

**Funktionsverlust der Ionenpumpe Pmr1  
induziert programmierten Zelltod in  
*Saccharomyces cerevisiae***

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

Vorgelegt von

Saskia Kraus

aus Schwäbisch Hall

Hauptberichter: PD Dr. H. Rudolph  
Mitberichter: Prof. Dr. D. H. Wolf  
Tag der mündlichen Prüfung:  
10.01.2007

Institut für Biochemie  
der Universität Stuttgart

2007

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

### **Danksagung**

Bei meinem Betreuer PD Dr. Hans Rudolph möchte ich mich herzlich bedanken für die Überlassung des Themas, den kritischen und anregenden Diskussionen und seine besonders engagierte Unterstützung während der Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Dieter Wolf möchte ich mich herzlich für die freundliche Aufnahme an seinem Institut und die mir gewährte Unterstützung bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Frank Madeo und seinen Mitarbeitern möchte ich mich herzlich bedanken für die praktischen Tipps und die anregenden Diskussionen.

Bei Andrea Zappe möchte ich mich herzlich für die engagierte Zusammenarbeit bedanken. Bei Regina und allen Laborkollegen möchte ich mich weiterhin für die nette Arbeitsatmosphäre bedanken.

Bei meiner Familie möchte ich mich für die kontinuierliche Unterstützung während der Arbeit bedanken. Besonders dankbar bin ich Thomas für seine Geduld.

Bei Simone, Maren, Frank und besonders Blanka möchte ich mich herzlich bedanken für den zeitlichen Freiraum den sie mir durch Kinderbetreuung geschaffen hatten.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>5</b>
<b>1 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>7</b>
<b>2 ABSTRACT</b>	<b>9</b>
2.1 Introduction	9
2.1.1 Ca <sup>2+</sup> transport in the yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
2.1.2 Apoptosis	10
2.2 Results and discussion	12
2.2.1 Programmed cell death in <i>pmr1</i> mutants	12
2.2.2 Cell death of secretion mutants	14
<b>3 EINLEITUNG</b>	<b>16</b>
3.1 Ca <sup>2+</sup> -Transport in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
3.1.1 Einstrom von Ca <sup>2+</sup> durch die Plasmamembran ins Zytosol	16
3.1.2 Erniedrigung der zytosolischen Ca <sup>2+</sup> -Konzentration durch Transport in die Vakuole	16
3.1.3 Erniedrigung der Zytosolischen Ca <sup>2+</sup> -Konzentration durch den Sekretorischen Weg	17
3.1.4 Ca <sup>2+</sup> -Transport durch exo- und endozytotische Vesikel	18
3.2 Zellwand	18
3.2.1 Die Komponenten der Zellwand	18
3.2.2 Die Erhaltung der Zellwand	20
3.2.3 Der Einfluss des Proteinkinase C-Signalweges auf das Zytoskelett	21
3.3 Stationen des Sekretionswegs	21
3.3.1 Einschleusung ins ER	21
3.3.2 Modifikationen im ER und Transport zum Golgi-Apparat	22
3.3.3 Modifikationen im Golgi und Transport zur Vakuole oder PM	24
3.4 Programmierter Zelltod	25
3.4.1 Apoptose	25
3.4.2 Apoptoseregulation mit TNF-R, AIF, Caspasen und der Bcl-2 Familie	26
3.4.3 Apoptoseregulation mit ROS	27
3.4.4 Das Mitochondrium als zentrales Apoptoseregulationszentrum	28
3.4.5 Signalwege bei Apoptose	29
3.4.6 Die Beteiligung von Ca <sup>2+</sup> -Ionen an der Apoptose	30
3.4.7 Der Golgi und Apoptose	31
3.4.8 Apoptose in der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	31
<b>4 ERGEBNISSE</b>	<b>34</b>
4.1 Beeinträchtigungen der Zellwand und des Zytoskeletts bei <i>Δpmr1</i> -Mutanten	34

4.1.1	„Synthetische Letalität“ Suche nach genetischen Interaktionen in der $\Delta pmr1$ -Deletionsmutante	34
4.1.2	$\Delta pmr1 \Delta ynd1$ - und $\Delta pmr1 \Delta van1$ -Doppelmutanten zeigen stark verlangsamtes Wachstum	35
4.1.3	Die Zellwand einer $\Delta pmr1$ -Mutante ist verändert	36
4.1.4	Die Expression der 1.3-beta-D-Glukansynthetase Fks2p ist in $\Delta pmr1$ -Zellen stark erhöht	38
4.1.5	Das Aktinzytoskelett einer $pmr1$ -Mutante kann sich nicht an Hitzestress adaptieren	40
4.1.6	Überexpression von <i>PMR1</i> kann Phänotypen einer $\Delta rom2$ - Mutante nicht supprimieren	42
4.1.7	Die Reifung von Gas1p ist in $pmr1$ -Mutanten kaum verzögert	43
4.1.8	Inositolauxotrophie und Expression <i>INO1-lacZ</i> in $\Delta pmr1$ -Zellen	44
4.1.9	Myriocinresistenz von $\Delta pmr1$ -Zellen	47
4.2	Programmierter Zelltod bei $\Delta pmr1$ und Mutanten des sekretorischen Weges	48
4.2.1	Reduzierte Überlebensfähigkeit bei stationären $\Delta pmr1$ - Zellen	48
4.2.2	Akkumulation von Sauerstoffradikalen in $\Delta pmr1$ -Zellen	49
4.2.3	Chromatinkondensation und DNA-Degradation in $\Delta pmr1$ -Zellen	51
4.2.4	Phosphatidylserin-Externalisierung an der Plasmamembran von $\Delta pmr1$ -Zellen	52
4.2.5	Cytochrom C-Freisetzung aus dem Mitochondrium in $\Delta pmr1$ -Mutanten	53
4.2.6	$\Delta cyc1/\Delta cyc7$ -Mutanten im S288C-Hintergrund zeigen starke DNA-Fragmentierung	54
4.2.7	Caspase-Aktivierung in $\Delta pmr1$ -Mutanten	54
4.2.8	Auch nach dem Ausschalten von <i>MCA1(YCA1)</i> zeigen $\Delta pmr1$ -Zellen weiterhin FITC-VAD-fmk-Bindung	55
4.2.9	Inaktivierung von Calcineurin durch eine $\Delta cnb1$ -Mutation kann den programmierten Zelltod von $\Delta pmr1$ -Zellen nicht verhindern	56
4.2.10	Anzeichen für programmierten Zelltod bei <i>sec</i> -Mutanten mit verschiedenen Defekten im Sekretionsweg	57
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>62</b>
5.1	Das Zusammenspiel von <i>PMR1</i> und <i>VAN1</i>	62
5.2	Der Zusammenhang von <i>YND1</i> und <i>PMR1</i>	63
5.3	Die Zellwand von $\Delta pmr1$ -Mutanten	64
5.4	Aktin in $\Delta pmr1$ -Mutanten	65
5.5	Programmierter Zelltod in $\Delta pmr1$ -Mutanten	66
5.6	Der Zelltod von Sekretionsmutanten	69
<b>6</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>85</b>

## Abkürzungsverzeichnis

abs.	absolut
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	Apoptose induzierender Faktor
ASR	<i>arrest of secretion response</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphat spaltendes Enzym
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCS	calcium cell survival
COPII-Vesikel	<i>coat-protein vesicles</i>
Da	Dalton
DAPI	4', 6'-Dianidino-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitril)-tetraacetat
EMS	Ethylmethansulfonat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i> (Durchflussscytometer)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
5-FOA	5-Fluoroorotsäure
5-FU	5-Fluorouracil
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
G <sub>2</sub> /M	Gap <sub>2</sub> -Phase/Mitose-Phase
GPI	glykosyliertes Phosphatidyl-Inositol
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2-ethansulfonsäure
HIS	Histidin
H <sub>2</sub> O	Wasser
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MAT	<i>mating type</i>
MES	2-(N- Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minuten
MM	Minimalmedium
mRNA	messenger-Ribonucleinsäure
MV	Minimalmedium
NSF-Protein	N-ethylmaleimide sensitive fusion protein
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBS-T	Phosphat-gepufferte Saline mit 0.05% Tween 20

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulphate
SC	Synthetisches Komplettmedium
ts	temperatursensitiv
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UV	ultraviolett
VAD	-Val-Ala-Asp (oMe)-Fluormethylketon
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

# 1 Zusammenfassung

Calcium-Ionen sind zweiwertige Kationen, die in der eukaryotischen Zelle an wichtigen Abläufen wie intrazellulärer Signaltransduktion, Proteinfaltung im ER, intrazellulärem Transport und Sekretion beteiligt sind. Sie kontrollieren 70 bis 90 Prozent aller Signaltransduktionswege in Eukaryontenzellen und sind praktisch in allen Organellen nachgewiesen. Das scheint auf den ersten Blick ein Paradoxon zu sein, weil das allgegenwärtige Ion zelluläre Funktionen trotzdem sehr selektiv steuert. Dies ist nur durch Aufteilung in spezialisierte Organellen mit verschiedenen luminalen Milieus möglich. Lokale Konzentrationsänderungen an  $\text{Ca}^{2+}$ -Gradienten können mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindeproteinen, die als  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren fungieren, erkannt und an selektive Zielproteine weitergeleitet werden. Nach erfolgter Signalübermittlung muss schnell wieder das  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausgangspotential mittels Pumpen und Transportern geschaffen werden. In der Hefezelle *Saccharomyces cerevisiae* werden die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und ATPasen reguliert. Pmr1, die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des Golgi-Apparates, bildet einen Eckpfeiler der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase. So erfolgt nach einem raschen Anstieg der freien zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, z.B. durch das Öffnen von Mid1/Cch1  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen in der Plasmamembran ein aktives Entfernen von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol. Pmr1 transportiert sowohl  $\text{Ca}^{2+}$  als auch  $\text{Mn}^{2+}$  aus dem Zytosol in den Golgi-Apparat. Künstlich erzeugte Funktionsstörungen dieser Transporter haben für eine Zelle weitreichende Konsequenzen. Eine *pmr1*-Mutation ist nicht letal, aber sie verursacht einen schnellen Verlust der Lebensfähigkeit in stationärer Phase. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass diese Zellen typische Merkmale der Apoptose aufweisen. Der Apoptoseprozess ist morphologisch durch die Aufhebung der asymmetrischen Verteilung der Phospholipide der Plasmamembran, die Kondensation des Chromatins an der Kernhülle und die Zellfragmentierung in so genannte apoptotische Körper gekennzeichnet. Da Pmr1 für die korrekte Physiologie des Golgi-Apparates benötigt wird und somit eine zentrale Komponente der Sekretionsmaschine ist, wurde bei weiteren Sekretionsmutanten nach apoptosetypischen Merkmalen gesucht. Die meisten *sec*-Mutationen sind letal. Bei konditionellen *ts sec*-Mutanten konnte unter restriktiver Temperatur Chromatinkondensation durch Anfärben mit Diaminophenylindol, einem selektiven, blau fluoreszierenden und in DNA interkalierenden Farbstoff, gezeigt werden. Um die Degradation der DNA nachzuweisen wurde der TUNEL Test (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) angewandt. Der Zustand der Plasmamembran wurde mit Annexin V aufgezeigt. In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass eine Mutation in

dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter des Golgi-Apparates Pmr1 zu drastischen Veränderungen in der Zellwand führen. Eine starke Reduktion der totalen Zellwandmasse und eine Verschiebung der zuckerhaltigen Zellwandkomponenten Glukose, Mannose und N-Acetylglucosamin liegen vor. In *pmr1*-Mutanten ist auch die Konzentration der katalytischen Untereinheit der  $\beta$ -1,3 Glukansynthase, einem Schlüsselenzym der Zellwandsynthese, stark erhöht. Diese Änderung des *pmr1*-Expressionsmusters wurde mit Hilfe eines Fks2/LacZ-Reporters detektiert. Weiterführend wurde eine genetische Methode entwickelt, um in Verbindung mit *pmr1* synthetisch letale Mutationskombinationen zu identifizieren. Als genetische Interaktionspartner von Pmr1 wurden dadurch die proteinglycosylierende Golgi-Apyrase Ynd1 und eine Komponente des Mannosylpolymerase1 Komplexes Van1 gefunden.

## 2 Abstract

### 2.1 Introduction

#### 2.1.1 $\text{Ca}^{2+}$ transport in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

In eucaryots, a brief increase in the free cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration initiates, among other things, processes like exocytosis, neuronal stimulation transfer, cell division, muscle contraction, cell metabolism and apoptosis. Exact control of the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration is therefore essential for the normal physiology of the cells. Opening the  $\text{Ca}^{2+}$  channels in the plasma membrane and in certain organelles leads to a rapid influx of  $\text{Ca}^{2+}$  into the cytosol, and the free cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration can increase 10- to 100-fold. This sharp rise in the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration is followed by a rapid closure of the  $\text{Ca}^{2+}$  channels to prevent a further influx of  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  pumps and antiporters then remove the  $\text{Ca}^{2+}$  from the cytosol again.

Two systems that are responsible for the  $\text{Ca}^{2+}$  influx through the plasma membrane are known: on the one hand HACS, a high-affinity  $\text{Ca}^{2+}$  influx channel ("High Affinity Calcium Influx System"); this is stimulated when the organelles of the secretory channels have insufficient  $\text{Ca}^{2+}$ , and on the other hand LACS ("Low Affinity Calcium Influx System"), which is stimulated by  $\text{Mg}^{2+}$ . The catalytic and regulatory subunits of HACS are presumably formed by Cch1p, a homologue of the electrically excitable  $\text{Ca}^{2+}$  channels which are found in the plasma membrane of mammalian cells (VGCCs) and Mid1p, a glycoprotein localised in the plasma membrane.

The vacuole, in yeast the main storage location for  $\text{Ca}^{2+}$ , stores 90% of cellular  $\text{Ca}^{2+}$  by bonding it to inorganic polyphosphate residues. Active  $\text{Ca}^{2+}$  transportation through the vacuole membrane is effected by Pmc1p and Vcx1p. Pmc1p is a  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase with a 40% identity with mammalian  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases of the plasma membrane (PMCA), without the calmodulin bonding domain at the C terminus which is typical of PMCA. A  $\Delta pmc1$  mutant is not viable on growth media with a high  $\text{Ca}^{2+}$  content. Through mutation of one of the two calcineurin subunits or of the  $\text{Ca}^{2+}$  bonding locations of calmodulin, a  $\Delta pmc1$  mutant can grow again on media with high  $\text{Ca}^{2+}$  concentrations. Calcineurin is a protein phosphatase whose activity is stimulated by the bonding of  $\text{Ca}^{2+}$  and calmodulin and inhibited by the drugs FK506 and Cyclosporin A. Calcineurin inhibits the vacuolar  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  antiporter Vcx1p by means of a post-translational mechanism and activates the transcription rate of *PMc1* and

*PMR1*. Vcx1p transports  $\text{Ca}^{2+}$  into the vacuolar lumen and, conversely, protons into the cytosol. The pH gradient at the vacuole membrane produced by an  $\text{H}^+$  ATPase is therefore essential for the activity of Vcx1p.

The  $\text{Ca}^{2+}$  of the vacuole is bonded to polyphosphate residues and if required can only be released slowly. The secretory organelles, in interaction with the cytosol, are responsible for a rapid exchange of the  $\text{Ca}^{2+}$ . The P-type  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$  ATPase Pmr1p is mainly located in the Golgi apparatus. P-type ATPases have eight to ten transmembrane domains, ten highly conserved regions, and they form a phosphorylated intermediate stage through which the hydrolysis energy of ATP can be used to pump ions against a concentration gradient. Pmr1p pumps  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  from the cytosol into the lumen of the Golgi. Pmr1p contains a N terminal motif similar to the "EF hand" of calmodulin ( $\text{Ca}^{2+}$  bonding location of calmodulin). *pmr1* deletions have a one to sixteen-fold higher  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the cytosol and, compared to the wild type, have a 50% lower ER  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, which is manifested in a variety of phenotypes. *Δpmr1* cells are hypersensitive to EGTA, a complexing agent for bivalent cations. They are sensitive to  $\text{Mn}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ , but show tolerance towards  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ni}^{2+}$ . The secretory channel is severely restricted by *Δpmr1*. Sensitivity to tunicamycin indicates an increased percentage of incorrectly folded proteins in the ER. p2-CpY is sorted incorrectly and the maturing of the pro-alpha factor is impaired. These phenotypes can be suppressed again by an increased  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the growth medium. N and O glycosylation defects can be partly neutralised by an increased  $\text{Mn}^{2+}$  concentration in the growth medium.

### 2.1.2 Apoptosis

Apoptosis is a physiological process for the controlled killing of infected or mutated cells in multicellular organisms. Unlike apoptosis, necrosis is usually connected with a bursting of the cell. The distribution of cell components caused by the bursting of a cell leads to inflammatory processes. Apoptosis, by contrast, avoids the bursting of the cell and inflammation. The term apoptosis in connection with characteristic physiological changes such as chromatin condensation, nucleus fragmentation and the formation of apoptotic bodies is a product of the 70s. Reduced apoptosis can lead to cancer, autoimmune reactions and the spreading of virus infections. Neurodegenerative diseases and AIDS are accompanied by an increase in apoptosis. The induction and regulation of apoptosis varies with the development status of different organisms, but always leads to the same apoptosis-typical markers. All

metazoas show DNA fragmentation, chromatin condensation, membrane blebbing, externalisation of phosphatidyl serine in the outer half of the plasma membrane double layer and the formation of apoptotic bodies. So far, not much has been understood about the responsible mechanisms. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* can be drawn on for basic research into general eukaryotic processes, as well as into this mechanism. The yeast genome is sequenced and the application of modern genetic engineering is easy to carry out on yeast. Although no conspicuous homologues to known apoptotic regulators in metazoas can be found in the genome sequence, not only cell division and intracellular transport but also apoptosis mechanisms can be explained. The expression of apoptotic genes kills yeast. Bax, caspase, p53 or CED-4/Apaf-1 induce cell death in *S. cerevisiae*. Bax-induced cell death can in turn be prevented by the simultaneous expression of apoptosis inhibitors such as Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub>. The inhibition of caspases in mammalian cells by the overexpression of Bcl-X<sub>L</sub> also suppresses Bax-induced cell death in yeast cells. The structural requirements for the induction or prevention of cell death in the Bax/Bcl-2 protein family (dimerisation of the BH3 domain and translocalisation to the mitochondria) are the same in mammalian and yeast cells. Bax-induced cell death can also be prevented by mutation of the Bax bonding capability of Bcl-X<sub>L</sub>. In yeast as well, therefore, Bax-induced cell death is based on the activation of a cell death programme, leading to unequivocal apoptosis markers such as chromatin condensation, DNA string breaks, blebbing on the PM and the externalisation of phosphatidyl serine. These apoptosis markers can also be produced intrinsically through the point mutation of *cdc48*. Cdc48p is involved in vesicle fusion in secretion and cell division. This means that an apoptosis machine must exist in yeast. Aged yeast cells or cells that cannot fuse with others are removed apoptotically from the gene pool. Aging yeast cells show not only apoptotic dying but also the adaptive growth of cells, which have acquired increased protection against the toxicity of superoxides through an increase in mutation frequency. As a protein similar to AIF1, Ynr074cp, which moves between mitochondrion and nucleus, depending on various apoptosis stimuli such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and aging, has been identified in yeast. In the presence of small quantities of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *AIF1* overexpression leads to massive apoptotic cell death, and the death rate caused by aging is considerably lower in *aif1*-deficient cells. Furthermore, a partial dependence of the Aif1p function on caspase Mca1p (Yca 1p) can be shown, a protein that is required for the apoptotic cell death caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or by aging. It has also been shown that this metacaspase is involved in an apoptosis pathway which shows characteristic similarities to apoptosis pathways in mammalian cells. Strong salt stress disrupts intracellular ionic equilibria and also triggers apoptosis in yeast cells. Expression of the antiapoptotic protein

Bcl-2 improves the salt tolerance of wild-type cells and calcineurin mutants  $\Delta cnb1$ . Deletion of *sro7* results in an impaired ion homeostasis, increased sensitivity to NaCl stress, secretion defects and increased susceptibility to apoptosis-like cell death under salt stress.

## 2.2 Results and discussion

### 2.2.1 Programmed cell death in *pmr1* mutants

*pmr1* cells gradually die off in the stationary phase. This cell death shows apoptotic characteristics such as chromatin condensation, phosphatidyl serine externalisation, ROS production, release of cytochrom c into the cytosol, apparent caspase activity and DNA fragmentation, visible in a positive TUNEL test. Further examinations in the Rudolph working group have now clearly shown that an AIF homologue of the yeast, Aif1p (Ynr074cp), is responsible for this die-off of stationary *pmr1* cells. The caspase Mca1p is not involved here. Furthermore, heat stress was also identified as the second trigger of programmed cell death in *pmr1* cells: unlike cell death in stationary cultures, a very rapid die-off of those *pmr1* cells within 2-3 hours, occurring at 37°C, is completely independent of *AIF1*. Here, the caspase Mca1 is activated; however, it is interesting that this activation only develops when Aif1p is lost, e.g. in cells with *aif1* deletion. This caspase activation is absolutely essential for heat-induced apoptosis:  $\Delta aif1 \Delta mca1$  double mutants survives this heat stress. Under heat stress, Aif1p apparently exercises a protective function vis-à-vis caspase activation in *pmr1* cells, whereas in the stationary phase,  $\Delta pmr1$  cells die a cell death induced by Aif1.

Human AIF arranges apoptosis-induced chromatin condensation through interaction with cyclophilin A, a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, which can be inhibited by cyclosporin A and also shows latent nuclease activity. The cyclophilin/cyclosporin A complex in turn binds and deactivates calcineurin and thus has a far-reaching effect on  $Ca^{2+}$ -induced signal pathways. The apoptotic function of the yeast protein Aif1p in yeast is also connected with cyclophilin A. Wissing *et al.* were able to show that a disruption of the *CPR1* gene, the yeast homologue to the human cyclophilin A gene, prevents the apoptotic cell death caused by Aif1p overexpression. These authors were also able to show that cyclosporin A, which inhibits the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity of CypA and in the end also deactivates calcineurin, does not improve the survival rate of cells in AIF overexpression. This shows that the cooperation between cyclophilin A and AIF in cell death in yeast as well

as in human cells is independent of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity and apparently is not induced by calcineurin either. However, these findings in no way rule out the possibility that calcineurin-induced signal routes influence the viability of cells in many different ways. As already mentioned above, activated calcineurin has an "anti-apoptotic" effect in the CCS route, that is, it counteracts the apoptotic death caused by ER stress. When stationary  $\Delta pmr1$  cells die off, on the other hand, calcineurin seems to accelerate cell death. As can be seen in Fig. 23, the deactivation of calcineurin through deletion of the *CNBI* gene, which encodes a  $Ca^{2+}$ -bonding regulatory subunit of calcineurin, initially has no influence on the die-off of *pmr1* cells in the first 5 days after the stationary phase has been reached. After 6-7 days, however,  $\Delta cnb1 \Delta pmr1$  cultures show an apparent rise in the survival rate to approx. 45%. This rise presumably comes from a growth phase of still-viable cells, with this growth being triggered by nutrients increasingly released by cells that have already died off. According to this notion, the elimination of calcineurin in the  $\Delta pmr1 \Delta cnb1$  mutants would either promote the die-off of cells and thus the release of nutrients, or in fact improve the staying power of cells that are still alive, until these nutrients become available. How do these two models match the known interaction of the two  $Ca^{2+}$  pumps Pmr1 (Golgi) and Pmc1 (vacuole) with calcineurin and the vacuolar  $Ca^{2+}/H^+$  antiporter Vcx1 in cellular  $Ca^{2+}$  homeostasis?

In the first place,  $\Delta pmr1$  mutants do not have the means to effectively use the secretory channel through  $Ca^{2+}$  transport to the Golgi for cytosolic  $Ca^{2+}$  homeostasis, as was shown for *PMR1* cells. This defect is possibly the cause of Aif1p-induced cell death, since this could lead to permanent  $Ca^{2+}$  stress in the cytosol. Normally, when the cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration is increased, calcineurin is activated by the bonding of  $Ca^{2+}$ /calmodulin and  $Ca^{2+}$ /Cnb1 complexes. By means of a post-translational mechanism, activated calcineurin inhibits the vacuolar absorption of  $Ca^{2+}$  via Vcx1 and at the same time stimulates the gene expression of the  $Ca^{2+}$  pumps Pmr1p and Pmc1p. In this way, yeast cells can apparently create a sharply rising and slowly falling cytosolic  $Ca^{2+}$  signal. The elimination of calcineurin prevents the gene activation of *PMR1* and *PMCI*, but removes the inhibition of Vcx1 and thus drastically stimulates the vacuolar absorption of  $Ca^{2+}$ . Cells with a constitutive Vcx1 allele that cannot be inhibited by calcineurin have a significantly better  $Ca^{2+}$  tolerance compared to other strains. Against this background it appears plausible that the failed calcineurin activation in *cnb1 pmr1* double mutants reduces or even prevents the latent cytosolic  $Ca^{2+}$  stress in these cells, since efficient  $Ca^{2+}$  transportation takes place in the vacuoles by means of Vcx1. This could certainly improve the viability of these cells compared to the  $\Delta pmr1$  mutant – quite independent of the Aif1-induced programmed cell death. An increase in the release of

nutrients in  $\Delta cnb1\Delta pmr1$  double mutants thus appears unlikely as an explanation for the increase in growth. The cooperation mentioned above between AIF and cyclophilin A is also possibly impaired in  $\Delta cnb1\Delta pmr1$  double mutants. Further examinations of cyclophilin A-defective  $\Delta cpr1\Delta pmr1$  mutants and  $\Delta pmr1 VCX1-D1$  cells in which Vcx1 cannot be inhibited by calcineurin would certainly be instructive here. Changes in the cell walls of  $\Delta pmr1$  cells could also play an important part in this cell death. However, general stability losses in the  $\Delta pmr1$  cell wall is not directly responsible for the  $\Delta pmr1$  cells dying off, since this also occurs in media with the osmotic stabiliser sorbitol. Through Rho1p not only  $\beta$ -1.3 Glukan synthase is activated, however, but also MAP kinase cascade, which contains Pkc1p and Mpk1p. These in turn stimulate the Cch1p/Mid1p  $Ca^{2+}$  channel in the plasma membrane and thus lead to a  $Ca^{2+}$  influx and a calcineurin signal, which apparently has an influence on cell death.

Through deletion of the appropriate key genes for the programmed cell death, it should be possible to restrain the die-off of the  $\Delta pmr1$  cells in the stationary phase. As can be seen in Fig. 22A, the elimination of the caspase Mca1 by means of the initiated *mca1* deletion does not improve the survival rate of the stationary  $\Delta mca1\Delta pmr1$  cells in comparison to  $\Delta pmr1$  cells. These findings prove that the caspase Mca1 is not involved here, but do not rule out the involvement of further, possibly still unknown caspases. An apparent caspase activation in  $\Delta pmr1\Delta mca1$  cells also becomes visible in Fig. 22B. However, more recent results call these measurements into question. It was shown that yeast cells that were only briefly incubated (5 min) at 80°C thus lose their cell integrity and can be stained using dyes like propidium iodide – and also by using FITC-conjugated caspase inhibitors. The colouring of lysated cells may also be incorrectly interpreted as "caspase activation". Only FITC-positive cells, which remain unstained in double dyes with propidium iodide, can be regarded as truly caspase-activated cells. With such double-dye techniques and their evaluation using FACS measurements, Daniela Ehehalt was able to show that no true caspase activation occurs in stationary *pmr1* cultures, i.e. there is no cell population that is only coloured by FITC-VAD-fmk. When the cells die off, FITC and propidium iodide coloration occurs synchronously.

### 2.2.2 Cell death of secretion mutants

Pmr1p is a central component of the secretory apparatus. The deletion of the *PMR1* gene leads to a variety of defects in secretory functions. For yeast cells, an intact secretory channel is essential for the growth of a daughter cell. Functional disruptions in the secretory channel could therefore be closely connected with the apoptotic death of *pmr1* mutants. Against this

background it was interesting to examine how well characterised *sec* mutants would "react" to the blocking of the secretory channel: would such cells simply die unspecifically ("burst"), or does an active process ("orderly retreat") take place through programmed cell death? The measurements carried out so far on *sec* mutants show initial signs of programmed cell death. All *sec* mutants examined so far show chromatin condensation and DNA fragmentation according to the TUNEL test. The more rapid die-off of "earlier" *sec* mutants with defects in ER Golgi transportation in comparison with "late" *sec* mutants with problems in the plasma membrane is conspicuous. If one proceeds from the assumption that this phenomenon does not occur due to a coincidentally faster deactivation of the former *sec* alleles at restrictive temperatures, this could mean that a disruption of the ER function and/or of ER Golgi transportation leads especially quickly to programmed cell death. ER stress activates a wide range of cellular responses such as UPR, which contains Ire1, containing cell cycle arrest in G2/M Swe1, MAP kinase cascades with Pkc1 and Mpk1 involvement, calcineurin response via the Cch1/Mid1 channel, ASR with Pkc1 involvement in gene transcription and, finally, a regulated path to cell death. Activation of an ER-specific caspase cascade unknown so far is also conceivable. An ER stress-specific caspase cascade containing caspase -12, -9 und -3 in a manner independent of cytochrome C is known in mammalian cells. Further measurements such as ROS production, release of cytochrome C and caspase activation are necessary in order to prove the apoptotic character of the cell death of the *sec* mutants. An additional *aif1* or *mca1* deletion would also be interesting to clarify the induction channels of *sec* cell death. A particularly important aspect would be further measurements of ROS production in *sec* mutants, which generally represents a very early characteristic of programmed cell death in yeast cells. For example, the die-off of *pmr1* mutants induced by heat stress with additional *aif1* deletion is accompanied by increased ROS production. The die-off of the *pmr1 aif1* cells can be restrained with PBN as an ROS quencher. The anaerobic implementation of heat stress also leads to a significant reduction in the extent of cell death.

These considerations make it clear that the observations made here of the cell death of *pmr1* mutants are of fundamental and very far-reaching significance. Yeast cells are obviously ideal for examining programmed cell death as a whole and its  $\text{Ca}^{2+}$  and/or  $\text{Mn}^{2+}$ -induced sub-processes.

## 3 Einleitung

### 3.1 Ca<sup>2+</sup>-Transport in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

In Eukaryonten begleitet ein kurzzeitiger Anstieg der freien zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration unter anderem Prozesse wie Exozytose, neuronale Reizvermittlung, Zellteilung, Muskelkontraktion, Zellmetabolismus und Apoptose. Eine exakte Kontrolle der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ist daher essentiell für die normale Physiologie der Zelle. Durch das Öffnen von Ca<sup>2+</sup>-Kanälen in der Plasmamembran und in bestimmten Organellen kommt es zu einem raschen Einstrom von Ca<sup>2+</sup> ins Zytosol. Die freie zytosolische Ca<sup>2+</sup>-Konzentration kann hierbei auf das 10-100fache ansteigen. Nach diesem starken Anstieg der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration folgt ein rasches Verschließen der Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, um einen weiteren Einstrom von Ca<sup>2+</sup> zu verhindern. Daraufhin entfernen Ca<sup>2+</sup>-Pumpen und Antiporter das Ca<sup>2+</sup> wieder aus dem Zytosol.

#### 3.1.1 Einstrom von Ca<sup>2+</sup> durch die Plasmamembran ins Zytosol

Es sind zwei Systeme bekannt, die für den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom durch die Plasmamembran verantwortlich sind: Einerseits HACS, ein hochaffiner Ca<sup>2+</sup>-Einstrom Kanal („High Affinity Calcium Influx System“). HACS wird stimuliert, wenn die Organellen des Sekretionsweges an Ca<sup>2+</sup> verarmen (Locke et al. 2000). Andererseits LACS („Low Affinity Calcium Influx System“) ein niederaffines Ca<sup>2+</sup>-Einstromsystem das durch Mg<sup>2+</sup> stimuliert wird (Muller et al. 2001). Die katalytischen und regulatorischen Untereinheiten von HACS werden vermutlich von Cch1p, einem Homolog der elektrisch erregbaren Ca<sup>2+</sup>-Kanäle, die in der Plasmamembran von Säugerzellen gefunden werden (VGCC s) und Mid1p, einem an der Plasmamembran lokalisierten Glykoprotein, gebildet.

#### 3.1.2 Erniedrigung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration durch Transport in die Vakuole

Die Vakuole, in Hefe der Hauptspeicher für Ca<sup>2+</sup> (Ohsumi et al. 1988), speichert 90% des zellulären Ca<sup>2+</sup> durch Bindung an anorganische Polyphosphatreste. Der aktive Ca<sup>2+</sup>-Transport durch die Vakuolenmembran wird durch Pmc1p und Vcx1p bewerkstelligt. Pmc1p ist eine Ca<sup>2+</sup>-ATPase mit 40% Identität zu Säuger-Ca<sup>2+</sup>-ATPasen der Plasmamembran (PMCA s), ohne die für PMCA typische Calmodulinbindungsdomäne am C-Terminus. Eine *Δpmc1*-Mutante ist nicht lebensfähig auf Wachstumsmedien mit hohem Ca<sup>2+</sup>-Gehalt. Durch Mutation einer der beiden Calcineurinuntereinheiten (Kuno et al. 1991) (Cyert and Thorner 1992) oder

der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestellen von Calmodulin (Cunningham and Fink 1994b) kann eine *Δpmc1*-Mutante wieder auf Medien mit hohen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen wachsen. Calcineurin ist eine Proteinphosphatase, deren Aktivität durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  und Calmodulin stimuliert wird und durch die Drogen FK506 und Cyclosporin A inhibiert wird. Calcineurin inhibiert den vakuolären  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter Vcx1p (Cunningham and Fink 1994a) durch einen posttranslationalen Mechanismus und aktiviert die Transkription von *PMc1* und *PMr1* (Cunningham and Fink 1996). Vcx1p transportiert  $\text{Ca}^{2+}$  in das vakuoläre Lumen im Austausch gegen Protonen. Der durch eine  $\text{H}^+$ -ATPase erzeugte pH-Gradient an der Vakuolenmembran ist daher essentiell für die Aktivität von Vcx1p.

### 3.1.3 Erniedrigung der Zytosolischen $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch den Sekretorischen Weg

Das  $\text{Ca}^{2+}$  der Vakuole ist an Polyphosphatresten gebunden und kann bei Bedarf nur langsam freigesetzt werden. Für einen schnellen Austausch des  $\text{Ca}^{2+}$  sind die sekretorischen Organellen im Zusammenspiel mit dem Zytosol zuständig (Eilam 1982a) (Eilam 1982b). Die P-Typ  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -ATPase Pmr1p (Rudolph et al. 1989) ist hauptsächlich im Golgi-Apparat lokalisiert (Antebi and Fink 1992). P-Typ ATPasen besitzen acht bis zehn Transmembrandomänen, zehn stark konservierte Regionen (Serrano 1988), und bilden eine phosphorylierte Zwischenstufe, um die Hydrolyseenergie von ATP zum Pumpen von Ionen gegen ein Konzentrationsgefälle zu nutzen (Carafoli 1987b). Pmr1p pumpt  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  aus dem Zytosol in das Lumen des Golgi-Apparates (Dürr et al. 1998). N-terminal enthält Pmr1p ein Motiv ähnlich der „EF-Hand“ von Calmodulin ( $\text{Ca}^{2+}$ -Bindestelle von Calmodulin) (Kretsinger 1980) (Rudolph et al. 1989). *pmr1*-Deletionen weisen eine bis zu sechzehnfach höhere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytosol auf (Halachmi and Eilam 1996) (Locke et al. 2000) und besitzen eine im Vergleich zum Wildtyp um 50% erniedrigte ER  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Strayle et al. 1999), was sich in vielfältigen Phänotypen manifestiert. *Δpmr1*-Zellen sind hypersensitiv gegen EGTA, einem Komplexbildner für zweiwertige Kationen (Rudolph et al. 1989). Sie sind sensitiv gegenüber  $\text{Mn}^{2+}$  (Lapinskas et al. 1995) und  $\text{Zn}^{2+}$ , zeigen aber Toleranz gegenüber  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ni}^{2+}$ . Die Sensitivität von *Δpmr1*-Stämmen gegen Calcofluor white und Koffein deutet auf Veränderungen der Zellwand hin. Der Sekretionsweg wird durch *Δpmr1* ebenfalls stark beeinträchtigt. Sensitivität gegenüber Tunicamycin deutet auf einen erhöhten Anteil an falsch gefalteten Proteinen im ER hin. p2-CpY wird fehlerhaft sortiert und die Reifung von pro-alpha Faktor ist beeinträchtigt. Diese Phänotypen lassen sich durch eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Wachstumsmedium wieder unterdrücken

(Antebi and Fink 1992). N- und O-Glykosylierungsdefekte lassen sich durch erhöhte  $Mn^{2+}$ -Konzentration im Wachstumsmedium zum Teil zurückdrängen (Dürr et al. 1998).

### 3.1.4 $Ca^{2+}$ -Transport durch exo- und endozytotische Vesikel

Neben dem  $Ca^{2+}$ -abhängigen Proteintransport über den sekretorischen Weg findet der Hauptanteil des  $Ca^{2+}$ -Ausstroms der Hefezelle *S. cerevisiae* über Exozytose statt (Zappe, Dissertation 2003). Die  $Ca^{2+}$ -Konzentration in Eukaryonten steigt vom ER mit einem  $Ca^{2+}$ -Gehalt von 3 mM über den Golgi-Apparat hin zu sekretorischen Transportvesikeln mit einem extrem hohen  $Ca^{2+}$ -Gehalt von bis zu 19 mM (Carafoli 1987a) (Roos 1988) (Sambrook 1989) (Tsien 1989) an. Der Vesikeltransport findet entlang Aktinfilamenten statt und ist ein Schlüsselprozess der Sekretion (Mulholland et al. 1994). Über endozytotische Vesikel nimmt eine Zelle nicht nur Proteine, sondern auch Ionen auf. Für die Endozytose wird ebenfalls Aktin gebraucht (Kubler and Riezman 1993) (Lamaze et al. 1997). Seine Polymerisations- und Depolymerisationsdynamik ist essentiell für endozytotische Prozesse (Lamaze et al. 1997) (Lappalainen and Drubin 1997). Zu den aktinbindenden Proteinen, die am Internalisierungsschritt der Endozytose beteiligt sind gehört Sla2p/End4p (Raths et al. 1993). End3p wird für die normale Aktinstruktur und Endozytose gebraucht (Benedetti et al. 1994). Die Deletion von *end3* oder *end4* ist synthetisch letal mit *Apmr1* (Rudolph, nicht veröffentlichte Daten).

