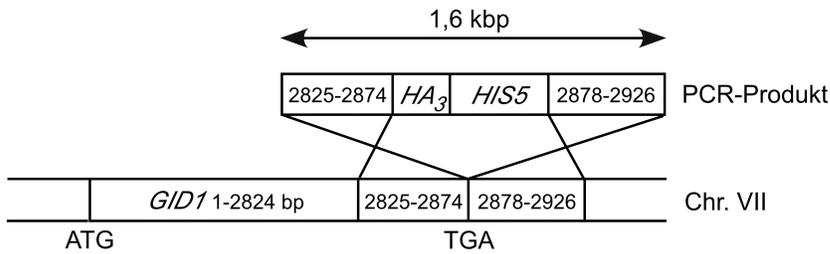


Abb. 36: Integration einer HA_3 - $HIS5$ -Kassette ins Genom des Hefestammes W303 zur Erzeugung von YJR12 ($GID1$ - HA_3 :: $HIS5^{S. pombe}$). Durch zwei homologe Rekombinationsprozesse wird das Stopp-Codon (TGA) durch ein HA -Tridem und das $HIS5$ -Markergen ersetzt.

Nach der Hefetransformation mit der Integrationskassette wurden die Zellen auf CM-Platten ohne Histidin selektioniert. Daraufhin wurden fünf histidinprototrophe Klone isoliert, unter Standardbedingungen der Katabolitinaktivierung angezogen und auf Expression von $GID1$ - HA_3 in einem Westernblot überprüft (Daten nicht gezeigt). In vier der Klone (Nr. 2, 3, 5 und 9) konnte mit Ha-Antikörper ein Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht detektiert werden. Diese Klone wurden einer Southernblot Analyse unterzogen (3.2.8.2).

3.2.8.2 Southernblot Analyse zur Überprüfung der HA_3 - $HIS5$ -Integration

Um die korrekte Integration der HA_3 - $HIS5$ -Kassette am $GID1$ -Genlocus zu überprüfen und eine Mehrfachintegration auszuschließen, wurde ein Southernblot durchgeführt (Abb. 37). Hierzu wurde die chromosomale DNA der vier in 3.2.8.1 isolierten Klone sowie des W303-Wildtypstammes (Kontrolle) einem Bgl // Pst -Doppelverdau unterworfen. In einem zweiten Ansatz wurden die Restriktionsenzyme Bgl und Nco verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die DNA-Proben auf eine Nylonmembran geblottet und fixiert. Bei korrekter Integration waren bei Verwendung einer $HIS5$ -Sonde drei Fragmente mit 4, 0,7 und 0,6 kbp (Bgl // Pst -Verdau) bzw. zwei Fragmente mit 3,1 und 1 kbp (Bgl // Nco -Verdau) zu erwarten.

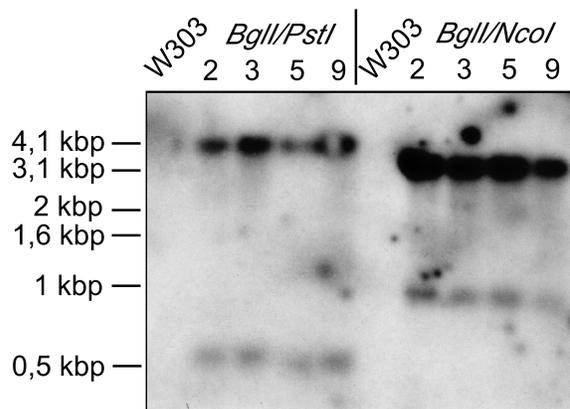


Abb. 37: Southernblot Analyse der HA_3 - $HIS5$ -Integration am $GID1$ -Genlocus. Aus den Klonen 2,3,5 und 9 sowie dem Ausgangsstamm W303 wurde chromosomale DNA isoliert, mit den Restriktionsenzymen $BglII/PstI$ bzw. $BglII/NcoI$ verdaut und die DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Nylonmembran überführt. Die Detektion erfolgte mit einer $HIS5$ -Sonde.

In allen getesteten Klonen konnte die korrekte Integration der HA_3 - $HIS5$ -Kassette nachgewiesen werden (Abb. 37). In der Kontrolle (W303) waren erwartungsgemäß keine DNA-Fragmente detektierbar. Der Hefestamm zur Expression von $GID1$ - HA_3 erhielt die Bezeichnung YJR12 ($W303$ $GID1$ - HA_3 :: $HIS5^{S. pombe}$). Für alle weiterführenden Experimente wurde Klon 2 verwendet.

3.2.8.3 Funktionalitätsüberprüfung des erzeugten $Gid1$ - Ha_3 -Fusionsproteins im Hefestamm YJR12

Der Nachweis der Funktionalität von $Gid1$ - Ha_3 erfolgte durch Messung der Kinetik des FBPase-Abbaus in Zellen des Stammes YJR12 ($GID1$ - HA_3) (Abb. 38). Die Zellen wurden unter Katabolitinaktivierungsbedingungen kultiviert und eine Immunoblot Analyse vorgenommen.

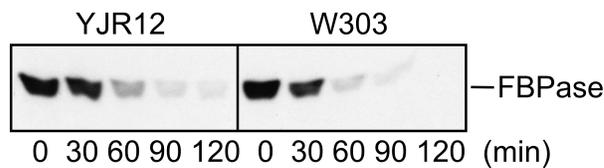


Abb. 38: Glucoseinduzierte Katabolitdegradation der FBPase in den Stämmen YJR12 (*W303 GID1-HA₃::HIS5^{S. pombe}*) und W303 (Wildtyp) zur Funktionalitätsüberprüfung von *Gid1-Ha₃*.

Wie in Abb. 38 ersichtlich ist die FBPase-Proteolyserate im Hefestamm YJR12 mit der des isogenen Wildtyps vergleichbar. Damit war der Nachweis der biologischen Funktionalität des *Gid1-Ha₃*-Fusionsproteins erbracht.

3.2.8.4 Herstellung eines *GID1-HA₃*-Expressionsplasmids (pJR15)

Unter Anwendung der „Gap Repair“ Methode sollte ein Plasmid zur Expression von *GID1-HA₃* unter seinem nativen Promotor hergestellt und bezüglich Funktionalität überprüft werden. Dazu wurde das *GID1*-Wildtypgen und das den *URA3*-Marker beherbergende Genbankplasmid pJR14 (2.4.3.4.1) mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *XbaI* verdaut, in den uracilautotrophen Hefestamm YJR12 (*GID1-HA₃::HIS5^{S. pombe}*) transformiert und auf CM-Platten ohne Uracil selektioniert. Durch den Doppelverdau wurde das *GID1*-Gen mit Überhängen auf beiden Seiten entfernt. Nur Klone, die die Lücke des linearisierten pJR14-Vektors geschlossen/aufgefüllt haben, können in uracilfreiem Medium überleben (Abb. 39).

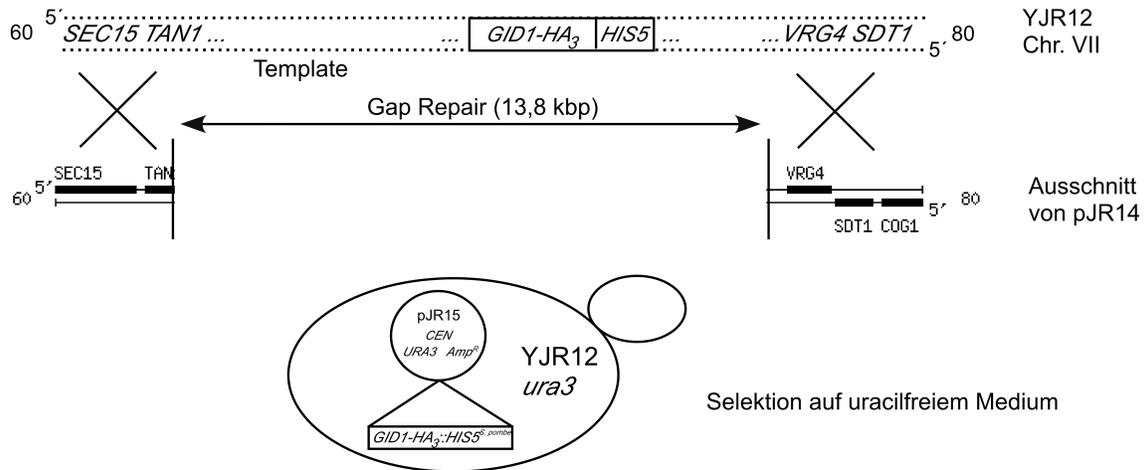


Abb. 39: Vorgehensweise zur Herstellung des *GID1-HA₃*-Expressionsvektors pJR15: Aus dem Plasmid pJR14 (*URA3 GID1*) wurde ein 13,8 kbp Fragment mit einem *SacI/XbaI*-Doppelverdau entfernt und die Lücke via „Gap Repair“ (2.6.12.3) nach Transformation in den Hefestamm YJR12 (*ura3 GID1-HA₃::HIS5^{S.pombe}*) aufgefüllt. Hierbei sollte die *GID1*-Wildtypversion durch *GID1-HA₃* und das *HIS5*-Markergen ersetzt werden. Der Nachweis wurde anschließend durch phänotypische Untersuchungen (*GID1-HA₃*-Expression, Test auf Uracil- bzw. Histidinprototrophie) erbracht.

Aus sechs uracilprototrophen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit einem *XbaI*-Verdau auf das Vorhandensein der *HA₃-HIS5*-Sequenz am C-Terminus des *GID1*-Gens überprüft. Das Auftreten eines 1,1 kbp großen DNA-Fragments in den Klonen 3 und 5, das im Ausgangsvektor pJR14 nicht vorhanden ist, war ein erster Hinweis dafür (Daten nicht gezeigt). Als nächstes wurde die Plasmid-DNA aus den positiv getesteten Klonen in die histidinauxotrophe *gid1*-Deletionsmutante Y34594 transformiert und auf CM-Platten ohne Histidin ausplattiert. Die Fähigkeit auf histidinfreiem Medium wachsen zu können war ein eindeutiger Beweis für das Vorhandensein des *HIS5*-Markergens aus *S. pombe*. Daraufhin wurden Zellen der Klone 3 und 5 unter Katabolitinaktivierungsbedingungen angezogen und einer Westernblot Analyse unterworfen. Mit spezifischem Ha-Antikörper konnte das Vorhandensein von Gid1-Ha₃ nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Das Plasmid zur Expression von *GID1-HA₃* erhielt die Bezeichnung pJR15 (2.4.3.4.3), für alle weiterführenden Experimente wurde Klon 3 verwendet.

Zur Funktionalitätsüberprüfung des Konstrukts wurde der FBPase-Abbau in *gid1Δ* [pJR15]-Zellen gemessen. Hierbei wurde ein im Vergleich zum Wildtyp geringfügig

verzögerter Abbau des Enzyms festgestellt (Abb. 40). Gid1-Ha₃ ist somit in der Lage, den Mutantenphänotyp der *gid1*-Nullmutante Y34594 (vollständig blockierter FBPase-Abbau) zu komplementieren.

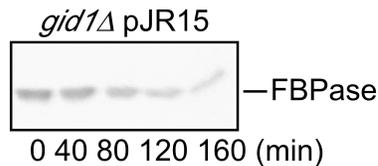


Abb. 40: Westernblot Analyse mit Y34594 (*gid1*Δ) [pJR15]-Zellen zur Funktionalitätsüberprüfung des *GID1-HA₃*-Expressionsvektors.

3.2.9 Gid1-Ha₃-Turnovermessungen

Bei einer Northern Analyse konnte *GID1*-mRNA in logarithmischen und stationären Kulturen in vergleichbaren Mengen nachgewiesen werden (Eugster, Diplomarbeit 1997). Um eine Aussage bezüglich der Abhängigkeit des Gid1p-„steady-state levels“ von den Wachstumsbedingungen und anderen Faktoren in der Hefezelle treffen zu können, wurde der Gid1-Ha₃-Proteinturnover mit Hilfe der Konstrukte YJR12 (3.2.8.1) und pJR15 (3.2.8.4) unter den in den Folgekapiteln beschriebenen Bedingungen untersucht.

3.2.9.1 Gid1-Ha₃-Turnover bei verschiedenen Wachstumsbedingungen

Um zu überprüfen, unter welchen Wachstumsbedingungen Gid1p in der Zelle vorliegt wurden Rohextrakte von logarithmischen und stationären YPD-Kulturen sowie von ethanoldeprimierten Zellen des Hefestammes YJR12 (*GID1-HA₃*) hergestellt und Gid1-Ha₃ nach Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran mit spezifischem Ha-Antikörper detektiert (Abb. 41).

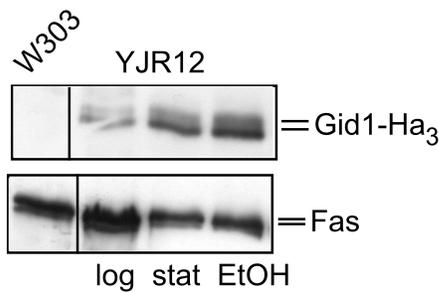


Abb. 41: Zelluläre Gid1-Ha₃-Konzentrationen bei verschiedenen Wachstumsbedingungen. Logarithmische (log) und stationäre (stat) YPD-Kulturen sowie ethanoldereprimierte Zellen (EtOH) des Stammes YJR12 (*W303 GID1-HA₃*) wurden denaturierend aufgeschlossen und Gid1-Ha₃ nach SDS-PAGE/Westernblot mit Ha-Antikörper detektiert. Als Kontrolle wurde ein Rohextrakt von ethanoldereprimierten W303-Zellen, die kein *GID1-HA3* exprimieren, aufgetragen. Ladekontrolle: Fettsäuresynthase (Fas).

Wie in Abb. 41 ersichtlich, war in einer logarithmisch gewachsenen YJR12-Kultur (log) vergleichsweise wenig Gid1-Ha₃ vorhanden. Nach Verbrauch der Glucose im Medium (stat. YPD-Kultur) oder bei Wachstum in Gegenwart von Ethanol (EtOH) als Kohlenstoffquelle wurde ein wesentlich höherer „steady-state level“ des Fusionsproteins nachgewiesen. Unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen liegt Gid1-Ha₃ demnach verstärkt in der Zelle vor. Desweiteren konnte das Auftreten einer Doppelbande beobachtet werden, was entweder für eine Proteinmodifikation oder ein Degradationsprodukt spricht.

Als nächstes wurde der Proteinturnover von Gid1-Ha₃ unter FBPase-Inaktivierungsbedingungen gemessen (Abb. 42). Hierzu wurden ethanoldereprimierte YJR12-Zellen in glucosehaltiges Medium umgesetzt, zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen und eine Westernblot Analyse durchgeführt. Zum Vergleich der Proteinkonzentrationen wurden parallel dazu Rohextrakte von logarithmischen und stationären YPD-Kulturen hergestellt.

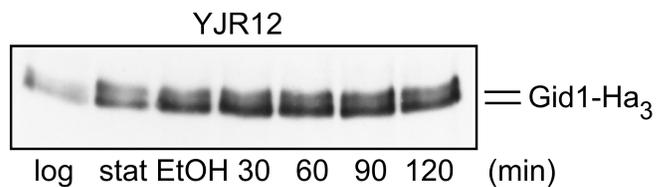


Abb. 42: Gid1-Ha₃-Turnover nach Glucosegabe zu ethanoldereprimierten Zellen (EtOH). Der Hefestamm YJR12 (*W303 GID1-HA₃*) wurde unter Standardbedingungen der FBPase-Inaktivierung angezogen und nach Umsetzen in glucosehaltiges Medium Proben zu den angegebenen Zeitpunkten gezogen. Anschließend wurden Rohextrakte hergestellt, auf eine NC-Membran transferiert und mit Ha-Antikörper angefärbt. Zum Konzentrationsvergleich wurden Rohextrakte von logarithmisch (log) und stationär (stat) gewachsenen YPD-Kulturen aufgetragen.

Nach Glucosegabe zu ethanoldereprimierten YJR12-Zellen (EtOH) konnte über einen Zeitraum von zwei Stunden keine merkliche Abnahme des Gid1-Ha₃-Proteinspiegels beobachtet werden (Abb. 42). Dies ist ein weiterer Beleg für die wichtige Rolle von Gid1p bei der glucoseinduzierten Katabolitdegradation der FBPase bzw. beim Umschalten von der Gluconeogenese zur Glykolyse.

