

**Molekularbiologische und physiologische  
Untersuchungen zum Hexosetransport unter  
Hungerbedingungen der Hefe  
*Saccharomyces cerevisiae***

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**vorgelegt von  
Stefanie Krampe  
aus Mülheim an der Ruhr**

**Düsseldorf**

**2001**

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. C. P. Hollenberg

Korreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 9.7.2001

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	8
1.1	Fermentation von Zuckern zu Alkohol.....	8
1.2	Hexosetransport-Familie der Hefe .....	10
1.3	Transkriptionelle Regulation der <i>HXT</i> -Gene .....	11
1.3.1	Glukoserepressionsweg .....	12
1.3.2	Glukosederepressions- und Glukoseinduktionsweg .....	13
1.4	Posttranskriptionelle Regulation der Hexosetransporter .....	15
1.4.1	Endozytischer Abbau von Plasmamembranproteinen .....	16
1.4.2	Hunger-induzierte Autophagozytose von zytoplasmatischen Proteinen.....	17
1.5	Konstruktion eines optimierten Hefestamms.....	18
2	Material und Methoden .....	19
2.1	Stämme und Medien .....	19
2.1.1	Bakterienstämme .....	19
2.1.2	Medien und Anzucht von <i>E. coli</i> .....	19
2.1.3	Hefestämme.....	20
2.1.4	Medien und Anzucht von Hefestämmen .....	22
2.2	Plasmide.....	23
2.3	Genbank .....	24
2.4	Synthetische Oligonukleotide .....	24
2.5	Antikörper .....	28
2.6	Chemikalien und Material.....	28
2.7	Enzyme.....	29
2.8	Transformation .....	29
2.8.1	Transformation von <i>E. coli</i> .....	29
2.8.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	29
2.9	Präparation von DNA.....	29
2.9.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	29
2.9.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	30

2.10	Enzymatische Modifikation von DNA.....	30
2.10.1	DNA-Restriktion.....	30
2.10.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	30
2.10.3	Ligation .....	30
2.11	DNA-Amplifizierung mittels PCR .....	30
2.12	RT-PCR.....	31
2.13	Gen-Deletionen in <i>S. cerevisiae</i> .....	31
2.14	Fusion von DNA-Fragmenten.....	32
2.14.1	Herstellung eines <i>HXT7</i> -GFP-Fusionskonstruktes.....	32
2.14.2	Herstellung eines Hxt7-Hxt1-Hybrids .....	33
2.14.3	Konstruktion einer C-terminalen Deletionsmutante von Hxt7 .....	33
2.14.4	Konstruktion einer N-terminalen Deletionsmutante von Hxt7 .....	34
2.15	Klonierung von DNA-Fragmenten durch <i>in vivo</i> -Rekombination.....	34
2.15.1	Re-Integration des <i>HXT7</i> -Promotors in Chromosom IV und VI .....	35
2.16	<i>In vitro</i> -Mutagenese von <i>HXT7</i> .....	35
2.17	DNA-Sequenzierung.....	36
2.18	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten.....	36
2.19	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	36
2.20	DNA-Aufreinigung von PCR-Produkten .....	36
2.21	Präparation von RNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	37
2.22	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	37
2.23	Genom-weite Transkriptionsanalyse mittels „Microarrays“ .....	37
2.24	Herstellung von Proteinextrakten aus <i>S. cerevisiae</i> .....	38
2.25	Präparation der Membranproteinfraktion aus <i>S. cerevisiae</i> .....	38
2.26	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	39
2.27	Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE.....	39
2.28	Immunologischer Nachweis von Proteinen („Western Blotting“ ).....	39
2.29	Bestimmung der Fermentations- und Glukoseverbrauchsrate .....	40
2.29.1	Bestimmung der Ethanolkonzentration .....	40
2.29.2	Bestimmung der Glukosekonzentration .....	40

2.30	Messung der Glukoseaufnahme .....	41
2.31	Mikroskopische Untersuchungen .....	41
3	Ergebnisse .....	42
3.1	Glukoseaufnahme unter Stickstoffhungerbedingungen in Anwesenheit verschiedener Kohlenstoffquellen .....	42
3.2	Glukoseaufnahme eines <i>HXT7</i> -Einzelexpressionsstamms unter Stickstoffhungerbedingungen .....	43
3.3	Proteinstabilität von Hxt6/7 und Hxt1 unter Hungerbedingungen .....	44
3.4	Signalauslösung des schnellen Abbaus von Hxt6/7 .....	46
3.4.1	Induktion des Proteinabbaus in Anwesenheit einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle und bei Stickstoffhunger .....	46
3.4.2	Rgt2 ist nicht an der Übermittlung des Abbausignals beteiligt .....	47
3.4.3	Induktion des Proteinabbaus von Hxt6/7 durch Rapamycin .....	48
3.5	Abbau von Hxt6/7 in der Vakuole .....	49
3.6	Internalisierung von Hxt6/7 mittels Endozytose .....	50
3.7	Lokalisierung eines Hxt7-GFP-Fusionsproteins unter Hungerbedingungen .....	51
3.8	Ubiquitinierung als Signal für den Abbau von Hxt6/7 .....	53
3.9	Beteiligung von Autophagozytoseproteinen am Abbauprozess von Hxt6/7 .....	54
3.10	Mögliche Beteiligung von Aut2 und Aut3 an der Endozytose .....	55
3.11	Lokalisierung eines Hxt7-GFP-Fusionsproteins in Endozytose- und Autophagozytosemutanten .....	56
3.12	Stabilität weiterer Proteine unter Stickstoffhungerbedingungen in Autophagozytosemutanten .....	59
3.13	Stabilität von GLUT1 <sup>V69M</sup> in Hefe unter Hungerbedingungen .....	60
3.14	GLUT1 <sup>V69M</sup> -vermittelte Glukoseaufnahme in Hefe unter Hungerbedingungen .....	62
3.15	Lokalisierung eines GLUT1-GFP-Fusionsproteins in Hefe unter Hungerbedingungen ....	63
3.16	Konstruktion eines unter Hungerbedingungen stabilisierten Hexosetransporters .....	64
3.16.1	Untersuchung der Pentapeptidmotive E/DXKXX .....	64
3.16.2	Austausch des C-Terminus von Hxt7 gegen den C-Terminus von Hxt1 .....	66
3.16.3	Deletion des C-Terminus von Hxt7 .....	68
3.16.4	Austausch des Serinrestes 259 von Hxt7 .....	69

3.16.5	Deletion des N-Terminus von Hxt7 .....	71
3.17	Glukoseaufnahme des <i>Hxt7ΔN<sup>2-56</sup>-HA</i> -Einzelexpressionsstamms unter Hungerbedingungen.....	72
3.18	Fermentationskapazität des <i>Hxt7ΔN<sup>2-56</sup>-HA</i> -Einzelexpressionsstamms unter Hungerbedingungen.....	74
3.18.1	Ethanolproduktion des <i>Hxt7ΔN<sup>2-56</sup>-HA</i> -Einzelexpressionsstamms .....	74
3.18.2	Ethanolproduktion des <i>HXT7ΔN<sup>2-56</sup>-HA</i> -Einzelexpressionsstamms bei Überexpression von <i>HXT7ΔN<sup>2-56</sup>-HA</i> .....	75
3.19	Glukoseverbrauch des <i>HXT7ΔN<sup>2-56</sup>-HA</i> -Einzelexpressionsstamms unter Hungerbedingungen.....	77
3.20	Existenz eines noch unbekanntem Glukosetransporters in <i>S. cerevisiae</i> .....	79
3.20.1	Re-Integration des <i>HXT7</i> -Promotors in den <i>hxf</i> -Stamm .....	80
3.21	Resistenz des <i>hxf Δsnf3</i> -Stammes gegen 2-DOG.....	81
3.22	Isolierung von „multi-copy“-Suppressoren, die den Wachstumsdefekt des <i>hxf</i> -Stamms auf Glukose komplementieren .....	82
3.23	Identifizierung des unbekanntem Glukosetransporters durch Deletion weiterer potentieller Regulatorproteine bzw. Transporter .....	85
3.23.1	Deletion weiterer Komponenten der <i>HXT</i> -Genregulationswege .....	85
3.23.2	Deletion möglicher Glukosetransporter bzw. deren Regulatoren.....	87
3.24	„Screening“ des gesamten Hefegenoms nach einem durch Snf3 reprimierten Gen .....	89
4	Diskussion.....	93
4.1	Abbaumechanismus von Hxt6/7.....	93
4.1.1	Endozytose der Hexosetransporter Hxt6/7 .....	93
4.1.2	Abbau der Hexosetransporter Hxt6/7 in der Vakuole.....	94
4.1.3	Ubiquitinierung der Hexosetransporter Hxt6/7 .....	94
4.1.4	Beteiligung von Aut2 und Aut3 am Abbau der Hexosetransporter Hxt6/7 .....	97
4.1.5	Auslösung des Abbausignals .....	99
4.2	Potentielle Internalisierungssequenzen von Hxt7.....	100
4.2.1	Untersuchung der Pentapeptidmotive E/DXKXX von Hxt7 .....	102
4.2.2	Veränderungen des C-Terminus von Hxt7.....	102
4.2.3	Austausch des Serinrestes 259 von Hxt7 .....	102

4.2.4	Deletion des N-Terminus von Hxt7 .....	103
4.3	Glukoseaufnahme und Ethanolproduktion eines <i>HXT7ΔN<sup>2-56</sup>-HA</i> -Einzelexpressionsstamms unter Hungerbedingungen .....	104
4.4	Existenz eines unbekanntes Glukosetransporters .....	107
4.4.1	Regulation des Glukosetransporters .....	107
4.4.2	Möglicherweise kann der Transporter Glukose exportieren.....	109
4.4.3	Ena1 als putativer Glukosetransporter .....	110
5	Zusammenfassung.....	111
6	Literaturverzeichnis .....	112
7	Abkürzungsverzeichnis .....	125

## 1 EINLEITUNG

Seit der Jungsteinzeit verwendet die Menschheit unwissentlich Mikroorganismen für die Herstellung von Nahrungsmitteln wie Wein, Bier und Brot. Doch erst im 19. Jahrhundert beobachtete Cagniard-Latour (1836), dass bei der Weinbereitung ein lebender Organismus für die Umsetzung des Zuckers zu Ethanol verantwortlich ist: die Wein-, Bier- und Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Neben einigen neuen Anwendungsgebieten, wie der Einsatz als Modellorganismus in der Forschung oder für die biotechnologische Produktion von Fremdproteinen, wird die Hefe auch heute noch für die Produktion von Lebensmitteln genutzt. Eine garantierte, gleichbleibende Produktqualität und die Produktionseffizienz sind heutzutage von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Jedoch tritt bei industriellen Großproduktionen von Wein, Bier und Backhefe durch Nährstofflimitierung nahezu immer eine Hungerphase der Hefe auf, die die Fermentationsrate und somit auch die Wirtschaftlichkeit der Produktion beeinflusst.

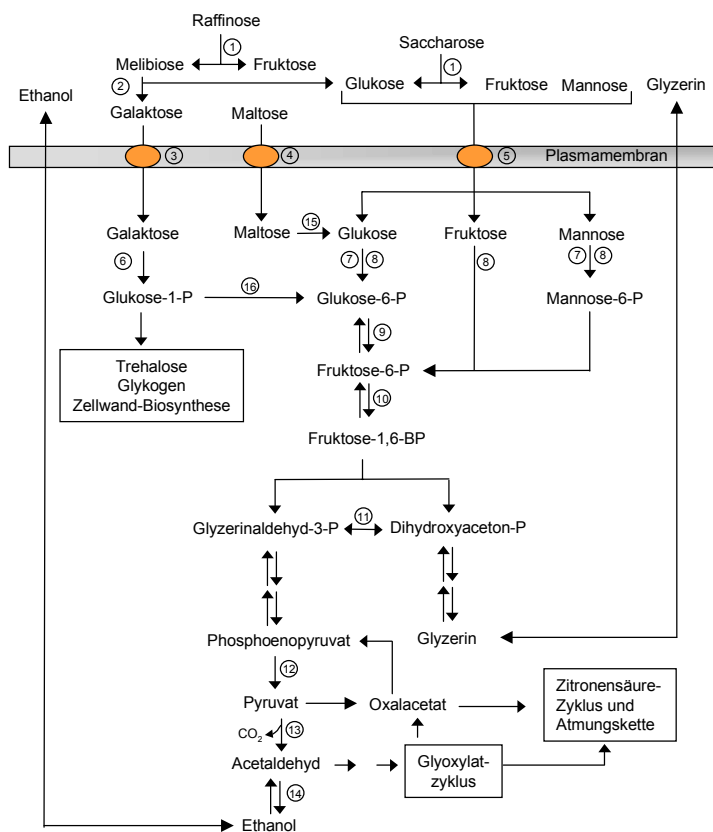
Diese Arbeit wurde im Rahmen eines EU-geförderten Projektes mit dem Titel "Optimisation of bioproductivity by engineering the response of yeast to starvation" durchgeführt. Im Wesentlichen sollten in diesem Projekt die Mechanismen identifiziert werden, die für die Abnahme der Fermentationskapazität der Hefe unter Hungerbedingungen verantwortlich sind. Die Reaktionen der Hefe auf Hunger wurden bisher kaum untersucht. Daher umfasste das EU-Projekt zahlreiche Bereiche, in denen unterschiedliche Arbeitsgruppen u. a. den Zuckertransport, die Regulation der Glykolyse, die Aufnahme von Aminosäuren sowie die Mobilisierung der Speicherkohlenhydrate Trehalose und Glykogen untersuchten. Der Schwerpunkt der hier vorgelegten Arbeit beruht auf der Untersuchung des Hexosetransports der Hefe unter Hungerbedingungen. Durch die gewonnen Erkenntnisse sollte schließlich ein Hefestamm konstruiert werden, der unter industriellen Bedingungen eine höhere Fermentationsrate gewährleistet und so die Bioproduktivität industrieller Prozesse verbessert.

### 1.1 Fermentation von Zuckern zu Alkohol

Die Hefe *S. cerevisiae* ist in der Lage, die verschiedensten Zucker sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen nahezu vollständig zu Ethanol und Kohlendioxid zu vergären (Lagunas, 1986). Nur in Anwesenheit niedriger Glukosekonzentrationen oder nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquellen wie z. B. Ethanol und Glycerin erfolgt der Energiegewinn respiratorisch über den Zitronensäurezyklus und die Atmungskette. Die Monosaccharide Glukose,



Fruktose, Mannose werden mittels der Hexosetransporter und Galaktose mittels der Galaktosepermease über die Plasmamembran in die Zelle importiert (Abb. 1). Die Maltoseaufnahme erfolgt über die Maltosepermease. Die anderen Disaccharide Saccharose und Melibiose und die Trisaccharide Raffinose und Maltotriose werden zunächst extrazellulär hydrolysiert und anschließend in die Zelle transportiert (Barnett, 1981). Die aufgenommenen Zucker werden dann über die Glykolyse, Pyruvatdecarboxylase und Alkoholdehydrogenase zu Ethanol und Kohlendioxid fermentiert.



**Abb. 1: Darstellung der einleitenden Stoffwechselwege der Zuckeraufnahme und -verwertung der Hefe.** Wichtige Enzyme der Fermentation sind durch Nummern gekennzeichnet: 1: Invertase (*SUC1-5/7*); 2:  $\alpha$ -Galaktosidase (*MEL1-10*); 3: Galaktosepermease (*GAL2*); 4: Maltosepermease (*MALX1*); 5: Hexosetransporter (*HXT1-17*); 6: Enzyme des Leloir-Stoffwechselwegs; 7: Glukokinase (*GLK1*); 8: Hexokinasen (*HXK1, HXK2*); 9: Phosphoglukoisomerase (*PGI1*); 10: Phosphofruktokinase (*PFK1, PFK2*); 11: Triosephosphatisomerase (*TPI1*); 12: Pyruvatkinase (*PYK1, PYK2*); 13: Pyruvatdecarboxylase (*PDC1, PDC5, PDC6*); 14: Alkoholdehydrogenase (*ADH1*); 15:  $\alpha$ -Glukosidase (*MALX2*); 16: Phosphoglukomutase (*PGM1, PGM2*)

Becker und Betz (1972) zeigten, dass die zytoplasmatische Zuckerkonzentration in der Hefe immer äußerst gering ist. Diese Beobachtung führte zu der Schlussfolgerung, dass die Zuckeraufnahme der limitierende Schritt der Glykolyse ist. Die übrigen Schritte der Glykolyse scheinen nicht begrenzend zu wirken (Schaaff et al., 1989). Somit kontrolliert der Zuckertransport vermutlich den glykolytischen Flux und damit auch die Ethanolproduktionsrate (Gancedo und Serrano, 1989).

Industrielle Fermentationsbedingungen unterscheiden sich deutlich von den üblicherweise im Labor verwendeten Bedingungen. So enthält z. B. der bei der Weinbereitung verwendete Traubensaft einen sehr hohen Zuckergehalt, jedoch eine niedrige Stickstoffkonzentration. In der Tat ist der kritischste, und unter



Wieczorke et al., 1999). Die physiologische Aufgabe der Hexosetransporter Hxt8-17 ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Möglicherweise besitzen sie, ähnlich wie Snf3 und Rgt2, eine regulatorische Funktion. Snf3 und Rgt2 sind Sensoren für extrazelluläre Glukosekonzentrationen und können selbst keine Glukose transportieren (Özcan et al., 1996a; Reifenberger et al., 1995). Darüber hinaus unterscheiden sich die Sensoren von den übrigen Hexosetransportproteinen durch einen ungewöhnlich langen C-Terminus, der für ihre regulatorische Aufgabe essentiell ist (Coons et al., 1997; Vagnoli et al., 1998).

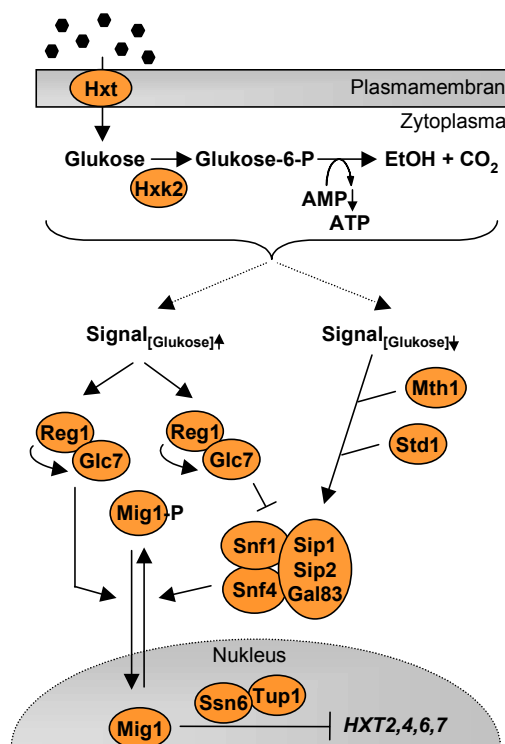
Die zahlreichen Hexosetransportproteine unterscheiden sich ferner in ihren kinetischen Eigenschaften. So existieren einerseits hoch-affine Transporter wie Hxt6 und Hxt7, die schon bei geringen Zuckerkonzentrationen Glukose effizient aufnehmen. Hxt1 ist ein Transporter mit einer niedrigen Affinität zu Glukose, wieder andere besitzen intermediäre Affinitäten. Der Hexosetransporter Hxt2 weist die Besonderheit auf, dass seine Affinität in Abhängigkeit der äußeren Glukosekonzentration moduliert wird (Reifenberger et al., 1997).

### 1.3 Transkriptionelle Regulation der *HXT*-Gene

Die Hefe kann Zucker über einen weiten Konzentrationsbereich effizient aufnehmen und verwerten. Dies erfordert allerdings eine komplexe Regulation der Hexosetransporter in Abhängigkeit der äußeren Glukosekonzentration. So beruht die Expression der *HXT*-Gene auf drei verschiedenen transkriptionellen Regulationsmechanismen: der Repression, der Derepression und der Induktion der *HXT*-Gene. Eine Kombination dieser verschiedenen Signalwege garantiert die Transkription unterschiedlicher *HXT*-Gene in Abhängigkeit der vorherrschenden Glukosekonzentration (Özcan und Johnston, 1995). Die resultierende Expression bestimmter Hexosetransporter steht im Einklang mit ihrer Funktion als niedrig- bzw. hoch-affiner Glukosetransporter. So wird die Transkription des niedrig-affinen Hexosetransporters Hxt1 ( $K_M = 100$  mM) nur durch hohe Glukosekonzentrationen induziert. Hxt3 besitzt mit einem  $K_M$  von 60 mM eine mittlere Affinität. Entsprechend wird die Expression sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Glukosekonzentrationen induziert. Die hoch-affinen Transporter Hxt2, Hxt4, Hxt6 und Hxt7 werden in Anwesenheit niedriger Glukosekonzentrationen dereprimiert, während sie bei hohen reprimiert werden.

### 1.3.1 Glukoserepressionsweg

In Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen wird die Transkription der hoch-affinen Hexosetransporter über den Glukoserepressionsweg gehemmt (Abb. 3) (Bisson, 1988). Neben den *HXT*-Genen werden auch Gene reprimiert, die für Proteine kodieren, die für die Fermentation der Glukose nicht benötigt werden. Das sind z. B. Enzyme, die an der Verwertung alternativer Kohlenstoffquellen beteiligt sind oder Enzyme der Atmungskette, Glukoneogenese und des Zitronensäurezyklus (Entian und Schüller, 1997). Die Frage nach dem auslösenden Signal des Glukoserepressionswegs ist noch ungeklärt. Woods et al. (1994) und Stapleton et al. (1994) postulierten, dass das AMP/ADP:ATP-Verhältnis das Glukosesignal auslöst. Möglicherweise ist aber auch die Glukose selber, die Hexokinase PII (*Hxk2*) oder ein früher Glykolysemetabolit für die Induktion des Glukoserepressionswegs verantwortlich (Gancedo, 1992; De Winde et al., 1996; Meijer et al., 1998).



**Abb. 3: Modell des Glukoserepressionswegs von *S. cerevisiae*.** In Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen wird der links abgebildete Signalweg aktiviert und der Repressor Mig1 hemmt die Transkription Glukose-reprimierter Gene. In Anwesenheit niedriger Glukosekonzentrationen oder in Abwesenheit von Glukose wird der rechts abgebildete Signalweg aktiviert. Durch Phosphorylierung von Mig1 wird der Transkriptionsrepressor inaktiviert und die Repression der entsprechenden Gene aufgehoben.

Wichtige Komponenten des Glukoserepressionswegs sind die Hexokinase PII *Hxk2*, der Snf1-Serin/Threonin-Proteinkinasekomplex aus den Proteinen Snf1, Snf4, Sip1, Sip2 und Gal83 und der DNA-bindende Transkriptionsrepressor Mig1. Die Snf1-Proteinkinase ist wahrscheinlich für die Phosphorylierung des Repressors Mig1 verantwortlich (Yang et al., 1994; Treitel et al., 1998). Der Phosphorylierungszustand von Mig1 bestimmt seine Lokalisation und damit auch seine Aktivität (De Vit et al., 1997).

In Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen wird die Snf1-Proteinkinase vermutlich durch eine Dephosphorylierung inaktiviert (Estruch et al., 1992; Wilson et al., 1996). Da die Proteinphosphatase PP1 eine antagonistische Funktion zu Snf1 ausübt (Tu und Carlson, 1994), ist möglicherweise die PP1 für diese Dephosphorylierung der Snf1-Kinase verantwortlich. Zunächst wird die regulatorische Untereinheit der PP1, Reg1, aktiviert. Reg1 aktiviert wiederum die katalytische Untereinheit Glc7 (Tu und Carlson, 1995). Jiang und Carlson (1996, 1997) postulierten, dass die Aktivität des Snf1-Kinasekomplexes durch die Wechselwirkung von Snf4 mit Snf1 reguliert wird. Durch die Dephosphorylierung wird die Interaktion von Snf1 mit Snf4 verhindert und die Snf1-Kinase wird inaktiviert (Ludin et al., 1998). Die Inaktivierung der Kinase resultiert wiederum in einer Unterphosphorylierung von Mig1 (Treitel und Carlson, 1995). Möglicherweise fördert die PP1 aber auch eine direkte Dephosphorylierung von Mig1 (Treitel et al., 1998). Im dephosphorylierten Zustand ist Mig1 im Nukleus lokalisiert und hemmt in diesem aktiven Zustand die Transkription der Zielgene (De Vit et al., 1997).

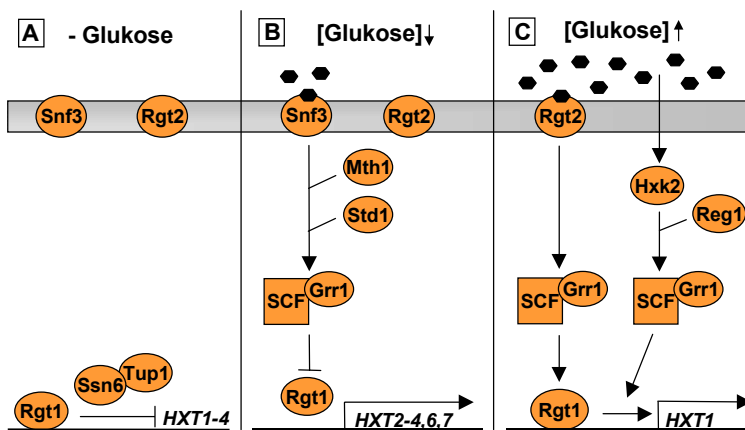
In Anwesenheit niedriger Glukosekonzentrationen liegt die Snf1-Kinase in einem aktiven Zustand vor. Vermutlich bindet Snf4 an die regulatorische Untereinheit von Snf1 und aktiviert so die katalytische Untereinheit der Proteinkinase (Jiang und Carlson, 1996). Die Proteine Std1 und Mth1 sind über einen noch unbekanntem Mechanismus an dieser Aktivierung beteiligt (Flick und Johnston, 1991; Hubbard et al., 1994; Schulte et al., 2000). Eine aktive Snf1-Kinase bewirkt die Phosphorylierung von Mig1. Der phosphorylierte Repressor ist im Zytoplasma lokalisiert und ist somit inaktiv.

### **1.3.2 Glukosederepressions- und Glukoseinduktionsweg**

In Anwesenheit von Glukose werden *HXT*-Gene jedoch nicht nur reprimiert, sondern über einen anderen Signalweg auch dereprimiert bzw. induziert. Anders als bei der Glukoserepression wird bei diesem Signalweg die extrazelluläre Glukose durch die Glukosesensoren Snf3 und Rgt2 wahrgenommen (Özcan et al., 1996a). Snf3 ist für die Derepression der hoch-affinen Glukosetransporter in Anwesenheit niedriger Glukosekonzentrationen essentiell, Rgt2 für die Induktion des niedrig-affinen Hexosetransporters Hxt1 in Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen.

Ein wichtiger Regulator dieses Signalwegs ist Rgt1. Rgt1 verhält sich in Abwesenheit von Glukose als Repressor, in Anwesenheit niedriger Glukosekonzentrationen neutral und bei hohen Glukosekonzentrationen als Aktivator (Özcan et al., 1996b). Die Übermittlung des Signals von den Glukosesensoren zu

dem Transkriptionsregulator Rgt1 wird über den SCF<sup>Grr1</sup>-Komplex vermittelt. SCF-Komplexe setzen sich aus den Proteinen Skp1, Cdc53, Cdc34 und einem variierenden F-Box-Protein, hier Grr1, zusammen. Die Proteine Std1 und Mth1 sind vermutlich nicht nur an dem Glukoserepressionsweg, sondern auch an der Derepression der *HXT*-Gene beteiligt. Aufgrund der variablen Lokalisierung von Std1 und Mth1 wurde für diese Proteine eine Funktion als Signalübermittler von der Plasmamembran zum Nucleus postuliert (Schmidt et al., 1999).



**Abb. 4: Modell des Glukoserepressions- und Glukoseinduktionswegs.** In Abwesenheit von Glukose hemmt Rgt1 die Transkription von *HXT1-4*. In Anwesenheit niedriger Glukosekonzentrationen verhält sich Rgt1 neutral, so dass *HXT2-4, 6 und 7* dereprimiert werden. In Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen aktiviert Rgt1 die Transkription von *HXT1*.

In Abwesenheit von Glukose ist der Derepressionsweg nicht aktiv, folglich werden die Gene *HXT1-4* reprimiert (Abb. 4A). Im Gegensatz dazu werden in Gegenwart niedriger Glukosekonzentrationen *HXT2, 3, 4, 6 und 7* dereprimiert (Abb. 4B). Die transkriptionelle Regulation von *HXT6* und *HXT7* weist jedoch zwei Besonderheiten auf. Zum einen ist der Glukosesensor Snf3 auch an der Vermittlung der Repression der Gene beteiligt (Liang and Gabor, 1996). Zum anderen unterliegen diese Gene im Vergleich zu anderen *HXT*-Genen einer nur sehr geringen Derepression. Allerdings weisen sie auch auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen eine hohe Basalexpression auf (Ciriacy und Reifenberger, 1997). Die Regulation der Induktion des niedrig-affinen Hexosetransporters Hxt1 ist noch weitgehend unerforscht. Özcan et al. (1996b) zeigten, dass in Gegenwart hoher Glukosekonzentrationen Rgt1 die Transkription von *HXT1* aktiviert (Abb. 4C). Jedoch existiert noch ein weiterer, Rgt2-unabhängiger Signalweg über die Komponenten Hxk2 und Reg1 des Glukoserepressionswegs.

## 1.4 Posttranskriptionelle Regulation der Hexosetransporter

Der Hexosetransport wird nicht nur auf Transkriptionsebene reguliert, sondern auch auf posttranskriptioneller Ebene. So ermöglicht die Regulation bereits existierender Proteine der Zelle eine schnelle Anpassung an plötzlich veränderte Umweltbedingungen. Während jedoch posttranskriptionelle Regulationen der Hexosetransportproteine kaum erforscht sind, wurden andere Zuckertransportsysteme bereits detaillierter untersucht. So wird z. B. die Transportaktivität der Maltosepermease einerseits in Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen durch einen Glc7/Reg1-abhängigen Weg inhibiert (Jiang et al., 2000). Andererseits unterliegt die Maltosepermease unter diesen Bedingungen einem proteolytischen Abbau (Lucero et al., 1993; Medintz et al., 1996). Mechanistisch wird die Maltosepermease u. a. mittels Clathrin-vermittelter Endozytose von der Plasmamembran internalisiert und unterliegt einem anschließenden Abbau in der Vakuole (Medintz et al., 1996; Peñalver et al., 1999). Auch andere Proteine, wie die Galaktosepermease (Matern und Holzer, 1977) oder glukoneogenische Enzyme (Gancedo und Gancedo, 1997), werden in Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen über den sogenannten Katabolit-Inaktivierungsprozess abgebaut. Der Begriff Katabolit-Inaktivierung wurde von Holzer (1976) geprägt und bezeichnet die schnelle Inaktivierung von Enzymen nach der Zugabe von Glukose in das Medium.

Posttranskriptionelle Regulationen der Hexosetransporter wurden bisher kaum untersucht. Wendell und Bisson (1993, 1994) beobachteten jedoch eine posttranskriptionelle Inaktivierung von Hxt2: trotz eines hohen Hxt2-Proteinlevels war unter bestimmten Bedingungen keine hoch-affine Glukoseaufnahmeaktivität nachweisbar. Aufklärungsbedarf besteht auch z. B. über die Lieferung sekretorischer Vesikel zur Plasmamembran oder putative Wechselwirkungen der Hxt-Proteine mit den Zucker-phosphorylierenden Enzymen bzw. mit Komponenten der Glykolyse. Ferner wurde bisher die Regulation des Turnovers der Hexosetransporter nur unzureichend untersucht. Es ist bekannt, dass die hoch-affine Glukoseaufnahmekomponente nach Überführung dereprimierter Zellen in Medium mit hohen Glukosekonzentrationen abnimmt (Bisson und Fraenkel, 1984; Ramos et al., 1988). Auch bei Stickstoffhunger oder bei fehlender Proteinsynthese findet eine Inaktivierung des hoch- und des niedrig-affinen Transportsystems statt (Busturia und Lagunas, 1986). Daher postulierten Busturia und Lagunas (1986), dass auch das Glukosetransportsystems einer Katabolit-Inaktivierung unterliegt. Zusammenfassend sprechen diese Beobachtungen dafür, dass das Hexosetransportsystem unter typischen industriellen Fermentationsbedingungen, also in Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen bei gleichzeitigem Stickstoffhunger, einer Inaktivierung unterliegt.

#### 1.4.1 Endozytischer Abbau von Plasmamembranproteinen

Die Endozytose ist nicht nur an der Inaktivierung des Maltose- und des Galaktosetransportsystems beteiligt (Medintz et al., 1996; Horak und Wolf, 1997), sondern voraussichtlich auch an der Inaktivierung der Hexosetransporter (Riballo und Lagunas, 1994; Riballo et al., 1995). Vermutlich ist eine intrazelluläre Proteolyse für die Reduktion der Halbwertszeit der Proteine verantwortlich.

Die meisten Plasmamembranproteine unterliegen einer Endozytose, die in Abhängigkeit der äußeren Wachstumsbedingungen einer strikten Regulation unterliegt. In der Regel werden endozytierte Plasmamembranproteine zur Vakuole geliefert und dort abgebaut. Einige Proteine werden aber auch wiederverwendet, indem sie erneut zur Plasmamembran transportiert werden („Recycling“) (Ziman et al., 1998). Bei einer Rekrutierung zur Vakuole werden die Proteine zunächst von der Plasmamembran über primäre endozytische Vesikel internalisiert, dann über frühe Endosomen und multivesikuläre, späte Endosomen zur Vakuole geliefert (Abb. 5) (Singer-Krüger et al., 1993; Prescianotto-Baschong und Riezman, 1998). Mittlerweile sind eine Reihe von Proteinen identifiziert worden, die in diesem Transportprozess eine Rolle spielen wie z. B. die GTP-bindenden Proteine Ypt7 und Vps21/Ypt51 (Schimmöller und Riezman, 1993; Singer-Krüger et al., 1994), die PI-3-Kinase Vps34 (Munn und Riezman, 1994), das Dynamin-Homolog Dnm1 (Gammie et al., 1995), Vps2/Ren1 und Vps4/End13 (Davis et al., 1993; Munn und Riezman, 1994). Wie jedoch der Transport der Proteine zwischen den endozytischen Kompartimenten erfolgt ist noch unbekannt. Nach dem Reifungsmodell es gibt keine prä-existierenden frühen und späten Endosomen (Munn, 2000). Die primären endozytischen Vesikel reifen erst zu frühen Endosomen, dann zu späten Endosomen, indem sie kontinuierlich mit sekretorischen Vesikeln fusionieren und parallel Vesikel abschnüren. Alternativ erfolgt der Transfer des endozytierten Materials durch einen vesikulären Transport. Frühe und späte Endosomen sind prä-existierende Kompartimente, die durch fortlaufende Knospung und Fusion von Vesikeln die endozytierten Proteine zur Vakuole liefern. Die späten Endosomen können entweder direkt mit der Vakuole fusionieren oder auch hier erfolgt der Transfer über einen vesikulären Transport. Da für den Transfer von Ste2 von der Plasmamembran zu den späten Endosomen die Funktion des sekretorischen Wegs essentiell ist, präferierten Hicke et al. (1997) das Reifungsmodell.

Die Endozytose ist also ein wichtiger Prozess, um den Abbau von Plasmamembranproteinen zu regulieren. Die Signalauslösung für die Induktion der Endozytose ist jedoch bisher nur zum Teil verstanden. So zeigten Kölling und



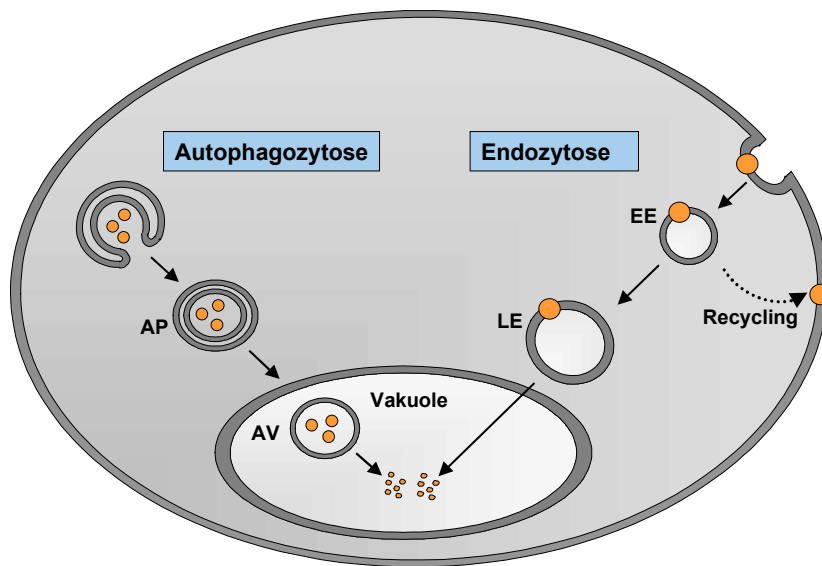
Hollenberg (1994), dass eine Ubiquitinierung von Plasmamembranproteinen ihre Endozytose und den anschließenden Abbau in der Vakuole auslösen kann. Von Bisson et al. (1993) wurde erstmals eine Beteiligung der Phosphorylierung an der Inaktivierung von Zuckertransportproteinen postuliert. Mittlerweile ist bekannt, dass viele Plasmamembranproteine durch Phosphorylierung auf die Ubiquitinierung vorbereitet werden (Hicke und Riezman, 1996; Roth und Davis, 1996). Die Signalsequenzen, die eine Phosphorylierung und Ubiquitinierung von Plasmamembranproteinen auslösen, sind bisher jedoch nur teilweise charakterisiert (Kölling und Losko, 1997; Hicke und Riezman, 1996).

#### **1.4.2 Hunger-induzierte Autophagozytose von zytoplasmatischen Proteinen**

Ein weiterer speziell unter Hungerbedingungen wichtiger Abbauprozess ist die Autophagozytose. Alle eukaryontischen Zellen, von der Hefe bis zu menschlichen Zellen, transportieren bei Nährstoffmangel große Teile ihrer eigenen Bestandteile, insbesondere zytoplasmatische Proteine, in das Lysosom/Vakuole und bauen sie dort ab. Durch diesen Prozess gewinnen die Zellen dringend benötigte Nährstoffe zurück und sichern so ihr Überleben (Hilt und Wolf, 1992).

Der autophagische Weg beginnt mit der Bildung von Zytosol-gefüllten Vesikeln (Autophagosomen), die von zwei Membranlagen umgeben sind (Abb. 5). Die Herkunft der Membranen ist noch ungeklärt. Kim et al. (2001) postulierten, dass das unter Hungerbedingungen induzierte Protein Aut7 (Kirisako et al., 1999, Huang et al., 2000) möglicherweise die Vesikelbildung einleitet. Dafür unterliegt Aut7 zunächst einer Aut2-abhängigen proteolytischen Spaltung (Kirisako et al., 2000) und bildet dann in einer Ubiquitinsystem-ähnlichen Reaktion eine Amidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin von Aut7 und der Aminogruppe eines Phosphatidylethanolamins aus (Ichimura et al., 2000). Durch diese Modifikation wird Aut7 an eine Membran gebunden und könnte so die Vesikelbildung einleiten. Ferner sind Aut1 und ein Konjugationssystem, an dem die Komponenten Apg5, Apg7, Apg10, Apg12, Apg16 beteiligt sind, für die Membranassoziation von Aut7 wichtig (Kim et al., 2001). Die Autophagosomen fusionieren schließlich mit der Vakuole und entlassen ein von einer Membran umschlossenes, autophagisches Vesikel in die Vakuole. Im Inneren der Vakuole werden die autophagischen Vesikel samt ihres zytosolischen Inhalts abgebaut.

Beide Prozesse, Autophagozytose und Endozytose, stellen somit Abbauege dar über die Proteine zur Vakuole geliefert werden. In Abb. 5 sind diese Proteintransportwege schematisch dargestellt.



**Abb. 5: Schematische Darstellung der abbaubenden Proteintransportwege zur Vakuole.** AP: Autophagosom; AV: autophagisches Vesikel; EE: frühes Endosom („early endosome“); LE: spätes Endosom („late endosome“)

## 1.5 Konstruktion eines optimierten Hefestamms

Die Verwendung eines Hefestamms, der optimal an die Fermentationsbedingungen industrieller Produktionen angepasst ist, kann entscheidend zur Verbesserung der Produktionseffizienz und Produktqualität beitragen. Bisher wurden neue Wein- und Bierhefestämme nahezu ausschließlich durch Selektion gewonnen. Ein für industrielle Fermentationen optimal geeigneter Hefestamm sollte möglichst folgende Kriterien erfüllen: eine schnelle physiologische Adaptation an die Fermentationsbedingungen, große Wachstums- und Fermentationskapazität, effiziente Zuckerverwertung, Produktion der gewünschten Aroma-stoffe, Vermeidung von ungewünschten Nebenprodukten und gute Stressresistenz (z. B. hohe Sulfit- und Ethanoltoleranz).

Die Identifizierung der unter Hungerbedingungen inaktivierten Hexosetransporter sowie eine Aufklärung des Inaktivierungsmechanismus sollte die Grundlage für die Herstellung eines nicht mehr inaktivierten Hexosetransportproteins schaffen. Schließlich sollte ein Hefestamm konstruiert werden, der unter Hungerbedingungen eine höhere Hexosetransportaktivität aufweist. Dieser Stamm sollte dann auf seine Fermentationskapazität getestet werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Stämme und Medien

#### 2.1.1 Bakterienstämme

**Tab. 1:** *Escherichia coli* (*E. coli*)

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
DH5 $\alpha$ F'	<i>F'</i> , $\Phi(80dlacZ\Delta M15)\Delta(lacZYA-argF)$ U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17 (r<sub>k</sub><sup>-</sup> m<sub>k</sub><sup>+</sup>) supE44<math>\Delta</math><sup>-</sup> gyrA96 thi-1 relA1</i>	Gibco BRL Gaithersburg, USA
DH10B	<i>F'</i> , <i>mcrA</i> $\Delta$ -( <i>mrr hsdRMS-mcrBC</i> ) $\Phi 80dlacZ\Delta M15 \Delta lacX74$ <i>deoR recA1 ara<math>\Delta</math>139 <math>\Delta</math>(ara, leu)7697 galU galK <math>\lambda</math><sup>-</sup> rpsL endA1 nupG</i>	Gibco BRL Gaithersburg, USA
SURE	<i>e14'(McrA<sup>-</sup>)<math>\Delta</math>(mcrCB-hsdSMR-mrr) 171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan<sup>r</sup>) uvrC [F' proAB lacI<sup>f</sup>Z<math>\Delta</math>M15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)]</i>	Stratagene

#### 2.1.2 Medien und Anzucht von *E. coli*

Vollmedium (LB): 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl, pH 7,5

Für die Selektion auf eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 40  $\mu$ g/ml Ampicillin zugesetzt. Feste Nährmedien enthielten zusätzlich 1,5% Agar, die Anzucht erfolgte bei 37°C.

### 2.1.3 Hefestämme

**Tab. 2:** verwendete Hefestämme (*S. cerevisiae*)

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
23344c	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3</i>	Hein und André, 1997
33089d	<i>MAT<math>\alpha</math> gap1<sup>pgf</sup> (Glu<sup>582</sup> → Lys) ura3</i>	B. André, Brüssel
27002d	<i>MAT<math>\alpha</math> npi2 ura3</i>	Springael et al., 1999a
27038a	<i>MAT<math>\alpha</math> npi1 ura3</i>	Hein et al., 1995
CMY1001	<i>MAT<math>\alpha</math> MAL61/HA MAL12 MAL13 GAL<sup>+</sup> leu2 ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-<math>\Delta</math>63 his3-<math>\Delta</math>200</i>	Medintz et al., 1996
CMY1003	<i>MAT<math>\alpha</math> MAL61/HA MAL12 MAL13 GAL<sup>+</sup> leu2 ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-<math>\Delta</math>63 his3-<math>\Delta</math>200 ren1<math>\Delta</math>::LEU2</i>	Medintz et al., 1996
DBY1689	<i>MAT<math>\alpha</math>, his4-619, ACT<sup>+</sup></i>	Novick & Botstein, 1985
DBY4878	<i>MAT<math>\alpha</math>, his4-619, act1-1</i>	D. Botstein
EBY.18ga	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 <math>\Delta</math>hxt1-17 <math>\Delta</math>gal2 stl1<math>\Delta</math>::loxP agt1<math>\Delta</math>::loxP</i>	Wieczorke et al., 2001
EBY.S7	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 <math>\Delta</math>hxt1-17 <math>\Delta</math>gal2 stl1<math>\Delta</math>::loxP agt1<math>\Delta</math>::loxP ydl247w<math>\Delta</math>::loxP yjr160c<math>\Delta</math>::loxP fgy1-1</i>	Wieczorke et al., 2001
EBY.VW4000	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 <math>\Delta</math>hxt1-17 <math>\Delta</math>gal2 stl1<math>\Delta</math>::loxP agt1<math>\Delta</math>::loxP ydl247w<math>\Delta</math>::loxP yjr160c<math>\Delta</math>::loxP</i>	Wieczorke et al., 1999
EBY.VW5000	<i>VW4000 snf3<math>\Delta</math>::loxP rgt2<math>\Delta</math>::loxP</i>	Wieczorke et al., 1999
JBY01	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 <math>\Delta</math>hxt1-17 <math>\Delta</math>gal2 stl1<math>\Delta</math>::loxP agt1<math>\Delta</math>::loxP ydl247w<math>\Delta</math>::loxP yjr160c<math>\Delta</math>::loxP <math>\Delta</math>phxt3::pHXT7-HXT1</i>	J. Becker, Düsseldorf
JBY02	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 <math>\Delta</math>hxt1-17 <math>\Delta</math>gal2 stl1<math>\Delta</math>::loxP agt1<math>\Delta</math>::loxP ydl247w<math>\Delta</math>::loxP yjr160c<math>\Delta</math>::loxP <math>\Delta</math>phxt3::pHXT7-HXT7</i>	Wieczorke et al., 2001
JBY15	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2 <math>\Delta</math>hxt1-17 <math>\Delta</math>gal2 stl1<math>\Delta</math>::loxP agt1<math>\Delta</math>::loxP ydl247w<math>\Delta</math>::loxP yjr160c<math>\Delta</math>::loxP <math>\Delta</math>phxt3::pHXT7-KIURA3</i>	Wieczorke et al., 2001
RE301A	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 MAL2 SUC2 GAL MEL <math>\Delta</math>hxt3 <math>\Delta</math>hxt6 hxt7 LEU HIS</i>	Reifenberger et al., 1995
RKY#534	<i>MAT<math>\alpha</math> bar1-1 leu2 his4 ura3</i>	R. Kölling, Düsseldorf
RKY#536	<i>MAT<math>\alpha</math> bar1-1 leu2 his4 ura3 end4<sup>ts</sup></i>	R. Kölling, Düsseldorf
RKY#649	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2-3,112 his3-11,15 GAL<sup>+</sup> CAN<sup>s</sup></i>	R. Kölling, Düsseldorf
RKY#826	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 his3-<math>\Delta</math>200 leu2-3,112 trp1-<math>\Delta</math>63 lys2-801 MAL2 SUC2 GAL MEL</i>	R. Kölling, Düsseldorf
RKY#927	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2-3,112 his3-11,15 GAL<sup>+</sup> CAN<sup>s</sup> pre1-1 pre2-2<sup>ts</sup></i>	R. Kölling, Düsseldorf
RKY#969	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 his3-<math>\Delta</math>200 leu2-3,112 trp1-<math>\Delta</math>63 lys2-801 MAL2 SUC2 GAL MEL <math>\Delta</math>pep4::URA3</i>	R. Kölling, Düsseldorf
VW1A CEN.PK2-1C	<i>MAT<math>\alpha</math> leu2-3,112 ura3-52 trp1-289 his3-<math>\Delta</math>1 MAL2-8<sup>c</sup> SUC2</i>	K.-D. Entian, Frankfurt

**Tab. 3:** Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Hefestämme

Stamm	Genotyp	Konstruktion
SKY2	VW1A <i>rgt2Δ::loxP</i>	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit den Primern s1-LRGT2 und s2-RGT2. Verifizierung der Deletion mit den Primern a1- und a4-RGT2.
SKY3	JBY15 <i>Δphxt3::pHXT7- GLUT1<sup>V69M</sup></i>	Amplifizierung des GLUT1 <sup>V69M</sup> -Gens mit kurzen überlappenden Bereichen zum <i>HXT7</i> -Promotor und <i>HXT7</i> -Terminator von dem Plasmid pTV3eGLUT1 <sup>V69M</sup> mit den Primern c1-pH7G1 und c4-pH7G1. Verifizierung der Integration mit den Primern a1-ipH7 und a4-hxt367.
SKY7	VW4000 <i>snf3Δ::loxP</i>	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit den Primern s1-LSNF3 und s2-SNF3. Verifizierung der Deletion mit den Primern a1- und a4-SNF3.
SKY8	VW4000 <i>rgt2Δ::loxP</i>	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit den Primern s1-LRGT2 und s2-RGT2. Verifizierung der Deletion mit den Primern a1- und a4-RGT2.
SKY9	VW4000 <i>Δhtr1::HIS3</i>	Disruption von <i>HTR1</i> durch homologe Rekombination des 2,4 kb großen <i>XmnI/NcoI</i> -Fragments aus dem Vektor pFS21 in den Stamm VW4000.
SKY10k	VW4000 <i>Δrgt1::kanMX</i>	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pFA6-kanMX mit den Primern s1- und s2-RGT1. Verifizierung der Deletion mit den Primern a1- und a4-RGT1.
SKY11k	VW4000 <i>Δphxt3::pkHXT7</i>	Amplifizierung der <i>pkHXT7-kanMX</i> -Kassette von dem Plasmid pUG6-kpHXT7 mit den Primern IntpH7-1 und IntpH7-2.
SKY12k	VW4000 <i>Δhxt10::pkHXT7</i>	Amplifizierung der <i>pkHXT7-kanMX</i> -Kassette von dem Plasmid pUG6-kpHXT7 mit den Primern s1-LH10 und s2-LH10.
SKY13k	VW4000 <i>Δmig1::kanMX</i>	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit den Primern s1- und s2-MIG1. Verifizierung der Deletion mit den Primern a1- und a4-MIG1.
SKY14k	VW4000 <i>Δsko1::kanMX</i>	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit den Primern s1- und s2-SKO1. Verifizierung der Deletion mit den Primern a1- und a4-SKO1.
SKY15k	SKY7 <i>Δyfl054::kanMX</i>	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit den Primern s1- und s2-YFL054. Verifizierung der Deletion mit den Primern a1- und a4-YFL054.
SKY16k	SKY7 <i>Δhal1::kanMX</i>	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit den Primern s1- und s2-HAL1. Verifizierung der Deletion mit den Primern a1- und a4-HAL1.
SKY39	VW1A <i>Δend4::loxP</i>	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit den Primern s1-LEND4 und s2-END4. Verifizierung der Deletion mit den Primern a1- und a4-END4.
SKY41	VW1A <i>Δaut2::loxP</i>	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit den Primern s1- und s2-AUT2. Verifizierung der Deletion mit den Primern a1- und a4-AUT2.
SKY43k	RKY#536 <i>end4<sup>ts</sup></i> <i>Δaut2::kanMX4</i>	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit den Primern s1- und s2-AUT2. Verifizierung der Deletion mit den Primern a1- und a4-AUT2.
SKY51	VW1A <i>Δaut3::loxP</i>	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit den Primern s1- und s2-AUT3. Verifizierung der Deletion mit den Primern a1- und a4-AUT3.