## 3.2 Zellwand

### 3.2.1 Die Komponenten der Zellwand

Die Zellwand der Hefe *S. cerevisiae* besteht aus einer inneren Glukanschicht mit Chitin und einer äußeren Mannoproteinschicht. Die Glukanschicht besteht hauptsächlich aus  $\beta$ -1,3 verknüpfter Glukose, die  $\beta$ -1,6 Verzweigungen aufweist (Manners et al. 1973a; Manners et al. 1973b). Die meisten Mannoproteine kann man nur durch den Verdau der Glukanschicht gewinnen. Vier Glykosylierungsarten sind zwischen Zellwandproteinen und der Polysaccharidschicht zu finden: O-Glykosylierung von einem oder fünf  $\alpha$ -verknüpften Mannoseeinheiten an einen Serin oder Threoninrest, N-Glykosylierung an Asparagin, Phosphodiester-verknüpfte Mannosylseitenketten (Ballou 1990) und  $\beta$ -1,6Glukan beinhaltende Seitenketten (Van Rinsum et al. 1991; Montijn et al. 1994). Die Mannoproteine lassen sind unterteilen in N-mannosylierte Proteine, bei denen lange  $\alpha$ -1,6 Mannoseketten mit

$\alpha$ -1,3 Mannoseseitenketten über Asparagin mit dem Protein verknüpft sind und O-mannosylierte Proteine, bei denen die Mannoseketten über Serin oder Threonin an das Protein gebunden sind (Van Rinsum et al. 1991). Chitin ist ein  $\beta$ -1,4-verknüpftes N-Acetylglukosaminpolymer. Ein Chitinring wird geformt zwischen Mutter- und Tochterzelle. Dieser Ring bleibt nach der Trennung beider Zellen als Geburtsnarbe bei der Mutterzelle zurück. Somit steigt mit zunehmendem Alter der Chitingehalt der Zellwand. Die Bestimmung des Chitingehalts bietet damit eine Möglichkeit der Altersbestimmung von Hefezellen. Zellwandmutanten werden nach verschiedenen Kategorien von Zellwandschädigungen eingeteilt: *chs* (Calcofluor HyperSensitiv), *kre* (Killertoxin RESistent), *mnn* (MaNNoprotein mutants) und lytische Mutanten. Chitin und  $\beta$ -1,3-Glukan werden beide von Enzymkomplexen synthetisiert, die an der Plasmamembran gebunden sind (Cabib et al. 1982). Es gibt drei Chitinsynthasen: Chs1p, Chs2p und Chs3p. Chs1p und Chs3p sind verantwortlich für 90% der Chitinsynthese (Ziman et al. 1996). Bei der Separation formt Chs3p den Ring zwischen Mutter- und Tochterzelle während Chs1p eher für Zellwandreparaturen zuständig ist. Chs2p ist essentiell für die Chitinansammlung in der G1-Phase des Zellzyklus. Die Chitinsynthasen können sich teilweise ersetzen, denn alle Einzeldelationen sind lebensfähig. Ein  $\Delta$ *chs2*-Stamm zeigt sehr klumpig wachsende Zellen und *chs3*-Deletionsstämme sind nahezu chitinfrei. Die katalytische Untereinheit der  $\beta$ -1,3 Glukansynthase wird hauptsächlich von den beiden Genen *FKS1* und *FKS2* neben *GNS1* kodiert.  $\beta$ -1,6 Glukansynthase wird von *SKN1* und *KRE6* kodiert. An der Zusammensetzung der  $\beta$ -1,6 Glukane sind *Knh1p* und *Kre9p*, beides O-glykosylierte Sekretionsproteine, beteiligt. Die Expression von *KNH1* wird reguliert von der zur Verfügung stehenden Kohlenstoffquelle (Dijkgraaf et al. 1996). Mutanten mit Veränderungen in N- und O-Glykosylierung sind in der großen Klasse der Mannoproteinmutanten enthalten (Klis 1994). Unter lytischen Mutanten versteht man eine Bandbreite von verschiedenen Mutanten, die alle die Stabilität der Zelle gegenüber erhöhtem osmotischen Druck beeinträchtigen. Die molekulare Basis dieser Mutationen ist sehr unterschiedlich, aber ihre Phänotypen sind ähnlich, da alle mutierten Gene Komponenten des Signalweges zum Erhalt der Zellwand sind. Das Herzstück dieses Signalweges wird von Kaskaden, die über Proteinphosphorylierung und Dephosphorylierung regulieren, gebildet. Proteinkinase-Kaskaden regulieren neben der Zellintegrität auch den Zellzyklus, pseudohyphales Wachstum, Paarung, Sporulation und die Reaktion auf hohen osmotischen Druck (Errede et al. 1995).

### 3.2.2 Die Erhaltung der Zellwand

Die Zusammensetzung der Zellwand wird von den physiologischen Bedingungen und von dem Entwicklungsstatus der Zelle beeinflusst. Signale werden von Rezeptoren in der Zellwand über Pkc1p, einem Isoenzym der in Säugerzellen bekannten Proteinkinase C vermittelt und über eine Signaltransduktionskaskade weitergeleitet, um damit die Aktivität von Transkriptionswegen zu modulieren. Pkc1p wird von Rho1p, einem Mitglied der GTP-bindenden Protein-Familie, aktiviert (Nonaka et al. 1995) (Kamada et al. 1996) (Cabib et al. 1998). Rho1p seinerseits wird von dem GDP/GTP-Austauschfaktor, der von zwei Genen *ROM1* und *ROM2* kodiert wird, aktiviert. Da *Δrom1*-Stämme nicht den temperatursensitiven Phänotyp von *Δrom2*-Stämmen zeigen, aber *ROM1*- Überexpression teilweise die Temperatursensitivität von *Δrom2* ausgleicht, wird vermutet, dass Rom2p die Hauptrolle bei der Signalübermittlung spielt (Hirano et al. 1996). Rho1p sichert die Erhaltung der Zellwand auf zwei Wegen. Einerseits ist Rho1p eine regulatorische Untereinheit des  $\beta$ -1,3 Glukansynthasekomplexes (Drgonova et al. 1996; Qadota et al. 1996), und andererseits aktiviert Rho1p die MAP-Kinasekaskade. Die Signalübermittlung findet über eine Phosphorylierungskaskade von Proteinen statt und wird MAP-Kinasekaskade (Mitogen Activated Protein kinase cascades) genannt, da sie letztendlich die Zellvermehrung reguliert. In Hefe sind fünf MAP-Kinasekaskaden bekannt, die Konjugation, Stressantwort auf hohen und niedrigen osmotischen Druck, pseudohyphales Wachstum, Sporulation und Zellwandreparatur regulieren (Herskowitz 1995) (Levin and Errede 1995) (Errede et al. 1995) (Banuett 1998). Die Kaskaden bestehen aus MAPKKK Bck1p (Bypass of C Kinase) (Lee and Levin 1992) (Costigan et al. 1992) (Irie et al. 1991), zwei redundanten Serin/Threonin MAPKK Mkk1p und Mkk2p (MAP-Kinase Kinase) (Irie et al. 1993) und der MAPK Slt2p (Suppressor of *lyt2*) (Torres et al. 1991) (Lee et al. 1993). Mutanten mit Defekten in einer dieser Komponenten lysieren mit kleinen Knospen bei 37°C. Dieser Phänotyp kann durch den osmotischen Stabilisator Sorbitol supprimiert werden (Levin and Errede 1995). Solche Mutanten zeigen oft Sensitivität gegenüber Koffein, Staurosporin (einem Inhibitor von PKC-Isoenzymen) und Calcofluor white (Lussier et al. 1995). Die MAP-Kinasekaskade wirkt auf Gene, die an der Zellwandbiosynthese beteiligt sind. *FKS1*, sein Homologes *FKS2* und *CSD2* (= *CHS3*) kodieren für Untereinheiten des  $\beta$ -1,3 Glukansynthasekomplexes. Außerdem ist die volle Expression von  $\alpha$ -1,3 Mannosyltransferase und einer Chitinsynthase abhängig von Slt2p (Igual et al. 1996). Die Funktion von Fks2p bei der Reorganisation der Zellwand ist nicht nur

abhängig von aktivem Pkc1p-Signalweg, sondern auch von Calcineurin (Mazur et al. 1995). Die *FKS2*-Expression wird durch beide Signalwege kontrolliert (Zhao et al. 1998).

### 3.2.3 Der Einfluss des Proteinkinase C-Signalweges auf das Zytoskelett

Der Proteinkinase C Signalweg hat neben der Auswirkung auf die Zellwand auch Einfluss auf die Sekretion und das Zytoskelett. So wurde z.B. Rho1p an Aktinpolymeren in wachsenden Tochterzellen detektiert (Yamochi et al. 1994), Mkk1p/Mkk2p und Slr2p sind in einem Multiproteinkomplex, der an Aktinflecken gebunden ist, lokalisiert (Sheu et al. 1998) und eine *slr2*-Mutation verursacht eine defekte Aktinorganisation neben der Akkumulation von sekretorischen Vesikeln (Mazzoni et al. 1993). Umgekehrt kann eine defekte Aktinorganisation durch die Expression von Genen des Proteinkinase C Signalweges wieder hergestellt werden. Tor2p reguliert neben der Überschreitung der G1 Zellzyklus-Phase die Organisation des Aktinskeletts über den Austauschfaktor Rom2p und die GTPasen Rho1p und Rho2p (Philip and Levin 2001) (Bickle et al. 1998) (Schmidt et al. 1996; Schmidt et al. 1997; Schmidt et al. 1998). Der durch *tor2*-Deletion verursachte Aktinorganisationsdefekt kann durch aktive *BCK1*-Allele oder Überexpression von *MKK1* und *SLT2* wieder unterdrückt werden (Nonaka et al. 1995) (Ozaki et al. 1996) (Helliwell et al. 1998b).

## 3.3 Stationen des Sekretionswegs

### 3.3.1 Einschleusung ins ER

Proteine werden aus dem Zytosol über das ER in das sekretorische System eingeschleust (Deshaies and Schekman 1987) (Rothblatt et al. 1989) (Green et al. 1992) (Panzner et al. 1995). Der Transport ins ER erfolgt aufgrund einer N-terminalen Signalsequenz, die das Protein während oder nach der Synthese zum ER dirigiert. Schon bei ihrer Neusynthese können Proteine durch die ER-Membran geschleust und funktional modifiziert werden. Die Abspaltung von Signalpeptiden (Fang et al. 1996) (Mullins et al. 1996), N- Glykosylierung bei spezifischen Glykosylierungssequenzen (NXS/T) (X = beliebige AS außer Prolin) (Colussi et al. 1997; Helenius and Aebi 2001), O-Glykosylierung (te Heesen et al. 1992) (Herscovics and Orlean 1993) und das Anbringen von GPI-Ankern (Doering and Schekman 1996) sind mögliche kovalente Modifikationen während und nach der Einschleusung.

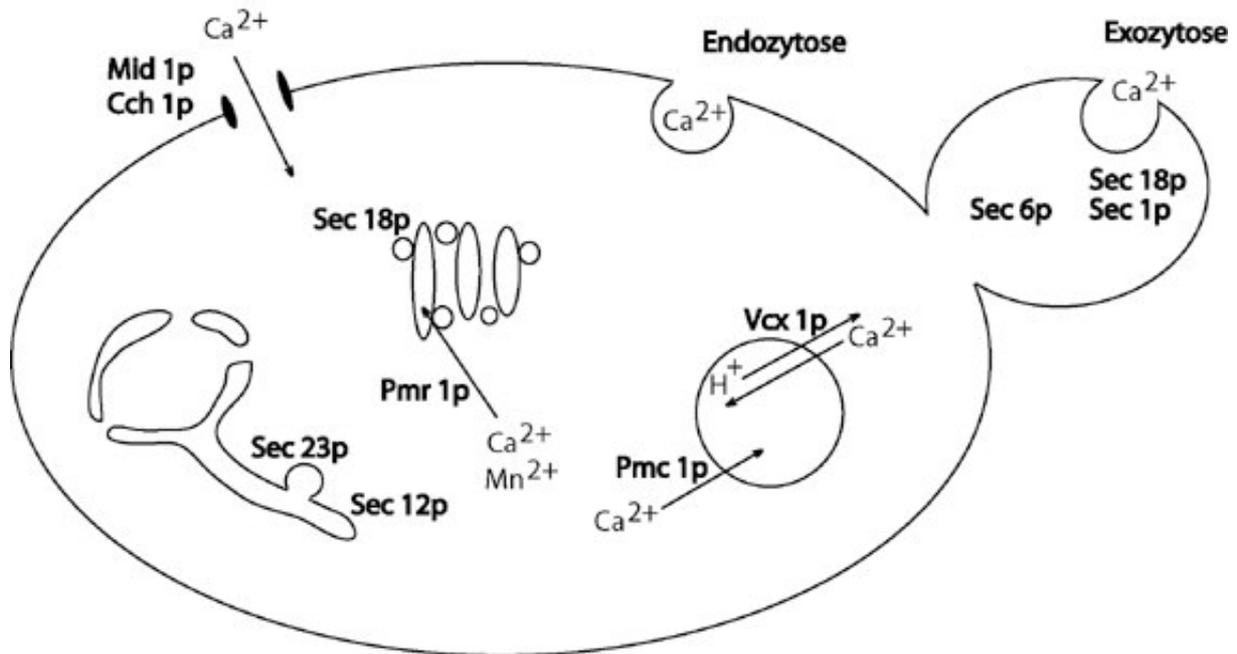
### 3.3.2 Modifikationen im ER und Transport zum Golgi-Apparat

Im ER werden Disulfidbrücken geknüpft (LaMantia et al. 1991) (Tachikawa et al. 1991) (Tachibana and Stevens 1992; Jamsa et al. 1994) und die Faltung der Proteine wird mit einer Vielzahl von unterstützenden Chaperonen (Peptidyl-Prolyl-Isomerasen und Protein-Disulfid-Isomerasen) vollendet (Zapun et al. 1999). In Säugerzellen ist der Hauptspeicher für  $\text{Ca}^{2+}$  das Endoplasmatische Retikulum bzw. Sarcoplasmatische Retikulum (ER bzw. SR). Im Unterschied zur Hefe besitzen Säugerzellen eine zusätzliche sarcoplasmatische-endoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA), mit der sie große Mengen an  $\text{Ca}^{2+}$  im ER akkumulieren. Diese hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im ER ist essentiell, weil  $\text{Ca}^{2+}$  mit vielen Enzymen wie auch Chaperonen eine direkte Bindung eingeht und so für die Translokalisierung, Disulfidbrückenbindung, Glykosylierung und Faltung sekretorischer Proteine eine wichtige Rolle spielt. In Säugerzellen ist an der Faltung neu translozierter Proteine das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein BiP beteiligt (Sambrook 1990). Die Autophosphorylierung von BiP wird in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  stimuliert. Phosphoryliertes BiP besitzt im Vergleich zu unphosphoryliertem BiP andere Proteinbindungseigenschaften. So wird die Bindung des Faltungshelfers BiP an die Alpha-Kette des T-Zellen-Rezeptorproteins durch Erniedrigung der luminalen ER  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei Zugabe von EGTA unterbunden (Suzuki et al. 1991). Der Transfer eines Core-Oligosaccharides  $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  von dem Lipidcarrier Dolicholpyrophosphat auf einen Aspartatrest des neusynthetisierten Proteins mit Hilfe der N-Oligosaccharyltransferase findet ebenfalls im ER statt. Wird die Glykosylierung des Proteins mittels Tunicamycin oder durch *sec*-Mutation gehemmt wird der UPR-Signalweg („*Unfolded Protein Response*“) aktiviert, um die Transkription von den ER-Proteinen zu initiieren, welche die Proteinfaltung unterstützen (Cox et al. 1993). Die Glykosylierung ist auch zur Degradation fehlerhaft gefalteter Proteine notwendig (Knop et al. 1996). Des Weiteren werden GPI-Anker („*Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker*“) an der ER-Membran synthetisiert und mit bestimmten Proteinen verknüpft. Diese Verknüpfung ist nötig für den weiteren Transport vom ER zum Golgi-Apparat; dies wurde für Gas1p, das die Vernetzung von  $\beta$ -1,6-Glukanen der Zellwand reguliert, gezeigt (Hamburger et al. 1995) (Doering and Schekman 1996). GPI-Proteine können erst nach dem Anbringen des GPI-Ankers in Transportvesikel verpackt werden und das ER verlassen (Schekman and Orci 1996). Nach erfolgter Qualitätskontrolle im ER (Chevet et al. 2001) werden die sekretorischen Proteine in COPII-Vesikel, die sich vom ER abschnüren und mit der Golgimembran fusionieren, verpackt. An dieser Proteinqualitätskontrolle ist bei Säugern das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Calnexin beteiligt, das

Sequenzverwandtschaft zu dem Hefegen *CNE1* aufweist. Am Export sekretorischer Proteine aus dem ER sind neben anderen Proteinen Sec12p und Sec23p beteiligt. Für den anterograden Transport zwischen ER und Golgi-Apparat sind COPII-Vesikel notwendig, während der retrograde Transport COPI-Vesikel benötigt (Banfield et al. 1995) (Lewis et al. 1997) (Graham and Emr 1991) (Lewis et al. 1997) (Springer and Schekman 1998). Die Bildung von COPII-Vesikeln wird initiiert durch die Rekrutierung von Sar1p an die ER-Membran. Dies geschieht durch das integrale ER-Membranprotein Sec12p was den Austausch von GDP/GTP an Sar1p stimuliert. Sar1p, in seiner GTP-gebundenen Form hat eine erhöhte Affinität, an die ER-Membran zu binden. Sar1p bindet an den Sec23/24p Komplex, der auch mit Sec16p interagiert. Sec13/31p bindet durch Interaktion mit Sec23/24p und Sec16p. Eine weitere Bindung der COPII-Komponenten Sec23/24p und Sec13/31p an die ER-Membran bedingt die Deformation der ER-Membran und leitet die Vesikelbildung ein. Der Vesikeltransport zwischen ER und Golgi-Apparat ist ebenfalls von  $Ca^{2+}$ -Ionen abhängig (Beckers and Balch 1989). Das Anlegen und Verschmelzen der Transportvesikel des sekretorischen Weges folgt einem allgemein gültigen Mechanismus. Das zentrale Modell zu den Transportmechanismen bildet die SNARE-Hypothese (Sollner et al. 1993). Diese besagt, dass Vesikel auf ihrer Oberfläche Proteine (v-SNARE) enthalten, die durch Interaktion mit Proteinen der Zielmembran (t-SNARE) binden. Diese Interaktion und Verschmelzung wird zusätzlich geleitet von allgemeinen Fusionsproteinen NSF („*N-ethylmaleimide Sensitive Fusion protein*“) und SNAP („*Soluble NSF Attachment Protein*“). Sec18p (NSF) und Sec17p (SNAP) werden in Hefe für fast alle Membranfusionen (Graham and Emr 1991) benötigt und eine *sec18*-Mutation führt zur Akkumulation von v-SNARE-t-SNARE-Komplexen (Wilson et al. 1989) (Sogaard et al. 1994). Zur Entfernung der COPII-Hülle der Vesikel wird Sec23p benötigt, welches die Hydrolyse von GTP an Sar1p stimuliert. GDP-Sar1p dissoziiert weg von den Vesikeln. Durch dieses Entfernen der Proteinhülle kommen jetzt die v-SNARE-Moleküle an die Vesikeloberfläche und ermöglichen Bindfaktoren wie Uso1p die Bindung. Ypt1p wird benötigt, um den t-SNARE Sed5p von einem Komplex mit Sec1p zu befreien. Das Anknüpfen des Vesikels an der Golgimembran ist nun über die Fusion der Faktoren Sec18p (NSF) und Sec17p (SNAP) ermöglicht. Sec17p zerstört abschließend die Interaktion zwischen v- und t-SNARE was die Verschmelzung mit der Vesikel- mit der Golgimembran ermöglicht. ER-Membranproteine werden aus dem frühen Golgi in COPI-Vesikel verpackt und retrograd zurück ins ER transportiert (Pagny et al. 2000) (Yamamoto et al. 2001).

### 3.3.3 Modifikationen im Golgi und Transport zur Vakuole oder PM

Die Vesikel fusionieren mit der Golgimembran und setzen dabei ihren Inhalt ins Golgilumen frei (Pryer et al. 1992) (Ferro-Novick and Jahn 1994) (Rothman 1994). Zu den Proteinen, die zum Anlegen der Vesikel gebraucht werden gehören die GTPasen der Rab-Familie, Sec1p-Homologe und SNARE-Proteine. Über die Anhäufung der einzelnen Anbindungs- und Verschmelzungs-Faktoren wird letztendlich die Transportrichtung festgelegt. Der Golgi-Apparat besteht aus abgeflachten Membranzystemen, die in *S. cerevisiae* ohne erkennbaren Zusammenhang im Zytosol verteilt sind (Morin-Ganet et al. 2000) (Rambourg et al. 1993) (Rambourg et al. 1995) (Rambourg et al. 2001). Durch Vesikeltransport gelangen die Proteine vom Cis- über den Medial- zum Trans-Golgi und werden in den einzelnen Kompartimenten mittels Mannosylierung weiter gereift. Im trans-Golgi ist z.B. das  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Enzym Kex2p lokalisiert, das für die Reifung des  $\alpha$ -Faktors Pheromon nötig ist (Fuller et al. 1989). Die Proteine befinden sich nach Knospung vom trans-Golgi entweder in Endosomen auf dem Weg zur Vakuole oder in sekretorischen Vesikeln, die zur Plasmamembran transportiert werden (Glick 2000). Für die Fusion sekretorischer Vesikel mit der PM sind die Proteine Sec1p (Novick and Schekman 1979) (Esmon et al. 1981) (Novick et al. 1981) und Sec6p essentiell (TerBush and Novick 1995) (Potenza et al. 1992) (Novick et al. 1980) (Novick et al. 1981). Sec6p ist als eine Komponente eines Proteinkomplexes im Zytosol und an der PM lokalisiert (TerBush and Novick 1995).



**Schematische Darstellung 1: Ca<sup>2+</sup>-Ionen Transport in der Hefezelle**

Das Modell einer Hefezelle zeigt die Ca<sup>2+</sup>-ATPasen Pmr1p, Pmc1p, den vakuolären Antiporter Vcx1p und den sekretorischen Weg vom ER zur PM. Sec18p wird für sämtliche Fusionsprozesse der Sekretionsvesikel mit Akzeptormembranen entlang des Sekretionsweges benötigt. Sec12p und Sec23p sind beteiligt an einem frühen Schritt der Sekretion, denn sie werden benötigt bei der Bildung der Sekretionsvesikel am ER. Für einen späten Schritt der Sekretion werden Sec1p und Sec6p benötigt, denn sie sind nötig bei der Fusion der Transportvesikel mit der PM.

### 3.4 Programmierter Zelltod

#### 3.4.1 Apoptose

Apoptose ist ein physiologischer Prozess, um infizierte oder mutierte Zellen in multizellulären Organismen kontrolliert zu töten. Nekrose ist im Gegensatz zu Apoptose in der Regel mit einem Aufplatzen der Zelle verbunden. Das durch Platzen einer Zelle verursachte Verteilen von Zellbestandteilen hat entzündliche Prozesse zur Folge. Apoptose hingegen vermeidet Zellbruch und Entzündung. Der Begriff Apoptose in Verbindung mit den charakteristischen physiologischen Veränderungen wie Chromatinkondensation, Zellkernfragmentierung und die Bildung von apoptotischen Körpern wurde in den 70er Jahren geprägt (Kerr et al. 1972). Verminderte Apoptose kann zu Krebs, Autoimmunreaktionen und Verbreitung von Virusinfektionen führen. Neurodegenerative Krankheiten und AIDS sind von gesteigerter Apoptose begleitet (Steller 1995). Die Induktion und Regulation der Apoptose variiert mit

dem Entwicklungsstatus verschiedener Organismen, führt aber immer zu den gleichen apoptosetypischen Merkmalen. Alle Metazoen zeigen DNA-Fragmentierung, Chromatinkondensation, Blasenbildung der PM, Externalisierung von Phosphatidylserin in die äußere Hälfte der Plasmamembrandoppelschicht und die Bildung apoptotischer Körper. Die verantwortlichen Mechanismen sind bislang nur wenig verstanden.

### 3.4.2 Apoptoseregulation mit TNF-R, AIF, Caspasen und der Bcl-2 Familie

Das Mitochondrium erkennt und vermittelt vorwiegend intrazelluläre Apoptose-Signale, während extrazelluläre Signale durch Todesrezeptoren an der Zelloberfläche übermittelt werden. An der Umformung von apoptotischen Signalen sind Mitglieder der (TNF-R) Familie („*Tumor Necrosis Factor-Receptor*“) beteiligt.

Apoptotische Signale führen zur Freisetzung von Proteinen wie AIF ), eine mitochondriale Oxidoreduktase (Susin et al. 1999b), Caspasen (Susin et al. 1999a) und Cytochrom C (Liu et al. 1996) aus dem Zwischenmembranraum des Mitochondriums in das Zytosol. Während die Cytochrom C-Freisetzung ein Teil der Caspasenaktivierung ist, induziert AIF apoptotische Veränderungen auf caspasenunabhängige Weise.

Caspasen sind Cysteinproteasen, die sehr spezifisch Peptidbindungen carboxy-terminal zu Aspartatsäure-Resten schneiden (Alnemri et al. 1996). Sie bilden das regulatorische Bindeglied zwischen apoptoseauslösendem Signal und apoptotisch morphologischen Veränderungen. In Säugerzellen sind 14 Caspasen charakterisiert, die in drei funktionsabhängige Gruppen unterteilt werden können (Alnemri et al. 1996): Initiator-Caspasen, die als Antwort auf ein apoptotisches Signal aktiviert werden, Effektor-Caspasen, die normalerweise durch Initiator-Caspasen (Nicholson and Thornberry 1997) oder Granzym B (Medema et al. 1997) aktiviert werden und Caspasen, die bei zellulären Entzündungsreaktionen beteiligt sind. Procaspasen werden als inaktive Precursor synthetisiert und bestehen aus einer aminoterminalen Domäne, einer p20 und einer p10-Domäne. Das gereifte Enzym ist ein Heterotetramer bestehend aus zwei p20/p10-Heterodimeren und zwei aktiven Zentren (Earnshaw 1999). Aktivierte Effektor-Caspasen spalten verschiedene Zielsubstrate, was die typische apoptotische Morphologie zur Folge hat. Neben caspasenverursachter DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation (Enari et al. 1998) (Sakahira et al. 1998) (Sahara et al. 1999) ist das Zytoskelett einer apoptotischen Zelle drastischen Änderungen unterworfen. Der Zellkörper schrumpft und löst sich von seiner Umgebung, weil Caspasen Proteine des Zytoskeletts z.B. Lamin (Lazebnik et al. 1995)

(Takahashi et al. 2001) und Gelsolin, ein zytosolisches Actin-depolymerisierendes Enzym, (Kothakota et al. 1997) abbauen.

Bcl-2 verwandte Proteine gehören zu den apoptotischen Regulatoren. Diese Proteine können pro-apoptotische oder anti-apoptotische Funktionen haben. Zu den Apoptose-fördernden Proteinen gehören z.B. Bax, Bak, Bid und Bad, zu Apoptose inhibierenden Proteinen gehören Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub>. Bcl-2 Proteine besitzen mindestens eine von vier stark konservierten Regionen (Bcl-2 homology domains) BH1-BH4. Diese Regionen können Homo- oder Heterodimere bilden um sich gegenseitig zu regulieren (Kelekar and Thompson 1998).

### 3.4.3 Apoptoseregulation mit ROS

ROS („*Reactive Oxygen Species*“) ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , und  $OH^\cdot$ ) sind ebenfalls Apoptoseregulatoren, die in Nervenzellen nach der Aktivierung von Bax und Caspasen in einem späten Schritt der Apoptose akkumulieren (Schulz et al. 1996).  $H_2O_2$ -Stress löst ebenfalls die Apoptose-Kaskade aus (Hockenbery et al. 1993) (Kane et al. 1993) (Greenlund et al. 1995) (Slater et al. 1995). Die aktive Rolle von ROS in Hefe zeigt sich durch Akkumulation von ROS, die durch geringe  $H_2O_2$ -Dosis oder durch den Mangel an Glutathion im Wachstumsmedium, erreicht wird. Glutathion spielt eine wichtige Rolle beim Schutz der mitochondrialen Membranen und bei der Erhaltung eines reduzierenden Protein-Thiol-Gruppen Pools. Neben Thioredoxin gehört es zu den  $H_2O_2$ -Entgiftungsmechanismen der Zelle (Reed 1990) (Ravindranath and Reed 1990). Diese Akkumulation von ROS kann durch Cycloheximid, das die Proteinneusynthese verhindert, wiederum invertiert werden. Dies zeigt, dass die Akkumulation von ROS mit der Funktion eines proteinabhängigen Regelkreises verbunden ist. ROS treten auch bei Bax-induziertem Zelltod in Hefe auf oder bei Mutation von *CDC48*, einem AAA-ATPase-Gen, dessen Produkt an der Vesikelfusion beteiligt ist (Latterich et al. 1995), (Madeo et al. 1999). Dies unterstreicht die zentrale Rolle von ROS im Apoptoseszenario. Das Mitochondrium gilt als Zentrum der ROS-Produktion, da dort die oxidative Phosphorylierung stattfindet. ROS können von verschiedenen Enzymen generiert werden. Eine aktive Atmungskette führt zur Produktion von Semiquinonen, einer Quelle von ROS (Papa and Skulachev 1997). Die Atmungskette produziert ROS am Komplex 1 (NADH/Ubiquinon Oxidoreduktase) und Komplex 3 (Ubiquinol/Cytochrom C Oxidoreduktase), wobei Ubiquinon in Komplex 3 die Hauptrolle spielt (Turrens et al. 1985) (Boveris et al. 1976) (Takeshige and Minakami 1979). Hier wird ein einzelnes Elektron auf molekularen Sauerstoff übertragen, wobei das Radikal  $O_2^-$  entsteht. Die Superoxiddismutase kann mit diesem Superoxidanion das noch reaktivere  $H_2O_2$  generieren (Chance et al. 1979),

welches durch reduktive  $\text{Fe}^{2+}$ -abhängige homolytische Spaltung zu dem hoch zytotoxischen Hydroxyl-Radikal  $\text{OH}^\cdot$  gespalten wird (Halliwell and Gutteridge 1990). Das Superoxidanion kann auch mit NO zu Peroxinitrit reagieren (Groves 1999), was irreversible Schädigungen des Mitochondriums und in Folge davon den Zelltod hervorruft (Szabo and Ohshima 1997) (O'Connor et al. 1997) (Lin et al. 1998) (Liu et al. 1999).

#### 3.4.4 Das Mitochondrium als zentrales Apoptoseregulationszentrum

Die morphologischen und biochemischen Änderungen der apoptotischen Zelle sind unabhängig von den auslösenden Faktoren. Sie führen zu mitochondrialer Membranpermeabilisation und der Aktivierung der Caspasen-Kaskade (Green and Martin 1995; Kroemer and Reed 2000; Finkel 2001), zwei Mechanismen, die eng miteinander verbunden sind, sich aber nicht immer gegenseitig bedingen (Susin et al. 2000; Joza et al. 2001). Permeabilisierte mitochondriale Membran stimuliert die Caspasenaktivierung durch Freisetzung mitochondrialer Proteine wie Cytochrom C, verschiedener Procaspasen und smac- $\alpha$ /DIABOLO. Diese aktivierten Caspasen führen zur proteolytischen Reifung von Proteinen (Bax, Bad und Bid), die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran auslösen (Kirsch et al. 1999) (Condorelli et al. 2001) (Korsmeyer et al. 2000). Die äußere Membran des Mitochondriums wird proteindurchlässig während die innere Membran Matrixproteine zurückhält, aber ihr Transmembranpotential auflöst. Caspasen und Nucleasen werden aktiviert durch ausfließende Proteine, die normalerweise im Raum zwischen innerer und äußerer Membran sind. Freigesetztes Cytochrom C stimuliert die Bildung des zytosolischen Apoptosom, dem Caspase aktivierenden Komplex, und ausfließender AIF (apoptosis inducing factor) aktiviert eine DNase im Zellkern (Kroemer and Reed 2000). Antiapoptotische Faktoren wie Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> sind hauptsächlich in mitochondrialen Membranen lokalisiert, wo sie die Permeabilisierung verhindern. Pro-apoptotische Faktoren wie Bax können nach Translokation mit der mitochondrialen Membran oligomerisieren und so die Permeabilisierung erleichtern (Kroemer 1997). Die Translokation-Oligomerisation und Permeabilisation wird stimuliert durch Bid. Das im Gegensatz zu Bax membranresidente Bax-Homolog Bak kann nach allosterischer Stimulation durch Bid mit der äußeren Membran oligomerisieren und so die Permeabilisierung antreiben (Korsmeyer et al. 2000). Es wird vermutet, dass Bax-ähnliche Proteine entweder eine Pore formen (Martinou and Green 2001) oder in Interaktion mit dem Multiproteinkomplex PTPC („Permeability Transition Pore Complex“), der die Kontaktstelle zwischen äußerer und innerer mitochondrialer Membran bildet, die Permeabilität ermöglichen (Kroemer 2001). Der Multiproteinkomplex PTPC

beinhaltet zwei porenbildende Proteine. Der VDAC („*Voltage Dependent Anion Channel*“) in der äußeren Membran und ANT („*Adenine Nucleotide Translocase*“) in der inneren Membran, die alleine oder in Zusammenarbeit mit Bax unspezifische Poren bilden können.  $\text{Ca}^{2+}$ , Sauerstoffradikale,  $\text{NO}^+$ , Ganglioside GD3, Arachidonsäure, Peroxynitrat und Fettsäuren veranlassen isolierte Mitochondrien zur Porenbildung über Konvertierung der Adenin-Nucleotid-Translocase (Vieira et al. 2000). Metaboliten wie Bilirubin (Bilirubincephalopathy) (Botla et al. 1995), Glycochenodeoxycholat (Cholestatic liver cell death) und  $\beta$ -Amyloid (Alzheimer, neuronaler Zell Tod) (Parks et al. 2001) (Rodrigues et al. 2000) und infektiöse pathogene Proteine wie Cytotoxin A, Porin B und Vpr (HIV-1) (Boya et al. 2001) wirken ebenfalls permeabilisierend auf Mitochondrien. Auch Inhibition der Atmungskette durch Antimycin A kann Apoptose verursachen, wobei dafür nicht die Cytochrom-Oxidase-Inhibition, sondern das Bindepotential zu Bcl-X<sub>L</sub> entscheidend ist (Zheng 2001). Mutationen des mitochondrialen Genoms (Fliss et al. 2000) (Singh et al. 1999) oder mitochondrialer Proteine wie Frataxin (Wong et al. 1999) können auch das Apoptoseverhalten von Zellen beeinflussen.

#### 3.4.5 Signalwege bei Apoptose

Der UPR-Signalweg und  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale sind an der Initiation von Apoptose beteiligt (Kaufman 1999; Patil and Walter 2001). In Säugerzellen ist der Hauptspeicher für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen das ER. Eine Zelle unter ER-Stress stirbt, wenn sie die Proteinfaltung nicht verbessern kann (Patil and Walter 2001). Die Akkumulation von falsch gefalteten Proteinen kann mit Tunicamycin (blockiert N-Glycosylierung), Brefeldin (verhindert ER-Golgi-Transport) oder Dithiothreitol (verhindert die Bildung von Disulfidbrücken) provoziert werden. Falsch gefaltete Proteine binden am ER-Chaperon Bip/Grp78 und spalten dabei die kompetitive Bindung zwischen Bip/Grp78 und Ire1 $\alpha$ . Letzteres kann dadurch oligomerisieren und autophosphoryliert sich mit seiner zytosolischen Serin/Threonin-Kinase (Katayama et al. 1999). An aktiviertes Ire1- $\alpha$  bindet das zytosolische Adapterprotein TRAF2 welches JNK („*c-Jun N-terminal-kinase pathway*“) aktiviert (Urano et al. 2000). Oder Ire1 $\alpha$  wird von Presenilin-1 geschnitten und wandert zum Zellkern (Niwa et al. 1999). Der N-Terminus von Ire1- $\beta$  prozessiert Ribonuclease, die weitere Proteintranslation durch den Verdau von 28S rRNA verhindert (Katayama et al. 1999; Iwawaki et al. 2001). ER-Stress aktiviert zusätzlich zwei Transmembranproteine PERK (PKR(RNA-activated protein kinase)-ähnliche ER-Kinase) und ATF-6 (Patil and Walter 2001). Wie Ire1 $\alpha$  oligomerisiert PERK und phosphoryliert den

Initiationsfaktor eIF2, was die Proteinsynthese allgemein nach unten reguliert. ATF-6 wird bei ER-Stress von S2P („*site 2 protease*“) geschnitten und der zytosolische Rest von S2P wandert in den Zellkern um dort als Transkriptionsfaktor (als basischer Leucin-Zipper) auf die ATF/CREB Familie zu wirken. Es werden dadurch Gene für Chaperone (Bip/Grp78) und Transkriptionsfaktoren (CHOP/GADD153), welche die Expression von Bcl-2 vermindern prozessiert und so Apoptose induziert (McCullough et al. 2001). ER-Stress führt auch direkt zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade (Morishima et al. 2002) (Nakagawa et al. 2000; Yoneda et al. 2001). Caspase-12 ist lokalisiert an der zytosolischen Seite des ER und wird aktiviert durch ER-Stress und durch die Ausschüttung von intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern. Caspase-12 wird proteolytisch durch m-Calpain, eine zytosolische durch  $\text{Ca}^{2+}$  regulierte Cystein-Protease aktiviert und schneidet Bcl- $\text{X}_L$  zu einem proapoptotischen Protein (Nakagawa and Yuan 2000).

#### 3.4.6 Die Beteiligung von $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an der Apoptose

$\text{Ca}^{2+}$ -Signale sind ein wichtiger Bestandteil des Apoptoseszenarios. Im ER-Lumen, dem Hauptspeicher für  $\text{Ca}^{2+}$  bei Säugerzellen, liegen die zweiwertigen Ionen entweder frei oder gebunden an Calreticulin und Calnexin vor. Die luminaire  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wird kontrolliert durch Pumpen (ATPase SERCA pumpt  $\text{Ca}^{2+}$  in das ER-Lumen) und Kanäle (Inositol-1,4,5-Triphosphat-Rezeptor/ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle) (Ryanodin-Rezeptor/ $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle) und Bcl-2-ähnliche Proteine. Eine Störung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts und ein rapider Ausfluss von  $\text{Ca}^{2+}$  lösen Apoptose aus. Die Inhibition der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA mit Tapsigargin induziert ebenfalls Apoptose. InsP3Rezeptor1-defiziente Lymphozyten sind resistent gegenüber vielen Apoptose induzierenden Stoffen (Khan et al. 1996). Bip/Grp78 verhindert Ionomycin erzeugte Apoptose und moduliert die Glutamat betriebene Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  im ER (Miyake et al. 2000). Die Suppression von Bip/Grp78 verursacht verstärkten Zelltod bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletion im ER (Jamora et al. 1996). Calreticulin moduliert die Oszillation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im ER durch Aktivierung der SERCA-Pumpe und des InsP3-Rezeptors und ist gleichzeitig ein Glykoprotein bindendes Chaperon, das durch UPR induziert wird. Calreticulin Überexpression führt zu erhöhter Apoptosebereitschaft der Zelle (Johnson et al. 2001) und führt bei zusätzlicher Behandlung mit SERCA-Inhibitoren (Tapsigargin, Staurosporin oder Etoposid) zu Cytochrom C Freisetzung aus dem Mitochondrium. Calreticulin-Defizienz führt zu Apoptoseresistenz (Nakamura et al. 2000). Bax und Bak-Defizienz führen zur Verhinderung der Apoptose verursacht durch Tunicamycin und Brefeldin (Wei et al. 2000). Ein weiteres Beispiel für ein Protein, das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktion

und Apoptose verbindet ist das antiapoptotische Bcl-2. Bcl-2 erhöht die Retentionszeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im ER (Hacki et al. 2000) (Annis et al. 2001) (Pinton et al. 2000) (Foyouzi-Youssefi et al. 2000) und wirkt Apoptose verzögernd. Bcl-2 wirkt sich *in vitro* auf die mikrosomale Permeabilität aus (He et al. 1997) und es ist denkbar, dass Bcl-2 auch  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale bei anderen Organellen neben dem ER beeinflusst.