3.2.9.2 Gid1-Ha₃-Turnover in den Deletionsstämmen *gid2Δ* bis *gid9Δ*

Als nächstes stellte sich die Frage, ob der Turnover von Gid1p vom Vorhandensein eines anderen Gid-Proteins abhängig ist. Um dies zu überprüfen wurden die *gid*-Nullmutanten *gid2Δ* bis *gid9Δ* und der isogene Wildtyp (BY4743) mit dem *GID1-HA₃*-Expressionsvektor pJR15 (2.4.3.4.3) transformiert und unter Standardbedingungen in Selektionsmedium angezogen. Nach Glucosegabe wurden Proben entnommen und eine Immunoblot Analyse durchgeführt (Abb. 43).

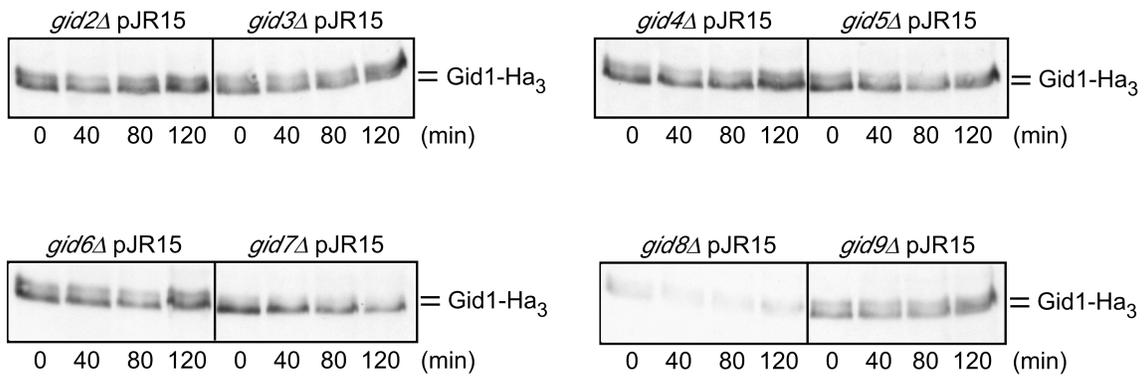


Abb. 43: Gid1-Ha₃-Turnover in den Deletionsmutanten *gid2Δ* bis *gid9Δ*. Die Stämme BY4743 (Daten nicht gezeigt), Y33614 (*gid2Δ*), Y36577 (*gid3Δ*), Y33244 (*gid4Δ*), Y31410 (*gid5Δ*), Y33195 (*gid6Δ*), Y33446 (*gid7Δ*), Y36576 (*gid8Δ*) und Y31488 (*gid9Δ*) wurden mit dem *GID1-HA₃*-Expressionsplasmid pJR15 transformiert, unter Katabolitinaktivierungsbedingungen angezogen und nach Umsetzen in glucosehaltiges Medium Proben zu den angegebenen Zeiten entnommen. Nach Zellaufschluß wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran überführt und mit Ha-Antikörper angefärbt.

Wie Abb. 43 zeigt, hat die Deletion der Gene *GID2*, *GID3/UBC8*, *GID4/VID24*, *GID5/VID28*, *GID6/UBP14* bzw. *GID9* keinen Einfluß auf den Proteinturnover von Gid1-Ha₃. Interessante Phänotypen wurden dagegen in *GID7*- bzw. *GID8*-deletierten Zellen beobachtet. In ethanoldeprimierten Zellen ($t = 0$ min) einer *gid7Δ*-Mutante konnte die in 3.2.9.1 beschriebene Gid1-Ha₃-Doppelbande nachgewiesen werden. Nach Einleitung der FBPase-Proteolyse durch Glucose verschwindet jedoch die obere Bande mit der Zeit. Die Stabilität der höhermolekularen Gid1-Ha₃-Spezies hängt damit von Gid7p und der Kohlenstoffquelle im Medium ab. Um das Zeitfenster näher eingrenzen zu können wurde das Experiment wiederholt und mehrere Proben unmittelbar nach Umsetzen in glucosehaltiges Medium gezogen (Abb. 44). Dadurch konnte gezeigt werden, daß die Konzentration der höhermolekularen Form von Gid1-Ha₃ innerhalb der ersten 10 Minuten der FBPase-Inaktivierung deutlich abnimmt.

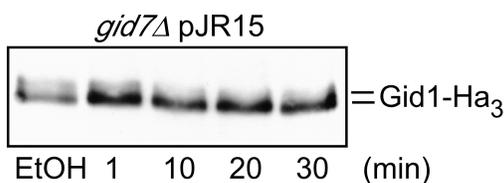


Abb. 44: Gid1-Ha₃-Turnover nach Glucosegabe zu ethanoldeprimierten Hefezellen (EtOH) in Abhängigkeit von Gid7p. Es wurden Rohextrakte von *gid7Δ* [pJR15]-Zellen hergestellt und nach SDS-PAGE/Westernblot mit Ha-Antikörper angefärbt.

Bei der *gid8*-Nullmutante Y36576 konnte mit den üblichen Belichtungszeiten nur ein schwaches Signal von Gid1-Ha₃ auf dem ECL-Film detektiert werden (Abb. 43). Es stellte sich somit die Frage, ob Gid8p die Neusynthese von Gid1-Ha₃ reguliert, oder ob das Fehlen des *GID8*-Gens einen sofortigen Abbau des Proteins zur Folge hat. Um dies unterscheiden zu können, wurde ein Cycloheximid-Chase durchgeführt. *gid8Δ* [pJR15]-Zellen wurden in Selektionsmedium unter Standardbedingungen angezogen und die ethanoldereprimierte Kultur in zwei Hälften aufgeteilt. Daraufhin wurden die Hefezellen in glucosehaltiges CM-Medium +/- 0,25 mg/ml Cycloheximid (CHX) umgesetzt, zu den angegebenen Zeiten Proben entnommen und einer Immunoblot Analyse unterworfen (Abb. 45). Cycloheximid ist ein Inhibitor der Proteinbiosynthese. Sollte in cycloheximidbehandelten Zellen (+ CHX) die Konzentration von Gid1-Ha₃ nach Glucosegabe rasch abnehmen, würde dies für eine Gid8p-abhängige Proteolyse sprechen.

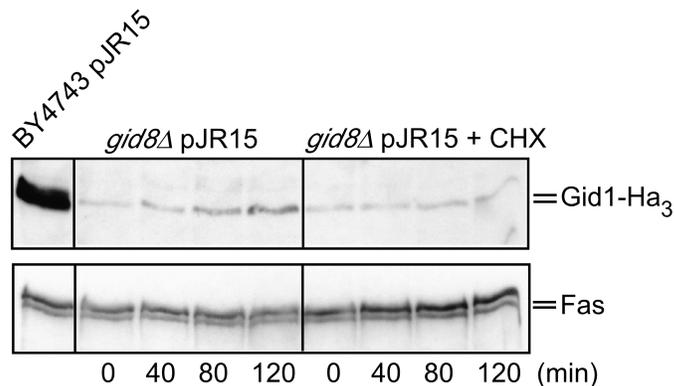


Abb. 45: Cycloheximid-Chase mit *gid8Δ* [pJR15]-Zellen. Die ethanoldereprimierte Kultur ($t = 0$ min) wurde in zwei Hälften aufgeteilt, in glucosehaltiges Selektionsmedium +/- Cycloheximid (CHX) umgesetzt und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen. Nach alkalischer Lyse wurden die Proteine auf eine NC-Membran überführt und mit spezifischem Ha-Antikörper angefärbt. Um bei den *GID8*-deletierten Zellen ein Signal für das Gid1-Ha₃-Fusionsprotein zu erhalten, mußte der ECL-Film überbelichtet werden. Um dies zu dokumentieren wurde ein Rohextrakt von ethanoldereprimierten BY4743 [pJR15]-Zellen aufgetragen. Ladekontrolle: Fettsäuresynthase (Fas).

Nach sehr langen Belichtungszeiten konnte bei der *gid8Δ*-Mutante in beiden Fällen (An- bzw. Abwesenheit von Cycloheximid) ein vergleichbares Bandenmuster nachgewiesen werden (Abb. 45). In Zellen, die Cycloheximid nicht ausgesetzt waren nimmt die Konzentration von Gid1-Ha₃ mit der Zeit erwartungsgemäß geringfügig zu, da die Proteinneusynthese nicht blockiert war. Da in cycloheximidbehandelten *gid8Δ*

[pJR15]-Zellen (+ CHX) die Proteinbiosynthese mit dem Umsetzen in glucosehaltiges Medium inhibiert wurde, deutet dieses Ergebnis darauf hin, daß bei einer Deletion von *GID8* die Biosynthese von Gid1-Ha₃ unterdrückt wird. Ein sofortiger Abbau des Gid1-Ha₃-Fusionsproteins kann ausgeschlossen werden.

Abschließend wurde noch der Gid1-Ha₃-Proteinturnover in einer *snl1Δ*- (Y31409) und *reg1Δ*-Mutante (Y33967) untersucht (Daten nicht gezeigt). In beiden Fällen konnte ein mit dem Wildtyp vergleichbares Bandenmuster nachgewiesen werden.

3.2.10 Gid1p liegt in mindestens zwei verschiedenen Modifikationen in der Zelle vor

Eine mögliche Erklärung für die unter 3.2.9.1 und 3.2.9.2 beschriebene Gid1-Ha₃-Doppelbande wäre eine kovalente Modifikation des Fusionsproteins mit einem Phosphatrest. Um diese Annahme zu überprüfen wurden Zellen des Stammes YJR12 (*GID1-HA₃*) zur Derepression von Gid1-Ha₃ unter Standardbedingungen in YPEtOH-Medium angezogen und geerntet. Anschließend wurden die Hefezellen unter nativen Bedingungen mit Glasperlen aufgeschlossen und Gid1-Ha₃ mit spezifischem Ha-Antikörper immunopräzipitiert. Die an Protein A-Sepharose gebundenen Präzipitate wurden daraufhin in zwei Hälften aufgeteilt und eine Probe mit Alkalischer Phosphatase (Calf Intestinal Phosphatase) (+ CIP) behandelt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Präzipitate erfolgte die Detektion mit Ha-Antikörper (Abb. 46).

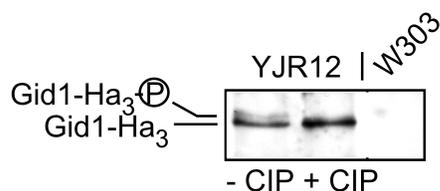


Abb. 46: Dephosphorylierung von Gid1-Ha₃ mit Alkalischer Phosphatase (CIP). Zellen des Stammes YJR12 (*W303 GID1-HA₃*) und des isogenen Wildtyps (Kontrolle) wurden in YPEtOH angezogen, unter nativen Bedingungen aufgeschlossen und Gid-Ha₃ mit Ha-Antikörper immunopräzipitiert. Die an Protein A-Sepharose gebundenen YJR12-Präzipitate wurden daraufhin in zwei Hälften aufgeteilt und mit (+ CIP) bzw. ohne (- CIP) Alkalische Phosphatase bei 37 °C inkubiert. Nach SDS-PAGE/Westernblot erfolgte die Detektion mit Ha-Antikörpern.

Wie in Abb. 46 ersichtlich konnten mit Ha-Antikörpern beide Formen (- CIP) von Gid1-Ha₃ immunopräzipitiert werden. Bei der mit Alkalischer Phosphatase behandelten Probe (+ CIP) war nur die niedermolekulare Form des Fusionsproteins in deutlich erhöhter Konzentration detektierbar, was durch eine Dephosphorylierung der höhermolekularen Spezies erklärt werden kann. Gid1-Ha₃ ist demnach ein Phosphoprotein, das in mindestens zwei verschiedenen Modifikationen in der *Saccharomyces cerevisiae*-Zelle vorliegt.

3.2.11 Lokalisation von Gid1-Ha₃ in der Hefezelle mit einer indirekten Immunofluoreszenz

Zur Lokalisation von Gid1-Ha₃ in der Zelle wurde der Stamm YJR12 (*GID1-HA₃*) unter Katabolitinaktivierungsbedingungen kultiviert und eine indirekte Immunofluoreszenz durchgeführt. Parallel dazu wurden logarithmische und stationäre YPD-Kulturen hergestellt. Die Hefezellen wurden sofort nach der Probenentnahme fixiert, sphäroplastiert und bei 4 °C über Nacht gelagert. Anschließend wurden die Zellen auf einen Objektträger aufgetragen und mit Ha-Antikörper behandelt. Nach Inkubation mit einem Cy3-gekoppelten anti-Maus-Antikörper wurde die auftretende Fluoreszenz unter dem Lichtmikroskop verfolgt und fotografiert (Abb. 47B). Als Kontrolle für die Spezifität des Fluoreszenzsignals wurden ethanoldereprimierte W303-Zellen, die kein *GID1-HA₃* exprimieren, analog aufgearbeitet (Abb. 47A).

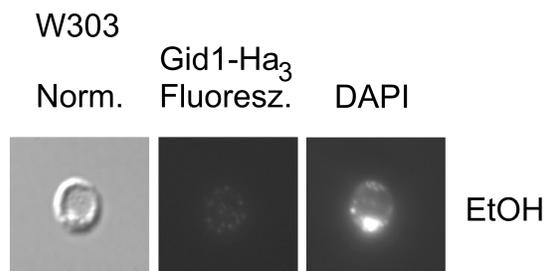


Abb. 47A: Indirekte Immunofluoreszenz mit ethanoldereprimierten W303-Wildtypzellen.

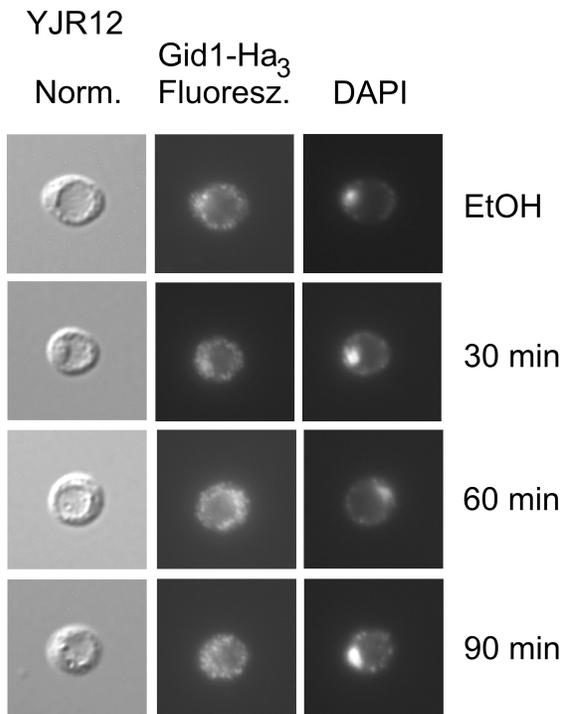


Abb. 47B: Lokalisation von Gid1-Ha₃ im Stamm YJR12 (*W303 GID1-HA₃*) mit Hilfe einer indirekten Immunofluoreszenz. Hierzu wurden Proben von ethanoldereprimierten Zellen (EtOH) und nach Umsetzen in glucosehaltiges Medium gezogen, diese sofort fixiert und sphäroplastierte und die Fluoreszenz von Gid1-Ha₃ mit einem Cy3-gekoppelten Antikörper detektiert. Gezeigt sind die Aufnahmen mit Normarski-Optik (Norm.), im Fluoreszenz- (Fluoresz.) und im DAPI-Kanal (DAPI).

In ethanoldereprimierten *W303*-Wildtypzellen konnte erwartungsgemäß keine Fluoreszenz von Gid1-Ha₃ detektiert werden (Abb. 47A), womit das Signal in Abb. 47B eindeutig dem Gid1-Ha₃-Fusionsprotein zugeordnet werden kann. Unter den gleichen Bedingungen war beim Stamm YJR12 (*W303 GID1-HA₃*) eine deutliche Fluoreszenz, die mit dem Signal der DAPI-Kernfärbung überlagert werden konnte, zu erkennen. Außerdem wurde ein schwaches Signal des Fusionsproteins außerhalb des Zellkerns beobachtet. Ein vergleichbares Bild ergab sich 30 Minuten nach Einleitung der Katabolitdegradation – auch hier wurde eine deutliche Anreicherung von Gid1-Ha₃ im Zellkern nachgewiesen. 60-90 Minuten nach Glucosegabe nahm die Konzentration von Gid1-Ha₃ außerhalb des Zellkerns signifikant zu, wobei sich das Fusionsprotein gleichmäßig innerhalb der Zelle verteilt. Nach Einleitung der FBPase-Proteolyse durch Glucose ändert sich somit die Lokalisation von Gid1-Ha₃ innerhalb der Hefezelle.