### 2.1.4 Medien und Anzucht von Hefestämmen

---

Vollmedium	YEP	1% Hefeextrakt, 2% Bacto-Pepton, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegebenen Konzentration
Minimalmedium	YNB +N	0,67% YNB w/o amino acids, pH 6,3, Aminosäuren/Nukleobasen-Lösung, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegeben Konzentration
Stickstoffhungermedium	YNB -N	0,17% YNB w/o amino acids & ammonium sulphate, pH 6,3, Kohlenstoffquelle in der jeweils angegeben Konzentration

---

Konzentration der Aminosäuren und Nukleobasen im Medium: Adenin (0,08 mM), Arginin (0,22 mM), Histidin (0,25 mM), Isoleucin (0,44 mM), Leucin (0,44 mM), Lysin (0,35 mM), Methionin (0,26 mM), Phenylalanin (0,29 mM), Tryptophan (0,19 mM), Threonin (0,48 mM), Tyrosin (0,34 mM), Uracil (0,44 mM), Valin (0,49 mM)

Innerhalb dieser Arbeit wurden folgende Kohlenstoffquellen verwendet: Glukose, Raffinose, Maltose und Ethanol. Die Raffinose-Stammlösungen wurden sterilfiltriert, die anderen Kohlenstoffquellen autoklaviert. Feste Nährböden enthielten zusätzlich 1,5% Agar. Zur Selektion auf plasmidhaltige Zellen wurde die jeweilige Aminosäure oder Base nicht hinzu gegeben. Zur Selektion auf Verlust eines Plasmids mit *URA3*-Gen wurden Minimalmediumsplatten verwendet, die neben Uracil 1 mg/ml FOA enthielten. Die Selektion auf Geneticinresistenz erfolgte auf Vollmediumsplatten mit 200 mg/ml G418.

Die Anzucht der Hefezellen erfolgte bei 30°C. Eine Ausnahme bildeten Stämme mit temperatursensitiven Allelen, die bei einer permissiven Temperatur von 25°C und restriktiven Temperatur von 37°C angezogen wurden.

## 2.2 Plasmide

**Tab. 4:** Verwendete Plasmide

Plasmid	Quelle/Referenz
p21-PST	E. Reifenberger, 1995
p426MET25-GFP	J. Makuc, Düsseldorf
p426MET25HXT11	Wieczorke et al., 1999
pFA6-kanMX	Wach et al., 1994
pFS21	F. Schulte, 1997
pSH47	Güldener et al., 1996
pTHXT1-2	E. Reifenberger, 1995
pUG6	Güldener et al., 1996
pUG6-HA	E. Boles, Düsseldorf
pUG6-kpHXT7	E. Boles, Düsseldorf
pTV3eGLUT1 <sup>V69M</sup>	Wieczorke et al., 2001
YCpHXT7a	R. Wieczorke, Düsseldorf
YCpHXT7b	R. Wieczorke, Düsseldorf
YCplac33	Gietz und Sugino, 1988
YEplac195	Gietz und Sugino, 1988
YEprGLUT1-GFP	Wieczorke et al., 2001

**Tab. 5:** Im Rahmen dieser Arbeit konstruierte Plasmide

Plasmid	Beschreibung
YCpHXT7 $\Delta$ C <sup>517-570</sup> -HA	Deletion von 54 C-terminalen Aminosäuren von Hxt7 im Austausch gegen einen HA-Tag. Klonierung des PCR-amplifizierten, verkürzten <i>HXT7</i> -ORFs mit den Primern 1dH7C-HA und UPhom und der <i>HXT7</i> -Terminator-Region mit den Primern 2dH7C-HA und RPhom über homologe Rekombination in den linearisierten Vektor YCplac33 <sup>XbaI/HindIII</sup> .
YCpHXT7 $\Delta$ C1C	Austausch der 56 C-terminalen Aminosäuren von Hxt7 gegen die 56 C-terminalen Aminosäuren von Hxt1. Klonierung des PCR-amplifizierten verkürzten <i>HXT7</i> -ORFs mit den Primern HXT7-1 und RPhom von dem Vektor YCpHXT7b und des PCR-amplifizierten <i>HXT1</i> -Fragments mit den Primern HXT1C und UPhom von dem Vektor pTHXT1-2 über homologe Rekombination in den linearisierten Vektor YCplac33 <sup>BamHI/PstI</sup> .
YCpHXT7GFP	C-terminale Fusion von <i>HXT7</i> mit GFP. Klonierung des PCR-amplifizierten <i>HXT7</i> -ORFs mit den Primern HXT7-C und RPhom von dem Vektor YCpHXT7b und des GFP-ORFs mit den Primern H7-GFP und UPhom von dem Vektor pMET25-GFP über homologe Rekombination in den linearisierten Vektor YCplac33 <sup>BamHI/HindIII</sup> .
YCpHXT7 <sup>D558K</sup>	entspricht YCpHXT7b, jedoch Austausch von Aspartat <sup>558</sup> gegen Lysin in Hxt7 mittels PCR-Mutagenese

YCpHXT7 <sup>E271K</sup>	entspricht YCpHXT7b, jedoch Austausch von Glutamat <sup>271</sup> gegen Lysin in Hxt7 mittels PCR-Mutagenese
YCpHXT7 <sup>S259A</sup>	entspricht YCpHXT7b, jedoch Austausch von Serin <sup>259</sup> gegen Alanin in Hxt7 mittels PCR-Mutagenese
YCpHXT7ΔN <sup>2-56</sup> -HA	Deletion von 55 N-terminalen Aminosäuren von Hxt7 im Austausch gegen einen HA-Tag. Klonierung des PCR-amplifizierten <i>HXT7</i> -Promotors mit den Primern 1dH7N-HA und UPhom und des verkürzten <i>HXT7</i> -ORFs mit den Primern 2dH7N-HA und RPhom über homologe Rekombination in den linearisierten Vektor YCplac33 <sup>XbaI/HindIII</sup> .
YEphXT7ΔN <sup>2-56</sup> -HA	Das 3,33 kb <i>PstI</i> -Fragment des Vektors YCpHXT7ΔN <sup>2-56</sup> -HA wurde in den <i>PstI</i> geschnittenen Vektor YEplac195 kloniert.
YEphXT7a	Das 3,47 kb <i>PstI</i> -Fragment des Vektors YCpHXT7a wurde in den <i>PstI</i> geschnittenen Vektor YEplac195 kloniert.

### 2.3 Genbank

Verwendet wurde eine *S. cerevisiae* DNA-Bank mit chromosomalen Fragmenten des Stammes EBY.VW5000 in dem 2μ-Vektor YEplac195 (Tanja Hamacher, Düsseldorf).

### 2.4 Synthetische Oligonukleotide

**Tab. 6:** Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Oligo	Sequenz (5' → 3')	Beschreibung/Verwendung
1DH7C-HA	AGCGTAGTCTGGAACGTCGTATGG GTAAGTTTCTGGAACAACATAACAAA	Deletion von 54 C-terminalen Aminosäuren von Hxt7 im Austausch gegen HA-Tag
2DH7C-HA	ATACGACGTTCCAGACTACGCTTAA TTTGCGAACACTTTTATTAAT	Deletion von 54 C-terminalen Aminosäuren von Hxt7 im Austausch gegen HA-Tag
1DH7N-HA	AGCGTAGTCTGGAACGTCGTATGG GTACATTTTTGATTAATAAATAAA AAC	Deletion von 55 N-terminalen Aminosäuren von Hxt7 im Austausch gegen HA-Tag
2DH7N-HA	ATACGACGTTCCAGACTACGCTAGA CCAGCTTCTGCCTATGTC	Deletion von 55 N-terminalen Aminosäuren von Hxt7 im Austausch gegen HA-Tag
a1-AUT2	CATTTTCATAGAACGGCTCTTG	Nachweis der <i>aut2</i> -Deletion
a1-AUT3	GCATCTGTTTTCTTTTAACC	Nachweis der <i>aut3</i> -Deletion
a1-dh7p	CACCATGTGGGAAGAAGGTG	Nachweis der <i>HXT7</i> -Promotor-Deletion
a1-ENA125	GATGTAGATTTTGGTCATATAC	Nachweis der <i>ena1-ena2-ena5</i> -Deletion
a1-END4	GCAGTTTGCT TTTATCCCTGTG	Nachweis der <i>end4</i> -Deletion
a1-HAL1	TGACCACGATCACTATATTTAG	Nachweis der <i>hal1</i> -Deletion
a1-HTR1	CTTTGTAATG CGCCTGTAAC	Nachweis der <i>htr1</i> -Deletion (= <i>Δmth1</i> )
a1-HXT10	CTCATCGGCT CCGGAACGCG	Nachweis der <i>Δhxt10::pkHXT7</i> -Promotor-integration
a1-ipH7	ATGCGTGTTGGTAAATATGA AGC	Nachweis der <i>Δhxt367::pkHXT7</i> -Promotor-integration



a1-MIG1	TATAATGGCTTCTCAGGAAACC	Nachweis der <i>mig1</i> -Deletion
a1-RGT1	GAGAAGAGACGCAGGAAGACCAG	Nachweis der <i>rgt1</i> -Deletion
a1-RGT2	GGGTTCCCTGTTCCCTGCATCG	Nachweis der <i>rgt2</i> -Deletion
a1-SKO1	GTCGTACTTAACCGCGCTAGCG	Nachweis der <i>sko1</i> -Deletion
a1-SNF3	TTCCAGCTGATCAACAACCC	Nachweis der <i>snf3</i> -Deletion
a1-YFL054	ATCACACATTGCGGTATTTTCC	Nachweis der <i>yfl054</i> -Deletion
a4-AUT2	ATGCGATTCCATTGAACGATTG	Nachweis der <i>aut2</i> -Deletion
a4-AUT3	TAGCCAAAGGCAAGTACTAAAC	Nachweis der <i>aut3</i> -Deletion
a4-dh7p	GGGAGGCTGAGTCAACAGC	Nachweis der <i>HXT7</i> -Promotor-Deletion
a4-ENA125	CGAGGTCTTTGTAGTACAAAG	Nachweis der <i>ena1-ena2-ena5</i> -Deletion
a4-END4	CCAAATGCCATTGTATCGAAATC	Nachweis der <i>end4</i> -Deletion
a4-HAL1	CGTCTTACGAAATTGGATATAG	Nachweis der <i>hal1</i> -Deletion
a4-HTR1	CTTGGAATTTGGAGCTCCTC	Nachweis der <i>htr1</i> -Deletion (= $\Delta mth1$ )
a4-HX367	CTTGGAACCGCAGGTTCCGC	Nachweis der $\Delta hxt10::pkHXT7$ -Promotorintegration
a4-HXT10	AGGTAGTTGTTATACTACAG	Nachweis der $\Delta hxt367::pkHXT7$ -Promotorintegration
a4-MIG1	CAGTAAAAGTACTAATAAGAGC	Nachweis der <i>mig1</i> -Deletion
a4-RGT1	GCTGTGAAAGAAGAAGGTGCTCCC	Nachweis der <i>rgt1</i> -Deletion
a4-RGT2	GAACCCGGTGATTTAGGAAACC	Nachweis der <i>rgt2</i> -Deletion
a4-SKO1	GTGAAATTATAACGGTATGCTC	Nachweis der <i>sko1</i> -Deletion
a4-SNF3	GTTATACGTGGCTCCTGCAGGAC	Nachweis der <i>snf3</i> -Deletion
a4-YFL054	GGATTACCTAGTTGATGGTGCC	Nachweis der <i>yfl054</i> -Deletion
c1-IHXT7	CCTGCGTGTTCTTCTGAGGTTCC	Integration des <i>HXT7</i> -ORFs hinter den <i>pkHXT7</i> -Promotor
c1-pH7G1	CAAAGAATAAACACAAAAACAAAAA GTTTTTTAATTTAATCAAAAAATGT CTGAATTCAGCAGCAAGAAGG	Integration des GLUT1-ORFs hinter den <i>pkHXT7</i> -Promotor
c4-IHXT7	TTTGTAGACGTGGGTCTGCAGGCA	Integration des <i>HXT7</i> -ORFs hinter den <i>pkHXT7</i> -Promotor
c4-pH7G1	AAGTTTCTTTGTCTCCGTCCCCTCA ACTTTCTGAGAACAAATGATCGACA AATAATAGGTTTAGGTAAGG	Integration des GLUT1-ORFs hinter den <i>pkHXT7</i> -Promotor
HXT7-S259A	GACATTTGTCCAGAGGCCACGT TATTTG	mutagener Primer zum Austausch von Serin <sup>259</sup> gegen Alanin von Hxt7
H7-GFP	GTACAAGAGAATGTTTCAGCACAAA GCGGCCGCTGGTCTGGTATGAG	C-terminale Fusion des <i>HXT7</i> -ORFs mit GFP
HXT7-1	TAATGATAAACCTTTAGTTTCTGGAA CAACTAAC	Austausch des Hxt7-C-Terminus gegen den C-Terminus von Hxt1
HXT71seq	CACTCCATTATTACTGGTG	Sequenzierung des C-Terminus von <i>HXT7C1C</i>
HXT7-C	TTTGGTGCTGAACATTCTCTTG	Amplifizierung des <i>HXT7</i> -ORFs für C-terminale <i>HXT7</i> -Fusionskonstrukte
HXT1C	GAAACTAAAGGTTTATCATTAG	Austausch des Hxt7-C-Terminus gegen den C-Terminus von Hxt1
HXT7-D558K	GAAGTCGGTAAGATCGAAAAGGCCA AACGTTCT	mutagener Primer zum Austausch von Asparat <sup>558</sup> gegen Lysin von Hxt7
HXT7-E271K	ACGACGCTGAAGAAATGACTCACAA AGGACAAGCCATTG	mutagener Primer zum Austausch von Glutamat <sup>271</sup> gegen Lysin von Hxt7
HXT7seq1	TCACCCAGGATGCATTACC	Sequenzierung von <i>HXT7</i>
HXT7seq2	GTTAGTTGTTCCAGAAACTA	Sequenzierung von <i>HXT7</i>

HXT7seq3	ATTCAAATTGCATCTATCAA	Sequenzierung von <i>HXT7</i>
HXT7seq4	TCTTTCGAAACCTCTATTGT	Sequenzierung von <i>HXT7</i>
HXT7seq5	GACTAAAGTACCCCTTAAAT	Sequenzierung von <i>HXT7</i>
HXT7seq6	GATCATGGGTGCTATGATTC	Sequenzierung von <i>HXT7</i>
HXT71seq	CACTCCATTATTACTGGTG	Sequenzierung von <i>HXT7</i>
INTPH7-1	CCTATTCGTCATCGCAGACAGCCTT CATCTTCTCGAGATAACACCTGGAG CGCGCGTTTCGGTGATGACG	Amplifizierung der <i>kanMX-pkHXT7</i> -Kassette von dem Plasmid pUG6-kpHXT7 mit überlappenden Sequenzen zur ursprünglichen <i>HXT3-6-7</i> -Region
INTPH7-2	AAGTTTCTTTGTCTCCGTCCCCTCA ACTTTCTGAGAACAAATGATCCATTT TTTGATTAATAAATAAAAAAC	Amplifizierung der <i>kanMX-pkHXT7</i> -Kassette von dem Plasmid pUG6-kpHXT7 mit überlappenden Sequenzen zur ursprünglichen <i>HXT3-6-7</i> -Region
K2kanMX	TTGTCGCACCTGATTGCCCG	Überprüfung einer Deletion mittels der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Kassette in Kombination mit dem entsprechenden a1-Primer
K3kanMX	TATGGAAGCTGCCTCGGTGAG	Überprüfung einer Deletion mittels der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Kassette in Kombination mit dem entsprechenden a4-Primer
RP	AACAGCTATGACCATG	reverse primer
RPhom	TGTGAGCGGATAACAATTTACACA GGAAACAGCTATGACCATG	überlappende Bereiche zur 5'-flankierenden Region der MCS für <i>in vivo</i> -Rekombination in die Plasmide YEplac195 und YCplac33
s1-AUT2	ATGGACGACTTCTTATCACGTATAG GAGTGATATACATGCAGAGGTGGTT CGTACGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 5'-Region des <i>AUT2</i> -ORFs
s1-AUT3	TGGGAGACATTAATAAATAAAGATCA CACAACCTCTGTGAACCATAATTTCT GTACGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 5'-Region des <i>AUT3</i> -ORFs
s1-dh7p	TACGACGCTGAAGAAATGGCTCACG ATGATAAGCCATTGTACAAGAGCAG CTGAAGCTTCGTACGC	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 5'-Region des <i>HXT7</i> -Promotors
s1-ENA125	GTTAGGGCAGGGATGTAGATTTTGG TCATATACTTTACCTGACAGTTCTG ACGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 5'-Region des <i>ENA1-ENA2-ENA5</i> -Genclusters
s1-HAL1	ATGCATTTCAAAGATTTAGGATTGCA TGACTACACTCTCAAAAACCTTCGTA CGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 5'-Region des <i>HAL1</i> -ORFs
s1-LEND4	ATGTCCAGAATAGATTGATCTGCTGC AGAAAGCGCTTAAAAAGCGTGTTT CGTACGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 5'-Region des <i>END4</i> -ORFs
s1-LH10	ATGGTTAGTTCAGTGTTCATTTT GGGACTAGCGCCAAGGCATCCTT CGTACGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>kanMX-pkHXT</i> -Kassette von dem Plasmid pUG6-kpHXT7 mit überlappenden Sequenzen zur ursprünglichen <i>HXT10</i> -Region.
s1-LRGT2	ATGAACGATAGCCAAAACCTGCCTAC GACAGAGGGAAGAAAATAGTCATTT CGTACGCTGCCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 5'-Region des <i>RGT2</i> -ORFs
s1-LSNF3	ATGGATCCTAATAGTAACAGTTCTA GCGAAACATTACGCCAAGAGAAATT CGTACGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 5'-Region des <i>SNF3</i> -ORFs
s1-MIG1	ATGCAAAGCCCATATCCAATGACAC AAGTGTCTAACGTTGATGATGTTCTG TACGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 5'-Region des <i>MIG1</i> -ORFs
s1-RGT1	AAGAAGCTGTACTTCTCTCAAAC CCAATATATTTCAAATTATGCGTACG CTGCAGGTCGACGG	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pFA6-kanMX mit überlappenden Bereichen zur 5'-Region des <i>RGT1</i> -ORFs
s1-SKO1	ATGTCAAGCGAGGAACGCTCGAGA CAACCAAGTACTGTTCAACTTTTCG	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden

	TACGCTGCAGGTCGAC	den Bereichen zur 5'-Region des <i>SKO1</i> -ORFs
s1-YFL054	ATGAGTTACGAATCTGGGAGGTCAT CCTCCTCTTCCGAGAGTACACTTCG TACGCTGCAGGTCGAC	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 5'-Region des <i>YFL054</i> -ORFs
s2-7H10	AAGCATCAATCCATTATCTGTTGTTA TTTCTGTTTACCAGAGTACCATTTTT TGATTAATAATAAAAAAAC	Amplifizierung der <i>kanMX-pkHXT7</i> -Kassette von dem Plasmid pUG6-kpHXT7 mit überlappenden Sequenzen zur ursprünglichen <i>HXT10</i> -Region.
s2-AUT2	ATATATTAACAAGTATATATGCTT ATGAAGTAGTGAATTCCTTACAGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 3'-Region des <i>AUT2</i> -ORFs
s2-AUT3	ATATAGCAGGTCATTTGTACTTAATA AGAAAACCATATTATGCATCACGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 3'-Region des <i>AUT3</i> -ORFs
s2-dh7p	AAGATGAACCTCAGAAGAACACGCA GGGGCCCGAAATGGTTCCTACGAG GCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 3'-Region des <i>HXT7</i> -Promotors
s2-ENA125	GATAAGGGATGCAAAAGGAAAGGC ACTCAATAAATTGCCCTCCTTAGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 3'-Region des <i>ENA1-ENA2-ENA5</i> -Genclusters
S2-END4	AAATATATTTATATTAACGTTTATCTT TATATATAAAAAGTACAATTCGCATA GGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 3'-Region des <i>END4</i> -ORFs
s2-HAL1	CATAGCAGCGCAGCTAACCGACCC GAAGCTAGTACCAACGAATTTTGCA TAGGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 3'-Region des <i>HAL1</i> -ORFs
s2-MIG1	CTATTGTCTTTTGATTATCTGCACC GCCAAAACTTGTGACGCTAGCATA GGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 3'-Region des <i>MIG1</i> -ORFs
s2-RGT1	TGGTCGTGGACGAAAGTCCTCCTGT CAGGGACATTATGGGCTTATTATCG ATGAATTCGAGCTCG	Amplifizierung der <i>kanMX</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pFA6-kanMX mit überlappenden Bereichen zur 3'-Region des <i>RGT1</i> -ORFs
s2-RGT2	GGGGGAAGTGTATTGGCTGTGCTTA CTAGCGAGGTCACCTCGTCCAATTGC ATAGGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 3'-Region des <i>RGT2</i> -ORFs
s2-SKO1	GAAAGCATCAGATAGAAGACTATTT AAGAACCCCGTCGCTATCTCGGCAT AGGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 3'-Region des <i>SKO1</i> -ORFs
s2-SNF3	TATTTCAAATCATTATTTTCATTTACA GGTTGATTAGTGGCGTTTTTCGCATA GGCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 3'-Region des <i>SNF3</i> -ORFs
s2-YFL054	GAAATTAATAATTAGGTTATAAATCG TAAAAAATTGAAAATTAAGCATAG GCCACTAGTGGATCTG	Amplifizierung der <i>loxP-kanMX-loxP</i> -Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit überlappenden Bereichen zur 3'-Region des <i>YFL054</i> -ORFs
UP	GTAAAACGACGGCCAGT	universal primer
UPhom	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG TTGTA AAAACGACGGCCAGT	überlappende Bereiche zur 3'-flankierenden Region der MCS für <i>in vivo</i> -Rekombination in die Plasmide YEplac195 und YCplac33

## 2.5 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	Quelle/Referenz
anti-GAP1	Polyklonaler Antikörper gegen die generelle Aminosäurepermease Gap1	B. André, Brüssel
anti-GLUT1	Polyklonales Antiserum gegen 12 GLUT1-spezifische Aminosäuren im C-Terminus des humanen Glukosetransporters	Dianova
anti-HA	Monoklonaler Antikörper aus Ratte gegen ein Epitop des Hämagglutinins des humanen Influenzavirus	Roche
anti-HXT1	Polyklonaler Antikörper gegen die Aminosäuren 17-49 des Hexosetransporters Hxt1	Krampe et al., 1998
anti-HXT7	Polyklonaler Antikörper gegen die Aminosäuren 17-47 des Hexosetransporters Hxt7	Krampe et al., 1998
anti-PFK1	Polyklonaler Antikörper gegen die Phosphofruktokinase	J. Heinisch, Düsseldorf
anti-PMA1	Polyklonaler Antikörper gegen die H <sup>+</sup> -ATPase	R. Kölling, Düsseldorf
anti-Kaninchen IgG (H+L) POD-Konjugat	Sekundär-Antikörper aus Kaninchen gekoppelt mit Peroxidase	Dianova
anti-Kaninchen IgG (H+L) AP-Konjugat	Sekundär-Antikörper aus Kaninchen gekoppelt mit alkalischer Phosphatase	Dianova
anti-Ratte IgG POD-Konjugat	Sekundär-Antikörper aus Ratte gekoppelt mit Peroxidase	Roche

## 2.6 Chemikalien und Material

Acros Organics	Fruktose, Gal, Harnstoff, KAc, Lysin, Mal, NaAc
Amersham	D-[ <sup>14</sup> C(U)]-Glukose
Bio-Rad	Bio-Rad Protein Assay, Bio-Spin Chromatography Columns
Braun-Melsungen	Glasperlen 0,45 mm Ø
Caesar & Loretz	Glukose
Calbiochem	G418/Geneticin, Rapamycin
Difco	Bacto Agar, Hefe-Extrakt, Pepton, Trypton, YNB
GibcoBRL	Agarose, Trizol
ICN Radiochemicals	<sup>33</sup> P-dCTP
Janssen Chimica	DMF, DMSO, Ethylenglykol
J.T. Baker	Chloroform, KAc, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MgCl <sub>2</sub> , NaCl, NaOH, PEG4000, RbCl <sub>2</sub> , Sac
Kodak	Röntgenfilme
Life Technologies	Superscript II RT-PCR System
MBI	Lambda-DNA
Merck	Adenin, EDTA, Leucin, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> , TEMED, Uracil
Millipore	Immobilon-N PVDF-Membran
MWG Biotech	Synthetische Oligonukleotide
NEN Life Science	D-[ <sup>14</sup> C(U)]-Glukose
Oxoid	Agar, Bacteriological Peptone, Hefe-Extrakt
PCR Inc. Florida	5-FOA
Pharmacia	dNTP-Mix, T7-Sequencing Kit
Pierce	SuperSignal ULTRA chemiluminescent substrate
Qiagen	QIAquick PCR Purification Kit, Plasmid Mini Kit, Qiaex II Gel Extraction Kit

Research Genetics	Yeast Index GeneFilters Microarrays, MicroHyb
Riedel-deHaën	Essigsäure, Ethanol, Glyoxal, NaN <sub>3</sub> , MeOH
Roche	AP, ATP, Expand High Fidelity PCR System, Lebensmittelanalytik-Kit „Ethanol“, Protease Inhibitoren „Complete“
Roth	DTT, Gel30 Acrylamid, Glycin, Isopropanol, KCl, PEG 1000 und 3350
Serva	APS, BSA, Bicin, CaCl <sub>2</sub> , Comassie brilliant blue G250, Glycerin, Mal, Raf, SDS, Tween20, X-Gal
Sigma	Amp, 2-DOG, EtBr, HMW, IPTG, LiAc, NaI, NBT, ONPG, PMSF, PonceauS, Sorbit, TCA, Tris
Sigma ARK	Synthetische Oligonukleotide
UBC	NaF
Whatman	GF/C Glas-Fiber-Filter
Zinnsser Analytik	Szintillationslösung „Quicksafe A“

## 2.7 Enzyme

Enzym	Quelle
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Gibco oder Roche
T7 Polymerase Sequenzier-Kit	Pharmacia
Reverse Transkriptase (Superscript II)	Life Technologies
T4-Ligase	Roche oder Gibco

## 2.8 Transformation

### 2.8.1 Transformation von *E. coli*

*E. coli* Zellen wurden nach der RbCl-Methode von Hanahan (1985) oder mittels Elektroporation nach der von Dower et al. (1988) und Wirth (1993) beschriebenen Methode transformiert.

### 2.8.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae*-Stämmen erfolgte nach der Gefrier-Methode von Klebe et al. (1983), modifiziert nach Dohmen et al. (1991). Alternativ wurden die Zellen nach der Lithiumacetat-Methode von Gietz und Woods (1994) transformiert.

## 2.9 Präparation von DNA

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

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte nach der Methode von Birnboim und Doly (1979). Hochreine Plasmid-DNA für Sequenzierungen wurde mit dem „Plasmid Mini Kit“ nach Angaben des Herstellers isoliert.

### **2.9.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae***

Die Zellen einer stationären Hefekultur (5 ml) wurden geerntet, gewaschen und in 400 µl Puffer 1 (entnommen aus dem „Plasmid Mini Kit“) resuspendiert. Nach Zugabe von 400 µl Puffer 2 und 2/3 Volumen Glasperlen ( $\varnothing = 0,45$  mm) wurden die Zellen 5 min mit einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen. 0,5 ml Überstand wurden mit 0,25 ml Puffer 3 versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm wurde die Plasmid-DNA mit Isopropanol gefällt, mit 70%igem kaltem Ethanol gewaschen und in Wasser aufgenommen. Die DNA wurde anschließend für eine Transformation in *E. coli* (2.8.1) eingesetzt.

## **2.10 Enzymatische Modifikation von DNA**

### **2.10.1 DNA-Restriktion**

Die sequenzspezifische Spaltung der DNA erfolgte mit 2-5 U Restriktionsenzym pro µg Plasmid-DNA für 2-3 Stunden bei 37°C.

### **2.10.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Die Dephosphorylierung von DNA-Enden erfolgte durch Zugabe von 1 U alkalischer Phosphatase zum Restriktionsansatz und einstündiger Inkubation bei 37°C.

### **2.10.3 Ligation**

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte in Gegenwart von 1 U T4-Ligase bei 4°C für 16 h (überstehende Enden) oder bei RT für 2 h (glatte Enden). Das Insertionsfragment wurde in 3-5-facher Konzentration der Vektor-DNA eingesetzt.

## **2.11 DNA-Amplifizierung mittels PCR**

Die Polymerasekettenreaktion erfolgte mit dem „Expand<sup>TM</sup> High Fidelity PCR System“ nach Angaben des Herstellers. Zu der zu amplifizierenden DNA wurden 0,2 mM dNTP-Mix, 1x Puffer 2, 1 U Polymerase und je 100 pmol der entsprechenden Oligonukleotidprimer zusammengegeben. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (Techne) durchgeführt.

Zur Amplifizierung der DNA wurde folgender Temperaturzyklus verwendet:

1. 4 min, 95°C Denaturierung der DNA
2. 20-35x 40 s, 95°C Denaturierung der DNA  
40 s, 50-55°C Bindung der Primer an die DNA (Annealing)  
1-5 min, 72°C/68°C DNA-Synthese (Elongation)
3. 5 min, 72°C/68°C DNA-Synthese

Nach dem ersten Schritt wurde die Polymerase zugegeben („hot start PCR“). Die Anzahl der Syntheseschritte, die Annealing-Temperatur und die Elongationszeit wurden an die spezifischen Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonukleotide bzw. an die Größe des erwarteten Produkts angepasst. Nach Beendigung der PCR wurden die PCR-Produkte aufgereinigt (2.19, 2.20).

Für eine PCR-Reaktion mit ganzen Hefezellen wurden anstelle von Plasmid-DNA ein bis zwei Hefekolonien mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte abgenommen, in das Reaktionsgefäß gegeben und 2 min in der Mikrowelle erhitzt. Danach wurden die übrigen Komponenten des Ansatzes zugegeben.

## 2.12 RT-PCR

Für eine RT-PCR wurden 0,5-1 µg Gesamt-RNA und 2 µg Oligo-dTs in einem Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt. Die Proben wurden für 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Für die Elongationsreaktion wurden 6 µl 5x First Strand Puffer, 1 µl DTT (0,1 M), 1,5 µl dNTP-Mix (20 mM), 1,5 µl Reverse Transkriptase (Superscript II) und 10 µl <sup>33</sup>P-dCTP (10 mCi/ml) zu der RNA gegeben. Die Probe wurde für 90 min bei 37°C inkubiert. Die synthetisierte cDNA wurde aufgereinigt (2.20) und die Effizienz der <sup>33</sup>P-dCTP-Inkorporation mit einem Szintillationszähler (Beckmann) gemessen.

## 2.13 Gen-Deletionen in *S. cerevisiae*

Die Deletion von Genen wurde, soweit nicht anders beschrieben, mit dem *loxP-kanMX-loxP*/Cre-Rekombinase-System nach Güldener et al. (1996) durchgeführt. Die Deletion wird dabei durch homologe Integration einer *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette in die chromosomale DNA bei gleichzeitiger Deletion des gewünschten Gens erzielt.

In einer PCR-Reaktion (2.11) wurde zunächst die *loxP-kanMX-loxP*-Deletionskassette von dem Plasmid pUG6 mit den entsprechenden

Oligonukleotiden s1 und s2 synthetisiert. Diese 70mere weisen einerseits 48 bp lange überlappende Bereiche zu den 5'- bzw. 3'-flankierenden Sequenzen des zu deletierenden Gens oder zu der zu deletierenden DNA-Region auf und andererseits 22 bp lange überlappende Bereiche zu den *loxP*-flankierenden Sequenzen. Die so amplifizierte Deletionskassetten enthielten folglich neben dem Kanamycin-Resistenzgen auch die überlappenden Bereiche zu dem zu deletierenden Gen. Nach Transformation der Deletionskassetten in die Hefe (2.8.2), erfolgte die Selektion auf Kanamycin-resistente Klone auf G418-haltigem Vollmedium. Die ersten 48 Basenpaare des Gens blieben aufgrund der Wahl der Oligonukleotide bei der Rekombination erhalten. Die Deletion wurde durch PCR mit ganzen Zellen (2.11) unter Verwendung der Oligonukleotidpaare a1/a4, K2-kanMX/a1 oder K3-kanMX/a4 verifiziert.

Das integrierte *kanMX*-Modul kann durch Expression der Cre-Rekombinase durch Rekombination der *loxP*-Stellen wieder effizient exzidiert werden. Die Zellen werden dafür mit dem Plasmid pSH47 transformiert, welches das Gen für das Enzym Cre-Rekombinase unter Kontrolle des induzierbaren *GAL1*-Promotor trägt. Nach einer 2-tägigen Inkubation der Transformanten auf Galaktose- bzw. Maltose-medium wurden die Kolonien auf G418-haltiges Medium replikaplatziert und G418-sensitive Kolonien isoliert. Die Exzision des *kanMX*-Gens wurde unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide in einer PCR überprüft.

## 2.14 Fusion von DNA-Fragmenten

Für eine Fusion von Genen oder DNA-Fragmenten wurden zunächst zwei getrennte PCR-Reaktionen durchgeführt. Eines der amplifizierten PCR-Produkte enthielt eine ca. 25 bp lange überlappende Sequenz zu dem anderen neu-synthetisierten PCR-Produkt. Die PCR-Produkte wurden gereinigt (2.20) und in einer weiteren PCR-Reaktion als DNA-Vorlage eingesetzt. Als Oligonukleotide dienten i. d. R. die Primer RPhom und UPhom, die überlappende Bereiche zu den MCS-flankierenden Sequenzen der Plasmide YCplac33 oder YEplac195 enthalten und so eine *in vivo*-Rekombination der PCR-Produkte in die gewünschte Zielsequenz der linearisierten Vektoren ermöglichen (siehe 2.15).

### 2.14.1 Herstellung eines *HXT7*-GFP-Fusionskonstruktes

Für die Herstellung eines *HXT7*-GFP-Fusionskonstruktes wurde zunächst der *HXT7*-ORF (ohne Stopkodon) inklusive des *HXT7*-Promotors mit den Primern HXT7-C und RP von dem Vektor YCpHXT7b mittels PCR amplifiziert. Parallel wurde der GFP-ORF inklusive eines aus 6 Aminosäuren bestehenden Linkers von



dem Vektor pMET25-GFP mit den Primern UP und H7-GFP amplifiziert. Das Oligonukleotid H7-GFP enthielt eine 25 bp lange komplementäre Sequenz zum *HXT7*-PCR-Produkt. Beide synthetisierten DNA-Fragmente wurden in einer weiteren PCR mit den Primern RPhom und UPhom mittels des überlappenden Anhangs fusioniert und amplifiziert. Das *HXT7*-GFP-PCR-Produkt wurde über homologe Rekombination in den linearisierten Vektor YCplac33<sup>BamHI/HindIII</sup> kloniert (2.15). Das so konstruierte Plasmid wurde YCpHXT7-GFP genannt.

#### 2.14.2 Herstellung eines Hxt7-Hxt1-Hybrids

Um ein chimäres Hxt7-Hxt1-Protein zu konstruieren, wurde der *HXT7*-ORF ohne die letzten 168 Basen, jedoch inklusive *HXT7*-Promotorregion mit den Oligonukleotiden RP und HXT7-1 mittels PCR von dem Plasmid YCpHXT7b amplifiziert. Das Oligonukleotid HXT7-1 bindet im *HXT7*-ORF und enthält zusätzlich einen 21 bp langen überlappenden Anhang zur 3'-terminalen Region des *HXT1*-ORFs. Die letzten 168 Basen des *HXT1*-ORFs wurden von dem Plasmid pTHXT1-2 mit den Oligonukleotiden HXT1-C und UP synthetisiert. Beide PCR-Produkte wurden in einer anschließenden PCR mit den Oligonukleotiden UPhom und RPhom als Vorlage eingesetzt und so fusioniert und amplifiziert. Das resultierende *HXT7* $\Delta$ C-*HXT1*C-DNA-Fragment wurde durch *in vivo*-Rekombination in den linearisierten Vektor YCplac33<sup>BamHI/PstI</sup> kloniert (2.15). Das so konstruierte Plasmid wurde YCpHXT7 $\Delta$ C1C genannt. Die korrekte Fusion der DNA-Fragmente wurde durch Sequenzierung überprüft (2.17).

#### 2.14.3 Konstruktion einer C-terminalen Deletionsmutante von Hxt7

Um die 54 C-terminalen Aminosäuren des Hxt7-Proteins zu deletieren und gegen einen HA-Tag auszutauschen, wurde zunächst der *HXT7*-ORF ohne die letzten 162 Basen, jedoch inklusive des *HXT7*-Promotors mittels PCR mit den Oligonukleotiden UP und 1dH7C-HA von dem Plasmid YCpHXT7a amplifiziert. Eine weitere PCR mit dem Plasmid YCpHXT7a und den Oligonukleotiden 2dH7C-HA und RP lieferte die Terminationsregion von *HXT7* inklusive Stopkodon. Die Oligonukleotide 1dH7C-HA und 2dH7C-HA beinhalten die HA-Sequenz mit jeweils teilweise überlappenden Sequenzen. Die PCR-Produkte wurden in einer weiteren PCR mit den Oligonukleotiden UPhom und RPhom als DNA-Vorlage eingesetzt und so fusioniert und amplifiziert. Das resultierende *HXT7* $\Delta$ C<sup>517-570</sup>-HA-DNA-Fragment wurde durch *in vivo*-Rekombination in den linearisierten Vektor YCplac33<sup>BamHI/PstI</sup> kloniert (2.15). Das so konstruierte Plasmid wurde YCpHXT7 $\Delta$ C<sup>517-570</sup>-HA genannt. Die korrekte Deletion des C-Terminus und der Austausch gegen einen HA-Tag wurde durch Sequenzierung überprüft (2.17).

#### 2.14.4 Konstruktion einer N-terminalen Deletionsmutante von Hxt7

Eine Deletion der N-terminalen Aminosäuren 2-56 von Hxt7 erfolgte analog zu der Deletion des C-Terminus von Hxt7 (2.14.3). In einer PCR wurde zunächst der *HXT7*-Promotor inklusive Startkodon des *HXT7*-ORFs mit den Oligonukleotiden 1dH7N-HA und UP von dem Plasmid YCpHXT7a amplifiziert. Eine weitere PCR mit Oligonukleotiden 2dH7N-HA und RP und dem Plasmid YCpHXT7a als DNA-Vorlage lieferte den *HXT7*-ORF ohne die ersten 168 Basen, jedoch inklusive Terminationsregion. Die Oligonukleotide 1dH7N-HA und 2dH7N-HA beinhalten die HA-Sequenz mit jeweils teilweise überlappenden Sequenzen. Beide PCR-Produkte wurden in einer weiteren PCR mit den Oligonukleotiden UPhom und RPhom als DNA-Vorlage eingesetzt und so fusioniert und amplifiziert. Das resultierende *HXT7* $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA-DNA-Fragment wurde durch *in vivo*-Rekombination in den linearisierten Vektor YCplac33<sup>BamHI/PstI</sup> kloniert (2.15). Das so konstruierte Plasmid wurde YCpHXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA genannt. Die korrekte Deletion und der Austausch gegen einen HA-Tag wurde durch Sequenzierung überprüft (2.17).

Für die Konstruktion entsprechender Überexpressionsplasmide wurde das *HXT7* $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA-Konstrukt und das entsprechende *HXT7*-Fragment auf ein „multi-copy“-Plasmid kloniert. Die Plasmide YCpHXT7a und YCpHXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA wurden mit *PstI* geschnitten, das 3,5 kb bzw. 3,3 kb große Fragment isoliert und in den mit *PstI* linearisierten Vektor YEplac195 ligiert. Die resultierenden Plasmide wurden YEpHxt7 und YEpHXT $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA genannt und durch Restriktionsanalyse (2.10.1) überprüft.

#### 2.15 Klonierung von DNA-Fragmenten durch *in vivo*-Rekombination

Für eine *in vivo*-Klonierung von DNA-Fragmenten oder Genen in *S. cerevisiae* wurde zunächst die entsprechende DNA-Sequenz mittels PCR amplifiziert. Die eingesetzten Oligonukleotide RPhom und UPhom besaßen spezifische Anhänge, die homolog zu dem gewählten Integrationsbereich der Zielvektoren YCplac33 oder YEplac195 waren. Der Vektor wurde durch Restriktion im Integrationsbereich linearisiert, gereinigt und zusammen mit dem PCR-Produkt in die Hefe transformiert. Die Zellen wurden im Anschluß auf Selektivmedium ausplattiert. Auf diese Weise wurden nur solche Transformanten erhalten, die aufgrund homologer Rekombination des DNA-Fragmentes in den linearisierten Vektor wieder ein stabiles, zirkularisiertes Plasmid besaßen. Die Plasmide wurden aus Hefe isoliert (2.9.2), in *E. coli* amplifiziert (2.8.1) und durch eine Restriktionsanalyse (2.10.1) oder durch Sequenzierung (2.17) überprüft.

Chromosomale Integrationen von DNA-Fragmenten wurden entsprechend durchgeführt. Die eingesetzten Oligonukleotide besaßen 5'- und 3'-terminale Anhänge zu dem Integrationsbereich der Zielsequenz. Die korrekte Integration wurde durch PCR mit entsprechenden Primern überprüft.

### 2.15.1 Re-Integration des *HXT7*-Promotors in Chromosom IV und VI

Für die Re-Integration des verkürzten *HXT7*-Promotors (-392 bis +1) in Chromosom IV wurde das 2,3 kb große *kanMX-HXT7*-Promotor-Fragment von dem Plasmid pUG6-kpHXT7 mit den Oligonukleotiden IntpH7-1 und IntpH7-2 amplifiziert. Das PCR-Produkt enthält neben der verkürzten Promotorregion von *HXT7*, das *kanMX*-Gen und kurze überlappende Regionen für die Integration in den ursprünglichen Ort von *HXT3-HXT6-HXT7*. Nach Transformation des PCR-Produkts in die Hefe erfolgte die Selektion auf Kanamycin-resistente Klone auf G418-haltigem Maltosemedium. Die korrekte Integration des *kanMX-pkHXT7*-Moduls wurde durch PCR mit den Primern a1-ipH7 und a4-HX367 überprüft. Der resultierende Stamm wurde SKY11k genannt. Für eine Integration des verkürzten *HXT7*-Promotors in Chromosom VI wurde die *kanMX-pkHXT7*-Kassette von dem Plasmid pUG6-kpHXT7 mit den Primern s1-LH10 und s2-7H10 amplifiziert. Neben dem *kanMX*-Gen und dem verkürzten *HXT7*-Promotor enthält das PCR-Produkt überlappende Sequenzen zu den flankierenden Bereichen der ursprünglichen *HXT10*-Region. Die korrekte Integration wurde mit den Primern a1-HXT10 und a4-HXT10 verifiziert. Der resultierende Stamm wurde SKY12k genannt.

## 2.16 *In vitro*-Mutagenese von *HXT7*

Die gerichtete sequenzspezifische PCR-Mutagenese wurde nach der Methode von Boles und Miosgsa (1995) durchgeführt.

Für den Austausch des Aspartats 558 (D<sup>558</sup>) gegen Lysin (K) und des Glutamats 271 (E<sup>271</sup>) gegen Lysin des Hxt7-Proteins wurde eine erste PCR mit dem Plasmid YCpHXT7a und den Oligonukleotiden HXT7-D558K bzw. HXT7-E271K und RP durchgeführt. Für den Austausch des Serins 259 (S<sup>259</sup>) gegen Alanin des Hxt7-Proteins wurde eine erste PCR mit dem Plasmid YCpHXT7b und den Oligonukleotiden HXT7-S259A und UP durchgeführt. Im Bereich des gewünschten Austausches entsprechen jeweils zwei Basen der mutagenen Primer nicht der Wildtypsequenz, so dass während der PCR jeweils zwei Nukleotide ausgetauscht wurden. Die mutagenisierten *HXT7*-PCR-Fragmente *HXT7*<sup>D558K</sup> (1,2 kb) und *HXT7*<sup>E271K</sup> (0,3 kb) wurden als Megaprimer zusammen mit dem Plasmid YCpHXT7b und dem Primer RP in einer weiteren PCR als Vorlage

eingesetzt. Entsprechend wurde das *HXT7*<sup>S259A</sup>-PCR-Produkt (1,3 kb) als Megaprimer mit dem Plasmid YCpHXT7a und dem Primer UP für eine zweite PCR eingesetzt. Die mutagenisierten *HXT7*-PCR-Produkte wurden mit *Pst*I geschnitten und die resultierenden 3,5 kb großen Fragmente in den mit *Pst*I linearisierten Vektor YCplac33 kloniert. Die konstruierten Plasmide wurden YCpHXT7<sup>D558K</sup>, YCpHXT7<sup>E271K</sup> bzw. YCpHXT7<sup>S259A</sup> genannt. Der Austausch der Nukleotide wurde durch Sequenzierung (2.17) überprüft.

## 2.17 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Methode von Sanger et al. (1977) mit dem „T7-Sequencing Kit“ unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt. Die Auftrennung der  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP markierten DNA erfolgte in einem 6%igen Acrylamid/Harnstoffgel (Maniatis et al., 1982). Alternativ wurden DNA-Sequenzierungen von der Firma SEQLAB (Sequence Laboratories, Göttingen) durchgeführt.

## 2.18 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente mit einer Größe von 0,2-20 kb wurden in 0,6-1,2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Als Gel- und Laufpuffer wurde 1xTAE-Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) verwendet (Maniatis et al., 1982). Als Größenstandard diente eine mit *Eco*RI- und *Hind*III-geschnittene Lambda-Phagen-DNA. Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zu der noch heißen Agarose und durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) nach der Trennung sichtbar gemacht.