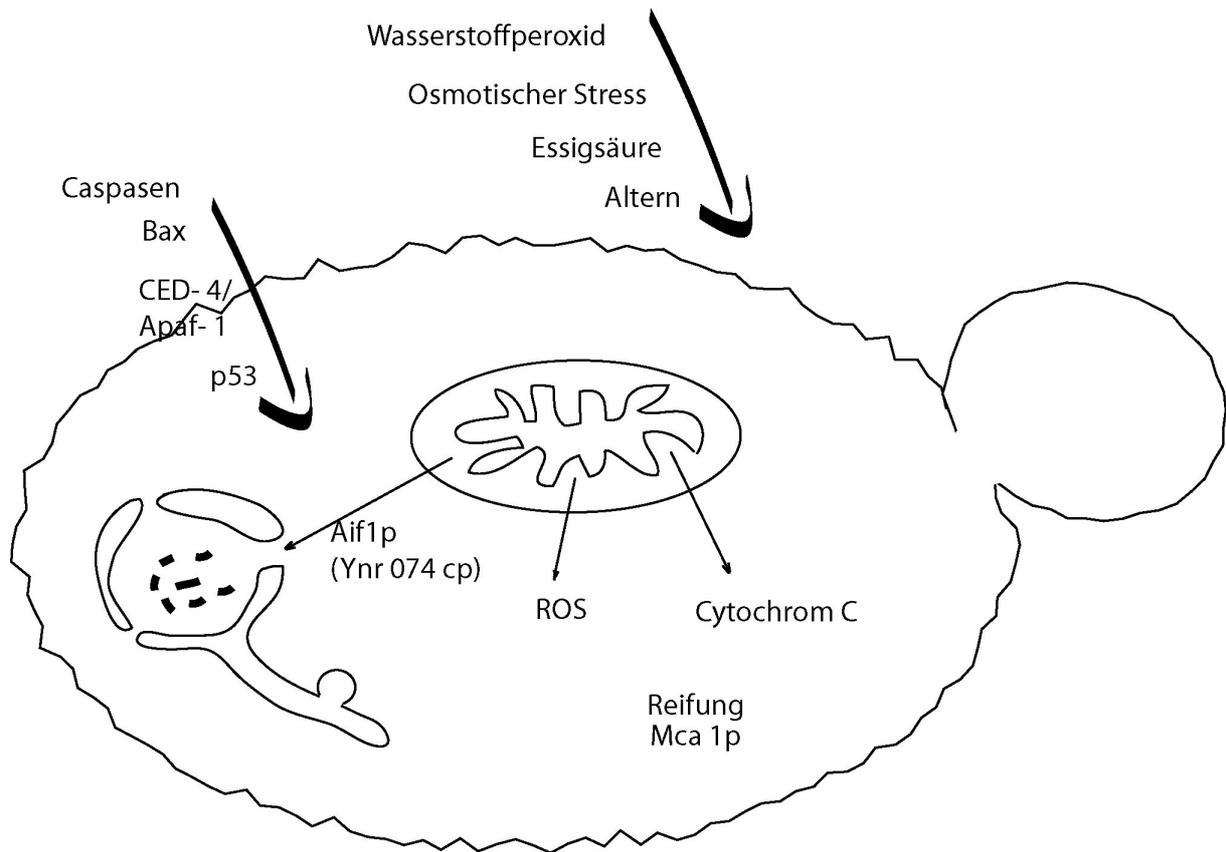
#### 3.4.7 Der Golgi und Apoptose

Einige Proteine des Apoptosesignalsystems sind auch verstärkt an Golgi Membranen zu finden. Caspase-2 (Mancini et al. 2000), TNF-R1 (CD95) (Bennett et al. 1998), TRAIL-Rezeptor1 und TRAIL-Rezeptor2 (Zhang et al. 2000), PI(3)K, Beclin und GD3 Synthase (De Maria et al. 1997). Am Golgi-Apparat lokalisiertes CD95, das GD3-Gangliosid Synthase enthält und für die Konvertierung von Ceramiden in GD3 verantwortlich ist (De Maria et al. 1997), kann zur Plasmamembran wandern als Antwort auf die Aktivierung von p53 (Bennett et al. 1998). GD3 wiederum wirkt bei der Permeabilisierung der mitochondrialen Membran (Rippo et al. 2000). Die Inhibition von  $\alpha 2$ -Mannosidase mit Swainsonine hat Apoptoseinduktion zur Folge (Goss et al. 1995).

#### 3.4.8 Apoptose in der Hefe *S. cerevisiae*

Zur grundlegenden Erforschung allgemeiner eukaryotischer Prozesse, wie auch deren Mechanismen kann die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* herangezogen werden. Das Hefegenom ist sequenziert und die Anwendung von moderner Gentechnologie ist leicht an Hefe durchzuführen. Obwohl auf der genomischen Sequenz keine augenfälligen Homologen zu bekannten apoptotischen Regulatoren in Metazoen zu finden sind, können neben Zellteilung und intrazellulärem Transport auch Apoptose-Mechanismen aufgeklärt werden. Die Expression von apoptotischen Genen tötet auch Hefe. Bax (Sato et al. 1994) (Hanada et al. 1995) (Greenhalf et al. 1996), Caspasen (Kang et al. 1999) (Ryser et al. 1999), p53 (Bischoff et al. 1992) (Nigro et al. 1992) oder CED-4/Apaf-1 (James et al. 1997) induzieren in *S. cerevisiae* Zelltod. Der Bax-induzierte Zelltod kann wiederum durch die gleichzeitige Expression von Apoptoseinhibitoren wie Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> verhindert werden (Sato et al. 1994) (Hanada et al. 1995) (Greenhalf et al. 1996) (Jurgensmeier et al. 1997). Die Inhibition von Caspasen in Säugerzellen durch Überexpression von Bcl-X<sub>L</sub> supprimiert auch in Hefezellen den Bax-induzierten Zelltod (Ligr et al. 1998) (Kitanaka et al. 1997). Die strukturellen Voraussetzungen zur Induktion oder Prävention von Zelltod der Bax/Bcl-2

Proteinfamilie (Dimerisieren der BH3-Domäne und Translokalisierung zum Mitochondrium) sind dieselben in Säuger- und Hefezellen (Zha et al. 1996). Bax-induzierter Zelltod kann auch durch Mutation des Bax-Bindevermögens von Bcl-X<sub>L</sub> verhindert werden (Tao et al. 1997) (Minn et al. 1999). Der Bax-induzierte Zelltod beruht somit auch in Hefe auf Aktivierung eines Zelltod-Programms, das zu den eindeutigen Apoptose-Merkmalen wie Chromatinkondensation, DNA-Strangbruch, Blasenbildung an der PM und Externalisierung von Phosphatidylserin führt. Diese Apoptose-Merkmale lassen sich auch intrinsisch durch Punktmutation von *cdc48*- erzeugen (Madeo et al. 1997). Cdc48p ist an der Vesikelfusion bei Sekretion und Zellteilung beteiligt (Latterich et al. 1995). Somit muss eine Apoptosemaschine in Hefe existieren. Gealterte Hefezellen (Frohlich and Madeo 2001) (Laun et al. 2001) oder Zellen die nicht mit anderen verschmelzen können (Severin and Hyman 2002) werden apoptotisch aus dem Genpool entfernt. Alternde Hefezellen zeigen neben apoptotischem Sterben ein adaptives Wachstum von Zellen, die durch gesteigerte Mutationsfrequenz einen erhöhten Schutz gegen die Toxizität von Superoxiden erworben haben (Fabrizio et al. 2004). Als AIF-ähnliches Protein wurde Ynr074cp in Hefe identifiziert, welches sich in Abhängigkeit von verschiedenen Apoptosestimuli wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Alterung, zwischen Mitochondrium und Zellkern bewegt. *AIF1*-Überexpression führt in Gegenwart von geringen Mengen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu massivem apoptotischen Zelltod und die Sterberate verursacht durch Alterung ist bei *aif1*-defizienten Zellen wesentlich geringer. (Wissing et al. 2004). Des Weiteren konnte eine teilweise Abhängigkeit der Aif1p-Funktion von der Caspase Mca1p (Yca 1p) gezeigt werden, ein Protein (Madeo et al. 2002), das nötig ist für den durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder durch Altern verursachten apoptotischen Zelltod. Von dieser Metacaspase wurde auch gezeigt, dass sie an einem Apoptoseweg beteiligt ist, der charakteristische Ähnlichkeiten zu Apoptosewegen in Säugerzellen zeigt (Qi et al. 2003). Starker Salz-Stress stört intrazelluläre Ionengleichgewichte und löst auch Apoptose in Hefezellen aus. Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 verbessert die Salztoleranz von Wildtypzellen und Calcineurin-Mutanten *Δcnb1* (Huh et al. 2002). Eine *sro7*-Deletion hat eine gestörte Ionenhomöostase (Larsson et al. 1998), verstärkte Sensitivität gegenüber NaCl-Stress, Sekretionsdefekte (Lehman et al. 1999) und erhöhte Anfälligkeit gegenüber apoptoseartigem Zelltod bei Salz-Stress (Wadskog et al. 2004) zur Folge.



### Schematische Darstellung 2: Programmierter Zelltod der Hefezelle

Die Abbildung zeigt die extrinsischen ( $H_2O_2$ ; Osmotischer Stress, schwache Säuren, Altern) und die heterologen intrinsischen Apoptose-induzierenden Stimuli (Caspasen, Bax, CED-4/Apaf1, p53). Die Hefezelle verfügt über Aif1p (Ynr074cp), ROS-Produktion, Cytochrom C-Freisetzung und Reifung von Mca1p um das Apoptoseszenario endogen zu regulieren.

## 4 Ergebnisse

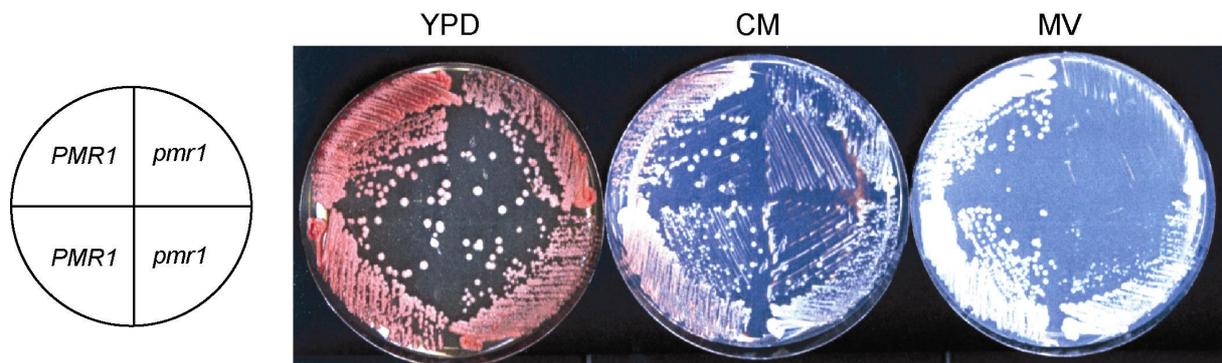
### 4.1 Beeinträchtigungen der Zellwand und des Zytoskeletts bei *Δpmr1*-Mutanten

#### 4.1.1 „Synthetische Letalität“ Suche nach genetischen Interaktionen in der *Δpmr1*-Deletionsmutante

Um im Hefegenom mögliche Interaktionspartner des *PMR1*-Lokus zu identifizieren, wurde mittels eines Rot/Weiß-Screens nach Mutationen gesucht, die das Wachstum oder die Lebensfähigkeit einer *Δpmr1*-Deletionsmutante beeinträchtigen, d.h. sogenannte „synthetische Letalität“ hervorrufen. Dazu wurde ein *Δpmr1/Δade2/Δade3*-Stamm mit einem Plasmid, welches die Gene *PMR1* und *ADE3* trägt, transformiert. Solche Stämme bilden rote Kolonien mit weißen Sektoren, da *Δade2*-Mutanten ein rotes Pigment akkumulieren und *Δade2/Δade3*-Zellen, die das *PMR1/ADE3*-Plasmid spontan verloren haben, weiß sind (die *Δade3*-Mutation verhindert die Bildung des für *ade2*-Mutanten typischen roten Pigments). Nach der Mutagenese dieses Stammes wurden vollständig rote Kolonien gesucht, die keine weißen Sektoren mehr aufweisen, da in solchen Kolonien das *PMR1/ADE3*-Plasmid offenbar durch die zusätzliche Mutation im Genom essentiell geworden ist und daher weiße, plasmidfreie Zellen nicht überleben oder zumindest nicht mehr wachsen können (Blinder et al. 1989) (Bender and Pringle 1991). Um die Identifikation der durch die Mutagenese getroffenen Gene zu erleichtern, wurde als Methode für diesen Screen eine Transposonmutagenese gewählt. Hierbei wird das Hefegenom letztendlich durch die integrative Transformation von Transposon-modifizierten, linearisierten Genbankfragmenten zufällig mutagenisiert (Burns et al. 1994). Durch Sequenzierung der flankierenden Bereiche einer Transposoninsertion mit einem Transposon-spezifischen Primer kann jedes für eine synthetische Letalität verantwortliche Gen rasch bestimmt werden. Nach diesem Verfahren konnten folgende, mit dem *PMR1*-Gen wechselwirkende Gene identifiziert werden: *PMC1*, *VPS3*, *VPS24*, *FUR1*, *PAC2*, *TUB3*, *SAC2*, *SLA1*, *ECM33*, *ZVO1*, *ROM2*, *ARG81*, *VAN1*, *SIR4*, *BST1*, *SEC35*, *LIP5*, *SWI1*, *YER005W*, *TOM1*

Dieser Screen kann offenbar die gewünschten Interaktionspartner identifizieren: von Cunningham ist bereits bekannt, dass sich eine zusätzliche *Δpmc1*-Mutation synthetisch-letal auf eine *Δpmr1*- Zelle auswirkt (Cunningham and Fink 1994a). Zur endgültigen Beurteilung der mit dieser Screenvariante gefundenen, potentiell synthetisch-letal Interaktionspartner

von  $\Delta pmr1$  wurde jeweils die Lebensfähigkeit von künstlich erzeugten Doppel-Deletionsmutanten untersucht. Dazu wurden mittels PCR die jeweiligen Deletionskonstrukte erzeugt und in einen heterozygoten  $\Delta pmr1/PMR1$ -Diploid transformiert. Durch Tetradenanalyse konnten genetische Interaktionen zwischen  $PMR1$  und einigen der im Screen gefundenen Gene nachgewiesen werden. Allerdings wurde in den bislang untersuchten Fällen nur ein zum Teil stark verlangsamtes Wachstum der Doppelmутanten, aber keine wirkliche Letalität beobachtet. Diese Art von genetischer Interaktion mit dem  $PMR1$ -Gen zeigten nach der Tetradenanalyse folgende Gene:  $BST1$ ,  $VPS24$ ,  $SAC2$ ,  $VANI$ ,  $YND1$ . Mit den Genen  $FUR1$ ,  $ECM33$ ,  $ZVO1$ ,  $ARG81$ ,  $SIR4$ ,  $SEC35$  und  $SWI1$  wurde noch keine Tetradenanalyse durchgeführt. Bei der Kontrollkreuzung des verwendeten  $\Delta pmr1$ -Stammes mit einem  $PMR1$ -Wildtyp zeigte sich in der anschließenden Tetradenanalyse nur auf dem auch im Screen eingesetzten Minimalmedium eine Inhomogenität der beiden  $\Delta pmr1$ -Sporen bezüglich des Wachstums (Abb. 1). Möglicherweise trägt der im Screen verwendete  $pmr1$ -Deletionsstamm eine Suppressormutation, die auch die Überlebensfähigkeit der hergestellten Doppelmутanten beeinflusst haben könnte.



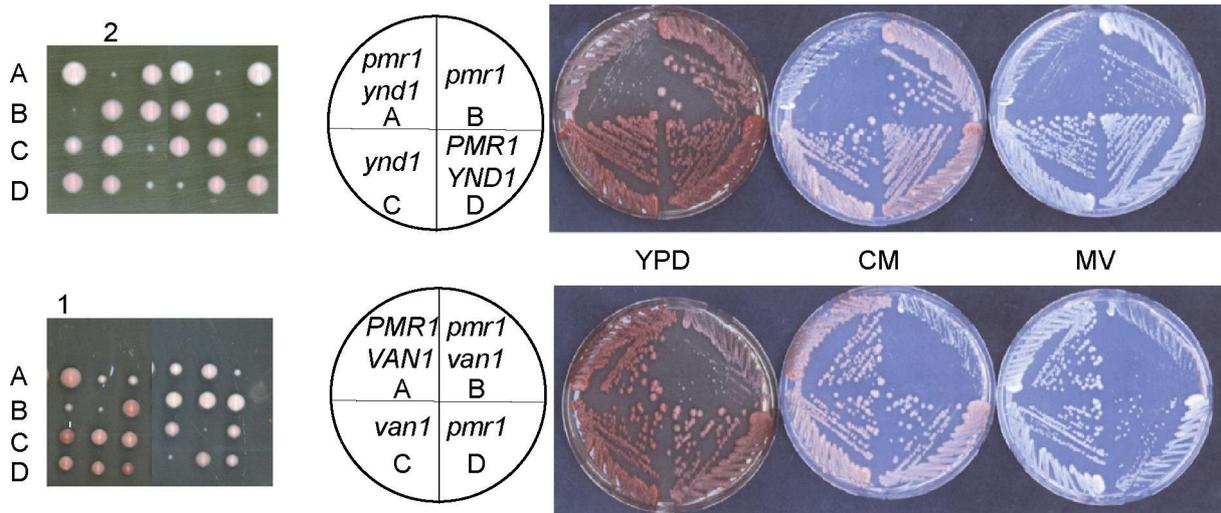
**Abb. 1: Unterschiedliches Wachstum zweier  $\Delta pmr1$ -Sporen auf Minimalmedium**

In der Abbildung sind die Sporen einer Vergleichs-Tetrade auf den Medien YPD (links), CM+ (mittig) und MV+Ade His Lys Ura Leu Trp (rechts) als Ausstriche zu sehen.

#### 4.1.2 $\Delta pmr1\Delta ynd1$ - und $\Delta pmr1\Delta van1$ -Doppelmутanten zeigen stark verlangsamtes Wachstum

Als genetische Interaktionspartner von  $PMR1$  wurden neben den Genen  $BST1$ ,  $SAC2$  und  $VPS24$  die Gene  $YND1$  und  $VANI$  gefunden. Ynd1p („Yeast Nucleotide Diphosphatase“) ist eine Golgi-lokalisierte, membrangebundene Apyrase und als GDPase an der N- und O-Glykosylierung beteiligt. Eine  $\Delta ynd1$ -Nullmutante zeigt Vanadatresistenz, Hygromycin-Sensitivität und einen schwachen Wachstumsdefekt (Gao et al. 1999). Van1p („Vanadat

*Resistance protein, component of Mannanpolymerase“)* besitzt  $\alpha$ -1,6- und  $\alpha$ -1,2-Mannosyltransferaseaktivität und ist somit ebenfalls entscheidend für vollständige Proteinglykosylierung im Golgi(Jungmann and Munro 1998). Die Deletion des *VAN1*-Gens führt zu Vanadatresistenz, Hygromycin-Sensitivität, Hitzeschock-Sensitivität, Zymolyase-Hypersensitivität und einem reduzierten Mannose/Glukose-Gehalt der Zellwand (Kanik-Ennulat and Neff 1990) (Kanik-Ennulat et al. 1995).



**Abb. 2: Stark verminderte Koloniegröße von  $\Delta ynd1 \Delta pmr1$ - und  $\Delta van1 \Delta pmr1$ - Doppelmutanten**

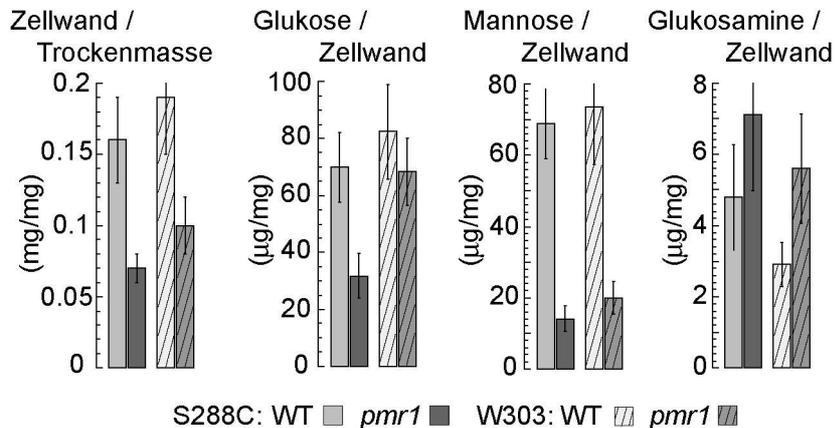
Die Abbildung zeigt separierte Tetraden eines heterozygoten  $\Delta ynd1/YND1 \Delta pmr1/PMR1$ - (oben) bzw.  $\Delta van1/VAN1 \Delta pmr1/PMR1$ - Stammes (unten) und die jeweiligen Einzelausstriche der Tetrade 2 bzw. 1 auf den Medien YPD, CM und MV.

Der Wachstumsdefekt der  $\Delta pmr1 \Delta van1$ - bzw.  $\Delta pmr1 \Delta ynd1$ -Doppelmutanten auf den verschiedenen Medien ist deutlich zu erkennen (Abb. 2). Offenbar steht *PMR1* genetisch in engem Zusammenhang mit Genen, die an der Glykosylierung (Mannosylierung) von Proteinen beteiligt sind und für die Zellwandintegrität verantwortlich sind.

#### 4.1.3 Die Zellwand einer $\Delta pmr1$ -Mutante ist verändert

Aufgrund der bekannten Auswirkungen einer *pmr1*-Deletion auf N- und O-Glykosylierung von Proteinen sind für *pmr1*-Mutanten auch Veränderungen in der Zellwand zu erwarten. Tatsächlich besitzt eine  $\Delta pmr1$ -Hefezelle eine runde Form und ist deutlich größer als eine Wildtyp-Zelle. Um mögliche Veränderungen in den Zuckerbestandteilen der  $\Delta pmr1$ -Zellwand zu quantifizieren, wurden die Zellwände in Schwefelsäure hydrolysiert und anschließend mit  $Ba(OH)_2$  von  $SO_4^{2+}$ -Ionen gereinigt. Die Auftrennung der gelösten Zellwände in ihre

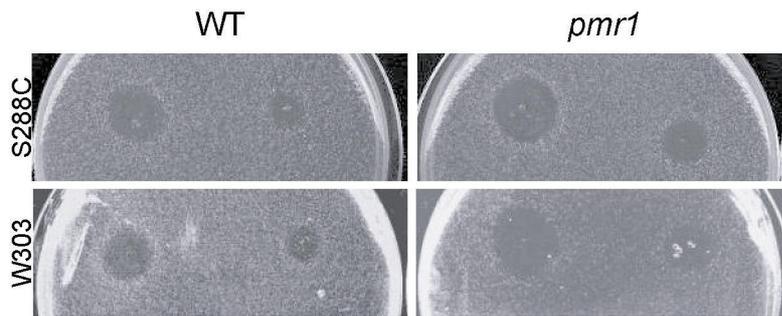
Einzelbestandteile Glukose, Mannose und N-Acetyl-Glukosamin wurde mit *High Performance Anion-exchange Chromatography* durchgeführt und mit Hilfe von *Pulsed Amperometric Detection* ausgewertet (Dallies et al. 1998). Diese Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit dem Labor von Prof. Jean M. Francois (Toulouse).



**Abb. 3: Veränderungen der Zellwand in  $\Delta pmr1$ -Mutanten**

Zu sehen sind die gewonnene Zellwandmasse bezogen auf die gesamte Zelltrockenmasse (linkes Diagramm) neben den Zellwand-Anteilen der drei Zuckerbausteine Glukose, Mannose und Glukosaminen bezogen auf die Zellwandmasse. Die Zuckerbestandteile der  $\Delta pmr1$ -Zellwand wurden mit *high performance anion-exchange chromatography* separiert, mit *pulsed amperometric detection* detektiert und quantifiziert. Die Werte wurden aus drei unabhängigen Experimenten erhalten. Es wurde in den zwei genetischen Hintergründen S288C (YR122, YR98) (gefüllte Balken) und W303 (YR1234, YR401) (schraffierte Balken) gearbeitet

Wie Abb. 3 zeigt, macht die Zellwand von  $\Delta pmr1$ -Mutanten einen sehr deutlich verringerten Anteil an der Zellgesamtmasse aus. Sie hat zusätzlich ein stark reduziertes Mannose/Glukose Verhältnis und der Chitingehalt der Zellwand ist erhöht. Ein erhöhter Chitingehalt der Zellwand ist typisch für Zellwandprotein-Mutanten mit defekten N-Seitenketten (Klis 1994).  $\Delta pmr1$ -Zellen zeigen auch Killertoxinsensitivität, was ebenfalls auf eine Veränderung der äußeren Zellwandschicht zurückzuführen ist, da Killertoxine als initiierenden Schritt an  $\beta$ -Glukankomponenten der Zellwand binden (Hutchins and Bussey 1983). Die  $\beta$ -1,6 Glukanbiosynthese findet offensichtlich im Sekretorischen Weg statt, denn Killertoxin-Resistenz findet sich bevorzugt bei Mutanten von Komponenten des Sekretorischen Weges (Brown and Bussey 1993) (Castro et al. 1995) und bei Mutanten der Komponenten des Golgi Apparates, die an der Glykosylierung von Mannoproteinen der Zellwand beteiligt sind (Lussier et al. 1996).



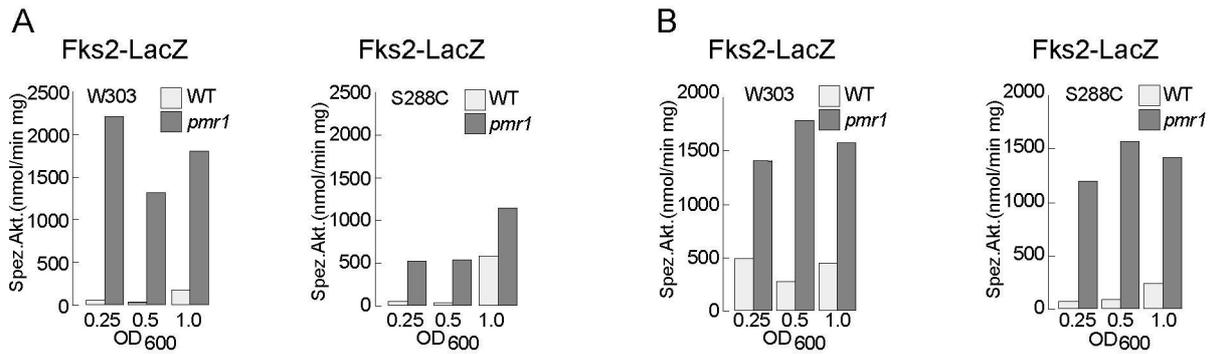
**Abb. 4: Killertoxinsensitivität von  $\Delta pmr1$ -Zellen**

Exponentiell wachsende Zellen im S288C- (YR122, YR98) (oben) und W303- (YR1234, YR401) Hintergrund (unten) wurden in Agar eingebettet und 10 $\mu$ l (kleiner Halo rechts) bzw. 30 $\mu$ l (großer Halo links) Killertoxin K aufgetropft. Nach einem Tag Wachstum bei 30°C konnte durch den Vergleich der Halo-Größe die Sensitivität der Zellen gegen Killertoxin K bestimmt werden.

#### 4.1.4 Die Expression der 1.3-beta-D-Glukansynthetase Fks2p ist in $\Delta pmr1$ -Zellen stark erhöht

Die Zusammensetzung der  $\Delta pmr1$ -Zellwand befindet sich im Ungleichgewicht: Ein Mangel an Glukose- bzw. Mannose-Anteilen wird offenbar durch vermehrte Synthese von Chitin kompensiert. Die Verminderung der  $\beta$ -Glukanschicht könnte möglicherweise direkt auf eine ionenabhängige Hemmung der  $\beta$ -Glukansynthetase-Aktivität oder indirekt auf eine defekte Regulation der Glukansynthetase-Expression zurückzuführen sein. Bei der Regulation der Zellwandintegrität werden physiologische oder entwicklungsbedingte Signale von Rezeptoren in der Zellwand über eine Signaltransduktionskaskade weitergeleitet, um die Aktivität entsprechender Transkriptionswege zu modulieren. Steht die Hefe z.B. vor der Aufgabe, ihre Zellwand für polarisiertes Wachstum zu organisieren oder auf Dehnung und Hitzeschock zu reagieren, wird über Phosphorylierung und Dephosphorylierung die Pkc1p- Mpk1p-Signalkette aktiviert. Diese induziert unter anderem die Expression von Fks2p, die neben Fks1p eine Komponente der katalytischen Untereinheit von  $\beta$ -1,3 Glukansynthase ist (Mazur et al. 1995) (Zhao et al. 1998).

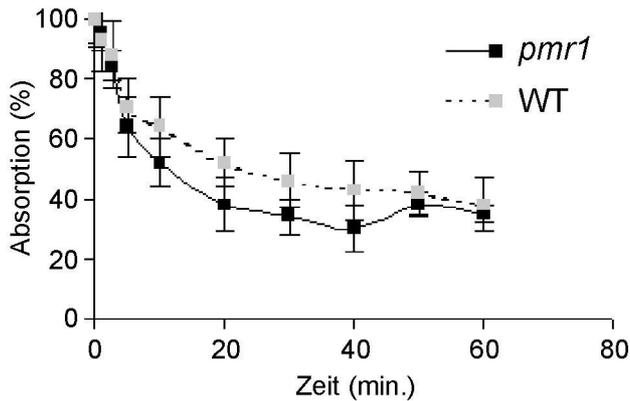
Um die Funktionalität dieser Signaltransduktionskaskade zur Expression von *FKS2* zu verfolgen, wurden  $\Delta pmr1$ -Zellen mit einem *FKS2-lacZ*-Reporter-Plasmid transformiert. Exprimiert die Zelle *FKS2*, wird gleichzeitig  $\beta$ -Galactosidase abhängig vom Expressionsgrad gebildet (Matheos et al. 1997) .



**Abb. 5: Stark erhöhte *FKS2*-Expression in *pmr1*-Mutanten**

Das 2 $\mu$  *FKS2-lacZ*, *URA3*-Reporterplasmid (BR674) wurde in die Stämme (YR1234; YR401 (genetischer W303-Stammhintergrund)) (linkes Diagramm) und (YR122; YR98 (genetischer S288C - Stammhintergrund)) (rechtes Diagramm) transformiert. Von Zellkulturen in unterschiedlichen Wachstumsphasen (optische Dichte bei 600 nm von 0,25; 0,5; 1,0) wurden Rohextrakte hergestellt und die  $\beta$ -Galactosidaseaktivität mit ONPG („*o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside“) spektroskopisch bestimmt. Die erhaltenen Werte wurden auf die isolierte Proteinmenge (bestimmt nach Bradford) bezogen. Die Diagramme zeigen Werte von Zellen die bei 25°C (A) oder 30°C (B) kultiviert wurden.

Ganz offensichtlich wird das *FKS2-lacZ*-Gen in  $\Delta$ *pmr1*-Zellen um ein Vielfaches stärkerer exprimiert als in den korrespondierenden Wildtyp-Zellen (Abb. 5). Die *lacZ*-Aktivität ist nicht nur in stationären  $\Delta$ *pmr1*-Zellen erhöht, sondern zeigt sich auch schon in exponentieller und frühstationärer Wachstumsphase. Ein durch die  $\Delta$ *pmr1*-Mutation erzeugtes Ungleichgewicht im Ca<sup>2+</sup>- und Mn<sup>2+</sup>-Ionen-Haushalt der Zellen führt offenbar zu verringerter Zellwandstabilität, die  $\Delta$ *pmr1*-Zellen durch verstärkte Glukansynthese-Expression über die Pkc1-Mpk1-Signalkaskade auszugleichen versuchen.  $\Delta$ *pmr1*-Zellen nutzen aber offenbar eine weitere Möglichkeit zur Stabilisierung der Zellwand: Der Chitingehalt wird fast verdoppelt. Eine besonders extreme Steigerung des Zellwandchitins ist von  $\Delta$ *gas1*-Mutanten bekannt. Eine  $\Delta$ *gas1*-Nullmutante gleicht inaktive  $\beta$ -1,3-Glukanosyltransferase, welche die Quervernetzung von  $\beta$ -1,3-Glukanen reguliert, durch stark erhöhten Chitinanteil der Zellwand aus. Dies hat eine 8- bis 10-fache Resistenz gegenüber Zymolyase zur Folge (Popolo and Vai 1999).



**Abb. 6: Keine Zymolyaseresistenz bei  $\Delta pmr1$ -Zellen**

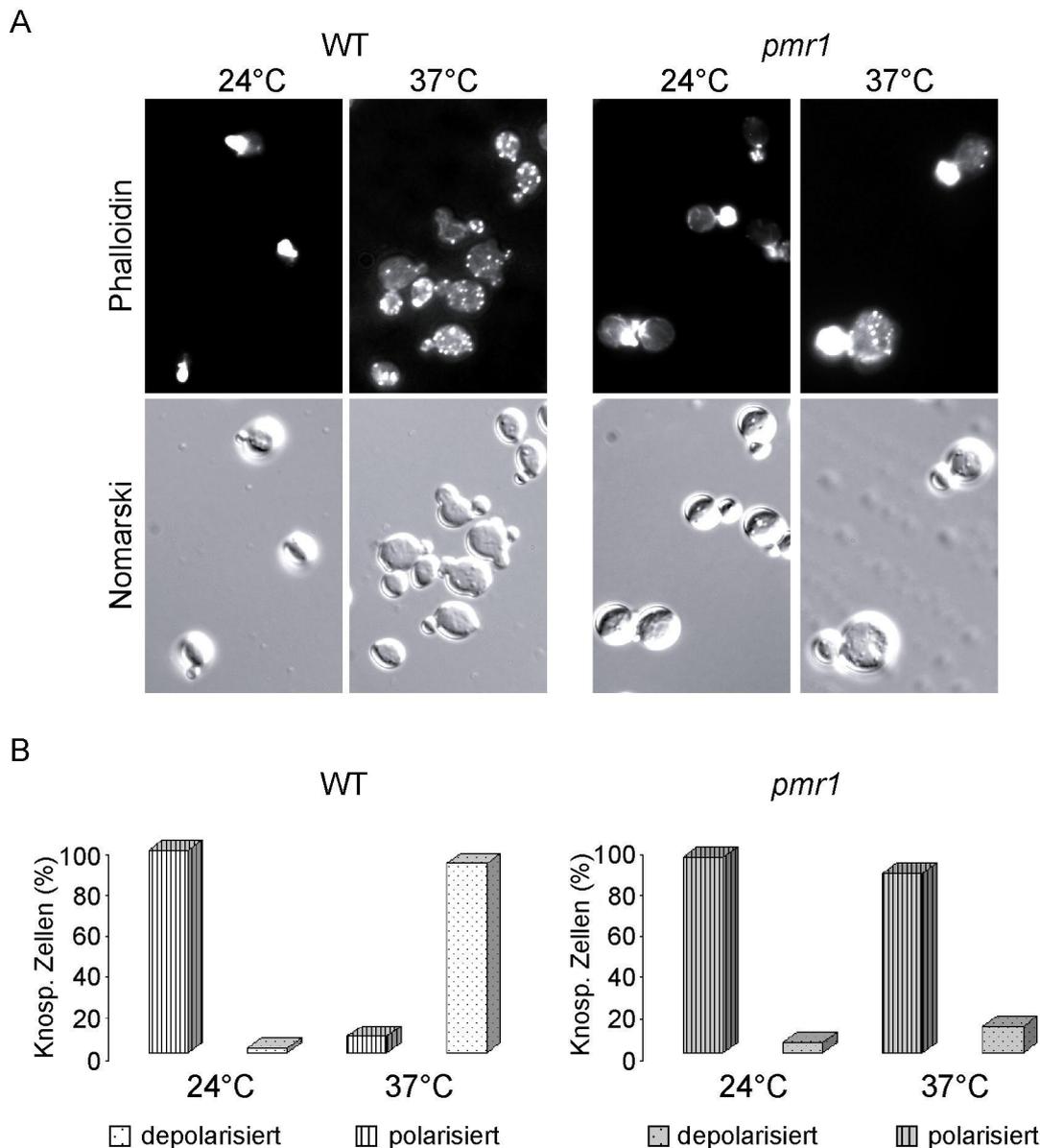
$5 \times 10^8$  Zellen wurden bei einer  $OD_{600nm}$  von 0.5 geerntet, mit 1.2M Sorbitollösung gewaschen und in 1.2M Sorbitollösung aufgenommen. Nach Behandlung mit  $\beta$ -Mercaptoethanol wurde ein Verdau mit Zymolyase bei  $30^\circ C$  angesetzt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden je  $100\mu l$  Zellen entnommen, deren Zellwandstabilität durch Verdünnung mit  $900\mu l$  Wasser bestimmt wurde. Das Aufklären der Zellsuspension, verursacht durch das Platzen von Zellen mit instabilen Zellwänden, wurde spektroskopisch bei  $600nm$  bestimmt. Die Kurven zeigen die Abnahme der Absorption (Startwerte zwischen 0.7 und 0.8) des  $\Delta pmr1$ -Stammes (YR122) (schwarze Quadrate) und des WT-Stammes (YR98) (graue Quadrate). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Die innere Glukanschicht der Zellwand ist von den Folgen einer  $\Delta pmr1$ -Mutation betroffen, was sich am erhöhten Chitinanteil deutlich zeigt (Abb. 3). Dieser gesteigerte Anteil an Chitin führt aber nicht zu einer Resistenz gegenüber Zymolyase wie im Fall von  $\Delta gas1$ -Mutanten sondern eher zu einer geringen Sensitivität gegenüber Zymolyase.

#### 4.1.5 Das Aktinzytoskelett einer $pmr1$ -Mutante kann sich nicht an Hitzestress adaptieren

Vermutlich sind  $\Delta pmr1$ -Zellen einem permanenten Zellwand-Stress ausgesetzt. Zellwand-Stress kann depolarisiertes Zellwachstum induzieren (Delley and Hall 1999). Diese Depolarisation ist Teil eines generellen Zellwand-Reparaturmechanismus, der über die Pkc1p-Mpk1p-Signalkette gesteuert wird und auch auf das Aktinzytoskelett wirkt (Bickle et al. 1998). Das Aktinzytoskelett einer knospenden Hefezelle kann auch durch einen Hitzeschock vorübergehend depolarisiert werden (Lillie and Brown 1994) (Delley and Hall 1999). Um diesen Prozess in der  $\Delta pmr1$ -Mutante zu untersuchen, wurde das Aktinzytoskelett mit TRITC-Phalloidin (Sigma Chemical Co) angefärbt und die Färbung am Mikroskop ausgewertet.

Zellen mit kleinen und mittelgroßen Knospen wurden als depolarisiert gewertet, wenn weniger als 50% der Aktinflecken in der Knospe waren (Abb. 7).



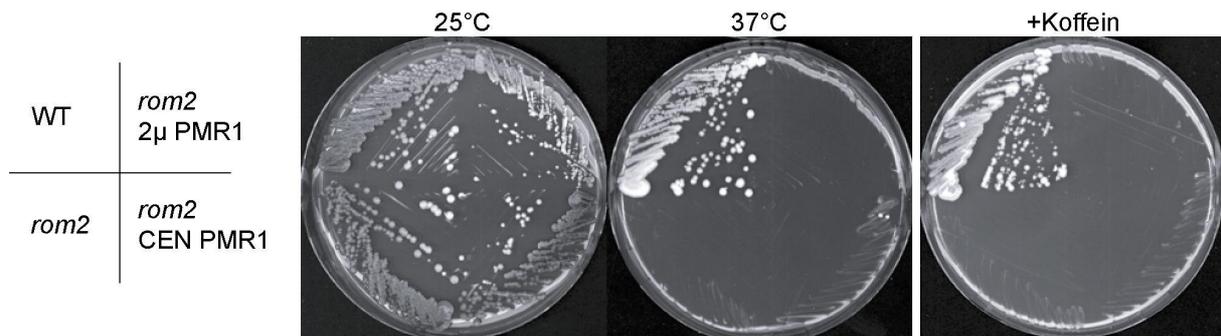
**Abb. 7: Das Aktinzytoskelett in  $\Delta pmr1$ -Zellen wird unter Hitzestress nicht depolarisiert**

Bei 24°C exponentiell wachsende Zellen wurden in zwei Ansätze getrennt und jeweils 30 min bei 24°C oder 37°C inkubiert. Die Aktinfilamente wurden danach mit Phalloidin gefärbt und unter dem Mikroskop ausgewertet. Dazu wurden 1000 Zellen mit kleinen und mittelgroßen Knospen ausgewählt. Polarisierte Zellen zeigen Aktin-Kabel und Flecken, während bei depolarisierten Zellen die Flecken überwiegen. Als polarisiert wurden Zellen gewertet, deren Aktinfilamente sich zu mehr als 50% in der Tochterzelle befanden. In (A) sind die Phalloidin-Färbungen des WT-Stammes (YR98) (linke Seite) und des  $\Delta pmr1$ -Stammes (YR122) (rechte Seite) ohne (links) und mit Hitzeschock (rechts) zu sehen. (B) zeigt die Einteilung von 1000 knospenden Zellen in polarisierte (liniert) oder depolarisierte (gepunktet) Zellen.