Die indirekte Immunofluoreszenz mit einer logarithmischen bzw. stationären YPD-Kultur (Daten nicht gezeigt) ergab folgenden Befund: In log-Zellen des Stammes YJR12 war kein Signal detektierbar, was auf die geringe Konzentration von Gid1-Ha₃ unter diesen Wachstumsbedingungen zurückgeführt werden kann (3.2.9.1). In einer stationären (glucosedepletierten) YPD-Kultur herrschten vergleichbare Verhältnisse wie in ethanoldereprimierten Zellen.

Ergänzend wurde die Lokalisation von Gid2-Ha₃ mit Hilfe des Stammes YTS3 (*W303 GID2-HA₃*) untersucht. Sowohl in ethanoldereprimierten Zellen als auch nach Glucosegabe konnte Gid2-Ha₃ ausschließlich im Zytosol der Zelle nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis korreliert mit den Untersuchungen zur Gid2-Ha₃-Lokalisation von Thomas Schüle (Schüle, Dissertation 2000).

3.2.12 Untersuchungen zur Interaktion von Gid1p mit der FBPase

Wie in Kapitel 3.1.2.4 bereits erwähnt, wurde in einer systematischen Studie über Protein-Protein-Interaktionen eine Wechselwirkung zwischen Gid1p und Gid7p nachgewiesen (Ho et al., 2002). Mit Hilfe einer co-Immunopräzipitation wurde dieser Befund in unserem Labor bestätigt (Thorsten Pfirrmann, persönliche Mitteilung). Weitere co-Immunopräzipitationsexperimente identifizierten eine Interaktion zwischen Gid2p und Gid7p (Thorsten Pfirrmann, persönliche Mitteilung) bzw. Gid2p und der FBPase (Schüle, Dissertation 2000).

Um zu überprüfen, ob zwischen Gid1p (bzw. Gid7p) und der FBPase eine Wechselwirkung vorliegt, wurden Zellen der Stämme YJR12 (*W303 GID1-HA₃*), YTS3 (*W303 GID2-HA₃*), GID7-HA₃ (*W303 GID7-HA₃*) sowie des isogenen Wildtyps (Kontrolle) unter Standardbedingungen kultiviert und zu den angegebenen Zeiten nach Einleitung der Katabolitinaktivierung Proben entnommen. Als zusätzliche Kontrolle für die Spezifität der anschließenden Immunopräzipitation wurde bei den Stämmen YJR12, YTS3 und GID7-HA₃ eine Probe bei 90 Minuten nach Glucosegabe gezogen, da zu diesem Zeitpunkt die FBPase fast vollständig degradiert ist. Die Zellen wurden unter nativen Bedingungen aufgeschlossen und die

FBPase mit spezifischem FBPase-Antikörper immunopräzipitiert. Nach SDS-PAGE wurden die Präzipitate auf eine Nitrocellulosemembran überführt und mit Ha-Antikörper detektiert. Anschließend wurde der Blot mit FBPase-Antikörper angefärbt (Abb. 48).

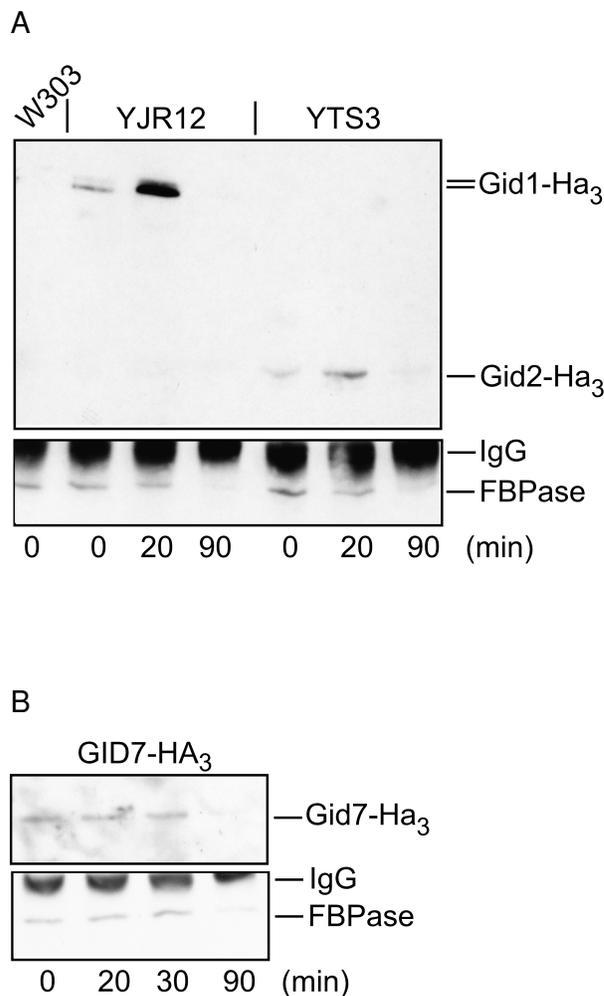


Abb. 48: Identifizierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen der FBPase und den Proteinen Gid1-Ha₃ (48A), Gid2-Ha₃ (48A) und Gid7-Ha₃ (48B) in Abhängigkeit von der Zeit nach Glucosegabe zu ethanoldeprimierten Zellen (t = 0 min). Native Zellextrakte der Stämme YJR12 (*W303 GID1-HA₃*), YTS3 (*W303 GID2-HA₃*), GID7-HA₃ (*W303 GID7-HA₃*) und des isogenen Wildtyps wurden mit FBPase-Antikörper immunopräzipitiert. Nach Auftrennung und Transfer der Präzipitate auf eine NC-Membran folgte die Immunfärbung mit Ha- bzw. FBPase-Antikörper. Als Kontrolle für die Spezifität der co-Immunopräzipitation diente der W303-Wildtyp und die 90 min-Proben der Stämme YJR12, YTS3 und GID7-HA₃.

Wie in Abb. 48 zu sehen ist, konnte sowohl das Gid1-Ha₃- (Abb. 48A) als auch das Gid7-Ha₃-Fusionsprotein (Abb. 48B) in nativen Extrakten ethanoldereprimierter Zellen (t = 0 min) und 20 Minuten nach Umsetzen in glucosehaltiges Medium zusammen mit der FBPase immunopräzipitiert werden. Im Falle von Gid1-Ha₃ nimmt die Menge des gefällten Proteins nach Glucosegabe signifikant zu. 90 Minuten nach Einleitung des FBPase-Abbaus durch Glucose und in W303-Hefeextrakten konnte erwartungsgemäß kein Ha₃-„getagtes“ Protein detektiert werden, womit eine unspezifische Wechselwirkung (z. B. mit der Protein A-Sepharose) ausgeschlossen werden kann. Die co-Immunopräzipitation mit dem Stamm YTS3 (*GID2-HA₃*) lieferte das gleiche Resultat wie von Thomas Schüle in seiner Dissertation beschrieben ist. 20 Minuten nach Einleitung der Katabolitdegradation konnte Gid2-Ha₃ verstärkt mit der FBPase immunopräzipitiert werden (Abb. 48A). Damit ist eindeutig bewiesen, daß die FBPase direkt oder indirekt an bestimmte Gid-Proteine rekrutiert wird.

3.2.13 Sedimentationsverhalten von Gid1-Ha₃ in einem Glyceringradienten

In einem Glyceringradienten sedimentieren Proteine entsprechend ihrer molekularen Masse, wobei die Größe mit Hilfe von Markerproteinen ermittelt werden kann. Bei den hier verwendeten Markern handelte es sich um die 3-Phosphoglyceratkinase (PGK, monomer mit 45 kDa), die Aminopeptidase I (API, Dodecamer mit ca. 600 kDa) und die Fettsäuresynthase (Fas, ca. 2,4 MDa).

Native Rohextrakte von ethanoldereprimierten YJR12-Zellen (*GID1-HA₃*) (Abb. 49A) bzw. 20 Minuten nach Umsetzen in glucosehaltiges Medium (Abb. 49B) wurden auf einen Stufengradienten mit gleichen Mengen von 50 (unten), 40, 30, 20 und 10 %igem Glycerin pipettiert. Im Verlauf der anschließenden Zentrifugation bei 55000 Upm wandern große Proteine (Proteinkomplexe) zum Boden des Gradienten, während kleinere Proteine im oberen Teil nachgewiesen werden können. Nach dem Zentrifugieren wurden 10-12 gleich große Fraktionen von oben nach unten abgenommen, die Proteine mit TCA gefällt und einer Westernblot Analyse unterworfen.

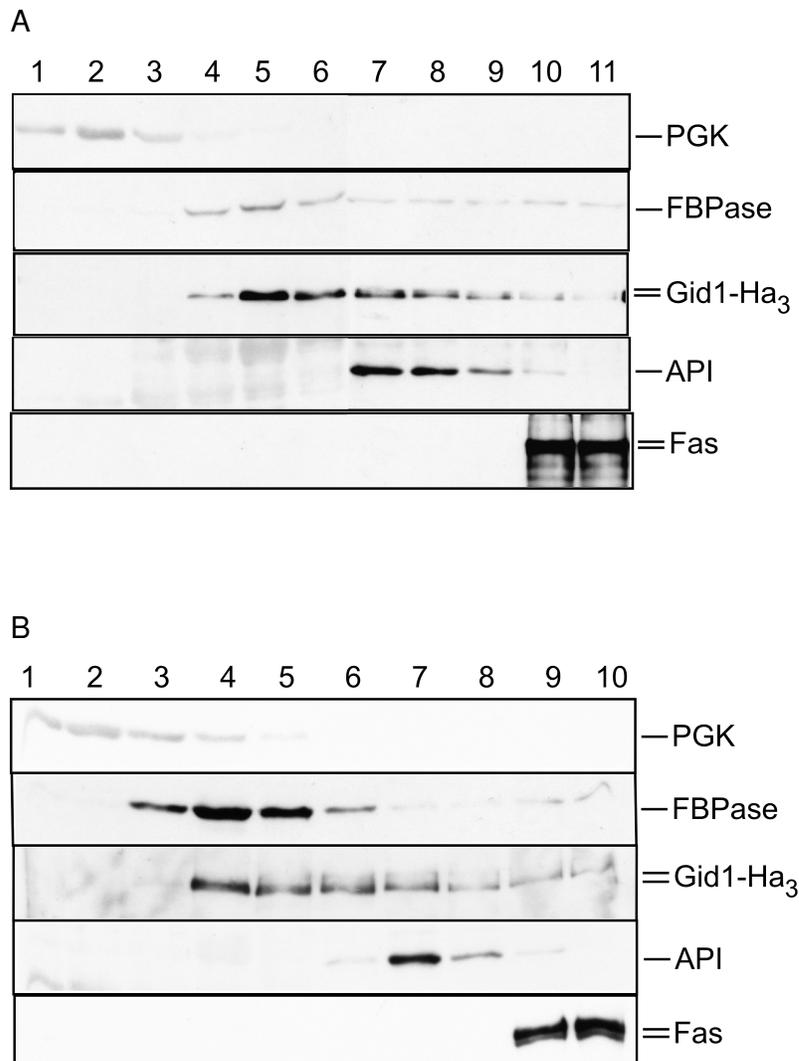


Abb. 49: Bestimmung der molekularen Masse von Gid1-Ha₃ in ethanoldeprimierten Hefezellen (49A) und 20 min nach Einleitung der Katabolitinaktivierung durch Glucose (49B). Native Rohextrakte des Stammes YJR12 (*W303 GID1-HA₃*) wurden auf einen Glyceringradienten aufgetragen und bei 55000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurden 10 bzw. 11 gleich große Fraktionen von oben (Fraktion 1) nach unten (Fraktion 10 bzw. 11) abgenommen, die Proteine mit TCA gefällt und eine Immunoblot Analyse vorgenommen.

Vor bzw. 20 Minuten nach Einleitung der FBPase-Proteolyse durch Glucose zeigt Gid1-Ha₃ ein vergleichbares Sedimentationsverhalten (Abb. 49A,B). Das Maximum befindet sich in den Fraktionen 5-7 (Abb. 49A) bzw. 4-7 (Abb. 49B). Ein beträchtlicher Anteil des Fusionsproteins co-sedimentiert somit mit der Aminopeptidase I (Maximum: Fraktionen 7-8), was darauf schließen läßt, daß Gid1-Ha₃ nicht als monomer in der Zelle vorliegt. Eine nicht zu vernachlässigbare Menge co-

sendimentiert außerdem mit der sich im Wesentlichen in den niedermolekularen Fraktionen befindenden FBPase (Maximum: Fraktionen 4-5). Es muß somit davon ausgegangen werden, daß Gid1-Ha₃ unter den getesteten Wachstumsbedingungen in unterschiedlich großen, in einem dynamischen Gleichgewicht befindenden, Aggregaten in der Hefezelle vorliegt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den noch nicht publizierten Interaktionsstudien von Thorsten Pfirrmann, der eine Wechselwirkung zwischen dem WD40-Protein Gid7p und Gid1p bzw. Gid7p und Gid2p unter FBPase-Inaktivierungsbedingungen eindeutig nachweisen konnte. Die Tatsache, daß das Maximum der FBPase im Vergleich zur 3-Phosphoglyceratkinase (monomer) nach rechts verschoben ist korreliert mit dem Befund, daß das Enzym einerseits als Tetramer in der Zelle vorliegt (Bigl und Eschrich, 1994) und andererseits während der Katabolitdegradation Protein-Protein-Interaktionen eingeht (3.2.12). Die Beteiligung eines (bzw. mehrerer) höhermolekularen „Gid-Komplexe(s)“ bei der FBPase-Hydrolyse ist nach diesen Erkenntnissen somit sehr wahrscheinlich.

4 Diskussion

Der wichtigste Signalgeber in der Bier- und Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist der Nährstoff Glucose. Seine Wirkung auf den Metabolismus, Zellzyklus und die Zellproliferation ist mit der von Hormonen in Säugetierzellen vergleichbar. Auf der einen Seite werden in Abhängigkeit des Glucosesignals zahlreiche Gene reprimiert oder induziert, andererseits werden viele Proteine/Enzyme posttranslational aktiviert bzw. inaktiviert. Bis heute sind die Signale und Mechanismen, die den gezielten Abbau bestimmter Proteine zur Folge haben, nur unzureichend verstanden. Ein Modellsystem, das schon seit längerer Zeit zur Aufklärung des durch Glucose induzierten Proteinabbaus herangezogen wird, ist die Katabolitinaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase).

Ein zentraler Schritt im Kohlenhydratstoffwechsel ist das wechselseitige Umschalten von der katabolen Glykolyse und der anabolen Gluconeogenese (Stryer, 2002). Beide Wege nutzen zum Großteil dieselbe Enzymausstattung, die wichtigsten Schaltstellen werden jedoch von unterschiedlichen Enzymen katalysiert. So wird die Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat in der Glykolyse von der Phosphofruktokinase bewerkstelligt, die umgekehrte Reaktion verwendet in der Gluconeogenese aus regulatorischen Gründen die FBPase als Katalysator.

In *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen, die in Gegenwart einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle (z. B. Ethanol oder Glycerin) wachsen, wird die Gluconeogenese zur Synthese von Glucose aus Nichtkohlenhydratvorstufen aktiviert. Unter diesen Bedingungen ist das gluconeogenetische Schlüsselenzym Fructose-1,6-bisphosphatase ein extrem langlebiges Protein mit einer Halbwertszeit von ca. 90 Stunden (Funayama et al., 1980). Nach Glucosegabe bzw. Umsetzen der Zellen in glucosehaltiges Nährmedium wird die Neusynthese sofort eingestellt, die Aktivität durch eine reversible Phosphorylierung am Serinrest 11 reduziert und das Enzym irreversibel mit einer Halbwertszeit von weniger als 30 Minuten schnell degradiert (Funayama et al., 1980; Müller und Holzer, 1981; Mazon et al., 1982; Schork et al., 1995; Hämmerle et al., 1998). Diesen Vorgang bezeichnet man als Katabolitinaktivierung (Gancedo, 1971; Holzer, 1976), den Abbauschritt des Enzyms

auch als Katabolitdegradation (Hämmerle et al., 1998). Die damit verbundene Inaktivierung der Gluconeogenese verhindert eine Energieverschwendung in der Zelle durch einen gleichzeitigen Auf- und Abbau von Glucose und Verbrauch von ATP (sogenannter „futile cycle“). Ähnliche Reaktionsmechanismen werden in der Literatur für die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (Müller et al., 1981), die cytosolische Malatdehydrogenase (Hägele et al., 1978), die Isocitratlyase (Lopez-Boado et al., 1987) und diverse Zuckertransporter wie die Maltose- oder Galactosepermease (Riballo et al., 1996; Horak und Wolf, 1997) beschrieben.