## 2.19 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel unter langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten und unter Verwendung des „Qiaex II Gel Extraction Kit“ entsprechend der vom Hersteller angegebenen Anleitung isoliert.

## 2.20 DNA-Aufreinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ nach Angaben des Herstellers gereinigt. RT-PCR-Produkte wurden mit dem „Bio-Spin 6 Chromatography Column-Kit“ aufgereinigt.

## 2.21 Präparation von RNA aus *S. cerevisiae*

Für die Präparation der Gesamt-RNA wurden Hefezellen aus einer logarithmisch wachsenden 100 ml-Kultur geerntet. Die Zellen wurden in 2 ml Trizol-Reagenz aufgenommen und nach Zugabe von 1 g Glasperlen ( $\varnothing = 0,45$  mm) mit einem „Fastprep Dissicator“ (BIO101) 20 s bei einer Geschwindigkeit von 6 m/s aufgeschlossen. Pro ml Überstand wurden 150  $\mu$ l Chloroform zugegeben und die Proben 10 min bei 4 °C bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 4°C bei 13000 rpm zentrifugiert. Das RNA-Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, 2 min bei 4°C bei 13000 rpm zentrifugiert und in 50  $\mu$ l RNA-freiem Wasser aufgenommen. Die RNA wurde bis zur Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.22 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die RNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bei 260 nm bestimmt (Maniatis et al., 1982). Bei einer gereinigten RNA-Präparation sollte der Quotient  $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$  bei 2,1 liegen, dann entspricht eine Extinktion  $E_{260\text{nm}}=1$  40  $\mu\text{g}$  RNA pro ml.

## 2.23 Genom-weite Transkriptionsanalyse mittels „Microarrays“

Für eine transkriptionelle Analyse des gesamten Hefegenoms auf die Expression eines bestimmten Gens wurden die „Yeast Index GeneFilters Microarrays“ verwendet. Diese enthalten 6144 mittels PCR amplifizierte ORFs der Hefe *S. cerevisiae*.

Die Gesamt-RNA wurde isoliert (2.21) und anschließend mittels RT-PCR (2.12) die cDNA hergestellt. Die Genfilter wurden für 3-6 h mit 5 ml MicroHyb-Lösung bei  $42^{\circ}\text{C}$  in einem Rollerofen (Hybaid) prä-hybridisiert. Die gereinigte cDNA (2.20) wurde 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  denaturiert und dann zu der Hybridisierungslösung gegeben. Nach einer 17-stündigen Hybridisierung bei  $42^{\circ}\text{C}$  wurden die Filter 2 mal mit 2x SSC, 0,1% SDS für 20 min bei  $50^{\circ}$  gewaschen. Ein dritter Waschschrift erfolgte mit 0,5x SSC, 0,1% SDS für 15 min bei RT. Um eine digitale Aufnahme zu erhalten, wurden die Genfilter für 3 h und 16 h einem Phosphor-Imager (Fuji, BAS-100) exponiert. Für die Auswertung wurden die Bilder zunächst in ein TIFF-Format konvertiert und dann in die „Pathways 2“-Software importiert. Die Filter wurden für eine erneute Hybridisierung 15 min mit kochender 0,5%iger SDS-

Lösung gewaschen. Durch diese Behandlung wurden mehr als 95% der Signale entfernt.

## 2.24 Herstellung von Proteinextrakten aus *S. cerevisiae*

Zur Herstellung von Proteinextrakten für Western-Blot-Analysen wurden 4 OD<sub>600</sub>-Einheiten Zellen einer logarithmisch wachsenden Hefekultur bei 3000 rpm abzentrifugiert und in 10 mM NaN<sub>3</sub>/NaF-Lösung gewaschen. Nach Resuspendieren der Zellen in 100 µl Lysispuffer (0,3 M Sorbitol, 50 mM MOPS, 10 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7,5) mit Proteaseinhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail Tablets) und Zugabe von Glasperlen, wurden die Zellen 4 min mit einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen. Anschließend wurden 200 µl 2x Probenpuffer (4% SDS, 20% Glycerin, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 mM DTT) zugegeben und der Überstand abgenommen. Unlösliche Zellbestandteile wurden abzentrifugiert und die Proben bei -20°C gelagert.

## 2.25 Präparation der Membranproteinfraktion aus *S. cerevisiae*

Für eine Präparation der Membranproteinfraktion wurden 50 OD<sub>600</sub>-Einheiten einer logarithmisch wachsenden Hefekultur für 10 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, in 1 ml Wasser aufgenommen und nochmals abzentrifugiert. Die Hefesedimente wurden bei -20°C eingefroren. Es wurden 0,5 g Glasperlen und 0,2 ml Tris-Mix (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,15 M NaCl, 5 mM EDTA) mit 0,2 mM PMSF zugegeben und die Zellen mit einem Vibrax (Janke & Kunkel, Vibrax-VXR) aufgeschlossen. Nach Zugabe von 0,2 ml Tris-Mix wurde der Überstand abgenommen und für 45 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,4 ml Tris-Mix mit 5 M Harnstoff aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Membranproteinfraktion wurde durch eine 45-minütige Zentrifugation bei 12000 rpm sedimentiert. Das Sediment wurde in 0,32 ml Tris-Mix resuspendiert, 80 µl 50%ige TCA zugegeben, die Proben für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 30 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Trispuffer (0,4 M Tris-HCl, 225 mM NaCl, 7,5 mM EDTA) oder 100 µl Imidazolpuffer (0,4 M Imidazol, 225 mM NaCl, 7,5 mM EDTA) gelöst. Es wurden 2-5 µg Protein mit 0,2% Bromphenolblaulösung versetzt und auf das SDS-Gel aufgetragen.

## 2.26 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford (1976) bestimmt. Als Standard diente Rinderserumalbumin (BSA) in Konzentrationen von 0-200 µg/ml. 500 µl Protein-haltige wässrige Lösung wurden mit 1 ml Bradford-Farbstoffreagenz (60 mg Comassie brilliant blue G250, 3% Perchlorsäure ad 1 l) versetzt. Nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurde die Extinktion bei 595 nm bestimmt. Alternativ erfolgte die Proteinbestimmung mit dem „Bio-Rad Protein Assay“ nach Angaben des Herstellers.

## 2.27 Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) beruht auf der Methode von Laemmli (1970). Zur Auftrennung der Proteine wurden ein 5%iges Sammelgel (5,9 ml H<sub>2</sub>O, 2,5 ml Upper Tris (0,4% SDS, 0,5 M Tris HCl pH 6,8), 1,6 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 75 µl 20% APS, 15 µl TEMED) und ein 10%iges Trenngel (16,2 ml H<sub>2</sub>O, 10 ml Lower Tris (0,4% SDS, 1,5 M Tris HCl, pH 8,8), 13,3 ml 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 200 µl APS, 25 µl TEMED) verwendet (Maniatis, 1982). Der Laufpuffer enthielt 25 mM Tris, 0,192 M Glycin und 0,1% SDS. Die Auftrennung der Proteine und des Molekulargewichtsstandards („HMW“) erfolgte bei 50 V über Nacht.

## 2.28 Immunologischer Nachweis von Proteinen („Western Blotting“)

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE, wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Übertragung erfolgte in Blotting-Puffer (25 mM Tris, 0,192 M Glycin, 20% MeOH) für 2 h bei 55 V (250 mA). Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation des Filters für 1 h in PBSTB (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,3% Tween20, 3% BSA) blockiert. Die Reaktion mit dem Primärantikörper (in PBSTB verdünnt) erfolgte für 1-14 h bei RT. Danach wurde der Filter 3x mit PBST (10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2, 150 mM NaCl, 0,3% Tween20) gewaschen und anschließend für 1-2 h mit dem Sekundärantikörper (in PBSTB verdünnt) bei RT inkubiert. Die Membran wurde wiederum 3x mit PBST gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte entweder durch eine Phosphatase-katalysierte Farbreaktion oder durch eine Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenzreaktion. Die Farbreaktion wurde in Substratpuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5, 0,1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>), dem 0,1 mg/ml BCIP und 1 mg/ml NBT zugesetzt wurden, durchgeführt und durch Waschen des Filters in Wasser

gestoppt. Bei Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgte der Nachweis durch Zugabe eines Chemilumineszenzsubstrates (SuperSignal ULTRA chemiluminescent substrate) und die anschließende Detektion durch Auflegen eines Röntgenfilms.

## **2.29 Bestimmung der Fermentations- und Glukoseverbrauchsrate**

Für die Bestimmung der Fermentationsrate wurden die Zellen in uracilfreiem Minimalmedium (YNB  $\text{ura}^-$ ) mit 3% Raffinose angezogen und bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 1 geerntet. Ein Teil der Zellen wurde mit YNB  $\text{ura}^-$ -Medium gewaschen und in YNB  $\text{ura}^-$ -Medium mit 1% Glukose überführt. In Abständen von 10 Minuten wurden über einen Zeitraum von 1,5 h Proben genommen. Die Proben wurden für 2 min bei 12000 rpm abzentrifugiert und aus dem Überstand die jeweilige Konzentration an Ethanol (2.29.1) und Glukose (2.29.2) bestimmt. Das Zellsediment wurde in 0,5 ml 1 M NaOH aufgenommen und für 30 min gekocht. Unlösliche Zellbestandteile wurden 10 min bei 10000 rpm abzentrifugiert. Anschließend wurde eine Protein-bestimmung (2.26) durchgeführt.

Der andere Teil der Zellen wurden einmal in YNB -N mit 5% Glukose gewaschen und in diesem Medium mit einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,8 wieder angeimpft. Nach 6-stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und wie mit der ersten Probe verfahren.

### **2.29.1 Bestimmung der Ethanolkonzentration**

Die Bestimmung der Ethanolkonzentration erfolgte mittels des Lebensmittelanalytik-Kits „Ethanol“ nach Herstellerangaben.  $\text{NADH}+\text{H}^+$  ist Messgröße und kann aufgrund seiner spezifischen Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm spektralphotometrisch bestimmt werden. Abweichend von der Herstelleranweisung wurden die Bestimmungen in einem Drittel des angegebenen Volumens durchgeführt.

### **2.29.2 Bestimmung der Glukosekonzentration**

Die Bestimmung der Glukosekonzentration beruht auf der Umsetzung von Glukose und ATP mittels Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat und ADP. Das gebildete Glukose-6-Phosphat und NADP wird durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphoglukonolacton und  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  umgesetzt.  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  ist Messgröße und kann aufgrund seiner spezifischen Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm spektralphotometrisch bestimmt werden.



### 2.30 Messung der Glukoseaufnahme

Die Glukoseaufnahmemessung erfolgte nach Bisson und Fraenkel (1983) mit Modifikationen nach Walsh et al. (1994). Die Aufnahme wurde bei Glukosekonzentrationen von 0,2-100 mM bestimmt. Die eingesetzte spezifische Radioaktivität betrug dabei 0,37-111 kBq  $\mu\text{mol}^{-1}$ . Die Zellen wurden bis zu einer Dichte von  $1-2 \times 10^7/\text{ml}$  angezogen. Nach zweimaligem Waschen mit Phosphatpuffer (0,1 M  $\text{K}_i\text{PO}_4$ , pH 6,5) wurde das Nassgewicht der Zellen bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von 60 mg/ml in Phosphatpuffer resuspendiert. Vor der Aufnahmemessung wurden sowohl die Zellen als auch die Glukoselösung 5 min bei 30°C inkubiert. Die Aufnahmereaktion wurde durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Zellen zu 50  $\mu\text{l}$  dreifach-konzentrierter Glukoselösung gestartet. Nach 5 sec wurden 100  $\mu\text{l}$  entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 10 ml Quenchlösung (0,1 M  $\text{K}_i\text{PO}_4$ , pH 6,5, 500 mM Glukose, -3-0°C) abgestoppt. Mit einer speziellen Pipette (Eigenbau der Elektronikwerkstatt der HHU Düsseldorf) wurde das 5 s-Zeitintervall der Glukoseinkubation auf 1/100 s genau bestimmt. Die Zellen wurden sofort unter Vakuum auf GF/C Glas-Fiber-Filter abfiltriert und viermal mit 10 ml eiskalter Quenchlösung gewaschen. Die Filter wurden in 5 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und die Radioaktivität mit einem Szintillationszähler (Beckmann) gemessen. Zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität wurden 10  $\mu\text{l}$  des Reaktionsansatzes in 5 ml Szintillationsflüssigkeit gemessen ( $\text{cpm}_0$ ). Da radioaktive Glukose unspezifisch an die Glas-Fiber-Filter bindet, wurden Kontrollen durchgeführt, bei denen die Glukoselösung und die Zellen gleichzeitig zur vorgelegten Quenchlösung gegeben wurden ( $\text{cpm}_{\text{Kontrolle}}$ ). Diese Kontrollen wurden für eine bestimmte eingesetzte Gesamtradioaktivität mehrfach bestimmt. Der Mittelwert der Kontrollen wurde von den entsprechenden Messwerten abgezogen. Die Aufnahmegeschwindigkeiten  $V$  in  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{TG}$  wurden nach folgender Formel berechnet:

$$\text{aufgenommene Glukose} = [(\text{cpm}_{\text{Probe}} - \text{cpm}_{\text{Kontrolle}})/(\text{cpm}_0 * 10)] * \text{mM}_{\text{Glukose}}$$

### 2.31 Mikroskopische Untersuchungen

Mikroskopische Untersuchungen wurden mit lebenden, nicht-fixierten Zellen mit einem Zeiss Axioskop durchgeführt. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurde ein FITC-Filter (Zeiss) verwendet. Die Bilder wurden mit einer CCD-Kamera (Sony) aufgenommen und mit der Software „Adobe Photoshop 5.0“ bearbeitet.

### 3 ERGEBNISSE

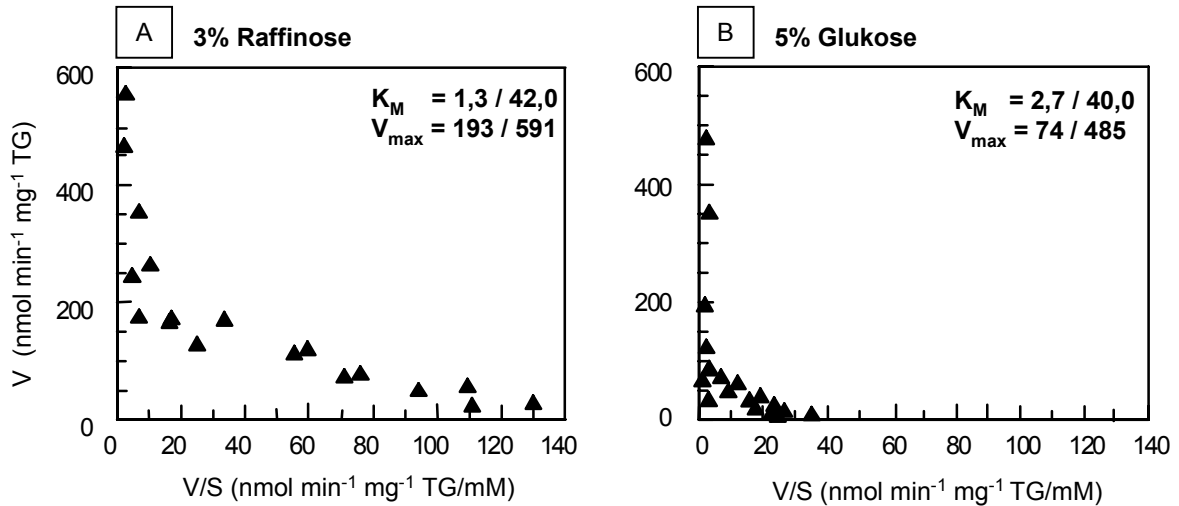
Im Rahmen des in der Einleitung beschriebenen EU-Projektes sollten die Auswirkungen von Stickstoffhunger auf den Zuckertransport der Hefe untersucht werden. Biotechnologisches Ziel des Projektes war die Konstruktion eines Stammes, der unter Hungerbedingungen eine höhere Fermentationskapazität aufweist. Da die Zuckeraufnahme vermutlich der limitierende Schritt der Ethanolfermentation ist (Becker und Betz, 1972), spielt die Inaktivierung und der Abbau von Zuckertransportproteinen voraussichtlich eine wesentliche Rolle bei der Reduzierung der Fermentationsrate unter Hungerbedingungen (Lagunas et al., 1982). Durch die Konstruktion eines stabilisierten Hexosetransporters, der unter Hungerbedingungen eine höhere Zuckeraufnahme gewährleistet, sollte die Zielsetzung dieses Projektes erreicht werden.

#### 3.1 Glukoseaufnahme unter Stickstoffhungerbedingungen in Anwesenheit verschiedener Kohlenstoffquellen

Um die Glukosetransportaktivität von Hefezellen unter Stickstoffhunger in Anwesenheit verschiedener Kohlenstoffquellen zu untersuchen, wurden Glukoseaufnahmemessungen in Stickstoffhungermedium in Anwesenheit von 3% Raffinose bzw. 5% Glukose durchgeführt. Dafür wurden die Hefezellen in Vollmedium mit 3% Raffinose angezogen, gewaschen und 5 Stunden in Stickstoffhungermedium mit 3% Raffinose bzw. 5% Glukose inkubiert. Das Trisaccharid Raffinose garantiert durch die extrazelluläre Spaltung des Zuckers eine gleichbleibend niedrige Konzentration von Hexosen im Medium.

Sowohl nach Inkubation der Zellen in Stickstoffhungermedium in Gegenwart von Raffinose (Abb. 6A) als auch von Glukose (Abb. 6B) kann eine biphasische Kinetik beobachtet werden, jeweils mit einer hoch- und einer niedrig-affinen Glukoseaufnahmekomponente. Nach Inkubation der Zellen in Anwesenheit von 5% Glukose ist speziell die hoch-affine Glukoseaufnahmekomponente sehr stark reduziert. Eine derart starke Reduktion der hoch-affinen Aufnahmekomponente ist nach Inkubation der Zellen in Raffinose-haltigem Stickstoffhungermedium nicht zu beobachten. Während der  $V_{\max}$  der hoch-affinen Aufnahmekomponente nach Inkubation in Raffinose  $193 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ TG}$  beträgt, ist der  $V_{\max}$  mit  $74 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ TG}$  nach Inkubation in dem Glukose-haltigen Hungermedium um mehr als 60% geringer. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die  $V_{\max}$ -Werte der niedrig-affinen Aufnahmekomponenten nur geringfügig. Nach Inkubation der Hefen in Raffinose-haltigen Stickstoffhungermedium beträgt der  $V_{\max}$   $591 \text{ nmol}$

$\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{ TG}$ , nach Inkubation in Glukose-haltigen Hungermedium  $493 \text{ nmol} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ TG}$ . Die  $K_M$ -Werte sowohl der hoch-affinen (1,3 und 2,7 mM) als auch der niedrig-affinen Komponente (42,0 und 40,0 mM) unterscheiden sich unter den verschiedenen Bedingungen nur unwesentlich.



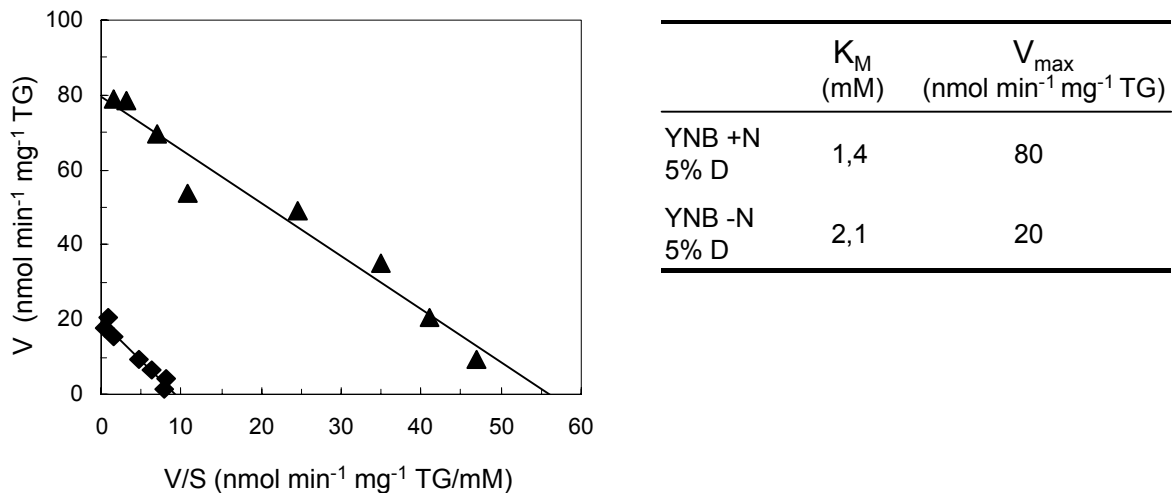
**Abb. 6: Eadie-Hofstee Plots der Glukoseaufnahme von Hefezellen nach Inkubation in Stickstoffhungermedium mit verschiedenen Kohlenstoffquellen.** Der Hefestamm RKY#826 wurde in YEP mit 3% Raffinose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Zellen wurden geerntet und gewaschen und für 5 h in YNB -N mit (A) 3% Raffinose und (B) 5% Glukose inkubiert.  $K_M$ -Werte in mM,  $V_{max}$ -Werte in  $\text{nmol} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ TG}$

### 3.2 Glukoseaufnahme eines *HXT7*-Einzelexpressionsstamms unter Stickstoffhungerbedingungen

Die in Gegenwart von 5% Glukose beobachtete starke Reduktion der hoch-affinen Glukoseaufnahmeaktivität unter Stickstoffhungerbedingungen (Abb. 6) legte nahe, dass vor allem hoch-affine Hexosetransporter der Hefe unter diesen Bedingungen einer Inaktivierung unterliegen. Hxt6 und Hxt7 besitzen einen  $K_M$  von 1-2 mM für Glukose und sind damit die Hexosetransporter mit der höchsten Affinität für Glukose (Reifenberger et al., 1997). Hxt7 besitzt jedoch aufgrund einer stärkeren Expression wahrscheinlich eine größere physiologische Relevanz als Hxt6 (Reifenberger et al., 1997).

Um festzustellen, ob der hoch-affine Hexosetransporter Hxt7 in Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen bei gleichzeitigem Stickstoffhunger einer Inaktivierung unterliegt, wurde die Glukoseaufnahme eines *HXT7*-Einzelexpressionsstamms untersucht. Dieser Stamm (JBY02) ist in allen Hexosetransportgenen deletiert (*hxf*) und kann nur durch die Expression eines re-integrierten *HXT7*-Gens Glukose aufnehmen (Wieczorke et al., 1999). Das *HXT7*-

Gen steht unter Kontrolle des eigenen, jedoch verkürzten und dadurch nicht mehr Glukose-reprimierten Promotors. So wurde der *HXT7*-Einzelexpressionsstamm in Minimalmedium mit 5% Glukose angezogen und die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Mit einem Teil der Zellen wurde die Glukoseaufnahme direkt gemessen. Der andere Teil der Zellen wurde zunächst für 24 Stunden in Stickstoffhungermedium mit 5% Glukose überführt, bevor auch die Glukose-aufnahmeaktivität dieser Zellen bestimmt wurde.



**Abb. 7: Eadie-Hofstee Plots der Glukoseaufnahme eines *HXT7*-Einzelexpressionsstammes vor und nach Inaktivierung in Stickstoffhungermedium mit 5% Glukose.** Der Hefestamm JBY02 (*HXT7*<sup>+</sup>) wurde in YNB +N mit 5% Glukose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Zellen wurden geerntet, gewaschen und für 24 h in YNB -N mit 5% Glukose inkubiert. Aufnahmemessung vor Inaktivierung (▲, +N) bzw. nach Inaktivierung (◆, -N)

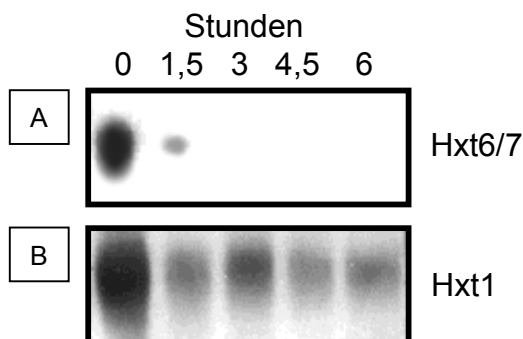
Vor der Überführung der Zellen in Stickstoffhungermedium mit 5% Glukose beträgt der  $V_{max}$  80 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG. Nach der 24-stündigen Inkubation in diesem Medium ist der  $V_{max}$  auf 20 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG reduziert (Abb. 7). Die  $K_M$ -Werte bleiben dagegen nahezu unverändert. Die Vermutung, dass der Hexose-transporter Hxt7 bei Stickstoffmangel in Gegenwart hoher Glukosekonzentrationen einer Inaktivierung unterliegt, konnte somit bestätigt werden. Die Reduktion des  $V_{max}$ -Wertes könnte entweder durch eine Inhibierung des Transporters oder durch einen Proteinabbau verursacht werden.

### 3.3 Proteinstabilität von Hxt6/7 und Hxt1 unter Hungerbedingungen

Um zu untersuchen, ob die Reduktion der hoch-affinen Glukoseaufnahme-komponente auf einen proteolytischen Abbau des hoch-affinen Hexose-transporters Hxt7 zurückzuführen ist, wurde die Proteinstabilität in einer Western-Blot-Analyse untersucht. Der Nachweis der nahezu identischen hoch-affinen

Transporter Hxt6 und Hxt7 (Reifenberger et al., 1995) erfolgte mit Hxt6/Hxt7-spezifischen Antikörpern.

Abb. 8 zeigt, dass Hxt6 und Hxt7 nach Inkubation in Stickstoffhungermedium mit 5% Glukose tatsächlich einem schnellen Abbau unterliegen, obwohl sich die Hexosetransporter unter Wachstumsbedingungen sehr stabil verhalten (Alonso und Kotyk, 1977). Eine solche Inaktivierung von Proteinen durch Proteolyse in Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen wird auch Katabolit-Inaktivierung genannt (Holzer, 1976). Die in der Western-Blot-Analyse beobachtete Proteinstabilität spiegelt die Halbwertszeit der Proteine wieder, da eine Hxt6/7-Neusynthese unter diesen Bedingungen so gut wie nicht stattfindet. So ist einerseits generell die Proteinsynthese unter Stickstoffhungerbedingungen deutlich reduziert. Andererseits ist in Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen die Genexpression gehemmt, da der *HXT6/7*-Promotor einer starken Glukoserepression unterliegt (Liang und Gabor, 1996; Ciriacy und Reifenberger, 1997). Überdies wird die bereits gebildete mRNA Glukose-reprimierter Gene in Gegenwart von Glukose vermutlich schnell abgebaut (Cereghino und Scheffler, 1996).



**Abb. 8: Proteinstabilität von Hxt6/7 und Hxt1 in Stickstoffhungermedium mit 5% Glukose.** Der Stamm VW1A wurde (A) in YEP mit 3% Raffinose und (B) in YEP mit 2% Glukose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Zellen wurden gewaschen und anschließend in YNB -N mit 5% Glukose überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Proteinrohextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt. Der Nachweis der Hexosetransporter erfolgte mit Hxt6/7- bzw. Hxt1-spezifischen Antikörpern.

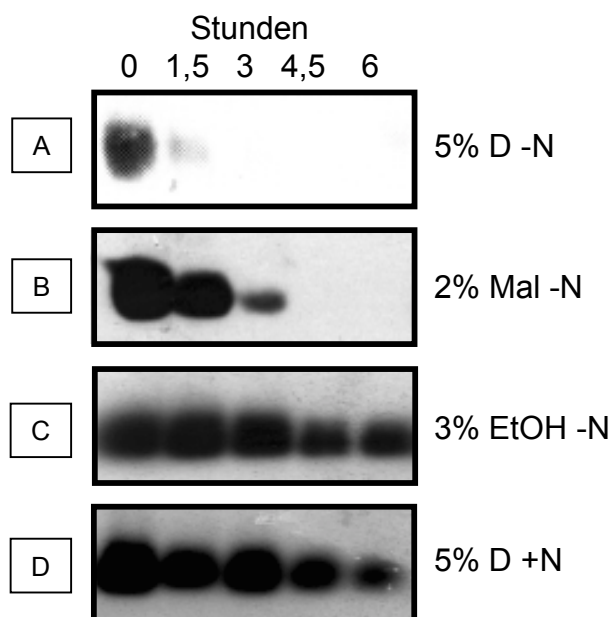
Hxt1 ist ein niedrig-affiner Hexosetransporter mit einem  $K_M$  von 100 mM für Glukose. Der im Vergleich zu Hxt6/7 deutlich langsamere und nicht vollständige Abbau von Hxt1 (Abb. 8) spiegelt auch die geringere Reduktion der niedrig-affinen Glukoseaufnahmekomponente in den Aufnahmemessungen wider (Abb. 6).

### 3.4 Signalauslösung des schnellen Abbaus von Hxt6/7

#### 3.4.1 Induktion des Proteinabbaus in Anwesenheit einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle und bei Stickstoffhunger

In Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen wird ein schneller Abbau von Hxt6/7 beobachtet (Abb. 8). Fraglich bleibt, ob auch andere Kohlenstoffquellen den Abbau der Transportproteine auslösen können. Weiterhin ist unklar, inwiefern sich der Stickstoffhunger auf den Abbau der Hexosetransporter auswirkt. Um diesen Fragen nachzugehen, wurde die Proteinstabilität von Hxt6/7 in Gegenwart verschiedener Kohlenstoffquellen und in An- und Abwesenheit einer Stickstoffquelle untersucht.

Tatsächlich induzieren nicht nur hohe Glukose-, sondern auch hohe Maltosekonzentrationen den Abbau von Hxt6/7 (Abb. 9A, B). Die Halbwertszeit der Transportproteine ist zwar höher als in Gegenwart von Glukose, jedoch verläuft der Abbau deutlich schneller als in Anwesenheit der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle Ethanol (Abb. 9C). In Gegenwart von Ethanol kann trotz des vorherrschenden Stickstoffhungers kein Abbau beobachtet werden.



**Abb. 9: Proteinstabilität von Hxt6/7 in Anwesenheit unterschiedlicher Kohlenstoffquellen und in An- bzw. Abwesenheit einer Stickstoffquelle.** Der Stamm VW1A wurde in YEP mit 3% Raffinose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Zellen wurden gewaschen und in YNB -N mit (A) 5% Glukose, (B) 2% Maltose, (C) 3% Ethanol oder in (D) YNB +N mit 5% Glukose überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Proteinrohextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt.

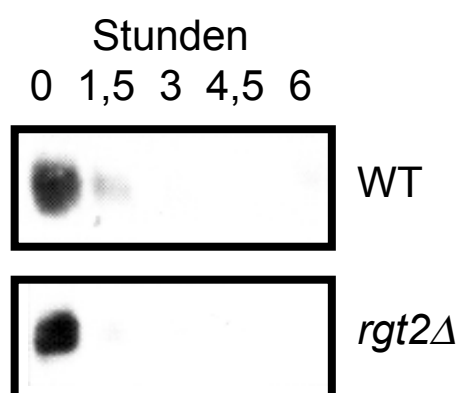
Auch in Anwesenheit der Stickstoffquelle Ammonium findet offensichtlich trotz der vorherrschenden hohen Glukosekonzentrationen nahezu kein Abbau von Hxt6/7 über den beobachteten Zeitraum statt (Abb. 9D). Folglich spielt nicht nur die hohe Glukosekonzentration, sondern auch der Stickstoffhunger eine entscheidende Rolle beim Proteinabbau von Hxt6/7. Die Halbwertszeiten der Hexosetransportproteine sind unter den verschiedenen Bedingungen jedoch nur bedingt vergleichbar. So wird in Anwesenheit von Ethanol die *HXT6/7*-Genexpression

nicht reprimiert. Die Proteinneusynthese ist jedoch durch den unter diesen Bedingungen vorherrschenden Stickstoffhunger stark reduziert. Dahingegen ist in Gegenwart von Glukose und Ammonium zwar generell Wachstum und Proteinsynthese möglich, jedoch unterliegt die *HXT6/7*-Genexpression der Glukoserepression. Auch die bereits vorliegende *HXT6/7*-mRNA wird vermutlich in Gegenwart von Glukose schnell abgebaut (Cereghino und Scheffler, 1996). Somit ist anzunehmen, dass der selbst nach 6 Stunden noch sehr hohe Proteinlevel nicht auf eine Proteinneusynthese, sondern auf die Stabilität der bereits vorhandenen Hexosetransportproteine zurückzuführen ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwei Signale für einen schnellen Abbau von Hxt6/7 notwendig sind: 1. eine hohe Konzentrationen einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle und 2. der Mangel einer Stickstoffquelle.

Diese Bedingungen, eine im Überschuss vorliegende Kohlenstoffquelle bei gleichzeitigem Stickstoffhunger, sind typisch für industrielle Fermentationen. Es ist also wahrscheinlich, dass der bei industriellen Fermentationen auftretende Stickstoffmangel einen schnellen Abbau der Hexosetransportproteine induziert. Dieser Proteinabbau könnte der auslösende Faktor für eine Reduktion oder sogar einen Abbruch der Fermentation sein. Dies hätte wiederum eine geringe Produktionseffizienz zur Folge.

### 3.4.2 Rgt2 ist nicht an der Übermittlung des Abbausignals beteiligt

Hxt6 und Hxt7 unterliegen in Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen einer besonders schnellen Inaktivierung. Hefezellen sind demzufolge in der Lage speziell hohe Glukosekonzentrationen in der Umgebung wahrzunehmen und daraufhin den Abbau der Transportproteine einzuleiten.



**Abb. 10: Proteinstabilität von Hxt6/7 in einem  $\Delta$ rgt2-Stamm.** Der Stamm SKY2 ( $\Delta$ rgt2) und der isogene Wildtypstamm VW1A wurden in YEP mit einem Gemisch aus 2% Maltose und 3% Raffinose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Zellen wurden gewaschen und in YNB -N mit 5% Glukose überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Proteinrohextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt.

Rgt2 ist ein Sensor für hohe Glukosekonzentrationen, der in die transkriptionelle Regulation der *HXT*-Genexpression involviert ist (Özcan et al., 1996a). Ferner ist

Rgt2 für den Abbau der Maltosepermease in Gegenwart hoher Glukosekonzentrationen wichtig (Jiang et al., 1997). Um zu untersuchen, ob der Glukose-sensor Rgt2 auch bei der Übermittlung des Glukosesignals für den Abbau von Hxt6/7 eine Rolle spielt, wurde die Proteinstabilität von Hxt6/7 in einem  $\Delta rgt2$ -Stamm und zum Vergleich in einem entsprechenden Wildtypstamm untersucht.

Abb. 10 zeigt jedoch, dass die Stabilität von Hxt6/7 in dem Wildtypstamm und in dem  $\Delta rgt2$ -Stamm vergleichbar ist. In beiden Stämmen findet ein schneller Abbau der Transportproteine statt. Der Sensor Rgt2 ist somit nicht entscheidend an der Wahrnehmung und Übermittlung des Abbausignals beteiligt.

### 3.4.3 Induktion des Proteinabbaus von Hxt6/7 durch Rapamycin

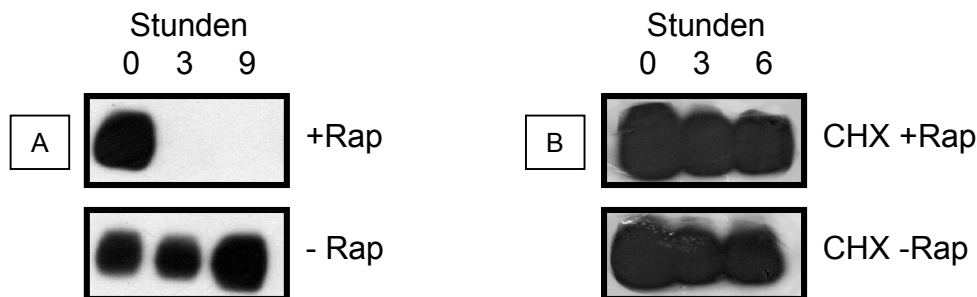
Für eine schnelle Inaktivierung der Hexosetransporter Hxt6/7 ist der Stickstoffhunger ebenso entscheidend wie die Anwesenheit einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle (3.4.1). Daher muss die Hefezelle die Fähigkeit besitzen Stickstoffhunger wahrzunehmen, so dass ein Signal induziert wird, das den Abbau der Transporter einleitet.

Der Tryptophantransporter Tat2 unterliegt ebenso wie der Hexosetransporter Hxt7 bei Stickstoffhunger einem schnellen Abbau (Schmidt et al., 1998). Beck et al. (1999) beobachteten, dass die Inaktivierung der Permease auch durch Zugabe von Rapamycin ausgelöst werden kann. Rapamycin ist ein Immunsuppressiva, das die Funktion der Proteine Tor1 und Tor2 inhibiert (Heitman et al., 1991). So löst Rapamycin eine zelluläre Antwort aus, die vergleichbar der Reaktion der Hefe auf Nährstoffmangel ist (Powers und Walter, 1999). Dementsprechend wird u. a. ein Wachstumsarrest, eine Reduktion der Proteinsynthese, eine Akkumulierung von Glykogen, Autophagozytose und eine Expression bzw. Repression spezifischer Gene induziert (Kunz et al., 1993; Helliwell et al., 1994; Barbet et al. 1996; Noda und Ohsumi, 1998). Da Rapamycin in Vollmedium den Abbau der Tryptophanpermease auslösen kann, sind die Proteine Tor1 und Tor2 vermutlich an der Regulation der Stabilität der Permease beteiligt. So vermuteten Beck et al. (1999), dass diese Phosphatidylinositolkinase-ähnlichen Proteine eine Rolle bei der Wahrnehmung und Weiterleitung des Hungersignals spielen. Um zu testen, ob Tor1 und Tor2 auch an der Wahrnehmung des Stickstoffhungers und der Einleitung des Abbaus von Hxt6/7 beteiligt sind, wurde untersucht, ob der Proteinabbau der Hexosetransporter Hxt6/7 durch Zugabe von Rapamycin in Vollmedium induziert werden kann.

Abb. 11A zeigt, dass die Hexosetransporter Hxt6 und Hxt7 nach Inkubation der Zellen in Gegenwart von Rapamycin schnell abgebaut werden. Ohne Zugabe von



Rapamycin ist der Proteinlevel nach 9 Stunden nicht reduziert. Ein direkter Vergleich der Proteininstabilität ist allerdings problematisch, da in Vollmedium ohne Rapamycin noch Hxt6/7-Proteinneusynthese stattfindet, während in den mit Rapamycin-behandelten Zellen die Proteinsynthese gehemmt ist (s.o.).



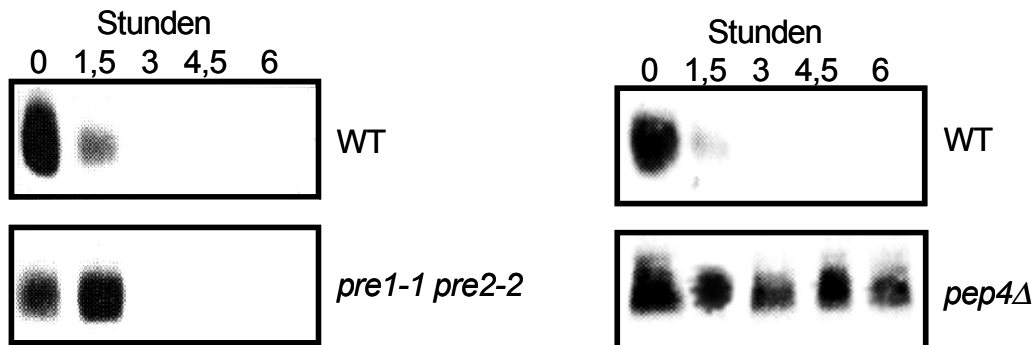
**Abb. 11: Proteininstabilität von Hxt6/7 in Anwesenheit von Rapamycin.** Der Stamm VW1A wurde in YEP mit 3% Raffinose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Zellen wurden geerntet und wiederum in YEP mit (A) 3% Raffinose und 200 µg/l Rapamycin (Rap) bzw. 3% Raffinose oder mit (B) 3% Raffinose, 1 mM Cycloheximid (CHX) und 200 µg/l Rapamycin bzw. 3% Raffinose und 1 mM Cycloheximid überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Proteinrohextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt.

Daher wurde zusätzlich die Proteininstabilität von Hxt6/7 in Anwesenheit des Proteinsynthese-Inhibitors Cycloheximid untersucht (Abb. 11B). Jedoch wird bei gleichzeitiger Anwesenheit von Rapamycin und Cycloheximid kein Abbau von Hxt6/7 beobachtet. Da in Anwesenheit von Cycloheximid der Proteinabbau von Hxt6/7 normalerweise nicht gestört ist, sondern Cycloheximid eher förderlich auf den Abbau wirkt (Busturia und Lagunas, 1986), kann der Abbau der Hexosetransporter durch Rapamycin anscheinend nicht ausgelöst werden. Ungewöhnlich ist jedoch, dass die sonst unter vegetativen Bedingungen sehr stabilen Hexosetransporter Hxt6/7 in Anwesenheit von Rapamycin ohne Cycloheximid schon nach drei Stunden nicht mehr nachweisbar sind (Abb. 11A). Die Frage, ob die Proteine Tor1 und Tor2 an der Weiterleitung des Hungersignals beteiligt sein könnten, konnte somit nicht eindeutig geklärt werden.

### 3.5 Abbau von Hxt6/7 in der Vakuole

In Hefe findet der Proteinabbau in zwei Hauptabbaukompartimenten statt: 1. im zytoplasmatischen Proteasom-Komplex und 2. in der Vakuole. Um herauszufinden in welchem Kompartiment die Hexosetransporter Hxt6/7 unter Inaktivierungsbedingungen abgebaut werden, wurde die Proteininstabilität von Hxt6/7 in Mutanten untersucht, die entweder in der proteasomalen oder in der vakuolären proteolytischen Aktivität gestört waren.

Die Gene *PRE1* und *PRE2* kodieren für die  $\beta$ -Untereinheiten des Proteasoms und sind somit essentiell für seine proteolytische Aktivität (Heinemeyer et al., 1991; 1993). Abb. 12 verdeutlicht, dass der Abbau von Hxt6/7 in einer temperatur-sensitiven *pre1-1 pre2-2*-Doppelmutante auch bei der restriktiven Temperatur im Vergleich zum Wildtypstamm unverändert ist. Folglich werden Hxt6 und Hxt7, wie nahezu alle Plasmamembranproteine der Hefe, unabhängig vom Proteasom abgebaut.



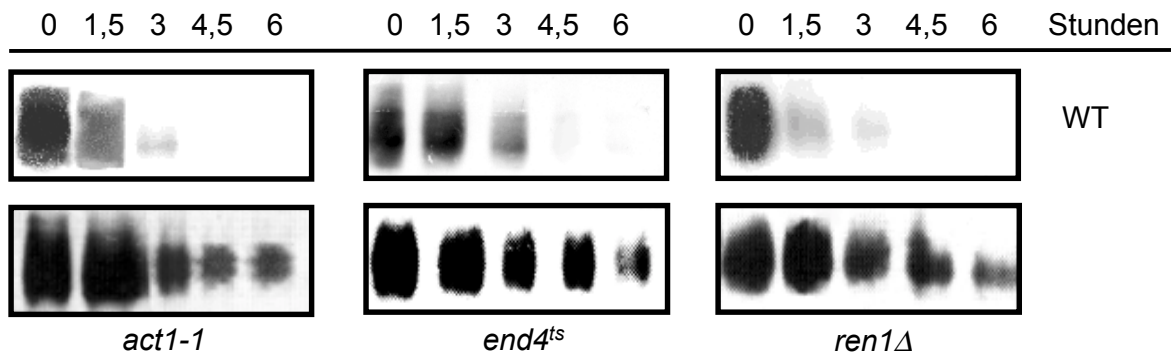
**Abb. 12: Proteinstabilität von Hxt6/7 in einer *pre1-1 pre2-2*- und einer  $\Delta pep4$ -Mutante.** Der Stamm RKY#927 (*pre1-1 pre2-2*) und der isogene Wildtypstamm RKY#649 wurden in YEP mit 3% Raffinose bis zur exponentiellen Wachstumsphase bei 25°C angezogen. Die Zellen wurden dann für 1 h bei 37°C inkubiert, anschließend gewaschen und in YNB -N mit 5% Glukose überführt und bei 37°C inkubiert. Der Stamm RKY#969 ( $\Delta pep4$ ) und der isogene Wildtypstamm RKY#826 wurden in YEP mit 3% Raffinose bis zur exponentiellen Wachstumsphase bei 30°C angezogen. Die Zellen wurden gewaschen und in YNB -N mit 5% Glukose überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Proteinrohextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt.

Anders verhält sich jedoch die Proteinstabilität von Hxt6/7 in einer  $\Delta pep4$ -Mutante. *PEP4* kodiert für die Proteinase A, eine bedeutende Protease der Vakuole (Jones et al., 1982). Teichert et al. (1989) zeigten, dass ein Funktionsverlust von Pep4 zu einer proteolytisch inaktiven Vakuole führt. In der  $\Delta pep4$ -Mutante ist die Halbwertszeit von Hxt6/7 unter Stickstoffhungerbedingungen in Anwesenheit von 5% Glukose deutlich erhöht (Abb. 12). Nach einer 6-stündigen Inkubation der Zellen unter Inaktivierungsbedingungen ist nahezu kein Abbau der Transportproteine zu verzeichnen. Somit findet der zelluläre Abbau von Hxt6/7 bei Stickstoffhunger in Gegenwart hoher Glukosekonzentrationen vor allem in der Vakuole statt und nicht in dem zytoplasmatischen Proteasom.

### 3.6 Internalisierung von Hxt6/7 mittels Endozytose

Hefen besitzen mehrere Transportwege, um Proteine zur Vakuole zu liefern: z. B. die Endozytose, die Autophagozytose oder den Cvt-Weg. Plasmamembran-

proteine werden üblicherweise mittels Endozytose von der Plasmamembran internalisiert und dann zur Vakuole geliefert (Knop et al., 1993). Ob auch Hxt6/7 unter Inaktivierungsbedingungen via Endozytose zur Vakuole geliefert werden, wurde mit einer *end4<sup>ts</sup>*, einer *act1-1<sup>ts</sup>* und einer  $\Delta$ *ren1*-Mutante untersucht, die alle einen Defekt im Endozytoseprozess aufweisen.



**Abb. 13: Proteinstabilität von Hxt6/7 in *end4<sup>ts</sup>*, *act1-1* und  $\Delta$ *ren1*-Mutanten.** Der Stamm RKY#536 (*end4<sup>ts</sup>*) und RKY#534 (WT) bzw. der Stamm DBY4878 (*act1-1*) und DBY1689 (WT) wurden in YEP mit 3% Raffinose bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Zellen wurden für 1 h bei 37°C inkubiert, gewaschen und in YNB -N mit 5% Glukose überführt und bei 37°C inkubiert. Der Stamm CMY1003 ( $\Delta$ *ren1*) und CMY1001 (WT) wurden in YEP mit 3% Raffinose bei 30°C angezogen. Die Zellen wurden gewaschen und in YNB -N mit 5% Glukose überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Proteinrohextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt.

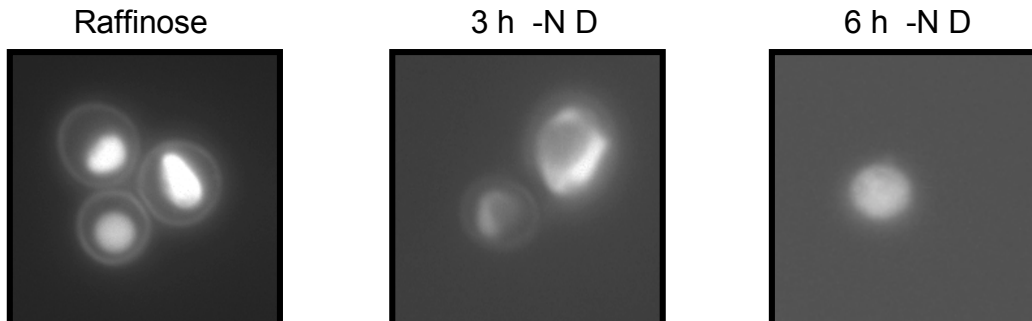
Die Hexosetransporter Hxt6 und Hxt7 sind in allen drei Mutanten im Vergleich zu den entsprechenden Wildtypstämmen deutlich stabilisiert (Abb. 13). In *end4*- und *act1*-Mutanten ist ein früher Schritt der Endozytose gestört, die Internalisierung der Proteine von der Plasmamembran (Raths et al., 1993; Novick und Botstein, 1985). In einer *ren1*-Mutante ist dagegen ein später Schritt in der Endozytose blockiert. Davis et al. (1993) vermuteten, dass Ren1 am Vesikeltransport von den Endosomen zur Vakuole beteiligt ist. Somit werden die Hexosetransporter Hxt6/7 unter Hungerbedingungen offensichtlich via Endozytose von der Plasmamembran internalisiert und anschließend zum Abbau zur Vakuole geliefert.