Wie (Abb. 7) zeigt, hält eine knospende *Δpmr1*-Zelle ihr Aktin auch bei Hitzeeinwirkung polarisiert und ist nicht fähig, durch Depolarisierung ihres Aktinskeletts auf einen Hitzeschock normal zu reagieren. Eine Depolarisation von Aktin ist auch nötig, um  $\beta$ -1,3-Glukansynthase Fks1p zu depolarisieren und damit an den Zellwänden zu relokalisieren (Delley and Hall 1999). Da Fks1p vermutlich zur Reparatur der Zellwände herangezogen wird, ist möglicherweise auch dieser Fks1p-Depolarisationsprozess unter Hitzeeinwirkung in der *Δpmr1*-Zelle gestört.

#### 4.1.6 Überexpression von *PMR1* kann Phänotypen einer *Δrom2*- Mutante nicht supprimieren

Die Signalkaskade zur Depolarisation des Aktinzytoskeletts unter Hitzestress beginnt an der Zell-Peripherie mit den Plasmamembranproteinen der WSC1-Proteinfamilie (Gray et al. 1997) (Ketela et al. 1999) (Rajavel et al. 1999) (Lodder et al. 1999) und geht weiter über Rom2p, den GDP/GTP-Austauschfaktor von Rho1p. Rho1p wird hyperaktiviert und setzt den Proteinkinase C-Signalweg in Gang (Levin et al. 1994) (Banuett 1998) (Gustin et al. 1998). Diese MAP-Kinase Kaskade kontrolliert neben der Transkription von Zellwandbiogenese-Genen (Igual et al. 1996) (Helliwell et al. 1998a) (Zhao et al. 1998) die Organisation des Aktins (Helliwell et al. 1998b) (Zhao et al. 1998). Zellen mit einer *Δrom2*-Mutation können – wie die *pmr1*-Mutante – ihr Aktinzytoskelett bei Hitzeschock nicht depolarisieren (Delley and Hall 1999). Zellen mit *Δrom2*-Mutation zeigen auch morphologische Defekte und sind Temperatur- (Ozaki et al. 1996) (Manning et al. 1997) sowie Koffein-sensitiv (Lussier et al. 1997). Sensitivität gegenüber Koffein wird meist in Verbindung mit defekten Komponenten des MAP-Kinase Kaskade gefunden (Nickas and Yaffe 1996), aber auch der Verlust von *PMR1* führt zu Koffeinsensitivität (Diplomarbeit Klee). Grund dieser phänotypischen Gemeinsamkeiten zwischen *rom2*- und *pmr1*-Zellen könnte eine Signalkette sein, in der das Fehlen von *ROM2* letztlich die Funktion von *PMR1* beeinträchtigt und so den gemeinsamen Phänotyp auslöst. In diesem Fall könnte sich eventuell der Phänotyp einer *rom2*-Mutante durch gesteigerte Expression von *PMR1* zurückdrängen lassen. Dies ist allerdings nicht der Fall, wie Abb. 8 zeigt.



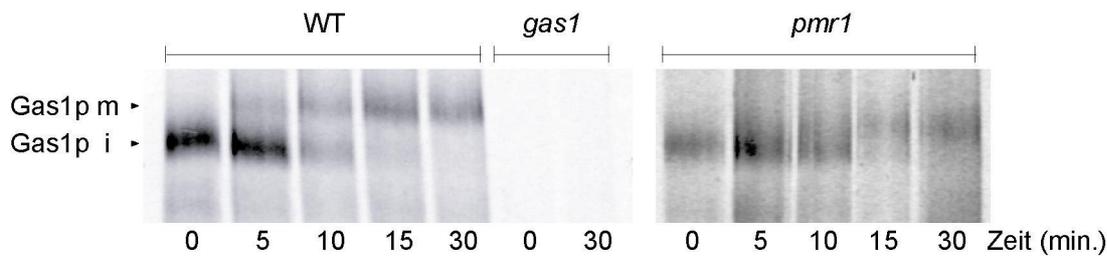
**Abb. 8: Überexpression von *PMR1* kann die Temperatursensitivität und Koffeinsensitivität von  $\Delta rom2$ -Zellen nicht unterdrücken**

Der  $\Delta rom2$ -Stamm (YR1435) wurde mit einem 2 $\mu$  *PMR1* (BR362) und einem *CEN PMR1*-Plasmid (BR5) transformiert, zu Einzelkolonien ausgestrichen und auf Platten mit Koffein bei 25°C 3 Tage inkubiert (rechts). Die Temperatursensitivität ist durch Einzelausstriche auf Platten nach 3 Tagen Inkubationszeit bei 25°C bzw. 37°C (links) gezeigt.

Die Auswirkungen einer  $\Delta rom2$ -Deletion können durch das Überexprimieren von *PMR1* nicht unterdrückt werden.

#### 4.1.7 Die Reifung von Gas1p ist in *pmr1*-Mutanten kaum verzögert

Ob die Zellwand-Defekte der  $\Delta pmr1$ -Zellen auch Störungen bei der Reifung von GPI-verankerten Zelloberflächenproteinen beinhalten, wurde am Beispiel von Gas1p untersucht. Gas1p („*Glycophospholipid Anchored Surface Glykoprotein*“) ist ein klassisches Zelloberflächen-Protein (Nuoffer et al. 1991) (Conzelmann et al. 1988). Es gehört zu Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerten  $\beta$ -1,3 Glukanosyltransferasen (Mouyna et al. 2000) und ist an der Quervernetzung von  $\beta$ -1,3 Glukanen mit  $\beta$ -1,6 Glukanen und Chitin beteiligt (Popolo et al. 1997). Die GPI-Protein-Verknüpfung findet im ER statt und ist essentiell für den COPII-Vesikel vermittelten Transport des Proteins zum Golgi (Doering and Schekman 1996). Im („*pulse-chase*“) Experiment ist die Umwandlung der Gas1p-Vorläuferform in die reife Form am zunehmenden Molekulargewicht zu erkennen (Abb. 9).



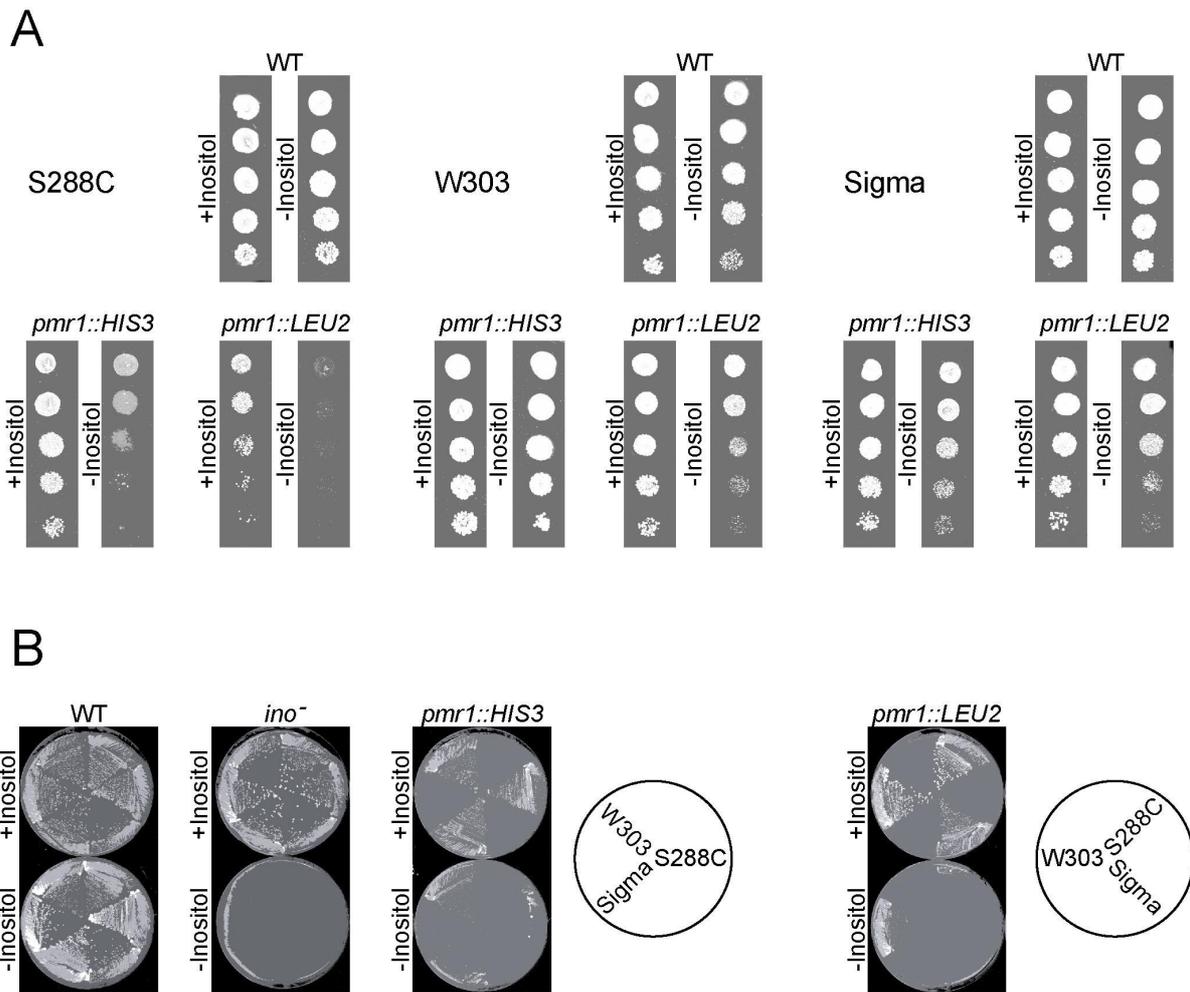
**Abb. 9: Die Reifung von Gas1p ist nur unmerklich verzögert in  $\Delta pmr1$ -Mutanten.**

Von einer exponentiell wachsenden ( $OD_{600nm}$  0,5) Übernachtskultur wurden insgesamt  $3 \times 10^8$  Zellen geerntet, gewaschen und zur Markierung der Proteine mit  $100 \mu Ci$  TRANS  $^{35}S$ -Label versetzt. Die Aufnahme von radioaktivem  $^{35}S$  wurde nach 5 min durch Zugabe des Chase-Cocktails (Methionin, Cystein und Ammoniumsulfat) gestoppt. An den gezeigten Zeitpunkten wurden jeweils  $5 \times 10^7$  Zellen entnommen, in  $NaN_3/NaF$  aufgenommen und mechanisch aufgeschlossen. Aus den Extrakten wurde Gas1p durch Immunpräzipitation gereinigt und mittels SDS-Gelelektrophorese weiter aufgetrennt. Die Gas1p-Banden wurden am Phosphoimager visualisiert. Auf dem obigen Blot wird die Reifung von der ER-Form (Gas1p i) zur Golgi-Form (Gas1p m) des WT-Stammes (YR401), des  $\Delta gas1$ -Stammes (YR1477) und des  $\Delta pmr1$ -Stammes (YR434) gezeigt.

$\Delta pmr1$ -Mutanten zeigen nur eine sehr geringe Reifeverzögerung von Gas1p. Eine Quantifizierung der Banden mit der obigen Abbildung ergab lediglich einen Unterschied der Halbwertszeiten von  $0.5 \text{ min } t_{1/2} pmr1=10.5 \text{ min}$ ;  $t_{1/2} WT=10.0 \text{ min}$ . Offenbar verläuft die Biogenese von Gas1-GPI in  $pmr1$ -Mutanten weitgehend normal. Dieser Befund ist bemerkenswert, da  $pmr1$ -Mutanten Inositol-Auxotrophie aufweisen und Inositolhungerung die normale Verknüpfung von GPI mit Gas1p und die damit verbundene Reifung der ER-Form zur Golgi-Form des Proteins unterbricht (Doering and Schekman 1996) (Sutterlin et al. 1997). Offensichtlich ist aber unter den hier gewählten Bedingungen genügend Inositol im Medium, um diese Beeinträchtigung der Gas1p GPI-Biogenese zu verhindern.

#### 4.1.8 Inositolauxotrophie und Expression *INO1-lacZ* in $\Delta pmr1$ -Zellen

Im Rahmen der phänotypischen Charakterisierung der  $pmr1$ -Mutante haben wir festgestellt, dass diese Stämme eine Inositol-Auxotrophie aufweisen, die in verschiedenen Stammhintergründen ungleich ausgeprägt erscheint. Dies ist in der Abbildung 10 dargestellt.

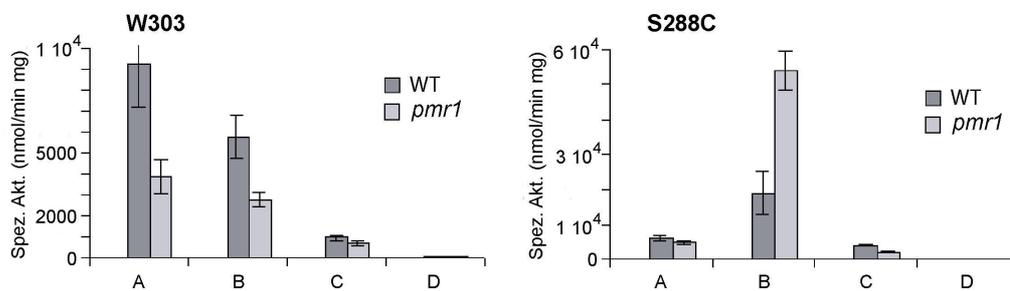


**Abb. 10: Inositol-Mangel und Wachstum von  $\Delta pmr1$ -Mutanten**

Unter (A) sind Kulturen gezeigt, die über Nacht in flüssigem YPD bis zum Erreichen der frühstationären Phase geschüttelt ( $OD_{600} = 1.0$ ) wurden. Diese Zellsuspensionen wurden seriell 1:10 mit MIM- Medium  $\pm$  Inositol verdünnt und aus den Verdünnungen jeweils 5 $\mu$ l auf MIM- Platten  $\pm$  Inositol aufgetropft. Die Platten wurden 3 Tage bei 30°C inkubiert. Hier werden die Stammhintergründe S288C (links) mit den  $\Delta pmr1$ - Stämmen (YR122, YR123), dem WT- Stamm (YR98) und W303 (mittig) mit dem  $\Delta pmr1$ - Stämmen (YR1234, YR434), dem WT- Stamm (YR401) und Sigma (rechts) mit dem  $\Delta pmr1$ - Stämmen (YR1337, YR1335), dem WT- Stamm (YR1305) auf MIM- Platten +Inositol (links) und MIM- Platten –Inositol (rechts) gezeigt. Unter (B) sind die verschiedenen  $\Delta pmr1$ -Stämme auf MIM-Platten + und –Inositol als Ausstriche zu Einzelkulturen zu sehen.

Insbesondere das  $\Delta pmr1::LEU2$ -Allel zeigt im S288C-Hintergrund Inositolautotrophie und führt auch im Sigma-Hintergrund zu eingeschränktem Wachstum auf inositoldepletiertem Medium. Dieser  $\Delta pmr1$ -Wachstumsdefekt ist im genetischen W303-Hintergrund schwächer ausgeprägt. Die Inositolautotrophie von  $\Delta pmr1$ -Zellen könnte mit einer Veränderung der *INO1*-Niveaus zusammen hängen. Ino1p („*L-myo-inositol-1-phosphat*synthase“) katalysiert

einen limitierenden Schritt der Inositolbiosynthese (Patton et al. 1995). *Δino1*-Mutanten benötigen Inositol und sterben in inositoldepletiertem Medium (Dean-Johnson and Henry 1989). Zur Messung des Expressionsgrades des *INO1*-Gens wurden verschiedene *INO1-lacZ*-Reportergene als Plasmide in *pmr1*-Stämme eingeführt. Dieser *lacZ*-Reporter kodiert für  $\beta$ -Galactosidase. Wird jetzt das *INO1-lacZ*-Gen exprimiert entsteht gleichzeitig  $\beta$ -Galactosidase. Als Negativkontrolle wurde ein vollständiges, unmarkiertes *INO1*-Gen, ohne *lacZ*-Reportersequenz, transformiert. Der jeweilige *INO1*-Expressionsgrad kann so anhand der gemessenen  $\beta$ -Galactosidaseaktivität abgeschätzt werden.



**Abb. 11: Die *INO1*-Expression ist verändert in *pmr1*-Mutanten**

Verschiedene *INO1-lacZ*-Reporterkonstrukte wurden in  $\Delta pmr1$ - (hellgrau) bzw. den korrespondierenden Wildtyp- Stämmen (dunkelgrau) mit dem genetischen Hintergrund W303 (YR1234; YR401) (linkes Schaubild) oder S288C (YR122; YR98) (rechtes Schaubild) transformiert. In der Abbildung ist die spezifische  $\beta$ -Galactosidaseaktivität (siehe Material u. Methoden) der Stämme zu sehen. Die Werte wurden aus fünf unabhängigen Messreihen ermittelt. (A) zeigt das *INO1/lacZ*-Reporterkonstrukt mit dem natürlichen *INO1*-Promotor ( $2\mu NO1/LacZ/URA3$ ) (BR731) , (B) den *INO1/lacZ*-Reporter mit dem synthetischen *ICRE-CYC1* Minimalpromotor ( $2\mu ICRE-LacZ URA3$ ) (BR732) , (C) den ins Genom integrierten Reporter (*ICRE-CYC1-LacZ*) (BR733) und (D) ein vollständiges, unmarkiertes *INO1*-Gen als Kontrollplasmid (*ARS CEN URA3 INO1*) (BR734).

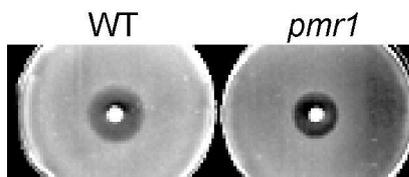
Im W303 Hintergrund hat die  $\Delta pmr1$ -Mutation eine Halbierung des *INO1-lacZ*-Expressionsniveaus zur Folge, was insbesondere unter dem natürlichen *INO1*-Promotor und dem synthetischen *ICRE-CYC1*- Minimalpromotor zu sehen ist (Abb. 11). Der S288C-Hintergrund zeigt ein anderes *INO1*-Expressionsverhalten. Die  $\Delta pmr1$ -Mutation wirkt sich hier um dreifach erhöhend auf das *INO1-lacZ* Niveau aus, wenn der *INO1-lacZ*-Reporter unter dem synthetischen Minimalpromotor exprimiert wird. Möglicherweise deutet dies auf

eine tatsächliche Erhöhung der *INO1*-Expression in diesem Stamm hin, allerdings ist das *INO1-lacZ*-Niveau in den beiden anderen Fällen sehr niedrig.

#### 4.1.9 Myriocinresistenz von *Δpmr1*-Zellen

*myo*-Inositol ist nicht nur als Phospholipid-Precursor für Phosphatidylinositol relevant. Inositol ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil der Expressionsregulation von Enzymen der Phospho- und Glykolipidbiosynthese. Die Genexpression der Enzyme zur Synthese des häufigsten Membranphospholipids Phosphatidylcholin wird zum Beispiel von Inositol reguliert (Carman and Henry 1989) (White et al. 1991) (Nikoloff and Henry 1991) (McMaster and Bell 1994) (Morash et al. 1994). Mit dem spezifischen Inhibitor der Palmitoyltransferase Myriocin (ISP- 1) kann die Neusynthese der Glykolipide Galactosyl- und Glukosyl-Ceramiden blockiert werden.

Ein verändertes Inositol-Niveau in *Δpmr1*-Zellen müsste sich auch auf den Ceramid-Haushalt der Zellen auswirken. Dazu wurde die Toxizität von Myriocin (ISP-1) auf exponentiell wachsende Zellen geprüft.



**Abb. 12: Myriocinresistenz von *Δpmr1*-Mutanten**

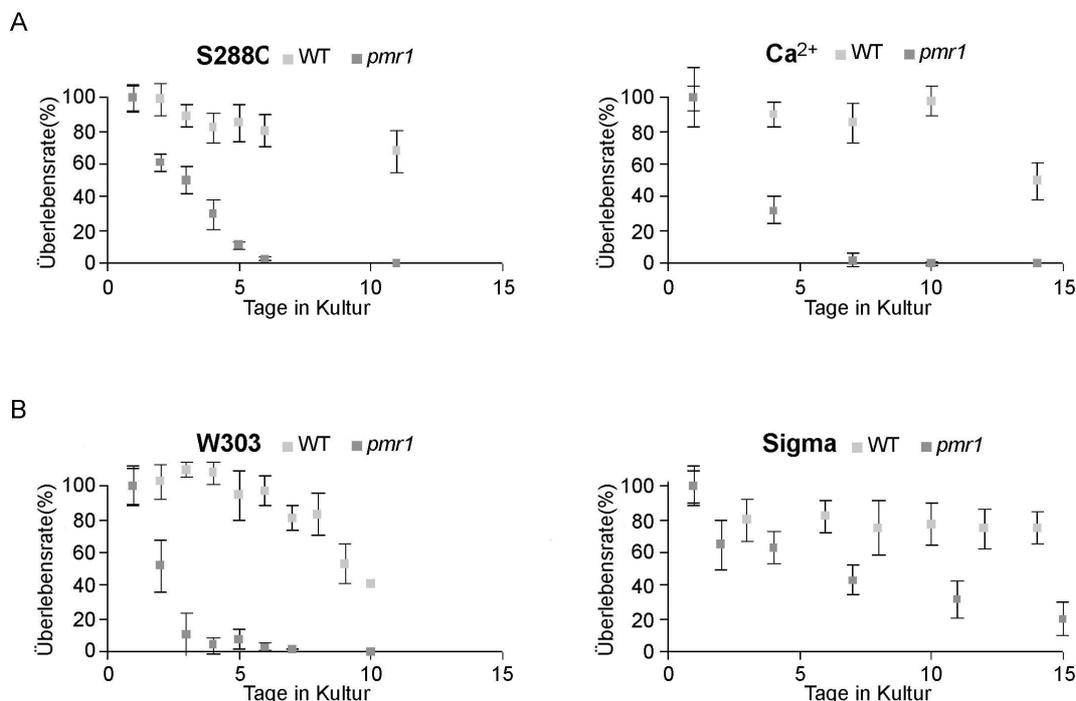
Zellen in exponentieller Wachstumsphase ( $OD_{600nm}$  0,5) wurden in YPD-Agar eingebettet. Dann wurde ein Filterpapier aufgelegt und mit 20 $\mu$ l Myriocinlösung betropft. Nach Wachstum über Nacht bei 30°C wurden die unterschiedlichen Halos sichtbar. Auf der linken Platte ist der WT-Stamm (YR98), auf der rechten Platte der *Δpmr1*-Stamm (YR122) zu sehen.

Wie Abb. 12 zeigt, wirkt Myriocin (ISP-1) in *Δpmr1*-Mutanten weniger toxisch, was für eine Anreicherung von Ceramiden in *pmr1*-Zellen sprechen könnte. Akkumulation von Ceramiden ist z.B. auch bekannt als Begleiterscheinung von apoptotisch sterbenden Zellen (Le Stunff et al. 2002).

## 4.2 Programmierter Zelltod bei $\Delta pmr1$ und Mutanten des sekretorischen Weges

### 4.2.1 Reduzierte Überlebensfähigkeit bei stationären $\Delta pmr1$ - Zellen

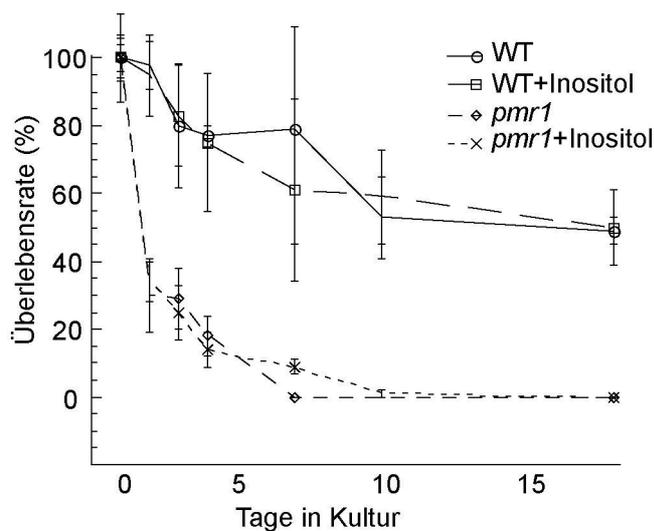
Die Funktion von Pmr1p ist nicht essentiell. Allerdings sterben  $\Delta pmr1$ -Mutanten in minimalem Wachstumsmedium nach dem Erreichen der stationären Wachstumsphase schneller ab als der Wildtyp. Dieses Absterben findet auch in normalem Vollmedium (YPD) statt und ist für verschiedene Stammhintergründe in Abb. 13 gezeigt. In Minimalmedium verstärkt Zugabe von millimolaren Mengen an  $Ca^{2+}$ -Ionen das Ausmaß dieses Phänotyps (Antebi and Fink 1992). In YPD-Medium tritt dieser Effekt nicht auf (Abb. 13A rechts).



**Abb. 13: Das Absterben stationärer  $\Delta pmr1$ -Kulturen**

Aus stationären  $\Delta pmr1$ - bzw. WT-Kulturen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten je 500 Zellen entnommen und zur Bestimmung der Überlebensrate auf YPD-Platten ausplattiert. Im oberen Teil der Abbildung sind die aus fünf unabhängigen Ansätzen ermittelten Überlebensraten des  $\Delta pmr1$ -Stammes (YR122) (dunkelgrau) und des WT-Stammes (YR98) (hellgrau) mit S288C-Hintergrund in YPD (linke Seite) und in YPD +20mMol  $Ca^{2+}$  (rechte Seite) zu sehen (A). Der untere Teil der Abbildung zeigt die Überlebensraten der  $\Delta pmr1$ - (hellgrau) bzw. WT-Stämme (dunkelgrau) mit den genetischen W303- (YR1234, YR401) und Sigma- (YR1305, YR1335) Hintergründen aus Kulturen gealtert in YPD (B).

Da  $\Delta pmr1$ -Zellen offenbar einen erhöhten Inositol-Bedarf haben, wurde versucht, das Überleben der Zellen durch Inositol im Wachstumsmedium zu steigern (Abb. 14).



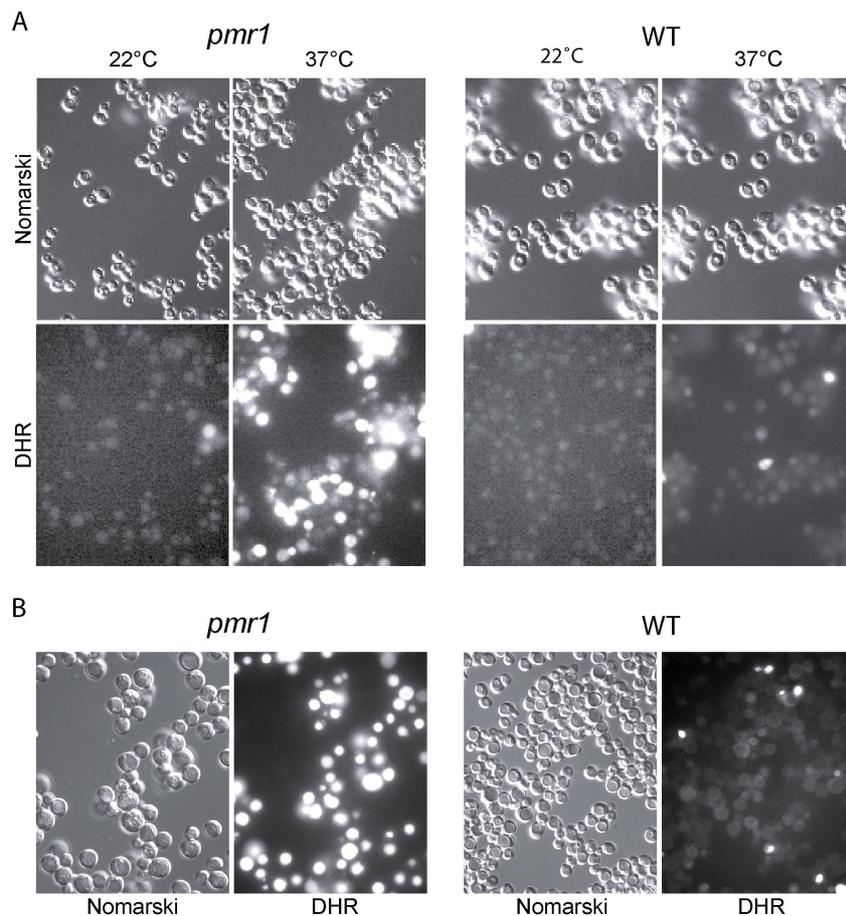
**Abb. 14: Inositol verhindert das Absterben von alternden  $\Delta pmr1$ -Zellen nicht**

Aus stationären Kulturen ( $OD_{600nm}$  3.0) in YPD bzw. in YPD +20mM Inositol wurden zu verschiedenen Zeitpunkten je 500 Zellen entnommen und auf YPD ausplattiert. Auf den Ausplattierungen wurde nach 3 Tagen Inkubation bei 30°C die Anzahl der überlebenden Kolonien ermittelt. Gezeigt sind die Überlebensraten des WT-Stammes (YR98) in YPD (runde Symbole) und in YPD +20mM Inositol (quadratische Symbole) neben dem  $\Delta pmr1$ -Stamm (YR122) in YPD (Rauten) und in YPD +20mM Inositol (X). Die Überlebensraten wurden als arithmetisches Mittel dreier voneinander unabhängigen Messreihen berechnet.

Die Überlebensrate von  $\Delta pmr1$ -Mutanten wurde durch die Zugabe von Inositol in das Vollmedium nicht beeinflusst. Die beobachtete Verringerung der Überlebensrate wirft aber die interessante Frage auf, ob stationäre  $\Delta pmr1$ -Zellen gezielt durch einen genetisch programmierten Zelltod absterben.

#### 4.2.2 Akkumulation von Sauerstoffradikalen in $\Delta pmr1$ -Zellen

Einer der Schlüsselmechanismen zur Auslösung eines programmierten Zelltods ist die Produktion von Sauerstoffradikalen – „Reactive oxygen species (ROS)“ (Kluck et al. 2000) (Skulachev 1996).  $pmr1$ -Zellen wurden deshalb auf die Produktion von ROS untersucht. Dafür wurden stationäre  $pmr1$ -Zellen mit Dihydrorhodamin-123, einem farblosen, zelldurchgängigen Farbstoff behandelt. Dieser Farbstoff wird beim Kontakt mit ROS zu dem eigentlichen Fluoreszenzfarbstoff oxidiert und wird im Fluoreszenzmikroskop anhand seiner roten Farbe sichtbar (Possel et al. 1997).



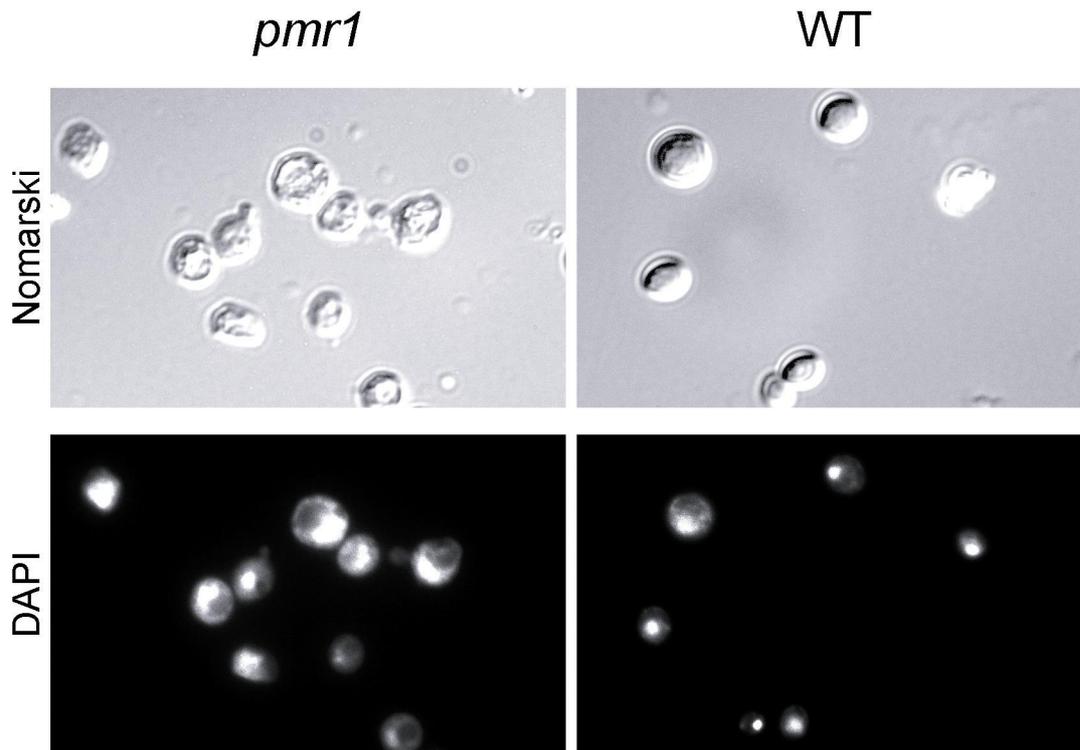
**Abb. 15: ROS-Akkumulation in  $\Delta pmr1$**

Für die Dihydrorhodamin 123-Färbung wurden Einzelkolonien in YPD bis zu einer  $OD_{600nm}$  0,8 bei 22 °C inkubiert. Dann wurden die Zell-Suspensionen in zwei Ansätze getrennt. Ein Ansatz wurde weiterhin bei 22 °C inkubiert, der andere Ansatz 30 min bei 37 °C geschüttelt. Aus den Flüssigkulturen wurde je 1 ml entnommen, mit 2  $\mu$ l Dihydrorhodamin 123-Lösung versetzt und weiter 2 h bei 37 °C bzw. bei 22 °C geschüttelt. Die Zellen wurden in PBS-Puffer gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Abbildung zeigt die konditionelle *ts pmr1*-Mutante (YR501) (linke Seite) und den WT-Stamm (YR506) (rechte Seite) unter (A). Im Teil (B) der Abbildung sind stationäre Kulturen ( $OD_{600nm}$  2.0) des  $\Delta pmr1$ -Stammes (YR122) (linke Seite) und des WT-Stammes (YR98) (rechte Seite) gezeigt. Die Kulturen wurden in YPD bei 30 °C gewachsen. 1 ml Kultur wurden mit 2  $\mu$ l Dihydrorhodamin123-Lösung angefärbt und nach 2 h anfärben mit PBS gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Die  $\Delta pmr1$ -Mutanten zeigen nach dem Erreichen der stationären Phase die Bildung von ROS (Abb. 15). Dies ist ein erster, wichtiger Hinweis auf einen aktiven Prozess als Ursache für das beobachtete Absterben. Nach Erreichen der restriktiven Temperatur (37 °C) zeigt auch eine temperatursensitive *pmr1*-Mutante sehr rasch ROS-Bildung. Dies stützt die Hypothese, dass mit dem Funktionsverlust von Pmr1p ein aktiver Prozess in Gang kommt, der erst zu ROS-Bildung und schließlich zum Zelltod führt.

#### 4.2.3 Chromatinkondensation und DNA-Degradation in $\Delta pmr1$ -Zellen

Weitere typische Merkmale eines programmierten Zelltods sind die Fragmentierung der DNA und die Kondensation des Chromatins am Kernrand. Diese Veränderungen der Zellkerne lassen sich auch in Hefe-Zellen verfolgen (Madeo et al. 1997). Diaminophenylindol (DAPI) ist ein blau fluoreszierender, in die DNA interkalierender Farbstoff, mit dem die Chromatinkondensation nachgewiesen werden kann.



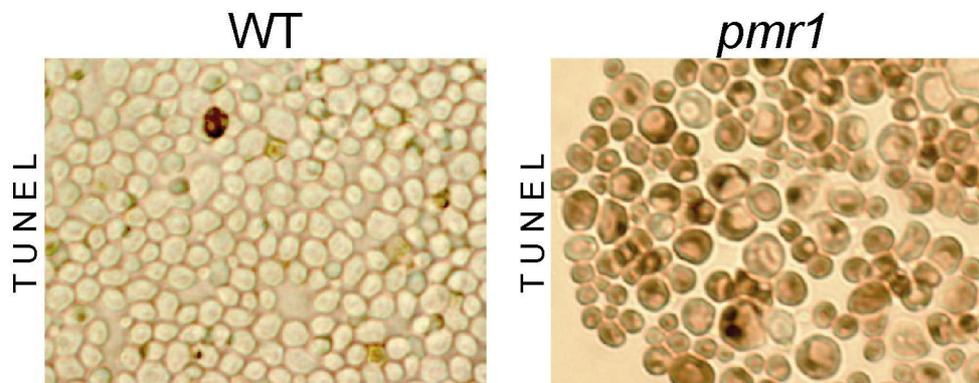
**Abb. 16: Abnormale Zellkerne in stationären  $\Delta pmr1$ - Zellen**

Einen Tag nach Erreichen der stationären Phase wurden Zellen mit Formaldehyd fixiert und die Kerne der Zellen mit DAPI angefärbt. Mit dem Fluoreszenzmikroskop kann zwischen runder und mondformiger, fragmentierter DNA-Anordnung unterschieden werden. Die Abbildung zeigt die Kerne des  $\Delta pmr1$ -Stammes (YR122) (links) und die Kerne des WT-Stammes (YR98) (rechts)

Chromatin von stationären  $\Delta pmr1$ -Zellen ordnet sich halbmondförmig oder langgestreckt entlang der Kernmembran an (Abb. 16). Bei fortgeschrittener Kernkondensation liegen die Kerne in fragmentiertem Zustand vor.

DNA-Fragmentation lässt sich recht einfach mit Hilfe eines für Hefe modifizierten TUNEL-Tests („terminal deoxynucleodidyl transferase mediated dUTP nick end labeling“) (Madeo et al. 1999) (Ludovico et al. 2001) nachweisen. DNA-Strangbruch führt zu freien 3'OH-Gruppen. Diese freien OH-Gruppen können unter Verwendung einer terminalen

Deoxynucleotidyltransferase mit markierten Nukleotiden verknüpft und so sichtbar gemacht werden.



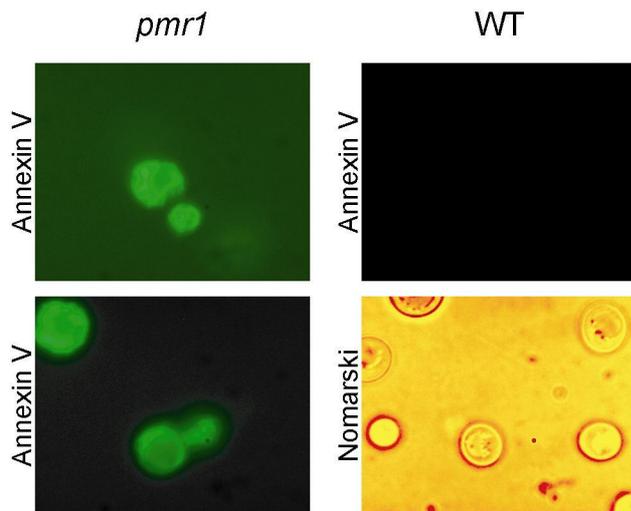
**Abb. 17: DNA-Strangbruch in  $\Delta pmr1$ -Kernen**

Einen Tag nach Erreichen der stationären Phase in YPD- Medium wurden die Zellen fixiert und der TUNEL-Test durchgeführt. Die Abbildung zeigt den WT-Stamm (YR98) (links) und den  $\Delta pmr1$ -Stamm (YR122) (rechts).

Wie Abb. 17 zeigt, treten in stationären  $\Delta pmr1$ -Zellen massive, irreversible Schädigungen auf, die tatsächlich auf einen genetisch programmierten Zelltod hinweisen. Die experimentellen Befunde weisen eine große Ähnlichkeit zur Caspase-induzierten Apoptose von Hefezellen auf (Madeo et al. 1997).