Der Ort und die molekularen Komponenten der glucoseinduzierten FBPase-Hydrolyse werden seit mehreren Jahren kontrovers diskutiert (Schork et al., 1994a,b). Gemäß Publikationen der Chiang-Arbeitsgruppe (Department of Cellular and Molecular Physiology Hershey, USA) wird die FBPase im Zytosol in sogenannte Vid-Vesikel mit einem Durchmesser von 30-40 nm eingeschlossen und zur Vakuole transportiert. Diese für die FBPase spezifischen Transportvesikel unterscheiden sich von allen bisher bekannten Vesikeln (z. B. sekretorische Vesikel oder Autophagosomen). Nach dem Import in die Vakuole wird der Inhalt dort schließlich von unspezifisch wirkenden Proteasen degradiert (Chiang und Schekman, 1991; Huang und Chiang, 1997). Für die Analyse dieses vakuolären Abbaumechanismus wurde ein *in vitro* System etabliert, außerdem konnten in den vergangenen Jahren zahlreiche FBPase-abbaufekte *vid*-Mutanten („vacuolar import and degradation“) isoliert und die Genprodukte näher charakterisiert werden (Hoffman und Chiang, 1996; Chiang und Chiang, 1998; Brown et al., 2001; Brown et al., 2002). Die veröffentlichten Daten bzw. abgeleiteten Schlußfolgerungen von Hui-Ling Chiang und Mitarbeitern konnten von unserem Labor jedoch in vielen Fällen nicht reproduziert/bestätigt werden. Durch Zellfraktionierungen bzw. Proteinase-Schutzexperimente wurde einerseits nachgewiesen, daß die FBPase nach Induktion ihres Abbaus nicht in vesikulären Intermediaten auftritt (Schüle, Dissertation 2000). Andererseits zeigten Pulse Chase Analysen mit diversen proteasedefekten Hefestämmen eindeutig, daß die Katabolitdegradation der FBPase unabhängig von der Aktivität vakuolärer Proteasen wie der Proteinase *yscA* stattfindet. Vielmehr sprechen die von uns gewonnenen Erkenntnisse dafür, daß es sich bei der FBPase-Inaktivierung um ein zytosolisches Ereignis handelt, bei dem das Enzym zunächst

polyubiquitiniert, vom 26S-Proteasom selektiv erkannt und abgebaut wird (Schork et al., 1994a,b; Schork et al., 1995; Schüle et al., 2000). Eine Schlüsselrolle spielt hierbei das N-terminale Prolin der FBPase. Wird dieses N-terminale Prolin durch eine beliebig andere Aminosäure ausgetauscht, ist die Proteolyse des Enzyms vollständig retardiert (Hämmerle et al., 1998). Ein vergleichbarer Phänotyp wurde bei einer am N-Terminus um 12 Aminosäuren verkürzten Form der cytosolischen Malatdehydrogenase (Mdh2p) beobachtet (Gibson und McAlister-Henn, 2003). Der N-Terminus scheint somit bei gluconeogenetischen Enzymen einen entscheidenden Einfluß auf die *in vivo* Funktion, vermutlich für die Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen, zu haben. Eine Blockierung der FBPase-Phosphorylierungsstelle (Serin-11) (Rittenhouse et al., 1986, Rittenhouse et al., 1987) hat keinen Einfluß auf die Halbwertszeit des Abbaus (Hämmerle et al., 1998). Die Funktion der Phosphorylierung liegt in der Verschiebung des pH-Optimums der FBPase (Pohlig und Holzer, 1985), wodurch die Enzymaktivität reguliert werden kann. Interessanterweise konnte die Gruppe von Hui-Ling Chiang kürzlich den von uns gefundenen Degradationsmechanismus der FBPase durch das Ubiquitin-Proteasomsystem bestätigen (Hung et al., 1994).

Neben der Diskrepanz eines proteasomalen und vakuolären Inaktivierungsmechanismus für die FBPase findet man in der Literatur auch widersprüchliche Meinungen bezüglich der Funktion einzelner Proteinkomponenten. Wichtige Faktoren der proteasomalen FBPase-Abbaumaschinerie sind u. a. die Ubiquitin-konjugierenden Enzyme (E2-Enzyme) Ubc1p, Ubc4p und Ubc5p, die nachweislich bei der Degradation von kurzlebigen und abnormalen Proteinen über das 26S-Proteasom beteiligt sind (Schork et al., 1995). Interessanterweise wird Ubc1p aber auch für die Vakuolen-vermittelte FBPase-Degradation benötigt, wobei eine vom Ubiquitin-Proteasomsystem unabhängige Funktion postuliert wurde (Shieh et al., 2001). Ein weiteres Beispiel wäre das Hitzeschockprotein Ssa2p, das lediglich am vakuolären (Brown et al., 2000), jedoch nicht am proteasomalen (Hämmerle, Dissertation 1998), FBPase-Abbau beteiligt ist. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, daß sich die von der Chiang-Gruppe verwendeten FBPase-Derepressionszeiten (≥ 48 Stunden) von unseren (5-16 Stunden) deutlich unterscheiden. Darüber hinaus kommen in den Standardprotokollen unterschiedliche

Derepressionsmedien (YPEtOH bzw. YPKG) zum Einsatz. Somit mußte zu Beginn dieser Dissertation von der Möglichkeit ausgegangen werden, daß die Zelle in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen verschiedene Proteolysesysteme für die FBPase verwenden könnte, und dafür unterschiedliche bzw. teilweise überlappende Komponenten benötigt. Die Verwendung von unterschiedlichen nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Ethanol bzw. Acetat) dürfte allerdings keinen entscheidenden Einfluß auf den Mechanismus der FBPase-Degradation haben.

Derepressionszeiten von 48 Stunden und mehr bedeuten extreme Hungerbedingungen und stellen für die Hefezelle – wie Überlebenstests zeigten – eine außerordentliche Streßsituation dar (Josupeit, Dissertation 2003). Eine weitere Erklärung für die topologisch verschiedenen Orte der FBPase-Inaktivierung könnte deshalb sein, daß unter den Bedingungen der Gruppe Chiang unspezifische und/oder überlappende Programme wie die Autophagozytose in der Zelle aktiviert werden. Dies führt dann zwangsläufig zu einem erhöhten – aber von der Katabolitinaktivierung unabhängigen - Gesamtproteinabbau in der Vakuole, um das Überleben der Kulturen sicher zu stellen. Damit wäre auch das Auftreten vesikulärer Zwischenprodukte erklärbar.

Da uns die Wachstumsbedingungen von Hui-Ling Chiang im Detail nicht bekannt sind, konnten diese Theorien bisher nicht überprüft werden. Durch Messung der FBPase-Abbaukinetiken in diversen Autophagozytosemutanten konnte eine Beteiligung der unspezifischen Autophagozytose jedenfalls bei der proteasomalen FBPase-Proteolyse definitiv ausgeschlossen werden (Schüle, Dissertation 2000; Josupeit, Dissertation 2003). Westernblot Analysen mit *aut1Δ*, *aut3Δ* und *aut5Δ*-Zellen (diese Arbeit) bestätigten diese Resultate.

Um weitere Informationen über das (die) FBPase-Proteolysesystem(e) zu erhalten, wurden in einer früheren Arbeit durch EMS-Mutagenese sogenannte *gid*-Mutanten („glucose-induced degradation deficient“) generiert (Hämmerle et al., 1998). Wie Pulse Chase Analysen bestätigten ist bei diesen Mutanten der proteasomale FBPase-Abbau vollständig blockiert, so daß den entsprechenden *GID*-Genen eine zentrale Funktion bei diesem Mechanismus zugeschrieben werden muß. Die isolierten Punktmutanten konnten in drei Komplementationsgruppen (*gid1*, *gid2* und *gid3*) eingeteilt werden und durch Komplementation des Mutantenphänotyps mit

einer Hefegenbank konnte das fehlerhafte Gen/Protein indentifiziert werden. Hierzu wurde ein sogenannter Kolonie-Immunoblot Screen entwickelt, bei dem in den Transformanten (Hefekolonien) die FBPase-Konzentration 2-2,5 Stunden nach Einleitung der Katabolitdegradation durch Glucose mit einem spezifischen FBPase-Antikörper detektiert und mit isogenen Wildtypzellen verglichen werden konnte (Schüle, Dissertation 2000; Schüle et al., 2000). Mit dieser Methode wurde schließlich das *GID2*- und *GID3*-Gen kloniert, das fehlerhafte *GID1*-Gen konnte jedoch nicht komplementiert werden. *GID3* kodiert für das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc8p, was ein weiterer Hinweis auf einen Ubiquitin-Proteasom-vermittelten Abbau der FBPase ist (Schüle et al., 2000). Ubc8p ist neben Ubc1p, Ubc4p und Ubc5p das vierte von insgesamt 13 E2-Enzymen (Hochstrasser, 1996; Scheffner et al., 1998), das für diesen Prozeß benötigt wird. Im Gegensatz zu einer *ubc8Δ*-Mutante (Schüle et al., 2000) wurde in einer *ubc1* bzw. *ubc4 ubc5* Mutante jedoch lediglich eine partielle Stabilisierung der FBPase gemessen (Schork et al., 1995), so daß Ubc8p möglicherweise das Hauptenzym der FBPase-Ubiquitinmarkierung darstellt. Ferner besteht die Möglichkeit, daß die verschiedenen E2-Enzyme (Ubc1p, Ubc4p, Ubc5p und Ubc8p) bei unterschiedlichen Schritten der glucoseinduzierten Katabolitinaktivierung eine Rolle spielen und auch einen indirekten Einfluß auf die Ubiquitinkonjugation ausüben könnten. Gid2p ist die Komponente eines zytosolischen Proteinkomplexes mit einem Molekulargewicht von mindestens 600 kDa (Schüle, Dissertation 2000; Josupeit, Dissertation 2003). In *GID2*- und *GID3/UBC8*-deletierten Zellen wurde das Fehlen von FBPase-Ubiquitinkonjugaten festgestellt, die eine essentielle Erkennungssequenz für das Proteasom darstellen. Damit kann die drastisch erhöhte Halbwertszeit der FBPase-Proteolyse von mehr als 10 Stunden in diesen Deletionsstämmen auf das Fehlen der Polyubiquitinkette zurückgeführt werden. Mit Hilfe einer co-Immunopräzipitation konnte zudem 20 Minuten nach Einleitung der Katabolitdegradation eine Wechselwirkung zwischen Gid2p und der FBPase nachgewiesen werden, was im Rahmen dieser Arbeit bestätigt wurde. Es wäre somit denkbar, daß Gid2p als ein Bestandteil eines für die Ubiquitinkonjugation benötigten Enzymkomplexes fungiert.

Ein zentraler Teil dieser Arbeit war die Klonierung und Charakterisierung von Gid1p. Nach Sequenzierung des Genbankinserts und dem Vergleich der Sequenzdaten mit

dem Hefegenom wurde die Beweisführung erbracht, daß das Gen *VID30* für die Komplementation des *gid1*-Mutantenphänotyps verantwortlich ist (Regelmann et al., 2003). In *gid1/vid30*-deletierten Zellen wurde eine etwa siebenfach erhöhte Halbwertszeit der FBPase-Proteolyse im Vergleich zum isogenen Wildtyp gemessen. Interessanterweise ist Gid1p/Vid30p gemäß eines Datenbankeintrags in der „*Saccharomyces* Genome Database“ auch am vakuolären Abbau der FBPase beteiligt. Außerdem wird dem Protein eine Funktion im Stickstoffmetabolismus zugeschrieben, da diverse Gene des Stickstoffmetabolismus in Abhängigkeit von Gid1p/Vid30p reguliert werden (Van der Merwe et al., 2001).

Aufgrund der Nichtverfügbarkeit weiterer FBPase-proteolysedefekter Punktmutanten wurde der bewährte Kolonie-Immunoblot Screen modifiziert und mit Hilfe dessen die Suche nach FBPase-Inaktivierungsmutanten zu einem genomweiten Ansatz ausgedehnt (diese Arbeit). Etwa 5000 *S. cerevisiae*-Gene (85 % des Hefegenoms) sind nicht-essentiell und können somit deletiert werden. Dank des „Hefe-Genomprojekts“ sind alle diese Nullmutanten inzwischen kommerziell erhältlich (EUROSCARF, Frankfurt) und standen für weitere Experimente zur Verfügung. Gesucht wurde nach Deletionsstämmen, bei denen die FBPase-Konzentration 2,5 Stunden nach Einleitung der Katabolitdegradation im Vergleich zu Wildtypzellen signifikant erhöht war. Der Vorteil gegenüber dem Komplementationsscreen bestand darin, daß er weniger zeitaufwendig war und über die Position in den Mikrotiterplatten sofort Rückschlüsse auf das fehlerhafte Gen gezogen werden konnten (deletierter ORF = Gen). Essentielle Hefegene waren über dieses Verfahren jedoch nicht zugänglich, so daß etwa 15 % des Hefegenoms unberücksichtigt blieben.

Erwartungsgemäß konnten *gid1Δ/vid30Δ*, *gid2Δ* und *gid3Δ/ubc8Δ* aus der EUROSCARF-Kollektion isoliert werden. Darüber hinaus wurden sechs weitere *GID*-Gene mit der Bezeichnung *GID4* bis *GID9* identifiziert (Regelmann et al., 2003). Der Defekt im proteasomalen FBPase-Abbau wurde anhand der vorliegenden Nullmutanten durch Immunoblot Analysen verifiziert. Im Anschluß daran erfolgte in Zusammenarbeit mit Frank Josupeit (Josupeit, Dissertation 2003) die Quantifizierung durch Pulse Chase Messungen. Hierbei traten bei *GID5*- bzw. *GID9*-deletierten Zellen experimentelle Schwierigkeiten auf. Bei Verwendung des Standardprotokolls befand sich die Konzentration der radioaktiv markierten FBPase unter der

Nachweisgrenze. Das Protokoll mußte deshalb im Folgenden für diese beiden Stämme modifiziert werden. Die Erhöhung der Einbauzeit des ^{35}S -Methionins auf 16 Stunden hatte in den Wildtypzellen eine geringfügig verzögerte Kinetik der FBPase-Hydrolyse zur Folge. Dies hatte jedoch auf die Aussagefähigkeit des Experiments keinen Einfluß, da sich die Halbwertszeiten von Wildtyp und Mutante drastisch unterschieden. Mit Ausnahme von *gid6* Δ -Zellen wurde bei allen *gid*-Deletionsstämmen ein vollständig retardierter FBPase-Abbau nachgewiesen. Bei der *gid6*-Nullmutante war die Halbwertszeit im Vergleich zum Wildtyp etwa dreifach erhöht. Darüber hinaus konnte bei diesem genomweiten Ansatz noch eine *grr1* Δ - und *snl1* Δ -Mutante isoliert werden. Immunoblot Analysen bestätigten eine gestörte FBPase-Abbaukinetik.

Aktivitätsmessungen des die FBPase-Degradation katalysierenden Proteasoms mit den Deletionsstämmen *gid1* Δ bis *gid9* Δ zeigten, daß in allen Fällen die Trypsin-ähnliche, Chymotrypsin-ähnliche und PGPH-Aktivität des 20S-Proteasoms nicht beeinträchtigt ist (diese Arbeit) und somit der Wirkort der Gid-Proteine Gid1p bis Gid9p bei der FBPase-Inaktivierung oberhalb des 26S-Proteasoms angesiedelt werden muß.

GID6 kodiert für das Deubiquitinierungsenzym Ubp14p. Wie die meisten biochemischen Prozesse befindet sich auch die Ubiquitinierung in einem dynamischen Gleichgewicht. Nachdem ubiquitinierte Proteine ihrem Schicksal zugeführt wurden, müssen die freiwerdenden Ubiquitinketten wiederverwertet werden. Dies wird von sogenannten Deubiquitinierungsenzymen katalysiert, von denen in *S. cerevisiae* zahlreiche bekannt sind (Amerik und Hochstrasser, 2004). Es wurde nachgewiesen, daß in *UBP14*-deletierten Zellen diverse proteasomale Substrate nicht mehr abgebaut werden können (Amerik et al., 1997). Dies kann dadurch erklärt werden, daß sich ungespaltene Ubiquitinketten in Konkurrenz mit ubiquitinierten Substratmolekülen um die Bindung am 26S-Proteasom befinden. Die Identifikation von Gid6p/Ubp14p ist ein weiterer entscheidender Hinweis für die Beteiligung des Ubiquitin-Proteasomsystems bei der Katabolitinaktivierung der FBPase unter den von uns gewählten Reaktionsbedingungen.

GID4 kodiert für Vid24p, ein peripheres Membranprotein welches gemäß des Chiang-Modells für den Transport der in Vid-Vesikel eingeschlossenen FBPase zur Vakuole benötigt wird (Chiang und Chiang, 1998). Was die übrigen *GID*-Gene anbelangt, so konnte aus den Datenbankeinträgen keine aufschlußreichen Informationen bezüglich einer möglichen Funktion erhalten werden.