### 3.7 Lokalisierung eines Hxt7-GFP-Fusionsproteins unter Hungerbedingungen

Um den Abbaumechanismus von Hxt6/7 unter Hungerbedingungen mit einer unabhängigen Methode zu bestätigen, wurde die Lokalisierung von Hxt7 vor und nach Inaktivierung untersucht. Hierfür wurde der Hexosetransporter Hxt7 C-terminal mit dem Grün-fluoreszierenden Protein (GFP) aus *Aequorea victoria*

genetisch fusioniert. Das nach der unter 2.14.1 beschriebenen Methode konstruierte Plasmid YCpHXT7-GFP konnte in *E. coli* nicht amplifiziert werden. Nach Transformation des Plasmids in den *hxt*-Stamm EBY.VW4000 komplementierte es jedoch dessen Wachstumsdefekt auf Glukose. Somit war das Hxt7-GFP-Fusionsprotein funktionell. Ferner unterliegt dieses Fusionsprotein laut einer Western-Blot-Analyse mit Hxt6/7-spezifischen Antikörpern einer ebenso schnellen Inaktivierung wie das Hxt7-Wildtypprotein (ohne Abb.).

Die Lokalisierung des Hxt7-GFP-Fusionsproteins wurde vor und nach Induktion der Inaktivierung mittels Fluoreszenz-Mikroskopie untersucht. Hierfür wurde das Plasmid YCpHXT7-GFP in den Stamm VW1A transformiert und die Expression des Fusionsproteins in Raffinose-haltigem Minimalmedium induziert. Erwartungsgemäß ist das Hxt7-GFP-Protein unter diesen Bedingungen in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 14). Zusätzlich ist jedoch auch im Zellinneren deutlich eine große Struktur, wahrscheinlich die Vakuole, gefärbt. Das GFP-Protein entzieht sich vermutlich dem proteolytischen Abbau in der Vakuole, da das GFP-Chromophor relativ Protease-resistent ist (Chalfie, 1995). Daher kann man die Färbung der Vakuole unter Wachstumsbedingungen wohl auf den natürlichen Turnover des Hxt7-Transporters und die Stabilität des GFP-Proteins zurückführen.



**Abb. 14: Lokalisierung des Hxt7-GFP-Fusionsproteins vor und nach Inaktivierung.** Der Stamm VW1A/YCpHXT7GFP wurde in YNB  $ura^-$  mit 3% Raffinose bis zur exponentiellen Wachstumsphase bei 30°C angezogen. Die Zellen wurden geerntet, gewaschen und in YNB -N mit 5% Glukose überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Fluoreszenz der Zellen mikroskopisch untersucht.

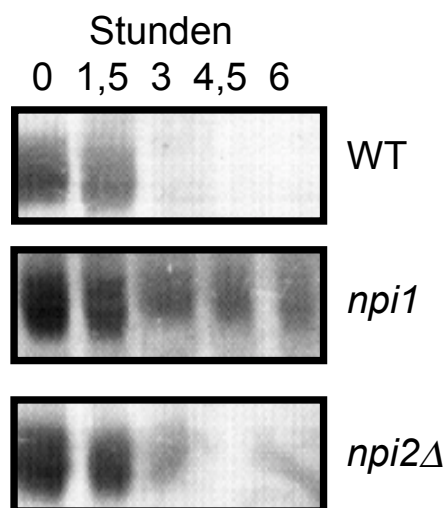
Nach Überführung der Zellen in Stickstoffhungermedium mit 5% Glukose wird das Fluoreszenzsignal in der Zellperipherie graduell reduziert. Zunächst tritt das Fluoreszenzsignal verstärkt in punktierten Strukturen nahe der Plasmamembran auf (ohne Abb.). Ähnliche Strukturen beobachteten auch Kruckeberg et al. (1999) zu einem frühen Zeitpunkt nach Induktion der Endozytose eines Hxt2-GFP-Fusionsproteins. Die Autoren postulierten, dass es sich hierbei um endozytische Vesikel handelt. Nach längerer Inkubation in Stickstoffhungermedium mit Glukose

akkumuliert das Hxt7-GFP-Protein in einer relativ großen intrazellulären Struktur, wahrscheinlich in der Vakuole.

Die Fluoreszenzstudien stehen im Einklang mit den Ergebnissen aus den Abbaustudien mit den Endozytosemutanten und der  $\Delta pep4$ -Mutante. Demnach wird Hxt7 nach Induktion der Inaktivierung durch Stickstoffhunger in Anwesenheit von Glukose mittels Endozytose von der Plasmamembran internalisiert und zum Abbau zur Vakuole geliefert.

### 3.8 Ubiquitinierung als Signal für den Abbau von Hxt6/7

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass Ubiquitinierung nicht nur an der Proteolyse zytosolischer Proteine, sondern auch am Abbauprozess von Plasmamembranproteinen beteiligt ist (Kölling und Hollenberg, 1994; Hochstrasser, 1995). Um die Bedeutung der Ubiquitinierung an der Inaktivierung von Hxt6/7 zu ermitteln, wurden Hefestämme analysiert, die Defekte in der Ubiquitinierungsreaktion aufweisen. In der *npi1*-Mutante ist die Aktivität der Ubiquitin-Protein-Ligase Rsp5, ein E3-Enzym, reduziert. Hein et al. (1995) vermuteten daher, dass der Transfer von Ubiquitinmolekülen an das Zielprotein gestört sein könnte. *NPI2* kodiert für die Ubiquitin-Protein-Hydrolase Doa4, ein E4-Enzym.  $\Delta npi2$ -Mutanten zeichnen sich durch eine fehlende Deubiquitinierungsfunktion und einen reduzierten Pool der zur Verfügung stehenden Ubiquitinmoleküle aus (Springael et al., 1999a).



**Abb. 15: Proteinstabilität von Hxt6/7 in einer *npi1*- und einer  $\Delta npi2$ -Mutante.** Der Stamm 27038a (*npi1*), 27002d ( $\Delta npi2$ ) und der isogene Wildtypstamm 23344c wurden in YEP mit 3% Raffinose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Zellen wurden gewaschen und in YNB -N mit 5% Glukose überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Proteinrohextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt.

Ein Vergleich der Proteinstabilität von Hxt6/7 in der *npi1*- und  $\Delta npi2$ -Mutante zeigte, dass v. a. in der *npi1*-Mutante der Abbau von Hxt6/7 deutlich reduziert ist (Abb. 15). In der  $\Delta npi2$ -Mutante ist dagegen nur eine sehr geringe Stabilisierung von Hxt6/7 im Vergleich zum Wildtypstamm zu beobachten.

Für eine Reihe von Plasmamembranproteinen konnte bereits gezeigt werden, dass eine Ubiquitinierung der Proteine für die Einleitung der Endozytose und einen anschließenden Abbau essentiell sein kann (Galan et al., 1996; Medintz et al., 1998). So löst beispielsweise eine mono-Ubiquitinierung der Maltosepermease die Inaktivierung des Transporters aus (Medintz et al., 1998). Aufgrund der deutlichen Stabilisierung der Hexosetransporter v. a. in der *npi1*-Mutante scheint eine Ubiquitinierung auch für den Abbauprozess von Hxt6/7 wichtig zu sein.

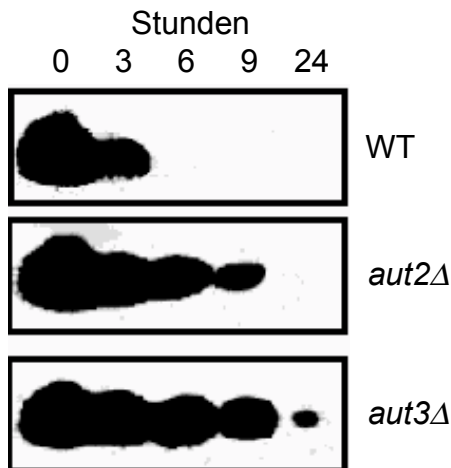
### 3.9 Beteiligung von Autophagozytoseproteinen am Abbauprozess von Hxt6/7

Die Autophagozytose ist ein wichtiger, unspezifischer Abbauprozess von zytosolischen Proteinen unter Stickstoffhungerbedingungen (Takeshige et al., 1992). Durch den Proteinabbau gewinnt die Zelle wichtige zelluläre Baustoffe zurück. Abbaustudien an  $\Delta aut2$ - und  $\Delta aut3$ -Hefestämmen, die einen Defekt im Autophagozytoseprozess aufweisen, zeigten, dass der Abbau der Hexosetransporter Hxt6/7 in diesen Mutanten deutlich gestört ist (Abb. 16). Diese Beobachtung war überraschend, da bisher der Abbau von Proteinen über die Autophagozytose nur für zytosolische Proteine beschrieben worden war. Eine Beteiligung des Autophagozytoseprozesses am Abbau von Plasmamembranproteinen war in Hefe nicht bekannt.

Die Konstruktion der Stämme SKY41 ( $\Delta aut2$ ) und SKY51 ( $\Delta aut3$ ) erfolgte nach der unter 2.13 beschriebenen Methode mit den Oligonukleotiden s1/s2-AUT2 bzw. s1/s2-AUT3. Die Deletionen wurden mit den Primern a1/a4-AUT2 bzw. a1/a4-AUT3 mittels PCR-Reaktion überprüft.

Die Funktionen der Proteine Aut2 (=Apg4) und Aut3 (=Apg1/Cvt10) sind noch weitgehend ungeklärt. Nach Lang et al. (1998) ist Aut2 Bestandteil eines Proteinkomplexes, der an der Lieferung der Autophagosomen zur Vakuole über das Mikrotubuli-Zytoskelett involviert ist. Huang et al. (2000) zeigten jedoch, dass Aut2 zusammen mit Aut7 (=Apg8) schon an der Vesikelbildung beteiligt sein muss. Über die Funktion von Aut3 gibt es mehrere Hypothesen. Aufgrund einer starken Homologie des N-Terminus von Aut3 zu Serin/Threonin-Kinasen (Straub et al., 1997; Matsuura et al., 1997) könnte Aut3 eine Funktion in einer Signaltransduktionskaskade ausüben und so z. B. in die Wahrnehmung des Nährstoffangebots involviert sein. Alternativ könnte das in  $\Delta aut3$ -Mutanten elektronenmikroskopisch beobachtete elongierte ER auf eine Funktion von Aut3 an der Biogenese der autophagischen Vesikel am ER hindeuten (Straub et al., 1997).

Am wahrscheinlichsten ist jedoch das Mitwirken von Aut3 an der Regulation des Wechsels zwischen dem Hunger-induzierten Autophagozytoseprozess und dem unter vegetativen Bedingungen stattfindenden, topologisch jedoch sehr ähnlichen, Cvt-Weg (Kamada et al., 2000).



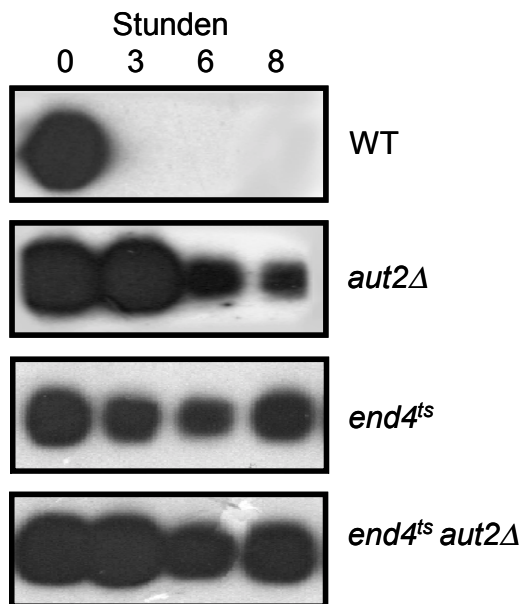
**Abb. 16: Proteinstabilität von Hxt6/7 in  $\Delta aut2$ - und  $\Delta aut3$ -Mutanten.** Der Stamm SKY41 ( $\Delta aut2$ ), SKY51 ( $\Delta aut3$ ) und der isogene Wildtypstamm VW1A wurden in YEP mit 3% Raffinose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Zellen wurden gewaschen und in YNB -N mit 5% Glukose überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Proteinrohextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt.

Abb. 16 zeigt den deutlich langsameren Abbau von Hxt6/7 in den  $\Delta aut2$ - und  $\Delta aut3$ -Mutanten in Stickstoffhungermedium mit 5% Glukose. Während im Wildtyp nach 6-stündiger Inaktivierung in der Western-Blot-Analyse kein Protein mehr nachweisbar ist, kann Hxt6/7 in der  $\Delta aut2$ -Mutante noch nach einer 9-stündiger Inaktivierung und in der  $\Delta aut3$ -Mutante sogar noch nach einer 24-stündiger Inaktivierung nachgewiesen werden. Die Proteine Aut2 und Aut3, die normalerweise eine Funktion am Proteinabbau zytosolischer Proteine unter Hungerbedingungen ausüben, sind somit auch am Inaktivierungsprozess der Plasmamembranproteine Hxt6/7 unter Hungerbedingungen beteiligt.

### 3.10 Mögliche Beteiligung von Aut2 und Aut3 an der Endozytose

Überraschenderweise war der Abbau von Hxt6 und Hxt7 in  $\Delta aut2$ - und  $\Delta aut3$ -Mutanten deutlich gehemmt (3.9). Es ist jedoch unklar, wie diese Proteine an dem Abbauprozess von Hxt6/7 beteiligt sind. Zum einen könnte die Autophagozytose indirekt am Abbau der Hexosetransporter beteiligt sein, indem z. B. Endosomen von Autophagosomen umschlossen werden und dann zur Vakuole geliefert werden. Andererseits ist aber auch möglich, dass die Autophagozytoseproteine eine weitere, bisher noch unbekannte Funktion besitzen. So ist z. B. eine Beteiligung der Proteine am Sekretionsweg oder an einem bislang noch unbekanntem Abbauweg von Plasmamembranproteinen denkbar. Um eine mögliche Überschneidung der Autophagozytose mit der Endozytose zu

untersuchen, wurde die Stabilität von Hxt6/7 in einer *end4<sup>ts</sup> Δaut2*-Doppelmutante im Vergleich zu den jeweiligen Einzelmutanten untersucht.



**Abb. 17: Proteinstabilität von Hxt6/7 in *Δaut2*-, *end4<sup>ts</sup>*- und *Δaut2 end4<sup>ts</sup>*-Mutanten.** Die Stämme SKY44k (*Δaut2*), RKY#536 (*end4<sup>ts</sup>*) und SKY43 (*Δaut2 end4<sup>ts</sup>*) und der isogene Wildtypstamm RKY#534 wurden in YEP mit 3% Raffinose bei 25°C bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Zellen wurden für 1 h bei 37°C inkubiert, gewaschen und in vorgewärmtes YNB -N mit 5% Glukose überführt und bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Proteinrohextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt.

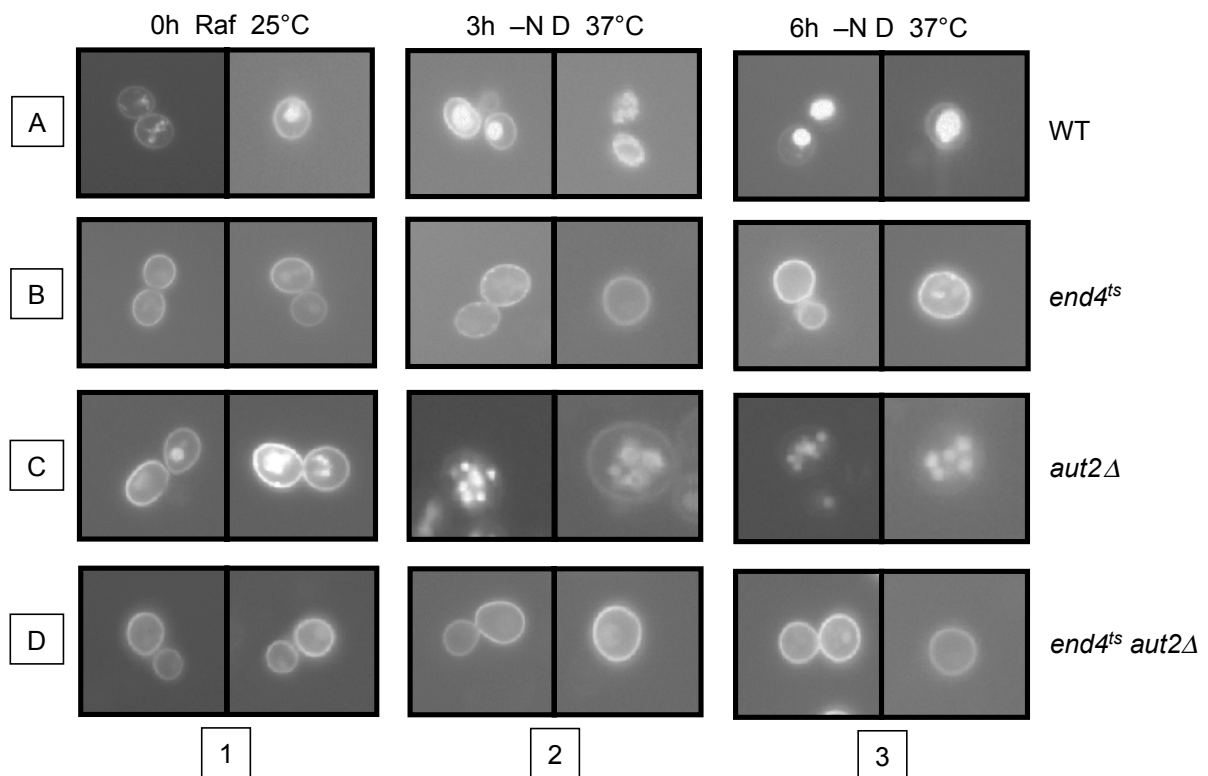
Wie Abb. 17 zeigt unterscheidet sich die Stabilität von Hxt6/7 in der *end4<sup>ts</sup>*-Einzelmutante kaum von der Halbwertszeit der Proteine in der *end4<sup>ts</sup> Δaut2*-Doppelmutante. In beiden Stämmen sind die Hexosetransporter über den gesamten untersuchten Zeitraum nahezu stabil. In der *Δaut2*-Einzelmutante ist dahingegen noch ein leichter Abbau zu verzeichnen. Aufgrund der Ähnlichkeit der Halbwertszeiten von Hxt6/7 in den unterschiedlichen Stämmen können keine direkten Rückschlüsse gezogen werden, ob die Autophagozytoseproteine in dem gleichen Abbauweg wirken wie End4 oder ob Aut2/Aut3 und End4 in zwei verschiedenen Abbauwegen eine Funktion ausüben. Aufgrund der starken Stabilisierung von Hxt6/7 über einen Zeitraum von 8 Stunden in den Einzelmutanten erscheint jedoch ein paralleler Abbauweg unwahrscheinlich.

### 3.11 Lokalisierung eines Hxt7-GFP-Fusionsproteins in Endozytose- und Autophagozytosemutanten

Um einen Eindruck zu bekommen an welchem Schritt in den Autophagozytosemutanten der Abbau der Hexosetransporter blockiert ist, wurde die Lokalisierung eines Hxt7-GFP-Fusionsproteins unter Inaktivierungsbedingungen in Endozytose- und Autophagozytosemutanten untersucht. Vorstellbar ist z. B. neben der Aufgabe von Aut2 und Aut3 in der Autophagozytose eine zusätzliche Funktion in der Endozytose, dem Sekretionsweg oder der vakuolären Biogenese. Bisher



wurden jedoch in Hefe Auswirkungen auf diese Transportwege in Autophagozytose-mutanten nicht beobachtet (Thumm, 1998; Tsukada und Ohsumi, 1993). Die Möglichkeit scheint jedoch trotzdem nicht gänzlich abwegig, da in Hefen mehrere Überschneidungen der verschiedenen Proteintransportwege bekannt sind. So treffen z. B. die Endozytose und der biosynthetische Sekretionsweg in einem prä-vakuolären, Endosomen-ähnlichen Kompartiment zusammen. Als Folge wird die unterschiedliche Ladung der Vesikel gemeinsam zur Vakuole geliefert (Babst et al., 1997; Rieder und Emr, 1997). Es wurde sogar bereits vermutet, dass ein endosomales Kompartiment an einem regulatorischen Schritt der Autophago-zytose involviert ist (Babst et al., 1997). In Säugerzellen wurden dagegen schon mehrfach direkte Überschneidungen des endozytischen mit dem autophago-zytischen Weg beschrieben (Gordon und Seglen, 1988; Punnonen et al., 1993; Tooze et al., 1990; Lucoq und Walker, 1997).



**Abb. 18: Lokalisierung des Hxt7-GFP-Fusionsproteins in Endozytose- bzw. Autophagozytosemutanten.** Die Stämme RKY#534 (WT), RKY#536 (*end4<sup>ts</sup>*), SKY44k (*Δaut2*) und SKY43 (*Δaut2 end4<sup>ts</sup>*) wurden bis zur exponentiellen Wachstumsphase in YNB *ura*<sup>-</sup> mit 3% Raffinose bei 25°C angezogen. Die Zellen wurden für 1 h bei 37°C inkubiert, gewaschen und in YNB -N mit 5% Glukose überführt und bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Fluoreszenz der Zellen mikroskopisch untersucht.

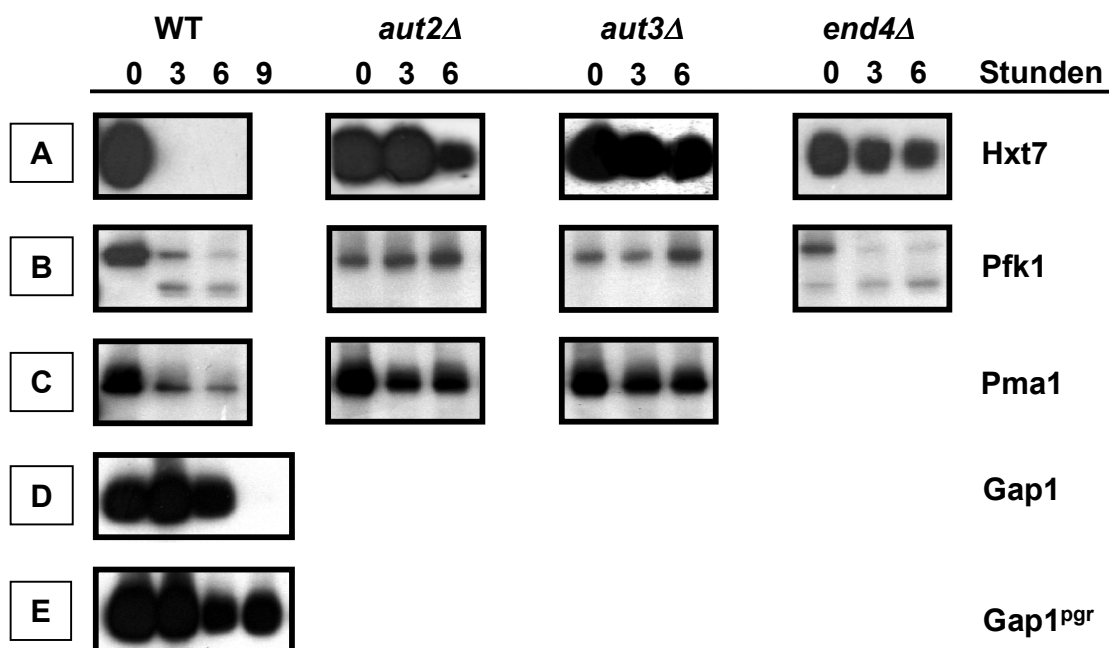
Aufgrund des temperatursensitiven Defekts von *END4* wurde die Expression von Hxt7-GFP bei der permissiven Temperatur in Raffinose-haltigem Medium induziert. Zu diesem Zeitpunkt ist im Wildtyp eine starke GFP-Färbung in der

Plasmamembran zu erkennen, parallel aber auch in intrazellulären Strukturen (Abb. 18A<sub>1</sub>). Nach Induktion der Inaktivierung von Hxt7-GFP weisen einige Zellen kleine punktierte Strukturen direkt an der Plasmamembran auf (Abb. 18A<sub>2</sub>). Diese Strukturen deuten wahrscheinlich auf die Bildung endozytischer Vesikel hin. Nach längerer Inaktivierung findet man im Wildtyp die Fluoreszenz in einer großen Struktur im Zellinneren, wahrscheinlich in der Vakuole (Abb. 18A<sub>3</sub>). In der *end4*-Mutante ist dagegen auch nach 6-stündiger Inkubation der Zellen in Stickstoffhungermedium mit 5% Glukose weiterhin die Plasmamembran stark gefärbt (12B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>). Es findet also keine Internalisierung des Fusionsproteins von der Plasmamembran statt. Allerdings ist die Färbung der Plasmamembran häufig ungleichmäßig. Möglicherweise reichern sich die Hxt7-Proteine nach Induktion der Inaktivierung in *end4*-Mutanten noch in bestimmten Membranregionen an, können jedoch nicht mehr internalisiert werden. Aber auch in der  $\Delta$ *aut2*-Mutante wird ebenso wie im Wildtyp zunächst eine starke Färbung der Plasmamembran beobachtet (Abb. 18C<sub>1</sub>). Die Lieferung des Hexosetransporters Hxt7 über den sekretorischen Weg scheint somit in  $\Delta$ *aut2*-Zellen nicht beeinträchtigt zu sein. Nach Überführen der Zellen in Stickstoffhungermedium mit Glukose beobachtet man in dem  $\Delta$ *aut2*-Stamm ebenso wie im Wildtyp eine Internalisierung von Hxt7 von der Plasmamembran (Abb. 18C<sub>2</sub>). Somit ist Aut2 auch nicht an einem frühen Schritt im Endozytoseprozess beteiligt. Das Hxt7-GFP-Protein ist nach Induktion der Inaktivierung im Zellinneren auf mehrere relativ große Strukturen verteilt. Diese Art der Färbung kann in dem Wildtypstamm und in der *end4*-Mutante nicht beobachtet werden. Vielleicht handelt es sich hier um späte Endosomen, die nicht mehr mit der Vakuole verschmelzen können und dadurch stabil im Zytosol verweilen. Da das Hxt7-GFP-Protein in der  $\Delta$ *aut2*-Mutante anscheinend nicht in die Vakuole aufgenommen wird, scheint auch eine direkte Beteiligung von Aut2 an einem Abbauprozess in der Vakuole auch unwahrscheinlich. In der *end4*- $\Delta$ *aut2*-Doppelmutante beobachtet man den gleichen Phänotyp wie in der *end4*-Einzelmutante, wo das Hxt7-GFP-Protein stabil in der Plasmamembran residiert (Abb. 18D).

Folglich ist Aut2 weder an einem Schritt des sekretorischen Wegs, noch an einem frühen Schritt der Endozytose, noch an einem direkten Abbauschritt des Hexosetransporters in der Vakuole beteiligt. Eine Überschneidung der Autophagozytose und der Endozytose, ähnlich zu der in den Säugerzellen beobachteten Fusion von Endosomen mit Autophagosomen, könnte also auch in Hefe existieren.

### 3.12 Stabilität weiterer Proteine unter Stickstoffhungerbedingungen in Autophagozytosemutanten

Eine Beteiligung des unspezifischen Autophagozytoseprozesses am Abbau der Hexosetransporter impliziert, dass es sich bei dem Abbau der Hexosetransporter unter Hungerbedingungen ebenfalls um einen nicht selektiven Proteinabbau handelt. Um die Spezifität des Proteinabbaus unter Stickstoffhungerbedingungen zu untersuchen, wurden einige andere Proteine unter Stickstoffhungerbedingungen in den bereits beschriebenen  $\Delta aut2$ - und  $\Delta aut3$ -Mutanten sowie einer  $\Delta end4$ -Mutante untersucht. Die  $\Delta end4$ -Mutante wurde nach der unter 2.13 beschriebenen Methode mit den Oligonukleotiden s1-LEND4/s2-END4 konstruiert und mit den Primern a1/a4-END4 überprüft.



**Abb. 19: Stabilität von Hxt6/7, Pfk1, Pma1, Gap1 und Gap1<sup>pgf</sup> im Wildtyp, in  $\Delta aut2$ -,  $\Delta aut3$ - und  $\Delta end4$ -Mutanten.** (A) Der Wildtypstamm VW1A und die Stämme SKY41 ( $\Delta aut2$ ), SKY51 ( $\Delta aut3$ ) und SKY39 ( $\Delta end4$ ) wurden in YEP mit 3% Raffinose angezogen. (B) + (C) Der Wildtypstamm VW1A und die Stämme SKY41 ( $\Delta aut2$ ) und SKY51 ( $\Delta aut3$ ) wurden in YEP mit 2% Glukose angezogen. (D) + (E) Die Stämme 23344c (*GAP1*) und 33089d (*gap1<sup>pgf</sup>*) wurden in YNB - N mit 0,1% Prolin, 0,44 mM Uracil und 2% Glukose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Zellen wurden gewaschen und in YNB -N mit 5% Glukose überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Proteinrohextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit den jeweils spezifischen Antikörpern.

Die Phosphofruktokinase Pfk1 der Glykolyse wird unter Stickstoffhungerbedingungen in Anwesenheit von 5% Glukose im Wildtyp erwartungsgemäß schnell abgebaut (Abb. 19B), da zytosolische Proteine unter diesen Bedingungen dem autophagozytischen Abbau unterliegen. In den Autophagozytosemutanten

$\Delta aut2$  und  $\Delta aut3$  verhält sich Pfk1 dementsprechend dagegen stabil. Im Gegensatz dazu ist der Abbau von Pfk1 in der Endozytosemutante  $\Delta end4$  wie erwartet nicht beeinträchtigt. Abb. 19C zeigt, dass das Plasmamembranprotein Pma1 bei Stickstoffhunger einem Abbau unterliegt, wenn auch einem deutlich langsameren als die Hexosetransporter Hxt6/7 (Abb. 19A). In den  $\Delta aut2$ - und  $\Delta aut3$ -Mutanten verhält sich Pma1 ebenso wie Hxt6/7 stabil. Somit sind die Proteine Aut2 und Aut3 auch am Abbau anderer Plasmamembranproteine beteiligt.

Die generelle Aminosäurepermease Gap1 wird nach Überführung in Stickstoffhungermedium mit 5% Glukose vermutlich langsamer abgebaut als Hxt6/7 oder Pma1 (Abb. 19D). Allerdings ist berücksichtigen, dass die Expression von Gap1 speziell unter Stickstoffmangelbedingungen induziert wird, somit wahrscheinlich noch Proteinneusynthese stattfindet. Jedoch ist in den Abb. 19D und E deutlich zu erkennen, dass der Abbau eines Plasmamembranproteins auch nach Induktion der Inaktivierung durch Stickstoffhunger und hohen Glukosekonzentrationen schon durch den Austausch einer einzigen Aminosäure beeinflusst werden kann. Die mutierte Form des Gap1-Proteins Gap1<sup>pgf</sup> unterscheidet sich von dem Wildtypprotein nur in dem Glutamatrests 582, der gegen die Aminosäure Lysin ausgetauscht wurde (Hein und André, 1997). Somit sind die Halbwertszeiten von Plasmamembranproteinen auch unter Stickstoffhungerbedingungen in Anwesenheit von Glukose sehr variabel und durch die Aminosäuresequenz des Plasmamembranproteins intrinsisch reguliert. Folglich ist der schnelle Abbau von Plasmamembranproteinen bei Stickstoffhunger kein genereller, unspezifischer Mechanismus.

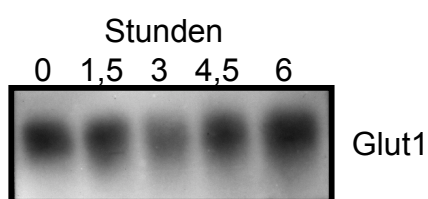
### 3.13 Stabilität von GLUT1<sup>V69M</sup> in Hefe unter Hungerbedingungen

Da der Abbau von Plasmamembranproteinen unter Hungerbedingungen kein unspezifischer Prozess zu sein scheint, besitzen vermutlich auch die Hexosetransporter intrinsische Signale, die für die Auslösung des Abbaus in Abwesenheit von Stickstoffquellen essentiell sind. Diese Annahme ist eine Voraussetzung, um einen unter Hungerbedingungen stabilisierten Hexosetransporter konstruieren zu können.

Die Stabilität des in Hefe heterolog-exprimierten Glukosetransporters GLUT1 der Ratte sollte mit der Stabilität der Hexosetransporter Hxt6/7 unter Hungerbedingungen verglichen werden. Durch einen solchen Vergleich sollte untersucht werden, ob die Transportproteine von *S. cerevisiae* Hefe-spezifische Abbaumotive

besitzen oder ob das Säuger-Plasmamembranprotein ebenfalls Signale enthält, die durch die Abbaumaschinerie der Hefe erkannt werden. Sollte sich GLUT1 stabiler verhalten als die Hexosetransporter Hxt6 und Hxt7 der Hefe, wäre es eventuell möglich durch einen Aminosäuresequenzvergleich von GLUT1 und Hxt6/7 mögliche Abbaumotive zu identifizieren.

Für die Konstruktion eines Hefestammes der einen funktionellen GLUT1-Glukosetransporter unter Kontrolle des verkürzten *HXT7*-Promotors exprimiert, wurde das Gen GLUT1<sup>V69M</sup> durch PCR von dem Plasmid pTV3eGLUT1 (Wieczorke et al., 2001) mit den Primern c1-pH7G1 und c4-pH7G1 amplifiziert. Da sich herausgestellt hatte, dass das Wildtyp-GLUT1-Protein in Hefe nicht funktionell ist, wurde eine modifizierte und in Hefe aktive Form von GLUT1 verwendet. Die Aminosäure Valin an Position 69 ist in dem modifizierten GLUT1<sup>V69M</sup>-Protein gegen Methionin ausgetauscht (Wieczorke et al., 2001). Das synthetisierte GLUT1<sup>V69M</sup>-PCR-Fragment, flankiert von kurzen überlappenden Regionen zum *HXT7*-Promotor und *HXT7*-Terminator, wurde in den Stamm JBY15 transformiert (siehe 2.15). Dieser Stamm kann keine Hexosen aufnehmen und besitzt eine in die Region des einstigen *HXT3-6-7*-Genclusters genomisch integrierte Kasette aus dem verkürzten *HXT7*-Promotor<sup>(-392 bis +1)</sup>, dem *K. lactis URA3*-Gen und dem *HXT7*-Terminator. Die Selektion auf Zellen, die das GLUT1<sup>V69M</sup>-Gen korrekt integriert hatten, erfolgte auf FOA-haltigem Minimalmedium mit 0,2% Glukose. Der resultierende Stamm mit dem integrierten GLUT<sup>V69M</sup>-Gen unter Kontrolle des nicht Glukose-reprimierten, verkürzten *HXT7*-Promotors wurde SKY3 genannt.



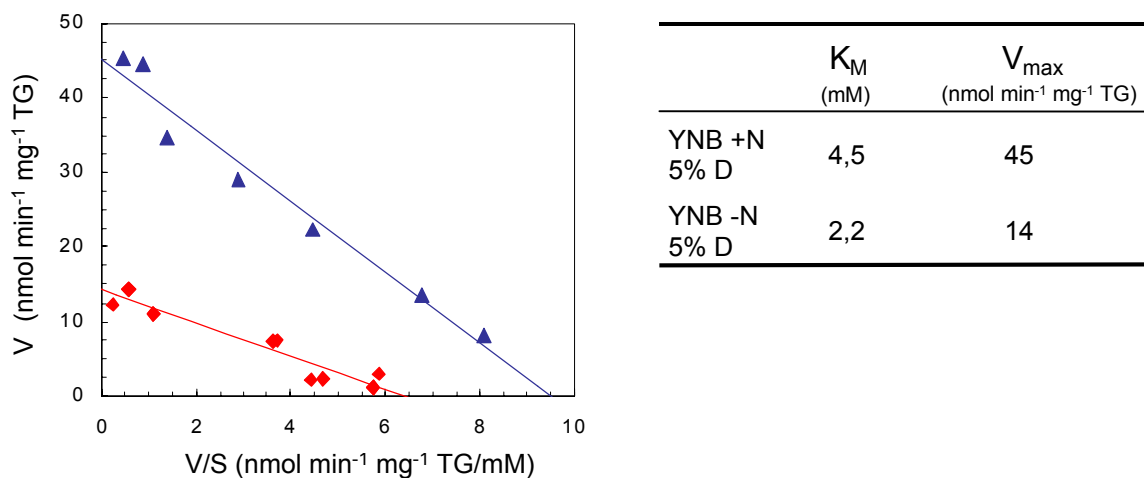
**Abb. 20: Proteinstabilität von GLUT1<sup>V69M</sup> in Stickstoffhungermedium mit 5% Glukose.** Der Stamm SKY3 (GLUT<sup>V69M</sup>) wurde in YNB + N mit 5% Glukose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Zellen wurden gewaschen und in YNB -N mit 5% Glukose überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Proteinrohextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt. Der Nachweis von GLUT1<sup>V69M</sup> erfolgte mit einem GLUT1-Antiserum.

Um die Stabilität des Säugertransporters GLUT1<sup>V69M</sup> in Hefe zu untersuchen, wurde der Stamm SKY3 in Minimalmedium mit 5% Glukose angezogen und in Stickstoffhungermedium mit 5% Glukose überführt. Tatsächlich verhält sich das GLUT1<sup>V69M</sup>-Säugerprotein in Hefe sehr stabil und wird innerhalb von 6 Stunden nicht abgebaut (Abb. 20).

Für die Konstruktion eines stabilisierten Hexosetransportproteins ist es wichtig, dass der Transporter funktionell in der Plasmamembran lokalisiert bleibt. Nur dann kann unter Hungerbedingungen durch eine nicht reduzierte Zuckeraufnahme eine höhere Fermentationsrate erzielt werden. Die beobachtete Stabilität des Säugerproteins GLUT1<sup>V69M</sup> in der Western-Blot-Analyse bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass das Protein nicht von der Endozytosemaschinerie der Hefe erkannt wird und noch funktionell in die Plasmamembran integriert vorliegt. So ist es auch möglich, dass das Protein zwar noch internalisiert wird, dann jedoch z. B. in vesikulären Strukturen zurückgehalten wird und nicht zur Vakuole geliefert wird. Das Protein kann unter solchen Umständen jedoch keinen Zuckertransport über die Plasmamembran vermitteln.

### 3.14 GLUT1<sup>V69M</sup>-vermittelte Glukoseaufnahme in Hefe unter Hungerbedingungen

Um die Funktionalität des heterolog-exprimierten Glukosetransporters GLUT1<sup>V69M</sup> in Hefe unter Hungerbedingungen zu untersuchen, wurden Glukoseaufnahmemessungen vor und nach Inaktivierung durchgeführt.



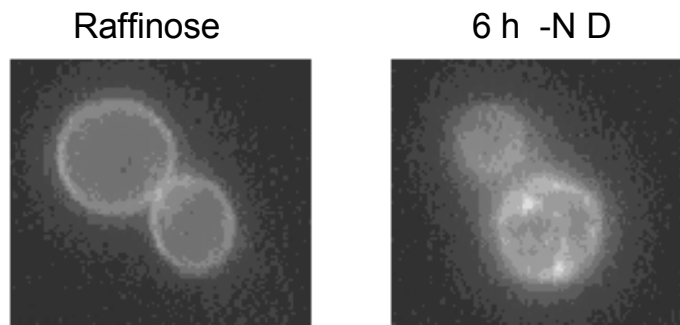
**Abb. 21: Eadie-Hofstee Plots der Glukoseaufnahme durch GLUT1<sup>V69M</sup> vor und nach Inaktivierung.** Der Hefestamm SKY3 (*hxt<sup>+</sup>* GLUT1<sup>V69M</sup>) wurde in YNB +N mit 5% Glukose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen, gewaschen und für 24 h in YNB -N mit 5% Glukose inkubiert. Aufnahmemessung vor Inaktivierung (■, +N) bzw. nach Inaktivierung (◻, -N)

Der Stamm SKY3 (*hxt<sup>+</sup>* GLUT1<sup>V69M</sup>) wurde in Minimalmedium mit 5% Glukose angezogen und für 24 h in Stickstoffhungermedium mit 5% Glukose überführt. Die Glukoseaufnahmeaktivität von GLUT1<sup>V69M</sup>-exprimierenden Zellen wird nach Inaktivierung deutlich reduziert (Abb. 21). So sinkt der  $V_{max}$  auf 1/3 des Ausgangswertes, von 45 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG auf 14 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG. Obwohl

das GLUT1<sup>V69M</sup>-Protein in der Western-Blot-Analyse stabilisiert vorliegt (Abb. 20), ist die Aufnahmeaktivität der Zellen unter Inaktivierungsbedingungen deutlich reduziert.

### 3.15 Lokalisierung eines GLUT1-GFP-Fusionsproteins in Hefe unter Hungerbedingungen

Um herauszufinden, ob die Abnahme der Glukoseaufnahmeaktivität von GLUT1 auf eine Inhibierung des Proteins an der Plasmamembran oder auf eine Internalisierung des Proteins zurückzuführen ist, wurde die Lokalisierung eines GLUT1-GFP-Fusionsproteins nach Inkubation in Stickstoffhungermedium untersucht. Dafür wurde das Plasmid YEprGLUT1-GFP (Wieczorke et al., 2001) in den Stamm EBY.S7 (*hxt<sup>-</sup> fgy1-1*) transformiert. Von dem Plasmid wird eine C-terminale Fusion des GLUT1-Wildtypproteins mit GFP unter Kontrolle des *MET25*-Promotors exprimiert. Durch die Mutation in dem Gen *FGY1* wird auch das nicht-modifizierte GLUT1-Protein in dem Stamm EBY.S7 in einer aktiven Form in die Plasmamembran integriert. So konnte die Lokalisierung von GLUT1-GFP fluoreszenzmikroskopisch vor und nach Inaktivierung untersucht werden.



**Abb. 22: Lokalisierung von GLUT1-GFP vor und nach Inaktivierung.** Der Stamm EBY.S7/YEprGLUT1-GFP wurde in YNB +N *ura<sup>-</sup> met<sup>-</sup>* mit 3% Raffinose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Zellen wurden gewaschen und für 6 h in YNB -N mit 5% Glukose überführt. Die Fluoreszenz der Zellen wurde vor und nach 6-stündiger Inaktivierung mikroskopisch untersucht.

Das GLUT1-GFP-Fusionsprotein ist unter vegetativen Bedingungen erwartungsgemäß nahezu ausschließlich in der Plasmamembran lokalisiert (Abb. 22). Nach 6-stündiger Inaktivierung ist jedoch weniger Fluoreszenz in der Plasmamembran zu beobachten, dafür sind deutliche Strukturen im Zellinneren, v. a. direkt unterhalb der Plasmamembran zu erkennen. Anscheinend wird GLUT1-GFP unter Inaktivierungsbedingungen zwar noch von der Plasmamembran internalisiert,

jedoch nicht zum Abbau zur Vakuole geliefert, sondern ist stabil in internen Strukturen wie z. B. in frühen Endosomen lokalisiert.

Folglich wird das Säuger-Glukosetransportprotein GLUT1 von der Endozytosemaschinerie ebenso erkannt und internalisiert wie die Hefe-eigenen Transporter. Damit steht es unter Stickstoffhungerbedingungen nicht mehr für eine Glukoseaufnahme zur Verfügung. Ein Aminosäuresequenzvergleich von GLUT1 und Hxt7, um mögliche Abbaumotive zu identifizieren, ist deshalb nicht erfolgversprechend.

### **3.16 Konstruktion eines unter Hungerbedingungen stabilisierten Hexosetransporters**

Die Konstruktion eines Hexosetransportproteins, das unter Stickstoffhungerbedingungen stabilisiert ist, war neben der Untersuchung des Abbaumechanismus der Hexosetransporter ein wesentliches Ziel dieser Arbeit. Da mehrere Versuche fehlschlugen ein Screening-Verfahren aufzubauen, um auf ein stabilisiertes Hxt7-Protein selektionieren zu können, wurden vor allem gezielte Veränderungen des Hxt7-Proteins vorgenommen.

Da alle Plasmamembranproteine unter Stickstoffhunger unterschiedliche Halbwertszeiten aufweisen, muss ein spezifischer Mechanismus den Abbau von Plasmamembranproteinen regulieren. Daher müsste es möglich sein durch Modifikation intrinsischer Abbausignale der Hexosetransporter ein Zuckersystem zu entwickeln, in dem die unter Hungerbedingungen sonst übliche Abnahme der Zuckertransportkapazität zumindest reduziert ist.

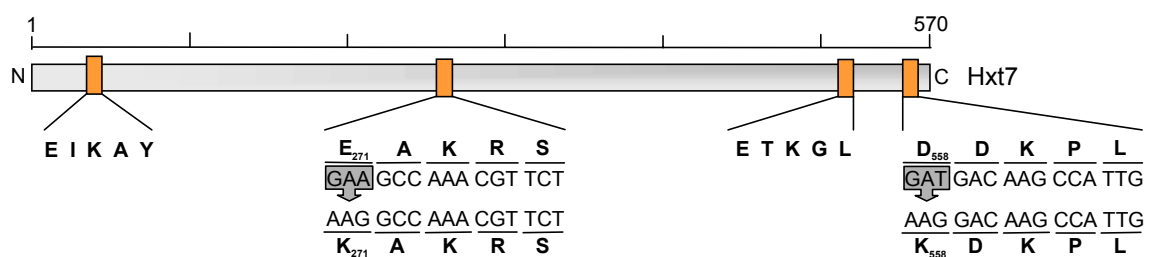
#### **3.16.1 Untersuchung der Pentapeptidmotive E/DXKXX**

Der Hexosetransporter Hxt7 enthält mehrere Sequenzmotive, die u. a. an die putativen Endozytosesignale des  $\alpha$ -Faktor-Rezeptors Ste2 (DAKSS) (Rohrer et al., 1993), des  $\alpha$ -Faktor-Transporters Ste6 (DAKTI) (Kölling und Hollenberg, 1994), des Tryptophantransporters Tat2 (ERKSN und EYKSK) (Schmidt et al., 1999) und der generellen Aminosäurepermease Gap1 (EEKAI) (Hein und André, 1997) erinnern. Diese Signalsequenzen sind für einen schnellen Abbau von Ste2, Ste6, Tat2 und Gap1 essentiell. Diesen Pentapeptidsignalen ist gemeinsam, dass sie alle an der ersten Position eine saure Aminosäure (Glutamat oder Aspartat) und an der dritten Position die basische Aminosäure Lysin besitzen. Eine Deletion oder Veränderung dieser Pentapeptidsignale resultierte in einer Stabilisierung der entsprechenden Proteine. Bisher wurde das Sequenzmotiv des  $\alpha$ -Faktor-Rezeptors DAKSS in dem Kontext SINNDKSS am detailliertesten untersucht.



Nach einer durch die Kinasen Yck1 und Yck2-vermittelten Phosphorylierung der flankierenden Serinreste dieses Motivs wird der zentrale Lysinrest ubiquitiniert (Rohrer et al., 1993; Tan et al., 1996; Hicke und Riezman, 1996; Hicke et al., 1998). Jedoch scheint die Ubiquitinierungsmaschinerie mehrere Lysinreste alternativ als Akzeptoren zu tolerieren (Kornitzer et al., 1994; Terrell et al., 1998; Roth und Davis, 2000). Entsprechend könnte auch ein Austausch des zentralen Lysinrestes der Sequenzen EAKRS und DDKPL im Hxt7-Protein redundant sein und keine direkte Auswirkung auf die Stabilität des Proteins haben. Im Gegensatz dazu führte ein Austausch des sauren Glutamatrests in der EEKAI-Sequenz von Gap1 (Gap1<sup>pgf</sup>) zu einer deutlichen Stabilisierung des vollständigen Proteins (Hein und André, 1997). Da diese modifizierte Form des Gap1-Proteins (Gap1<sup>pgf</sup>) auch unter Stickstoffhunger in Anwesenheit von Glukose im Vergleich zum Wildtypprotein deutlich stabilisiert ist (siehe Abb. 19), wurde in den entsprechenden D/EXKXX-Sequenzmotiven des Hxt7-Proteins ebenfalls ein Austausch des sauren Aminosäurerestes gegen Lysin vorgenommen.