#### 4.2.4 Phosphatidylserin-Externalisierung an der Plasmamembran von $\Delta pmr1$ -Zellen

Beim apoptotischen Zelltod von Hefezellen können neben den Schädigungen im Zellkern auch Veränderungen an der Plasmamembran nachgewiesen werden (Madeo et al. 1997). Hier kommt es bereits in einem sehr frühen Stadium der Apoptose zur Aufhebung der Plasmamembranasymmetrie von Phosphatidylserin, das in lebenden Zellen vorwiegend in der zytosolischen Schicht der Plasmamembran zu finden ist. Im Verlauf der Apoptose wird Phosphatidylserin externalisiert. Dieser Prozess kann durch selektive Bindung von externalisiertem Phosphatidylserin an FITC-markiertes Annexin V sichtbar gemacht werden. Um dabei mechanisch beschädigte, aufgeborstene Zellen von aktiv sterbenden, aber noch intakten Zellen unterscheiden zu können wird neben FITC-Annexin noch zusätzlich mit Propidiumiodid angefärbt (Madeo et al. 1997).

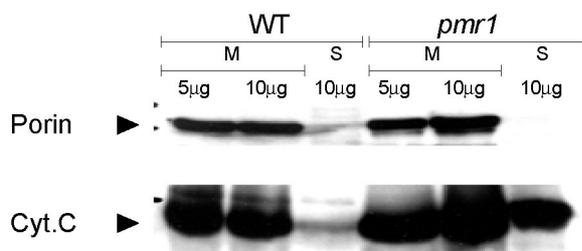


**Abb. 18: Phosphatidylserin-Externalisierung der  $\Delta pmr1$ -Plasmamembran**

Durch Annexin V-Färbung wurde an  $\Delta pmr1$ -Zellen (YR122) (rechte Seite) und WT-Zellen (YR98) (linke Seite) nach einem Tag in stationärer Phase (YPD) die Aufhebung der PM-Asymmetrie überprüft. Mit einer zusätzlichen Propidiumiodid-Färbung wurde sichergestellt, dass die Anfärbung der Zellen nicht durch mechanische Zellwand-Defekte zustande kam.

Offensichtlich weist die Plasmamembran stationärer  $\Delta pmr1$ -Zellen an ihrer Außenseite Phosphatidylserin (Abb. 18) auf und zeigt die für Apoptose typische Blasenbildung (Abb. 18 oben links) der PM.

#### 4.2.5 Cytochrom C-Freisetzung aus dem Mitochondrium in $\Delta pmr1$ -Mutanten



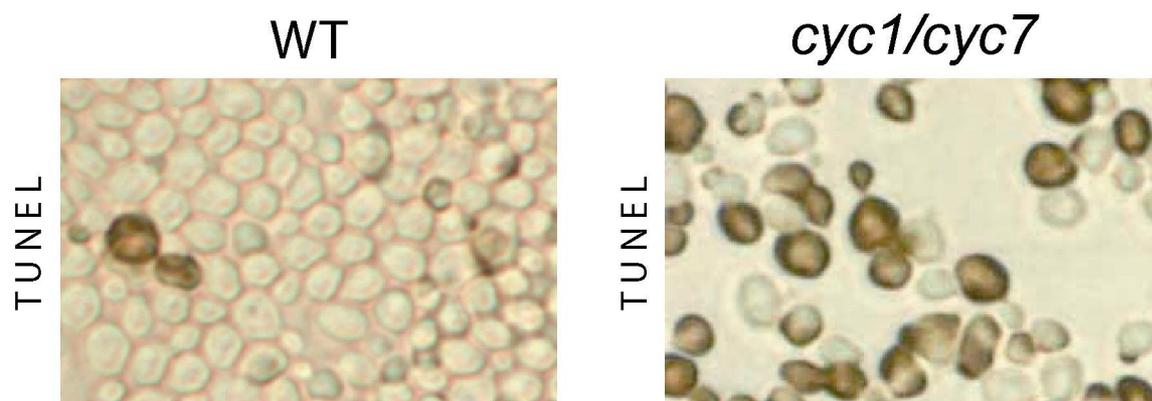
**Abb. 19: Cytochrom C -Freisetzung in  $\Delta pmr1$ -Mutanten**

Stationäre Zellen in YPD wurden bei einer  $OD_{600}$  von 2.0 geerntet, spheroplastiert und mit einem Glas-Glas-Homogenisierer aufgeschlossen. Die Mitochondrien wurden durch mehrere Zentrifugationsschritte isoliert. Die mitochondriale Fraktion (M) und der Überstand (S) wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot auf Cytochrom C beziehungsweise auf Porin, ein Transmembranprotein der äußeren Mitochondrienmembran, untersucht. Die Abbildung zeigt den WT-Stamm (YR98) (Spalte 1-3) und der  $\Delta pmr1$ -Stamm (YR122) (Spalte 4-6).

Durch die Isolation von Mitochondrien (Tzagoloff et al. 1975) und Western-Blot-Analyse wurde die subzelluläre Verteilung von Cytochrom C in  $\Delta pmr1$ -Zellen untersucht (Abb. 19). In stationären  $\Delta pmr1$ -Zellen wird ganz offensichtlich Cytochrom C durch einen spezifischen Prozess aus dem Mitochondrium freigesetzt, Porin verbleibt als integrales Membranprotein im Pellet der Membranfraktion.

#### 4.2.6 $\Delta cyc1/\Delta cyc7$ -Mutanten im S288C-Hintergrund zeigen starke DNA-Fragmentierung

Um die Bedeutung der Cytochrom C-Freisetzung für den Ablauf des programmierten Zelltods in  $\Delta pmr1$ -Zellen zu untersuchen, sollten  $\Delta cyc1\Delta cyc7/\Delta pmr1$ -Tripelmutanten herangezogen werden, die kein Cytochrom C mehr herstellen können. In verschiedenen Szenarien zur Induktion von Apoptose bei Hefezellen (Alpha-Faktor, Stress durch schwache Säuren etc.) hatte dieses Ausschalten der Cytochrom C-Synthese das Überleben der Zellen zum Teil erheblich verbessert.



**Abb. 20: DNA- Fragmentierung bei  $\Delta cyc7/\Delta cyc1$ -Mutanten**

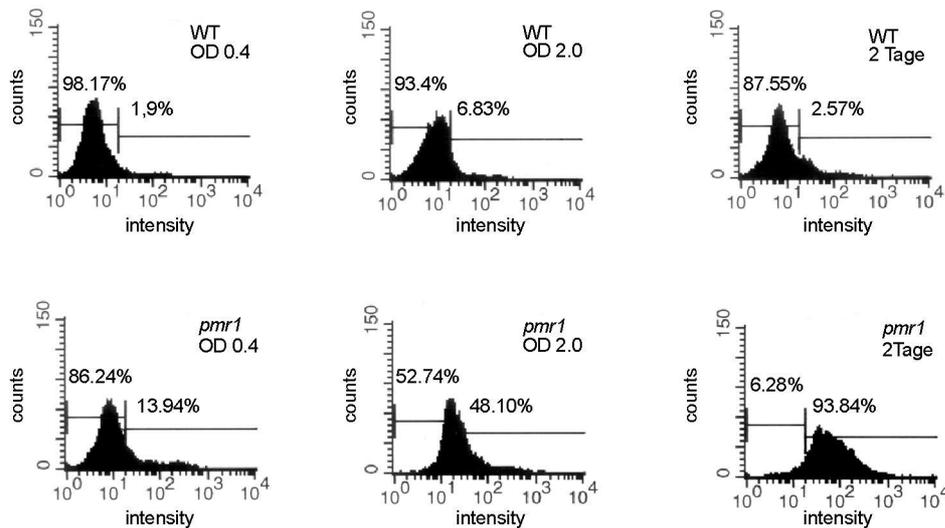
In Hefezellen mit dem genetischen S288C-Hintergrund wurden durch Transformation PCR-generierte  $cyc1::URA3$  und  $cyc7::HIS3$ -Allele eingeführt. Die Abbildung zeigt eine TUNEL-Färbung der erhaltenen  $\Delta cyc7/\Delta cyc1$ -Doppelmutante (YE12).

Wie (Abb. 20) zeigt, weist im S288C-Hintergrund bereits die  $\Delta cyc1/\Delta cyc7$ -Doppelmutante starke DNA-Fragmentierung auf, so dass die Analyse der Lebensfähigkeit einer  $\Delta cyc1/\Delta cyc7/\Delta pmr1$ -Mutante in diesem Stammhintergrund nicht sinnvoll erscheint.

#### 4.2.7 Caspase-Aktivierung in $\Delta pmr1$ -Mutanten

Caspasen bilden das Herzstück des apoptotischen Programms. Initiator-Caspasen, aktiviert durch apoptotische Signale, reifen inaktive Precursor zu Effektor-Caspasen, die wiederum

eine Reihe von Zielproteinen spalten. Die Aktivierung bestimmter Caspasen kann durch die hochspezifische Bindung des fluoreszenzmarkierten Caspase-Inhibitors FITC-VAD-fmk (CaspACE, Promega) an die aktiven Zentren dieser Caspasen durchflusszytometrisch verfolgt werden.



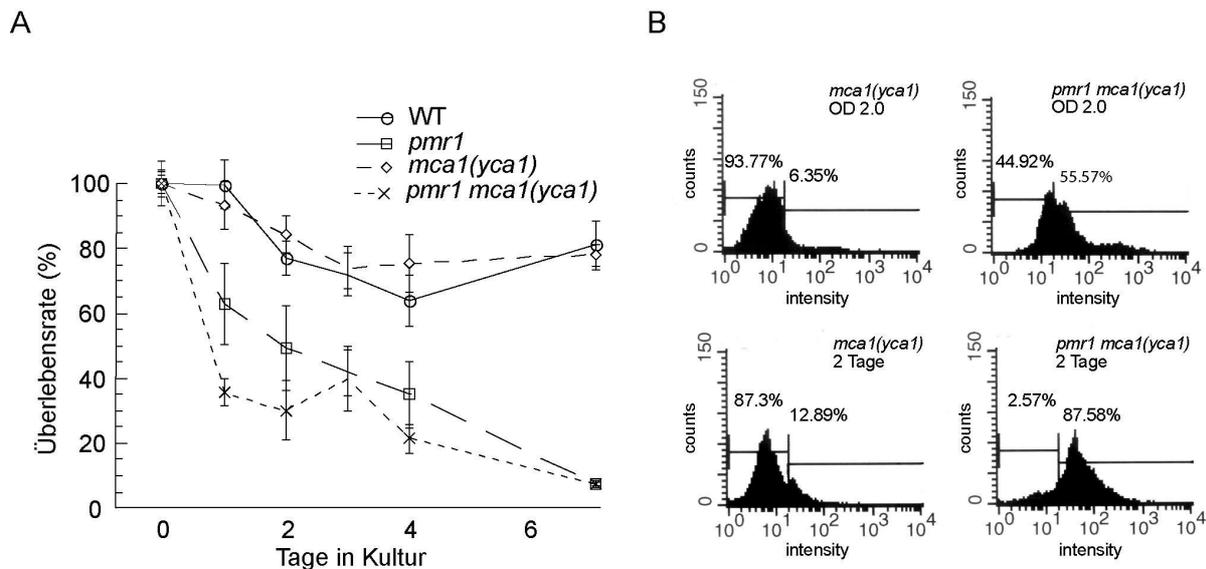
**Abb. 21: Caspase-Aktivierung in stationären  $\Delta pmr1$ -Zellen**

Zellen wurden in verschiedenen Wachstumsphasen {exponentiell,  $OD_{600} = 0.4$  (links); frühstationär,  $OD_{600} = 2.0$  (mittig); stationär, 2 Tage alt (rechts)} geerntet, mit FITC-VAD-fmk behandelt und im FACS auf den Anteil an aktivierten Caspasen-Zentren untersucht. Die obere Reihe zeigt die FITC-Fluoreszenz von WT-Zellen des Stammes (YR98), die untere Reihe die der  $\Delta pmr1$ -Zellen des Stammes (YR122).

In diesen Untersuchungen zeigt sich bei der  $\Delta pmr1$ -Mutante mit zunehmender Verweildauer in der stationären Phase eine deutliche Akkumulation von FITC-VAD-fmk (Abb. 21). Nach 2 Tagen in stationärer Phase sind praktisch alle (93%)  $pmr1$ -Zellen mit dem Caspase-Inhibitor angefärbt.

#### 4.2.8 Auch nach dem Ausschalten von $MCA1(YCA1)$ zeigen $\Delta pmr1$ -Zellen weiterhin FITC-VAD-fmk-Bindung

*YCA1* („Yeast Caspase“), auch *MCA1* („Metacaspase“) genannt, kodiert für eine Initiator-Caspase in Hefe (Madeo et al. 2002). In einer  $\Delta mca1(yca1)$ -Deletionsmutante kann eine z.B. durch  $H_2O_2$  oder durch Alterung induzierte Apoptose nicht stattfinden (Madeo et al. 2002). Wäre *MCA1(YCA1)* auch am  $\Delta pmr1$ -Zelltod beteiligt, sollte mit dem Einführen einer  $\Delta 1(yca1)$ -Deletion die Caspase-Aktivierung in  $\Delta pmr1$ -Zellen unterdrückt werden.



**Abb. 22: Caspasenaktivität in stationären  $\Delta mca1(yca1)/\Delta pmr1$ -Zellen**

Die Kulturen von Einzelkolonien wurden in YPD-Medium bis zur stationären Wachstumsphase  $OD_{600}$  3.0 inkubiert. Ab dem Eintritt in die stationäre Phase wurden jeweils 500 Zellen an verschiedenen Zeitpunkten aus den Kulturen entnommen und auf YPD ausplattiert. Durch das Auszählen der anwachsenden Kolonien aus 3 unabhängigen Messreihen konnte die Überlebensrate ermittelt werden. In Teil (A) der Abbildung sind die Überlebensraten des WT-Stammes (YR98) (runde Symbole), der  $\Delta mca1(yca1)$ -Mutante (YE37) (Rauten), des  $\Delta pmr1$ -Stammes (YR122) (Quadrate) und der  $\Delta pmr1/\Delta mca1(yca1)$ -Doppelmutanten (X) (YE41) zu sehen. Das Ausmaß der Caspasenaktivierung wurde mittels FITC-VAD-fmk-Färbung und FACS-Auswertung bestimmt (B). Die beiden Diagramme links zeigen den  $\Delta mca1(yca1)$ -Stamm, rechts ist der  $\Delta pmr1/\Delta mca1(yca1)$ -Stamm zu sehen.

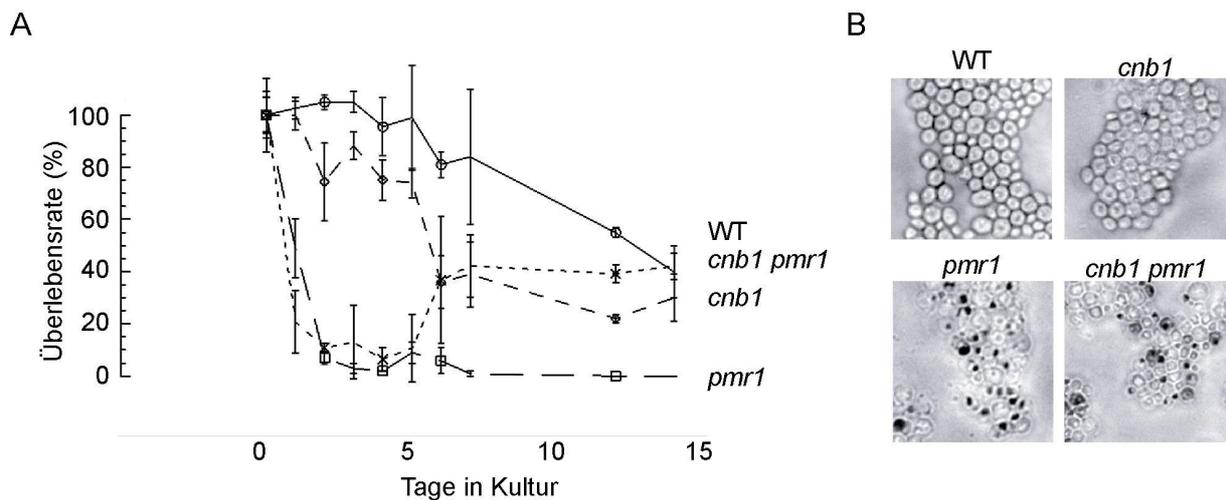
Wie aus Abb. 22B hervorgeht, ist aber in der  $\Delta pmr1/\Delta mca1(yca1)$ -Doppelmutante trotz der Einführung der  $\Delta mca1(yca1)$ -Mutation in praktisch allen Zellen (87%) weiterhin eine Caspase-Aktivierung/FITC-VAD-fmk-Bindung sichtbar. Die  $\Delta pmr1/mca1(yca1)$ -Doppelmutante zeigt auch in stationärer Phase die für die *pmr1*-Einfachmutante typische reduzierte Überlebensrate. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die in  $\Delta pmr1$ -Zellen zu beobachtende Caspase Aktivierung/FITC-VAD-fmk-Bindung nicht auf eine Aktivierung von *MCA1(YCA1)* zurückzuführen ist und diese Caspase auch nicht am programmierten Zelltod in stationären  $\Delta pmr1$ -Zellen beteiligt ist.

#### 4.2.9 Inaktivierung von Calcineurin durch eine $\Delta cnb1$ -Mutation kann den programmierten

##### Zelltod von $\Delta pmr1$ -Zellen nicht verhindern

Aufgrund der deutlich erhöhten  $Ca^{2+}$ -Konzentration im Zytosol von  $\Delta pmr1$ -Mutanten (Halachmi and Eilam 1996), wäre es gut vorstellbar, dass  $Ca^{2+}$ /Calcineurin-vermittelte

Signalwege beim programmierten Zelltod der  $\Delta pmr1$ -Mutante eine Rolle spielen. Diese Möglichkeit wurde durch die Einführung einer *CNBI*-Deletion in  $\Delta pmr1$ -Stämme untersucht. *CNBI* kodiert die regulatorische Untereinheit der  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinphosphatase Calcineurin und ist entscheidend für die Aktivität dieses wichtigen  $Ca^{2+}$ -Signalvermittlers.



**Abb. 23: Programmierter Zelltod von  $pmr1/cnb1$ -Doppelmutanten**

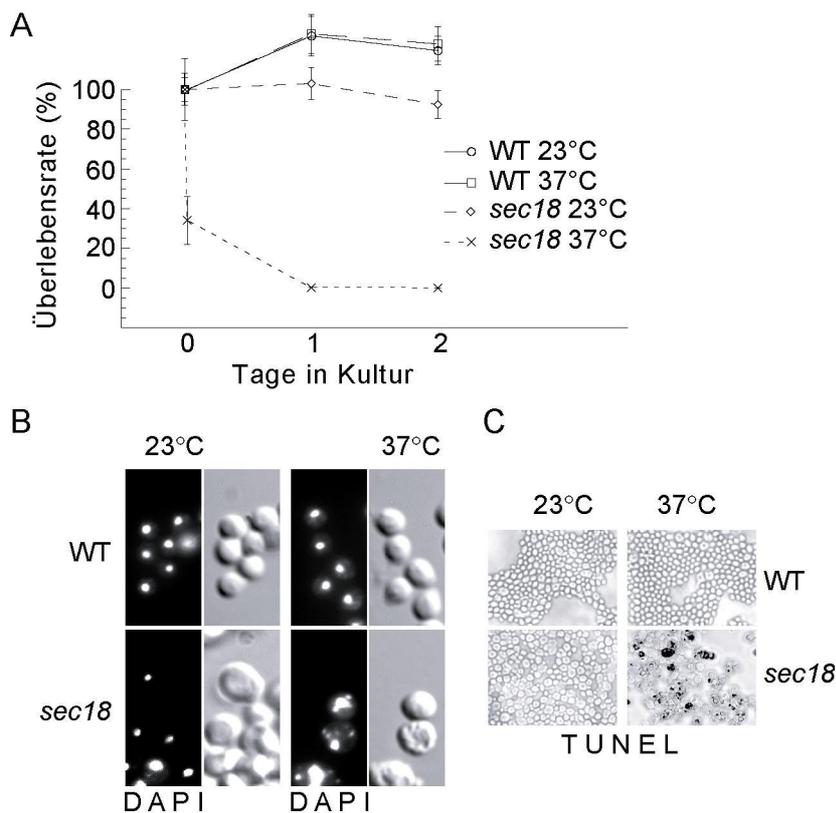
Im Teil A der Abbildung sind die Überlebensraten des WT-Stammes (YR98) (Kreise), des  $\Delta cnb1/\Delta pmr1$ -Stammes (YR435) (X), des  $\Delta cnb1$ -Stammes (YR431) (Rauten) und des  $\Delta pmr1$ -Stammes (YR122) (Quadrate) aus stationär gewachsenen Zellkulturen durch Ausplattieren von je 500 Zellen gezeigt. Die Überlebensrate wurde aus fünf unabhängigen Ansätzen ermittelt. In B sind TUNEL-Tests nach einem Tag stationär in Kultur zu sehen.

Wie die Abb. 23 zeigt, wird durch eine zusätzliche  $\Delta cnb1$ -Mutation die Überlebensrate von stationären  $\Delta pmr1$ -Zellen in den ersten 5 Tagen in Kultur nicht entscheidend beeinflusst. Nach 6-7 Tagen steigt jedoch die Überlebensrate der  $\Delta cnb1/\Delta pmr1$ -Doppelmutante auf ca. 45% an. Dies deutet zumindest darauf hin, dass Calcineurin-vermittelte Signalwege das Absterben von stationären  $\Delta pmr1$ -Zellen nicht unmittelbar beeinflussen.

#### 4.2.10 Anzeichen für programmierten Zelltod bei *sec*-Mutanten mit verschiedenen Defekten im Sekretionsweg

Der Verlust von *PMR1* beeinflusst den sekretorischen Weg nicht durch einen stringenten, klar definierten Block, sondern in vielfältiger Weise: so sind beispielsweise in  $\Delta pmr1$ -Mutanten  $Ca^{2+}$ - bzw.  $Mn^{2+}$ -abhängige Defekte bei der Proteinglykosylierung (Invertase, Chitinase), Sortierung (CpY) und Reifung (Alpha-Faktor) beschrieben worden (Rudolph et al. 1989) (Dürr et al. 1998). Um eine Blockade spezifischer Einzelschritte des sekretorischen Weges als

mögliche Auslöser des programmierten Zelltods genauer betrachten zu können, wurde mit konditionalen, temperatursensitiven *sec*-Mutanten gearbeitet, in denen essentielle Komponenten des Sekretionswegs mutiert sind. Bei permissiven Bedingungen sind diese Mutanten voll funktionstüchtig, zeigen aber bei restriktiven Temperaturen - je nach Funktion des betroffenen *SEC*-Gens - einen charakteristischen Block innerhalb des Sekretionswegs und sind unter diesen Bedingungen nicht lebensfähig. Hier sollte nun untersucht werden, ob in *sec*-Mutanten bei restriktiver Temperatur ein programmierter Zelltod ausgelöst wird.



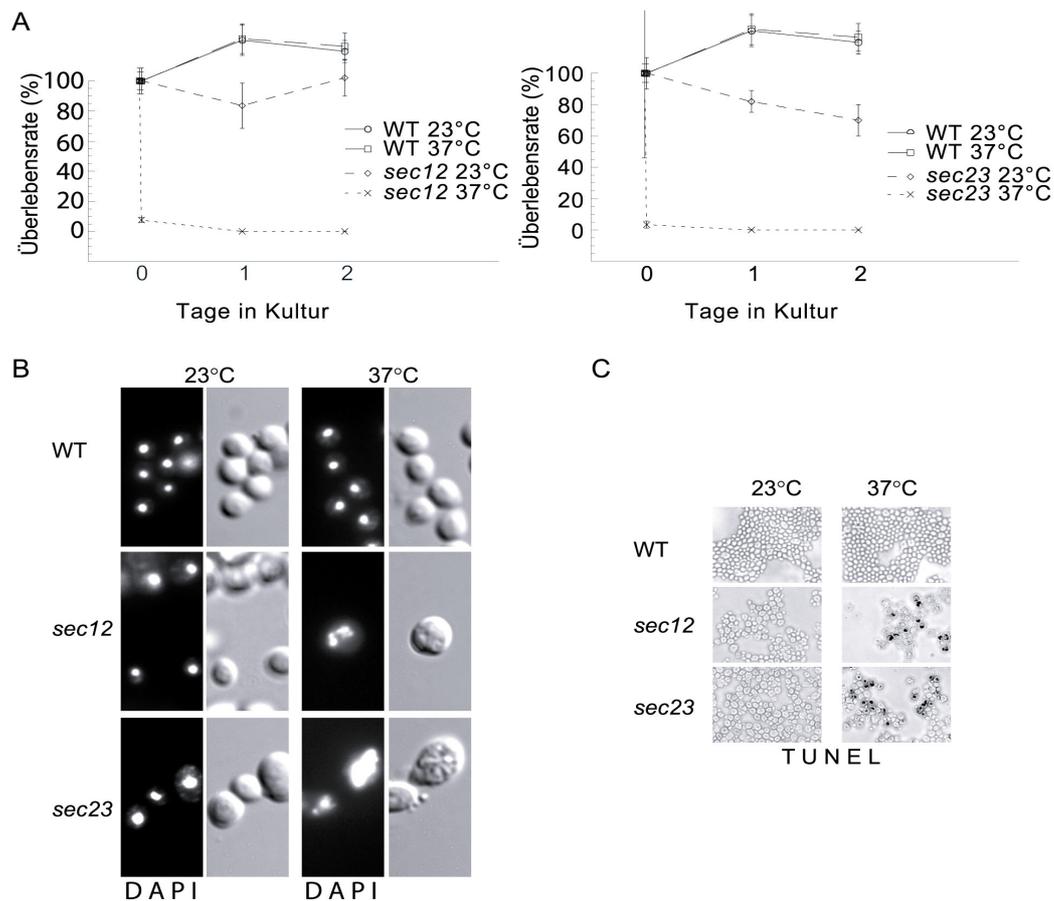
**Abb. 23: Überlebensrate, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung in einer *sec18*-Mutante**

Kulturen der Stämme YR1070 (Wildtyp) und YR1069 ( $\Delta sec18$ ) wurden nach dem Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0.5$ ) in zwei Ansätze aufgetrennt und bei 23 °C bzw. 37 °C geschüttelt. Die Überlebensrate (A) wurde in drei unabhängigen Messreihen durch das Ausplattieren von jeweils 500 Zellen auf YPD-Platten, die dann bei 23 °C inkubiert wurden, bestimmt. Für die DAPI-Kernfärbung (B) und den TUNEL-Test (C) wurden den Ansätzen bei 23°C (links) bzw. 37°C (rechts) nach je einem Tag Proben entnommen.

Als erstes Beispiel wurde hier *SEC18* betrachtet, das ein essentielles 84 kDa Polypeptid kodiert, welches für Membranfusionen benötigt wird. Sec18p ist das Hefehomolog zu dem NSF-Protein („*N-ethylmaleimide sensitive fusion protein*“) in Säugerzellen. Bei restriktiven Bedingungen wird in der *sec18*-Mutante der Proteintransport vom ER zum Golgi und weiter

zur Plasmamembran blockiert, nur der Transport vom späten Golgi zur Vakuole ist nicht beeinträchtigt (Graham and Emr 1991).

Wie Abb. 23 zeigt, findet man in  $\Delta sec18$ -Mutanten bei 37 °C nach 24 h Anzeichen von Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung. Zu diesem Zeitpunkt haben praktisch alle  $\Delta sec18$ -Zellen ihre Lebensfähigkeit verloren.



**Abb. 24: Überlebensrate, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung in  $\Delta sec12$ - und  $\Delta sec23$ -Mutanten**

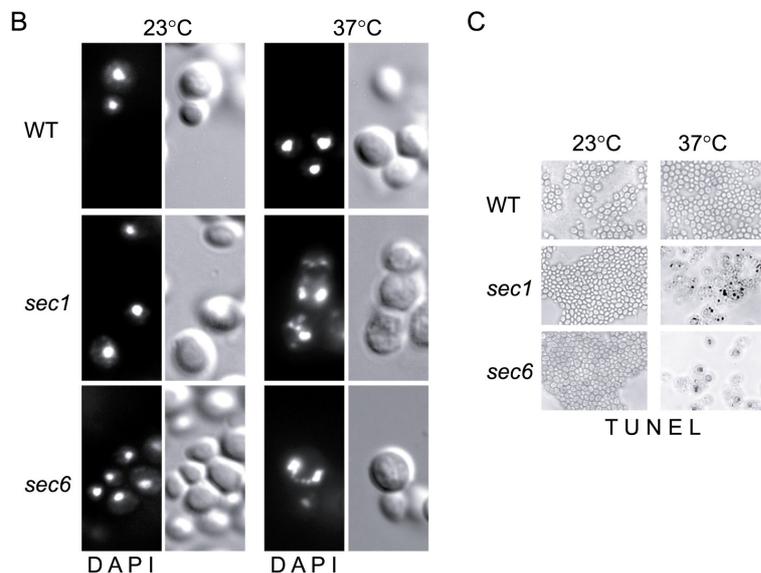
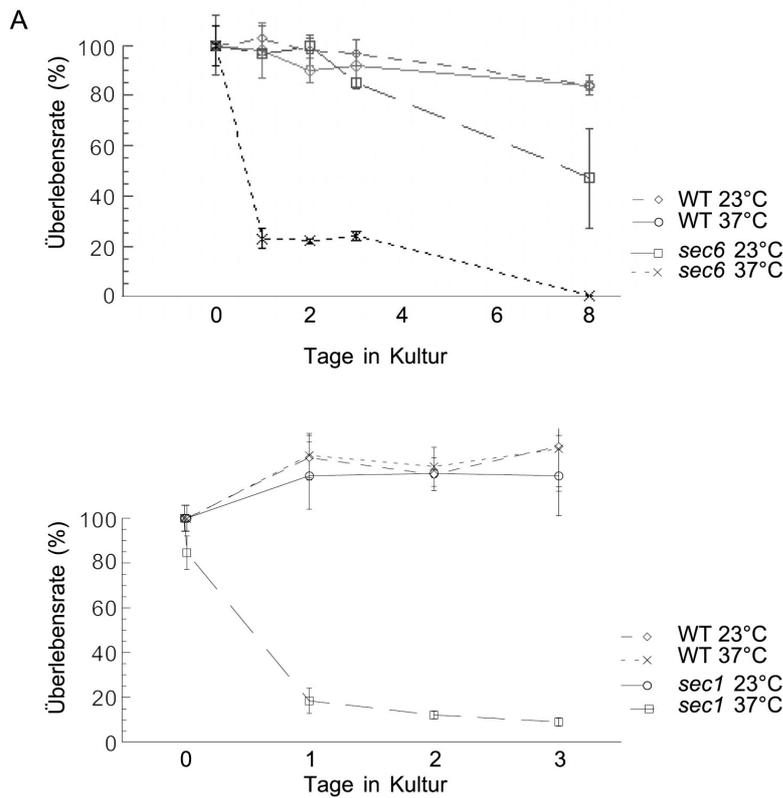
Kulturen der Stämme YR1070 (Wildtyp) und YR1067 ( $\Delta sec23$ ) bzw. YR1068 ( $\Delta sec12$ ) wurden nach dem Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0.5$ ) in jeweils zwei Ansätze aufgetrennt und bei 23 °C bzw. 37 °C geschüttelt. Die Überlebensrate (A) wurde in drei unabhängigen Messreihen durch das Ausplattieren von jeweils 500 Zellen auf YPD-Platten, die anschließend bei 23 °C inkubiert wurden, bestimmt. Für die DAPI-Kernfärbung (B) und den TUNEL-Test (C) wurde den Ansätzen bei 23 °C (links) bzw. 37°C (rechts) nach jeweils einem Tag Proben entnommen.

Als Vertreter der sogenannten „frühen“  $\Delta sec$ -Mutanten mit spezifischen Defekten im ER-Golgi-Transport wurden  $\Delta sec12$ - und  $\Delta sec23$ -Stämme untersucht. In beiden Mutanten wird unter restriktiven Bedingungen die Bildung von Transportvesikeln aus dem ER und damit auch der

ER-Golgi-Transport gestoppt. Wie Abb. 24 zeigt, findet man unter diesen Bedingungen nach 24 h ebenfalls Chromatin-Kondensation und DNA-Fragmentierung.

Als Vertreter der sogenannten „späten“ *sec*-Mutanten mit spezifischen Defekten im Transport von Golgi-Vesikeln zur Plasmamembran wurden  $\Delta sec1$ - und  $\Delta sec6$ -Stämme untersucht. In beiden Mutanten akkumulieren bei restriktiver Temperatur vollständig glykosylierte, sekretorische Proteine in 100 nm Vesikeln, die nicht mehr mit der Plasmamembran fusionieren können.

Wie bei allen anderen *sec*-Mutanten finden sich auch bei den  $\Delta sec1$ - und  $\Delta sec6$ -Zellen Anzeichen von Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung als Anzeichen für einen programmierten Zelltod (Abb. 25). Inwieweit die hier untersuchten *sec*-Mutanten bei 37 °C tatsächlich durch programmierten Zelltod absterben, muss in weiteren Untersuchungen zur ROS-Bildung und Caspase-Aktivierung geklärt werden. Es fällt jedoch auf, dass in den frühen *sec*-Mutanten ( $\Delta sec12$ ,  $\Delta sec23$ ) die Überlebensrate generell sehr schnell durch einen 37 °C-Block erheblich reduziert ist. Dies könnte darauf hinweisen, dass Zellen insbesondere bei Störungen von ER-Funktionen durch programmierten Zelltod absterben.



**Abb. 25: Überlebensrate, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung in *Δsec1*- und *Δsec6*-Mutanten**

Kulturen der Stämme YR1063 (Wildtyp) und YR1056 (*sec1*) bzw. YR990 (WT) und YR993 (*sec6*) wurden nach dem Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0.5$ ) in zwei Ansätze aufgetrennt und bei 23 °C bzw. 37 °C geschüttelt. Die Überlebensrate (A) wurde in drei unabhängigen Messreihen durch das Ausplattieren von jeweils 500 Zellen auf YPD-Platten, die dann bei 23 °C inkubiert wurden, bestimmt. Für die DAPI-Kernfärbung (B) und den TUNEL-Test (C) wurden den Ansätzen bei 23 °C (links) bzw. 37 °C (rechts) nach einem Tag Proben entnommen.

## 5 Diskussion

Die Suche nach „synthetisch-letalen“ genetischen Interaktionen von *PMRI* erfolgte in dieser Arbeit über einen Rot/Weiß-Screen in einem zuvor durch Transposonmutagenese mutagenisierten *ade2 ade3*-Stamm, der zudem ein *ADE3 URA3 PMRI*-Plasmid trug. Dieses Vorgehen ist besonders geeignet, um für eine große Anzahl von scheinbar synthetisch-letalen Mutanten rasch das jeweils zugrunde liegende Gen zu identifizieren, da durch Sequenzierung der flankierenden Bereiche einer Transposoninsertion und Vergleich mit dem bekannten Hefegenom das betroffene Gen einfach und zuverlässig bestimmt werden kann. Synthetisch-letale Mutanten, die durch EMS- oder UV-induzierte Mutagenese gewonnen werden, müssen zur Identifikation der betroffenen Gene erst aufwendig mit einer Genbank komplementiert werden.

Um die im Screen beobachtete synthetische Letalität endgültig zu beurteilen, wurden die gefundenen Gene jeweils mittels *HIS3*-markierter PCR-Konstrukte in einem heterozygoten  $\Delta pmr1/PMRI$ -Diploid deletiert. Nach Sporulation dieser Stämme konnte dann in der Tetradenanalyse auf Segregation einer synthetisch-letalen Mutation geprüft werden. Die Kontrollkreuzung dazu, *PMRI* x  $\Delta pmr1$  im S288C- Hintergrund, enthüllte einen uneinheitlichen Wachstums-Phänotyp der  $\Delta pmr1$ -Sporen auf MV-Medium. Dieses schlechtere Wachstum bestimmter  $\Delta pmr1$ -Mutanten könnte hier auch die synthetische Letalität einiger Gene vorgetäuscht haben. Im Screen wurde mit MV-Medium gearbeitet, um mit 5-FOA auf den Verlust des *ADE3 URA3 PMRI*-Plasmids selektionieren zu können (Alani et al. 1987) (Langle-Rouault and Jacobs 1995). Dennoch konnten genetische Interaktionen mit dem *PMRI*-Gen gefunden und bestätigt werden.

### 5.1 Das Zusammenspiel von *PMRI* und *VANI*

Van1p, Mnn9p und Anp1p bilden eine Gruppe von Membranproteinen, die für charakteristische Golgi-Funktionen bei der Proteinglykosylierung benötigt werden. N-glykosylierte Proteine erreichen den Golgi mit der Core-Struktur  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ , die dort mit bis zu 200 Mannose-Resten weiter modifiziert werden kann. Diese Hypermannosestruktur besteht aus einem langen Gerüst aus  $\alpha$ -1,6-verknüpften Mannoseketten mit  $\alpha$ -1,2-verknüpften Seitenketten, die mit einem  $\alpha$ -1,3-verknüpften Mannoserest enden (Ballou 1974) (Herscovics and Orlean 1993). Diese Mannosestruktur ist spezifisch für sekretorische Proteine wie Invertase und einige Mannoproteine der Zellwand. Es wird vermutet, dass diese Hypermannosereste dazu beitragen, die Integrität der Zellwand zu erhalten. Sie bilden eine

Art Schutzschild gegen Antikörper und Enzyme (Klis 1994) (Cid et al. 1995). Der Mnn9p/Van1p-Komplex verknüpft die Core-Zuckerstruktur mit einem kurzen, leicht  $\alpha$ -1,2-verzweigten  $\alpha$ -1,6-Mannopolymer. Der Mnn9p/Anp1p-Komplex komplettiert anschließend die Mannoseketten zur Hyperstruktur (Jungmann and Munro 1998). Neben spezifischen Mannosyltransferasen wie Van1p werden zur Mannosylierung GDP-Mannose und weitere Co-Faktoren benötigt: die Mannosylierung von Invertase erfordert  $Mn^{2+}$ -Ionen als Kofaktor (Haselbeck and Schekman 1986). Eine mangelnde Versorgung des Golgi-Apparates mit  $Mn^{2+}$ -Ionen wird als Ursache der Glykosylierungsdefekte in  $\Delta pmr1$ -Zellen angesehen: es fehlen die äußeren Mannoseketten von Invertase - ein Defekt, der sich durch Zugabe von  $250\mu M Mn^{2+}$ -Ionen ins Wachstumsmedium zurückdrängen lässt (Dürr et al. 1998). Es ist anzunehmen, dass die gleichzeitige Deletion der Gene *VAN1* und *PMR1* zu einer sehr starken Reduktion der Mannosehyperstruktur von Proteinen führt, da durch die fehlende Pmr1p-Funktion der  $Mn^{2+}$ -Gehalt im Golgi stark erniedrigt ist, womit auch andere Mannosyltransferasen als Van1p durch den allgemeinen Mangel an  $Mn^{2+}$ -Ionen als Co-Faktor in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Zellwandproteine verlieren dadurch ihr Schutzschild und die Stabilität der Zellwand wird dadurch nachhaltig beeinträchtigt. Des Weiteren besitzen  $\Delta van1$ -Mutanten auch ein abnormales Aktinzytoskelett: Sie verlieren die Fähigkeit normal polarisiert zu wachsen und damit ihre Knospen richtig zu platzieren (Singer-Kruger and Ferro-Novick 1997). Dieses Defizit des  $\Delta van1$ -Aktinzytoskeletts wird möglicherweise durch eine zusätzliche *PMR1*-Deletion, die eine stark verminderte Reaktion des Aktinskeletts auf Stressfaktoren zur Folge hat, noch verstärkt.