GID5 kodiert für Vid28p, das wie Vid24p (Gid4p) und Vid30p (Gid1p) zur Klasse der Vid-Proteine gehört. Bezüglich Vid28p und Vid30p existieren von der Chiang-Arbeitsgruppe noch keine publizierten Daten, die Informationen stützen sich auf einen Datenbankeintrag in der „*Saccharomyces* Genome Database“. Es stellte sich somit die Frage, ob darüber hinaus noch weitere Vid-Proteine für den proteasomalen FBPase-Abbau benötigt werden und möglicherweise eine generelle Überlappung von *VID*- und *GID*-Genen vorliegt. Durch Westernblot und Pulse Chase Messungen mit diversen *vid*-Deletionsstämmen konnte in Zusammenarbeit mit Frank Josupeit (Josupeit, Dissertation 2003) eindeutig gezeigt werden, daß nicht alle *VID*-Gene für die Ubiquitin-Proteasom-vermittelte FBPase-Degradation benötigt werden (diese Arbeit; Regelman et al., 2003). So kann eine Beteiligung von *VID22* und *VID27* (Brown et al., 2001; Brown et al., 2002) am proteasomalen Abbau der FBPase definitiv ausgeschlossen werden, da in den entsprechenden Deletionsstämmen die Kinetik der FBPase-Hydrolyse unter unseren Standardbedingungen (Derepressionszeiten 5-16 Stunden) mit der des Wildtyps vergleichbar ist. Ergänzende Messungen mit *NYV1*-, *VAM3*-, *VAM6*-, *VAM7*-, *VPS41*- und *YPT7*-deletierten Zellen zeigten, daß die entsprechenden Genprodukte für den proteasomalen Abbauweg der FBPase ebenfalls nicht benötigt werden (diese Arbeit) - für den Vakuolen-vermittelten Abbau sind sie dagegen essentiell (Brown et al., 2003). Diese Resultate erhärten die schon seit längerer Zeit angestellten Vermutungen, daß die FBPase in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen über zwei verschiedene Wege abgebaut werden könnte und daran jeweils ein spezifischer Satz von Proteinen beteiligt ist. Die von uns gewählten FBPase-Derepressionszeiten von 5-16 Stunden führen zu einem vom Ubiquitin-Proteasomsystem katalysierten Abbau des Enzyms. Bei den von der Chiang-Arbeitsgruppe gewählten Derepressionszeiten von mindestens 48 Stunden treten möglicherweise vesikuläre Zwischenprodukte auf, deren Inhalt in der Vakuole hydrolysiert wird. Da auch am Ende dieser Dissertation die genauen Reaktionsbedingungen, die zu einem vakuolären Abbaumechanismus des Enzyms

führen könnten nach wie vor unbekannt sind, konnten in diese Richtung keine weiterführenden Experimente durchgeführt werden.

Bei einem Westernblot mit einer *snl1*-Nullmutante wurde eine deutlich verzögerte Kinetik des FBPase-Abbaus beobachtet (diese Arbeit), so daß Snl1p vermutlich zur Familie der Gid-Proteine gezählt werden kann. Um dies endgültig zu bestätigen ist jedoch noch eine Pulse Chase Analyse notwendig. Snl1p ist ein co-Chaperon mit einer Bag-Domäne und wird für die Kontrolle von Hsp70-Hitzeschockproteinen benötigt (Sondermann et al., 2002). Snl1p wurde in der Kernmembran bzw. am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und könnte möglicherweise bei der Biogenese von Kernporen eine wichtige Rolle spielen. Außerdem wurde gezeigt, daß Snl1p ein „High Copy Suppressor“ einer *nup116*-Mutante ist. Nup116p ist ein essentielles Nucleoporin, das bei der Bindung und Translokation von Kernproteinen beteiligt sein könnte. In einem 2-Hybrid-Screen wurde Nup116p als Interaktionspartner von Gid4p/Vid24p und Gid7p identifiziert, was auf einen funktionellem Zusammenhang zwischen Nup116p, Snl1p und den Gid-Proteinen hindeutet.

In einer *grr1*-Deletionsmutante wurde lediglich eine partielle Stabilisierung der FBPase nach Glucosegabe zu ethanoldereprimierten Zellen festgestellt (diese Arbeit; Horak et al., 2002). Grr1p wird eine zentrale Funktion bei der Regulation der Transkription durch Glucose zugeschrieben. Da *grr1*-Mutanten bekannterweise pleiotrope Phänotypen aufweisen, könnte es sich somit auch um einen indirekten Einfluß auf die Proteolyse des Enzyms handeln.

Die am besten charakterisierten glucosevermittelten Signalwege in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind der cAMP/Proteinkinase A-Weg, der Katabolit-Repressionsweg und ein Stoffwechselweg zur Induktion von Hexosetransportern. Letztendlich wird auf das Glucosesignal ein ganz spezifischer Satz von Proteinen synthetisiert bzw. abgebaut. In früheren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, daß bestimmte Genprodukte dieser Signaltransduktionswege (Grr1p, Rgt1p, Rgt2p, Reg1p und Hxk2p) bei der Katabolitinaktivierung der Maltosepermease (Mal61p) eine bedeutende Rolle spielen (Sikorski und Hieter, 1989; Ho et al., 1996; James et al., 1996). Ein erster Hinweis, daß dies auch für die Inaktivierung der FBPase zutreffen könnte, war die Identifikation von Grr1p mit Hilfe der EUROSCARF-Kollektion (diese

Arbeit). Für eine detaillierte Analyse wurden in Zusammenarbeit mit Jaroslav Horak (Akademie der Wissenschaften, Physiologisches Institut Prag, Tschechien) gezielt verfügbare Mutanten untersucht, die einen Defekt in den oben genannten Signalwegen aufweisen (Horak et al., 2002). Abgesehen von *grr1Δ*-Zellen konnte lediglich noch in einem *reg1*-Deletionsstamm ein gestörter FBPase-Abbau nachgewiesen werden. Reg1p ist die regulatorische Untereinheit des Glc7p/Reg1p-Proteinphosphatasekomplexes, welcher die zentrale Schaltstelle der Glucose-Repression darstellt. Gemäß einer Publikation der Chiang-Gruppe ist Glc7p/Reg1p auch eine essentielle Komponente der vakuolären FBPase-Degradation (Dong-Ying Cui et al., 2004). Auf der Suche nach Reg1p-Interaktionspartnern wurde eine Wechselwirkung mit den 14-3-3-Proteinen Bmh1p und Bmh2p nachgewiesen (Mayordomo et al., 2003). Es ist bekannt, daß Proteine der *S. cerevisiae*-14-3-3-Familie bei essentiellen physiologischen Prozessen wie dem proteasomalen Proteinabbau beteiligt sind. Da die Katabolitinaktivierung von Mal61p in einer *bmh1* *bmh2*-Doppeldelation nachweislich gestört ist, wurde für die Arbeitsgruppe von Pascual Sanz (Institut für Biomedizin Valencia, Spanien) in dieser Mutante der FBPase-Abbau mit Hilfe einer Immunoblot Analyse untersucht. Aufgrund des extrem gestörten Zellwachstums dieses Hefestammes wurden unterschiedliche Reaktionsbedingungen (verschiedene nicht-fermentierbare Kohlenstoffquellen, unterschiedlich lange Derepressionszeiten) getestet, bei denen allerdings in allen Fällen keine FBPase in den Rohextrakten nachgewiesen werden konnte. Das Fehlen des gluconeogenetischen Schlüsselenzyms in einer *bmh1Δ* *bmh2Δ*-Mutante erklärt den starken Wachstumsdefekt in Gegenwart einer nicht-fermentierbaren Kohlenquelle.

Widersprüchliche Resultate lieferten Westernblot Analysen mit einer *glk1* *hxx1* *hxx2*-Tripelmutante und einem *hxx2*-Deletionsstamm. In der Tripelmutante wurde – im Gegensatz zu einer *glk1* *hxx1*-Doppelmutante - ein vollständig retardierter FBPase-Abbau beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die gleichen Ergebnisse erhielt Jaroslav Horak bei seinen Messungen. Darüber hinaus konnte er noch eine deutliche Stabilisierung der FBPase in *HXX2*-deletierten Zellen nachweisen. Dies führte zur Schlußfolgerung, daß Hxx2p ebenfalls eine zentrale Komponente der proteasomalen FBPase-Degradation ist (Horak et al., 2002). Wie sich bei einer nachträglichen Überprüfung herausstellte, ist in einer *hxx2Δ*-Mutante die FBPase-Proteolyserate

jedoch mit dem isogenen Wildtyp vergleichbar (Daten nicht gezeigt), was Zweifel an einer Beteiligung von Hxk2p beim Abbau des Enzyms aufkommen lässt.

Parallel zu den oben beschriebenen Untersuchungen zur glucoseabhängigen Signaltransduktion der FB Pase-Inaktivierung wurde von Jaroslav Horak die Katabolitinaktivierung der Galatosepermease (Gal2p) mit Hilfe der vorliegenden Deletionsstämme analysiert (Horak et al., 2002). Dabei konnte er nachweisen, daß in *GRR1*- bzw. *REG1*-deletierten Zellen die Gal2p-Proteolyse gestört ist.

Der Galactosetransporter Gal2p wird synthetisiert, wenn Hefezellen in Gegenwart von Galactose als Kohlenstoffquelle kultiviert werden. Im Gegensatz zur zytosolischen FB Pase wird der plasmamembranlokalisierte Zuckertransporter jedoch auf das Glucosesignal hin monoubiquitiniert und via Endozytose zur Vakuole transportiert, wo er schließlich abgebaut wird (Horak und Wolf, 1997; Horak und Wolf, 2001). Mit Grr1p und Reg1p wurden zwei Proteine identifiziert, die sowohl für den proteasomalen FB Pase-Abbau als auch die vakuoläre Gal2p-Hydrolyse essentiell sind. Somit werden diese beiden unterschiedlichen Proteolysesysteme von den gleichen Komponenten induziert. Wie die Zelle zwischen dem proteasomalen FB Pase- bzw. vakuolären Gal2p-Abbau unterscheiden kann, ist noch ungeklärt. Durch die Messung der Gal2p-Abbaukinetiken in den *gid*-Deletionsstämmen *gid1Δ* bis *gid9Δ* konnte Jaroslav Horak darüber hinaus zeigen, daß sämtliche bisher bekannten Gid-Proteine keine Funktion bei der Gal2p-Hydrolyse besitzen und spezifisch für die Katabolitdegradation der FB Pase sind (Regelmann et al., 2003). Auch die für den vakuolären FB Pase-Abbau spezifischen Vid22p und Vid27p spielen bei der Inaktivierung des Galactosetransporters keine Rolle.

Das *GID1/VID30*-Gen wurde im Rahmen dieser Arbeit in zwei voneinander unabhängigen Ansätzen identifiziert und im Folgenden einer detaillierten Analyse unterzogen. Zur Detektion von Gid1p mit einem kommerziell erhältlichen Antikörper wurden Ha-epitopmarkierte Fusionsproteine (Gid1-Ha₃) unter Kontrolle des nativen Promotors hergestellt und deren biologische Funktionalität nachgewiesen. Anschließende Turnovermessungen zeigten, daß Gid1p bei Verbrauch der Glucose im Nährmedium bzw. bei Wachstum in Gegenwart einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle (gluconeogenetische Wachstumsbedingungen) verstärkt exprimiert wird. In einer logarithmisch gewachsenen YPD-Kultur ist die Gid1p-Konzentration

deutlich reduziert. Nach Glucosegabe zu ethanoldeprimierten Zellen wurde über einen Zeitraum von 2 Stunden keine merkliche Abnahme des Gid1p-„steady-state levels“ beobachtet. Die deutlich erhöhte Konzentration unter diesen Bedingungen deutet auf eine zentrale Funktion dieses Proteins bei der Katabolitinaktivierung der FB Pase und dem damit verbundenen Umschalten von der Gluconeogenese zur Glykolyse hin. Bei sämtlichen Turnovermessungen wurde das Auftreten einer Gid1p-Doppelbande beobachtet. Ein Dephosphorylierungsexperiment mit Alkalischer Phosphatase (CIP) bestätigte die Vermutung, daß die höhermolekulare Form des Proteins durch eine Phosphorylierung zustande kommt. Gid1p ist damit ein Phosphoprotein und liegt unter den oben beschriebenen Wachstumsbedingungen in mindestens zwei verschiedenen Modifikationen in der Hefezelle vor. Mit Hilfe der Deletionsstämme *gid2Δ* bis *gid9Δ* konnte außerdem gezeigt werden, daß der Gid1p-Turnover von den Proteinen Gid7p und Gid8p abhängig ist. Das Fehlen des *GID7*-Gens führt wenige Minuten nach Einleitung der Katabolitinaktivierung durch Glucose zu einer raschen Abnahme der höhermolekularen Gid1p-Spezies. In *GID8*-deletierten Zellen ist dagegen die Neusynthese von Gid1p gestört. Um diese Phänotypen interpretieren zu können sind weiterführende Arbeiten notwendig.

Eine Sequenzanalyse mit Hilfe der SMART-Datenbank identifizierte innerhalb von Gid1p drei Domänen (SPRY, LisH und CTLH) mit unbekannter Funktion. Interessanterweise taucht das LisH-Motiv auch innerhalb von Gid8p und das CTLH-Motiv in den Gid-Proteinen Gid2p, Gid8p und Gid9p auf, so daß bezüglich dieser Proteinabschnitte ein funktioneller Zusammenhang zur FB Pase-Inaktivierung bestehen könnte. Außerdem weist der C-Terminus von Gid1p eine etwa 30 %ige Sequenzidentität zum menschlichen RanBP9 auf, welches als Interaktionspartner des Ran-Proteins identifiziert wurde (Nakamura et al., 1998). Das Ran-Protein ist eine Ras-ähnliche GTPase, dem eine Funktion im Kern-Ex-/Import von Makromolekülen, bei der Prozessierung von rRNA und der Zellzykluskontrolle zugeschrieben wird.

In einer *gid1*-Nullmutante wurde für die Fructose-1,6-bisphosphatase eine Halbwertszeit von über 3 Stunden gemessen (diese Arbeit; Regelmann et al., 2003). Die vom 26S-Proteasom katalysierte Hydrolyse des Enzyms ist damit weitgehend

blockiert. Pulse Chase Analysen bzw. Aktivitätsmessungen mit einer *gid1*-Punktmutante zeigten, daß *Gid1p* auch für die Katabolitinaktivierung der Phosphoenolpyruvat Carboxykinase, der Isocitrat Lyase und der cytosolischen Malatdehydrogenase benötigt wird (Hämmerle et al., 1998). Eine generelle Beteiligung von *Gid1p* bei glucoseinduzierten Katabolitinaktivierungsprozessen kann allerdings ausgeschlossen werden, da die Gal2p-Proteolyse in *gid1Δ*-Zellen nicht beeinträchtigt ist (Regelmann et al., 2003).

In *gid1*-Zellen sind die peptidspaltenden Aktivitäten des Proteasoms nicht beeinträchtigt (Hämmerle et al., 1998). Dies konnte durch einen *in situ* Overlaytest sowie durch Messung der Abbaukinetik des proteasomalen Substratproteins *Hel48p/Far10p* in einer *gid1*-Nullmutante bestätigt werden (diese Arbeit). Somit fungiert *Gid1p* bei der FB Pase-Proteolyse „upstream“ zum 26S-Proteasom. Durch ein Ubiquitinierungsexperiment (diese Arbeit), bei dem die FB Pase-Ubiquitinkonjugation in *gid1Δ*-Zellen nach Einleitung der Katabolitinaktivierung untersucht wurde, konnte dies noch genauer spezifiziert werden. Das Fehlen von FB Pase-Ubiquitinkonjugaten deutet nämlich darauf hin, daß *Gid1p* eine wichtige Rolle bei der Ubiquitinmarkierung des Enzyms spielen muß. Ob *Gid1p* direkt oder indirekt für die Polyubiquitinierung der FB Pase verantwortlich ist, kann bisher allerdings nicht beantwortet werden. Da *Gid1p* (wie *Gid2p* und *Gid7p*) zusammen mit der FB Pase aus nativen Hefeextrakten co-immunopräzipitiert werden konnte (diese Arbeit; Schüle, Dissertation 2000), wäre eine direkte Beteiligung bei der Ubiquitinmarkierung durchaus denkbar.