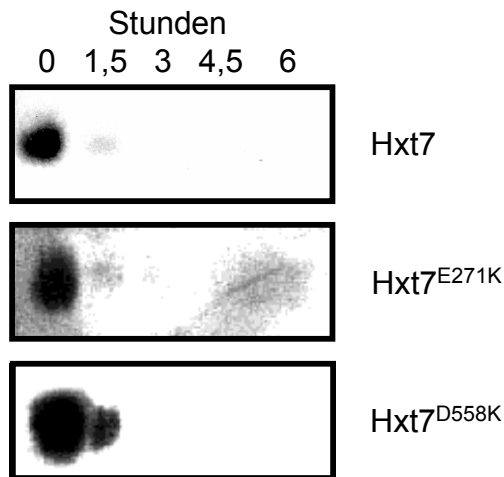
In der Aminosäuresequenz von Hxt7 sind insgesamt vier Pentapeptidmotive mit der Signalsequenz E/DXKXX zu finden (Abb. 23). Zwei dieser Motive sind allerdings gleichfalls an entsprechenden Positionen in dem niedrig-affinen Hexosetransporter Hxt1 vorhanden. Da sich Hxt1 unter Stickstoffhunger in Anwesenheit von Glukose deutlich stabiler verhält als Hxt6/7 (siehe Abb. 8), sind diese zwei Motive offensichtlich nicht maßgeblich an einer schnellen Inaktivierung beteiligt. Ein Aminosäureaustausch in den beiden anderen potentiellen Internalisierungssignalen von Hxt7 könnte dagegen einen Hexosetransporter erzeugen, der sich unter Hungerbedingungen stabiler verhält.



**Abb. 23: Schematische Darstellung des Aminosäureaustauschs in den D/EXKXX-Motiven des Hexosetransportproteins Hxt7.** Hervorgehoben sind die Pentapeptidsignale D/EXKXX, die möglicherweise an der Regulation der Stabilität des Hxt7-Proteins beteiligt sind. Weiterhin ist der Austausch des Glutamatrestes E<sup>271</sup> und des Aspartatrestes D<sup>558</sup> jeweils gegen Lysin dargestellt.

Um zu untersuchen, ob die Stabilität von Hxt7 durch einen Aminosäureaustausch der sauren Aminosäure gegen eine basische an der ersten Position der Pentapeptidsignale verändert wird, wurde eine gerichtete PCR-Mutagenese

durchgeführt (siehe 2.16). Mittels mutagener Primer wurde in der EAKRS-Sequenz der Glutamatrest an Position 271 und in der DDKPL-Sequenz der saure Aspartatrest an Position 558 gegen die basische Aminosäure Lysin ausgetauscht (Abb. 23). Die so konstruierten Plasmide YCpHXT7<sup>E271K</sup> und YCpHXT7<sup>D558K</sup> wurden in den Stamm EB.YVW4000 (*hxt<sup>-</sup>*) transformiert. Beide Plasmide komplementierten den Wachstumsdefekt dieses Stammes auf Glukose. Somit konnte die Funktionalität der mutierten Hxt7-Proteine nachgewiesen werden.



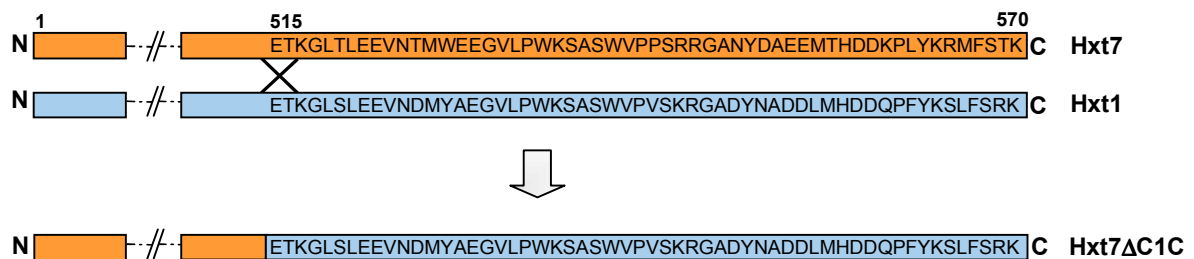
**Abb. 24: Proteinstabilität von Hxt7, Hxt7<sup>E271K</sup> und Hxt7<sup>D558K</sup>.** Die Stämme RE301/YCpHXT7a, RE301/YCpHXT7<sup>E271K</sup> und RE301/YCpHXT7<sup>D558K</sup> wurden in YNB +N *ura<sup>-</sup>* mit 3% Raffinose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Zellen wurden gewaschen und in YNB -N mit 5% Glukose überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Proteinrohextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt.

Um die Proteinstabilität der mutagenisierten Hxt7-Proteine im Vergleich zu dem Hxt7-Wildtypprotein unter Hungerbedingungen zu untersuchen, wurden die Plasmide YCpHXT7a, YCpHXT7<sup>E271K</sup> und YCpHXT7<sup>D558K</sup> in den Stamm RE301 ( $\Delta hxt3 \Delta hxt6 \Delta hxt7$ ) transformiert. Abb. 24 zeigt, dass die Proteine Hxt7<sup>E271K</sup> und Hxt7<sup>D558K</sup> trotz des Aminosäureaustauschs mit nahezu der gleichen Halbwertszeit abgebaut werden wie der nicht-modifizierte Transporter Hxt7. Somit sind diese sauren Aminosäurereste, anders als der analoge Glutamatrest des EEKAI-Motivs von Gap1, nicht ausschlaggebend an der Regulation der Proteinstabilität der Hexosetransporter Hxt6 und Hxt7 beteiligt.

### 3.16.2 Austausch des C-Terminus von Hxt7 gegen den C-Terminus von Hxt1

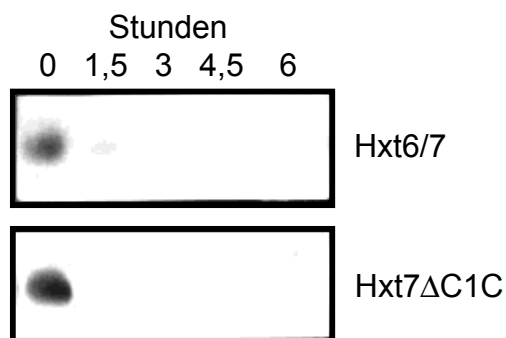
Der C-Terminus von Plasmamembranproteinen ist oft maßgeblich an einem schnellen Proteinabbau beteiligt. So führen C-terminale Modifikationen z. B. der generellen Aminosäurepermease Gap1 (Hein und André, 1997), des  $\alpha$ -Faktor-Rezeptors Ste2 (Hicke und Riezman, 1996) oder des  $\alpha$ -Faktor-Rezeptors Ste3 (Roth et al., 1998) zu einer deutlichen Veränderung der Stabilität der Proteine. In Analogie zu diesen Plasmamembranproteinen könnten auch im C-Terminus von Hxt7 wichtige Signalsequenzen lokalisiert sein, die für einen schnellen Abbau des Proteins unter Inaktivierungsbedingungen unerlässlich sind.

Da sich der niedrig-affine Hexosetransporter Hxt1 unter Hungerbedingungen deutlich stabiler verhält als der hoch-affine Hexosetransporter Hxt7 (siehe Abb. 8), wurden die letzten 56 Aminosäuren nach der zwölften Transmembrandomäne von Hxt7 gegen die letzten 56 Aminosäuren des C-Terminus von Hxt1 ausgetauscht (Abb. 25). Das nach der unter 2.14.2 beschriebenen Methode konstruierte Plasmid YCpHXT7 $\Delta$ C1C wurde in dem Stamm EBY.18ga (*hxf*) transformiert. Da durch diese Transformation der Wachstumsdefekt dieses Stammes auf Glukose komplementiert werden konnte, ist das chimäre Protein funktionell in der Plasmamembran lokalisiert.



**Abb. 25: Schematische Darstellung des chimären Hxt7-Hxt1-Fusionsproteins Hxt7 $\Delta$ C1C.** Die letzten 56 Aminosäuren des hoch-affinen, unter Hungerbedingungen instabilen Hexosetransporters Hxt7 wurden gegen die 56 C-terminalen Aminosäuren des niedrig-affinen stabileren Hexosetransporters Hxt1 ausgetauscht.

Für die Untersuchung der Proteinstabilität von Hxt7 $\Delta$ C1C wurde das Plasmid YCpHXT7 $\Delta$ C1C in den Stamm RE301 ( $\Delta$ *hxt3*  $\Delta$ *hxt6*  $\Delta$ *hxt7*) transformiert. In einer Western-Blot-Analyse zeigte sich jedoch nicht die gewünschte Stabilisierung des modifizierten Hexosetransporters unter Stickstoffhungerbedingungen (Abb. 26). Die Halbwertszeiten des Wildtyp- und des chimären Proteins sind ähnlich.



**Abb. 26: Proteinstabilität von Hxt7 und Hxt7 $\Delta$ C1C.** Der Stamm RE301/YCpHXT7a und RE301/YCpHXT7 $\Delta$ C1C wurde in YNB +Nura<sup>-</sup> mit 3% Raffinose bis zur exponentiellen Wachstumsphase ange-zogen. Die Zellen wurden gewaschen und in YNB -N mit 5% Glukose überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Proteinrohextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt.

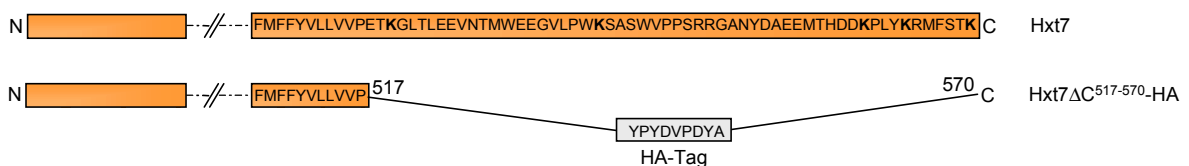
Es könnte einerseits sein, dass die C-Termini der Hexosetransporter keinen entscheidenden Einfluss auf die Proteinstabilität haben, sondern die stabilisierenden Elemente des Hexosetransporters Hxt1 in anderen Regionen des Proteins liegen. Andererseits ist es aber auch möglich, dass zwar die putativen

Abbausignale im C-Terminus nicht mehr erkannt werden, jedoch durch die Fusion des Hxt1-C-Terminus an das Hxt7-Protein das chimäre Protein aufgrund einer veränderten Faltung andere Sequenzen der Abbaumaschinerie zugänglich macht.

### 3.16.3 Deletion des C-Terminus von Hxt7

Für mehrere Plasmamembranproteine konnte gezeigt werden, dass Phosphorylierung und eine anschließende Ubiquitinierung entscheidende Modifikationen für die Einleitung der Endozytose sind (Marchal et al., 1998). So konnte u. a. für den  $\alpha$ -Faktor-Transporter Ste6 (Kölling und Hollenberg, 1994), die Uracilpermease Fur4 (Galan et al., 1996), die Maltosepermease Mal61 (Medintz et al., 1998) oder die Galaktosepermease Gal2 (Horak und Wolf, 1997) eine direkte Ubiquitinierung der Proteine nachgewiesen werden. Bisher ist zwar noch kein eindeutiges Ubiquitinierungs- und Endozytosemotiv identifiziert worden, es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Ubiquitinierung an Lysinresten der Plasma-membranproteine stattfindet (Hicke und Riezman, 1996). Die Auswahl der ubiquitinierten Lysinreste ist wahrscheinlich redundant, d. h., wird die eigentliche Zielsequenz z. B. durch eine Entfernung des Lysinrests modifiziert, findet die Ubiquitinierungsreaktion offenbar an benachbarten Lysinresten statt (Beck et al., 1999; Roth und Davis, 2000). Erst wenn alle in der Nähe liegenden Lysinreste entfernt werden, ist eine deutliche Auswirkung auf die Proteinstabilität zu verzeichnen.

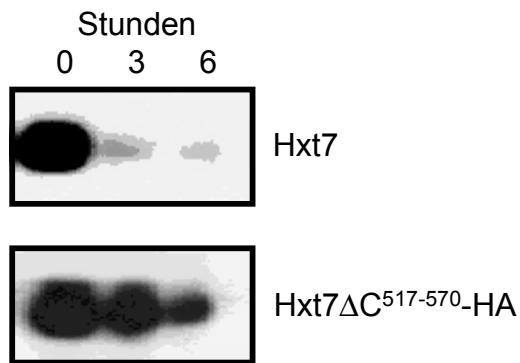
Der zytoplasmatische Teil des C-Terminus von Hxt7 enthält insgesamt fünf Lysinreste, die auch bei dem Austausch des C-Terminus von Hxt7 gegen den von Hxt1 in dem Hxt7 $\Delta$ C1C-Konstrukt alle erhalten blieben (Abb. 25). Um eine eventuelle Beteiligung dieser Lysinreste oder anderer möglicher Sequenzmotive im C-Terminus zu erfassen, wurde ein Hxt7-Protein konstruiert, das in den letzten 54 Aminosäuren deletiert ist. Dafür wurden die Aminosäuren 517 bis 570 des Hxt7-Transporters gegen einen HA-Tag ausgetauscht (Abb. 27).



**Abb. 27: Schematische Darstellung der Deletion des C-Terminus von Hxt7.** Die Aminosäuren 517 bis 570 von Hxt7 wurden deletiert und gegen einen HA-Tag ausgetauscht.

Für eine Untersuchung der Stabilität dieser C-terminalen Deletionsmutante von Hxt7 wurde das nach der unter 2.14.3 beschriebenen Methode konstruierte Plasmid YCpHXT7 $\Delta$ C<sup>517-570</sup>-HA in den Stamm RE301 ( $\Delta$ hxt3  $\Delta$ hxt6  $\Delta$ hxt7)

transformiert. Nach Überführung der Zellen in Stickstoffhungermedium mit 5% Glukose ist nach 6-stündiger Inkubation das modifizierte Protein Hxt7 $\Delta$ C<sup>517-570</sup>-HA noch in der Western-Blot-Analyse detektierbar, während das Wildtypprotein deutlich schneller abgebaut wird (Abb. 28). Somit ist das C-terminal trunkierte Protein stabiler als das Wildtypprotein.



**Abb. 28: Proteinstabilität von Hxt7 und Hxt7 $\Delta$ C<sup>517-570</sup>-HA.** Der Stamm RE301/YCpHXT7a und RE301/YCpHXT7 $\Delta$ C<sup>517-570</sup>-HA wurde in YNB +N ura<sup>-</sup> mit 3% Raffinose angezogen. Die Zellen wurden gewaschen und in YNB -N mit 5% Glukose überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Proteinrohextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit Hxt6/7-spezifischen Antikörpern.

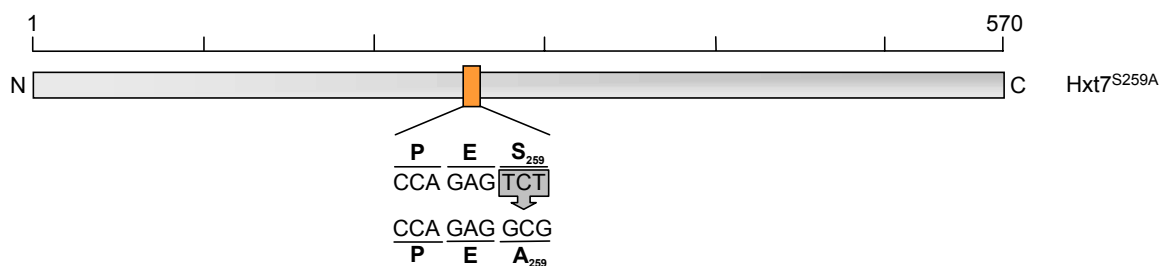
Allerdings kann das mutierte Transportprotein den Wachstumsdefekt des Stammes EBY.VW4000 (*hxt*) auf Glukose nicht komplementieren (ohne Abb.), d. h. der Transporter wird nicht funktionell exprimiert. So könnte es sein, dass der C-Terminus von Hxt7 entweder für die Aktivität oder für die Lokalisierung des Transporters wichtig ist. Möglicherweise reguliert der C-Terminus tatsächlich die Internalisierung und den Abbau des Hexosetransporters ausschlaggebend. Jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Protein aufgrund einer Misslokalisierung in der Western-Blot-Analyse stabil erscheint. Da das Hxt7 $\Delta$ C<sup>517-570</sup>-HA-Protein jedoch nicht funktionell exprimiert werden konnte, ist es für eine Steigerung der Zuckertransportkapazität unter Hungerbedingungen nicht nutzbar.

#### 3.16.4 Austausch des Serinrestes 259 von Hxt7

Neben der Ubiquitinierung scheint auch die Phosphorylierung von Plasmamembranproteinen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Proteinstabilität zu spielen. Wahrscheinlich leitet eine Phosphorylierung, zumindest bei einigen Proteinen, eine Ubiquitinierung des Proteins ein (Marchal et al., 1998). Der Serinrest 259 von Hxt7 in dem Aminosäuremotiv PES stellt eine mögliche Proteinkinase C-Phosphorylierungsstelle in der zytoplasmatischen Region zwischen Transmembranhelix VI und VII dar. Dieser Serinrest ist sowohl in prokaryontischen (z. B. XylE und AraE von *E. coli*) als auch eukaryontischen (z. B. Mal61, Agt1, Snf3 und *K. lactis* Lac12) Zuckertransportern sehr stark konserviert. Brondijk et al. (1998) konnten zeigen, dass durch den Austausch des entsprechenden Serinrests gegen Alanin in der PES-Sequenz des

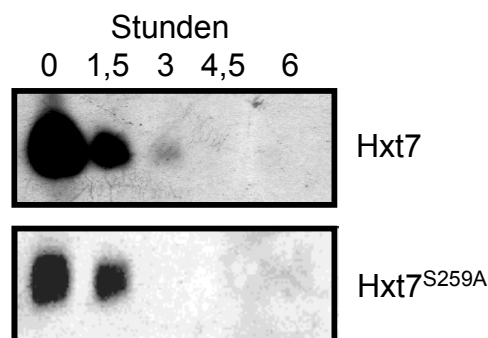
Maltosetransporters (Mal61<sup>S295A</sup>), das Protein einer deutlich geringeren Inaktivierung unterlag.

Die Bedeutung des konservierten Serinrests der PES-Sequenz für die Stabilität von Hxt7 wurde durch einen Aminosäureaustausch mittels gerichteter PCR-Mutagenese analysiert. Der Serinrest 259 von Hxt7 wurde durch Verwendung eines mutagenen Primers gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht (Abb. 29). Das so konstruierte Plasmid YCpHXT7<sup>S259A</sup> (siehe 2.16) wurde in den Stamm EBY.VW4000 (*hxt*) transformiert und durch eine Komplementation des Wachstumsdefektes des *hxt*-Stammes auf Glukosemedium wurde die Funktionalität des mutierten Proteins nachgewiesen.



**Abb. 29: Schematische Darstellung des Austausches von Serin<sup>259</sup> gegen Alanin des Hexosetransporters Hxt7.** Hervorgehoben ist das stark konservierte PES-Motiv. Diese putative Phosphorylierungsstelle des Hxt7-Proteins könnte an der Inaktivierung des Hexosetransporters beteiligt sein.

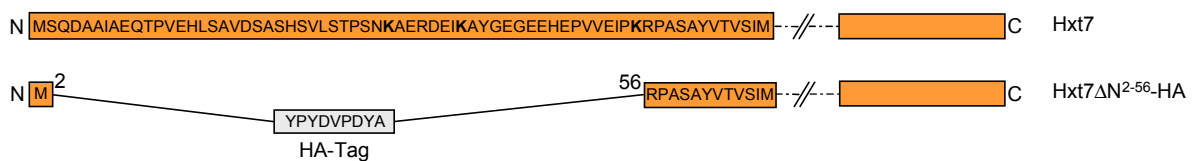
Die Untersuchung der Proteinstabilität des mutierten Transporters erfolgte in dem Stamm RE301 ( $\Delta hxt3 \Delta hxt6 \Delta hxt7$ ). Die Western-Blot-Analyse zeigte jedoch, dass das modifizierte Hxt7<sup>S259A</sup>-Protein mit einer ähnlichen Halbwertszeit abgebaut wird wie das Hxt7-Wildtypprotein (Abb. 30). Im Gegensatz zu der Bedeutung des Serinrestes des PES-Motivs des Maltosetransporters Mal61, hat die Modifikation der putativen Proteinkinase C-Phosphorylierungsstelle des Hxt7-Proteins folglich keine Auswirkung auf den Abbau des Hexosetransporters. Somit wird die Stabilität von Hxt7 und der Maltosepermease durch unterschiedliche Signale reguliert.



**Abb. 30: Proteinstabilität von Hxt7 und Hxt7<sup>S259A</sup>.** Der Stamm RE301/YCpHXT7a und RE301/YCpHXT7<sup>S259A</sup> wurde in YNB +N ura<sup>-</sup> mit 3% Raffinose angezogen. Die Zellen wurden gewaschen und in YNB -N mit 5% Glukose überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Proteinrohextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt.

### 3.16.5 Deletion des N-Terminus von Hxt7

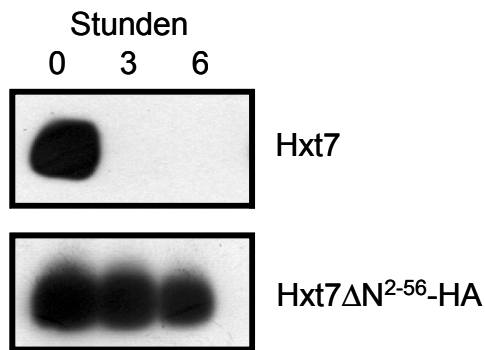
Neben dem C-Terminus kann auch der N-Terminus von Plasmamembranproteinen für deren Stabilität eine wichtige Rolle spielen. So befindet sich im N-Terminus der Uracilpermease Fur4 ein aus 20 Aminosäuren bestehendes Motiv, das für einen schnellen Abbau der Permease essentiell ist (Marchal et al., 1998). Dieses Motiv enthält u. a. fünf wichtige Serinreste, die vermutlich als Phosphoakzeptoren dienen, zum anderen aber auch zwei wichtige Lysinreste. Diese Region ähnelt den sogenannten PEST-Sequenzen, die sich durch die hohe Anzahl an Prolin-, Glutamat-, Serin- und Threoninresten auszeichnen. Auch die Stabilität des Tryptophantransporters Tat2 wird durch die 31 N-terminalen Aminosäuren mit fünf kritischen Lysinresten entscheidend beeinflusst (Beck et al., 1999). So führte einerseits eine Deletion aller 31 Aminosäuren oder andererseits ein Austausch aller fünf Lysinreste zu einem stabilisierten Tat2-Protein. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde in Analogie auch der Einfluss des zytoplasmatisch lokalisierten N-Terminus von Hxt7 auf die Proteinstabilität untersucht, indem die Aminosäuren 2-56 des Transporters deletiert und gegen einen HA-Tag ausgetauscht wurden (Abb. 31). Die Konstruktion des Plasmids YCpHXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA erfolgte nach der unter 2.14.4 beschriebenen Methode.



**Abb. 31: Schematische Darstellung der Deletion des N-Terminus von Hxt7.** Die Aminosäuren 2 bis 56 von Hxt7 wurden deletiert und gegen einen HA-Tag ausgetauscht.

Die Untersuchung der Proteinstabilität von Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA erfolgte in dem Stamm RE301 ( $\Delta$ *hxt3*  $\Delta$ *hxt6*  $\Delta$ *hxt7*). In einer Western-Blot-Analyse mit HA-spezifischen Antikörpern zeigte sich, dass das modifizierte Protein tatsächlich einer Stabilisierung unter Hungerbedingungen unterliegt (Abb. 32). Nach 6-stündiger Inkubation in Stickstoffhungermedium mit 5% Glukose konnte nahezu kein Abbau von Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA verzeichnet werden.

Im Gegensatz zu der C-terminalen Deletionsmutante von Hxt7 konnte das Protein Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA auch den Wachstumsdefekt des Stammes EBY.VW4000 (*hxt*) auf Glukose komplementieren und ist somit in einer aktiven Form in der Plasmamembran lokalisiert (ohne Abb.). Folglich ist der N-Terminus von Hxt7 für einen schnellen Abbau des Proteins unter Inaktivierungsbedingungen essentiell. Die drei im N-Terminus lokalisierten Lysinreste oder die auch die sieben Serinreste könnten für die Proteinstabilität von Bedeutung sein.



**Abb. 32: Proteinstabilität von Hxt7 und Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA.** Die Stämme RE301/YCpHXT7a und RE301/YCpHXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA wurden in YNB +N ura<sup>-</sup> mit 3% Raffinose angezogen. Die Zellen wurden gewaschen und in YNB -N mit 5% Glukose überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und Proteinrohextrakte für die Western-Blot-Analyse hergestellt. Der Nachweis des Wildtypproteins erfolgte mit Hxt6/7-spezifischen Antikörpern, der Nachweis von Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA erfolgte mit HA-spezifischen Antikörpern.

Aufgrund der Stabilität erschien die Verwendung dieses Proteinkonstrukt sehr vielversprechend in Bezug auf eine mögliche Erhöhung der Glukosetransportrate unter Hungerbedingungen. Allerdings musste zunächst untersucht werden, ob das Protein Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA auch unter Hungerbedingungen funktionsfähig ist.

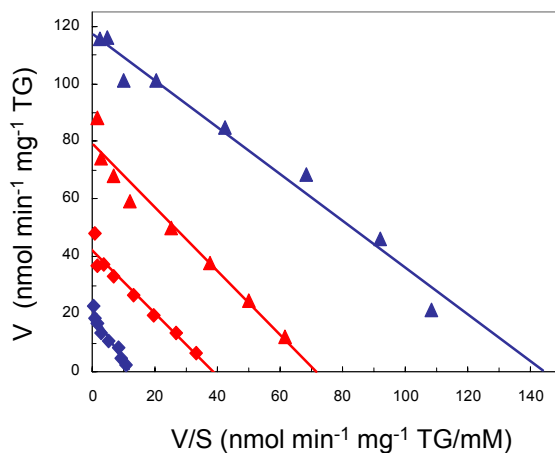
### 3.17 Glukoseaufnahme des Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA-Einzelexpressionsstamms unter Hungerbedingungen

Die in der Western-Blot-Analyse beobachtete Stabilisierung des modifizierten Hexosetransporters Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA gibt keine Auskunft über die Lokalisierung des Proteins unter Hungerbedingungen. Der modifizierte Transporter könnte ebenso wie das Wildtypprotein endozytiert werden, dann jedoch in internalisierten Strukturen stabil erhalten bleiben. Die Funktionalität des Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA-Proteins nach Inaktivierung wurde im Vergleich zu dem Hxt7-Wildtypprotein in dem Stamm EBY.VW4000 (*hxt*) mittels Glukoseaufnahmemessungen analysiert. Ein Stamm, der das stabilere Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA-Konstrukt exprimiert, sollte sich im Vergleich zu einem Stamm mit dem endogenen, instabileren Hxt7-Transporter unter Inaktivierungsbedingungen durch eine höhere Glukoseaufnahme auszeichnen. Diese höhere Glukoseaufnahme wird allerdings nur erzielt, wenn das Protein funktionell in der Plasmamembran bleibt.

Erwartungsgemäß ist die Glukoseaufnahmeaktivität von EBY.VW4000/YCpHXT7a nach 6-stündiger Inkubation in Stickstoffhungermedium mit 5% Glukose durch den raschen Abbau des Wildtypproteins deutlich niedriger als vor der Inaktivierung (Abb. 33). Der  $V_{\max}$  sinkt um fast 83% von 117 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG auf 20 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG. Die Transportaktivität von EBY.VW4000/Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA erreicht bereits vor der Inaktivierung nicht die



Aufnahmerate von EBY.VW4000/ YCpHXT7a. So beträgt der  $V_{\max}$  der Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA-vermittelten Glukoseaufnahme nur 76 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG. Nach Inaktivierung ist die Glukosetransportrate von EBY.VW4000/YCpHXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA jedoch noch deutlich höher als die Wildtypprotein-vermittelte Glukoseaufnahme. Der  $V_{\max}$  wird durch die Inkubation der Zellen unter Inaktivierungsbedingungen nur um ungefähr 47% gesenkt, von 76 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG auf 40 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG. Infolgedessen ist die Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA-vermittelte Glukoseaufnahmeaktivität nach 6-stündiger Inaktivierung etwa doppelt so hoch wie die Hxt7-Wildtypprotein-vermittelte Aufnahme nach Inaktivierung.



		$K_M$ (mM)	$V_{\max}$ (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> TG)
Hxt7	+N	0,9	117
Hxt7	-N	1,7	20
Hxt7 $\Delta$ N	+N	1,1	76
Hxt7 $\Delta$ N	-N	1,1	40

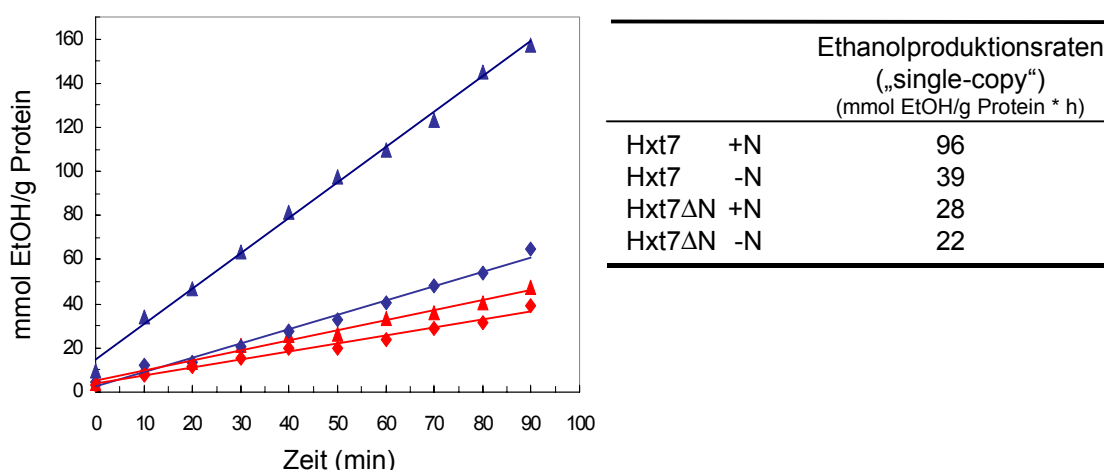
**Abb. 33: Eadie-Hofstee Plots der Glukoseaufnahme eines HXT7- und HXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA-Einzelexpressionsstamms vor und nach Inaktivierung.** Die Stämme EBY.VW4000/YCpHXT7a (blau) und EBY.VW4000/YCpHXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA (rot) wurden in YNB +N ura<sup>-</sup> mit 3% Raffinose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen, gewaschen und für 6 h in YNB -N mit 5% Glukose inkubiert. Aufnahmemessung vor Inaktivierung (■, +N) bzw. nach Inaktivierung (▹, -N)

Somit wurde ein wesentliches, primäres Ziel des EU-Projektes erreicht. Es konnte ein Hexosetransporter konstruiert werden, der unter Stickstoffhungerbedingungen in Anwesenheit einer im Überfluss vorliegenden Kohlenstoffquelle stabilisiert ist und unter diesen Bedingungen einen deutlich höheren Glukosetransport aufrechterhält. Nun galt es zu untersuchen, ob durch die gesteigerte Glukoseaufnahme auch die Fermentationsrate der Hefe unter Hungerbedingungen erhöht werden konnte.

### 3.18 Fermentationskapazität des *Hxt7* $\Delta$ *N*<sup>2-56</sup>-HA-Einzelexpressionsstamms unter Hungerbedingungen

#### 3.18.1 Ethanolproduktion des *Hxt7* $\Delta$ *N*<sup>2-56</sup>-HA-Einzelexpressionsstamms

Eine unter industriellen Fermentationsbedingungen eingeschränkte Fermentationskapazität hat eine geringe Produktivität zur Folge. Da die Glukoseaufnahme als der limitierende Schritt der Fermentationsrate gilt (Becker und Betz, 1972), sollte ein erhöhter Glukosetransport unter Hungerbedingungen in einer erhöhten Fermentationsrate resultieren. Deshalb wurde mit dem stabilisierten, transportaktiven *Hxt7* $\Delta$ *N*<sup>2-56</sup>-HA-Konstrukt die Fermentationsrate unter Hungerbedingungen ermittelt. Dafür wurde die Ethanolbildung der Stämme EBY.VW4000/YCpHXT7a und EBY.VW4000/YCpHXT7 $\Delta$ *N*<sup>2-56</sup>-HA in 1% Glukose-haltigem Medium vor und nach einer 6-stündiger Überführung der Zellen in Stickstoffhungermedium mit 5% Glukose gemessen.



**Abb. 34: Ethanolproduktion des *HXT7*- und *HXT7* $\Delta$ *N*<sup>2-56</sup>-HA-Einzelexpressionsstamms („single-copy“) vor und nach Inaktivierung.** EBY.VW4000/YCpHXT7a (blau) und EBY.VW4000/YCpHXT7 $\Delta$ *N*<sup>2-56</sup>-HA (rot) wurden in YNB +N ura<sup>-</sup> mit 3% Raffinose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen, gewaschen und ein Teil der Zellen in YNB +N ura<sup>-</sup> mit 1% Glukose überführt. Der andere Teil der Zellen wurde für 6 h in YNB -N mit 5% Glukose inkubiert, gewaschen und dann ebenfalls in YNB +N ura<sup>-</sup> mit 1% Glukose überführt. Alle 10 min wurde eine Probe genommen, die Ethanolkonzentration bestimmt und eine Proteinbestimmung durchgeführt. Ethanolproduktion vor Inaktivierung (■, +N) bzw. nach Inaktivierung (▹, -N)

Abb. 34 zeigt, dass die *Hxt7*-vermittelte Fermentationsrate nach der Inaktivierung in Relation zwar sehr viel stärker reduziert wird als die des modifizierten *Hxt7* $\Delta$ *N*<sup>2-56</sup>-HA-Transporters, jedoch ist die absolute Ethanolproduktionsrate von EBY.VW4000/YCpHXT7 $\Delta$ *N*<sup>2-56</sup>-HA bereits vor Inaktivierung äußerst gering. So wird bei Expression des modifizierten Transporters vor Inaktivierung (28 mmol EtOH/g Protein \* h) nur ca. 1/3 der Ethanolproduktionsrate von EBY.VW4000/

YCpHXT7a erreicht (96 mmol EtOH/g Protein \* h). Damit ist die Fermentationskapazität von EBY.VW4000/YCpHXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA schon vor Inaktivierung geringer als die Ethanolproduktion von EBY.VW4000/YCpHXT7a nach Inaktivierung (39 mmol EtOH/g Protein \* h). Demzufolge führte die Verwendung des Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA-Konstruktes, trotz der unter Hungerbedingungen erreichten höheren Glukoseaufnahme, nicht zu der erhofften höheren Ethanolausbeute.

**Tab. 7: Vergleich der Fermentationsrate und Glukoseaufnahmeaktivität des *HXT7*- und *HXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>*-HA-Einzelexpressionsstamms („single-copy“) vor (+N) und nach 6-stündiger Inaktivierung (-N).**

	Ethanolproduktionsraten (mmol EtOH/g Protein * h)	Glukoseaufnahmeaktivität (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> TG)
Hxt7 +N	96 (100%)	117 (100%)
Hxt7 -N	39 (41%)	20 (17%)
Hxt7 $\Delta$ N +N	28 (29%)	76 (65%)
Hxt7 $\Delta$ N -N	22 (23%)	40 (34%)

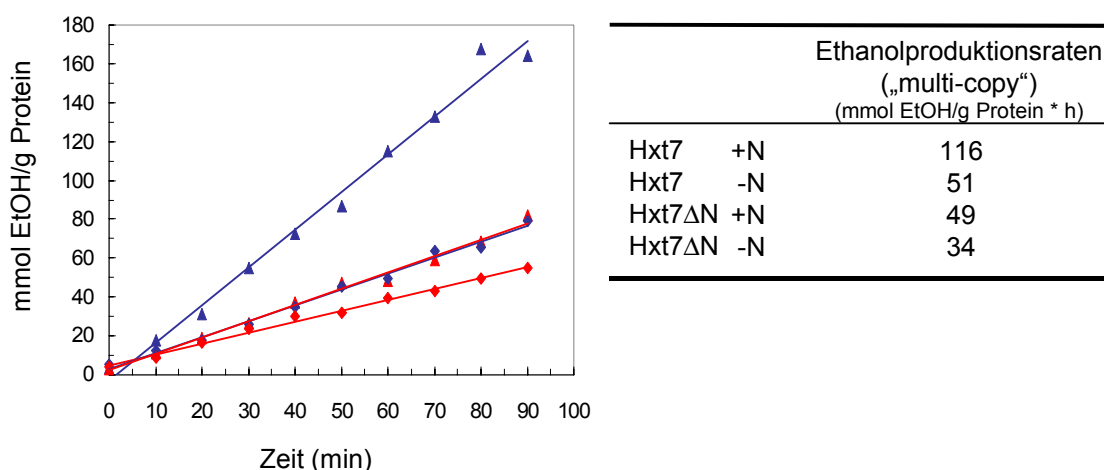
Die Ethanolproduktionsraten und die Glukoseaufnahmeaktivität des *HXT7*- und des *HXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>*-HA-Einzelexpressionsstamms (3.17) korrelieren überraschenderweise nicht miteinander (Tab. 7). So nimmt die Ethanolbildung von EBY.VW4000/YCpHXT7a nach Inaktivierung nicht in dem Maße ab wie man es im Vergleich zur Reduktion der Glukoseaufnahmeaktivität erwarten würde. Die Ethanolproduktionsrate wird von 96 auf 39 mmol EtOH/g Protein \* h nur um 59% reduziert, während die Glukoseaufnahmeaktivität von 117 auf 20 nmol Glukose min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG abnimmt, und somit einer 83%igen Reduktion unterliegt. Auch die bereits vor Inaktivierung um 71% geringere Ethanolproduktionsrate von EBY.VW4000/YCpHXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA im Vergleich zu der von EBY.VW4000/YCpHXT7a (96 und 28 mmol EtOH/g Protein \* h) steht nicht im Einklang mit der nur 35% geringeren Glukoseaufnahmeaktivität (117 und 76 nmol min<sup>-1</sup> \* mg<sup>-1</sup> TG).

### 3.18.2 Ethanolproduktion des *HXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>*-HA-Einzelexpressionsstamms bei Überexpression von *HXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>*-HA

Hefezellen, die den modifizierten Hexosetransporter Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA exprimieren, weisen eine sehr geringe Fermentationskapazität auf (Abb. 34). Das angestrebte Ziel durch einen stabilisierten Hexosetransporter eine höhere Fermentationsrate unter Hungerbedingungen zu erzielen, konnte somit nicht erreicht werden. Um zu untersuchen, ob es möglich ist, die geringe Fermentationskapazität durch Überexpression des modifizierten Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA-Transporters zu steigern, wurde das *HXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>*-HA-Konstrukt und zum Vergleich das entsprechende *HXT7*-Gen auf ein „multi-copy“-Plasmid kloniert (2.14.4). Wiederum wurde die Ethanol-

produktion der Stämme EBY.VW4000/YEpHxt7 und EBY.VW4000/YEpHXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA wie unter 3.18.1 beschrieben bestimmt.

Abb. 35 demonstriert, dass die Fermentationskapazitäten der Stämme EBY.VW4000/YEpHxt7 und EBY.VW4000/YEpHXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA sowohl vor als auch nach Inaktivierung im Vergleich zu der „single-copy“-Expression (Abb. 34) erhöht sind. Jedoch konnte die Fermentationsleistung von EBY.VW4000/YEpHXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA nicht ausschlaggebend gesteigert werden. Die Fermentationsrate des Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA-exprimierenden Stamms nach Inaktivierung (34 mmol EtOH/g Protein \* h) übertrifft bei Überexpression nicht das Fermentationsniveau von EBY.VW4000/YCpHXT7a nach Inaktivierung (39 mmol EtOH/g Protein \* h) (Abb. 34). Somit konnte auch durch die Überexpression des stabilisierten Hexosetransporters Hxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA unter Hungerbedingungen keine höhere Fermentationsrate erzielt werden als mit dem Hxt7-Wildtypprotein.



**Abb. 35: Ethanolproduktion des HXT7- und HXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA-Einzelexpressionsstamms („multi-copy“) vor und nach Inaktivierung.** EBY.VW4000/YEpHxt7a (blau) und EBY.VW4000/YEpHxt7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA (rot) wurden in YNB ura<sup>-</sup> mit 3% Raffinose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen, gewaschen und ein Teil der Zellen in YNB +N ura<sup>-</sup> mit 1% Glukose überführt. Der andere Teil der Zellen wurde für 6 h in YNB -N mit 5% Glukose inkubiert, gewaschen und dann ebenfalls in YNB +N ura<sup>-</sup> mit 1% Glukose überführt. Alle 10 min wurde eine Probe genommen, die Ethanolkonzentration bestimmt und eine Proteinbestimmung durchgeführt. Ethanolproduktion vor Inaktivierung (+N, ■) bzw. nach Inaktivierung (-N, □)

Ein Vergleich der Ethanolproduktionsraten der Hefestämme bei „single-copy“- und „multi-copy“-Expression der Hexosetransporter zeigt, dass eine höhere Expression in einer insgesamt höheren Fermentationsrate resultiert (3.18.1, 3.18.2). Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass der Glukosetransport der limitierende Schritt der Fermentation ist. Jedoch bedingt eine höhere Glukoseaufnahme nicht eine entsprechend höhere Fermentationskapazität der

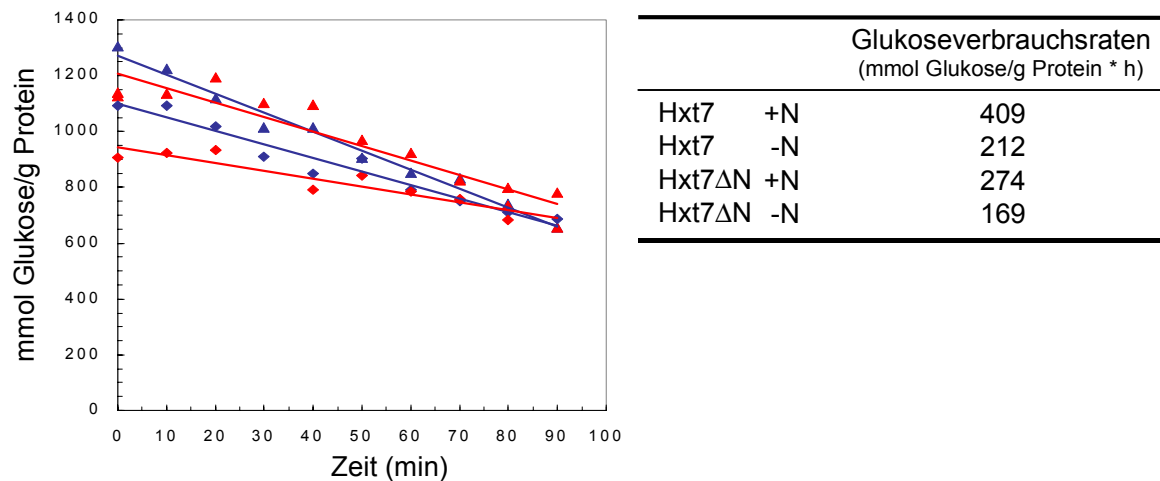
Hefe. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu der Hypothese, dass der Glukosetransport begrenzend wirkt. In der Tat konnte die Hypothese bisher noch nicht eindeutig bewiesen werden. So postulierten Bisson et al. (1993), dass eine geringe zytoplasmatische Glukose-konzentration nicht zwangsläufig eine Limitierung des Transports bedeuten muss, sondern auch durch eine stringente Koordination zwischen Glukoseaufnahme und Glukoseverbrauch hervorgerufen werden kann. So könnte der Glukosetransport so reguliert sein, dass nur die Glukosemenge in die Zelle aufgenommen wird, die auch direkt verbraucht wird.

Allerdings lassen sich die beobachteten Ergebnisse der Glukoseaufnahmemessung und der Ethanolproduktion nicht allein dadurch interpretieren, dass der Glukosetransport limitierend oder auch nicht limitierend wirkt. Die Fermentation scheint ferner einer Regulation zu unterliegen, an der der N-Terminus des Hexosetransporters Hxt7 beteiligt ist: die relativ hohen Glukosetransportraten des Stamms EBY.VW4000/YCpHXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA resultierten in vergleichsweise nur geringen Ethanolproduktionsraten. Diese Diskrepanz deutet möglicherweise darauf hin, dass der N-Terminus von Hxt7 eine aktivierende Funktion auf die Fermentation ausüben kann.

### 3.19 Glukoseverbrauch des *HXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA*-Einzelexpressionsstamms unter Hungerbedingungen

Um die Ursache für die fehlende Korrelation zwischen Glukoseaufnahme und Ethanolproduktion zu klären, wurde zusätzlich zu der „zero trans“-Glukoseaufnahme auch die Glukoseverbrauchsrate unter Wachstumsbedingungen von EBY.VW4000/YCpHXT7a und EBY.VW4000/YCpHXT7 $\Delta$ N<sup>2-56</sup>-HA vor und nach Inaktivierung gemessen.

In Abb. 36 ist deutlich zu erkennen, dass sich die Ergebnisse der Messung der Glukoseverbrauchsrate deutlich von den Ergebnissen der Glukoseaufnahmemessung (Abb. 33) unterscheiden. Die Glukoseverbrauchsrate von EBY.VW4000/YCpHXT7a ist nach Inaktivierung nur um etwa die Hälfte reduziert (von 404 auf 246 mmol Glukose/g Protein \* h), während bei der Messung der Glukoseaufnahme eine Reduktion um mehr als 80% gemessen wurde (von 117 auf 19 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> TG) (3.17). Diese relativ geringe Reduktion der Glukoseverbrauchsrate von EBY.VW4000/YCpHXT7a nach Inaktivierung war nicht zu erwarten, da nicht nur die gemessene Glukoseaufnahmeaktivität gering war, sondern auch in der Western-Blot-Analyse nach 6-stündiger Inaktivierung das Wildtypprotein vollständig abgebaut war (3.16.5).



**Abb. 36: Glukoseverbrauch eines *HXT7*- und *HXT7ΔN<sup>2-56</sup>*-HA-Einzelexpressionsstamms vor und nach Inaktivierung.** EBY.VW4000/YCpHXT7a (blau) und EBY.VW4000/YCpHXT7ΔN<sup>2-56</sup>-HA (rot) wurden in YNB +N ura<sup>-</sup> mit 3% Raffinose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen, gewaschen und ein Teil der Zellen in YNB +N ura<sup>-</sup> mit 1% Glukose überführt. Der andere Teil der Zellen wurde für 6 h in YNB -N mit 5% Glukose inkubiert, gewaschen und dann ebenfalls in YNB +N ura<sup>-</sup> mit 1% Glukose überführt. Alle 10 min wurde eine Probe genommen, die Glukosekonzentration bestimmt und eine Proteinbestimmung durchgeführt. Glukoseverbrauch vor Inaktivierung (■, +N) bzw. nach Inaktivierung (▴, -N)

Es ist schwierig diese offensichtlichen Widersprüche zwischen Glukoseaufnahme und Glukoseverbrauch zu erklären. Da sich die Ergebnisse reproduzieren ließen, sind die Diskrepanzen wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Messmethoden zurückzuführen. Der Glukoseverbrauch und auch die Ethanolproduktion wird mittels *in vivo*-Messmethoden ermittelt, während die Messung der Glukoseaufnahme *in vitro* durchgeführt wird. Einerseits wäre es möglich, dass das Wildtypprotein unter den *in vitro*-Bedingungen einem verstärkten Abbau unterliegt, während das modifizierte Hxt7ΔN<sup>2-56</sup>-HA-Protein gegen diese zusätzliche Inaktivierung resistent ist. Andererseits könnte der N-Terminus von Hxt7 eine regulatorische Funktion besitzen. Vorstellbar ist z. B. eine Wechselwirkung des N-Terminus von Hxt7 mit einer Komponente der Glykolyse, die durch eine „Feedback“-Regulation den Glukosetransport und die Ethanolbildung kontrolliert. Ferner ist es auch denkbar, dass die aufgenommene freie intrazelluläre Glukose für eine umgehende Hemmung der Hexosetransporter verantwortlich ist. Solche metabolischen Wechselwirkungen können naturgemäß nur unter den *in vivo*-Bedingungen bei der Messung des Glukoseverbrauchs und der Ethanolproduktion, jedoch nicht bei der „zero trans“-Glukoseaufnahmemessung wahrgenommen werden.