## 5.2 Der Zusammenhang von *YND1* und *PMR1*

Ynd1p ist ein Homolog der Guanosindiphosphatase Gda1p und wie diese ebenfalls an der Proteinglykosylierung im Golgi beteiligt (Gao et al. 1999). Gda1p ist ein homodimeres Membranprotein (Berninsone et al. 1995) und sichert die Glykosylierung von Proteinen und Sphingolipiden (Abeijon et al. 1993). Es reguliert indirekt die Menge an verfügbarer GDP-Mannose im Golgi durch Hydrolyse von GDP zu GMP. Vrg4, der GDP-Mannose/GMP-Antiporter des Golgi, transportiert zytosolische Mannose nur im Austausch gegen luminales GMP in den Golgi (Berninsone et al. 1994) (Abeijon et al. 1997) (Abeijon et al. 1997). Der vollständige Verlust der Mannosylierungsfähigkeit durch  $\Delta vrg4$ -Mutation führt zum Zelltod (Poster and Dean 1996) (Dean et al. 1997). Hier zeigt sich noch einmal die Wichtigkeit der Mannosylierung im Golgi. Ynd1p ist eine Apyrase mit Aktivität zur Spaltung von ADP/ATP,

GDP/GTP und UDP/UTP. Gegenüber CDP/CTP und Thiaminphosphaten ist die Aktivität vermindert (Gao et al. 1999). Die Hydrolyseaktivität gegenüber GDP wird von bivalenten Kationen ( $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+}$ ) stimuliert (Gao et al. 1999). Ein  $\Delta pmr1 \Delta ynd1$ -Golgi-Apparat hat aufgrund der *pmr1*-Deletion einen Mangel an  $Mn^{2+}$ -Ionen, die den Mannosyltransferasen und GDPasen als Co-Faktoren nicht mehr aktivierend zur Verfügung stehen. Durch die *ynd1*-Deletion fehlt zudem eine Aktivität zur Spaltung von GDP in GMP, so dass im Golgi ein stark erniedrigter GMP-Gehalt und letztlich ein reduzierter Mannose-Transport in den Golgi zu erwarten ist. Dies führt dann zu einer starken Reduktion der Mannoseseitenketten von Proteinen und Lipiden und beeinträchtigt schließlich die Zellwandstabilität erheblich.

### 5.3 Die Zellwand von *Δpmr1*-Mutanten

Die *Δpmr1*-Zellwand ist stark beschädigt. Der Anteil der Zellwandmasse an der Zell-Gesamtmasse ist stark vermindert und besonders der Mannoseanteil der *Δpmr1*-Zellwand ist stark reduziert. Als Sensor für Zellwandschwächung fungieren die Membranproteine der Wsc- und Mid-Familien (Gustin et al. 1998). Die Signalübermittlung zum Erhalt der *Δpmr1*-Zellwand könnte ebenfalls durch mangelnde Mannosylierung beeinflusst sein. Ohne O-Mannosylierung der extrazellulären Domänen des Zellwandsensors Mid2p, verursacht z.B. durch eine *Δpmt2*-Mutation, wird der lytische Defekt von *Δwsc1*-Mutanten stark verschärft (Philip and Levin 2001). Eine *Δpmr1*-Zelle hat N- und O-Mannosylierungsdefekte, die zu einer dementsprechend eingeschränkten Funktion des Zellwandsensors Mid2p führen könnten. Dennoch kann eine *Δpmr1*-Zelle die Aktivität der  $\beta$ -1,3-Glukansynthase über eine erhöhte Expression des *FKS2*-Gens stimulieren. Das Signal der Zellwandsensoren wird erfasst und übertragen durch Rho1p, einem GTP- bindenden Protein mit dem GDP/GTP-Austauschfaktor Rom2p (Schmidt et al. 1997) (Bickle et al. 1998) und durch Tor2p, einer Phosphatidylinositol-4-Kinase. Rho1p moduliert einerseits den Proteinkinase-Weg (Cabib et al. 1998) und stimuliert andererseits  $\beta$ -1,3-Glukansynthase. Dies führt zu einer erhöhten Synthese von Glukanen und Chitin (Kapteyn et al. 1997) (Ram et al. 1998) (Dallies et al. 1998), veränderten Verknüpfungen zwischen Glukanen und Proteinen (Kapteyn et al. 1999) (Kapteyn et al. 1997), verstärkter Expression von Zellwandproteinen (Kapteyn et al. 1999) (Kapteyn et al. 1997) (Ram et al. 1998) und zur Stimulation des Cch1/Mid2  $Ca^{2+}$ -Kanals, der ein Calcineurin-Signal in Gang setzt (Bonilla and Cunningham 2003).

Eine *Δpmr1*-Mutation verursacht auch die Anhebung des zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Spiegels und eine Anhäufung falsch gefalteter Proteine im ER. Dieser permanente ER-Stress in *Δpmr1*-

Zellen kann den UPR-Signalweg zwar kurzfristig (Dürr et al. 1998), aber nicht nachhaltig aktivieren. Die Rettung der Zelle erfolgt über den CCS- Weg („*calcium cell survival*“) (Bonilla and Cunningham 2003), der in einer *Δpmr1*-Zelle mit der Aktivierung von Calcineurin aufgrund des erhöhten zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Spiegels stimuliert wird. Aktivierte Faktoren der MAP-Kinase Kaskade könnten in *Δpmr1*- Mutanten das Calcineurin-Signal, das über den  $Ca^{2+}$ -Kanal Cch1p/Mid1p der PM gestartet wird, verstärken. Eine *Δpmr1*-Zelle könnte die Induktion des *FKS2*-Gens aber auch unabhängig von der MAP-Kinase Kaskade starten. Exogene  $Ca^{2+}$ -Ionen stimulieren die *FKS2*-Expression durch einen Calcineurin-abhängigen Signalweg (Mazur et al. 1995), eine *Δbck1*-Mutante zeigt ebenfalls Akkumulation von *FKS2*-mRNA nach Zugabe von 30 mM  $CaCl_2$  ins Wachstumsmedium. Dies zeigt, dass hohe externe  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen die *FKS2*-Expression unabhängig von der MAP- Kinase Kaskade stimulieren können. Möglicherweise bewirkt die erhöhte zytosolische  $Ca^{2+}$ -Konzentration in einer *Δpmr1*-Mutante neben der Aktivierung des CCS-Signalwegs auch die Stimulation der *FKS2*-Expression, entweder als Teil der CCS-Antwort, oder in einem getrennten Signalweg.

#### **5.4 Aktin in *Δpmr1*-Mutanten**

In knospenden Hefezellen wird das Zytoskelett wie in Säugerzellen durch eine Familie von GTPasen - wie Cdc42p, Rho1p, Rho2p, Rho3p und Rho4p - reguliert (Leberer et al. 1997) (Helliwell et al. 1998b) (Schmidt and Hall 1998) (Tanaka and Takai 1998). Während der G1-Phase des Zellzyklus liegt Aktin in Form von Flecken („*patches*“) zufällig und gleichmäßig über den Zellquerschnitt verteilt vor. Zu Beginn eines Zyklus vermittelt Cdc42p das Erscheinen der Knospe durch die Kontrolle der Aktinflecken-Konzentration an der Knospungsstelle. Rho1p und vermutlich auch sein nicht essentielles Homolog Rho2p werden für das weitere Knospenwachstum gebraucht. Rho1p kontrolliert vier Effektoren, die für die Aktin- und Zellwandorganisation wichtig sind. Es bindet und aktiviert Fks1p ( $\beta$ -1,3-Glukansynthase) (Drgonova et al. 1996) (Qadota et al. 1996), es bindet und aktiviert Pck1p (Nonaka et al. 1995) (Igual et al. 1996) (Kamada et al. 1996) (Helliwell et al. 1998b) (Zhao et al. 1998), es interagiert mit Bni1, einem Mitglied der Formin-Familie, welches über die Bindung von Profilin das Aktinzytoskelett kontrolliert (Evangelista et al. 1997) und es interagiert mit Skn7p, einem Signalprotein eines Zweikomponentensystems (Kohno et al. 1996) (Alberts et al. 1998). Rho3p und Rho4p sind für das weitere Knospenwachstum wichtig. *RHO3*- und *RHO4*-Deletionen führen zu lysierenden Zellen oder einem

Wachstumsarrest mit kleinen Knospen und mit einem fehlerhaft platzierten Aktinskelett. Die Depolarisation des Aktinskeletts ist die Zellantwort auf Umweltstress, der die Zellwand beeinflusst. Sie ist zwingend erforderlich für die Depolarisation der Glukansynthase Fks1p (Delley and Hall 1999), die für die Reparatur der Zellwandschädigungen gebraucht wird. Diese Stress-Antwort wird durch einen allgemeinen Reparatur-Signalweg kontrolliert, der Wsc1p, Rom2p, Rho1p und Pkc1p beinhaltet. Der Pkc1p-aktivierte MAP-Kinase Signalweg ist nicht nötig für die Aktin-Depolarisation. Der MAP-Kinase Signalweg wird erst wieder für die Repolarisation des geschockten Aktinzytoskeletts essentiell (Delley and Hall 1999). Die nichtvorhandene Aktindepolarisation in hitzebehandelten *Δpmr1*-Mutanten zeigt, dass Calciumsignale auch einen Einfluss auf Faktoren haben, die vor der MAP-Kinase Kaskade geschaltet sind. Von Rho1p ist bekannt, dass es von Geranylgeranyl-Transferase Typ I, kodiert im *CALI*-Gen, modifiziert werden muss, um eine Aktivierung von  $\beta$ -1,3-Glukansynthase zu bewirken. Eine eingeschränkte Modifikation von Rho1p, verursacht durch eine Deletion von *CALI*, kann durch erhöhte zytoplasmatische  $Ca^{2+}$ -Konzentration wiederhergestellt werden (Inoue et al. 1999). Möglicherweise hat das veränderte  $Ca^{2+}$ -Niveau in *Δpmr1*-Mutanten einen ähnlichen Einfluss auf Rho1p. Neben der Beeinflussung der  $\beta$ -1,3-Glukansynthase-Aktivität ist auch eine Einwirkung auf das *Δpmr1*-Aktinskelett denkbar, die möglicherweise über eine Veränderung des Bindevermögens von Rho1p gegenüber Bni1 und Profilin stattfindet.

## 5.5 Programmierter Zelltod in *Δpmr1*-Mutanten

*pmr1*-Zellen sterben in der stationären Phase allmählich ab (Fig. 13). Dieser Zelltod zeigt apoptotische Merkmale wie Chromatinkondensation (Fig. 16), Phosphatidylserin-Externalisierung (Fig. 18), ROS-Produktion (Fig. 15), Cytochrom C-Freisetzung ins Zytosol (Fig. 19), scheinbare Caspasenaktivität (Fig. 21) und DNA-Fragmentierung, sichtbar im positiven TUNEL-Test (Fig. 17). Weiterführende Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Rudolph haben jetzt klar gezeigt, dass für dieses Absterben stationärer *Δpmr1*-Zellen ein AIF-Homolog der Hefe, Aif1p (Ynr074cp), verantwortlich ist. Die Caspase Mca1p ist hier nicht beteiligt. Des weiteren konnte als zweiter Auslöser eines programmierten Zelltods in *Δpmr1*-Zellen Hitze-Stress identifiziert werden: Ein bei 37°C auftretendes, sehr rasches Absterben von *Δpmr1*-Zellen innerhalb von 2-3 h verläuft im Gegensatz zum Zelltod in stationären Kulturen völlig unabhängig von *AIF1*. Es erfolgt hierbei eine Aktivierung der Caspase Mca1, die sich interessanterweise aber erst bei Verlust von Aif1p, z.B. in Zellen mit einer *aif1*-

Deletion, entfaltet. Diese Caspase-Aktivierung ist zwingend notwendig für eine hitzeinduzierte Apoptose:  $\Delta aif1 \Delta mca1$ -Doppeldelationen überleben den Hitzestress. Unter Hitzestress übt Aif1p offenbar eine Schutzfunktion gegen Caspasenaktivierung in  $\Delta pmr1$ -Zellen aus, in stationärer Phase sterben  $\Delta pmr1$ -Zellen dagegen einen Aif1-vermittelten Zelltod (Simone Moser, Diplomarbeit 2003; Daniela Eehalt, Studienarbeit 2005).

Humanes AIF bewerkstelligt die Apoptose-induzierte Chromatinkondensation im Zusammenwirken mit Cyclophilin A (Cande et al. 2004), einer Peptidyl-prolyl cis-trans-Isomerase, die sich durch Cyclosporin A hemmen lässt und zudem eine latente Nuklease-Aktivität aufweist (Montague et al. 1997). Der Cyclophilin/Cyclosporin A-Komplex wiederum bindet und inaktiviert Calcineurin und hat so tiefgreifenden Einfluss auf  $Ca^{2+}$ -vermittelte Signalwege. Auch in Hefe steht die apoptotische Funktion des Hefe-Proteins Aif1p in Verbindung mit Cyclophilin A. Wissing *et al.* konnten zeigen, dass eine Disruption des *CPRI*-Gens, dem Hefe-Homolog zum humanen Cyclophilin A-Gen (Dolinski et al. 1997), den durch Aif1p-Überexpression verursachten apoptotischen Zelltod verhindert. Diese Autoren konnten ebenfalls zeigen, dass Cyclosporin A, welches die Peptidyl-prolyl cis-trans-Isomerase Aktivität von CypA inhibiert und letztlich auch Calcineurin inaktiviert, die Überlebensrate von Zellen bei AIF-Überexpression nicht steigert (Wissing et al. 2004). Damit ist klar, dass die Kooperation von Cyclophilin A mit AIF beim Zelltod in Hefe wie in humanen Zellen unabhängig von der Peptidyl-prolyl cis-trans-Isomeraseaktivität ist und offenbar auch nicht über Calcineurin vermittelt wird. Dieser Befund schließt aber keinesfalls aus, dass Calcineurin-vermittelte Signalwege in verschiedenster Weise die Lebensfähigkeit von Zellen beeinflussen.

Wie oben bereits erwähnt, wirkt aktiviertes Calcineurin im CCS-Weg „anti-apoptotisch“, d.h. dem durch ER-Stress verursachten apoptotischen Tod entgegen (Bonilla and Cunningham 2003). Beim Absterben stationärer  $\Delta pmr1$ -Zellen hingegen scheint Calcineurin den Zelltod zu beschleunigen. Wie in (Fig. 23) zu sehen ist, hat die Inaktivierung von Calcineurin durch Deletion des *CNBI*-Gens, das eine  $Ca^{2+}$ -bindende regulatorische Untereinheit von Calcineurin kodiert, zunächst keinen Einfluss auf das Absterben von  $\Delta pmr1$ -Zellen in den ersten 5 Tagen nach dem Erreichen der stationären Phase. Allerdings zeigen  $\Delta cnb1 \Delta pmr1$ -Kulturen nach 6-7 Tagen jedoch einen scheinbaren Anstieg der Überlebensrate auf ca. 45%. Dieser Anstieg kommt wohl durch einen Wachstumsschub noch lebensfähiger Zellen zustande, der durch zunehmend freiwerdende Nährstoffe aus bereits abgestorbenen Zellen ausgelöst werden könnte. Nach dieser Vorstellung würde das Ausschalten von Calcineurin in den  $\Delta pmr1 \Delta cnb1$ -Mutanten entweder das Absterben von Zellen und damit die Freisetzung von

Nährstoffen befördern, oder tatsächlich das Durchhaltevermögen noch lebender Zellen bis zur Verfügbarkeit dieser Nährstoffe verbessern. Wie passen diese beiden Modelle zu dem bekannten Zusammenspiel der beiden  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen Pmr1 (Golgi) und Pmc1 (Vakuole) mit Calcineurin und dem vakuolären  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Antiporter Vcx1 bei der zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase?

In erster Linie fehlt in  $\Delta pmr1$ -Mutanten die Möglichkeit, durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in den Golgi, den Sekretionsweg effektiv zur zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase einzusetzen, wie dies für *PMR1*-Zellen gezeigt wurde (Andrea Zappe, Dissertation 2003). Möglicherweise ist dieser Defekt ursächlich für den Aif1p-vermittelten Zelltod, da er zu einem permanenten „ $\text{Ca}^{2+}$ -Stress“ im Zytosol führen könnte. Normalerweise wird bei einer Erhöhung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration Calcineurin durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin- und  $\text{Ca}^{2+}$ /Cnb1-Komplexen aktiviert. Aktiviertes Calcineurin hemmt über einen posttranslationalen Mechanismus die vakuoläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme via Vcx1 und stimuliert gleichzeitig die Genexpression der  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen Pmr1 und Pmc1. So können Hefezellen offenbar ein rasch ansteigendes und langsam abklingendes zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal erzeugen. Das Ausschalten von Calcineurin verhindert zwar die Genaktivierung von *PMR1* und *PMC1*, beseitigt aber die Hemmung von Vcx1 und stimuliert daher die vakuoläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme drastisch. Zellen mit einem konstitutiven, nicht durch Calcineurin hemmbaren Vcx1-Allel besitzen eine deutlich verbesserte  $\text{Ca}^{2+}$ -Toleranz im Vergleich zu anderen Stämmen (Cunningham and Fink 1996). Auf diesem Hintergrund erscheint es plausibel, dass die ausbleibende Calcineurin-Aktivierung in  $\Delta cnb1 \Delta pmr1$ -Doppelmutanten den latenten zytosolischen „ $\text{Ca}^{2+}$ -Stress“ dieser Zellen abbaut oder gar ganz verhindert, da ein effizienter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in die Vakuole via Vcx1 stattfindet. Damit könnte sich die Lebensfähigkeit dieser Zellen im Vergleich zur  $\Delta pmr1$ -Mutante – ganz unabhängig vom Aif1-induzierten programmierten Zelltod durchaus verbessern. Eine Steigerung der Freisetzung von Nährstoffen bei  $\Delta cnb1 \Delta pmr1$ -Doppelmutanten erscheint somit als Erklärung für den Wachstumsschub eher unwahrscheinlich. Möglicherweise ist in *cnb1 pmr1*-Doppelmutanten auch die erwähnte Kooperation von AIF und Cyclophilin A gestört. Hier wären weitere Untersuchungen an Cyclophilin A-defekten *cpr1 \Delta pmr1*-Mutanten und  $\Delta pmr1 VCX1-D1$ -Zellen, in denen Vcx1 nicht durch Calcineurin hemmbar ist, sicherlich aufschlussreich. Veränderungen in der Zellwand von *pmr1*-Zellen könnten ebenfalls entscheidend am Zelltod beteiligt sein. Generelle Stabilitätsverluste der  $\Delta pmr1$ -Zellwand sind jedoch nicht unmittelbar verantwortlich für das Absterben der  $\Delta pmr1$ -Zellen, da dies auch in Medien mit dem osmotischen Stabilisator Sorbitol stattfindet (Daten der Arbeitsgruppe Rudolph). Aber über

Rho1p wird neben der  $\beta$ -1.3-Glukansynthase auch die MAP-Kinase Kaskade, die Pkc1p und Mpk1p beinhaltet, aktiviert. Diese stimulieren wiederum den Cch1p/Mid1p  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal an der Plasmamembran und bewirken so einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und ein Calcineurin-Signal, welches offenbar Einfluss auf den Zelltod hat.

Durch Deletion der entsprechenden Schlüssel-Gene für den programmierten Zelltod müsste das Absterben der  $\Delta pmr1$ -Zellen in stationärer Phase zurückdrängen lassen. Wie in Fig. 22A zu sehen ist, verbessert das Ausschalten der Caspase Mca1/(Yca1) durch die eingeführte  $\Delta mca1(yca1)$ -Deletion die Überlebensrate der stationären  $\Delta mca1(yca1)/\Delta pmr1$ -Zellen im Vergleich zu  $\Delta pmr1$ -Zellen nicht. Dieser Befund belegt zwar, dass die Caspase Mca1 hier nicht beteiligt ist, schließt aber eine Beteiligung weiterer, eventuell noch unbekannter Caspasen nicht aus. In Fig. 22B wird auch eine scheinbare Caspase-Aktivierung in  $\Delta mca1(yca1)/\Delta pmr1$ -Zellen sichtbar. Neuere Ergebnisse stellen allerdings diese Messungen in Frage. Es konnte gezeigt werden, dass Hefezellen, die nur kurz (5 min) bei 80°C inkubiert wurden, dadurch ihre Zellintegrität verlieren und durch Farbstoffe wie Propidiumiodid – und eben auch durch FITC-konjugierte Caspase-Inhibitoren - gefärbt werden können (Wysocki and Kron 2004). Das Anfärben von lysierten Zellen kann also fälschlicherweise als „Caspase-Aktivierung“ interpretiert werden. Als tatsächlich Caspasen-aktivierte Zellen können nur FITC-positive Zellen gelten, die in Doppelfärbungen mit Propidiumiodid ungefärbt bleiben. Durch solche Doppelfärbungen und deren Auswertung durch FACS-Messungen konnte Daniela Eehalt zeigen, dass in stationären  $\Delta pmr1$ -Kulturen keine echte Caspase-Aktivierung auftritt, d.h. es findet sich keine Zellpopulation, die nur durch FITC-VAD-fmk angefärbt wird. Mit dem Absterben der Zellen treten FITC- und Propidiumiodid-Färbung synchron auf.

## 5.6 Der Zelltod von Sekretionsmutanten

Pmr1p ist eine zentrale Komponente des Sekretorischen Apparates. Eine Deletion des *PMR1*-Gens führt zu vielfältigen Defekten in sekretorischen Funktionen. Für Hefezellen ist ein intakter Sekretionsweg essentiell für das Heranwachsen einer Tochterzelle. Funktionelle Störungen im Sekretionsweg könnten daher schon in engem Zusammenhang mit dem apoptotischen Tod von *pmr1*-Mutanten stehen. Vor diesem Hintergrund war es interessant zu untersuchen, wie gut charakterisierte *sec*-Mutanten auf die Blockade des Sekretionswegs „reagieren“ würden: sterben solche Zellen einfach unspezifisch ab „platzen“, oder findet durch einen programmierten Zelltod ein aktiver Prozess „geordneter Rückzug“ statt. Die bisherigen Messungen an *sec*-Mutanten zeigen erste Anzeichen eines programmierten

Zelltodes. Alle untersuchten *sec*-Mutanten zeigen Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung laut TUNEL-Test (Fig. 23 – 25). Das schnellere Absterben „früher“ *sec*-Mutanten mit Defekten im ER-Golgi-Transport im Vergleich zu „späten“ *sec*-Mutanten mit Problemen an der Plasmamembran ist auffällig. Wenn man davon ausgeht, dass dieses Phänomen nicht durch eine zufällig raschere Inaktivierung der frühen *sec*-Allele bei restriktiver Temperatur zustande kommt, könnte dies bedeuten, dass eine Störung der ER-Funktion und/oder des ER-Golgi-Transports besonders rasch zum programmierten Zelltod führt. ER-Stress aktiviert eine Bandbreite von zellularen Antworten wie UPR, der Ire1 beinhaltet, Zellzyklusarrest bei G2/M Swe1 beinhaltend, MAP-Kinasen Kaskade mit Pkc1 und Mpk1-Beteiligung, Calcineurin-Antwort über den Cch1/Mid1-Kanal, ASR mit Pkc1-Beteiligung an der Gen-Transkription und letztlich einen regulierten Pfad zum Zelltod (Bonilla and Cunningham 2003). Denkbar wäre eine Aktivierung einer bisher unbekanntem ER-spezifischen Caspasen-Kaskade. In Säugerzellen ist eine ER-Stress spezifische Caspasen-Kaskade bekannt, welche die Caspasen -12, -9 und -3 auf Cytochrom C unabhängige Weise beinhaltet (Morishima et al. 2002). Weiterführende Messungen wie ROS-Produktion, Cytochrom C Freisetzung und Caspasenaktivierung sind nötig, um den apoptotischen Charakter des Zelltodes der *sec*-Mutanten zu beweisen. Auch eine zusätzliche *aif1*- oder *mca1*-Deletion zur Klärung der Induktionswege des *sec*-Zelltods wäre interessant. Besonders wichtig wären weitere Messungen zur ROS-Produktion in *sec*-Mutanten, das die ROS-Produktion generell ein sehr frühes Merkmal des programmierten Zelltods in Hefezellen darstellt. So ist z.B. das durch Hitze-Stress induzierte Sterben der *pmr1*-Mutante mit zusätzlicher *aif1*-Deletion von starker ROS-Produktion begleitet. Das Absterben der  $\Delta pmr1 \Delta aif1$ -Zellen lässt sich mit PBN als ROS-Quencher zurückdrängen. Auch die anaerobe Durchführung des Hitzestresses reduziert das Ausmaß des Zelltodes erheblich (Sylvie Soehnen, Diplomarbeit 2005).

Diese Betrachtungen lassen klar erkennen, dass den hier gemachten Beobachtungen zum Zelltod von  $\Delta pmr1$ -Mutanten eine grundlegende und sehr weitreichende Bedeutung zukommt. Hefezellen sind offenbar hervorragend geeignet, um den programmierten Zelltod insgesamt und seine  $Ca^{2+}$ - und/oder  $Mn^{2+}$ -vermittelten Teilprozesse zu untersuchen.

## 6 Material und Methoden

### Verwendete Hefe Stämme

YR98	MAT $\alpha$ ade2 his3- $\Delta$ 200 leu2-3,112 lys1- $\Delta$ 201 ura3-52	A. Antebi
YR101	MAT $\alpha$ ade2 his3- $\Delta$ 200 leu2-3,112 lys1- $\Delta$ 201 ura3-52	A. Antebi
YR122	MAT $\alpha$ ade2 his3- $\Delta$ 200 leu2-3,112 lys1- $\Delta$ 201 ura3-52 pmr1- $\Delta$ 1::LEU2	A. Antebi
YR123	MAT $\alpha$ ade2 his3- $\Delta$ 200 leu2-3,112 lys1- $\Delta$ 201 ura3-52 pmr1- $\Delta$ 1::HIS3	H. Rudolph
YR331	MAT $\alpha$ his6 ino1 leu2-3 mal1 ts11 ura1	Culbertson
YR332	MAT $\alpha$ his6 ino1 leu2-3 mal1 trp2 ts11 ura1	Culbertson
YR401	MAT $\alpha$ ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-11 ura3-1	R. Schekman
YR431	MAT $\alpha$ ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cnb1::LEU2	K. Cunningham
YR434	MAT $\alpha$ ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-11 ura3-1 pmr1- $\Delta$ 1::HIS3	K. Cunningham
YR435	MAT $\alpha$ ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 pmr1::HIS3 cnb1::LEU2	K. Cunningham
YR501	MAT $\alpha$ ura3-52 his3d leu2-3,112 trp1-1 ade8 tpk2::HIS3 tpk3::TRP1 pmr1-241 (Ts) TPK+	S. Garrett
YR506	MAT $\alpha$ ura3-52 his3d leu2-3,112 trp1-1 ade8TPK+ tpk2::HIS3 tpk3::TAP1 PMR1+	S. Garrett
YR990	MAT $\alpha$ ura3-52 leu2-3,112	C. Kaiser
YR991	MAT $\alpha$ ura3-52 his4-619 sec12-4	
YR992	MAT $\alpha$ ura3-52 his4-619 sec18-1	
YR993	MAT $\alpha$ ura3-52 sec6-4	
YR1056	MAT $\alpha$ sec1 ura3 leu2 his4 lys2 bar1	B. Singer-Krüger
YR1063	MAT $\alpha$ leu2 his4 ura3 bar1	B. Singer-Krüger
YR1068	MAT $\alpha$ ura3-52 sec12-1	P. Ljungdahl
YR1069	MAT $\alpha$ ura3-52 sec18-1	P. Ljungdahl
YR1067	MAT $\alpha$ ura3-52 sec23-1	P. Ljungdahl
YR1070	MAT $\alpha$ ura3-52	P. Ljungdahl
YR1234	MAT $\alpha$ ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-11 ura3-1	J. Strayle

	pmr1-Δ1::LEU2	
YR1301	MATa his3-delta1 leu2 trp-289 ura3-52	K. Hauser
YR1335	Mata ura3-52 leu2Δ::hisG pmr1-Δ1::LEU2	E. Bandzuchova
YR1337	Mata ura3-52 his3Δ::hisG pmr1-Δ2::his3	E. Bandzuchova
YR1435	MATa ade2 his3-Δ200 leu2-3,112 lys2-Δ201 rom2::HIS3 ura3-52	Vorliegende Arbeit
YR1476	MATα ade2-1 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 leu2-3,112 can1-100	L. Popolo
YR1477	MATα ade2-1 his3-11,15 trp1-1 ura3-1 leu2-3,112 can1-100 gas1::LEU2	L. Popolo
YE12	MATα ade2 his3-Δ200 leu2-3,112 lys1-Δ201 ura3-52 cyc1 ::LEU2 cyc7 ::HIS3	vorliegende Arbeit
YE37	MATa ade2 his3-Δ200 leu2-3,112 lys1-Δ201 ura3-52 mca1::HIS3	vorliegende Arbeit
YE41	MATα ade2 his3-Δ200 leu2-3,112 lys1-Δ201 ura3-52 pmr1- Δ1::LEU2 mca1 ::HIS3	vorliegende Arbeit

### Verwendete Plasmide

BR5	CEN URA3 PMR1	A. Antebi
BR13	2μ URA3	H. Rudolph
BR172	CEN TRP1 ADE2	
BR362	PMR1 URA3 2μ	H. Rudolph
BR674	AmpR URA3 FKS2(-928 to -1)	D. Levin
BR731	INO1-lacZ URA3 2μ	J. Schüller
BR732	ICRE-CYC1-lacz URA3 2μ	J. Schüller
BR733	ICRE-CYC1-lacz URA3	J. Schüller
BR734	ARS CEN URA3 INO1	J. Schüller

### Medien

Zur Aufzucht von *Saccharomyces cerevisiae* und *Escherichia coli* Stämmen wurden Standardmedien verwendet (Sambrook 1989) (Guthrie 1991). Agarplatten enthielten 2%. Synthetische Medien wurden je nach vorhandenen Auxotrophien mit den entsprechenden Aminosäuren und Nukleotiden supplementiert.

### Prespoplatten

1% Bacto Yeast extract, 3% Bacto peptone, 5% Glukose, 2% Bacto Agar

### Sporulationsmedium

1% KAc-Lösung

### 5-FOA-Platten

(300ml MV-Medium, 3 ml Histidin, 6 ml Adenin, 15 ml Uracil, 6 ml Lysin, 300 ml Agar, 30 ml Glukose (40%), 0,6 g 5-Fluoroorotsäure)

Das MV-Medium wurde zusammen mit den Supplementen, Glukose und dem geschmolzenen Agar vermischt und auf 60°C temperiert. 5-FOA wurde unter Rühren zugegeben und nach dessen Auflösung Platten gegossen.

### 5-FU-Platten

(300ml MV-Medium, 3 ml Histidin, 6 ml Adenin, 15 ml Uracil, 6 ml Lysin, 300 ml Agar, 30 ml Glukose (40%), 180 mg 5-FU)

Das MV-Medium wurde mit den Supplementen und geschmolzenem Agarosegel vermischt und auf 60 °C abgekühlt. In diese Lösung wurden 180 mg 5-FU gegeben und unter Rühren gelöst. Nach dessen Auflösung wurden Platten gegossen.

### Inositol-Medien

MIM-Medium (15 ml 40% Glukose, 60 ml 5xMIM (5,9 g Bernsteinsäure, 2,63 g Kaliumdihydrogenphosphat, 0,81 g  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 5,29 g Ammoniumsulfat in 400 ml  $H_2O$ ), 300µl 1.000x Vitamine (1 mg Biotin, 100mg Natriumpantothenat, 1 mg Folsäure, 200 mg Niacin, 100 mg p-Aminobenzoesäure, 200 mg Pyridoxinhydrochlorid, 100 mg Riboflavin, 200 mg Thiaminhydrochlorid, 1 g Inositol in 500 ml  $H_2O$  gelöst und zur Sterilisation mit Chloroform unterschichtet und über Nacht gerührt), Aminosäuren entsprechend den Auxotrophiemarkern). Der pH-Wert wurde mit 1 M KOH auf pH 4.0 eingestellt und 100 ml  $H_2O$  zugegeben.

Zur Herstellung von Platten wurde 1x MIM-Medium mit aufgeschmolzener Agarose (6g Agarose für Elektrophorese in 200 ml  $H_2O$ ) 1:2 gemischt. Für Platten ohne Inositol wurde eine 1.000x Vitamin-Lösung ohne Inositol hergestellt.

## **Zellkulturen**

*S. cerevisiae* Kulturen wurden auf Agarplatten zwei bis drei Tage bei 30°C inkubiert. Plasmidhaltige Hefestämme wurden in Selektionsmedien kultiviert. Vorkulturen wurden über Nacht in 3 ml Medium bei 220 Upm inkubiert. Durch Verdünnung wurden Hauptkulturen hergestellt deren gewünschte Zelldichte nach mindestens 3 Teilungszyklen bzw. höchstens über Nacht erreicht werden konnte. Dazu wurde die Zelldichte photometrisch bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) bestimmt (1 OD<sub>600</sub> = 1-2x 10<sup>6</sup> Zellen).

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

Zur Sporulation wurden die Hefekulturen zunächst bei 30°C über Nacht auf Presopplatten ausgestrichen und anschließend bei Raumtemperatur in 3 ml Sporulationsmedium bei 220 Upm 4-5 Tage geschüttelt.

## **Modifizierter Screen zur Identifikation „synthetisch Letaler“ mit *pmr1***

14 Pools zirkulärer Snyder DNA wurden in DH5α *E. Coli* amplifiziert. Diese *E. Coli* Bakterien mit Snyder DNA wurden in LB Amp.-Medium vermehrt, durch alkalische Lyse isoliert, gereinigt mit PEG 8000 und mit dem Restriktionsenzym Not1 verdaut. Die linearisierten Transposon-beinhaltenenden DNA-Stücke wurden nach der LiAc-Methode für eingefrorene Hefezellen (Dohmen et al 1991) in den Stamm YS 159 integriert und nach Selektion auf CM-leu auf ihr sektorenbildendes Verhalten geprüft. Das optimierte Wachstumsmedium für sektorenbildendes Verhalten beinhaltet einen erhöhten Glukosegehalt von 4%, einen erniedrigten Histidingehalt von 0,1 mM und einen erniedrigten Adeningehalt von 0,66 mM. Die Rotfärbung wurde optimal sichtbar nach drei Tagen Wachstum bei 30 °C und 2 Tagen Lagerung bei 4 °C. Die Suche nach roten Kolonien ohne weiße Sektoren wurde mit Hilfe einer optischen Lupe durchgeführt. Mutanten, die das Transposon in ein mit der *pmr1*-Deletion essentielles Gen integriert hatten und dadurch ihr *PMR1/ADE3/URA3*-Plasmid nicht verlieren konnten zeigten Wachstum auf CM-Leu-Platten, Wachstum auf CM-Ura-Platten und kein Wachstum auf MV-5FOA-Platten. Diese Stämme wurden diploidisiert durch das Kreuzen mit dem Hefestamm YS 155, der zuvor mit Hilfe von (BR 61) Lys<sup>+</sup>-markiert wurde. Nach der Selektion auf CM-lys Platten zeigen die gesuchten Kolonien jetzt Sektoren auf den oben beschriebenen Adenin-Histidinmangelplatten (Elbs, Diplomarbeit 1997). Durch die Auswahl eines weißen Sektors wurden plasmidfreie Stämme erzeugt, die durch

zweimaliges Ausstreichen auf Einzelkolonien gereinigt wurden. Diese Stämme zeigten Wachstum auf MV-5FOA bzw. 5FU-Platten. Die Einführung einer Nsi I Schnittstelle ins Transposon wurde durch lineare Rekombination eines PvuI-verdauten YIp5-Plasmids ermöglicht. Nach der Selektion auf CM-ura-Platten, Vermehrung, Isolation, Reinigung und Restriktionsverdau mit NsiI wurde die Ligation zu einem zirkulären DNA-Strang mit den flankierenden Regionen des Transposons und einem Teil des betroffenen Gens durchgeführt. Nach dieser Ligation mit T4-Ligase und der Transformation in DH5 $\alpha$  wurde auf LB Amp.-Platten selektioniert und die nach Vermehrung isolierten DNA-Stücke mit EcoRI verdaut und sequenziert. Durch den Vergleich mit den bekannten Hefe-Gen-Sequenzen konnten die synthetisch letalen Gene identifiziert werden. Zur Kontrolle der Ergebnisse wurden mit PCR generierte Deletionskonstrukte der erhaltenen Gene in einen diploiden, heterozygoten *pmr1*-Stamm eingeführt.

### **Klonierung und DNA-Transformation**

Es wurde nach molekularbiologischen Grundmethoden nach entsprechenden Standardprotokollen gearbeitet (Asubel 1990) (Sambrook 1989). Plasmidpräparationen wurden mit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen; Hilden), Gelextraktionen mit QIAEX II GelExtraction Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Zur Deletion von Genen wurde mit einer HIS3-Deletionskassette pFA6a-His3MX6 (Wach et al. 1997) gearbeitet. Die Deletionskonstrukte wurden mit Hilfe von PCR amplifiziert. Die *S. cerevisiae* Stämme wurden mit der Lithiumacetat Methode transformiert (Ito et al. 1983). Homologe Rekombinationen wurden mit Southern Blot Analyse nachgewiesen.

### **Southern Blot Analysis**

#### Isolation und Verdau chromosomaler DNA

5 ml einer stationären Zellkultur wurden 5 min bei 2500 Upm abzentrifugiert und mit 500 $\mu$ l H<sub>2</sub>O gewaschen. Zu den Zellen wurden 200 $\mu$ l Aufschlusspuffer ( 2% Triton X 100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA pH8), 200  $\mu$ l Glasperlen und 200  $\mu$ l Phenol/Chloroform 1:1 gegeben. Die Proben wurden 5 x 1 min auf maximaler Stufe mit dem Vortexer geschüttelt und zwischen den einzelnen Schritten auf Eis gestellt. Den Proben wurden 200 $\mu$ l H<sub>2</sub>O zugesetzt und bei 14000 Upm und 4°C 10 min abzentrifugiert. 300  $\mu$ l Überstand wurden entnommen und mit 1 ml eiskaltem Ethanol die DNA gefällt. Nach 10 min

bei  $-25^{\circ}\text{C}$  wurde die DNA bei 14000 Upm,  $4^{\circ}\text{C}$  10 min abzentrifugiert, in 400  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und mit 3  $\mu\text{l}$  RNase-Lösung (10mg/ml) 20 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  behandelt. Mit 10  $\mu\text{l}$  5 M Ammoniumacetat-Lösung und 1 ml eiskaltem Ethanol wurde erneut gefällt und nach 10 min Fällung bei  $4^{\circ}\text{C}$  und anschließender Abzentrifugation (5 min  $4^{\circ}\text{C}$  14000 Upm) mit 500  $\mu\text{l}$  70% Ethanol gewaschen. Nach nochmaligem Abzentrifugieren wurde der Überstand verworfen und die Proben bei RT getrocknet. Die DNA wurde in 30  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Zum Verdau wurden 1  $\mu\text{g}$  chromosomale DNA über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  verdaut. Die verdauten Fragmente wurden mit Gelelektrophorese auf 0,8% Agarosegel aufgetrennt.

#### Transfer mit Vacuumblot Verfahren

Die DNA-Fragmente wurden auf eine in 2-fach SSC-Puffer (0.3 M NaCl, 0.03M Natriumcitrat pH 7,0) äquilibrierte Hybond-N Nylonmembran (Amersham) übertragen. Das Gel wurde 10 min mit Denaturierungs-Puffer (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH), 10 min mit Neutralisations-Puffer (0.5 M Tris/HCl, 3 M NaCl pH 7.0) behandelt und 1 h auf die Nylonmembran mit 20x SSC-Puffer übertragen. Die Nylonmembran wurde anschließend getrocknet und die DNA 5 min unter UV-Licht an die Membran fixiert.

#### Hybridisierung und Entwicklung

30 ml *AlkPhos Direct Hybridisierungspuffer* wurden auf  $55^{\circ}\text{C}$  erhitzt und zum Blot in eine Hybridisierungsröhre gegeben und 30 min bei  $55^{\circ}\text{C}$  im Hybridisierungsöfen prehybridisiert. Es wurden 30  $\mu\text{l}$  einer Sonde zugegeben und über Nacht bei  $55^{\circ}\text{C}$  hybridisiert. Der Hybridisierungspuffer wurde entfernt und der Blot 2 x mit 50 ml  $55^{\circ}\text{C}$  warmen *primary wash buffer* (120 g Harnstoff, 1 g SDS, 100 ml 0,5 M Natriumphosphatpuffer pH 7.0, 8,7 g NaCl, 1 ml 1.0 M  $\text{MgCl}_2$ , 2 g *blocking reagent* auf 1000 ml) für 15 min gewaschen. Die Nylonmembran wurde aus der Röhre genommen und 2 x 5 min mit *secondary wash buffer* (250 ml 20 x *secondary wash buffer* (112 g Tris, 112 g NaCl pH 10), 0.5 ml 1 M  $\text{MgCl}_2$ -Lösung) gewaschen. Zur Detektion wurde die Membran für 3 min mit *detection reagent* überschichtet, der Überschuss entfernt, der Blot in eine durchsichtige Folie verpackt und mit einem ECL-Hyperfilm (Amersham) entwickelt.