Darüber hinaus hat das Fehlen des *GID1*-Gens einen drastischen Einfluß auf den Turnover des Proteins *Gid4p/Vid24p* (diese Arbeit; Josupeit, Dissertation 2003). *Gid4p/Vid24p* wird in Analogie zu den FB Pase-Ubiquitinkonjugaten wenige Minuten nach Glucosegabe zu ethanoldeprimierten Hefezellen synthetisiert und könnte möglicherweise zusammen mit *Gid1p* ein weiterer essentieller Faktor für die Polyubiquitinierung sein. Neben seiner potentiellen Beteiligung beim vakuolären FB Pase-Abbau (Chiang und Chiang, 1998) wäre auch eine Funktion als Regulator von Ubiquitin-konjugierenden Enzymen denkbar, was Sequenzvergleiche mit Hilfe der SCOP-Datenbank spekulieren lassen.

Mit Hilfe einer indirekten Immunfluoreszenz konnte Gid1p in der Hefezelle lokalisiert werden (diese Arbeit). Dabei wurde in Abhängigkeit des jeweiligen Nährstoffangebots ein verstärktes Signal innerhalb des Zellkerns bzw. außerhalb im Zytosol beobachtet. Bei Wachstum in Gegenwart einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle (bzw. in glucosedepletierten Zellen) befand sich die Hauptmenge von Gid1p im Kern, 60-90 Minuten nach Glucosegabe hauptsächlich im Zytosol. Wie sein menschliches Homologes RanBP9 verändert Gid1p somit auf ein bestimmtes Signal seine Lokalisation innerhalb der Zelle.

Da der Gid4p/Vid24p-Turnover in Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle (Ethanol/Glucose) wie oben beschrieben durch Gid1p reguliert, und auch der mRNA-Spiegel diverser Gene des Stickstoffmetabolismus in Abhängigkeit der Stickstoffquelle *GID1*-abhängig kontrolliert wird (Van der Merwe et al., 2001), könnte Gid1p somit auch als Transkriptionsfaktor agieren. In diesem Modell könnte Gid1p ein wichtiger Nährstoffsensor der Hefezelle sein, wobei je nach Qualität der Kohlen- bzw. Stickstoffquelle schlußendlich ein ganz spezifischer Satz von Proteinen synthetisiert bzw. degradiert wird. Die oben diskutierte direkte Beteiligung von Gid1p bei der Ubiquitinmarkierung der FBPase schließt dies nicht aus, da diverse Proteine mehrere, voneinander unabhängige, Funktionen in einer Zelle einnehmen können. Um diese Theorie zu bestätigen sind jedoch weiterführende Experimente unbedingt erforderlich.

Gid1p wurde von Michael N. Hall und Mitarbeitern (Biozentrum Universität Basel, Schweiz) in mehreren voneinander unabhängigen 2-Hybrid-Interaktionsstudien mit den Angelproteinen Tor1p und Tor2p identifiziert und als Tin1p („Tor-interactor“ bzw. „Tor-inhibitor“) bezeichnet (Michael N. Hall, persönliche Mitteilung). In Folgeexperimenten konnte jedoch eine Protein-Protein-Interaktion über eine co-Immunopräzipitation nicht nachgewiesen werden, so daß hier vermutlich unspezifische 2-Hybrid-Wechselwirkungen detektiert wurden.

Die Tor-Proteine („target of rapamycin“) gehören zu einer Klasse von hoch konservierten Phosphatidylinositol-verwandten Proteinkinasen, die bei zahlreichen physiologischen Prozessen wie der Transkription und Translation, dem Proteinabbau, Proteinkinase C-Signaltransduktion, der Organisation des Actinzytoskeletts sowie der Biogenese von Ribosomen eine wichtige Rolle spielen

(Schmelze und Hall, 2000). In *Saccharomyces cerevisiae* kodieren die Gene *TOR1* und *TOR2* für zwei homologe Proteine mit 70 % Identität. Mit Hilfe der Droge Rapamycin kann die Funktion dieser Kinasen selektiv inhibiert werden. Wachstumstests mit Rapamycin (und Coffein) führten zur Annahme, daß eine genetische Interaktion zwischen Gid1p und den Tor-Proteinen vorliegen könnte (Michael N. Hall, persönliche Mitteilung; Eugster, Diplomarbeit 1997). Diese wachstumsphänotypischen Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit unter den gleichen Bedingungen wiederholt. Die in der Diplomarbeit von Anne C. Eugster beschriebenen Ergebnisse konnten dabei allerdings nicht bestätigt werden, was daraufhin von der Hall-Gruppe nochmals überprüft und bestätigt wurde (Michael N. Hall, persönliche Mitteilung). Ein funktioneller Zusammenhang zwischen Gid1p und den Tor-Kinasen konnte somit nicht nachgewiesen werden.

Wie Immunoblot und Pulse Chase Analysen zeigten, hat eine Inhibierung der Tor-Proteine mit der Droge Rapamycin einen gestörten Abbau der Fructose-1,6-bisphosphatase zur Folge (diese Arbeit). In ethanoldereprimierten Hefezellen, die 10-15 Minuten vor dem Umsetzen in glucosehaltiges Medium mit Rapamycin supplementiert wurden, wird die FBPase mit einer Halbwertszeit von 60-65 Minuten degradiert. Eine vergleichbare Stabilisierung wurde in *gid6Δ/ubp14Δ*-Zellen beobachtet. Daß eine selektive Inhibierung der Tor-Proteine durch Rapamycin auch tatsächlich vorlag, wurde durch Messung der FBPase-Abbaukinetik in einer rapamycinresistenten *tor1-1*-Mutante bestätigt. In rapamycinbehandelten *tor1-1*-Zellen war die Halbwertszeit der FBPase mit nichtsupplementierten Zellen dieser Punktmutante vergleichbar. Mit den Tor-Proteinen wurde damit ein weiterer, essentieller Faktor der glucoseinduzierten Katabolitinaktivierung der FBPase identifiziert. Weiterführende Untersuchungen von Punkt- und Nullmutanten diverser Tor-abhängiger „downstream“-Komponenten brachten keine weiteren Informationen bezüglich einer möglichen Funktion des Tor-Weges bei der FBPase-Inaktivierung. Interessanterweise wurden in einer temperatursensitiven *tap42-11*-Mutante und in einem *sit4*-Deletionsstamm ein signifikant reduzierter FBPase-„steady-state level“ in ethanoldereprimierten Zellen beobachtet. Dies erklärt das extrem verlangsamte Wachstum dieser Stämme in Gegenwart einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle. Der Tor-Weg scheint somit nicht nur den FBPase-Abbau, sondern auch die Derepression des Enzyms zu beeinflussen.

Mit Hilfe eines Glyceringradienten kann die molekulare Masse eines Proteins bestimmt werden. Die Untersuchungen zum Sedimentationsverhalten von Gid1p (diese Arbeit) ergaben folgenden Befund: Vor bzw. 20 Minuten nach Einleitung der Katabolitinaktivierung durch Glucose co-sedimentiert der Hauptteil von Gid1p mit der Aminopeptidase I (API). Die Aminopeptidase I ist ein Dodecamer mit einem Molekulargewicht von ca. 600 kDa. Ein nicht zu vernachlässigbarer Anteil von Gid1p co-sedimentiert außerdem mit der sich in den niedermolekularen Fraktionen befindenden FBPase. Dies deutet darauf hin, daß Gid1p in unterschiedlich großen, möglicherweise in einem dynamischen Gleichgewicht befindenden, Molekülaggregaten in der *S. cerevisiae*-Zelle vorliegt. Die FBPase ist im Vergleich zur 3-Phosphoglyceratkinase (monomer mit 45 kDa) im Gradienten etwas nach rechts verschoben. Dies bedeutet, daß das gluconeogenetische Schlüsselenzym nicht als monomer in der Zelle vorliegt. Dieses Ergebnis korreliert einerseits mit der Tatsache, daß die FBPase ein Tetramer darstellt (Bigl und Eschrich, 1994), andererseits steht es im Einklang mit diversen Interaktionsstudien, bei denen Wechselwirkungen zwischen der FBPase mit Gid1p, Gid2p und Gid7p identifiziert (diese Arbeit; Schüle, Dissertation 2000) sowie Interaktionen von Gid7p mit Gid1p, Gid2p, Gid4p, Gid5p, Gid8p und Gid9p nachgewiesen werden konnten (Ho et al., 2000; Thorsten Pfirrmann, persönliche Mitteilung). Es kann somit über die Existenz eines höhermolekularen „Gid-Komplexes“ bei der FBPase-Inaktivierung spekuliert werden.

Auf Grundlage der in dieser Dissertation beschriebenen Daten und daraus abgeleiteten Schlußfolgerungen ergibt sich für die Katabolitinaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase das in Abb. 50 dargestellte Modell:

Die FBPase wird unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen exprimiert. Die Gluconeogenese ist ein essentieller Stoffwechselweg und dient der Synthese von Glucose aus Nichtkohlenhydratvorstufen.

Werden die *Saccharomyces cerevisiae*-Kulturen mit Glucose supplementiert, wird unter Beteiligung der Proteine Grr1p und Reg1p innerhalb der Zelle eine Signalkaskade – deren einzelne Komponenten bisher unbekannt sind – in Gang gesetzt. Als Reaktion darauf wird die FBPase schnell in zwei Stufen inaktiviert, was

die Inaktivierung der Gluconeogenese zur Folge hat und eine Energieverschwendung in der Hefezelle ausschließt. Zunächst erfolgt eine Phosphorylierung am Serinrest 11, die innerhalb der ersten 15-20 Minuten reversibel ist und zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität führt. Dem folgt der irreversible proteolytische Abbau mit einer Halbwertszeit von 20-30 Minuten (vergleiche Proteolyseweg I). Eine Blockierung der Phosphorylierungsstelle hat keinen Einfluß auf die Halbwertszeit der FBPase. Im Gegensatz dazu hat ein Austausch des N-terminalen Prolins durch eine andere Aminosäure einen vollständig blockierten Abbau des Enzyms zur Folge. Dem N-terminalen Prolin der FBPase muß demnach eine zentrale Funktion – möglicherweise bei der Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen - bei der Katabolitdegradation zugeschrieben werden.

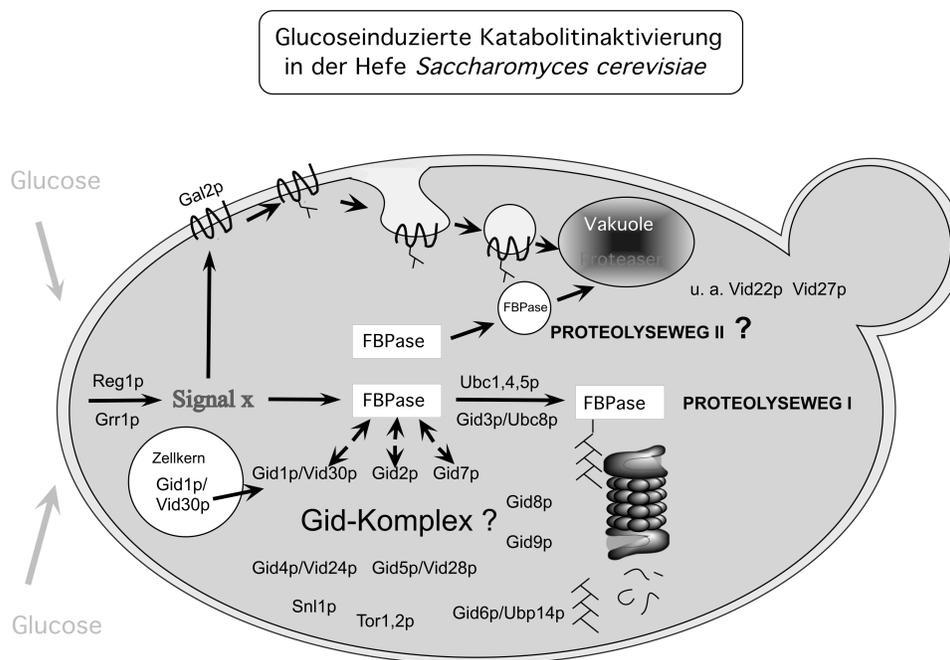


Abb. 50: Modell der glucoseinduzierten Katabolitinaktivierung der FBPase in *Saccharomyces cerevisiae*.

Die seit Jahren mit der Arbeitsgruppe von Hui-Ling Chiang (Department of Cellular and Molecular Physiology Hershey, USA) kontrovers geführte Diskussion bezüglich des FBPase-Abbaumechanismus konnte durch Isolierung und Charakterisierung von

sogenannten *gid*- und *vid*-Mutanten möglicherweise geklärt werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse bestätigten die schon früher angestellten Vermutungen, daß die FBPase in Abhängigkeit der Wachstumsbedingungen vermutlich über zwei verschiedene Wege abgebaut wird. FBPase-Derepressionszeiten von 5 bis 16 Stunden führen zu **Proteolyseweg I**, der vom zytosolischen Ubiquitin-Proteasomsystem katalysiert wird. Wird die Induktionszeit auf etwa 48 Stunden ausgedehnt, tritt **Proteolyseweg II** in Erscheinung. Bei Proteolyseweg II wird die FBPase im Zytosol in sogenannte Vid-Vesikel eingeschlossen, zur Vakuole transportiert und nach dem Import von unspezifischen Proteasen degradiert. Der von der Chiang-Arbeitsgruppe publizierte Proteolyseweg II konnte möglicherweise deshalb von unserem Labor nicht nachgewiesen werden, da uns die Reaktionsbedingungen im Detail nicht bekannt sind. Die Tatsache, daß nicht alle identifizierten Proteinkomponenten von Proteolyseweg II für Proteolyseweg I (und umgekehrt) benötigt werden (z. B. Vid22p und Vid27p), deuten auf einen weiteren, vom 26S-Proteasom unabhängigen, Mechanismus hin.

Proteolyseweg I und Proteolyseweg II benutzen neben anderen Komponenten einen ganz spezifischen, teilweise überlappenden, Satz von *Gid*- und *Vid*-Proteinen. Interaktionsstudien und diverse Zellfraktionierungstechniken deuten darauf hin, daß bei Proteolyseweg I ein höhermolekularer „*Gid*-Komplex“ beteiligt ist, dessen Zusammensetzung und Funktion jedoch im Detail nicht bekannt ist. Interessanterweise sind einzelne Komponenten dieses potentiellen „*Gid*-Komplexes“ - wie das Protein *Gid1p/Vid30p* - im Verlauf der FBPase-Inaktivierung nicht ausschließlich im Zytosol, sondern auch im Zellkern lokalisiert. Dort könnte *Gid1p* als Transkriptionsfaktor agieren. Da bestimmte *Gid*-Proteine wie *Gid1p* und *Gid2p* mit der FBPase interagieren und bei einer Deletion der entsprechenden Gene die Polyubiquitinierung der FBPase blockiert ist, könnte der neu identifizierte „*Gid*-Komplex“ eine wichtige Rolle für die Ubiquitinmarkierung des Enzyms spielen und die schon seit längerer Zeit gesuchte Ubiquitin-Ligase der FBPase-Inaktivierung sein. Dies sind offene Fragen, die Gegenstand einer weiterführenden Arbeit darstellen könnten.

5 Zusammenfassung

Die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) wird exprimiert, wenn Zellen der Hefe *S. cerevisiae* auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle wachsen. Nach Glucosegabe wird die Neusynthese sofort abgeschaltet, die enzymatische Aktivität auf etwa die Hälfte reduziert und das Protein zügig über das Ubiquitin-Proteasomsystem abgebaut. Dieser Vorgang wird als Katabolitinaktivierung bezeichnet und ist einer der zentralen Schritte beim Umschaltprozeß der Zelle von der Gluconeogenese zur Glykolyse. Um den molekularen FBPase-Inaktivierungsmechanismus besser verstehen zu können, wurde im Rahmen dieser Dissertation nach sogenannten *GID*-Genen gesucht, die für die proteasomale FBPase-Hydrolyse essentiell sind. Ausgehend von einer *gid1*-Punktmutante wurde durch Komplementation des Mutantenphänotyps das *GID1/VID30*-Gen kloniert. Das für diesen Ansatz etablierte Verfahren wurde im Folgenden so modifiziert, daß mit Hilfe der kommerziell erhältlichen EUROSCARF-Mutantenkollektion die Suche genomweit ausgedehnt werden konnte. Auf diese Weise gelang es die bereits bekannten Gene *GID2*, *GID3/UBC8* und *GID4/VID24* zu identifizieren. Außerdem wurden fünf neue *S. cerevisiae*-Gene isoliert, die die Bezeichnung *GID5* bis *GID9* erhielten. In *GID1*-, *GID2*-, *GID3*-, *GID4*-, *GID5*-, *GID7*-, *GID8*- und *GID9*-deletierten Zellen ist die Degradation der FBPase vollständig blockiert. Bei einer *gid6Δ*-Mutante ist die Halbwertszeit der FBPase-Proteolyse im Vergleich zum isogenen Wildtyp immerhin dreifach erhöht. Darüber hinaus konnten *SNL1*, *GRR1* und *REG1* als weitere wichtige Komponenten der FBPase-Abbaumaschinerie identifiziert werden. Durch selektive Inhibierung der Tor-Kinasen wurde darüber hinaus eine Beteiligung der *TOR*-Gene bei diesem Prozeß nachgewiesen.