Überdies ist es möglich, dass nicht nur der Hexosetransporter Hxt7, sondern zusätzlich ein bisher noch unbekannter Glukosetransporter eine Zuckeraufnahme in den *hxf*-Stamm vermitteln kann. Dafür spricht v. a., dass trotz des vollständigen Abbaus des Hxt7-Wildtypproteins nach einer 6-stündigen Inaktivierung noch ein bemerkenswerter Glukoseverbrauch stattfindet (3.16.5, 3.19). Möglicherweise ist dieser Glukoseverbrauch auf einen weiteren Glukosetransporter zurückzuführen, der in dem *hxf*-Stamm unter bestimmten Bedingungen induziert werden kann. Kürzlich wurde tatsächlich die Existenz eines weiteren Glukosetransporters in der Hefe *S. cerevisiae* gezeigt, der nicht zur Hexosetransport-Familie gehört (siehe 3.20) (Wieczorke et al., 1999). Möglicherweise vermittelt dieser Transporter in dem *hxf*-Stamm unter den gegebenen Bedingungen den Glukoseverbrauch und könnte ferner dementsprechend ebenfalls einer Regulation durch den Glukosemetabolismus unterliegen.

### **3.20 Existenz eines noch unbekanntem Glukosetransporters in *S. cerevisiae***

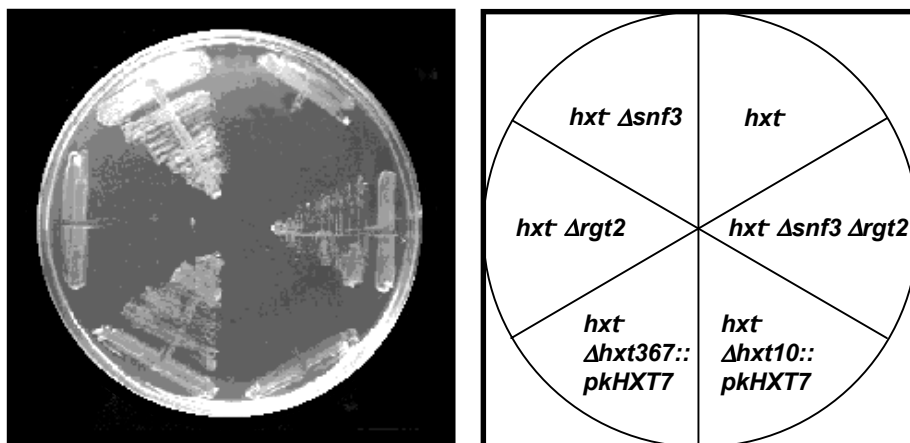
Tatsächlich scheint in der Hefe *S. cerevisiae* neben den bekannten Hexosetransportern noch mindestens ein weiterer, bisher noch unbekannter, Glukosetransporter zu existieren. Die Hexosetransporter-Familie von *S. cerevisiae* umfasst 20 Proteine inklusive zweier Glukosesensoren (*HXT1-17*, *GAL2*, *SNF3*, *RGT2*) (Kruckeberg, 1996, Boles und Hollenberg, 1997). Die Deletion der Gene *HXT1* bis *HXT17* und *GAL2* resultierte in einem Stamm (*hxf*), der nicht mehr auf Hexosen als einziger Kohlenstoffquelle wachsen konnte (Wieczorke et al., 1999). Eine zusätzliche Deletion der Glukosesensoren *SNF3* und *RGT2* erfolgte nach der unter 2.13 beschriebenen Methode mit den Primerpaaren s1-LSNF3/s2-SNF3 und s1-LRGT2/s2-RGT2. Die so konstruierten Stämme SKY7 und SKY8 wurden mit den Oligonukleotidpaaren a1/a4-SNF3 und a1/a4-RGT2 überprüft.

Überraschenderweise hatte die Deletion des hoch-affinen Glukosesensors *SNF3* eine Aufhebung des Wachstumsdefekt auf Glukose zur Folge (Abb. 37) (Wieczorke et al., 1999). Die Deletion des niedrig-affinen Glukosesensors *RGT2* zeigte keinen Effekt bezüglich des Wachstums des *hxf*-Stamms auf Glukose (Abb. 37). *Snf3* scheint also direkt oder indirekt eine reprimierende Funktion auf ein zusätzliches, Glukose-transportierendes Protein auszuüben. So wird z. B. der zur Zuckerpermease-Familie gehörende Transporter *Stl1* durch die Deletion von *SNF3* dereprimiert (Wieczorke et al., 1999). Jedoch konnte das Wachstum des *hxf*  $\Delta$ *snf3*-Stamms auf Glukose weder durch die Deletion von *STL1* und noch durch die Deletion der ebenfalls Glukose-transportierenden Maltosepermease-

Homologen *AGT1*, *YDL247* (*MPH2*) und *YJR160* (*MPH3*) verhindert werden (Abb. 37) (Wieczorke et al., 1999). Durch die Deletion von insgesamt 22 Genen konnte ein Stamm konstruiert werden (EBY.VW4000), der weder auf Glukosemedium wachsen konnte, noch einen nachweisbaren Glukoseverbrauch, noch eine detektierbare Glukoseaufnahme aufwies (Wieczorke et al., 1999). Trotzdem kann dieser Stamm durch eine zusätzliche Deletion von *SNF3* die Fähigkeit auf Glukose zu wachsen, zurückgewinnen.

### 3.20.1 Re-Integration des *HXT7*-Promotors in den *hxf*-Stamm

Nicht nur die Deletion von *SNF3* in dem Stamm EBY.VW4000 (*hxf*) führte zu einer Aufhebung des Wachstumsdefektes auf Glukose, sondern auch eine Re-Integration eines *HXT7*-Promotorfragmentes<sup>(-392 bis +1)</sup> an seinen ursprünglichen Lokus auf Chromosom IV (Abb. 37). Die Konstruktion der Stämme SKY11k (*hxf*  $\Delta$ *hxt367::pkHXT7) und SKY12k (*hxf*  $\Delta$ *hxt10::pkHXT7) erfolgte nach der unter 2.15.1 beschriebenen Methode.**



**Abb. 37: Wachstumspheänotyp des *hxf*-Stamms nach Re-Integration des *HXT7*-Promotorfragments in seine Ursprungsregion auf Chromosom IV und in die ehemalige Region von *HXT10* auf Chromosom VI.** Die Stämme EBY.VW4000 ( $\Delta$ *hxt1-17*  $\Delta$ *gal2*  $\Delta$ *stl1*  $\Delta$ *agt1*  $\Delta$ *mph2*  $\Delta$ *mph3*; kurz: *hxf*), EBY.VW5000 (*hxf*  $\Delta$ *snf3*  $\Delta$ *rgt2*), SKY12k (*hxf*  $\Delta$ *hxt10::pkHXT7), SKY11k (*hxf*  $\Delta$ *hxt367::pkHXT7), SKY8 (*hxf*  $\Delta$ *rgt2*) und SKY7 (*hxf*  $\Delta$ *snf3*) wurden auf YEP mit 2% Glukose ausgestrichen und für 2 Tage bei 30°C inkubiert.**

Abb. 37 zeigt, dass allein die Re-Integration des *HXT7*-Promotorfragments an seinen ursprünglichen Lokus auf Chromosom IV dem *hxf*-Stamm wieder die Fähigkeit verleiht Glukose aufzunehmen. Die Integration des gleichen *HXT7*-Promotorfragments in die Ursprungsregion von *HXT10* auf Chromosom VI kann den Wachstumsdefekt des Stammes EBY.VW4000 auf Glukose nicht aufheben. Ferner verursachte die Anwesenheit des *HXT7*-Promotorfragments auf einem „single-copy“- oder einem „multi-copy“-Plasmid kein Wachstum des *hxf*-Stammes auf Glukose (persönliche Mitteilung E. Boles). Da nur die Integration des *HXT7*-

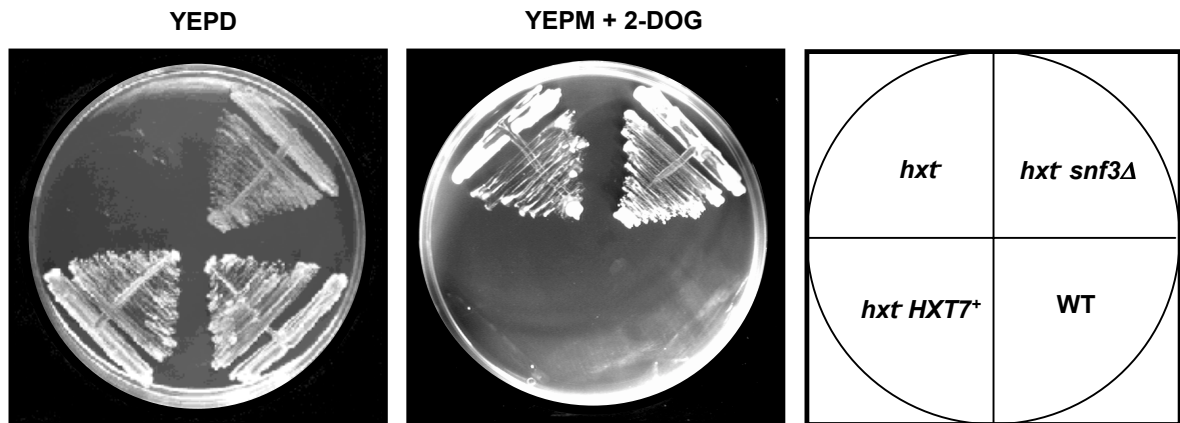


Promotors an seinen ursprünglichen Locus den Wachstumsdefekt des Stammes EBY.VW4000 aufhebt, liegt es nahe zu vermuten, dass der *HXT7*-Promotor ein in der Nähe gelegenes Protein aktiviert. Jedoch ist kein Transporter-ähnliches Protein in der Nähe der ehemaligen *HXT3-6-7*-Region lokalisiert. Eine andere Möglichkeit ist, dass die Integration des *HXT7*-Promotorfragments einen Einfluss auf die Chromatinstruktur des Chromosoms IV ausübt, so dass die Transkription eines entfernter liegenden Gens aktiviert wird. Auf dem gleichen Chromosom liegen drei weitere Gene der Zuckerpermease-Familie: *ITR1*, *ITR2* und *YDR387*. Jedoch konnte durch eine Überexpression dieser zu der Inositolpermease-Familie gehörenden Proteine in dem Stamm EBY.VW4000 kein Wachstum auf Glukose vermittelt werden (Wieczorke et al., 1999). Folglich sind die Transportproteine *Itr1*, *Itr2* und *Ydr387* wahrscheinlich weder für den Glukosetransport in dem Stamm SKY11k (*hxf Δhxt367::pkHXT7*) noch in dem Stamm EBY.VW5000 (*hxf Δsnf3*) verantwortlich.

### 3.21 Resistenz des *hxf Δsnf3*-Stammes gegen 2-DOG

Hefezellen, die Glukose aufnehmen können sind normalerweise sensitiv gegenüber dem toxischen Glukoseanalogon 2-Deoxyglukose (2-DOG) (Biely et al., 1972). Überraschenderweise zeigt der Stamm SKY7 (*hxf Δsnf3*) trotz seiner Fähigkeit auf Glukosemedium zu wachsen, keine Sensitivität gegenüber 2-DOG (Abb. 38). Der Wildtypstamm (VW1A) und der *HXT7*-Einzelexpressionsstamm (JBY02) können erwartungsgemäß aufgrund ihrer Fähigkeit zur Glukoseaufnahme auf dem 2-DOG-haltigen Medium nicht wachsen. Auch der *hxf*-Stamm verhält sich wie erwartet resistent gegenüber 2-DOG.

Die Eigenschaft des *hxf Δsnf3*-Stamms auf Glukose zu wachsen ohne gegenüber 2-DOG sensitiv zu sein, könnte einerseits so erklärt werden, dass der gesuchte Transporter eine so spezifische Transportaktivität für Glukose aufweist, dass er das Glukoseanalogon nicht transportieren kann. Andererseits handelt es vielleicht sich bei dem gesuchten Transporter um einen Glukose-Exporter. Über diesen Exporter können zwar geringe Mengen Glukose aufgenommen werden, effizienter wird jedoch Glukose aus der Zelle heraus transportiert. Diese Hypothese wird auch durch die Beobachtung unterstützt, dass die Resistenz gegen das Toxikum mit steigender 2-DOG-Konzentration zunimmt (ohne Abb.).



**Abb. 38:** Wachstumsphänotyp eines *hxt*<sup>-</sup>, *hxt*  $\Delta$ *snf3*<sup>-</sup>, *HXT7*-Einzelexpressions- und Wildtypstamms auf Glukosemedium und 2-DOG-haltigem Maltosemedium. Die Stämme EBY.VW4000 (*hxt*), SKY7 (*hxt*  $\Delta$ *snf3*), JBY02 (*hxt* *HXT7*<sup>+</sup>) und VW1A (WT) wurden auf YEP mit 2% Glukose und auf YEP mit 0,2% Maltose mit 5000 ppm 2-DOG ausgestrichen und für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

### 3.22 Isolierung von „multi-copy“-Suppressoren, die den Wachstumsdefekt des *hxt*-Stamms auf Glukose komplementieren

Um den Transporter zu identifizieren, der das Wachstum des *hxt*  $\Delta$ *snf3*-Stammes auf Glukose wieder ermöglicht, wurde der *hxt*-Stamm EBY.VW4000 mit „multi-copy“-Genbankplasmiden transformiert, die aus dem Stamm EBY.VW5000 (*hxt*  $\Delta$ *snf3*) hergestellt wurden (2.3). Der Transformationsansatz wurde auf uracilfreiem Maltosemedium ausplattiert und auf Vollmedium mit 2% Glukose replikaplattiert. Nach 3-tägiger Inkubation bei 30°C wuchsen 20 Kolonien auf den Glukoseplatten. Die Plasmide wurden isoliert, durch Restriktionsanalyse charakterisiert und wieder in den Stamm EBY.VW4000 (*hxt*) retransformiert. Zur Identifikation der Genbankplasmid-kodierten Gene wurden die 3'- und 5'-terminalen Enden der inserierten DNA-Fragmente mit den Oligonukleotiden RP und UP ansequenziert. Durch eine Datenbanksuche (NCBI Blast search) wurden die erhaltenen Sequenzen Chromosomenfragmenten zugeordnet. Die Ergebnisse des Datenbankvergleichs sind in Tab. 8 zusammengefasst.

**Tab. 8: Identifikation der Genbankplasmid-kodierten Gene.**

Plasmid		klonierte DNA-Sequenz	identifizierte ORFs
pUGT1	1x	Chr. IV: 1015362-1023786	<b>(MTH1)</b> , YDR278c, YDR279w, RRP45, YDR281c, YDR282c
pUGT2	1x	Chr. IV: 1014155-1020831	<b>MTH1</b> , YDR278c, YDR279w,(RRP45)
pUGT3	1x	Chr. IV: 1119666-1125939	(YDR325w), YDR326c, YDR327w, <b>(Skp1)</b>
pUGT4	1x	Chr. VII: 98390-106705	<b>(SIP2)</b> , SPT16, CHC1
pUGT5	3x	Chr. XV: 413772-418347	(TOM6), DBP5, <b>STD1</b>
pUGT6	3x	Chr. XV: 414765-420999	DBP5, <b>STD1</b> , RAT1
pUGT7	1x	Chr. XV: 420647-420999	DBP5, <b>STD1</b> , RAT1
pUGT8	1x	Chr. XV: 420895ff.	(RAT1), <b>STD1</b> ff.

Die in Klammern geschriebenen ORFs sind nur unvollständig auf den klonierten DNA-Sequenzen enthalten. Die fett geschriebenen Gene sind bekanntermaßen an der Regulation der *HXT*-Expression beteiligt. pUGT8 wurde nur mit dem Primer RP sequenziert.

**Tab. 9: Funktion der Genbankplasmid-klonierten Gene**

Gen	Beschreibung
<i>CHC1</i>	„Clathrin heavy chain“; beteiligt am Internalisierungsschritt der Endozytose
<i>DBP5</i>	RNA-Helikase
<i>MTH1</i>	(= <i>HTR1</i> ), Repressor der <i>HXT</i> -Genexpression (s.u.)
<i>RAT1</i>	5'→3' Exoribonuklease, hat wahrscheinlich Effekt auf generelle Transkription
<i>RRP45</i>	rRNA-prozessierendes Protein, putative 3'→5' Exonuklease, 1 TMD
<i>SIP2</i>	Bestandteil des Snf1-Komplexes (s.u.)
<i>Skp1</i>	Bestandteil des SCF <sup>Grr1</sup> -Komplexes (s.u.)
<i>SPT16</i>	genereller Transkriptionsfaktor
<i>STD1</i>	(= <i>MSN3</i> ), an der <i>HXT</i> -Genregulation beteiligt (s.u.)
<i>YDR278c</i>	unbekannt, keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen, 1 TMD
<i>YDR279w</i>	unbekannt, keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen
<i>YDR281c</i>	unbekannt, keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen, 1 TMD
<i>YDR282c</i>	Ähnlichkeit zu anderen unbekannt Proteinen, 1TMD, Interaktion mit Msc1
<i>YDR325w</i>	unbekannt, keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen
<i>YDR326c</i>	unbekannt, keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen, 1 TMD
<i>YDR327w</i>	fraglicher ORF

Die Genbankplasmide enthielten weder ein bekanntes Transportprotein, noch ein bisher charakterisiertes Gen, dass von seiner Strukturvorhersage ein Transportprotein kodieren könnte (Tab. 9). Da bereits alle 16 neben den *HXT*-

Genen verbleibenden Transporter der Zuckerpermease-Familie durch Überexpression auf eine Komplementation des Wachstumsdefekts des *hxt*-Stammes auf Glukose getestet wurden (Wieczorke et al., 1999), ist sicher, dass der gesuchte Transporter strukturell nicht sehr nah mit den Hexosetransportern verwandt ist. Jedoch durchspannen voraussichtlich alle bekannten Hexosetransporter von Bakterien, Pflanzen und Säugern die Plasmamembran mit zwölf Transmembrandomänen (Abb. 44). Den in dem „Genbankscreen“ identifizierten Proteinen wird jedoch maximal eine Transmembrandomäne vorausgesagt. Somit ist eine Transportfunktion dieser Proteine so gut wie ausgeschlossen. Demzufolge konnte der unbekannte Glukosetransporter mit dieser Methode nicht identifiziert werden.

Allerdings konnten einige Gene ermittelt werden, die bei Expression in hoher Kopienzahl den Wachstumsdefekt des *hxt*-Stamms auf Glukose komplementieren. Eine Analyse dieser „multi-copy“-Suppressoren zeigte, dass offensichtlich alle isolierten Genbankplasmide Gene tragen, die eine Funktion in der Regulation der *HXT*-Genexpression ausüben (Tab. 8). Besonders häufig wurde *STD1* (= *MSN3*) kloniert. Std1 ist wahrscheinlich an der Weiterleitung des Glukosesignals von der Plasmamembran zum Kern beteiligt (Schmidt et al., 1999). Schmidt et al. (1999) konnten auch eine Wechselwirkung von Std1 mit den C-Termini von Rgt2 und Snf3 im „Two-Hybrid“-System zeigen. Da eine Überexpression von *STD1* u. a. zu einer partiellen Aufhebung der Glukoserepression führt (Hubbard et al., 1994), kann man mutmaßen, dass durch die Überexpression von *STD1* auch der unbekannte Glukosetransporter dereprimiert wird. In einem möglichen Funktionsmodell reprimiert Snf3 Std1, so dass letzteres die Expression des unbekanntes Glukosetransporters nicht aktivieren kann. Folglich würde bei Deletion von *SNF3* bzw. bei Überexpression von *STD1* dem Stamm EBY.VW4000 wieder Wachstum auf Glukose ermöglicht.

Neben Std1 konnte auch das zu Std1 61% identische Protein Mth1 (= Htr1) mehrfach in dem „Genbankscreen“ identifiziert werden. Mth1 wirkt einerseits als ein negativer Regulator der Snf3/Rgt2-abhängigen *HXT*-Induktion, andererseits als ein positiver Regulator der Snf1-abhängigen Derepression (Schmidt et al., 1999; Schulte et al., 2000; Lafuente et al., 2000). Da auch für Mth1 eine Wechselwirkung mit den C-Termini von Snf3 und Rgt2 gezeigt werden konnte (Schmidt et al., 1999; Lafuente et al., 2000), vermuteten Lafuente et al. (2000), dass das Glukosesignal direkt von den Glukosesensoren auf Mth1 übertragen wird. Somit könnte auch für Mth1 eine ähnliche reprimierende Funktion wie für Std1 postuliert werden. Das Plasmid pUGT1 enthält allerdings lediglich ein DNA-Fragment mit den ersten 331 Basen des *MTH1*-ORFs. Das stark verkürzte Mth1-

Protein reicht wahrscheinlich bereits aus, um die Aktivierung des unbekanntes Glukosetransporters bei Überexpression zu bewirken.

Das ebenfalls im „Genbankscreen“ identifizierte Gen *SIP2* kodiert für einen Bestandteil des *SNF1*-Proteinkinasekomplexes, eine Schlüsselkomponente des Glukoserepressionswegs. Die Snf1-Proteinkinase agiert u. a. in dem gleichen Signalweg wie Std1 und Mth1. Hubbard et al. (1994) konnten sogar eine direkte biochemische Wechselwirkung von Std1 mit der Snf1-Kinase zeigen. Ein weiteres Gen, dass bei der Weiterleitung des Glukosesignals eine Rolle spielt, ist *SKP1*. Skp1 ist Bestandteil des SCF<sup>Grr1</sup>-Komplexes, der u. a. in die Vermittlung der Derepression der *HXT*-Gene involviert ist. Auf dem Plasmid pUGT4 sind lediglich 194 Basen des *SIP2*-ORFs bzw. auf dem Plasmid pUGT3 immerhin 514 Basen des *SKP1*-ORFs enthalten. Analog zu *MTH1* verursachen auch hier die verkürzten Proteine eine Aktivierung des unbekanntes Glukosetransporters.

Es kann natürlich nicht ausgeschlossen werden, dass auch die anderen, auf den Genbankplasmiden kodierten, teilweise noch unbekanntes Proteine, einen Einfluss auf die Aktivität des unbekanntes Glukosetransporters ausüben. Lediglich eine direkte Vermittlung des Glukosetransport über die Plasmamembran scheint aufgrund ihrer strukturellen Voraussage äußerst unwahrscheinlich (s. o.). Aufgrund der direkten Beteiligung der Proteine Std1, Mth1, Sip2 (Snf1) und Skp1 (Grr1) an den Glukosesignalwegen der Hefe, ist eine Beteiligung dieser Proteine an der Expression oder Aktivierung des in dem *hxt<sup>-</sup> Δsnf3*-Stamm exprimierten Glukosetransporters jedoch naheliegend.

### **3.23 Identifizierung des unbekanntes Glukosetransporters durch Deletion weiterer potentieller Regulatorproteine bzw. Transporter**

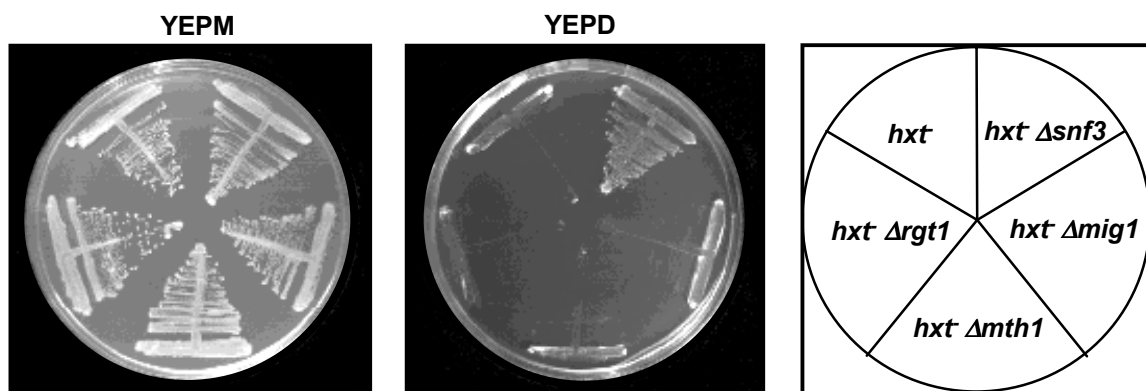
#### **3.23.1 Deletion weiterer Komponenten der *HXT*-Genregulationswege**

Die Ergebnisse des „Genbankscreens“ ließen vermuten, dass der unbekanntes Glukosetransporter wahrscheinlich über die gleichen Signalwege reguliert wird wie die *HXT*-Gene. Daher wurde eine Beteiligung weiterer bekannter Komponenten der *HXT*-Regulationswege untersucht, um weitere Rückschlüsse auf die Regulation des unbekanntes Glukosetransporters zu ermöglichen und so seine Identifizierung zu erleichtern.

Die Proteine Rgt1 und Mig1 regulieren die *HXT*-Genexpression durch eine direkte Bindung an die *HXT*-Promotoren. Rgt1 kann in Abhängigkeit der Glukosekonzentration als Repressor oder Aktivator fungieren (Özcan et al., 1996b). Mig1

reprimiert in Gegenwart hoher Glukosekonzentrationen u. a. die Expression der hoch-affinen Hexosetransporter (Özcan und Johnston, 1996). Falls Mig1 oder Rgt1 auch die Expression des unbekanntes Glukosetransporters reprimiert, sollte durch eine Deletion von *MIG1* und *RGT1* in dem Stamm EB.Y.VW4000 (*hxf*) die Expression des unbekanntes Glukosetransporters aktiviert werden. Die Plasmidanalyse des „Genbankscreens“ zeigte bereits (3.22), dass die Überexpression von *MTH1* eine Komplementation des Wachstumsdefekts des Stamms EB.Y.VW4000 ermöglichte. Es ist jedoch spekulativ, wie Mth1 die Aktivierung des unbekanntes Glukosetransporters bewirkt. Daher sollte zusätzlich untersucht werden, ob auch eine Deletion von *MTH1* den Wachstumsdefekt des *hxf*-Stamms aufheben kann.

Die Deletionen von *RGT1* und *MIG1* erfolgten nach der unter 2.13 beschriebenen Methode mit den Oligonukleotiden s1/s2-RGT1 bzw. s1/s2-MIG1. Für die Deletion von *MTH1* wurde zunächst das Plasmids pFS21 (Schulte, 1997) mit *XmnI* und *NcoI* geschnitten. Das 2,4 kb große *XmnI/NcoI*-Fragment trägt das *HIS3*-Gen und enthält 5'-überlappende Bereiche zur Promotorregion von *MTH1* (-141 vor dem ATG) und 3'-überlappende Bereiche zum *MTH1*-ORF (ab Kodon 268). Alle konstruierten Stämme SKY9 ( $\Delta mth1$ ), SKY10k ( $\Delta rgt1$ ) und SKY13k ( $\Delta mig1$ ), wurden mit den entsprechenden a1/a4-Primerpaaren durch PCR überprüft. Die Stämme wurden auf Vollmedium mit 2% Maltose bzw. 2% Glukose ausgestrichen und das Wachstum über 5 Tage beobachtet.



**Abb. 39: Wachstumssphänotyp der *hxf*  $\Delta mig1$ -, *hxf*  $\Delta mth1$ - und *hxf*  $\Delta rgt1$ -Mutanten.** Die Stämme EB.Y.VW4000 (*hxf*), SKY10k (*hxf*  $\Delta rgt1$ ), SKY9 (*hxf*  $\Delta mth1$ ), SKY13k (*hxf*  $\Delta mig1$ ) und SKY7 (*hxf*  $\Delta snf3$ ) wurden auf YEP mit 1% Maltose bzw. YEP mit 2% Glukose ausgestrichen und für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Abb. 39 zeigt, dass die Stämme auf Maltosemedium alle ein vergleichbares Wachstum aufweisen. Durch die Deletion der Gene *MIG1*, *RGT1* und *MTH1* kann jedoch der Wachstumsdefekt des *hxf*-Stamms EB.Y.VW4000 auf Glukosemedium nicht aufgehoben werden. Mth1 kann folglich nur durch Überexpression die

Aktivierung des Glukosetransporters vermitteln, während eine Deletion keinen Effekt aufweist. Auch die Repressorproteine Mig1 und Rgt1 sind vermutlich nicht wesentlich an einer Repression des noch unbekanntes Glukosetransporters beteiligt. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Funktion der untersuchten Proteine redundant ist. So ist beispielsweise bekannt, dass in Hefe zwei zu Mig1 homologe Proteine existieren, die die Funktion von Mig1 unterstützen und teilweise auch übernehmen können (Lutfiyya et al., 1998).

### 3.23.2 Deletion möglicher Glukosetransporter bzw. deren Regulatoren

Neben der Deletion von Genen, die vermutlich eine Rolle in der Regulation des unbekanntes Glukosetransporters spielen, wurden auch Gene deletiert, die Proteine kodieren, die eventuell selbst eine Glukosetransportfähigkeit besitzen. Durch eine Wachstumsanalyse der Deletionsstämme auf Glukose sollte anschließend untersucht werden, ob diese Gene tatsächlich für Glukosetransportproteine kodieren. Potentielle Glukosetransportproteine sind z. B. das Transportprotein Yfl054 mit noch unbekannter Funktion und das Plasmamembranprotein Ena1, das bekanntermaßen für einen  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ -Efflux verantwortlich ist.

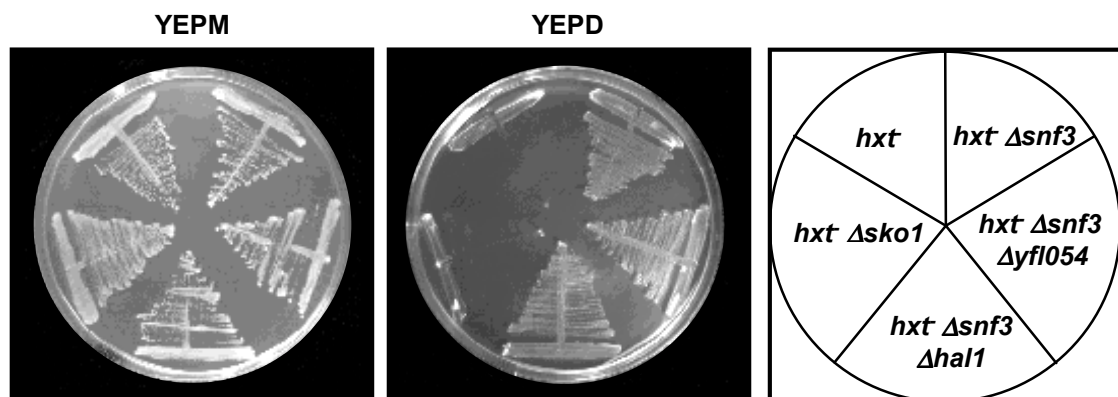
Yfl054 weist Ähnlichkeiten zu den Kanalproteinen Fps1, Aqy1 und Agy2 auf. Diese Proteine der MIP („major intrinsic protein“-)Familie sind an dem Transport bzw. Efflux von Wasser und Glyzerin beteiligt. Yfl054 wird ebenso wie der unbekanntes Glukosetransporter über Komponenten des Glukosesignalwegs reguliert. So konnten Lutfiyya et al. (1998) zeigen, dass die Expression von *YFL054* durch Mig1 und Mig2 und auch durch Glukose reprimiert wird.

Die Expression eines anderen putativen Glukosetransporters, Ena1, wird ebenso wie *YFL054* in Abwesenheit von Glukose über Komponenten des Glukosesignalwegs induziert. Andererseits findet aber auch bei Salzstress eine *ENA1*-Induktion über einen Calcineurin-abhängigen Weg oder über den HOG-MAPK-Weg statt (Alepuz et al., 1997). Die Salzinduktion wird über Hal1 und den Transkriptionsrepressor Sko1 vermittelt (Márquez und Serrano 1996; Alepuz et al., 1997). So führt eine Überexpression von *HAL1* zu einer erhöhten Expression von *ENA1*, während Sko1 die Expression von *ENA1* durch eine direkte Bindung an den *ENA1*-Promotor reprimiert. Die Induktion von *ENA1* in Abwesenheit von Glukose erfolgt über den generellen Glukoserepressionswegs an dem Snf1, Mig1/Mig2 und Ssn6/Tup1 beteiligt sind. Aber auch Std1 und Mth1 sind an der Regulation von *ENA1* und auch *HAL1* beteiligt (Ganster et al., 1998). So weist eine  $\Delta\text{std1} \Delta\text{mth1}$ -Doppelmutante eine erhöhte  $\text{Na}^+$ -Sensitivität auf und eine Überexpression von *STD1* resultiert in einer erhöhten  $\text{Na}^+$ -Resistenz. Außer Std1 und Mth1 scheinen auch die Glukosesensoren Snf3 und Rgt2 in die Regulation der Ionenhomeostasis

involviert zu sein (Ganster et al., 1998). So zeigen z. B.  $\Delta snf3$ - oder  $\Delta rgt2$ -Mutanten eine höhere Resistenz gegenüber  $\text{Na}^+$  und  $\text{Li}^+$ . Folglich scheinen die in dem „Genbankscreen“ identifizierten Proteine Std1, Mth1, Sip2 (Snf1) und sowie Snf3 sowohl an der Regulation des noch unbekanntes Glukosetransporters als auch an der von *ENA1* beteiligt zu sein. Aufgrund der Ähnlichkeit in der Regulation ist es naheliegend für *ENA1* eine zusätzliche Funktion als Glukosetransporter zu postulieren.

*ENA1* ist je nach Hefestamm in einem Gencluster mit einer variierenden Anzahl von nahezu identischen Genen organisiert (Wieland et al., 1995). Da eine Deletion des *ENA*-Genclusters nach der unter 2.13 beschriebenen Methode unter Verwendung der Primer s1/s2-ENA125 in dem Stamm SKY7 nicht erfolgreich war (wahrscheinlich aufgrund der Heterogenität der *ENA*-Gencluster in verschiedenen Stämmen), wurden stattdessen die Regulatorproteine Sko1 und Hal1 deletiert, um eine mögliche Funktion von Ena1 am Glukosetransport zu untersuchen.

Die Deletionen von *YFL054*, *SKO1* und *HAL1* wurden nach der unter 2.13 beschriebenen Methode unter Verwendung der entsprechenden s1/s2-Oligonukleotidpaare durchgeführt. Die Deletion von *YFL054* und *HAL1* erfolgte in dem Stamm SKY7, die Deletion des Repressors *SKO1* in dem Stamm EBY.VW4000. Alle konstruierten Stämme SKY15k ( $\Delta yfl054$ ), SKY14k ( $\Delta sko1$ ) und SKY16k ( $\Delta hal1$ ) wurden mit den entsprechenden a1/a4-Primerpaaren überprüft. Die konstruierten Stämme wurden auf Vollmedium mit 1 % Maltose bzw. 2% Glukose ausgestrichen und das Wachstum über 5 Tage beobachtet.



**Abb. 40: Wachstumsphänotyp des *hxt Δsnf3 Δyfl054*-, *hxt Δsnf3 Δhal1*- und *hxt Δsko1*- Stammes auf Maltose- und Glukosemedium.** Die Stämme EBY.VW4000 (*hxt*), SKY14k (*hxt Δsko1*), SKY16k (*hxt Δsnf3 Δhal1*), SKY15k (*hxt Δsnf3 Δyfl054*) und SKY7 (*hxt Δsnf3*) wurden auf YEP mit 1% Maltose bzw. YEP mit 2% Glukose ausgestrichen und für 2 Tage bei 30°C inkubiert.

Auf Maltosemedium weisen alle Stämme ein adäquates Wachstumsverhalten auf (Abb. 40). Jedoch verändert sich durch die Deletion der Gene *YFL054*, *HAL1* und



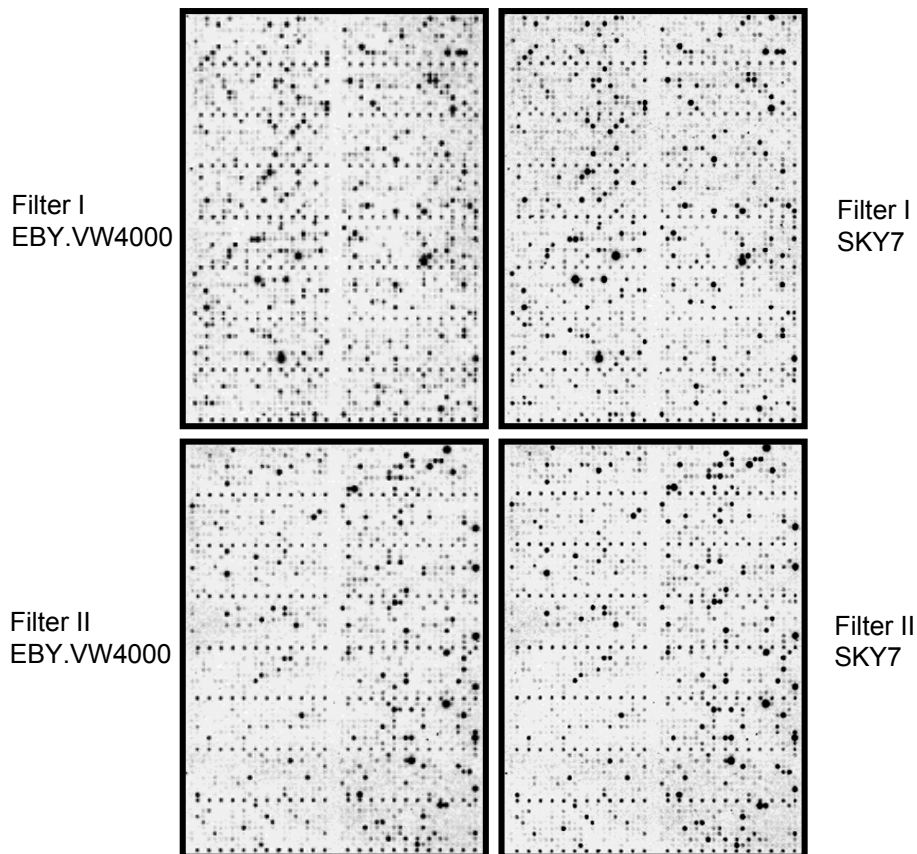
*SKO1* auch das Wachstum der Stämme auf Glukosemedium nicht (Abb. 40). So kann der Stamm SKY7 trotz der Deletion des Gens *YFL054* weiterhin auf Glukose wachsen. Folglich handelt es sich bei diesem Kanalprotein nicht um den potentiellen Glukosetransporter. Da auch die Deletionen von *HAL1* und von *SKO1* keinen Effekt bezüglich des Wachstums der entsprechenden Stämme auf Glukose zeigten, ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei dem Hal1/Sko1-regulierten Transporter Ena1 um den gesuchten Glukosetransporter handelt. Jedoch kann diese Möglichkeit nicht gänzlich ausgeschlossen werden, da Ena1 über mehrere Signalwege reguliert wird (s. o.). Durch die Deletion von *HAL1* und *SKO1* oder auch *MIG1* und *MTH1* wird jeweils nur eine der drei möglichen Signalkaskaden ausgeschaltet. Aber auch andere durch Hal1 und Sko1 regulierte Gene, wie z. B. Zielgene des HOG-MAPK-Signalwegs, kodieren somit vermutlich nicht für den putativen Glukosetransporter oder für Regulatoren desselben. Ferner ist es auch möglich, dass nicht nur ein, sondern mehrere zusätzliche Glukosetransporter existieren. Durch die Deletion nur eines putativen Transportergens kann folglich der Wachstumsphänotyp auf Glukose nicht aufgehoben werden.

### **3.24 „Screening“ des gesamten Hefegenoms nach einem durch *Snf3* reprimierten Gen**

Mit den bisher beschriebenen Ansätzen konnte der unbekannte Glukosetransporter nicht identifiziert werden. Daher wurde nun das gesamte Hefegenom systematisch nach Genen durchsucht, die in dem *hxt<sup>-</sup> Δsnf3*-Stamm höher exprimiert werden als in dem *hxt<sup>-</sup>*-Stamm. Für den Genom-weiten Vergleich wurden die „Yeast Index GeneFilters Microarrays“ verwendet, auf denen 6144 ORFs der Hefe *S. cerevisiae* in Form von PCR-amplifizierter einzelsträngiger DNA aufgetragen sind. Mit diesen Filtern kann mittels Hybridisierung mit der aus verschiedenen Stämmen präparierten cDNA ein Vergleich der Expression aller Gene erfolgen (Lashkari et al., 1997).

Da der unbekannte Glukosetransporter möglicherweise nur in Anwesenheit von Glukose exprimiert wird, wurden die Stämme EBY.VW4000 (*hxt<sup>-</sup>*) und SKY7 (*hxt<sup>-</sup> Δsnf3*) mit dem Plasmid p426MET25HXT11 transformiert. So kann auch der Stamm EBY.VW4000 in Glukose-haltigem Medium wachsen. Weil der plasmid-kodierte Hexosetransporter Hxt11 unter der Kontrolle des Methionin-reprimierten *MET25*-Promotors steht, wurden die Stämme EBY.VW4000/p426MET25HXT11 und SKY7/p426MET25HXT11 für die Präparation der Gesamt-RNA in methionin-freiem Medium mit 2% Glukose angezogen. Die vorbehandelten Genfilter wurden anschließend mit der aus der präparierten Gesamt-RNA synthetisierten cDNA

hybridisiert (2.21 - 2.23). Die Auswertung der Genfilter erfolgte mit der Software „Pathways 2“, die einen direkten Vergleich der Expression einzelner Gene ermöglicht und die Expression der Gene quantifiziert. Jedoch ist zu beachten, dass durch die Konvertierung der Daten die Expressionsunterschiede abnehmen und daher nicht der absoluten Differenz in den verschiedenen Stämmen entsprechen (Rep et al., 2000).



**Abb. 41: Mit der aus dem *hxf*-Stamm und dem *hxf*  $\Delta$ *snf3*-Stamm präparierten cDNA hybridisierte Genfilter.** Die Stämme EBY.VW4000/p426MET25HXT11 (*hxf*) und SKY7/p426MET25HXT11 (*hxf*  $\Delta$ *snf3*) wurden in YNB +N ura<sup>-</sup> met<sup>-</sup> mit 2% Glukose bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen. Die Gesamt-RNA der Stämme wurde präpariert und mittels RT-PCR wurde <sup>33</sup>P-markierte cDNA hergestellt. Die Genfilter wurden für 17 h mit der cDNA hybridisiert, gewaschen und für 16 Stunden in einem Phospho-Imager exponiert.

Die Suche nach einem Gen, das in dem Stamm SKY7 höher exprimiert wird als in dem Stamm EBY.VW4000, verlief erfolglos. Auch die Expression des potentiellen Glukosetransporters *Ena1* ist in beiden Stämmen vergleichbar. Somit war es auch durch einen Vergleich der Expression aller Gene der Hefe nicht möglich, den gesuchten Glukosetransporter zu identifizieren. Allerdings wurden eine Reihe von Genen identifiziert, die nach Deletion von *SNF3* höher exprimiert sind. Alle Gene, die in dem Stamm EBY.VW4000 einer mindestens 1,5-fachen Induktion/ Derepression unterliegen, sind in Tab. 10 aufgelistet.

**Tab. 10: Gene, die mindestens 1,5-fach in dem Stamm EBY.VW400 (*hxf*) gegenüber SKY7 (*hxf Δsnf3*) induziert sind**

ORF	Gen	x-fache Induktion	Funktion
YGR069	unbekannt	2,6	Ähnlichkeit zu Ydr504
YHR095	unbekannt	2,6	keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen
YMR095	<i>SNO1</i>	2,5	wahrscheinlich an der Pyridoxin-Biosynthese beteiligt, Ähnlichkeit zu Glutaminaminotransferasen
YPL095	unbekannt	2,4	Ähnlichkeit zu Ybr177
YMR096	<i>SNZ1</i>	1,9	wahrscheinlich an der Pyridoxin-Biosynthese beteiligt
YER069	<i>ARG5,6</i>	1,9	Acetylglutamatkinase und N-Acetyl- $\gamma$ -Glutamyl-Phosphatreduktase der Ornithin- und Arginin-Biosynthese
YLL048	<i>YBT1 (BAT1)</i>	1,8	Transporter, Mitglied der „ATP-binding cassette“ (ABC)-Familie
YCL030	<i>HIS4</i>	1,7	Oxidoreduktase/Hydrolase, beteiligt an Histidin-Biosynthese
YGL078	<i>DBP3</i>	1,7	ATP-abhängige RNA-Helikase, Zusammenbau der ribosomalen Untereinheiten
YGR285	<i>ZUO1</i>	1,7	Zuotin, Z-DNA-bindendes Protein; Ähnlichkeit zu dem DnaJ-Chaperonin von <i>E. coli</i> ; Proteinfaltung, RNA-Prozessierung/Modifikation
YIL094	<i>LYS12, LYS11, LYS10</i>	1,7	Oxidoreduktase der Lysin-Biosynthese
YJL095	<i>BCK1</i>	1,7	Ser/Thr-Proteinkinase der MEKK-Familie; Komponente des Rho1- und PKC-Wegs
YNL104	<i>LEU4</i>	1,7	2-Isopropylmalatsynthase der Leucin-Biosynthese
YNL143	unbekannt	1,7	keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen
YIL169	unbekannt	1,7	keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen
YDL189	unbekannt	1,6	Wechselwirkung mit Crm1
YDL215	<i>GDH2</i>	1,6	Glutamat-Dehydrogenase
YGR106	unbekannt	1,5	Ähnlichkeit mit Chemotaxis-Methyltransferase von <i>Vibrio anguillarum</i>
YHR029	unbekannt	1,5	Ähnlichkeit zu phz C von <i>Pseudomonas aureofaciens</i> ; Synthese von Phenazin (Antibiotikum)
YDR171	<i>HSP42</i>	1,5	Hitzeschockprotein mit Ähnlichkeit zu Hsp26, Proteinfaltung, assoziiert mit Aktinzytoskelett; induziert durch Hog1, Msn2, Msn4, Ethanol
YDR209	unbekannt	1,5	keine Ähnlichkeit zu anderen Proteinen
YDR354	<i>TRP4</i>	1,5	Anthranilatphosphoribosyltransferase der Tryptophan-Biosynthese
YER175	unbekannt	1,5	enthält S-Adenosylmethionin-abhängigem Methyltransferase-Motiv
YFR044	unbekannt	1,5	Ähnlichkeit zu Ybr281
YER052	<i>HOM3; THR3; BOR1</i>	1,5	Aspartatkinase; an Methionin- and Threonin-Biosynthese beteiligt

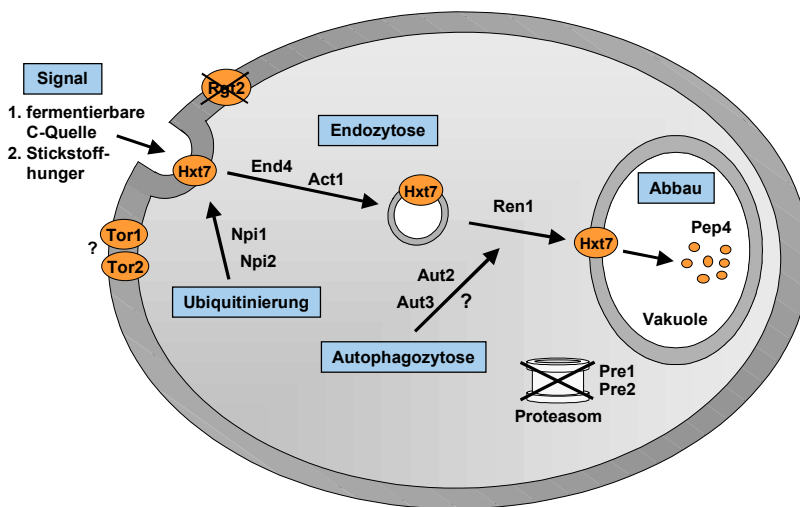
Vier Gene sind in dem Stamm EBY.VW4000 mehr als 2-fach höher exprimiert. Die Funktion von drei dieser vier Gene ist noch unbekannt. Sie weisen teilweise lediglich Ähnlichkeiten zu anderen unbekanntem Proteinen auf. Das identifizierte Gen *SNZ1* ist wahrscheinlich in die Biosynthese von Pyridoxin involviert. Weitere 21 Gene werden in dem Stamm EBY.VW4000 unter den untersuchten Bedingungen mindestens 1,5-fach höher exprimiert als in dem Stamm SKY7. Auffallend viele dieser Gene sind an der Biosynthese von Aminosäuren beteiligt. Es ist vorstellbar, dass einige dieser Gene indirekt an der Regulation des unbekanntem Glukosetransporters beteiligt sind, z. B. durch Aktivierung eines Repressors, der die Transkription des unbekanntem Glukosetransporters unterbindet.