#### Sonde

Die Sonde wurde mit *AlkPhos direct Kit* (Amersham) hergestellt. Dazu wurde DNA (gewonnen aus Plasmidverdau oder PCR-Amplifikation und Reinigung über

Gelelektrophorese und Isolation mit Gelextraktionskit QIAEX II (Qiagen, Hilden) in einer Konzentration von (10ng/μl) für 5 min bei 96°C denaturiert und im Eisbad abgeschreckt. Davon wurden 10 μl mit 10 μl Reaktionspuffer, 2 μl labelling reagent und 10 μl Crosslinker 30 min bei 37°C inkubiert.

### **Quantitative Bestimmung der Polysaccharid-Zusammensetzung von *Δpmr1*- Zellwänden**

Die Zuckerbestandteile der Zellwand wurden mit „*high performance anion-exchange chromatography*“ separiert und mit „*pulsed amperometric detection*“ quantifiziert. Diese Methodik zur Bestimmung der Zuckeranteile in den Hefe-Zellwänden wurde von J. Francois entwickelt und an Proben zu dieser Arbeit durchgeführt (Dallies et al. 1998).

### **Bestimmung des *FKS2-LacZ* Expressionsgrades**

Zur Ermittlung des *FKS2*-Anteils in *Δpmr1*-Mutanten wurde mit dem Reporterkonstrukt BR674 gearbeitet. Dieses Reporterplasmid wurde von David E. Levin konstruiert aus einer Fusion von der 5' *FKS2*-Sequenz von Nukleotid -706 bis +1 mit dem *E. coli lacZ*-Gen (kodiert für β-Galactosidase) (Zhao et al. 1998). Der Reporter wurde in die Stämme nach der Lithiumacetat-Standardmethode (Ito et al. 1983) transformiert. Für *Δpmr1*-Stämme wurde der Hitzeschock (42°C) zur Transformation auf 5 min reduziert. Die Kulturen wurden in CM-Ura Selektionsmedium kultiviert und bei den Wachstumsphasen (OD<sub>600</sub> = 0,25; 0.5 und 1.0) durch 5 min Zentrifugation bei 3000g geerntet.

### **Herstellung eines Rohextraktes**

Die Zellen wurden gewaschen und in Puffer (100mM (Tris-HCl pH 8,0), 1 mM DTT, 20% Glycerin) aufgenommen. Die Zellen wurden 1:1 mit Glasperlen versetzt und konnten eingefroren (-80°C) und bei -24°C gelagert werden. Zum Aufschluss wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 μl Phenylmethylsulfonylfluorid (Okorokov et al.) und 1 μl Leupeptin (Okorokov et al.) versetzt und 5x 1 min durch vortexen aufgeschlossen. Zwischen den Vortex-Schritten wurden die Proben jeweils 1 min in Eis gekühlt. Die Glasperlen und Zellbruchstücke wurden durch 1x 1 min und 2x 5 min Zentrifugation bei 4°C und 13000g abgetrennt.

### Der $\beta$ -Galactosidase-Aktivitätstest

10-100  $\mu$ l des Rohextraktes wurden mit 900ml Z-Puffer (16.1 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 5.5 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.75 g KCl, 0.246 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2.7 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1000 ml auffüllen pH7.0) gemischt und mit Aufschlusspuffer auf ein Volumen von 1 ml justiert. Die Mischung wurde für ca. 5 min im Wasserbad auf  $28^\circ\text{C}$  temperiert. Zur Initiation der Reaktion wurden 0.2 ml ONPG Stock-Lösung (4 mg/ml *o*-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactoside in Z-Puffer) bei  $28^\circ\text{C}$  zugegeben und die Zeit gemessen bis die Mischung eine gelbe Färbung zeigte. Die Reaktion wurde mit 0.5 ml 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung gestoppt und die Absorption bei 420 nm gemessen.

### Proteinbestimmung durch Bradford

Als Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe von 0.1-1 mg/ml BSA in Aufschluss-Puffer verwendet. Zu 10-20  $\mu$ l Rohextrakt wurde 1 ml Bradford Reagenz (Bio-Rad) gegeben und die Absorption der blauen Farbe bei 595 nm bestimmt.

$\text{Specific activity} = \text{OD}_{420} \times 1.7 / 0.0045 \times \text{Protein}(\text{mg/ml}) \times \text{Volumen}(\text{ml}) \times \text{Zeit}(\text{min})$   
(mM/min/mg Protein)

### Polarisationszustand des Aktinzytoskeletts

Zu asynchron exponentiell wachsenden Hefezellen wurde 10%iges Formaldehyd ins Wachstumsmedium gegeben (Endkonzentration 4% Formaldehyd) und die Zellen bei den jeweiligen Temperaturen für 10 min fixiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 3000 Upm. abzentrifugiert und in PBS + 4% Formaldehyd für 30 min bei entsprechender Temperatur fixiert. Die fixierten Zellen wurden 2x mit PBS pH 6,5 gewaschen und in PBS aufgenommen. 100  $\mu$ l Zellsuspension wurde mit 10  $\mu$ l TRITC-Phalloidin (6,6  $\mu\text{M}$  in Methanol) (Sigma) versetzt und für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Zellen wurden fotografiert und jeweils 1000 knospende Zellen in polarisiert (mehr als 50% der Aktin-Flecken und Filamente befinden sich in der Tochterzelle) und depolarisiert (Aktin liegt als Flecken gleichmäßig verteilt in Mutter- und Tochter-Zelle vor) unterteilt.

## Reifung von Gas1p

### Radioaktive Markierung

Von auf exponentiell wachsenden Übernachtskulturen  $OD_{600}=0,5$  wurden Zellen (jeweils  $2,5 \times 10^7$  Zellen/Zeitpunkt) durch Zentrifugation bei 3000 Upm geerntet. Die Zellen wurden 3x mit SDYE-Hungermedium (0,2% yeast extract, 0,67% yeast nitrogen base ohne Aminosäuren, 2% Glukose) gewaschen und erneut 50 min bei 30°C inkubiert. Der Zellsuspension wurden 100  $\mu$ Ci TRANS  $^{35}$ S-label/Zeitpunkt (Dupont de Nemours) zugesetzt. Die  $^{35}$ S-Aufnahme wurde nach 5 min mit 50  $\mu$ l chase-cocktail (0,3% Methionin, 0,3% Cystein; 0,3 M  $(NH_4)_2SO_4$ ) gestoppt und Proben nach weiteren 0 / 5 / 10 / 15 / 30 min entnommen. Dazu wurde 1 ml Probe entnommen und in vorgelegte, eisgekühlte 100  $\mu$ l einer 1:1-Mischung  $NaN_3$  (200 mM)/NaF (200 mM) pipettiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, vom Überstand getrennt und eingefroren.

### Immunopräzipitation und Detektion

Das Zellpellet wurde in 100  $\mu$ l TEPI (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM EDTA) aufgenommen, es wurden ca. 100 $\mu$ l Glasperlen zugegeben und 5  $\mu$ l Proteasen Inhibitor Cocktail Mix Complete (Boehringer Mannheim) zugesetzt. Die Zellen wurden durch 5x 1-minütiges vortexen aufgeschlossen, wobei zwischen den Einzelschritten die Proben jeweils 1 min auf Eis gekühlt wurden. Nach dem mechanischen Aufschluss wurden in die Suspensionen 11  $\mu$ l SDS (10%) gegeben und die Proben 10 min bei 95°C im Heizblock inkubiert. Den Suspensionen wurden erneut 40  $\mu$ l Proteasen Inhibitor Cocktail Mix Complete und 900  $\mu$ l TNET-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH8, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100) zugesetzt und anschließend wurde 15 min mit 3000 Upm abzentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde in ein frisches Probenröhrchen überführt, mit 3,5  $\mu$ l Antikörper versetzt und 1,5h über Kopf geschüttelt. Danach wurden der Lösung 50  $\mu$ l Sepharose A-Suspension (5% in TNET-Puffer) zugesetzt und erneut 2 h über Kopf geschüttelt. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation abgetrennt, 4x mit TNET-Puffer gewaschen und in 50  $\mu$ l 2x Lämmli-Puffer (4% SDS, 20% Glycerin, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, Bromphenolblau, 1,5% DTT frisch zugesetzt) aufgenommen und 10 min auf 95°C erhitzt. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde mit dem Überstand eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Das Gel wurde auf dem Gelrockner getrocknet und autoradiographisch sichtbar gemacht. Zur Quantifizierung wurde

ein Phosphoimager (Molecular Probes) verwendet und das Verhältnis der Signalintensitäten zwischen gereifter (125 kDa) und ungereifter Gas1p-Form (105 kDa) ermittelt.

### **Überlebensrate**

Zur Bestimmung der Überlebensrate wurden zu den entsprechenden Zeitpunkten die Zellzahlen ermittelt, um die Volumina zu ermitteln, in denen je 500 Zellen vorlagen. Es wurden 3 Platten mit je 500 Zellen ausplattiert und nach einer Inkubationszeit von 2-3 Tagen bei 30°C die gewachsenen Kolonien gezählt. Bei ts-Mutanten wurden die Überlebensplattierungen bei 23°C inkubiert.

Zur Bestimmung der Zellzahlen/ml wurden die entnommenen Proben zunächst 1:1000 verdünnt. Davon wurden 100 µl Verdünnung in 10 ml Casytonlösung pipettiert und gut vermischt. Die Messung der Zellzahl erfolgte am *Casy cell counter*®. Dieser ermittelte aus 2 Messungen die Partikelanzahl in einem definierten Größenbereich.

### **Nachweis von ROS-Produktion**

#### Dihydrorhodamin 123-Färbung

ROS oxidieren das farblose, zelldurchgängige Dihydrorhodamin 123 zu Rhodamin 123, dem Fluoreszenzfarbstoff, der im Fluoreszenzmikroskop durch Rotfärbung detektierbar ist (Possel et al. 1997). Für die Färbung wurden 1 ml Probe mit 2 µl DHR 123-Lösung (aus 2,5 mg/ml-Stocklösung wurde kurz vor der Färbung eine 5 µg/ml Ethanol-Lösung hergestellt) versetzt. Der Ansatz wurde 2 h auf einem Schüttler bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert, 2x mit 500 µl PBS (53 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 13 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 75 mM NaCl) gewaschen und in 1 ml PBS aufgenommen. Unter einem Fluoreszenzmikroskop im Rhodamin-Kanal konnte eine qualitative Bestimmung der roten Fluoreszenz (Fluoreszenzmaxima bei 535 nm) erfolgen.

### **Nachweis von Caspase-Aktivität**

Während des apoptotischen Prozesses findet durch proteolytische Spaltung die Aktivierung von Caspasen statt. Caspasen gehören zu einer Familie von Cystein-Aspartyl Proteasen. In ihren aktiven Zentren benutzen sie Cystein als nukleophile-Gruppen zur Substratspaltung. An diese Gruppen kann ein Farbstoff spezifisch gebunden werden. Der CaspACE<sup>TM</sup> FIFC-VAD-FMK in situ Marker für Apoptose (Promega) ist ein Fluoroisocyanat-Konjugat des zell-

permeablen, irreversiblen Caspasen-Inhibitors Z-VAD-FMK („Carbobenzoyl-Yalyl-Alanyl-Aspartyl-Fluoromethylketon“) (Grabarek and Darzynkiewicz 2002). Durch Fluoreszenz-Detektion kann der gebundene Marker lokalisiert werden.

Von der zu testenden Kultur wurden  $5 \times 10^6$  Zellen geerntet und in 1 ml PBS gewaschen. Nach Abzentrifugation wurden sie in 200  $\mu$ l verdünnter FITC-VAD-FMK-Lösung (5 mM FITC-VAD-FMK in DMSO 1:1000 in PBS verdünnt) resuspendiert und für 20 min bei 30°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde mit 1 ml PBS gewaschen und die Zellen wurden in 200  $\mu$ l PBS resuspendiert. Die durchflusszytometrische Analyse wurde unter Verwendung eines FACS in der Arbeitsgruppe von F. Madeo durchgeführt.

### **DAPI-Kernfärbung**

DNA kann mit verschiedenen Farbstoffen angefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. 1 ml Hefekultur wurde 2 min bei 3000 Upm zentrifugiert, mit 1 ml HEPES-Puffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub> pH 7,4) gewaschen und in 1 ml Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 1  $\mu$ l 33342-Trihydrochlorid-Trihydrat (10 mg/ml H<sub>2</sub>O) (Hoechst) wurde 10 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2-3 mal mit 1 ml HEPES-Puffer gewaschen, in 1 ml Puffer aufgenommen und 30 min im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die Zellen wurden daraufhin unter dem Mikroskop bei UV-Licht analysiert.

### **Detektion der Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien ins Zytosol über die Isolation der Mitochondrien**

Zur Isolation der Hefe-Mitochondrien wurden 200 ml einer in YPD gewachsenen Kultur mit OD<sub>600</sub> = 2.0 geerntet. Die Kulturen wurden für 5 min bei 3000 Upm zentrifugiert, 2x mit H<sub>2</sub>O gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Nassgewicht der Zellen bestimmt. Die Zellen wurden in 3 ml Tris-Puffer/Zellen (g) aufgenommen, resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 4 ml Sorbitol-Puffer aufgenommen, erneut resuspendiert und wiederum durch 5 min Zentrifugation bei 3000 Upm vom Überstand getrennt. Das Zellpellet wurde in 4 ml Sorbitol-Puffer aufgenommen und 1 ml Zymolyase-Lösung (1,5 mg /Zellen (g) in 1 ml Sorbitol-Puffer) wurden zu den resuspendierten Zellen gegeben. Die Sphäroplastierung wurde durch 45 min sanftes Schütteln im 30°C-Wasserbad erreicht. Zur Kontrolle wurden 100  $\mu$ l Zellen entnommen und mit 400  $\mu$ l H<sub>2</sub>O verdünnt. Bei kompletter Sphäroplastierung klärte sich die

Lösung auf. Die Sphäroplasten wurden unter Vermeidung von Stößen und Schütteln bei 1200 Upm und Raumtemperatur 5 min abzentrifugiert. Die Sphäroplasten wurden in 4 ml eiskaltem Sorbitol-Puffer aufgenommen. Dabei wurde die Sorbitol-Lösung langsam entlang dem Gefäßrand in die Sphäroplasten-Suspension einpipettiert und durch sehr langsames von-Hand-schütteln resuspendiert. Mit einer 5minütigen Zentrifugation wurden die Sphäroplasten bei 2°C und 1200 Upm gereinigt. Diese Reinigung wurde wiederholt. Die Aufnahme der Sphäroplasten erfolgte in 3 ml einer 1:1-Mischung von 2x BB-Puffer mit 1 mM PMSF ( 1.2 M Sorbitol, 40 mM HEPES, pH 7.4, 1 mM PMSF) und H<sub>2</sub>O mit 1 mM PMSF.

Die Sphäroplasten wurden in einem in Eis gekühlten Glas-Glas-Homogenisierer mit 15 langsamen Hüben aufgeschlossen (keine Luft in die Suspension eintragen). Zum Entfernen der Zellbruchstücke wurde der Aufschluss bei 2°C und 3000 Upm für 5 min zentrifugiert. Der trübe Überstand wurde in eisgekühlte Cortex-Röhrchen überführt und 10 min bei 4°C und 10000 Upm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde als zytosolische Fraktion von dem Pellet getrennt. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml 1x BB-Puffer resuspendiert, mit einem weiteren ml 1x BB-Puffer verdünnt und bei 4000 Upm und 4°C für 5 min von den Zellbruchstücken getrennt. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde in ein frisches Cortex-Röhrchen gefüllt und die Mitochondrien wurden durch erneute 10 min Zentrifugation bei 10000 Upm 4°C abgetrennt. Das Pellet wurde in 200 µl 1x BB-Puffer aufgenommen und als mitochondriale Fraktion verwendet. Von der mitochondrialen und zytosolischen Fraktion wurde mit Bradford-Reagenz die isolierte Protein-Menge bestimmt. Zur Trennung der mitochondrialen bzw. zytosolischen Proteine wurden 5 bzw. 10 µg Protein in Lämmli-Puffer aufgenommen und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine wurden mit Hilfe von Western-Blotting aus den Gelen auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und Cytochrom C und Porin wurden immunologisch detektiert.

### **DNA-Fragmentation mit TUNEL-Test**

#### Beschichtung der Objektträger mit Polylysin

Die Objektträger wurden zuerst mit tensidhaltigem Wasser und anschließendem Klarspülen mit Wasser gereinigt. Die Fettfreien Objektträger wurden mit abs. Ethanol sterilisiert und unter dem Abzug getrocknet. In die einzelnen Fenster der Objektträger wurde 25 µl Polylysinlösung pipettiert und 30 min angetrocknet. Der Überstand wurde nun abgesaugt und die Polylysin-benetzten Fenster unter dem Abzug getrocknet. Nach Trocknung wurden die

beschichteten Fenster 3x mit H<sub>2</sub>O mit jeweils frischem H<sub>2</sub>O gewaschen, getrocknet und bei 4°C in einer staubfreien Box gelagert.

#### TUNEL-Fixierung

Aus den Hefekulturen wurde ein salzkorngroßes Pellet (ca. 500 µl bei OD<sub>600</sub> = 0.5) mittels Zentrifugation geerntet. Das Pellet wurde in 500 µl B-Puffer (350 mM Kaliumphosphat, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen und in 1 ml B-Puffer resuspendiert. In die Suspension wurden 120 µl 37%ige Formaldehydlösung gegeben. Dann wurde kurz vorgetext und unter dem Abzug 1 h inkubiert. Die fixierten Zellen wurden 3x mit 500 µl B-Puffer + 1,2 M Sorbitol gewaschen und in 330 µl B-Puffer + 1.2 M Sorbitol resuspendiert. Zur Entfernung der Zellwand wurden die fixierten Zellen mit 20 µl β-Glucuronidase/Arylsulfatase und 5 µl Lyticase (1000 U/ml) 2h bei 30°C inkubiert. Die Sphäroplasten wurden kurz (5 s) in der Tischzentrifuge abzentrifugiert, vorsichtig mit 300 µl B-Puffer + 1,2 M Sorbitol gewaschen und nach erneutem kurzem Abzentrifugieren in 30 µl B-Puffer + 1.2 M Sorbitol aufgenommen. 25 µl der Suspension wurden auf ein Fenster des polylysinbeschichteten Objektträger aufpipettiert, die Zellen wurden 20 min sedimentiert und angetrocknet. Der Überstand wurde erneut abgesaugt und die Zellen konnten antrocknen. Die Proben konnten bei 4°C gelagert werden.

#### TUNEL-Färbung

Die Zellen in den Objektträgerfenstern wurden 2x mit PBS pH 7,0 gewaschen und erneut getrocknet. Die Objektträger wurden schräg gestellt und eine 0,3%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung in Methanol wurde über den Objektträger laufen gelassen. Der Vorgang wurde so oft wiederholt, dass der Objektträger 30 min lang nicht austrocknen konnte. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die restliche Lösung vorsichtig abgesaugt und der Objektträger getrocknet. Der Objektträger wurde auf Eis gestellt und jedes Fenster genau 2 min mit Permeabilisierungslösung (0.1% Triton X-100, 0,1% (w/v) NaAc) inkubiert. Die überstehende Lösung wurde abgesaugt, die Fenster 2x mit PBS gewaschen und die Objektträger erneut getrocknet. Auf die permeabilisierten Zellen wurden 10 µl TUNEL-Reaktionsmix (1:10 frisch mit Puffer angesetzt) (In Situ Cell Death Detection Kit (Roche)) pro Fenster gegeben und in einer Feuchtkammer 1 h bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde erneut abgesaugt, die Fenster wurden 3x mit PBS gewaschen und mit 10 µl Converter-POD (Roche) wiederum 30 min in einer auf 37°C temperierten Feuchtkammer inkubiert. Anschließend wurde 3x mit PBS gewaschen und mit 30 µl DAB-Substrat (1:10 DAB-Substratlösung in Peroxidpuffer) 10 min bei Raumtemperatur behandelt, 3 x mit PBS gewaschen und getrocknet. Die Fenster wurden

mit geschmolzener Kaisers-Gelatine blasenfrei verschlossen und unter dem Lichtmikroskop ausgewertet.

### **Phosphatidylexternalisierung mit Annexin V**

Die Hefezellen wurden in Sorbitol-Puffer (1,2 M Sorbitol, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 35 mM Kaliumphosphat pH 6,8) gewaschen und die Zellwände mit 5,5% Glusulase (Boehringer Mannheim) und 15 U/ml Lyticase (Sigma) in Sorbitol-Puffer über 2 h bei 30°C verdaut. Die Sphäroplasten wurden vorsichtig in Binde-Puffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) + 1,2 M Sorbitol gewaschen und aufgenommen. Zu 40 µl Zellsuspension wurden 2 µl Annexin-FITC (CLONTECH) und 2 µl Propidiumiodid (500 µg/ml) gegeben, vorsichtig vermischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Sphäroplasten wurden mit Binde-Puffer + Sorbitol gewaschen, aufgenommen und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

### **Benennung der Gene**

Die Nomenklatur der Gene der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte nach Demerc et al. 1996. Jedes Gen wurde durch drei kursive Buchstaben beschrieben, Dominante Allele wurden durch Großbuchstaben symbolisiert. Eine nachgestellte Zahl kennzeichnet ein spezifisches Allel oder Mutation. Das Symbol Δ steht für eine partielle oder vollständige Deletion eines Gens. Eine Insertion wurde mit dem Symbol :: gekennzeichnet. Proteine wurden durch den Gennamen mit groß geschriebenem ersten Buchstaben und mit einem nachgestellten p beschrieben.

## 7 Literatur

- Abeijon, C., Yanagisawa, K., Mandon, E.C., Hausler, A., Moremen, K., Hirschberg, C.B. and Robbins, P.W. (1993) Guanosine diphosphatase is required for protein and sphingolipid glycosylation in the Golgi lumen of *Saccharomyces cerevisiae* *J Cell Biol*, **122**(2), 307-23.
- Abeijon, C., Mandon, E.C. and Hirschberg, C.B. (1997) Transporters of nucleotide sugars, nucleotide sulfate and ATP in the Golgi apparatus *Trends Biochem Sci*, **22**(6), 203-7.
- Alani, E., Cao, L. and Kleckner, N. (1987) A method for gene disruption that allows repeated use of URA3 selection in the construction of multiply disrupted yeast strains *Genetics*, **116**(4), 541-5.
- Alberts, A.S., Bouquin, N., Johnston, L.H. and Treisman, R. (1998) Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7 *J Biol Chem*, **273**(15), 8616-22.
- Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W. and Yuan, J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature *Cell*, **87**(2), 171.
- Annis, M.G., Zamzami, N., Zhu, W., Penn, L.Z., Kroemer, G., Leber, B. and Andrews, D.W. (2001) Endoplasmic reticulum localized Bcl-2 prevents apoptosis when redistribution of cytochrome c is a late event *Oncogene*, **20**(16), 1939-52.
- Antebi, A. and Fink, G.R. (1992) The yeast Ca(2+)-ATPase homologue, PMR1, is required for normal Golgi function and localizes in a novel Golgi-like distribution *Mol Biol Cell*, **3**(6), 633-54.
- Asubel, F.M., Brent R., Kingston, R.E.; Moore D.D. (1990). *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing association & Wiley Interscience, New York.
- Ballou, C.E. (1974) Some aspects of the structure, immunochemistry, and genetic control of yeast mannans *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, **40**(0), 239-70.
- Ballou, C.E. (1990) Isolation, characterization, and properties of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants with nonconditional protein glycosylation defects *Methods Enzymol*, **185**, 440-70.
- Banfield, D.K., Lewis, M.J. and Pelham, H.R. (1995) A SNARE-like protein required for traffic through the Golgi complex *Nature*, **375**(6534), 806-9.
- Banuet, F. (1998) Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**(2), 249-74.
- Beckers, C.J. and Balch, W.E. (1989) Calcium and GTP: essential components in vesicular trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus *J Cell Biol*, **108**(4), 1245-56.
- Bender, A. and Pringle, J.R. (1991) Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressor mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell Biol*, **11**(3), 1295-305.
- Benedetti, H., Raths, S., Crausaz, F. and Riezman, H. (1994) The END3 gene encodes a protein that is required for the internalization step of endocytosis and for actin cytoskeleton organization in yeast *Mol Biol Cell*, **5**(9), 1023-37.
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S.W., Luzio, J.P., Simari, R. and Weissberg, P. (1998) Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis *Science*, **282**(5387), 290-3.
- Berninsone, P., Miret, J.J. and Hirschberg, C.B. (1994) The Golgi guanosine diphosphatase is required for transport of GDP-mannose into the lumen of *Saccharomyces cerevisiae* Golgi vesicles *J Biol Chem*, **269**(1), 207-11.
- Berninsone, P., Lin, Z.Y., Kempner, E. and Hirschberg, C.B. (1995) Regulation of yeast Golgi glycosylation. Guanosine diphosphatase functions as a homodimer in the membrane *J Biol Chem*, **270**(24), 14564-7.
- Bickle, M., Delley, P.A., Schmidt, A. and Hall, M.N. (1998) Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2 *Embo J*, **17**(8), 2235-45.
- Bischoff, J.R., Casso, D. and Beach, D. (1992) Human p53 inhibits growth in *Schizosaccharomyces pombe* *Mol Cell Biol*, **12**(4), 1405-11.
- Blinder, D., Bouvier, S. and Jenness, D.D. (1989) Constitutive mutants in the yeast pheromone response: ordered function of the gene products *Cell*, **56**(3), 479-86.
- Bonilla, M. and Cunningham, K.W. (2003) Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca(2+) signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast *Mol Biol Cell*, **14**(10), 4296-305.
- Botla, R., Spivey, J.R., Aguilar, H., Bronk, S.F. and Gores, G.J. (1995) Ursodeoxycholate (UDCA) inhibits the mitochondrial membrane permeability transition induced by glycochenodeoxycholate: a mechanism of UDCA cytoprotection *J Pharmacol Exp Ther*, **272**(2), 930-8.
- Boveris, A., Cadenas, E. and Stoppani, A.O. (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide *Biochem J*, **156**(2), 435-44.
- Boya, P., Roques, B. and Kroemer, G. (2001) New EMBO members' review: viral and bacterial proteins regulating apoptosis at the mitochondrial level *Embo J*, **20**(16), 4325-31.

- Brown, J.L. and Bussey, H. (1993) The yeast KRE9 gene encodes an O glycoprotein involved in cell surface beta-glucan assembly *Mol Cell Biol*, **13**(10), 6346-56.
- Burns, N., Grimwade, B., Ross-Macdonald, P.B., Choi, E.Y., Finberg, K., Roeder, G.S. and Snyder, M. (1994) Large-scale analysis of gene expression, protein localization, and gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae* *Genes Dev*, **8**(9), 1087-105.
- Cabib, E., Roberts, R. and Bowers, B. (1982) Synthesis of the yeast cell wall and its regulation *Annu Rev Biochem*, **51**, 763-93.
- Cabib, E., Drgonova, J. and Drgon, T. (1998) Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis *Annu Rev Biochem*, **67**, 307-33.
- Cande, C., Vahsen, N., Kouranti, I., Schmitt, E., Daugas, E., Spahr, C., Luban, J., Kroemer, R.T., Giordanetto, F., Garrido, C., Penninger, J.M. and Kroemer, G. (2004) AIF and cyclophilin A cooperate in apoptosis-associated chromatinolysis *Oncogene*, **23**(8), 1514-21.
- Carafoli, E. (1987a) Intracellular calcium homeostasis *Annu Rev Biochem*, **56**, 395-433.
- Carafoli, P.a. (1987b) Ion motive ATPase. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function *Trends in Biochem*, **12**, 146- 149.
- Carman, G.M. and Henry, S.A. (1989) Phospholipid biosynthesis in yeast *Annu Rev Biochem*, **58**, 635-69.
- Castro, C., Ribas, J.C., Valdivieso, M.H., Varona, R., del Rey, F. and Duran, A. (1995) Papulacandin B resistance in budding and fission yeasts: isolation and characterization of a gene involved in (1,3)beta-D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* *J Bacteriol*, **177**(20), 5732-9.
- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs *Physiol Rev*, **59**(3), 527-605.
- Chevet, E., Cameron, P.H., Pelletier, M.F., Thomas, D.Y. and Bergeron, J.J. (2001) The endoplasmic reticulum: integration of protein folding, quality control, signaling and degradation *Curr Opin Struct Biol*, **11**(1), 120-4.
- Cid, V.J., Duran, A., del Rey, F., Snyder, M.P., Nombela, C. and Sanchez, M. (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* *Microbiol Rev*, **59**(3), 345-86.
- Colussi, P.A., Taron, C.H., Mack, J.C. and Orlean, P. (1997) Human and *Saccharomyces cerevisiae* dolichol phosphate mannose synthases represent two classes of the enzyme, but both function in *Schizosaccharomyces pombe* *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(15), 7873-8.
- Condorelli, F., Salomoni, P., Cotteret, S., Cesi, V., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S. and Calabretta, B. (2001) Caspase cleavage enhances the apoptosis-inducing effects of BAD *Mol Cell Biol*, **21**(9), 3025-36.
- Conzelmann, A., Riezman, H., Desponds, C. and Bron, C. (1988) A major 125-kd membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is attached to the lipid bilayer through an inositol-containing phospholipid *Embo J*, **7**(7), 2233-40.
- Costigan, C., Gehrung, S. and Snyder, M. (1992) A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth *Mol Cell Biol*, **12**(3), 1162-78.
- Cox, J.S., Shamu, C.E. and Walter, P. (1993) Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase *Cell*, **73**(6), 1197-206.
- Cunningham, K.W. and Fink, G.R. (1994a) Ca<sup>2+</sup> transport in *Saccharomyces cerevisiae* *J Exp Biol*, **196**, 157-66.
- Cunningham, K.W. and Fink, G.R. (1994b) Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPases *J Cell Biol*, **124**(3), 351-63.
- Cunningham, K.W. and Fink, G.R. (1996) Calcineurin inhibits VCX1-dependent H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and induces Ca<sup>2+</sup> ATPases in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell Biol*, **16**(5), 2226-37.
- Cyert, M.S. and Thorner, J. (1992) Regulatory subunit (CNB1 gene product) of yeast Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to pheromone *Mol Cell Biol*, **12**(8), 3460-9.
- Dallies, N., Francois, J. and Paquet, V. (1998) A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* *Yeast*, **14**(14), 1297-306.
- De Maria, R., Lenti, L., Malisan, F., d'Agostino, F., Tomassini, B., Zeuner, A., Rippo, M.R. and Testi, R. (1997) Requirement for GD3 ganglioside in CD95- and ceramide-induced apoptosis *Science*, **277**(5332), 1652-5.
- Dean, N., Zhang, Y.B. and Poster, J.B. (1997) The VRG4 gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the Golgi in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae* *J Biol Chem*, **272**(50), 31908-14.
- Dean-Johnson, M. and Henry, S.A. (1989) Biosynthesis of inositol in yeast. Primary structure of myo-inositol-1-phosphate synthase (EC 5.5.1.4) and functional analysis of its structural gene, the INO1 locus *J Biol Chem*, **264**(2), 1274-83.
- Delley, P.A. and Hall, M.N. (1999) Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1 *J Cell Biol*, **147**(1), 163-74.

- Deshaies, R.J. and Schekman, R. (1987) A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum *J Cell Biol*, **105**(2), 633-45.
- Dijkgraaf, L.C., De Bont, L.G., Boering, G. and Liem, R.S. (1996) Function, biochemistry, and metabolism of the normal synovial membrane of the temporomandibular joint: a review of the literature *J Oral Maxillofac Surg*, **54**(1), 95-100.
- Doering, T.L. and Schekman, R. (1996) GPI anchor attachment is required for Gas1p transport from the endoplasmic reticulum in COP II vesicles *Embo J*, **15**(1), 182-91.
- Dolinski, K., Muir, S., Cardenas, M. and Heitman, J. (1997) All cyclophilins and FK506 binding proteins are, individually and collectively, dispensable for viability in *Saccharomyces cerevisiae* *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(24), 13093-8.
- Drgonova, J., Drgon, T., Tanaka, K., Kollar, R., Chen, G.C., Ford, R.A., Chan, C.S., Takai, Y. and Cabib, E. (1996) Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis *Science*, **272**(5259), 277-9.
- Dürr, G., Strayle, J., Plemper, R., Elbs, S., Klee, S.K., Catty, P., Wolf, D.H. and Rudolph, H.K. (1998) The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation *Mol Biol Cell*, **9**(5), 1149-62.
- Earnshaw, W.C. (1999) Apoptosis. A cellular poison cupboard *Nature*, **397**(6718), 387, 389.
- Eilam, Y. (1982a) Studies on calcium efflux in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Microbios*, **35**(140), 99-110.
- Eilam, Y. (1982b) The effect of monovalent cations on calcium efflux in yeasts *Biochim Biophys Acta*, **687**(1), 8-16.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD *Nature*, **391**(6662), 43-50.
- Errede, B., Cade, R.M., Yashar, B.M., Kamada, Y., Levin, D.E., Irie, K. and Matsumoto, K. (1995) Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways *Mol Reprod Dev*, **42**(4), 477-85.
- Esmon, B., Novick, P. and Schekman, R. (1981) Compartmentalized assembly of oligosaccharides on exported glycoproteins in yeast *Cell*, **25**(2), 451-60.
- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M.S., Chow, C.J., Adames, N., Pringle, J.R., Peter, M. and Boone, C. (1997) Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis *Science*, **276**(5309), 118-22.
- Fabrizio, P., Battistella, L., Vardavas, R., Gattazzo, C., Liou, L.L., Diaspro, A., Dossen, J.W., Gralla, E.B. and Longo, V.D. (2004) Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae* *J Cell Biol*, **166**(7), 1055-67.
- Fang, H., Panzner, S., Mullins, C., Hartmann, E. and Green, N. (1996) The homologue of mammalian SPC12 is important for efficient signal peptidase activity in *Saccharomyces cerevisiae* *J Biol Chem*, **271**(28), 16460-5.
- Ferro-Novick, S. and Jahn, R. (1994) Vesicle fusion from yeast to man *Nature*, **370**(6486), 191-3.
- Finkel, E. (2001) The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science*, **292**(5517), 624-6.
- Fliss, M.S., Usadel, H., Caballero, O.L., Wu, L., Buta, M.R., Eleff, S.M., Jen, J. and Sidransky, D. (2000) Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids *Science*, **287**(5460), 2017-9.
- Foyouzi-Youssefi, R., Arnaudeau, S., Borner, C., Kelley, W.L., Tschopp, J., Lew, D.P., Demaurex, N. and Krause, K.H. (2000) Bcl-2 decreases the free Ca<sup>2+</sup> concentration within the endoplasmic reticulum *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**(11), 5723-8.
- Frohlich, K.U. and Madeo, F. (2001) Apoptosis in yeast: a new model for aging research *Exp Gerontol*, **37**(1), 27-31.
- Fuller, R.S., Brake, A. and Thorner, J. (1989) Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca<sup>2+</sup>-dependent serine protease *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(5), 1434-8.
- Gao, X.D., Kaigorodov, V. and Jigami, Y. (1999) YND1, a homologue of GDA1, encodes membrane-bound apyrase required for Golgi N- and O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* *J Biol Chem*, **274**(30), 21450-6.
- Glick, B.S. (2000) Organization of the Golgi apparatus *Curr Opin Cell Biol*, **12**(4), 450-6.
- Goss, P.E., Baker, M.A., Carver, J.P. and Dennis, J.W. (1995) Inhibitors of carbohydrate processing: A new class of anticancer agents *Clin Cancer Res*, **1**(9), 935-44.
- Grabarek, J. and Darzynkiewicz, Z. (2002) In situ activation of caspases and serine proteases during apoptosis detected by affinity labeling their enzyme active centers with fluorochrome-tagged inhibitors *Exp Hematol*, **30**(9), 982-9.
- Graham, T.R. and Emr, S.D. (1991) Compartmental organization of Golgi-specific protein modification and vacuolar protein sorting events defined in a yeast sec18 (NSF) mutant *J Cell Biol*, **114**(2), 207-18.

- Gray, J.V., Ogas, J.P., Kamada, Y., Stone, M., Levin, D.E. and Herskowitz, I. (1997) A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator *Embo J*, **16**(16), 4924-37.
- Green, D.R. and Martin, S.J. (1995) The killer and the executioner: how apoptosis controls malignancy *Curr Opin Immunol*, **7**(5), 694-703.
- Green, N., Fang, H. and Walter, P. (1992) Mutants in three novel complementation groups inhibit membrane protein insertion into and soluble protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane of *Saccharomyces cerevisiae* *J Cell Biol*, **116**(3), 597-604.
- Greenhalf, W., Stephan, C. and Chaudhuri, B. (1996) Role of mitochondria and C-terminal membrane anchor of Bcl-2 in Bax induced growth arrest and mortality in *Saccharomyces cerevisiae* *FEBS Lett*, **380**(1-2), 169-75.
- Greenlund, L.J., Deckwerth, T.L. and Johnson, E.M., Jr. (1995) Superoxide dismutase delays neuronal apoptosis: a role for reactive oxygen species in programmed neuronal death *Neuron*, **14**(2), 303-15.
- Groves, J.T. (1999) Peroxynitrite: reactive, invasive and enigmatic *Curr Opin Chem Biol*, **3**(2), 226-35.
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M. and Davenport, K. (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**(4), 1264-300.
- Guthrie, C. and Fink, G.R. (1991). *Guide to Yeast genetics and Molecular biology.*, San Diego.
- Hacki, J., Egger, L., Monney, L., Conus, S., Rosse, T., Fellay, I. and Borner, C. (2000) Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2 *Oncogene*, **19**(19), 2286-95.
- Halachmi, D. and Eilam, Y. (1996) Elevated cytosolic free Ca<sup>2+</sup> concentrations and massive Ca<sup>2+</sup> accumulation within vacuoles, in yeast mutant lacking PMR1, a homolog of Ca<sup>2+</sup> -ATPase *FEBS Lett*, **392**(2), 194-200.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview *Methods Enzymol*, **186**, 1-85.
- Hamburger, D., Egerton, M. and Riezman, H. (1995) Yeast Gaa1p is required for attachment of a completed GPI anchor onto proteins *J Cell Biol*, **129**(3), 629-39.
- Hanada, M., Aime-Sempe, C., Sato, T. and Reed, J.C. (1995) Structure-function analysis of Bcl-2 protein. Identification of conserved domains important for homodimerization with Bcl-2 and heterodimerization with Bax *J Biol Chem*, **270**(20), 11962-9.
- Haselbeck, A. and Schekman, R. (1986) Interorganelle transfer and glycosylation of yeast invertase in vitro *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**(7), 2017-21.
- He, H., Lam, M., McCormick, T.S. and Distelhorst, C.W. (1997) Maintenance of calcium homeostasis in the endoplasmic reticulum by Bcl-2 *J Cell Biol*, **138**(6), 1219-28.
- Helenius, A. and Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans *Science*, **291**(5512), 2364-9.
- Helliwell, S.B., Howald, I., Barbet, N. and Hall, M.N. (1998a) TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae* *Genetics*, **148**(1), 99-112.
- Helliwell, S.B., Schmidt, A., Ohya, Y. and Hall, M.N. (1998b) The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton *Curr Biol*, **8**(22), 1211-4.
- Herscovics, A. and Orlean, P. (1993) Glycoprotein biosynthesis in yeast *Faseb J*, **7**(6), 540-50.
- Herskowitz, I. (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and more *Cell*, **80**(2), 187-97.
- Hirano, H., Tanaka, K., Ozaki, K., Imamura, H., Kohno, H., Hihara, T., Kameyama, T., Hotta, K., Arisawa, M., Watanabe, T., Qadota, H., Ohya, Y. and Takai, Y. (1996) ROM7/BEM4 encodes a novel protein that interacts with the Rho1p small GTP-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell Biol*, **16**(8), 4396-403.
- Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Millman, C.L. and Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis *Cell*, **75**(2), 241-51.
- Huh, G.H., Damsz, B., Matsumoto, T.K., Reddy, M.P., Rus, A.M., Ibeas, J.I., Narasimhan, M.L., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. (2002) Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants *Plant J*, **29**(5), 649-59.
- Hutchins, K. and Bussey, H. (1983) Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1 leads to 6)-beta-D-glucan *J Bacteriol*, **154**(1), 161-9.
- Igual, J.C., Johnson, A.L. and Johnston, L.H. (1996) Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity *Embo J*, **15**(18), 5001-13.
- Inoue, S.B., Qadota, H., Arisawa, M., Watanabe, T. and Ohya, Y. (1999) Prenylation of Rho1p is required for activation of yeast 1, 3-beta-glucan synthase *J Biol Chem*, **274**(53), 38119-24.
- Irie, K., Araki, H. and Oshima, Y. (1991) A new protein kinase, SSP31, modulating the SMP3 gene-product involved in plasmid maintenance in *Saccharomyces cerevisiae* *Gene*, **108**(1), 139-44.