Über eine mögliche Funktion der *GID*-Gene bei der FBPase-Inaktivierung gibt es bisher nur sehr wenig Informationen. *GID3* kodiert für das Ubiquitin-konjugierende Enzym Ubc8p und *GID6* für das Deubiquitinierungsenzym Ubp14p. Kombiniert mit den Ergebnissen aus früheren Arbeiten in unserem Labor sprechen diese Daten eindeutig für eine Beteiligung des Ubiquitin-Proteasomsystems bei der FBPase-Degradation, was bisher von einer amerikanischen Arbeitsgruppe immer angezweifelt wurde. Gemäß des Chiang-Modells wird die FBPase nämlich in sogenannte Vid-Vesikel eingeschlossen und unabhängig vom 26S-Proteasom in der

Vakuole abgebaut. Kürzlich wurde der von uns beschriebene Proteolysemechanismus jedoch von Hui-Ling Chiang bestätigt. Interessanterweise waren drei der isolierten *GID*-Gene mit von der Chiang-Gruppe veröffentlichten *VID*-Genen identisch, denen eine zentrale Rolle bei der vakuolären FBPase-Hydrolyse zugeschrieben wird. Weiterführende Experimente mit zusätzlichen *vid*-Nullmutanten bestätigten die schon früher angestellten Vermutungen, daß die FBPase in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen (kurze/lange FBPase-Derepressionszeiten) über zwei verschiedene Wege (26S-Proteasom/Vakuole) abgebaut werden könnte und dazu jeweils ein ganz spezifischer, teilweise überlappender, Satz von Gid- und/oder Vid-Proteinen benötigt wird. Unter welchen Bedingungen die Hefezelle von der proteasomalen zur vakuolären Katabolitinaktivierung umschaltet ist jedoch noch ungeklärt.

Die genetische und biochemische Charakterisierung des *GID1/VID30*-Gens führte zu folgenden Erkenntnissen: In *GID1*-deletierten Zellen ist die Funktion des 26S-Proteasoms nicht beeinträchtigt. Die um den Faktor sieben erhöhte Halbwertszeit der FBPase-Proteolyse im Vergleich zu Wildtypzellen muß damit durch einen anderen, von den proteasomalen Aktivitäten unabhängigen, Effekt begründet sein. Bei Ubiquitinierungsexperimenten wurde in einer *gid1* Δ -Mutante das Fehlen von FBPase-Ubiquitinkonjugaten beobachtet. Gid1p spielt demnach eine entscheidende Rolle bei der Ubiquitinmarkierung der FBPase. Zudem konnte gezeigt werden, daß eine Deletion von *GID1* den Gid4p/Vid24p-Turnover beeinflusst. Das Protein Gid4p wird in Analogie zu den FBPase-Ubiquitinkonjugaten wenige Minuten nach Glucosegabe zu ethanol-dereprimierten Hefezellen gebildet und könnte, was Sequenzvergleiche mit der SCOP-Datenbank spekulieren lassen, ein Regulator von E2-Enzymen darstellen. Zur weiteren Charakterisierung von Gid1p wurden Ha-epitopmarkierte Fusionsproteine (Gid1-Ha₃) hergestellt. Turnovermessungen ergaben, daß Gid1p unter gluconeogenetischen Wachstumsbedingungen in einer deutlich erhöhten Konzentration in der Hefezelle vorliegt. Unter den getesteten Bedingungen lag Gid1p stets in zwei verschiedenen Proteinmodifikationen in der Zelle vor. Weiterführende Experimente zeigten, daß die höhermolekulare Form durch eine Phosphorylierung begründet ist. Mit Hilfe der Deletionsstämme *gid2* Δ bis *gid9* Δ wurde eine Abhängigkeit des Gid1p-Turnovers von den Gid-Proteinen Gid7p und Gid8p nachgewiesen. In glucosedepletierten bzw. ethanol-dereprimierten Zellen wurde eine deutliche

Anreicherung von Gid1p im Zellkern beobachtet. 60-90 Minuten nach Einleitung der Katabolitinaktivierung nahm die Konzentration des Proteins außerhalb des Zellkerns signifikant zu. Gid1p verändert demnach in Abhängigkeit des Nährstoffangebots seine Lokalisation (Zellkern/Zytosol) innerhalb der *S. cerevisiae*-Zelle. Dies ist ein Phänomen, das z. B. bei Transkriptionsfaktoren beobachtet wird und den gestörten Gid4p-Turnover bzw. das Fehlen von FB Pase-Ubiquitinkonjugaten in *gid1Δ*-Zellen erklären könnte. Unter FB Pase-Inaktivierungsbedingungen konnte eine Wechselwirkung zwischen Gid1p und der FB Pase nachgewiesen werden. Damit wäre auch eine direkte Beteiligung von Gid1p bei der Ubiquitinmarkierung der FB Pase denkbar. Darüber hinaus wurde eine Interaktion zwischen Gid2p bzw. Gid7p und der FB Pase gezeigt. Weitere Untersuchungen ergaben, daß Gid1p in unterschiedlich großen Molekülaggregaten in der Hefezelle vorliegen muß. Diese Ergebnisse deuten auf die Beteiligung eines höhermolekularen „Gid-Komplexes“ bei der FB Pase-Inaktivierung hin.

6 Abstract

The nutrient glucose has a pivotal influence on protein synthesis and degradation. Glucose-triggered proteolysis of the gluconeogenic key enzyme fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) is one of the most important regulatory steps, when *S. cerevisiae* cells switch from gluconeogenesis to glycolysis. FBPase is synthesized, when yeast cells are growing in media containing a non-fermentable carbon source like ethanol or glycerol. After glucose addition, protein synthesis is arrested and the enzyme becomes inactivated in a process called catabolite inactivation. The inactivation process consists of two separate steps: 1) phosphorylation of the enzyme and 2) degradation of the protein with a half-life of 20-30 minutes. Similar mechanisms are described for the phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), the cytosolic malate dehydrogenase (cMDH), the isocitrate lyase (ICL) and sugar transporters like the galactose permease Gal2p. The breakdown of FBPase blocks gluconeogenesis to prevent an otherwise ongoing futile cycle of ATP hydrolysis.

The site of FBPase inactivation is the subject of an ongoing debate. The import of FBPase into Vid-vesicles with a diameter of 30-40 nm and its subsequent vacuolar degradation have been reported by the group of Hui-Ling Chiang (Department of Cellular and Molecular Physiology Hershey, USA). This vacuolar catabolite inactivation process has been analyzed genetically by isolating and characterizing so-called *vid*-mutants (“vacuolar import and degradation”). Proteinase yscA-dependent degradation of FBPase has been shown to require, besides other factors, Vid22p and Vid24p. Vid24p has been reported to be peripherally attached to Vid-vesicles.

Our laboratory has found that the inactivation of FBPase occurs independently of vacuolar proteolysis. Instead, we find that the breakdown of the enzyme depends on polyubiquitination and the activity of the 26S proteasome. The linkage of polyubiquitin chains onto proteins via an enzyme cascade consisting of an ubiquitin activating enzyme (E1), ubiquitin conjugating enzyme (E2) and ubiquitin protein ligases (E3) marks these proteins for degradation via the cytoplasmic and nuclear proteolytic nanocompartment, the proteasome. Interestingly, recent studies of Hui-Ling Chiang confirmed our proteasome-dependent mechanism.

To achieve a better understanding of the molecular mechanism of FBPase proteolysis, the *gid1*-mutant WAY.5-4A/D1 (“glucose-induced degradation deficient”) was complemented applying an immunological colony screen and the respective *GID1* wild-type gene was cloned. In a genome-wide screen, using the EUROSCARF collection which represents about 85 % of the yeast genome, eight additional *GID* genes (*GID2-GID9*) were identified. Further essential components of the proteasomal FBPase inactivation machinery are *SNL1* and *GRR1*.

No function for most of these *Gid* proteins has yet been described. *GID3* encodes the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc8p and *GID6* encodes the deubiquitinating enzyme Ubp14p. Ubp14p is thought to act as a “helper” enzyme during proteasomal breakdown of ubiquitinated proteins. It disassembles free ubiquitin chains, which would otherwise compete with binding of ubiquitinated proteins to the proteasome. The identification of Ubc8p and Ubp14p was another important hint for the involvement of the ubiquitin-proteasome system for FBPase degradation. Interestingly, *GID1*, *GID4* and *GID5* are identical with the *VID* genes *VID30*, *VID24* and *VID28*. Further analysis with additional *vid*-mutant strains raised the question as to whether two catabolite inactivation pathways for the gluconeogenic key enzyme – depending on growth conditions - exist. Some – but not all – components of the (proteasomal) proteolytic pathway I are shared with the (vacuolar) proteolytic pathway II.

For glucose signalling in yeast, a variety of signal transduction pathways exist and the ultimately response is a change in the synthesis or degradation of specific proteins. The cAMP-protein kinase A pathway, the glucose (catabolite) repression pathway and the pathway controlling the induction of hexose transporter genes are the three best-characterized pathways that respond to an increased availability of glucose. A systematic screen with mutants defective in the above mentioned pathways revealed in collaboration with Jaroslav Horak that beneath *Grr1p* also *Reg1p* is involved in catabolite inactivation of FBPase.

The *Tor* proteins (“target of rapamycin”) are members of a class of phosphatidylinositol kinase related protein kinases (PIKK), first discovered in yeast and now also found in mammals, worms, flies and plants. It has been demonstrated,

that yeast and mammalian Tor kinases control several readouts in response to nutrients. These include translation initiation, the organization of the actin cytoskeleton, membrane traffic and protein degradation, PKC signalling, ribosome biogenesis and transcription. In *S. cerevisiae*, the highly homologous (70 % identical) Tor1p and Tor2p proteins redundantly regulate cell growth in a rapamycin-sensitive manner. However, the polarization of the actin cytoskeleton is controlled by Tor2p in a rapamycin-insensitive manner. Tor signalling is involved in catabolite inactivation of FBPase, because inhibition of Tor1/2p by the immunosuppressant and antibiotic rapamycin leads to a significantly decreased proteolysis rate of the enzyme.

Gid1p contains a LIS1 homology (LisH) motif, which is also present in Gid8p and in many eukaryotic proteins involved in microtubule dynamics, cell migration, nucleokinesis and chromosome segregation. The LisH motif is found associated to other domains, such as WD40, SPRY, RasGEF, HEAT, Kelch or AAA ATPase. Furthermore, a CTLH (C-terminal to LisH) and a SPRY (named from the Spl1a and Ryanodine receptor) domain, both of unknown function, reside within Gid1p. Interestingly, in the yeast genome the CTLH domain is present in only four proteins: Gid1p, Gid2p, Gid8p and Gid9p. The C-terminus of Gid1p shows 30 % identity with the human RanBP9.

Gid1p is involved in catabolite inactivation of FBPase, PEPCK, cMDH and ICL, but not necessary for the inactivation pathway of the galactose transporter Gal2p. To learn more about the function of Gid1p, glucose-induced ubiquitination of FBPase and the peptide-cleaving activities of the 26S proteasome were measured in *gid1Δ* cells. In contrast to the wild-type strain, no FBPase-ubiquitin conjugates were detectable in *GID1* deleted cells. The proteasomal trypsin-like, chymotrypsin-like or peptidyl-glutamylpeptide-hydrolyzing (PGPH) peptide cleaving activity was not impaired in the *gid1Δ* mutant. This suggests an important function of Gid1p in (or upstream to) ubiquitination of FBPase.

Only minor amounts of Gid1p were detectable in cells grown in the presence of glucose (log-phase cells). Gid1p is significantly upregulated in glucose depleted (stationary phase) cells or in cells grown in ethanol containing medium. After glucose addition to

ethanol-derepressed cells *Gid1p* is relatively stable consistent with its important role during the metabolic switch from gluconeogenesis to glycolysis. Western blot analysis further showed that *Gid1p* migrates as a double band. This protein-modification is due to phosphorylation, which was shown by an assay using alkaline phosphatase (CIP). The synthesis of *Gid1p* depends on the presence of *GID8*. In contrast lack of *GID7* leads to a decrease of the second high molecular form of *Gid1p* already about 10 minutes after onset of glucose-triggered catabolite inactivation.

The turnover of *Gid4p/Vid24p* is controlled by *Gid1p*. Under gluconeogenetic growth conditions *Gid1p* mainly localizes in the nucleus. 60-90 minutes after glucose addition to these cells a significant amount of *Gid1p* is found in the cytoplasm. These data suggest that *Gid1p* shuttles between nucleus and cytoplasm and therefore could function as a transcription factor.

The sedimentation patterns of *Gid2p* in sucrose and glycerol density gradients in combination with cell fractionation proposed that the protein is a part of a cytosolic protein complex with a molecular mass of at least 600 kDa. *Gid1p* showed a similar sedimentation behaviour in a glycerol density gradient. Additionally, protein-protein interactions between *FBPase*, *Gid1p*, *Gid2p* and *Gid7p* were observed in a time-dependent manner after onset of glucose-triggered *FBPase* proteolysis. These results suggest the involvement of a high molecular "Gid complex" in the proteasome dependent catabolite inactivation of *FBPase*.

7 Abkürzungen

(m)A	(Milli-) Ampere
Abb.	Abbildung
Ade	Adenin
Amp	Ampicillin
API	Aminopeptidase I
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine (Rinder)-Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CHX	Cycloheximid
CM	Synthetisches Vollmedium
cMDH	cytosolische Malatdehydrogenase
CMEtOH	Synthetisches Ethanol-Vollmedium
CPY	Carboxypeptidase Y
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1-Enzym	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2-Enzym	Ubiquitin-konjugierendes Enzym
E3-Enzym	Ubiquitinligase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
etc.	etcetera
EtOH	Ethanol
(μ)F	(Mikro-) Farad

Fas	Fettsäuresynthase
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
5-FOA	5-Fluoroorotat
(m, μ) g	(Milli-, Mikro-) Gramm
Gal	Galactose
Glc	Glucose
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde(n)
Ha	Ha-(Haemagglutinin) Epitop
HCl	Salzsäure
His	Histidin
KAN	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
(m, μ) l	(Milli-, Mikro-) Liter
IgG	Immunoglobulin G
Inkl.	inklusiv
LB	Luria-Bertani-Medium
Leu	Leucin
LiOAc	Lithiumacetat
Lys	Lysin
(m)M	(milli-) molar
β -ME	2-Mercaptoethanol
MAT	Paarungstyp
MCS	Multiple Cloning Site
Met	Methionin
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
MV	Mineralmedium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
Nr.	Nummer

nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF	open reading frame
Ω	Ohm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PEPCK	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
PGK	Phosphoglyceratkinase
PGPH	Peptidylglutamyl-peptid-hydrolysierend
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
Pro	Prolin
RNA	Ribonucleinsäure
RNAse A	Ribonuclease A
Rap	Rapamycin
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	Unit (Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro Minute
Ura	Uracil
usw.	und so weiter
V	Volt
v/v, w/v	Volumen pro Volumen, Gewicht pro Volumen

w/o	without
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
YPD	Glucose-Vollmedium
YPEtOH	Ethanol-Vollmedium
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

8 Literaturverzeichnis

- Amerik, A., S. Swaminathan, B. A. Krantz, K. D. Wilkinson, and M. Hochstrasser. 1997. In vivo disassembly of free polyubiquitin chains by yeast Ubp14 modulates rates of protein degradation by the proteasome. *Embo J* 16: 4826-38.
- Amerik, A. Y., and M. Hochstrasser. 2004. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695: 189-207.
- Ausubel, F. M., R. E. Kingston, F. G. Seidman, K. Struhl, D. D. Moore, R. Brent, and F. A. Smith. 1992. Current Protocols in Molecular Biology. *New York: John Wiley & Sons*.
- Baba, M., K. Takeshige, N. Baba, and Y. Ohsumi. 1994. Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J Cell Biol* 124: 903-13.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, and L. Stryer. 2002. Biochemistry, Fifth Edition.
- Brown, C. R., D. Y. Cui, G. G. Hung, and H. L. Chiang. 2001. Cyclophilin A mediates Vid22p function in the import of fructose-1,6-bisphosphatase into Vid vesicles. *J Biol Chem* 276: 48017-26.
- Brown, C. R., J. Liu, G. C. Hung, D. Carter, D. Cui, and H. L. Chiang. 2003. The Vid vesicle to vacuole trafficking event requires components of the SNARE membrane fusion machinery. *J Biol Chem* 278: 25688-99.
- Brown, C. R., J. A. McCann, and H. L. Chiang. 2000. The heat shock protein Ssa2p is required for import of fructose-1, 6-bisphosphatase into Vid vesicles. *J Cell Biol* 150: 65-76.
- Brown, C. R., J. A. McCann, G. G. Hung, C. P. Elco, and H. L. Chiang. 2002. Vid22p, a novel plasma membrane protein, is required for the fructose-1,6-bisphosphatase degradation pathway. *J Cell Sci* 115: 655-66.
- Carlson, M. 1999. Glucose repression in yeast. *Curr Opin Microbiol* 2: 202-7.
- Chiang, H. L., and R. Schekman. 1991. Regulated import and degradation of a cytosolic protein in the yeast vacuole. *Nature* 350: 313-8.
- Chiang, H. L., R. Schekman, and S. Hamamoto. 1996. Selective uptake of cytosolic, peroxisomal, and plasma membrane proteins into the yeast lysosome for degradation. *J Biol Chem* 271: 9934-41.