Dass der unbekanntem Glukosetransporter mit Hilfe der „Microarrays“ nicht identifiziert werden konnte, kann verschiedene Ursachen haben: 1. Obwohl der unbekanntem Glukosetransporter transkriptionell reguliert wird, sind die Expressionsunterschiede des Transporters in den beiden untersuchten Stämmen so gering, so dass sie mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden können. 2. Es findet eine so schwache Expression des Transporters statt, die mit den „Microarrays“ nicht nachweisbar ist. 3. Die Expression des unbekanntem Glukosetransporters wird nur dann induziert, wenn sonst keine Glukoseaufnahme in die Zelle stattfindet. Um vergleichbare Bedingungen zu schaffen, mussten jedoch beide Stämme mit dem Plasmid p426MET25HXT11 transformiert werden. Möglicherweise wird durch die Hxt11-vermittelte Glukoseaufnahme die Expression des unbekanntem Glukosetransporters unterbunden. 4. Es findet keine transkriptionelle Regulation des Glukosetransporters statt, sondern eine posttranskriptionelle. Eine mögliche Regulation auf posttranskriptioneller Ebene ist z. B. die Aktivierung des gesuchten Transporters durch eine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung. Solche Regulationen werden jedoch mit den „Microarrays“ nicht erfaßt.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Abbaumechanismus von Hxt6/7

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die hoch-affinen Hexosetransporter Hxt6/7 der Hefe *S. cerevisiae* in Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen bei gleichzeitigem Stickstoffhunger einer Inaktivierung unterliegen. Der resultierende Verlust der Transportaktivität ist auf einen schnellen Abbau der Proteine zurückzuführen. Der Abbaumechanismus von Hxt7 ist in Abb. 42 schematisch dargestellt.



**Abb. 42: Schematische Darstellung des Abbaumechanismus von Hxt7 bei Stickstoffhunger in Anwesenheit hoher Glukosekonzentrationen.**

#### 4.1.1 Endozytose der Hexosetransporter Hxt6/7

Die Hexosetransportproteine Hxt6/7 werden von der Plasmamembran internalisiert und mittels Endozytose zur Vakuole geliefert. An diesem Prozess sind die Proteine Act1, End4 und Ren1 beteiligt (3.6, 3.7). Nach bisherigem Kenntnisstand werden alle Plasmamembranproteine der Hefe zum Abbau in der Vakuole mittels Endozytose internalisiert mit Ausnahme des Kupfertransporters Ctr1. Ctr1 unterliegt einer End3/End4/Pep4-unabhängigen Kupfer-induzierten Proteolyse direkt an der Plasmamembran (Ooi et al., 1996).

Der Internalisierungsmechanismus der Endozytose ist noch weitgehend unbekannt. Möglicherweise werden die Plasmamembranproteine in Domänen der Plasmamembran befördert, die sich durch eine Anreicherung an Ergosterolen und eine aktive Endozytose auszeichnen (Munn et al., 1999; Hicke, 1997). Viele Proteine, die speziell mit den „actin cortical patches“ interagieren und Komponenten des Aktin-Zytoskeletts sind für die Internalisierung essentiell (Mulholland, 1999). Daher wurde bisher vermutet, dass die „actin cortical patches“ die Orte der Endozytose sind (Munn et al., 1995; Mulholland et al., 1994). Kürzlich

zeigten jedoch Mulholland et al. (1999), dass der endozytierte  $\alpha$ -Faktor-Rezeptor Ste2 nicht mit den Finger-ähnlichen Invaginationen der Plasmamembran der „actin cortical patches“ co-lokalisiert. Stattdessen reichert sich Ste2 in Furchen-ähnlichen Invaginationen der Plasmamembran an. Folglich wirkt das Aktin-Zytoskelett auf andere kortikale Strukturen als die „actin cortical patches“ (Hicke et al., 1997; Mulholland et al., 1999). Das Aktin-Zytoskelett ist vermutlich auch an der Internalisierung der Hexosetransporter beteiligt, da für den Abbau von Hxt6 und Hxt7 sowohl das Aktin-kodierende Gen *ACT1* und auch das Aktin-bindende Protein End4 essentiell sind (3.6).

#### **4.1.2 Abbau der Hexosetransporter Hxt6/7 in der Vakuole**

Da Mutationen in den proteasomalen Untereinheiten Pre1 und Pre2 (Heinemeyer et al., 1991; 1993) keinen Einfluss auf die Halbwertszeit von Hxt6/7 unter Inaktivierungsbedingungen hatten, spielt das Proteasom vermutlich keine Rolle bei dem Abbau der Hexosetransporter (3.5). Jedoch muss der Abbau von Plasma-membranproteinen nicht unweigerlich Proteasom-unabhängig erfolgen. So vermuteten Loayza und Michaelis (1998), dass Ste6 nicht ausschließlich von den vakuolären Hydrolasen abgebaut wird (Kölling und Losko, 1997), sondern die zytoplasmatischen Regionen des internalisierten Proteins auch durch das Proteasom abgebaut werden. Ferner zeigten Studien am humanen Wachstumshormonrezeptor GHR, dass das Proteasom in Säugerzellen auch an der Internalisierung von Plasmamembranproteinen beteiligt sein kann (van Kerkhof et al., 2000). Die meisten Plasmamembranproteine der Hefe unterliegen jedoch, ebenso wie die Hexosetransportproteine Hxt6/7, einem Pep4-abhängigen Abbau in der Vakuole, der unabhängig von der Funktion des Proteasoms ist.

#### **4.1.3 Ubiquitinierung der Hexosetransporter Hxt6/7**

##### **Ubiquitinierung leitet die Endozytose ein**

Vermutlich ist eine Ubiquitinierung an der Inaktivierung der Hexosetransporter Hxt6/7 beteiligt (3.8). Mittlerweile wurde für viele Plasmamembranproteine eine enge Korrelation zwischen dem Grad der Ubiquitinierung und der Halbwertszeit des Proteins beschrieben. So postulierten Hicke und Riezman (1996), dass die Ubiquitinierung die Endozytose von Plasmamembranproteinen einleitet. Wie durch die Ubiquitinierung die Internalisierung der Plasmamembranproteine induziert wird, ist jedoch noch weitgehend unbekannt. Die Ubiquitinierung könnte die Aggregation der Plasmamembranproteine fördern und so die Internalisierung einleiten (Hou et al., 1994). Alternativ werden die Proteine in Membran-subdomänen mit aktiver Endozytose lokalisiert (Hicke, 1997). Shih et al. (2000) zeigten kürzlich, dass die Internalisierungsinformation durch das Ubiquitinmolekül

selbst vermittelt wird. Eine durch die Ubiquitinierung ausgelöste Konformationsänderung des Plasmamembranproteins, die ein zuvor maskiertes Internalisierungsmotiv freilegt, scheidet demnach als Signal aus.

#### **Ubiquitinierung proteosomaler und endozytischer Substrate**

Da sowohl der Abbau von Plasmamembranproteinen via Endozytose als auch die Proteolyse zytoplasmatischer Proteine und ER-Membranproteine durch eine Ubiquitinierung der Substrate eingeleitet wird, muss sich die Art der Ubiquitinierung der verschiedenen Substrate unterscheiden. Entscheidend ist das Ausmaß der Ubiquitinierung: während für die proteosomale Erkennung eine multi-Ubiquitinkette aus vier oder mehr Ubiquitinmolekülen benötigt wird (Hochstrasser, 1996), reicht für eine effektive Internalisierung der Plasmamembranproteine via Endozytose bereits eine mono-Ubiquitinierung aus (Terrell et al., 1998; Roth und Davis, 2000). Jedoch wird für eine maximale Internalisierungsrate mancher Plasmamembranproteine wie der Uracilpermease Fur4 und der generellen Aminosäurepermease Gap1 auch eine di- bis penta-Ubiquitinierung benötigt. Die Ubiquitinketten endozytischer und proteosomaler Substrate unterscheiden sich überdies durch die Verknüpfungsart der Ubiquitinmoleküle untereinander (Galan und Haguenaer-Tsapis, 1997; Springael et al., 1999a).

#### **Beteiligung der Ubiquitin-Protein-Ligase Npi1/Rsp5 an der Inaktivierung von Hxt6/7**

Die Ubiquitinierung wird durch Ubiquitin-aktivierende Enzyme (E1), Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E2) und Ubiquitin-Protein-Ligasen (E3) katalysiert (Ciechanover, 1994). Eine Reihe von endozytischen Substraten werden in Abhängigkeit der redundanten E2-Enzyme Ubc1, Ubc4 und Ubc5 ubiquitiniert (Kölling und Hollenberg, 1994; Egner und Kuchler, 1996). Die in einem Komplex organisierte, am häufigsten beteiligte E3-Komponente ist die Ubiquitin-Protein-Ligase Npi1/Rsp5 (Hein et al., 1995; Rotin et al., 2000). Auch der Abbau der Hexosetransporter Hxt6/7 ist Npi1-abhängig (3.8). Die Ligase Npi1/Rsp5 besitzt eine C<sub>2</sub>-, drei WW- und eine HECT-Domäne. Die genaue Funktionsweise von Npi1/Rsp5 ist jedoch bisher noch unbekannt. Vermutlich ist die Ligase für die direkte Ubiquitinierung der Plasmamembranproteine verantwortlich, weil in *npi1*-Mutanten keine Protein-Ubiquitin-Konjugate nachweisbar sind (Galan et al., 1996; Springael und André, 1998; Lucero und Lagunas, 1997). Da aber beispielsweise in einer *Npi1ΔC<sub>2</sub>*-Mutante noch eine Ubiquitinierung von Gap1, jedoch keine Endozytose stattfindet, besitzt die Ligase vermutlich neben der direkten Ubiquitinierungsfunktion noch eine generelle Funktion in der Endozytose (Zoladek et al., 1997; Springael et al., 1999b). Auch diese Funktion von Npi1 ist jedoch

substratspezifisch, da der Abbau von Hxt7 in einer Npi1 $\Delta$ C<sub>2</sub>-Mutante nicht blockiert war (Becker, 1999).

Die WW-Domänen der Npi1/Rsp5-Ligase sind für die Erkennung der Substrate notwendig und binden generell an Prolin-reiche Motive wie PPXY und PPLP oder an Phosphoserine bzw. -threonine (Dunn und Hicke, 2001). Da der untersuchte  $\alpha$ -Faktor-Rezeptor Ste2 keine Prolin-reichen Stellen besitzt, vermuteten Dunn und Hicke (2001), dass die Ligase vermutlich direkt an die phosphorylierten Serinreste von Ste2 bindet. So schafft die Phosphorylierung des Rezeptors Bindestellen für die Ligase und reguliert somit positiv die Ubiquitinierung (Hicke et al., 1998). Zwar wurde bisher für die Hexosetransportproteine keine direkte Phosphorylierung nachgewiesen, jedoch hatte eine Deletion der PEST-ähnlichen, N-terminalen Region von Hxt7 ebenso wie die Deletion der entsprechenden Region von Ste2 eine Stabilisierung des Hexosetransportproteins zur Folge (3.16.5). So ist es denkbar, dass analog zu Ste2 durch die Deletion der PEST-ähnlichen Region die putativen Phosphorylierungsstellen des Hexosetransporters wegfallen und die Npi1/Rsp5-Ligase das Substrat nicht mehr erkennt.

#### **Beteiligung der Ubiquitin-Protein-Ligase Npi2/Doa4 an der Inaktivierung von Hxt6/7**

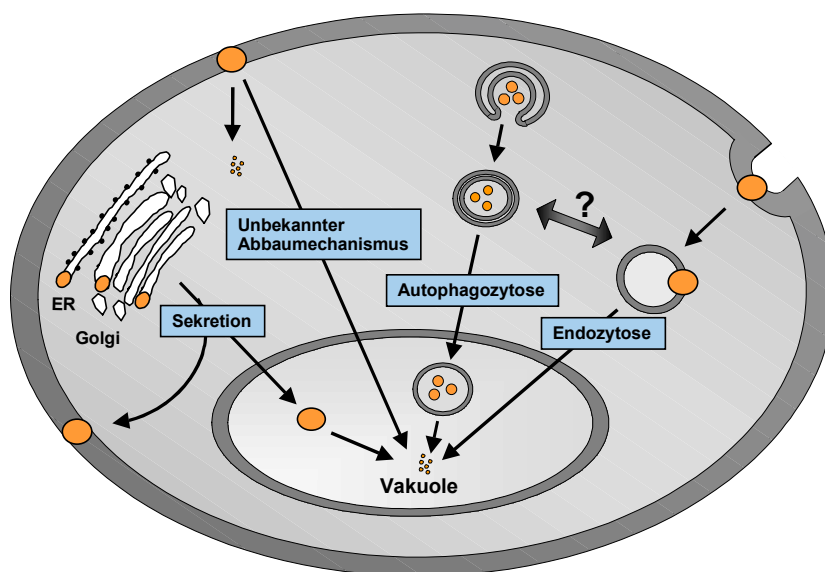
Der Abbau von Hxt6/7 ist in der  $\Delta$ npi2-Mutante im Vergleich zu der npi1-Mutante nur gering beeinflusst (3.8). In der  $\Delta$ npi2-Mutante ist die Menge freier Ubiquitinmoleküle reduziert (Springael et al., 1999a). Die genaue physiologische Rolle des deubiquitinierenden E4-Enzyms Npi2/Doa4 ist jedoch noch unklar (Papa et al., 1993). Vielleicht hängt das Ausmaß der Stabilisierung in der  $\Delta$ npi2-Mutante von dem Ausmaß der Ubiquitinierung des Substrats ab. Möglicherweise werden die Hexosetransporter Hxt6/7 ebenso wie z. B. der  $\alpha$ -Faktor-Rezeptor Ste2 oder auch die Maltosepermease nur mono-ubiquitiniert. In diesem Fall könnte ein geringer Rest-Pool an freiem Ubiquitin für eine Internalisierung ausreichen, im Gegensatz zum Abbau von Plasmamembranproteinen, die einer multi-Ubiquitinierung unterliegen wie Gap1 oder Fur4 (Galan und Haguenaer-Tsapis, 1997; Springael et al., 1999a).

Insgesamt kann man aufgrund der Analogie zu anderen Plasmamembranproteinen annehmen, dass die Hexosetransporter selbst einer Ubiquitinierung unterliegen und dass diese Modifizierung der Auslöser für die Internalisierung ist.



#### 4.1.4 Beteiligung von Aut2 und Aut3 am Abbau der Hexosetransporter Hxt6/7

In den Autophagozytosemutanten  $\Delta aut2$  und  $\Delta aut3$  ist der Abbau der Hexosetransportproteine deutlich verlangsamt (3.9). Dies war überraschend, da bisher lediglich bekannt war, dass mittels Autophagozytose zytoplasmatische Hefeproteine unspezifisch abgebaut werden. Eine Beteiligung des Prozesses am Abbau von Plasmamembranproteinen war bisher jedoch nicht beschrieben worden. Doch wie greifen Aut2 und Aut3 in den Abbauprozess von Hxt6/7 ein? Es ist vorstellbar, dass Aut2 und Aut3 neben ihrer Funktion im Autophagozytoseprozess zusätzlich eine Funktion im Sekretionsweg ausüben. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da die Sekretion der Invertase und Carboxypeptidase Y (CPY) in  $\Delta aut3$ -Mutanten nicht beeinträchtigt ist (Matsuura et al., 1997; Straub et al., 1997). Aufgrund der korrekten Lokalisation des Hxt7-GFP-Fusionsproteins in  $\Delta aut2$ - und  $\Delta aut3$ -Mutanten zur Plasmamembran (3.11), ist auch die Sekretion der Hexosetransporter offensichtlich nicht beeinflusst. Alternativ könnte ein Defekt im Sekretionsweg auch indirekt den Abbau der Transporter beeinflussen. Hervorgerufen durch eine Misslokalisierung der vakuolären Proteasen in Autophagozytosemutanten könnte die proteolytische Aktivität der Vakuole reduziert sein. Da das Hxt7-GFP-Fusionsprotein jedoch in der  $\Delta aut2$ -Mutante in kleineren, vermutlich prä-vakuolären Strukturen zurückgehalten wird und nicht bis zur Vakuole geliefert wird, ist diese Möglichkeit unwahrscheinlich. Eine Fragmentierung der Vakuole, die das veränderte Lokalisierungssignal des Hxt7-GFP-Fusionsproteins verursachen könnte, wurde in  $\Delta aut2$ - und  $\Delta aut3$ -Mutanten nicht beobachtet (Straub et al., 1997; Lang et al., 1998).



**Abb. 43:** Schematische Darstellung möglicher Beteiligungen der Proteine Aut2 und Aut3 am Abbau der Hexosetransporter Hxt6/7.

Möglicherweise sind Aut2 und Aut3 an einem bisher noch unbekanntem Abbauweg von Plasmamembranproteinen involviert. Tatsächlich existiert neben der Endozytose noch mindestens ein anderer Abbauweg: der Kupfertransporter Ctr1 wird völlig unabhängig von der Endozytose direkt an der Plasmamembran abgebaut (Ooi et al., 1996). Auch Munn (2000) postulierte, dass möglicherweise mehrere Endozytosewege in Hefe existieren. Da jedoch sowohl in der  $\Delta aut2$ - als auch in der  $end4^{ts}$ -Mutante eine sehr deutliche Stabilisierung der Hexosetransporter über mehrere Stunden zu verzeichnen ist (3.10), ist ein paralleler Abbauweg äußerst unwahrscheinlich. Aller Voraussicht nach wirken End4 und Aut2 im gleichen Abbauweg.

Am wahrscheinlichsten ist, dass sich Autophagozytose und Endozytose an einem prä-vakuolären Schritt überschneiden (3.11). In Säugerzellen gibt es eine Reihe von Hinweisen, dass solche Überschneidungen möglich und sogar für eine Reifung der Autophagosomen notwendig sind (Gordon und Seglen, 1988; Gordon et al., 1992; Alpin et al., 1992; Liou et al., 1997). So enthalten Autophagosomen Proteine, die eigentlich charakteristisch sind für endozytische oder lysosomale Strukturen. Auf welcher Ebene endosomale und autophagische Kompartimente aufeinandertreffen ist umstritten. So wurde einerseits eine Überschneidung auf der Ebene der späten Endosomen oder der prä-lysosomalen Kompartimente beschrieben, andererseits eine Verschmelzung früher Autophagosomen mit Vesikeln der frühen Endosomen (Punnonen et al., 1993; Tooze et al., 1990). Auch elektronenmikroskopisch konnte eine Fusion von Autophagosomen mit Endosomen in HeLa-Säugerzellen gezeigt werden (Lucocq und Walker, 1997). Ferner beobachteten Tagawa et al. (1999), dass ein peripheres Membranprotein nach Induktion der Autophagozytose von der Plasmamembran vermutlich über Endosomen zu den Autophagosomen/Autolysosomen geliefert wird. Auch diese Beobachtung bestätigt, dass es eine Verbindung zwischen Plasmamembran und Autophagozytoseprozess geben muss.

In Hefe wurden bisher keine direkten Überschneidungen zwischen Autophagozytose und Endozytose beobachtet. Jedoch treffen in Hefe mehrere Wege, die zur Vakuole führen, an einem prä-vakuolären Kompartiment (PVC) zusammen. So üben eine Reihe von Autophagozytoseproteinen (Aut/Apg) sowohl eine Funktion im Autophagozytoseprozess als auch im biosynthetischen Cvt-Weg aus (Harding et al., 1996; Baba et al., 1997; Scott et al., 1996). Auch der klassische Sekretionsweg (CPY-Weg) trifft an einem PVC auf den endozytischen Weg (Piper et al., 1995; Babst et al., 1997; Rieder und Emr, 1997). Es gibt jedoch erste Hinweise, dass ein endosomales Kompartiment eine regulatorische Funktion im Autophagozytoseprozess ausübt. Shiharama et al. (1997) beobachteten, dass

eine „gain-of-function“-Mutation von *VPS4*, *csc1*, in Vollmedium Autophagozytose induziert. *VPS4* gehört zu den „class E“-*VPS*-Genen und ist am Proteintransport von den Endosomen/PVC zur Vakuole beteiligt. Auch Hxt6 und Hxt7 werden vermutlich über ein prä-vakuoläres „class E“-Kompartiment zur Vakuole transportiert, da der Abbauprozess in einer  $\Delta ren1$ -Mutante blockiert war. So konnte z. B. für Ste2 und Ste3 gezeigt werden, dass in einer *ren1-1*-Mutante die Proteine in einem „class E“-Kompartiment akkumulieren (Davis et al., 1993; Loayza und Michaelis, 1998). Auch für Mos1, ebenfalls ein Protein mit einem „class E“-Phänotyp, wurde eine Wechselwirkung mit einem Autophagozytoseprotein beschrieben: in einem „Two-Hybrid-Screen“ wurde Aut3/Apg1 als Interaktionspartner von Mos1 identifiziert (Kranz, 2000). Ferner ist der Transportprozess zur Vakuole in *vps4*-Mutanten nicht komplett blockiert (Babst et al., 1997). Der verbleibende alternative Transportweg von den Endosomen zur Vakuole ist allerdings recht ineffizient und beansprucht mehr als 90 min. Babst et al. (1997) vermuteten, dass der verbleibende Transport über die Autophagozytose vermittelt wird. Tatsächlich handelt es sich bei dem Abbau der Hexosetransportproteine um einen im Vergleich zu anderen endozytierten Proteinen sehr langsamen Abbau. Die Halbwertszeit von Hxt6/7 beträgt, je nach Stamm, 1-2 Stunden. Möglicherweise sind die Autophagozytoseproteine nur an dem langsamen endozytischen/autophagozytischen Abbau von Plasmamembranproteinen beteiligt.

Endozytose und Autophagozytose könnten auf verschiedene Weise zusammenwirken. So könnten Autophagosomen schon bei ihrer Bildung endosomale Vesikel umschließen. Es könnte aber auch, ähnlich wie in Säugerzellen beobachtet, eine Verschmelzung der Endosomen und Autophagosomen stattfinden. Eine weitere Möglichkeit ist, dass Aut2 und Aut3 zusätzlich zu ihrer bereits identifizierten Funktion, eine zusätzliche Aufgabe in der Endozytose besitzen.

#### **4.1.5 Auslösung des Abbausignals**

Gerade unter typischen Fermentationsbedingungen, bei Stickstoffhunger und gleichzeitigem Überfluss einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle, findet ein schneller Abbau der Hexosetransporter Hxt6/7 statt. Vermutlich sind Sensoren an der Wahrnehmung der veränderten Umweltbedingungen beteiligt.

##### **Induktion des Abbausignals durch eine fermentierbare Kohlenstoffquelle**

Da in Anwesenheit von Ethanol bei gleichzeitigem Stickstoffhunger kein Abbau der Hexosetransporter stattfindet (3.4.1), wurde zunächst vermutet, dass dies auf die generelle Inhibition der Endozytose in Anwesenheit von Ethanol zurück-

zuführen ist (Lucero et al., 1997). Jedoch fanden Lucero et al. (2000), dass diese Hemmung der Endozytose bei Stickstoffhunger nicht stattfindet. Somit ist die Anwesenheit einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle für die Einleitung des Abbausignals essentiell. Jiang et al. (1997) zeigten, dass der Glukosesensor Rgt2 an der Inaktivierung der Maltosepermease beteiligt ist. Das Glukosesignal für den Abbau von Hxt6/7 wird allerdings weder über den niedrig-affinen Glukosesensor Rgt2 noch den hoch-affinen Sensor Snf3 vermittelt (Krampe et al., 1998).

#### **Induktion des Abbausignals durch Stickstoffhunger**

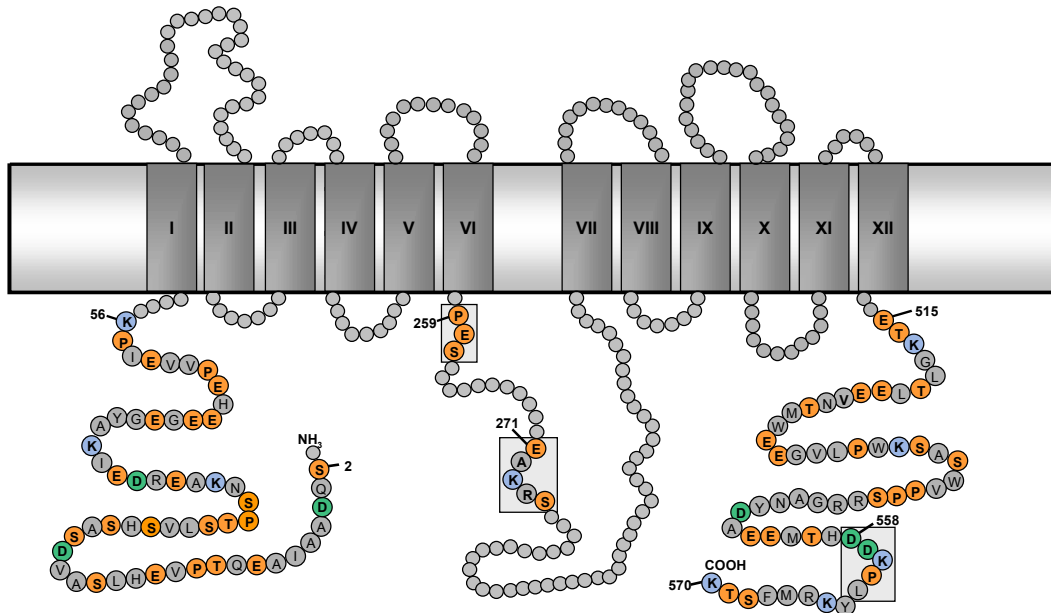
Möglicherweise sind die Proteine Tor1 und Tor2, ähnlich wie bei der Einleitung des Abbaus der Tryptophanpermease Tat2, an der Wahrnehmung des Hungersignals beteiligt (Beck et al., 1999). Es konnte jedoch nicht eindeutig gezeigt werden, ob der Abbau der Hexosetransporter Hxt6/7 durch eine Behandlung der Zellen mit dem Tor1/Tor2-Inhibitor Rapamycin induziert werden kann (3.4.3) (Heitman et al., 1991). Die resultierende zelluläre Antwort der Hefen auf eine Rapamycinbehandlung ist charakteristisch für Nährstoffmangel. Allerdings werden neben Stickstoff-sensitiven auch viele andere Nährstoff-sensitive Wege Tor-abhängig vermittelt. Die Inaktivierung von Tat2 wird im Gegensatz zu den Hexosetransportproteinen nicht nur durch Stickstoffhunger, sondern auch bei Stickstoff- oder Kohlenstoffmangel eingeleitet (Beck et al., 1999; Lagunas et al., 1982; Busturia und Lagunas, 1986). Möglicherweise vermittelt Rapamycin den Abbau von Tat2 nicht aufgrund eines Stickstoffhungersignals, sondern aufgrund eines anderen Stress-Signals. Tatsächlich zeigten Hardwick et al. (1999) in einer DNA-Microarray-Studie, dass die Tor-Proteine zwar an der Wahrnehmung von Stickstoffmangel, jedoch nicht Stickstoffhunger beteiligt sind. Es scheint daher durchaus plausibel, dass unterschiedliche Sensormechanismen die Induktion des Abbaus von Hxt6/7 und Tat2 vermitteln.

## **4.2 Potentielle Internalisierungssequenzen von Hxt7**

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion eines Hexosetransporters, der unter Stickstoffhungerbedingungen in Anwesenheit von Glukose stabilisiert ist. Da es nicht gelang ein Screening-Verfahren aufzubauen, durch das auf stabilisierte Hexosetransporter selektioniert werden konnte, wurden gezielt putative Internalisierungsmotive verändert.

Alle bisher identifizierten Endozytosesignale sind in den zytoplasmatischen Domänen der Plasmamembranproteine lokalisiert. Die Hexosetransportproteine der Hefe durchspannen die Plasmamembran vermutlich ähnlich wie die

menschlichen Glukosetransporter mit 12 amphipatischen  $\alpha$ -helikalen Domänen (Ciriacy und Reifenberger, 1997). Die N- und C-Termini und auch hydrophilere Regionen zwischen den Transmembrandomänen sind u. a. auf der zytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert. Auf diese Weise kommen diese Bereiche der Hexosetransportproteine als mögliche Angriffspunkte der Ubiquitinierungs- und Endozytosemaschinerie in Frage.



**Abb. 44: Topologisches Modell des Hexosetransporters Hxt7.** Die Aminosäuren P (Prolin), E (Glutamat), S (Serin) und T (Threonin) der PEST-Region sind orange dargestellt, Lysinreste (K) blau und saure Asparatreste (D) grün.

Die meisten Internalisierungsmotive zeichnen sich durch eine hohe Anzahl an Serin- und Threoninresten und durch saure Aminosäurereste aus. So wurde mehrfach postuliert, dass negativ geladene Reste eine bessere Substrat-Erkennung der Ubiquitinierungsmaschinerie ermöglichen (Hicke und Riezman 1996; Marchal et al., 1998; Hicke et al., 1998). Einerseits können also negative Ladungen der sauren Aminosäuren Asparat und Glutamat der Plasmamembranproteine erkannt werden, andererseits negative Ladungen von angehängten Phosphatresten. Jedoch konnten in Hefe auch Internalisierungssequenzen identifiziert werden, die nicht mit sauren Aminosäuren, einer Phosphorylierung oder Ubiquitinierung in Zusammenhang stehen. Hierzu gehören die Di-Leucinmotive von Gap1 und Mal61 oder die NPF-Signale von Ste2 und Ste3 (Hein und André, 1997; Medintz et al., 2000; Tan et al., 1996). So werden beispielweise bestimmte Signale durch Adaptorproteine der Clathrin-abhängigen Endozytosemaschinerie erkannt (Heilker et al., 1999).

#### 4.2.1 Untersuchung der Pentapeptidmotive E/DXKXX von Hxt7

Es wurde zwei Motive des Hxt7-Proteins untersucht, die an die putativen Endozytosesignale verschiedener Proteine der allgemeinen Sequenz D/EXKXX erinnern: das EAKRS-Motiv und das DDKPL-Motiv (Abb. 44). Jedoch verhinderte ein Austausch des sauren Aminosäurerestes des jeweiligen Motivs gegen Lysin nicht die Inaktivierung von Hxt7 (3.16.1). Über einen entsprechenden Austausch des sauren Aminosäurerest in Gap1 ist bekannt, dass dieses Gap1<sup>pgf</sup>-Protein noch ubiquitiniert, jedoch nicht mehr inaktiviert wird (Springael und André, 1998). Die untersuchten Sequenzmotive EAKRS und DDKPL des Hxt7-Proteins sind anscheinend nicht an der Regulation der Stabilität involviert oder ein Austausch des sauren Rests reicht nicht, um das Internalisierungssignal unwirksam zu machen.

#### 4.2.2 Veränderungen des C-Terminus von Hxt7

Während für einige Plasmamembranproteine wie Ste2, Gap1 oder Ste3 der C-Terminus für die Internalisierung der Proteine wichtig ist (Hicke und Riezman, 1996; Hicke et al., 1998; Tan et al., 1996; Hein und André, 1997), ist dieser für andere Proteine wie die Maltosepermease unbedeutend.

Zwar konnte durch einen Austausch des C-Terminus von Hxt7 gegen den des stabileren Hexosetransportproteins Hxt1 keine Stabilisierung erreicht werden (3.16.2), jedoch durch eine Deletion der letzten 54 Aminosäuren von Hxt7 (3.16.3). Der zytoplasmatische C-Terminus von Hxt7 ist reich an Serin- und Threoninresten und enthält insgesamt fünf Lysinreste (Abb. 44). Die Deletion dieser potentiellen Phosphorylierungs- und Ubiquitinierungsmotive resultierte in einem Protein, das in einer Western-Blot-Analyse stabilisiert erschien (3.16.3). Da das Protein jedoch seine Funktionalität eingebüßt hat, konnte mit diesem Protein keine höhere Glukosetransportaktivität unter Hungerbedingungen erzielt werden. Aufgrund dessen wurde nicht untersucht, ob die Stabilisierung auf ein Sequenzmotiv im C-Terminus oder durch eine defekte Lokalisierung zurückzuführen ist. Es ist denkbar, dass das Hxt7 $\Delta$ C<sup>517-570</sup>-HA-Protein ebenso wie der heterolog-exprimierte Glukosetransporter Glut1 der Ratte in Hefe nach Inaktivierung noch internalisiert wird (3.13-3.15), jedoch nicht zur Vakuole geliefert wird.

#### 4.2.3 Austausch des Serinrestes 259 von Hxt7

Bei den meisten Plasmamembranproteinen leitet vermutlich eine Phosphorylierung die Ubiquitinierung des Proteins ein (Marchal et al., 1998). Der Serinrest 259 von Hxt7 in dem Aminosäuremotiv PES stellt eine mögliche Proteinkinase C

(PKC)-Phosphorylierungsstelle in der zytoplasmatischen Region zwischen Transmembranhelix VI und VII dar (Abb. 44). Während ein Austausch des entsprechenden Serinrests des Maltosetransporters zu einer deutlichen Reduktion der Inaktivierung führte (Brondijk et al., 1998), hatte die Modifikation der putativen PKC-Phosphorylierungsstelle des Hxt7-Proteins keine Auswirkung auf den Abbau des Hexosetransporters (3.16.4). Dies spricht dafür, dass die Stabilität von Hxt7 und der Maltosepermease durch unterschiedliche Signale reguliert wird. Von Riballo et al. (1994) wurde auch bereits gezeigt, dass die Katabolit-Inaktivierung des hoch-affinen Hexosetransportsystems nicht durch die Proteinkinase C beeinflusst wird. Mittlerweile ist für mehrere endozytierte Plasmamembranproteine bekannt, dass der Ubiquitinierung eine Yck1-/Yck2-vermittelte Phosphorylierung vorausgeht (Hicke et al., 1998). Möglicherweise sind die Caseinkinase I-Homologen Yck1/Yck2 auch an der Regulation der Stabilität der Hexosetransportproteine involviert.

#### **4.2.4 Deletion des N-Terminus von Hxt7**

Nicht nur der C-Terminus, sondern auch der N-Terminus einiger Plasmamembranproteine ist für die Einleitung der Internalisierung wichtig. Eine Deletion der Aminosäuren 2-56 von Hxt7 führte zu einem Hexosetransportprotein, das über 6 Stunden nach Inaktivierung fast komplett stabilisiert ist (3.16.5). Die deletierte N-terminale Sequenz erinnert an PEST-Sequenzen, die für die Direktion vieler zytoplasmatischer und nukleärer Proteine zum proteasomalen Abbau verantwortlich sind (Rechsteiner und Rogers, 1996). PEST-Sequenzen weisen keine primäre Sequenzidentität auf. Allerdings sind sie im Allgemeinen 10-50 Reste lang und sind durch eine hohe Dichte an sauren Aminosäuren (Glutamat und Aspartat) und hydroxylierten Aminosäuren gekennzeichnet (Serin und Threonin) (Abb. 44). Auch der Abbau einer Reihe von Plasmamembranproteinen wird durch PEST-ähnliche Sequenzen reguliert: die Uracilpermease Fur4 (Marchal et al., 1998), der Tryptophantransporter Tat2 (Beck et al., 1999), der  $\alpha$ -Faktor-Transporter Ste6 (Kölling und Losko, 1997), die  $\alpha$ - und  $\alpha$ -Faktor-Rezeptoren Ste2 und Ste3 (Dunn und Hicke, 2001; Roth et al., 1998) und die Maltosepermease Mal61 (Medintz et al., 2000). Zusammen repräsentieren diese Sequenzen wahrscheinlich eine neue Klasse von Endozytosesignalen, deren primäre Rolle das Anhängen eines initiierenden Ubiquitins ist (Roth et al., 1998). Die Lysinreste innerhalb der PEST-Sequenz und in der näheren Umgebung fungieren wahrscheinlich als redundante Ubiquitinakzeptorstellen (Marchal et al., 2000; Roth und Davis, 2000), während die Serinreste vermutlich als Phosphoakzeptoren dienen (Medintz et al., 2000). Die Kinasen Yck1/Yck2 vermitteln vermutlich die Phosphorylierung der PEST-ähnlichen Sequenzen (Marchal et al., 2000; Vancura et al., 1994; Estrada et al.,

1996; Medintz et al., 2000). In dem deletierten Bereich des N-Terminus von Hxt7 befinden sich sieben Serin- und drei Lysinreste, die als putative Phosphorylierungs- und Ubiquitinierungsstellen dienen könnten (Abb. 44). Medintz et al. (1996; 1998) konnten zeigen, dass die Maltosepermease speziell in Anwesenheit von Glukose phosphoryliert und ubiquitiniert wird. Möglicherweise unterliegt der N-Terminus von Hxt7 einer ähnlichen Regulation.

### 4.3 Glukoseaufnahme und Ethanolproduktion eines *HXT7ΔN<sup>2-56</sup>-HA*-Einzelexpressionsstamms unter Hungerbedingungen

Industrielle Fermentationen können durch die Inaktivierung des Zuckertransportsystems limitiert werden (Salmon und Vincent, 1993). Das konstruierte Hxt7ΔN<sup>2-56</sup>-HA-Protein unterliegt im Gegensatz zum Hxt7-Wildtypprotein unter Hungerbedingungen keinem schnellen Abbau. Es erschien somit sehr vielversprechend in Bezug auf eine mögliche Erhöhung der Glukosetransportrate unter Fermentationsbedingungen. Tatsächlich konnte mit einem *HXT7ΔN<sup>2-56</sup>-HA*-Einzelexpressionsstamm im Vergleich zu einem *HXT7*-Einzelexpressionsstamm unter Inaktivierungsbedingungen eine ca. doppelt so hohe Transportaktivität gemessen werden (3.17).

**Tab. 11: Glukoseaufnahme, Glukoseverbrauch und Ethanolproduktion eines *HXT7*- und *HXT7ΔN<sup>2-56</sup>-HA*-Einzelexpressionsstamms vor (+N) und nach 6-stündiger Inaktivierung (-N).**

		Glukoseaufnahme (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> TG)		Glukoseverbrauchsraten (mmol Glukose/g Protein * h)		Ethanolproduktionsraten (mmol EtOH/g Protein * h)	
Hxt7	+N	117	(100%)	409	(100%)	96	(100%)
Hxt7	-N	20	(17%)	212	(52%)	39	(41%)
Hxt7ΔN	+N	76	(65%)	274	(67%)	28	(29%)
Hxt7ΔN	-N	40	(34%)	169	(41%)	22	(23%)

Unter der Annahme, dass der limitierende Schritt der Fermentation der Glukosetransport über die Plasmamembran ist, sollte es möglich sein, durch einen erhöhten Glukosetransport die Fermentationsrate zu steigern. Jedoch konnte durch Expression des Hxt7ΔN<sup>2-56</sup>-HA-Proteins die Ethanolproduktionsrate unter Hungerbedingungen nicht erhöht werden (3.18.1, 3.18.2). Die Messung des Glukoseverbrauchs zeigte dann ebenfalls, dass die unter Wachstumsbedingungen gemessene Glukoseaufnahme des *HXT7ΔN<sup>2-56</sup>-HA*-Einzelexpressionsstamms nach Inaktivierung im Vergleich zum *HXT7*-Einzelexpressionsstamm nicht erhöht war (Tab. 11). Somit ist eine deutliche Diskrepanz zwischen der *in vitro*-gemessenen Glukoseaufnahme und des *in vivo*-

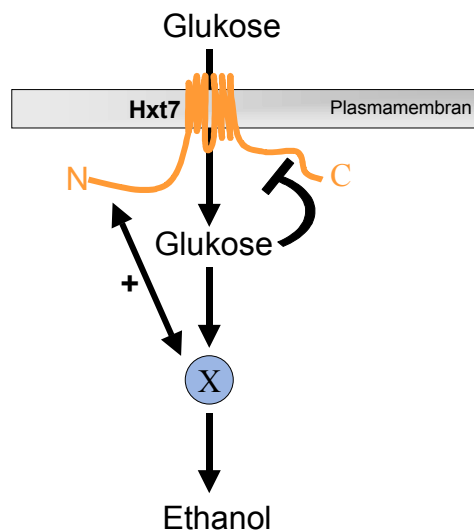


gemessenen Glukoseverbrauchs zu verzeichnen. Auch Teusink et al. (1998) beobachteten, dass Glukoseverbrauch und Glukoseaufnahme nicht direkt korrelieren: bei Expression des hoch-affinen Glukosetransportsystems ist die Glukoseverbrauchsrate um ca. 50% niedriger als der Glukosetransport. Wahrscheinlich sind die unterschiedlichen Ergebnisse auf Regulationen der Hexosetransporter durch den Glukosemetabolismus der Zellen zurückzuführen. Solche Regulationen können naturgemäß nur unter den *in vivo*-Bedingungen der Glukoseverbrauchsmessungen wahrgenommen werden, jedoch nicht bei den Glukoseaufnahmemessungen. Bei den „zero trans“-Glukose-Influx-Messungen kann per Definition keine Rückkopplung vom Metabolismus gemessen werden. Die „Feedback“-Regulation könnte durch Metabolite oder Proteine erfolgen, die mit dem Transportprotein interagieren. So wurden beispielsweise Glukose-6-Phosphat, ATP, die Hexosekinasen oder eine Untereinheit der Trehalosesynthase als mögliche Regulatoren der Glukosetransporter diskutiert (Azam und Kotyk, 1969; Galazzo und Bailey, 1990; Schuddemat et al., 1988; Bisson und Fraenkel, 1983; Thevelein und Hohmann, 1995). Teusink et al. (1998) konnten zeigen, dass die freie intrazelluläre Glukosekonzentration in der Zelle höher ist als zuvor angenommen. Da Transporter, die ihre Substrate mittels erleichterter Diffusion aufnehmen durch ihre Produkte wieder gehemmt werden, postulierten Teusink et al. (1998), dass die aufgenommene Glukose als primäres Signalmolekül wirkt und die Hexosetransporter nach Aufnahme umgehend wieder hemmt.

Durch eine solche „Feedback“-Hemmung kann die fehlende Korrelation zwischen der „zero trans“-Messung der Glukoseaufnahme und des *in vivo*-gemessenen Glukoseverbrauchs erklärt werden. Vor Inaktivierung nimmt der *HXT7*-Einzel-expressionsstamm relativ viel Glukose auf. Dies resultiert umgehend in einer starken Hemmung der Hexosetransporter. Daher ist der gemessene Glukoseverbrauch in Relation zum Glukosetransport gering. Durch den Abbau des Wildtypproteins wird nach Inaktivierung nur noch wenig Glukose aufgenommen. Somit ist einerseits der gemessene Glukosetransport gering, andererseits ist auch die Hemmung der Glukosetransporter mäßig. Folglich ist die Glukoseverbrauchsrate relativ hoch. Entsprechendes beobachtet man auch bei einem Vergleich des Glukoseverbrauchs und der Glukoseaufnahme des *HXT7ΔN<sup>2-56</sup>-HA*-Einzel-expressionsstamms. Da die Hxt7ΔN<sup>2-56</sup>-HA-vermittelte Glukoseaufnahme schon vor Inaktivierung geringer ist als die des Hxt7-Proteins, ist dementsprechend auch die „Feedback“-Hemmung geringer als bei der Expression des transportaktiveren Wildtypproteins. Die Glukoseverbrauchsrate des *HXT7ΔN<sup>2-56</sup>-HA*-Einzel-expressionsstamms ist folglich relativ hoch. Durch die höhere Stabilität des Hxt7ΔN<sup>2-56</sup>-HA-Proteins ist die gemessene Glukoseaufnahmeaktivität nach

Inaktivierung deutlich höher als im Wildtypprotein. Die gemessene Glukoseverbrauchsrate ist jedoch nicht deutlich erhöht, da wiederum ein höhere Hemmung stattfindet.

Die ebenfalls *in vivo*-gemessene Ethanolproduktionsrate müsste nach diesem Modell mit der Glukoseverbrauchsrate korrelieren. Während dies für den *HXT7*-Einzelexpressionsstamm vor und nach Inaktivierung zutrifft, ist jedoch die Ethanolproduktion des *HXT7ΔN<sup>2-56</sup>-HA*-Einzelexpressionsstamms im Vergleich zum Glukoseverbrauch signifikant niedriger. Folglich scheint der N-Terminus von Hxt7 eine regulatorische Funktion zu besitzen. Möglicherweise tritt der N-Terminus in direkte Wechselwirkung mit einem Enzym oder Metabolit der Glykolyse und aktiviert so die Ethanolproduktion (Abb. 45).



**Abb. 45: Modell der „Feedback“-Kontrolle des Hexosetransporters Hxt7 durch freie intrazelluläre Glukose.** Die aufgenommene Glukose wirkt direkt wieder als primäres Signalmolekül und hemmt umgehend den Hexosetransporter. Ferner hat der N-Terminus von Hxt7 eine aktivierende Auswirkung auf die Ethanolproduktion.

Eine Überexpression der Hexosetransporter resultierte zwar in einer insgesamt höheren Fermentationsrate (3.18.2), jedoch ist die Korrelation zwischen Glukoseaufnahme und Ethanolproduktion nicht linear. Dies ist vermutlich auf eine metabolische Kontrolle der Transporter zurückzuführen. Sollte die Glukoseaufnahme in die Zelle tatsächlich durch eine „Feedback“-Hemmung des Glukosemetabolismus reguliert werden, dann kann die Glukoseaufnahme vermutlich generell nicht wesentlich über das Wildtypniveau gesteigert werden. Biotechnologisch erstrebenswert ist jedoch primär die Aufrechterhaltung der Zuckers-transportaktivität unter industriellen Fermentationsbedingungen. Um dies zu erzielen, muss ein Hexosetransporter konstruiert werden, der 1. unter Hungerbedingungen nicht abgebaut wird, der 2. über eine ebenso hohe Glukose-transportaktivität verfügt wie das entsprechende Wildtypprotein und 3. keine eingeschränkte Ethanolproduktionsrate aufweist. Die Deletion der Aminosäuren 2-56 von Hxt7 resultierte zwar in einem deutlich stabilisiertem Hexosetransportprotein, jedoch war auch die *Hxt7ΔN<sup>2-56</sup>-HA*-vermittelte Glukoseaufnahmeaktivität und

auch die Ethanolproduktionsrate reduziert. Möglicherweise reicht beispielsweise ein Austausch der 5 Lysinreste im N-Terminus von Hxt7 aus, um ein Protein zu konstruieren, das unter Hungerbedingungen nicht abgebaut wird. Vielleicht weist ein solches, geringfügiger modifiziertes Protein einerseits eine Wildtypprotein-ähnliche Transportaktivität auf und ist andererseits auch in der Aktivierung der Ethanolproduktion nicht beeinträchtigt.

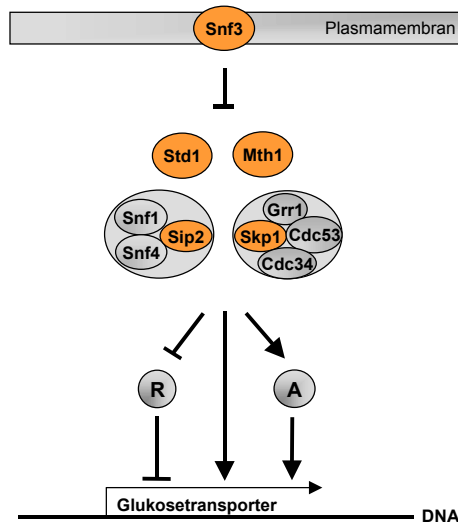
#### 4.4 Existenz eines unbekanntes Glukosetransporters

Neben den Hexosetransportproteinen existiert in der Hefe *S. cerevisiae* ein weiteres Protein, das nicht der Zuckerpermease-Familie angehört, aber Glukoseaufnahme vermitteln kann (Wieczorke et al., 1999). Da das Hxt7-Wildtypprotein nach einer 6-stündigen Inaktivierung laut Western-Blot-Analyse komplett abgebaut war, jedoch der *HXT7*-Einzelexpressionsstamm nach Inaktivierung noch eine beträchtliche Glukoseverbrauchsrate aufwies, ist möglicherweise dieser noch nicht identifizierte Glukosetransporter unter diesen Bedingungen für den gemessenen Glukoseverbrauch verantwortlich.