- Irie, K., Takase, M., Lee, K.S., Levin, D.E., Araki, H., Matsumoto, K. and Oshima, Y. (1993) MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C *Mol Cell Biol*, **13**(5), 3076-83.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations *J Bacteriol*, **153**(1), 163-8.
- Iwawaki, T., Hosoda, A., Okuda, T., Kamigori, Y., Nomura-Furuwatari, C., Kimata, Y., Tsuru, A. and Kohno, K. (2001) Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress *Nat Cell Biol*, **3**(2), 158-64.
- James, C., Gschmeissner, S., Fraser, A. and Evan, G.I. (1997) CED-4 induces chromatin condensation in *Schizosaccharomyces pombe* and is inhibited by direct physical association with CED-9 *Curr Biol*, **7**(4), 246-52.
- Jamora, C., Dennert, G. and Lee, A.S. (1996) Inhibition of tumor progression by suppression of stress protein GRP78/BiP induction in fibrosarcoma B/C10ME *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(15), 7690-4.
- Jamsa, E., Simonen, M. and Makarow, M. (1994) Selective retention of secretory proteins in the yeast endoplasmic reticulum by treatment of cells with a reducing agent *Yeast*, **10**(3), 355-70.
- Johnson, S., Michalak, M., Opas, M. and Eggleton, P. (2001) The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space *Trends Cell Biol*, **11**(3), 122-9.
- Joza, N., Susin, S.A., Daugas, E., Stanford, W.L., Cho, S.K., Li, C.Y., Sasaki, T., Elia, A.J., Cheng, H.Y., Ravagnan, L., Ferri, K.F., Zamzami, N., Wakeham, A., Hakem, R., Yoshida, H., Kong, Y.Y., Mak, T.W., Zuniga-Pflucker, J.C., Kroemer, G. and Penninger, J.M. (2001) Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death *Nature*, **410**(6828), 549-54.
- Jungmann, J. and Munro, S. (1998) Multi-protein complexes in the cis Golgi of *Saccharomyces cerevisiae* with alpha-1,6-mannosyltransferase activity *Embo J*, **17**(2), 423-34.
- Jurgensmeier, J.M., Krajewski, S., Armstrong, R.C., Wilson, G.M., Oltersdorf, T., Fritz, L.C., Reed, J.C. and Otilie, S. (1997) Bax- and Bak-induced cell death in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* *Mol Biol Cell*, **8**(2), 325-39.
- Kamada, Y., Qadota, H., Python, C.P., Anraku, Y., Ohya, Y. and Levin, D.E. (1996) Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase *J Biol Chem*, **271**(16), 9193-6.
- Kane, D.J., Sarafian, T.A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Ord, T. and Bredesen, D.E. (1993) Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species *Science*, **262**(5137), 1274-7.
- Kang, J.J., Schaber, M.D., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Litwack, G., Hall, D.J. and Bjornsti, M.A. (1999) Cascades of mammalian caspase activation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *J Biol Chem*, **274**(5), 3189-98.
- Kanik-Ennulat, C. and Neff, N. (1990) Vanadate-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* show alterations in protein phosphorylation and growth control *Mol Cell Biol*, **10**(3), 898-909.
- Kanik-Ennulat, C., Montalvo, E. and Neff, N. (1995) Sodium orthovanadate-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* show defects in Golgi-mediated protein glycosylation, sporulation and detergent resistance *Genetics*, **140**(3), 933-43.
- Kapteyn, J.C., Ram, A.F., Groos, E.M., Kollar, R., Montijn, R.C., Van Den Ende, H., Llobell, A., Cabib, E. and Klis, F.M. (1997) Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content *J Bacteriol*, **179**(20), 6279-84.
- Kapteyn, J.C., Van Egmond, P., Sievi, E., Van Den Ende, H., Makarow, M. and Klis, F.M. (1999) The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient mutants *Mol Microbiol*, **31**(6), 1835-44.
- Katayama, T., Imaizumi, K., Sato, N., Miyoshi, K., Kudo, T., Hitomi, J., Morihara, T., Yoneda, T., Gomi, F., Mori, Y., Nakano, Y., Takeda, J., Tsuda, T., Itoyama, Y., Murayama, O., Takashima, A., St George-Hyslop, P., Takeda, M. and Tohyama, M. (1999) Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response *Nat Cell Biol*, **1**(8), 479-85.
- Kaufman, R.J. (1999) Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls *Genes Dev*, **13**(10), 1211-33.
- Kelekar, A. and Thompson, C.B. (1998) Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis *Trends Cell Biol*, **8**(8), 324-30.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics *Br J Cancer*, **26**(4), 239-57.
- Ketela, T., Green, R. and Bussey, H. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway *J Bacteriol*, **181**(11), 3330-40.

- Khan, A.A., Soloski, M.J., Sharp, A.H., Schilling, G., Sabatini, D.M., Li, S.H., Ross, C.A. and Snyder, S.H. (1996) Lymphocyte apoptosis: mediation by increased type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor *Science*, **273**(5274), 503-7.
- Kirsch, D.G., Doseff, A., Chau, B.N., Lim, D.S., de Souza-Pinto, N.C., Hansford, R., Kastan, M.B., Lazebnik, Y.A. and Hardwick, J.M. (1999) Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c *J Biol Chem*, **274**(30), 21155-61.
- Kitanaka, C., Namiki, T., Noguchi, K., Mochizuki, T., Kagaya, S., Chi, S., Hayashi, A., Asai, A., Tsujimoto, Y. and Kuchino, Y. (1997) Caspase-dependent apoptosis of COS-7 cells induced by Bax overexpression: differential effects of Bcl-2 and Bcl-xL on Bax-induced caspase activation and apoptosis *Oncogene*, **15**(15), 1763-72.
- Klis, F.M. (1994) Review: cell wall assembly in yeast *Yeast*, **10**(7), 851-69.
- Kluck, R.M., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M., Naiem, S., Yaffe, M.P., Margoliash, E., Bredesen, D., Mauk, A.G., Sherman, F. and Newmeyer, D.D. (2000) Determinants of cytochrome c pro-apoptotic activity. The role of lysine 72 trimethylation *J Biol Chem*, **275**(21), 16127-33.
- Knop, M., Hauser, N. and Wolf, D.H. (1996) N-Glycosylation affects endoplasmic reticulum degradation of a mutated derivative of carboxypeptidase yscY in yeast *Yeast*, **12**(12), 1229-38.
- Kohno, H., Tanaka, K., Mino, A., Umikawa, M., Imamura, H., Fujiwara, T., Fujita, Y., Hotta, K., Qadota, H., Watanabe, T., Ohya, Y. and Takai, Y. (1996) Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae* *Embo J*, **15**(22), 6060-8.
- Korsmeyer, S.J., Wei, M.C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K.J. and Schlesinger, P.H. (2000) Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c *Cell Death Differ*, **7**(12), 1166-73.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T.J., Kirschner, M.W., Kohts, K., Kwiatkowski, D.J. and Williams, L.T. (1997) Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis *Science*, **278**(5336), 294-8.
- Kretsinger, R.H. (1980) Structure and evolution of calcium-modulated proteins *CRC Crit Rev Biochem*, **8**(2), 119-74.
- Kroemer, G. (1997) The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis *Nat Med*, **3**(6), 614-20.
- Kroemer, G. and Reed, J.C. (2000) Mitochondrial control of cell death *Nat Med*, **6**(5), 513-9.
- Kroemer, G. (2001) B709 mitochondrial control of cell death *ScientificWorldJournal*, **1**(1 Suppl 3), 48.
- Kubler, E. and Riezman, H. (1993) Actin and fimbrin are required for the internalization step of endocytosis in yeast *Embo J*, **12**(7), 2855-62.
- Kuno, T., Tanaka, H., Mukai, H., Chang, C.D., Hiraga, K., Miyakawa, T. and Tanaka, C. (1991) cDNA cloning of a calcineurin B homolog in *Saccharomyces cerevisiae* *Biochem Biophys Res Commun*, **180**(2), 1159-63.
- LaMantia, M., Miura, T., Tachikawa, H., Kaplan, H.A., Lennarz, W.J. and Mizunaga, T. (1991) Glycosylation site binding protein and protein disulfide isomerase are identical and essential for cell viability in yeast *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(10), 4453-7.
- Lamaze, C., Fujimoto, L.M., Yin, H.L. and Schmid, S.L. (1997) The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells *J Biol Chem*, **272**(33), 20332-5.
- Langle-Rouault, F. and Jacobs, E. (1995) A method for performing precise alterations in the yeast genome using a recyclable selectable marker *Nucleic Acids Res*, **23**(15), 3079-81.
- Lapinskas, P.J., Cunningham, K.W., Liu, X.F., Fink, G.R. and Culotta, V.C. (1995) Mutations in PMR1 suppress oxidative damage in yeast cells lacking superoxide dismutase *Mol Cell Biol*, **15**(3), 1382-8.
- Lappalainen, P. and Drubin, D.G. (1997) Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo *Nature*, **388**(6637), 78-82.
- Larsson, K., Bohl, F., Sjostrom, I., Akhtar, N., Strand, D., Mechler, B.M., Grabowski, R. and Adler, L. (1998) The *Saccharomyces cerevisiae* SOP1 and SOP2 genes, which act in cation homeostasis, can be functionally substituted by the *Drosophila* lethal(2)giant larvae tumor suppressor gene *J Biol Chem*, **273**(50), 33610-8.
- Latterich, M., Frohlich, K.U. and Schekman, R. (1995) Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes *Cell*, **82**(6), 885-93.
- Laun, P., Pichova, A., Madeo, F., Fuchs, J., Ellinger, A., Kohlwein, S., Dawes, I., Frohlich, K.U. and Breitenbach, M. (2001) Aged mother cells of *Saccharomyces cerevisiae* show markers of oxidative stress and apoptosis *Mol Microbiol*, **39**(5), 1166-73.
- Lazebnik, Y.A., Takahashi, A., Moir, R.D., Goldman, R.D., Poirier, G.G., Kaufmann, S.H. and Earnshaw, W.C. (1995) Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(20), 9042-6.
- Le Stunff, H., Galve-Roperh, I., Peterson, C., Milstien, S. and Spiegel, S. (2002) Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis *J Cell Biol*, **158**(6), 1039-49.

- Leberer, E., Thomas, D.Y. and Whiteway, M. (1997) Pheromone signalling and polarized morphogenesis in yeast *Curr Opin Genet Dev*, **7**(1), 59-66.
- Lee, K.S. and Levin, D.E. (1992) Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog *Mol Cell Biol*, **12**(1), 172-82.
- Lee, K.S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, K. and Levin, D.E. (1993) A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C *Mol Cell Biol*, **13**(5), 3067-75.
- Lehman, K., Rossi, G., Adamo, J.E. and Brennwald, P. (1999) Yeast homologues of tomosyn and lethal giant larvae function in exocytosis and are associated with the plasma membrane SNARE, Sec9 *J Cell Biol*, **146**(1), 125-40.
- Levin, D.E., Bowers, B., Chen, C.Y., Kamada, Y. and Watanabe, M. (1994) Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae* *Cell Mol Biol Res*, **40**(3), 229-39.
- Levin, D.E. and Errede, B. (1995) The proliferation of MAP kinase signaling pathways in yeast *Curr Opin Cell Biol*, **7**(2), 197-202.
- Lewis, M.J., Rayner, J.C. and Pelham, H.R. (1997) A novel SNARE complex implicated in vesicle fusion with the endoplasmic reticulum *Embo J*, **16**(11), 3017-24.
- Ligr, M., Madeo, F., Frohlich, E., Hilt, W., Frohlich, K.U. and Wolf, D.H. (1998) Mammalian Bax triggers apoptotic changes in yeast *FEBS Lett*, **438**(1-2), 61-5.
- Lillie, S.H. and Brown, S.S. (1994) Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae* *J Cell Biol*, **125**(4), 825-42.
- Lin, K.T., Xue, J.Y., Lin, M.C., Spokas, E.G., Sun, F.F. and Wong, P.Y. (1998) Peroxynitrite induces apoptosis of HL-60 cells by activation of a caspase-3 family protease *Am J Physiol*, **274**(4 Pt 1), C855-60.
- Liu, G.Y., Chen, K.J., Lin-Shiau, S.Y. and Lin, J.K. (1999) Peroxyacetyl nitrate-induced apoptosis through generation of reactive oxygen species in HL-60 cells *Mol Carcinog*, **25**(3), 196-206.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. and Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c *Cell*, **86**(1), 147-57.
- Locke, E.G., Bonilla, M., Liang, L., Takita, Y. and Cunningham, K.W. (2000) A homolog of voltage-gated Ca(2+) channels stimulated by depletion of secretory Ca(2+) in yeast *Mol Cell Biol*, **20**(18), 6686-94.
- Lodder, A.L., Lee, T.K. and Ballester, R. (1999) Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae* *Genetics*, **152**(4), 1487-99.
- Ludovico, P., Sousa, M.J., Silva, M.T., Leao, C. and Corte-Real, M. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* commits to a programmed cell death process in response to acetic acid *Microbiology*, **147**(Pt 9), 2409-15.
- Lussier, M., Sdicu, A.M., Ketela, T. and Bussey, H. (1995) Localization and targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* Kre2p/Mnt1p alpha 1,2-mannosyltransferase to a medial-Golgi compartment *J Cell Biol*, **131**(4), 913-27.
- Lussier, M., Sdicu, A.M., Camirand, A. and Bussey, H. (1996) Functional characterization of the YUR1, KTR1, and KTR2 genes as members of the yeast KRE2/MNT1 mannosyltransferase gene family *J Biol Chem*, **271**(18), 11001-8.
- Lussier, M., White, A.M., Sheraton, J., di Paolo, T., Treadwell, J., Southard, S.B., Horenstein, C.I., Chen-Weiner, J., Ram, A.F., Kapteyn, J.C., Roemer, T.W., Vo, D.H., Bondoc, D.C., Hall, J., Zhong, W.W., Sdicu, A.M., Davies, J., Klis, F.M., Robbins, P.W. and Bussey, H. (1997) Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae* *Genetics*, **147**(2), 435-50.
- Madeo, F., Frohlich, E. and Frohlich, K.U. (1997) A yeast mutant showing diagnostic markers of early and late apoptosis *J Cell Biol*, **139**(3), 729-34.
- Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H. and Frohlich, K.U. (1999) Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast *J Cell Biol*, **145**(4), 757-67.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S. and Frohlich, K.U. (2002) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast *Mol Cell*, **9**(4), 911-7.
- Mancini, M., Machamer, C.E., Roy, S., Nicholson, D.W., Thornberry, N.A., Casciola-Rosen, L.A. and Rosen, A. (2000) Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis *J Cell Biol*, **149**(3), 603-12.
- Manners, D.J., Masson, A.J. and Patterson, J.C. (1973a) The structure of a beta-(1 leads to 3)-D-glucan from yeast cell walls *Biochem J*, **135**(1), 19-30.
- Manners, D.J., Masson, A.J., Patterson, J.C., Bjorndal, H. and Lindberg, B. (1973b) The structure of a beta-(1--6)-D-glucan from yeast cell walls *Biochem J*, **135**(1), 31-6.

- Manning, B.D., Padmanabha, R. and Snyder, M. (1997) The Rho-GEF Rom2p localizes to sites of polarized cell growth and participates in cytoskeletal functions in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Biol Cell*, **8**(10), 1829-44.
- Martinou, J.C. and Green, D.R. (2001) Breaking the mitochondrial barrier *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**(1), 63-7.
- Matheos, D.P., Kingsbury, T.J., Ahsan, U.S. and Cunningham, K.W. (1997) Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* *Genes Dev*, **11**(24), 3445-58.
- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J.A., Nielsen, J.B. and Foor, F. (1995) Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase *Mol Cell Biol*, **15**(10), 5671-81.
- Mazzoni, C., Zarov, P., Rambourg, A. and Mann, C. (1993) The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae* *J Cell Biol*, **123**(6 Pt 2), 1821-33.
- McCullough, K.D., Martindale, J.L., Klotz, L.O., Aw, T.Y. and Holbrook, N.J. (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state *Mol Cell Biol*, **21**(4), 1249-59.
- McMaster, C.R. and Bell, R.M. (1994) Phosphatidylcholine biosynthesis via the CDP-choline pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Multiple mechanisms of regulation *J Biol Chem*, **269**(20), 14776-83.
- Medema, J.P., Toes, R.E., Scaffidi, C., Zheng, T.S., Flavell, R.A., Melief, C.J., Peter, M.E., Ofringa, R. and Krammer, P.H. (1997) Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis *Eur J Immunol*, **27**(12), 3492-8.
- Minn, A.J., Kettlun, C.S., Liang, H., Kelekar, A., Vander Heiden, M.G., Chang, B.S., Fesik, S.W., Fill, M. and Thompson, C.B. (1999) Bcl-xL regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and -independent mechanisms *Embo J*, **18**(3), 632-43.
- Miyake, H., Hara, I., Arakawa, S. and Kamidono, S. (2000) Stress protein GRP78 prevents apoptosis induced by calcium ionophore, ionomycin, but not by glycosylation inhibitor, tunicamycin, in human prostate cancer cells *J Cell Biochem*, **77**(3), 396-408.
- Montague, J.W., Hughes, F.M., Jr. and Cidlowski, J.A. (1997) Native recombinant cyclophilins A, B, and C degrade DNA independently of peptidylprolyl cis-trans-isomerase activity. Potential roles of cyclophilins in apoptosis *J Biol Chem*, **272**(10), 6677-84.
- Montijn, R.C., van Rinsum, J., van Schagen, F.A. and Klis, F.M. (1994) Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain *J Biol Chem*, **269**(30), 19338-42.
- Morash, S.C., McMaster, C.R., Hjelmstad, R.H. and Bell, R.M. (1994) Studies employing *Saccharomyces cerevisiae* *cpt1* and *ept1* null mutants implicate the CPT1 gene in coordinate regulation of phospholipid biosynthesis *J Biol Chem*, **269**(46), 28769-76.
- Morin-Ganet, M.N., Rambourg, A., Deitz, S.B., Franzusoff, A. and Kepes, F. (2000) Morphogenesis and dynamics of the yeast Golgi apparatus *Traffic*, **1**(1), 56-68.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T. and Yasuhiko, Y. (2002) An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12 *J Biol Chem*, **277**(37), 34287-94.
- Mouyna, I., Monod, M., Fontaine, T., Henrissat, B., Lechenne, B. and Latge, J.P. (2000) Identification of the catalytic residues of the first family of beta(1-3)glucanosyltransferases identified in fungi *Biochem J*, **347 Pt 3**, 741-7.
- Mulholland, J., Preuss, D., Moon, A., Wong, A., Drubin, D. and Botstein, D. (1994) Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane *J Cell Biol*, **125**(2), 381-91.
- Muller, E.M., Locke, E.G. and Cunningham, K.W. (2001) Differential regulation of two Ca(2+) influx systems by pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae* *Genetics*, **159**(4), 1527-38.
- Mullins, C., Meyer, H.A., Hartmann, E., Green, N. and Fang, H. (1996) Structurally related Spc1p and Spc2p of yeast signal peptidase complex are functionally distinct *J Biol Chem*, **271**(46), 29094-9.
- Nakagawa, T. and Yuan, J. (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis *J Cell Biol*, **150**(4), 887-94.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B.A. and Yuan, J. (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta *Nature*, **403**(6765), 98-103.
- Nakamura, K., Bossy-Wetzel, E., Burns, K., Fadel, M.P., Lozyk, M., Goping, I.S., Opas, M., Bleackley, R.C., Green, D.R. and Michalak, M. (2000) Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis *J Cell Biol*, **150**(4), 731-40.
- Nicholson, D.W. and Thornberry, N.A. (1997) Caspases: killer proteases *Trends Biochem Sci*, **22**(8), 299-306.
- Nickas, M.E. and Yaffe, M.P. (1996) BRO1, a novel gene that interacts with components of the Pkc1p-mitogen-activated protein kinase pathway in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell Biol*, **16**(6), 2585-93.

- Nigro, J.M., Sikorski, R., Reed, S.I. and Vogelstein, B. (1992) Human p53 and CDC2Hs genes combine to inhibit the proliferation of *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell Biol*, **12**(3), 1357-65.
- Nikoloff, D.M. and Henry, S.A. (1991) Genetic analysis of yeast phospholipid biosynthesis *Annu Rev Genet*, **25**, 559-83.
- Niwa, M., Sidrauski, C., Kaufman, R.J. and Walter, P. (1999) A role for presenilin-1 in nuclear accumulation of Ire1 fragments and induction of the mammalian unfolded protein response *Cell*, **99**(7), 691-702.
- Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., Mino, A. and Takai, Y. (1995) A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* *Embo J*, **14**(23), 5931-8.
- Novick, P. and Schekman, R. (1979) Secretion and cell-surface growth are blocked in a temperature-sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae* *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**(4), 1858-62.
- Novick, P., Field, C. and Schekman, R. (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway *Cell*, **21**(1), 205-15.
- Novick, P., Ferro, S. and Schekman, R. (1981) Order of events in the yeast secretory pathway *Cell*, **25**(2), 461-9.
- Nuoffer, C., Jenö, P., Conzelmann, A. and Riezman, H. (1991) Determinants for glycosphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* GAS1 protein to the plasma membrane *Mol Cell Biol*, **11**(1), 27-37.
- O'Connor, M., Salzman, A.L. and Szabo, C. (1997) Role of peroxynitrite in the protein oxidation and apoptotic DNA fragmentation in vascular smooth muscle cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide and interferon-gamma *Shock*, **8**(6), 439-43.
- Ohsumi, Y., Kitamoto, K. and Anraku, Y. (1988) Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion *J Bacteriol*, **170**(6), 2676-82.
- Okorokov, L.A., Lichko, L.P., Kadomtseva, V.M., Kholodenko, V.P., Titovsky, V.T. and Kulaev, I.S. (1977) Energy-dependent transport of manganese into yeast cells and distribution of accumulated ions *Eur J Biochem*, **75**(2), 373-7.
- Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y. and Takai, Y. (1996) Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae* *Embo J*, **15**(9), 2196-207.
- Pagny, S., Cabanes-Macheteau, M., Gillikin, J.W., Leborgne-Castel, N., Lerouge, P., Boston, R.S., Faye, L. and Gomord, V. (2000) Protein recycling from the Golgi apparatus to the endoplasmic reticulum in plants and its minor contribution to calreticulin retention *Plant Cell*, **12**(5), 739-56.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S. and Rapoport, T.A. (1995) Posttranslational protein transport into the endoplasmic reticulum *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **60**, 31-40.
- Papa, S. and Skulachev, V.P. (1997) Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging *Mol Cell Biochem*, **174**(1-2), 305-19.
- Parks, J.K., Smith, T.S., Trimmer, P.A., Bennett, J.P., Jr. and Parker, W.D., Jr. (2001) Neurotoxic Aβ peptides increase oxidative stress in vivo through NMDA-receptor and nitric-oxide-synthase mechanisms, and inhibit complex IV activity and induce a mitochondrial permeability transition in vitro *J Neurochem*, **76**(4), 1050-6.
- Patil, C. and Walter, P. (2001) Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals *Curr Opin Cell Biol*, **13**(3), 349-55.
- Patton, J.L., Pessoa-Brandao, L. and Henry, S.A. (1995) Production and reutilization of an extracellular phosphatidylinositol catabolite, glycerophosphoinositol, by *Saccharomyces cerevisiae* *J Bacteriol*, **177**(12), 3379-85.
- Philip, B. and Levin, D.E. (2001) Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1 *Mol Cell Biol*, **21**(1), 271-80.
- Pinton, P., Ferrari, D., Magalhaes, P., Schulze-Osthoff, K., Di Virgilio, F., Pozzan, T. and Rizzuto, R. (2000) Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells *J Cell Biol*, **148**(5), 857-62.
- Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P. and Vai, M. (1997) Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae* *J Bacteriol*, **179**(2), 463-9.
- Popolo, L. and Vai, M. (1999) The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker *Biochim Biophys Acta*, **1426**(2), 385-400.
- Possel, H., Noack, H., Augustin, W., Keilhoff, G. and Wolf, G. (1997) 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation *FEBS Lett*, **416**(2), 175-8.
- Poster, J.B. and Dean, N. (1996) The yeast VRG4 gene is required for normal Golgi functions and defines a new family of related genes *J Biol Chem*, **271**(7), 3837-45.
- Potenza, M., Bowser, R., Muller, H. and Novick, P. (1992) SEC6 encodes an 85 kDa soluble protein required for exocytosis in yeast *Yeast*, **8**(7), 549-58.

- Pryer, N.K., Wuestehube, L.J. and Schekman, R. (1992) Vesicle-mediated protein sorting *Annu Rev Biochem*, **61**, 471-516.
- Qadota, H., Python, C.P., Inoue, S.B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D.E. and Ohya, Y. (1996) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase *Science*, **272**(5259), 279-81.
- Qi, H., Li, T.K., Kuo, D., Nur, E.K.A. and Liu, L.F. (2003) Inactivation of Cdc13p triggers MEC1-dependent apoptotic signals in yeast *J Biol Chem*, **278**(17), 15136-41.
- Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B.M., Errede, B. and Levin, D.E. (1999) Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Cell Biol*, **19**(6), 3969-76.
- Ram, A.F., Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Caro, L.H., Douwes, J.E., Baginsky, W., Mazur, P., van den Ende, H. and Klis, F.M. (1998) Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity *J Bacteriol*, **180**(6), 1418-24.
- Rambourg, A., Clermont, Y. and Kepes, F. (1993) Modulation of the Golgi apparatus in *Saccharomyces cerevisiae* sec7 mutants as seen by three-dimensional electron microscopy *Anat Rec*, **237**(4), 441-52.
- Rambourg, A., Clermont, Y., Ovtracht, L. and Kepes, F. (1995) Three-dimensional structure of tubular networks, presumably Golgi in nature, in various yeast strains: a comparative study *Anat Rec*, **243**(3), 283-93.
- Rambourg, A., Jackson, C.L. and Clermont, Y. (2001) Three dimensional configuration of the secretory pathway and segregation of secretion granules in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *J Cell Sci*, **114**(Pt 12), 2231-9.
- Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F. and Riezman, H. (1993) end3 and end4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae* *J Cell Biol*, **120**(1), 55-65.
- Ravindranath, V. and Reed, D.J. (1990) Glutathione depletion and formation of glutathione-protein mixed disulfide following exposure of brain mitochondria to oxidative stress *Biochem Biophys Res Commun*, **169**(3), 1075-9.
- Reed, D.J. (1990) Glutathione: toxicological implications *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **30**, 603-31.
- Rippo, M.R., Malisan, F., Ravagnan, L., Tomassini, B., Condo, I., Costantini, P., Susin, S.A., Rufini, A., Todaro, M., Kroemer, G. and Testi, R. (2000) GD3 ganglioside directly targets mitochondria in a bcl-2-controlled fashion *Faseb J*, **14**(13), 2047-54.
- Rodrigues, C.M., Sola, S., Silva, R. and Brites, D. (2000) Bilirubin and amyloid-beta peptide induce cytochrome c release through mitochondrial membrane permeabilization *Mol Med*, **6**(11), 936-46.
- Roos, N. (1988) A possible site of calcium regulation in rat exocrine pancreas cells: an X-ray microanalytical study *Scanning Microsc*, **2**(1), 323-9.
- Rothblatt, J.A., Deshaies, R.J., Sanders, S.L., Daum, G. and Schekman, R. (1989) Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast *J Cell Biol*, **109**(6 Pt 1), 2641-52.
- Rothman, J.E. (1994) Mechanisms of intracellular protein transport *Nature*, **372**(6501), 55-63.
- Rudolph, H.K., Antebi, A., Fink, G.R., Buckley, C.M., Dorman, T.E., LeVitre, J., Davidow, L.S., Mao, J.I. and Moir, D.T. (1989) The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca<sup>2+</sup> ATPase family *Cell*, **58**(1), 133-45.
- Ryser, S., Vial, E., Magnenat, E., Schlegel, W. and Maundrell, K. (1999) Reconstitution of caspase-mediated cell-death signalling in *Schizosaccharomyces pombe* *Curr Genet*, **36**(1-2), 21-8.
- Sahara, S., Aoto, M., Eguchi, Y., Imamoto, N., Yoneda, Y. and Tsujimoto, Y. (1999) Acinus is a caspase-3-activated protein required for apoptotic chromatin condensation *Nature*, **401**(6749), 168-73.
- Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S. (1998) Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis *Nature*, **391**(6662), 96-9.
- Sambrook, J.F. (1990) The involvement of calcium in transport of secretory proteins from the endoplasmic reticulum *Cell*, **61**(2), 197-9.
- Sambrook, J.F.M., T. and Fritsch, E.F. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor.
- Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S., Iwama, N., Boise, L.H., Thompson, C.B., Golemis, E., Fong, L., Wang, H.G. and et al. (1994) Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(20), 9238-42.
- Schekman, R. and Orci, L. (1996) Coat proteins and vesicle budding *Science*, **271**(5255), 1526-33.
- Schmidt, A., Kunz, J. and Hall, M.N. (1996) TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(24), 13780-5.
- Schmidt, A., Bickle, M., Beck, T. and Hall, M.N. (1997) The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2 *Cell*, **88**(4), 531-42.
- Schmidt, A., Beck, T., Koller, A., Kunz, J. and Hall, M.N. (1998) The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease *Embo J*, **17**(23), 6924-31.

- Schmidt, A. and Hall, M.N. (1998) Signaling to the actin cytoskeleton *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 305-38.
- Schulz, J.B., Weller, M. and Klockgether, T. (1996) Potassium deprivation-induced apoptosis of cerebellar granule neurons: a sequential requirement for new mRNA and protein synthesis, ICE-like protease activity, and reactive oxygen species *J Neurosci*, **16**(15), 4696-706.
- Serrano, R. (1988) Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi *Biochim Biophys Acta*, **947**(1), 1-28.
- Severin, F.F. and Hyman, A.A. (2002) Pheromone induces programmed cell death in *S. cerevisiae* *Curr Biol*, **12**(7), R233-5.
- Sheu, Y.J., Santos, B., Fortin, N., Costigan, C. and Snyder, M. (1998) Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis *Mol Cell Biol*, **18**(7), 4053-69.
- Singer-Kruger, B. and Ferro-Novick, S. (1997) Use of a synthetic lethal screen to identify yeast mutants impaired in endocytosis, vacuolar protein sorting and the organization of the cytoskeleton *Eur J Cell Biol*, **74**(4), 365-75.
- Singh, K.K., Russell, J., Sigala, B., Zhang, Y., Williams, J. and Keshav, K.F. (1999) Mitochondrial DNA determines the cellular response to cancer therapeutic agents *Oncogene*, **18**(48), 6641-6.
- Skulachev, V.P. (1996) Why are mitochondria involved in apoptosis? Permeability transition pores and apoptosis as selective mechanisms to eliminate superoxide-producing mitochondria and cell *FEBS Lett*, **397**(1), 7-10.
- Slater, A.F., Stefan, C., Nobel, I., van den Dobbelsteen, D.J. and Orrenius, S. (1995) Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis *Toxicol Lett*, **82-83**, 149-53.
- Sogaard, M., Tani, K., Ye, R.R., Geromanos, S., Tempst, P., Kirchhausen, T., Rothman, J.E. and Sollner, T. (1994) A rab protein is required for the assembly of SNARE complexes in the docking of transport vesicles *Cell*, **78**(6), 937-48.
- Sollner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J.E. (1993) SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion *Nature*, **362**(6418), 318-24.
- Springer, S. and Schekman, R. (1998) Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs *Science*, **281**(5377), 698-700.
- Steller, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide *Science*, **267**(5203), 1445-9.
- Strayle, J., Pozzan, T. and Rudolph, H.K. (1999) Steady-state free Ca<sup>2+</sup> in the yeast endoplasmic reticulum reaches only 10 microM and is mainly controlled by the secretory pathway pump pmr1 *Embo J*, **18**(17), 4733-43.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M.C., Alzari, P.M. and Kroemer, G. (1999a) Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process *J Exp Med*, **189**(2), 381-94.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. and Kroemer, G. (1999b) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor *Nature*, **397**(6718), 441-6.
- Susin, S.A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., Costantini, P., Ferri, K.F., Irinopoulou, T., Prevost, M.C., Brothers, G., Mak, T.W., Penninger, J., Earnshaw, W.C. and Kroemer, G. (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis *J Exp Med*, **192**(4), 571-80.
- Sutterlin, C., Doering, T.L., Schimmoller, F., Schroder, S. and Riezman, H. (1997) Specific requirements for the ER to Golgi transport of GPI-anchored proteins in yeast *J Cell Sci*, **110** ( Pt 21), 2703-14.
- Suzuki, C.K., Bonifacino, J.S., Lin, A.Y., Davis, M.M. and Klausner, R.D. (1991) Regulating the retention of T-cell receptor alpha chain variants within the endoplasmic reticulum: Ca<sup>2+</sup>-dependent association with BiP *J Cell Biol*, **114**(2), 189-205.
- Szabo, C. and Ohshima, H. (1997) DNA damage induced by peroxynitrite: subsequent biological effects *Nitric Oxide*, **1**(5), 373-85.
- Tachibana, C. and Stevens, T.H. (1992) The yeast EUG1 gene encodes an endoplasmic reticulum protein that is functionally related to protein disulfide isomerase *Mol Cell Biol*, **12**(10), 4601-11.
- Tachikawa, H., Miura, T., Katakura, Y. and Mizunaga, T. (1991) Molecular structure of a yeast gene, PDI1, encoding protein disulfide isomerase that is essential for cell growth *J Biochem (Tokyo)*, **110**(2), 306-13.
- Takahashi, T., Shimoi, H. and Ito, K. (2001) Identification of genes required for growth under ethanol stress using transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Genet Genomics*, **265**(6), 1112-9.
- Takehige, K. and Minakami, S. (1979) NADH- and NADPH-dependent formation of superoxide anions by bovine heart submitochondrial particles and NADH-ubiquinone reductase preparation *Biochem J*, **180**(1), 129-35.
- Tanaka, K. and Takai, Y. (1998) Control of reorganization of the actin cytoskeleton by Rho family small GTP-binding proteins in yeast *Curr Opin Cell Biol*, **10**(1), 112-6.

- Tao, W., Kurschner, C. and Morgan, J.I. (1997) Modulation of cell death in yeast by the Bcl-2 family of proteins *J Biol Chem*, **272**(24), 15547-52.
- te Heesen, S., Janetzky, B., Lehle, L. and Aebi, M. (1992) The yeast WBP1 is essential for oligosaccharyl transferase activity in vivo and in vitro *Embo J*, **11**(6), 2071-5.
- TerBush, D.R. and Novick, P. (1995) Sec6, Sec8, and Sec15 are components of a multisubunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae* *J Cell Biol*, **130**(2), 299-312.
- Torres, L., Martin, H., Garcia-Saez, M.I., Arroyo, J., Molina, M., Sanchez, M. and Nombela, C. (1991) A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants *Mol Microbiol*, **5**(11), 2845-54.
- Tsien, R.Y. (1989) Fluorescent probes of cell signaling *Annu Rev Neurosci*, **12**, 227-53.
- Turrens, J.F., Alexandre, A. and Lehninger, A.L. (1985) Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria *Arch Biochem Biophys*, **237**(2), 408-14.
- Tzagoloff, A., Akai, A. and Needleman, R.B. (1975) Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defects in mitochondrial ATPase and respiratory enzymes *J Biol Chem*, **250**(20), 8228-35.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding, H.P. and Ron, D. (2000) Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1 *Science*, **287**(5453), 664-6.
- Van Rinsum, J., Klis, F.M. and van den Ende, H. (1991) Cell wall glucomannoproteins of *Saccharomyces cerevisiae* *mnn9* *Yeast*, **7**(7), 717-26.
- Vieira, H.L., Haouzi, D., El Hamel, C., Jacotot, E., Belzacq, A.S., Brenner, C. and Kroemer, G. (2000) Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator *Cell Death Differ*, **7**(12), 1146-54.
- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C. and Philippsen, P. (1997) Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae* *Yeast*, **13**(11), 1065-75.
- Wadskog, I., Maldener, C., Proksch, A., Madeo, F. and Adler, L. (2004) Yeast lacking the SRO7/SOP1 encoded tumor suppressor homologue shows increased susceptibility to apoptosis-like cell death on exposure to NaCl stress *Mol Biol Cell*.
- Wei, Y., Chen, J., Rosas, G., Tompkins, D.A., Holt, P.A. and Rao, R. (2000) Phenotypic screening of mutations in *Pmr1*, the yeast secretory pathway Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>-ATPase, reveals residues critical for ion selectivity and transport *J Biol Chem*, **275**(31), 23927-32.
- White, M.J., Lopes, J.M. and Henry, S.A. (1991) Inositol metabolism in yeasts *Adv Microb Physiol*, **32**, 1-51.
- Wilson, D.W., Wilcox, C.A., Flynn, G.C., Chen, E., Kuang, W.J., Henzel, W.J., Block, M.R., Ullrich, A. and Rothman, J.E. (1989) A fusion protein required for vesicle-mediated transport in both mammalian cells and yeast *Nature*, **339**(6223), 355-9.
- Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Buttner, S., Engelhardt, S.M., Decker, T., Link, A., Proksch, A., Rodrigues, F., Corte-Real, M., Frohlich, K.U., Manns, J., Cande, C., Sigrist, S.J., Kroemer, G. and Madeo, F. (2004) An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast *J Cell Biol*, **166**(7), 969-74.
- Wong, A., Yang, J., Cavadini, P., Gellera, C., Lonnerdal, B., Taroni, F. and Cortopassi, G. (1999) The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis *Hum Mol Genet*, **8**(3), 425-30.
- Wysocki, R. and Kron, S.J. (2004) Yeast cell death during DNA damage arrest is independent of caspase or reactive oxygen species *J Cell Biol*, **166**(3), 311-6.
- Yamamoto, K., Fujii, R., Toyofuku, Y., Saito, T., Koseki, H., Hsu, V.W. and Aoe, T. (2001) The KDEL receptor mediates a retrieval mechanism that contributes to quality control at the endoplasmic reticulum *Embo J*, **20**(12), 3082-91.
- Yamochi, W., Tanaka, K., Nonaka, H., Maeda, A., Musha, T. and Takai, Y. (1994) Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae* *J Cell Biol*, **125**(5), 1077-93.
- Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T. and Tohyama, M. (2001) Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress *J Biol Chem*, **276**(17), 13935-40.
- Zapun, A., Jakob, C.A., Thomas, D.Y. and Bergeron, J.J. (1999) Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum *Structure Fold Des*, **7**(8), R173-82.
- Zha, H., Fisk, H.A., Yaffe, M.P., Mahajan, N., Herman, B. and Reed, J.C. (1996) Structure-function comparisons of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells *Mol Cell Biol*, **16**(11), 6494-508.
- Zhang, X.D., Franco, A.V., Nguyen, T., Gray, C.P. and Hersey, P. (2000) Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells *J Immunol*, **164**(8), 3961-70.

- Zhao, C., Jung, U.S., Garrett-Engle, P., Roe, T., Cyert, M.S. and Levin, D.E. (1998) Temperature-induced expression of yeast FKS2 is under the dual control of protein kinase C and calcineurin *Mol Cell Biol*, **18**(2), 1013-22.
- Zheng, T.S. (2001) Death by design: the big debut of small molecules *Nat Cell Biol*, **3**(2), E43-6.
- Ziman, M., Chuang, J.S. and Schekman, R.W. (1996) Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway *Mol Biol Cell*, **7**(12), 1909-19.