- Chiang, M. C., and H. L. Chiang. 1998. Vid24p, a novel protein localized to the fructose-1, 6-bisphosphatase-containing vesicles, regulates targeting of fructose-1,6-bisphosphatase from the vesicles to the vacuole for degradation. *J Cell Biol* 140: 1347-56.
- Ciechanover, A., and A. L. Schwartz. 2004. The ubiquitin system: pathogenesis of human diseases and drug targeting. *Biochim Biophys Acta* 1695: 3-17.
- Cottarel, G. 1995. The *Saccharomyces cerevisiae* HIS3 and LYS2 genes complement the *Schizosaccharomyces pombe* his5-303 and lys1-131 mutations, respectively: new selectable markers and new multi-purpose multicopy shuttle vectors, pSP3 and pSP4. *Curr Genet* 28: 380-3.
- Cui, D. Y., C. R. Brown, and H. L. Chiang. 2004. The type 1 phosphatase Reg1p-Glc7p is required for the glucose-induced degradation of fructose-1,6-bisphosphatase in the vacuole. *J Biol Chem* 279: 9713-24.
- Dupre, S., D. Urban-Grimal, and R. Haguener-Tsapis. 2004. Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta* 1695: 89-111.
- Egner, R., M. Thumm, M. Straub, A. Simeon, H. J. Schüller, and D. H. Wolf. 1993. Tracing intracellular proteolytic pathways. Proteolysis of fatty acid synthase and other cytoplasmic proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268: 27269-76.
- Epple, U. D., I. Suriapranata, E. Eskelinen, and M. Thumm. 2001. Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *J Bact* 183: 5942-55.
- Eugster, A. C. 1996. A search for Two-Hybrid interactors of TOR1 and characterisation of one putative interactor: TIN1. Diplomarbeit, Biozentrum Universität Basel.
- Funayama, S., J. M. Gancedo, and C. Gancedo. 1980. Turnover of yeast fructose-bisphosphatase in different metabolic conditions. *Eur J Biochem* 109: 61-6.
- Gancedo, C. 1971. Inactivation of fructose-1,6-diphosphatase by glucose in yeast. *J Bacteriol* 107: 401-5.
- Gancedo, J. M. 1998. Hxk2 and Mig1 are the two major factors of glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 334-61.

- Gibson, N., and L. McAlister-Henn. 2003. Physical and genetic interactions of cytosolic malate dehydrogenase with other gluconeogenic enzymes. *J Biol Chem* 278: 25628-36.
- Glotzer, M., A. W. Murray, and M. W. Kirschner. 1991. Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349: 132-8.
- Goffeau, A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, and S. G. Oliver. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274: 546, 563-7.
- Güldener, U., S. Heck, T. Fielder, J. Beinhauer, and J. H. Hegemann. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 24: 2519-24.
- Guthrie, C., and G. R. Fink. 1991. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology. *New York: Academic Press* 194.
- Haeghele, E., J. Neeff, and D. Mecke. 1978. The malate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, characterisation and studies on their regulation. *Eur J Biochem* 83: 67-76.
- Hammerle, M., J. Bauer, M. Rose, A. Szallies, M. Thumm, S. Dusterhus, D. Mecke, K. D. Entian, and D. H. Wolf. 1998. Proteins of newly isolated mutants and the amino-terminal proline are essential for ubiquitin-proteasome-catalyzed catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273: 25000-5.
- Hannahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 576-84.
- Hieter, P., D. E. Bassett, Jr., and D. Valle. 1996. The yeast genome--a common currency. *Nat Genet* 13: 253-5.
- Hilt, W., C. Enenkel, A. Gruhler, T. Singer, and D. H. Wolf. 1993. The PRE4 gene codes for a subunit of the yeast proteasome necessary for peptidylglutamyl-peptide-hydrolyzing activity. Mutations link the proteasome to stress- and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Biol Chem* 268: 3479-86
- Hilt, W., and D. H. Wolf. 1995. Proteasomes of the yeast *S. cerevisiae*: genes, structure and functions. *Mol Biol Rep* 21: 3-10.

- . 1996. Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem Sci* 21: 96-102.
- Ho, Y., A. Gruhler, A. Heilbut, G. D. Bader, L. Moore, S. L. Adams, A. Millar, P. Taylor, K. Bennett, K. Boutilier, L. Yang, C. Wolting, I. Donaldson, S. Schandorff, J. Shewnarane, M. Vo, J. Taggart, M. Goudreault, B. Muskat, C. Alfarano, D. Dewar, Z. Lin, K. Michalickova, A. R. Willems, H. Sassi, P. A. Nielsen, K. J. Rasmussen, J. R. Andersen, L. E. Johansen, L. H. Hansen, H. Jespersen, A. Podtelejnikov, E. Nielsen, J. Crawford, V. Poulsen, B. D. Sorensen, J. Matthiesen, R. C. Hendrickson, F. Gleeson, T. Pawson, M. F. Moran, D. Durocher, M. Mann, C. W. Hogue, D. Figeys, and M. Tyers. 2002. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* 415: 180-3.
- Hochstrasser, M. 1996. Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30: 405-39
- Hoffman, M., and H. L. Chiang. 1996. Isolation of degradation-deficient mutants defective in the targeting of fructose-1,6-bisphosphatase into the vacuole for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 143: 1555-66.
- Holzer, H. 1976. Catabolite inactivation in yeast. *Trends Biochem Sci* 1: 178-81.
- Horak, J. 2003. The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. *Biochim Biophys Acta* 1614: 139-55.
- Horak, J., J. Regelmann, and D. H. Wolf. 2002. Two distinct proteolytic systems responsible for glucose-induced degradation of fructose-1,6-bisphosphatase and the Gal2p transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* share the same protein components of the glucose signaling pathway. *J Biol Chem* 277: 8248-54.
- Horak, J., and D. H. Wolf. 1997. Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endocytosis, and degradation in the vacuole. *J Bacteriol* 179: 1541-9.
- Huang, P. H., and H. L. Chiang. 1997. Identification of novel vesicles in the cytosol to vacuole protein degradation pathway. *J Cell Biol* 136: 803-10.

- Hung, G. C., C. R. Brown, A. B. Wolfe, J. Liu, and H. L. Chiang. 2004. Degradation of the gluconeogenic enzymes fructose-1,6-bisphosphatase and malate dehydrogenase is mediated by distinct proteolytic pathways and signaling events. *J Biol Chem* 279: 49138-50.
- Jones, E. W., G. C. Webb, and M. A. Hiller. 1997. Biogenesis and function of the yeast vacuole. molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Vol. III. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p 363-469.
- Josupeit, F. S. 2003. Die Glucose-induzierte Katabolitinaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*: Neue Komponenten ihres Ubiquitin-Proteasom-katalysierten Abbaus. Dissertation, Universität Stuttgart, Institut für Biochemie.
- Kamada, Y., T. Funakoshi, T. Shintani, K. Nagano, M. Ohsumi, and Y. Ohsumi. 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 150: 1507-13.
- Klionsky D. J., R. Cueva, and D. S. Yaver. 1992. Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J Cell Biol* 119: 287-99.
- Koegl, M., T. Hoppe, S. Schlenker, H. D. Ulrich, T. U. Mayer, and S. Jentsch. 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96: 635-44.
- Kostova, Z., and D. H. Wolf. 2003. For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *Embo J* 22: 2309-17.
- Kruckeberg, A. L., M. C. Walsh, and K. Van Dam. 1998. How do yeast cells sense glucose? *Bioessays* 20: 972-76.
- Loewith, R., E. Jacinto, S. Wullschleger, A. Lorberg, J. L. Crespo, D. Bonenfant, W. Oppliger, P. Jenoe, and M. N. Hall. 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell* 10: 457-68.
- Lopez-Boado, Y. S., P. Herrero, S. Gascon, and F. Moreno. 1987. Catabolite inactivation of isocitrate lyase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 147: 231-4.

- Mayordomo, I., J. Regelman, J. Horak, and P. Sanz. 2003. Saccharomyces cerevisiae 14-3-3 proteins Bmh1 and Bmh2 participate in the process of catabolite inactivation of maltose permease. *FEBS Lett* 544: 160-4.
- Mazon, M. J., J. M. Gancedo, and C. Gancedo. 1982. Inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. In vivo phosphorylation of the enzyme. *J Biol Chem* 257: 1128-30.
- Meiling-Wesse, K., H. Barth, and M. Thumm. 2002. Ccz1p/Aut11p/Cvt16p is essential for autophagy and the cvt pathway. *FEBS Lett* 526: 71-6
- Michel, R. H., P. E. McGovern, and V. R. Badler. 1992. Chemical evidence for ancient beer. *Nature* 360: 24.
- Minard, K. I., and L. McAlister-Henn. 1992. Glucose-induced degradation of the MDH2 isozyme of malate dehydrogenase in yeast. *J Biol Chem* 267: 17458-64.
- Müller, D., and H. Holzer. 1981. Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast by phosphorylation/dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 103: 926-33.
- Nakamura, M., H. Masuda, J. Horii, K. Kuma, N. Yokoyama, T. Ohba, H. Nishitani, T. Miyata, M. Tanaka, and T. Nishimoto. 1998. When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to γ -tubulin. *J Cell Biol* 143: 1041-52
- Pickart, C. M., and M. J. Eddins. 2004. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1695: 55-72.
- Pringle, J. R., A. E. M. Adams, D. G. Drubin, and B. K. Haarer. 1992. Immunofluorescence methods for yeast. in *Methods in Enzymology* 194: 565-602.
- Pringle, J. R., R. A. Preston, A. E. Adams, T. Stearns, D. G. Drubin, B. K. Haarer, and E. W. Jones. 1989. Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol* 31:357-435.
- Raught, B., A. C. Gingras, and N. Sonenberg. 2001. The target of rapamycin (TOR) proteins. *PNAS* 98: 7037-44.
- Rechsteiner, M. 1988. Regulation of enzyme levels by proteolysis: the role of pest regions. *Adv Enzyme Regul* 27: 135-51.

- Regelmann, J., T. Schule, F. S. Josupeit, J. Horak, M. Rose, K. D. Entian, M. Thumm, and D. H. Wolf. 2003. Catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide screen identifies eight novel GID genes and indicates the existence of two degradation pathways. *Mol Biol Cell* 14: 1652-63.
- Rittenhouse, J., P. B. Harrsch, J. N. Kim, and F. Marcus. 1986. Amino acid sequence of the phosphorylation site of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) fructose-1,6-bisphosphatase. *J Biol Chem* 261: 3939-43.
- Rittenhouse, J., L. Moberly, and F. Marcus. 1987. Phosphorylation in vivo of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) fructose-1,6-bisphosphatase at the cyclic AMP-dependent site. *J Biol Chem* 262: 10114-9.
- Rogers, S., R. Wells, and M. Rechsteiner. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234: 364-8.
- Rolland, F., J. Winderickx, and J. M. Thevelein. 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* 26: 310-17.
- Rose, M. D., P. Novick, J. H. Thomas, D. Botstein, and G. R. Fink. 1987. A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene* 60: 237-43.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor, New York.
- Scheffner, M., S. Smith, and S. Jentsch. 1998. The ubiquitin-conjugation system. In Peters, J. M., J. R. Harris, and D. Finley (eds), *Ubiquitin and the Biology of the cell*. Plenum Press, New York and London, pp. 65-98.
- Schlumpberger, M., E. Schaeffeler, M. Straub, M. Bredschneider, D. H. Wolf, and M. Thumm. 1997. Aut1, a gene essential for autophagocytosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 179: 1068-76.
- Schmelzle, T., and M. N. Hall. 2000. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103: 253-62.
- Schork, S. M., G. Bee, M. Thumm, and D. H. Wolf. 1994a. Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast is mediated by the proteasome. *FEBS Lett* 349: 270-4.
- . 1994b. Site of catabolite inactivation. *Nature* 369: 283-4.

- Schork, S. M., M. Thumm, and D. H. Wolf. 1995. Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. Degradation occurs via the ubiquitin pathway. *J Biol Chem* 270: 26446-50.
- Schuele, T., M. Rose, K. D. Entian, M. Thumm, and D. H. Wolf. 2000. Ubc8p functions in catabolite degradation of fructose-1, 6-bisphosphatase in yeast. *Embo J* 19: 2161-7.
- Schuele, T. 2000. Gid2p und Gid3p, zwei neue, an der Katabolitinaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beteiligte Proteine. Dissertation, Universität Stuttgart, Institut für Biochemie.
- Shieh, H. L., Y. Chen, C. R. Brown, and H. L. Chiang. 2001. Biochemical analysis of fructose-1,6-bisphosphatase import into vacuole import and degradation vesicles reveals a role for UBC1 in vesicle biogenesis. *J Biol Chem* 276: 10398-406.
- Shieh, H. L., and H. L. Chiang. 1998. In vitro reconstitution of glucose-induced targeting of fructose-1, 6-bisphosphatase into the vacuole in semi-intact yeast cells. *J Biol Chem* 273: 3381-7.
- Smith, T. F., C. Gaitatzes, K. Saxena, and E. J. Neer. 1999. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem Sci* 24: 181-5.
- Sondermann, H., A. K. Ho, L. L. Listenberger, K. Siegers, I. Moarefi, S. R. Wentz, F. U. Hartl, and J. C. Young. 2002. Prediction of novel Bag-1 homologs based on structure/function analysis identifies Snl1p as an Hsp70 co-chaperone in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 277: 33220-7
- Struhl, K. 1983. The new yeast genetics. *Nature* 305: 391-7.
- Stryer, L. 2002. Biochemie.
- Takehige, K., M. Baba, S. Tsuboi, T. Noda, and Y. Ohsumi. 1992. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* 119: 301-11.
- Teichert, U., B. Mechler, H. Muller, and D. H. Wolf. 1989. Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J Biol Chem* 264: 16037-45.
- Thevelein, J. M., and J. H. de Winde. 1999. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 33: 904-18.

- Thumm, M. 2000. Structure and function of the yeast vacuole and its role in autophagy. *Microsc Res Tech* 51: 563-72.
- Thumm, M., and D. H. Wolf. 1998. From Proteasome to Lysosome: Studies on Yeast Demonstrate the Principles of Protein Degradation in the Eukaryote Cell. *Adv. Mol. Cell Biol.* 27: 41-67.
- Tsukada, M., and Y. Ohsumi. 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333: 169-74.
- van den Hazel, H. B., M. C. Kielland-Brandt, and J. R. Winther. 1996. Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast* 12: 1-16.
- van der Merwe, G. K., T. G. Cooper, and H. J. van Vuuren. 2001. Ammonia regulates VID30 expression and Vid30p function shifts nitrogen metabolism toward glutamate formation especially when *Saccharomyces cerevisiae* is grown in low concentrations of ammonia. *J Biol Chem* 276: 28659-66.
- Varshavsky, A. 1992. The N-end rule. *Cell* 69: 725-35.
- Wach, A., A. Brachat, R. Pohlmann, and P. Philippsen. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10: 1793-1808.
- Willems, A. R., M. Schwab, and M. Tyers. 2004. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim Biophys Acta* 1695: 133-170.
- Wolf, D. H. 2004. From lysosome to proteasome: the power of yeast in the dissection of proteinase function in cellular regulation and waste disposal. *Cell Mol Life Sci* 61: 1601-14.
- Wolf, D. H., and W. Hilt. 2004. The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim Biophys Acta* 1695: 19-31.