##### 4.4.1 Regulation des Glukosetransporters

Die Expression des unbekanntes Glukosetransporters kann in dem *hxt<sup>f</sup>*-Stamm durch eine Deletion des Glukosesensors *SNF3* oder durch eine Re-Integration eines *HXT7*-Promotorfragments in den ursprünglichen *HXT3-6-7*-Lokus induziert werden (3.23). Mittels eines „Genbankscreens“ konnten ferner einige „multi-copy-Suppressoren“ identifiziert werden, die ebenfalls dem *hxt<sup>f</sup>*-Stamm wieder ein Wachstum auf Glukosemedium ermöglichten (3.22). Identifiziert wurden u. a. die Proteine Std1, Mth1, Skp1 (Bestandteil des SCF<sup>Grr1</sup>-Komplexes) und Sip2 (Bestandteil des Snf1-Kinasekomplexes), die somit vermutlich nicht nur an der Regulation der Hexosetransporter beteiligt sind, sondern auch an der Regulation des unbekanntes Glukosetransporters. Sollten diese Proteine tatsächlich die Aktivierung des unbekanntes Glukosetransporters bewirken, reicht vermutlich die Expression deutlich verkürzter Proteine oder die Anwesenheit ihrer Promotoren für diese Aktivierung des Transporters aus, da die Genbankplasmide jeweils nicht den kompletten ORF von *SKP1*, *MTH1* und *SIP2* enthalten. So könnte durch die Bindung eines regulatorischen Proteins an den Promotor die Konzentration dieses Proteins in der Zelle so stark erniedrigt werden, dass es für eine Repression des Glukosetransporters nicht mehr zur Verfügung steht. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass die exprimierten, verkürzten Proteine hyperaktiv sind, z. B. durch eine fehlende regulatorische Untereinheit. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch die anderen auf den Genbankplasmiden kodierten Proteine

einen Einfluss auf die Aktivität des unbekanntes Glukosetransporters ausüben. Aufgrund ihrer Strukturvorhersage kann jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit keines der identifizierten Proteine direkt einen Glukosetransport über die Plasmamembran vermitteln.



**Abb. 46: Transkriptionelles Regulationsmodell des unbekanntes Glukosetransporters.** Snf3 wirkt möglicherweise hemmend auf den Snf1-Kinase-Komplex, den SKP<sup>Grr1</sup>-Komplex, Std1 und/oder Mth1. Diese Proteine sind an der Aktivierung der Expression des unbekanntes Glukosetransporters beteiligt, indem sie eine direkte Aktivierung oder aber durch eine Aktivierung eines Aktivators oder Repression eines Repressors die Expression bewirken.

Ein mögliches Modell für eine transkriptionelle Regulation des unbekanntes Glukosetransporters ist in Abb. 46 dargestellt. Snf3 könnte eine reprimierende Funktion auf die Aktivität der Proteine Sip2, Skp1, Mth1 und/oder Std1 ausüben. Diese Proteine wirken auf unbekanntes Weise zusammen und aktivieren entweder die Expression des unbekanntes Glukosetransporters direkt oder indirekt durch Aktivierung eines Aktivators oder Repression eines Repressors. Die Repressorproteine Mig1, Rgt1 und Sko1 sind jedoch nicht wesentlich an einer solchen möglichen Hemmung beteiligt, da eine *MIG1*-, *RGT1*- und *SKO1*-Deletion den Wachstumsdefekt des *hxt*-Stamms nicht aufhebt (3.23.1, 3.23.2).

Gegen ein solches transkriptionelles Regulationsmodell spricht jedoch, dass durch eine Genom-weite transkriptionelle Analyse kein Gen identifiziert werden konnte, das in dem *hxt*  $\Delta$ *snf3*-Stamm deutlich höher exprimiert wird als in dem *hxt*-Stamm (3.24). Dies könnte auch auf die gewählten Versuchsbedingungen zurückzuführen sein. Da die Möglichkeit besteht, dass der unbekanntes Glukosetransporter nur in Gegenwart von Glukose induziert wird, sollte der *hxt*  $\Delta$ *snf3*-Stamm in Gegenwart von Glukose angezogen werden. Der *hxt*-Stamm kann jedoch keine Glukose aufnehmen und wurde daher mit dem Plasmid p426MET25HXT11 transformiert. Um möglichst vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurde aber nicht nur der *hxt*-Stamm, sondern auch der *hxt*  $\Delta$ *snf3*-Stamm mit diesem Plasmid versehen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der Glukosetransporter einer genau entgegengesetzten Regulation unterliegt. So ist auch vorstellbar, dass der unbekanntes Glukosetransporter nur induziert wird, wenn absolut keine Glukose-aufnahme in die Zelle stattfindet.

Unter dieser Annahme, könnte die Hxt11-vermittelte Glukoseaufnahme in die Zelle dafür verantwortlich sein, dass der unbekannte Glukosetransporter nicht induziert wird. Folglich kann der Transporter unter diesen Umständen auch nicht mittels „Microarrays“ identifiziert werden. Der transkriptionellen Analyse mittels DNA-„Microarrays“ sind überdies auch methodische Grenzen gesetzt. So ist u. a. die Anzahl der repräsentierten Gene auf den Genfiltern unvollständig; es fehlen ca. 100 ORFs. Ferner könnte die Sensitivität des Systems zu gering sein, falls das entsprechende Gen nur sehr schwach exprimiert wird.

Da auf allen isolierten Genbankplasmiden Gene identifiziert wurden, die an der transkriptionellen Regulation der *HXT*-Gene beteiligt sind und auch aufgrund der postulierten Aktivierung des Transporters durch eine Veränderung der Chromatinstruktur des Chromosoms IV, war es naheliegend, für den unbekanntes Glukosetransporters eine transkriptionelle Regulation zu favorisieren. Es ist aber auch möglich, dass der Glukosetransporter posttranskriptionell reguliert wird. So ist z. B. eine Regulation des Transporters durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen vorstellbar. Die Proteine Snf3, aber auch Std1 und Mth1, sind an der Plasmamembran lokalisiert und kommen als mögliche Interaktionspartner in Frage. Bereits 1993 postulierten Wendell und Bisson, dass Snf3 an einer posttranskriptionellen Aktivierung von Hxt2 und möglicherweise auch anderen Hexosetransportproteinen beteiligt ist. Sie beobachteten, dass in Anwesenheit niedriger Glukosekonzentrationen *snf3*-Mutanten hohe Mengen Hxt2-Protein aufweisen, jedoch keine Hxt2-vermittelte Transportaktivität. Snf3 könnte auch an einer posttranskriptionellen Regulation des unbekanntes Glukosetransporters beteiligt sein. Jedoch müsste Snf3, anders als bei Hxt2, keine aktivierende, sondern eine hemmende Funktion ausüben.

#### **4.4.2 Möglicherweise kann der Transporter Glukose exportieren**

Der *hxt*  $\Delta$ *snf3*-Stamm ist trotz seiner Fähigkeit Glukose aufzunehmen und zu verwerten gegen das toxische Glukoseanalogon 2-DOG resistent (3.21). Ein analoges Phänomen beobachteten Marini et al. (2000) bei der Expression menschlicher Erythrozyten-Proteine in Hefe. Die Proteine RhAG und RhGK konnten einerseits den Wachstumsdefekt eines Hefestamms, der in seinen endogenen Ammoniumtransportgenen deletiert war, auf Ammonium-haltigen Medium aufheben. Andererseits wies der Stamm eine erhöhte Resistenz gegen das toxische Ammoniumanalogon Methylammonium auf. Die Autoren zeigten, dass diese Resistenz auf einen Ammoniumexport zurückzuführen war. Möglicherweise ist die 2-DOG-Resistenz des *hxt*  $\Delta$ *snf3*-Stamms schlicht auf die Spezifität des Transporters zurückzuführen. Dies erscheint jedoch insofern unwahrschein-

lich, da der Transporter ansonsten das gleiche Substratspektrum aufweist wie die Hexosetransporter: so kann er ebenfalls Fruktose, Mannose und Saccharose transportieren (Wieczorke et al., 1999). In Analogie zu den Befunden von Marini et al. (2000) ist es vorstellbar, dass es sich bei dem gesuchten Protein um einen Transporter mit Glukoseexportfunktion handelt. Physiologisch könnte ein solcher Glukoseexporter durchaus sinnvoll sein, da er z. B. bei einer starken „Feedback“-Hemmung der Hexosetransporter einen Glukoseexport vermitteln könnte.

#### 4.4.3 *Ena1* als putativer Glukosetransporter

Da sowohl der unbekannte Glukosetransporter und auch der  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ -Transporter *Ena1* durch die Proteine *Snf3*, *Mth1*, *Std1* und *Snf1* (*Sip2*) reguliert werden (3.22, Ganster et al., 1998), wurde untersucht, ob *ENA1* den gesuchten Glukosetransporter kodiert. Auch einige weitere Anhaltspunkte lassen vermuten, dass es sich bei *Ena1* um den gesuchten Transporter handeln könnte. Da nur durch Re-Integration des *HXT7*-Promotorfragments an seinem ursprünglichen Locus auf Chromosom IV der Wachstumsdefekt des *hxf*-Stamms supprimiert werden konnte, ließ dies vermuten, dass der Glukosetransporter durch eine Veränderung der Chromatinstruktur induziert wird (3.20.1). Somit muss der Glukosetransporter auf Chromosom IV lokalisiert sein. Dies trifft für *ENA1* zu. Ferner können Kationen- und Glukosetransporter strukturell sehr ähnlich zu sein. So wurden die Hexosetransporter *Hxt1* und *Hxt3* ursprünglich als mutierte Allele isoliert, die einen  $\text{K}^+$ -Aufnahmedefekt von Zellen supprimieren konnten (Ko et al., 1993). Überdies werden einige Hexosetransporter wie *HXT1* und *HXT5* ebenso wie *ENA1* durch Osmostress induziert (Hirayama et al., 1995).

Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, ob *Ena1* den Glukosetransport des *hxf*  $\Delta$ *snf3*-Stamms vermittelt, da eine Deletion des *ENA*-Genclusters nicht erfolgreich war (3.23.2). Durch eine Deletion der Gene *Hal1* und *Sko1*, die an der Regulation von *Ena1* beteiligt sind, konnte kein Einfluss von *Ena1* auf den Glukosetransport nachgewiesen werden (3.23.2). Ganster et al. (1998) zeigten, dass in einer  $\Delta$ *snf3*-Mutante die  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Li}^+$ -Resistenz des Stammes durch die Induktion von *ENA1* erhöht ist. Jedoch konnte auf Maltosemedium mit Natriumkonzentrationen zwischen 0,6-2 M keine Unterschiede zwischen dem Wachstum des *hxf*  $\Delta$ *snf3*-Stamms und des *hxf*-Stamm beobachtet werden (ohne Abb.). Jedoch schließen solche Beobachtungen die Beteiligung von *Ena1* nicht gänzlich aus, da möglicherweise der Transporter z. B. nur in Anwesenheit von Glukose induziert wird oder die verschiedenen Regulationswege redundant sind. Vielleicht kann durch Überexpression von *ENA1* gezeigt werden, ob *Ena1* in dem *hxf*-Stamm Glukosetransport vermitteln kann.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Hefeindustrie hat weltweit eine sehr große ökonomische Bedeutung. Während industrieller Großproduktionen von z. B. Wein, Bier oder auch Backhefe kommt es jedoch immer wieder zu Hungerstadien, die die Produktionseffizienz und Produktqualität beeinflussen. So führen z. B. Stickstoffhungerbedingungen zu einer Abnahme der Fermentationskapazität der Hefezellen, die vermutlich auf eine Inaktivierung der Zuckeraufnahmesysteme zurückzuführen ist. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit im Rahmen eines EU-geförderten Projektes die Regulation der Inaktivierung der Hexosetransporter von *S. cerevisiae* unter Hungerbedingungen untersucht werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die hoch-affinen Hexosetransporter Hxt6 und Hxt7 aber auch der niedrig-affine Hexosetransporter Hxt1 nach Zugabe einer fermentierbaren Kohlenstoffquelle bei gleichzeitigem Stickstoffhunger durch einen selektiven Abbau inaktiviert werden. Durch Untersuchung der Proteinstabilität in verschiedenen Hefemutanten und durch intrazelluläre Lokalisierungsstudien stellte sich heraus, dass Hxt6/Hxt7 nach einer Ubiquitinierung mittels Endozytose internalisiert werden. Die Proteine werden zur Vakuole geliefert und dort abgebaut. Das Proteasom ist an dem Abbau von Hxt6/Hxt7 nicht beteiligt. Erstmals konnte in Hefe gezeigt werden, dass Proteine, die normalerweise an der Autophagozytose von zytoplasmatischen Komponenten beteiligt sind, auch an einem selektiven Abbau von Plasmamembranproteinen mitwirken.

Ein wesentliches biotechnologisches Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion eines Hexosetransporters, der auch unter Inaktivierungsbedingungen stabil, aktiv und in der Plasmamembran lokalisiert bleibt. Mit Hilfe von *in vitro*-Mutagenese und gezielten Deletionsanalysen wurden verschiedene putative Internalisierungsmotive von Hxt7 geändert. Durch eine Deletion einer PEST-ähnlichen Region im N-Terminus des Hxt7-Proteins konnte ein funktioneller und deutlich stabilisierter Transporter hergestellt werden. Obwohl in Hefezellen, die diesen stabilisierten Hexosetransporter exprimierten, die Glukosetransportaktivität unter Inaktivierungsbedingungen deutlich erhöht war, konnte jedoch die Glukoseverbrauchsrate und auch die Fermentationskapazität nicht gesteigert werden. Dieses wurde auf eine regulatorische Wechselwirkung der Hexosetransporter mit Stoffwechselmetaboliten zurückgeführt, die generell eine Erhöhung der Fermentationskapazität von Hefen durch Überexpression von Hexosetransportern fraglich erscheinen lässt.

Ein weiterer Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung eines noch unbekanntem Glukosetransporters in *S. cerevisiae*. Dieser Transporter kann durch eine Deletion des Glukosesensors Snf3 oder durch Überexpression verschiedener Signalproteine wie Mth1 oder Std1 aktiviert werden. Jedoch konnte das entsprechende Gen weder durch genetische „Screening“-Verfahren noch durch eine Genom-weite „Microarray“-Analyse identifiziert werden. Es wird diskutiert, dass der unbekanntem Glukosetransporter entweder auf posttranskriptioneller Ebene reguliert oder nur sehr schwach exprimiert wird.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Alepuz, P. M., K. W. Cunningham und F. Estruch (1997) Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated *ENA1* gene. *Mol. Microbiol.* 26, 91-98
- Alonso, A. und A. Kotyk (1977) Apparent half-lives of sugar transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiol.* 23, 118-125
- Alpin, A., T. Jasionowski, D. L. Tuttle, S. E. Lenk und W. A. Dunn (1992) Cytoskeletal elements are required for the formation and maturation of autophagic vacuoles. *J. Cell Physiol.*, 152, 458-466
- Azam, F. und A. Kotyk (1969) Glucose 6-phosphate as regulator of monosaccharide transport in baker's yeast. *FEBS Lett.* 2; 333-335
- Baba, M., M. Osumi, S. V. Scott, D. J. Klionsky und Y. Ohsumi (1997) Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome. *J. Cell Biol.* 139, 1687-1695
- Babst, M., T. K. Sato, L. M. Banta und S. D. Emr (1997) Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4. *EMBO J.* 16, 1820-1831
- Barbet, N. C., U. Schneider, S. B. Helliwell, I. Stansfield, M. F. Tuite und M. N. Hall (1996) TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol. Biol. Cell.* 7, 25-42
- Barnett, J. A. (1981) The utilization of disaccharides and some other sugars by yeasts. *Adv. Carbohyd. Chem.* 39, 347-404
- Beck, T., A. Schmidt und M. N. Hall (1999) Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J. Cell. Biol.* 146, 1227-1237
- Becker, J. U. und A. Betz (1972) Membrane transport as controlling pacemaker of glycolysis in *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochim. Biophys Acta* 274, 584-597
- Becker, J. (1999) Molekulargenetische Untersuchungen zum Glukosetransport der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* unter Hungerbedingungen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Biely, P., Z. Kratky und S. Bauer (1972) Metabolism of 2-deoxy-D-glucose by baker's yeast. IV. Incorporation of 2-deoxy-D-glucose into cell wall mannan. *Biochim. Biophys. Acta* 255, 631-639
- Birnboim, H. C. und J. Doly (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids. Res.* 7, 1513-1523
- Bisson, L. F. und D. G. Fraenkel (1983) Involvement of kinases in glucose and fructose uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1730-1734
- Bisson, L. F. und D. G. Fraenkel (1984) Expression of kinase-dependent glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 159, 1013-1017
- Bisson, L. F. (1988) High-affinity glucose transport is under general glucose repression control. *J. Bacteriol.* 170, 4838-4845
- Bisson, L. F., D. M. Coons, A. L. Kruckeberg und D. A. Lewis (1993) Yeast sugar transporters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28, 259-308
- Boles, E. und T. Miosga (1995) A rapid and highly efficient method for PCR-based site-directed mutagenesis using only one new primer. *Curr. Genet.* 28, 197-198



- Boles, E. und C. P. Hollenberg (1997) The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 85-111
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- Brondijk, T. H. C., M. E. van der Rest, D. Pluim, Y. de Vries, K. Stingl, B. Poolman und W. N. Konings (1998) Catabolite inactivation of wild-type and mutant maltose transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 15352-15357
- Busturia, A. und R. Lagunas (1986) Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 132, 379-385
- Cagniard-Latour, C. (1838). Mémoire sur la fermentation vineuse. *Ann. Chim. Phys.* 68, 206-222
- Cereghino, G. P. und I. E. Scheffler (1996) Genetic analysis of glucose regulation in *Saccharomyces cerevisiae*: control of transcription versus m RNA turnover. *EMBO J.* 15, 363-374
- Chalfie, M. (1995) Green fluorescent protein. *Photochem. Photobiol* 62, 651-656)
- Ciechanover, A. (1994) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 79, 13-21
- Ciriacy, M. und E. Reifengerger (1997) Hexose transport, in *Yeast sugar metabolism* (Zimmermann, F. K. und K.-D. Entian, eds) Technomic Publishing Co, Lancaster PA
- Coons, D. M., P. Vagnoli und L. F. Bisson (1997) The C-terminal domain of Snf3p is sufficient to complement the growth defect of *snf3* null mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: *SNF3* functions in glucose recognition. *Yeast* 13, 9-20
- Davis, N. G., J. L. Horecka und G. F. Sprague (1993) *Cis*- and *trans*-acting functions required for endocytosis of the yeast pheromone receptors. *J. Cell Biol.* 122, 53-65
- DeVit, M., J. A. Waddle und M. Johnston (1997) Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol. Biol. Cell.* 8, 1603-1618
- De Winde, J. H., M. Crauwels, S. Hohmann, J. M. Thevelein und J. Winderickx (1996) Differential requirement of the yeast sugar kinases for sugar sensing in establishing the catabolite-repressed state. *Eur. J. Biochem.* 241, 633-643
- Dohmen, R. J., A. W. M. Strasser, C. B. Höner und C. P. Hollenberg (1991) An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* 7, 691-692
- Dunn, R. und L. Hicke (2001) Domains of the Rsp5 ubiquitin-protein ligase required for receptor mediated and fluid-phase endocytosis. *Mol. Biol. Cell.* 12, 421-435
- Egner, R. und K. Kuchler (1996) The yeast multidrug transporter Pdr5 of the plasma membrane is ubiquitinated prior to endocytosis and degradation in the vacuole. *FEBS Lett.* 378, 177-181
- Entian, K.-D. und H.-J. Schüller (1997) Glucose repression (carbon catabolite repression) in yeast, in *Yeast sugar metabolism* (F. K. Zimmermann und K.-D. Entian, eds) Technomic Publishing Co, Lancaster PA
- Estrada, E., P. Agostinis, J. R. Vandenheede, J. Goris, W. Merlevede, J. Francois, A. Goffeau und M. Ghislain (1996) Phosphorylation of yeast plasma membrane H<sup>+</sup>ATPase by casein kinase I. *J. Biol. Chem.* 271, 32064-72
- Estruch, F. M. A. Treitel, X. Yang und M. Carlson (1992) N-terminal mutations modulate yeast *SNF1* protein kinase function. *Genetics* 132, 639-650

- Flick, J. S. und M. Johnston (1991) *GRR1* of *Saccharomyces cerevisiae* is required for glucose repression and encodes a protein with leucine-rich repeats. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5101-5112
- Galan, J. M., V. Moreau, B. André, C. Volland und R. Haguenauer-Tsapis (1996) Ubiquitination mediated by the Npi1/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *J. Biol. Chem.* 271, 10946-10952
- Galan, J.-M. und R. Haguenauer-Tsapis (1997) Ubiquitin Lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J.* 16, 5847-5854
- Galazzo, J. L. und J. E. Bailey (1990) Fermentation pathway kinetics and metabolic flux control in suspended and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme microb. Technol.* 12, 162-172
- Gammie, A. E., L. J. Kurihara, R. B. Vallee und M. D. Rose (1995) *DNM1*, a dynamin-related gene, participates in endosomal trafficking in yeast. *J. Cell. Biol.* 130, 553-566
- Gancedo, C. und R. Serrano (1989) Energy-yielding metabolism, in *The yeasts. Metabolism and physiology of yeasts.* (A. H. Rose und J. S. Harrison, eds) Academic Press, New York
- Gancedo, J. M. (1992) Carbon catabolite repression in yeast. *Eur. J Biochem.* 206, 297-313
- Gancedo, J. M. und C. Gancedo (1997) Gluconeogenesis and catabolite inactivation, in *Yeast sugar metabolism* (Zimmermann, F. K. und K.-D. Entian, eds) Technomic Publishing Co, Lancaster PA
- Ganster, R. W., R. R. McCartney und M. C. Schmidt (1998) Identification of a calcineurin-independent pathway required for sodium ion stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150, 31-42
- Gietz, R. D. und A. Sugino (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 527-534
- Gietz, R. D. und R. A. Woods (1994) High efficiency transformation in yeast. (Invited Book Chapter) in *Molecular genetics of yeast. Practical approaches*, eds. J. A. Johnston, Oxford University Press, 121-134
- Gordon, P. B. und P. O. Seglen (1988) Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151, 40-47
- Gordon, P. B., H. Hoyvik und P. O. Seglen (1992) Prelysosomal and lysosomal connections between autophagy and endocytosis. *Biochem. J.* 15, 361-369
- Güldener, U., S. Heck, T. Fiedler, J. Beinbauer und J. H. Hegemann (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research* 24, 2519-2524
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: *DNA-Cloning I*, edited by Glover, D. M., Oxford, IRL Press, S. 109-135
- Harding, T. M., A. Hefner-Gravink, M. Thumm und D. J. Klionsky (1996) Genetic and phenotypic overlap between autophagy and the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 17621-17624
- Hardwick, J. S., F. G. Kuruvilla, J. K. Tong, A. F. Sjamji und S. L. Schreiber (1999) Rapamycin-modulated transcription defines the subset of nutrient-sensitive signaling pathways directly controlled by the Tor proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14866-14870

- Heilker, R., M. Spiess und P. Crottet (1999) Recognition of sorting signals by clathrin adaptors. *Bioessays* 21, 558-567
- Hein, C., J.-Y. Springael, C. Volland, R. Haguenaer-Tsapis und B. André (1995) *NP11*, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin-protein ligase. *Mol. Microbiol.* 18, 77-87
- Hein, C. und B. André (1997) A C-terminal di-leucine motif and nearby sequences are required for  $\text{NH}_4^+$ -induced inactivation and degradation of the general amino acid permease, Gap1p, of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 24, 607-616
- Heinemeyer, W., J. A. Kleinschmidt, J. Saidowsky, C. Escher und D. H. Wolf (1991) Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic-multifunctional proteinase: mutants unravel its function in stress induced proteolysis and uncover its necessity of cell survival. *EMBO J.* 10, 555-562
- Heinemeyer, W., A. Gruhler, V. Mohrle, Y. Mahe und D. H. Wolf (1993) *PRE2*, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked *RING10* gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 5115-5120
- Heitman, J., N. R. Movva und M. N. Hall (1991) Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905-909
- Helliwell, S. B., P. Wagner, J. Kunz, M. Deuter-Reinhard, R. Henriquez und M. N. Hall (1994) *TOR1* and *TOR2* are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol. Biol. Cell* 5, 105-118.
- Hicke, L. und H. Riezman (1996) Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* 84, 277-287
- Hicke, L. (1997) Ubiquitin-dependent internalization and down-regulation of plasma membrane proteins. *FASEB J.* 11, 1215-1226
- Hicke, L., B. Zanolari, M. Pypaert, J. Rohrer und H. Riezman (1997) Transport through the yeast endocytic pathway occurs through morphologically distinct compartments and requires an active secretory pathway and Sec18p/N-Ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Mol. Biol. Cell.* 8, 13-31
- Hicke, L., B. Zanolari und H. Riezman (1998) Cytoplasmic tail phosphorylation of the  $\alpha$ -factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *J. Cell. Biol.* 141, 349-358
- Hilt, W. und D. H. Wolf (1992) Stress-induced proteolysis in yeast. *Mol. Microbiol.* 6, 2437-2442
- Hirayama, T., T. Maeda, H. Saito und K. Shinozaki (1995) Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-response (*HOR*) genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 249, 127-138
- Hochstrasser, M. (1995) Ubiquitin, proteasomes, and the regulation of intracellular protein degradation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 7, 215-223
- Hochstrasser, M. (1996) Protein degradation or regulation: ub the judge. *Cell* 84, 813-815
- Holzer, H. (1976) Catabolite inactivation in yeast. *Trends in Biochem. Sci.* 1, 178-181
- Horak, J. und D. H. Wolf (1997) Catabolite inactivation of the galactose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: ubiquitination, endocytosis, and degradation in the vacuole. *J. Bacteriol.* 179, 1541-1549

- Hou, D., C. Cenciarelli, J. P. Jensen, H. B. Nguyen, A. M. Weissman (1994) Activation-dependent ubiquitination of a T cell antigen receptor subunit on multiple intracellular lysines. *J. Biol. Chem.* 269, 14244-14247
- Huang, W. P., S. V. Scott, J. Kim und D. J. Klionsky (2000) The itinerary of a vesicle component, Aut7p/Cvt5p, terminates in the yeast vacuole via the autophagy/cvt pathways. *J. Biol. Chem.* 275, 5845-5851
- Hubbard, E. J. A., R. Jiang und M. Carlson (1994) Dosage-dependent modulation of glucose repression by *MSN3 (STD1)* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1972-1978
- Ichimura, Y., T. Kirisako, T. Takao, Y. Satomi, Y. Shimonishi, N. Ishihara, N. Mizushima, I. Tanida, E. Kominami, M. Ohsumi, T. Noda und Y. Ohsumi (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408, 488-492
- Jiang, H., I. Medintz und C. A. Michels (1997) Two glucose sensing/signaling pathways stimulate glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces*. *Mol Biol. Cell*, 8, 1293-1304
- Jiang, H., I. Medintz, B. Zhang und C. A. Michels (2000) Metabolic signals trigger glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces*. *J. Bact.* 182 (3), 647-654
- Jiang, R. und M. Carlson (1996) Glucose regulates protein interactions within the yeast *SNF1* protein kinase complex. *Genes Dev.* 10, 3105-3111
- Jiang, R. und M. Carlson (1997) The *Snf1* protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2099-2106
- Jones, E., G. S. Zubenko und R. Parker (1982) *PEP4* gene function is required for expression of several vacuole hydrolases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 102, 665-677
- Kamada, Y., T. Funakoshi, T. Shintani, K. Nagano, M. Ohsumi und Y. Ohsumi (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J. Cell Biol.* 150, 1507-1513
- Kim, J., W. P. Huang und D. J. Klionsky (2001) Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex. *J. Cell Biol.* 152, 51-64
- Kirisako, T., M. Baba, N. Ishihara, K. Miyazawa, M. Ohsumi, T. Yoshimori, T. Noda und Y. Ohsumi (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7 in yeast. *J. Cell. Biol.* 147, 435-446
- Kirisako, T., Y. Ichimura, H. Okada, Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Yoshimori, M. Ohsumi, T. Takao, T. Noda und Y. Ohsumi (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.* 151, 263-276
- Klebe, R. J., J. V. Harries, Z. D. Sharp und M. G. Douglas (1983) A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* 25, 333-341
- Knop, M., H. H. Schiffer, S. Rupp und D. H. Wolf (1993) Vacuolar/lysosomal proteolysis: proteases, substrates, mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5, 990-996
- Ko, C. H., H. Liang und R. F. Gaber (1993) Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 13, 638-648

- Kölling, R. und C. P. Hollenberg (1994) The ABC-transporter Ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J.* 13, 3261-3271
- Kölling, R. und S. Losko (1997) The linker region of the ABC-transporter Ste6 mediates ubiquitination and fast turnover of the protein. *EMBO J.* 16, 2251-2261
- Kornitzer, D., B. Raboy, R. G. Kulka und G. R. Fink (1994) Regulated degradation of the transcription factor Gcn4. *EMBO J.* 13, 6021-6030
- Kotyk, A.. (1967) Properties of the sugar carrier in baker's yeast. II. Specificity of transport. *Folia Microbiol.* 12, 121-131
- Krampe, S., O. Stamm, R. Wieczorke und E. Boles (1998) Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS Lett.* 441, 343-347
- Kranz, A. (2000) Identifizierung von Protein-Transport-Faktoren in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Kruckeberg, A. L. (1996) The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 166, 283-292
- Kruckeberg, A. L., L. Ye, J. A. Berden und K. Van Dam (1999) Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. *Biochem. J.* 339, 299-307
- Kunz, J., R. Henriquez, U. Schneider, M. Deuter-Reinhard, N. R. Movva und M. N. Hall (1993) Target of rapamycin in yeast, *TOR2*, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* 73, 585-596
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- Lafuente, M. J., C. Gancedo, J. C. Jauniaux und J. M. Gancedo (2000) Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 und Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 35, 161-172
- Lagunas, R., C. Dominguez, A. Busturia und M. J. Sáez (1982) Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems. *J. Bacteriol.* 152, 19-25
- Lagunas, R. (1986) Misconceptions about the energy metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 2, 221-228
- Lang, T., E. Schaeffeler, D. Bernreuther, M Bredschneider, D, H. Wolf und M. Thumm (1998) Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO J.* 17, 3597-3607
- Lashkari, D. A., J. L. DeRisi, J. H. McCusker, A. F. Namath, C. Gentile, S. Y. Hwang, P. O. Brown und R. W. Davis (1997) Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13057-13062
- Liang, H. und R. F. Gaber (1996) A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of *HXT6*. *Mol. Biol. Cell* 7, 1953-1966
- Liou, W., J. H. Geuze, M. H. H. Geelen und H. W. Slot (1997) The autophagic and endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles. *J. Cell Biol.* 136, 61-70
- Loayza, D. und S. Michaelis (1998) Role for the ubiquitin-proteasome system in the vacuolar degradation of Ste6p, the a-factor transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 18, 779-789

- Lucero, P., M. Herweijer und R. Lagunas (1993) Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter is due to proteolysis. *FEBS Lett.* 333, 165-168
- Lucero, P. und R. Lagunas (1997) Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter requires ubiquitin-ligase Npi1/Rsp5 and ubiquitin-hydrolase Npi2/Doa4. *FEMS Microbiol. Lett.* 147, 273-277
- Lucero, P., É. Peñalver, E. Moreno und R. Lagunas (1997) Moderate concentrations of ethanol inhibit endocytosis of the yeast maltose transporter. *Appl and Environm. Microbiol* 63, 3831-3836
- Lucero, P., É. Peñalver, L. Vela und R. Lagunas (2000) Monoubiquitination is sufficient to signal internalization of the maltose transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.* 102, 241-243
- Lucocq, J. und D. Walker (1997) Evidence for fusion between multilamellar endosomes and autophagosomes in HeLa cells. *Eur. J. Cell Biol.* 72, 307-313.
- Ludin, K., R. Jiang und M. Carlson (1998) Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 6245-6250
- Lutfiyya, L. L., V. R. Iyer, J. DeRisi, M. J. DeVit, P. O. Brown und M. Johnston (1998) Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150, 1377-1391.
- Maniatis, T., E. F. Fritsch und J. Sambrook (1982) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Marchal, C., R. Haguenaer-Tsapis und D. Urban-Grimal (1998) A PEST-like sequence mediates phosphorylation and efficient ubiquitination of yeast uracil permease. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 314-321
- Marchal, C., R. Haguenaer-Tsapis und D. Urban-Grimal (2000) Casein kinase I-dependent phosphorylation within a PEST sequence and ubiquitination at nearby lysines signal endocytosis of yeast uracil permease. *J. Biol. Chem.* 275, 23608-23614
- Marini, A.-M., G. Matassi, V. Raynal., B. André, J.-P. Cartron und B. Chérif-Zahar (2000) The human Rhesus-associated RhAG protein and a kidney homologue promote ammonium transport in yeast. *Nature Gen.* 26, 341-344
- Márquez, J. A. und R. Serrano (1996) Multiple transduction pathways regulate the sodium extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett.* 382, 89-92
- Matern, H. und H. Holzer (1977) Catabolite inactivation of the galactose transport system in yeast. *J. Biol. Chem.* 252, 6399-6402
- Matsuura, A., M. Tsukada, Y. Wada und Y. Ohsumi (1997) Apg1, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 192, 245-50
- Mauricio, J. C. und J. M. Salmon (1992) Apparent loss of sugar transport activity in *Saccharomyces cerevisiae* may mainly account for maximum ethanol production during alcoholic fermentation. *Lett.* 14, 5777
- Medintz, I., H. Jiang, E.-K. Han, W. Cui und C. A. Michels (1996) Characterization of the glucose-induced inactivation of maltose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 178, 2245-2254

- Medintz, I., H. Jiang und C. A. Michels (1998) The role of ubiquitin conjugation in glucose-induced proteolysis of *Saccharomyces* maltose permease. *J. Bact. Chem.* 273 (51), 34454-34462
- Medintz, I., X. Wang, T. Hradek und C. A. Michels (2000) A PEST-like sequence in the N-terminal cytoplasmic domain of *Saccharomyces* maltose permease is required for glucose-induced proteolysis and rapid inactivation of transport activity. *Biochemistry* 39, 4518-4526
- Meijer, M. M., J. Boonstr, A. J. Verkleij und C. T. Verrips (1998) Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is related to the glucose concentration rather than the glucose flux. *J. Biol. Chem.* 273, 24102-24107
- Mueckler, M., L. Caruso, S. A. Baldwin, M. Panico, I. Blench, H. R. Morris, W. J. Allard, G. E. Lienhard und H. F. Lodish (1985) Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229, 941-945
- Mulholland, J., D. Preuss, A. Moon, A. Wong, D. Drubin und D. Botstein (1994) Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J. Cell. Biol.* 125, 381-391
- Mulholland, J., J. Konopka, B. Singer-Krüger, M. Zerial und D. Botstein (1999) Visualization of receptor-mediated endocytosis in yeast. *Mol. Biol. Cell* 10, 799-817
- Munn, A. L. und H. Riezman (1994) Endocytosis is required for the growth of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase defective yeast: identification of six new *END* genes. *J. Cell Biol.* 127, 373-386
- Munn, A. L., B. J. Stevenson, M. I. Geli und H. Riezman (1995) *end5*, *end6*, and *end7*: mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 6, 1721-1742
- Munn, A. L., A. Heese-Peck, B. J. Stevenson, H. Pichler und H. Riezman (1999) Specific sterols required for the internalization step of endocytosis in yeast. *Mol. Biol. Cell* 10, 3943-3957
- Munn, A. L. (2000) The yeast endocytic membrane transport system. *Microscopy Res. Tech.* 51, 547-562
- Noda, T. und Y. Ohsumi (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* 273, 3963-3966
- Nourani, A., M. Wésolowski-Louvel, T. Delaveau, C. Jacq und A. Delahodde (1997) Multiple drug resistance phenomenon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of two hexose transporters. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5453-5460.
- Novick, P. und D. Botstein (1985) Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants. *Cell* 40, 405-416
- Ooi, C. E., E. Rabinovich, A. Dancis, J. S. Bonifacino und R. D. Klausner (1996) Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *EMBO J.* 15, 3515-3523
- Özcan, S. und M. Johnston (1995) Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (*HXT*) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1564-1572
- Özcan, S. und M. Johnston (1996) Two different repressors collaborate to restrict expression of the yeast glucose transporter genes *HXT2* and *HXT4* to low levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* 16, 5536-5545

- Özcan, S., J. Dover, A. G. Rosenwald, S. Wöfl und M. Johnston (1996a) Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:12428-12432
- Özcan, S., R. Leong und M. Johnston (1996b) Rgt1 of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. Mol. Cell. Biol. 16, 6419-6426
- Papa, F. R. und M. Hochstrasser (1993) The yeast *DOA4* gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human *tre-2* oncogene. Nature 366, 313-319
- Peñalver, É., P. Lucero, E. Moreno und R. Lagunas (1999) Clathrin and two components of the COPII Complex, Sec23p and Sec24p, could be involved in endocytosis of the *Saccharomyces cerevisiae* maltose transporter. J. Bacteriol. 181 (8), 2555-2563
- Piper, R. C., A. A. Cooper, H. Yang und T. H. Stevens (1995) *VPS27* controls vacuolar and endocytic traffic through a prevacuolar compartment in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell. Biol. 131, 603-617
- Powers, T. und P. Walter (1999) Regulation of ribosome biogenesis by the rapamycin-sensitive TOR-signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell. 10, 987-1000
- Prescianotto-Baschong, C. und H. Riezman (1998) Morphology of the yeast endocytic pathway. Mol. Biol. Cell 9, 173-189
- Proft, M. und R. Serrano (1999) Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1 confers HOG-dependent osmotic regulation. Mol Cell. Biol. 19, 537-546
- Punnonen, E.-L., S. Autio, H. Kaija und H. Reunanen (1993) Autophagic vacuoles fuse with the prelysosomal compartment in cultured rat fibroblasts. Eur. J. Cell Biol., 61, 54-66.
- Ramos, J., K. Szkutnicka und V. P. Cirillo (1988) Relationship between low- and high-affinity glucose transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 170, 5375-5377
- Raths, S., J. Rohrer, F. Crausaz und H. Riezman (1993) *end3* and *end4*: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Cell Biol. 120, 55-65
- Rechsteiner, M. und S. W. Rogers (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. Trends Biochem. Sci. 21, 267-271
- Reifenberger, E. (1995) Genetische und physiologische Untersuchungen zum Hexosetransport in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Reifenberger, E., K. Freidel und M. Ciriacy (1995) Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. Mol. Microbiol. 16, 157-167
- Reifenberger, E., E. Boles und M. Ciriacy (1997) Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. Eur. J. Biochem. 245, 324-333
- Rep, M., M. Krantz, J. M. Thevelein und S. Hohmann (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. J. Bacteriol. Chem. 275, 8290-8300
- Riballo, E., M. J. Mazón und R. Lagunas (1994) cAMP-dependent protein kinase is not involved in catabolite inactivation of the transport of sugars in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta 1192, 143-146



- Riballo, E. und R. Lagunas (1994) Involvement of endocytosis in catabolite inactivation of the K<sup>+</sup> and glucose transport systems in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Lett. 121, 77-80
- Riballo, E., M. Herweijer, D. H. Wolf und R. Lagunas (1995) Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. J. Bacteriol. 177, 5622-5627
- Rieder, S. E. und S. D. Emr (1997) A novel RING finger protein complex essential for a late step in protein transport to the yeast vacuole. Mol. Biol. Cell 8, 2307-2327
- Rohrer, J., H. Bénédicti, B. Zanolari und H. Riezman (1993) Identification of a novel sequence mediating regulated endocytosis of the G protein-coupled  $\alpha$ -pheromone receptor in yeast. Mol. Biol. Cell. 4, 511-524
- Roth, A. F., D. M. Sullivan und N. G. Davis (1998) A large PEST-like sequence directs the ubiquitination, endocytosis, and vacuolar degradation of the yeast a-factor receptor. J. Cell Biol. 4, 949-961
- Roth, A. F. und N. G. Davis (2000) Ubiquitination of the PEST-like endocytosis signal of the yeast a-factor receptor. J. Biol. Chem. 275, 8143-8153
- Rotin, D., O. Staub und R. Haguenauer-Tsapis (2000) Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. J. Membrane Biol. 176, 1-17
- Salmon, J. M. (1989) Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 55, 953
- Salmon, J. M. und O. Vincent. (1993) Sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor during enological fermentations. Am. J. Enol. Vitic. 44, 56-64
- Sanger, F., S. Nicklen und A. R. Coulson (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467
- Schaaff, I., J. Heinisch und F. K. Zimmermann (1989) Overproduction of glycolytic enzymes in yeast. Yeast 5, 285-290
- Schimmöller, F. und H. Riezman (1993) Involvement of Ypt7, a small GTPase, in traffic from late endosome to the vacuole in yeast. J. Cell Sci. 106, 823-830
- Schmidt, A., T. Beck, A. Koller, J. Kunz und M. N. Hall (1998) The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates *NPR1* and inhibits turnover of the tryptophan permease. EMBO J. 17, 6924-6931
- Schmidt, M. C., R. R. McCartney., X. Zhang, T. S. Tillman, H. Solimeo, S. Wöfl, C. Almonte und S. C. Watkins (1999) Std1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 19, 4561-4571
- Schuddemat, J., P. J. A. Van den Broek und H. Van Stevenick (1988) The influence of ATP on sugar uptake mediated by the constitutive glucose carrier of *Saccharomyces cerevisiae*. Biochim. Biophys. Acta, 937, 81-87
- Schulte, F. (1997) Molekulargenetische und physiologische Untersuchungen zur Funktion von *HTR1* beim Hexosetransport in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität

- Schulte, F., R. Wieczorke, C. P. Hollenberg und E. Boles (2000) The *HTR1* gene is a dominant negative allele of *MTH1* and blocks Snf3- and Rgt2-dependent glucose signaling in yeast. *J. Bacteriol.* 182, 540-542
- Scott, S. V., A. Hefner-Gravink, K. A. Morano, T. Noda, Y. Ohsumi und D. J. Klionsky (1996) Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 12304-12308
- Shih, S. C., K. E. Sloper-Mould und L. Hicke (2000) Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *EMBO J.* 19, 187-198
- Shirahama, K., T. Noda, Y. Ohsumi (1997) Mutational analysis of Csc1/Vps4p: involvement of endosome in regulation of autophagy in yeast. *Cell. Struct. Funct.* 22, 501-509
- Singer-Krüger, B., R. Frank, F. Crausaz und H. Riezman (1993) Partial purification and characterization of early and late endosomes from yeast: identification of four novel proteins. *J. Biol. Chem.* 268, 14376-14386
- Singer-Krüger, B., H. Stenmark, A. Düsterhöft, P. Philippsen, J. S. Yoo, D. Gallwitz und M. Zerial (1994) Role of three rab5-like GTPases Ypt51p, Ypt52p, and Ypt53p, in the endocytic and vacuolar protein sorting pathways of yeast. *J. Cell. Biol.* 125, 283-298
- Springael, J.-Y. und B. André (1998) Nitrogen-regulated ubiquitination of the Gap1 permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 9, 1253-1263
- Springael, J.-Y., J.-M. Galan, R. Haguenaer-Tsapis und B. André (1999a)  $\text{NH}_4^+$ -induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. *J. Cell Sci.* 112, 1375-1383
- Springael, J.-Y., J.-O. De Craene und B. André (1999b) The yeast Npi1/Rsp5 ubiquitin ligase lacking its N-terminal C<sub>2</sub> domain is competent for ubiquitination but not for subsequent endocytosis of the Gap1 permease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 561-566
- Stapleton, D., G. Gao, B. J. Michell, J. Widmer, K. Mitchelhill, T. Teh, C. M. House, L. A. Witters und B. E. Kemp (1994) Mammalian 5'-AMP-activated protein kinase non-catalytic subunits are homologs of proteins that interact with yeast Snf1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* 269, 29343-29346
- Straub, M., M. Bredschneider und M. Thumm (1997) *AUT3*, a serine/threonine kinase gene, is essential for autophagocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.* 179, 3875-3883
- Tagawa, Y., A. Yamamoto, T. Yoshimori, R. Masaki, K. Omori, M. Himeno, K. Inoue und Y. Tashiro (1999) A 60 kDa plasma membrane protein changes its localization to autophagosome and autolysosome membranes during induction of autophagy in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell. Struct. Funct.* 24, 59-70
- Takehige, K., M. Baba, S. Tsuboi, T. Noda und Y. Ohsumi (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* 119, 301-311
- Tan, P. K., J. P. Howard und G. S. Payne (1996) The sequence NPF<sub>2</sub> defines a new class of endocytosis signal in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 135, 1789-1800
- Teichert, U., B. Melcher, H. Müller und D. H. Wolf (1989) Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J. Bio. Chem.* 264, 16037-16045
- Terrell, J., S. Shih, R. Dunn und L. Hicke (1998) A function for monoubiquitination in the internalization of a G protein-coupled receptor. *Mol. Cell* 1, 193-202

- Teusink, B., J. A. Diderich, H. V. Westerhoff, K. van Dam und M. C. Walsh (1998) Intracellular glucose concentration in derepressed yeast cells consuming glucose is high enough to reduce the glucose transport rate by 50%. *J. Bacteriol.* 180, 556-562
- Thevelein, J. M. (1994) Signal transduction in yeast. *Yeast* 10, 1753-1790
- Thevelein, J. M. und S. Hohmann (1995) Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem. Sci.* 20, 3-10
- Thumm, M. (1998) Autophagocytose, ein Proteintransportweg vom Cytosol in die Vakuole. *Biofocus* 4, 48-49
- Tooze, J., M. Hollinshead, T. Ludwig, K. Howell, B. Hoflack und H. Kern (1990) In exocrine pancreas, the basolateral pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome. *J. Cell Biol.* 111, 3329-3345
- Treitel, M. A. und M. Carlson (1995) Repression by *SSN6/TUP1* is directed by *MIG1*, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3132-3136
- Treitel, M. A., S. Kuchin und M. Carlson (1998) Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 18, 6273-6280
- Tsukada, M. und Y. Ohsumi (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333, 169-174
- Tu, J. und M. Carlson (1994) The *GLC7* type 1 protein phosphatase is required for glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6789-6796
- Tu, J. und M. Carlson (1995) *REG1* binds to protein phosphatase type I and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 14, 5939-5946
- Vagnoli, P., D. M. Coons und L. F. Bisson (1998) The C-terminal domain of Snf3p mediates glucose-responsive signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 31-36
- van Kerkhof, P., R. Govers, C. M. Alves dos Santos und G. J. Strous (2000) Endocytosis and degradation of the growth hormone receptor are proteasome-dependent. *J. Biol. Chem.* 275, 1575-1580
- Vancura, A., A. Sessler, B. Leichus und J. Kuret (1994) A prenylation motif is required for plasma membrane localization and biochemical function of casein kinase I in budding yeast. *J. Biol. Chem.* 269, 19271-19278
- Wach, A., A. Brachat, R. Pohlmann und P. Philippsen (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11, 1001-1013
- Walsh, M. C., H.-P. Smits, M. Scholte und K. Van Dam (1994) Affinity of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated during growth on glucose. *J. Bacteriol.* 176, 953-958
- Wendell, D. L. und L. F. Bisson (1993) Physiological characterization of putative high-affinity glucose transport protein Hxt2 of *Saccharomyces cerevisiae* by use of anti-synthetic peptide antibodies. *J. Bacteriol.* 175, 7689-7696
- Wendell, D. L. und L. F. Bisson (1994) Expression of high-affinity glucose transport protein Hxt2p of *Saccharomyces cerevisiae* is both repressed and induced by glucose and appears to be regulated posttranslationally. *J. Bacteriol.* 176, 3730-3737

- Wieczorke, R., S. Krampe, T. Weierstall, K. Freidel, C. P. Hollenberg und E. Boles (1999) Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 464, 123-128
- Wieczorke, R., S. Dlugai, S. Krampe und E. Boles (2001) Restoration of glucose uptake and growth in hexose transport-deficient yeast mutants by rat and human GLUT1 and GLUT4 glucose transporters. Zur Veröffentlichung eingereicht
- Wieland, J., A. M. Nitsche, J. Strayle, J. Steiner und H. K. Rudolph (1995) The *PMR2* gene cluster encodes functionally distinct isoforms of a putative Na<sup>+</sup> pump in the yeast plasma membrane. EMBO J. 14, 3870-3882
- Wilson, W. A., S. A. Hawley und D. G. Hardie (1996) Glucose repression/derepression in budding yeast: *SNF1* protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. Curr. Biol. 6, 1426-1434
- Wirth, R. (1993) Elektroporation: Eine alternative Methode zur Transformation von Bakterien mit Plasmid DNA. Forum Mikrobiologie 11, 507-515
- Woods, A., M. R. Munday, J. Scott, X. Yang, M. Carlson und D. Carling (1994) Yeast Snf1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase *in vivo*. J. Biol. Chem. 269, 19509-19515
- Yang, X., R. Jiang und M. Carlson (1994) A family of proteins containing conserved domain that mediates interaction with the yeast *SNF1* protein kinase complex. EMBO J. 13, 5878-5886
- Ziman, M., J. S. Chuang, M. Tsung, S. Hamamoto und R. Schekman (1998) Chs6p-dependent anterograde transport of Chs3p from the chitosome to the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Biol. Cell. 9, 1565-1576
- Zoladek, T., A. Tobiasz, G. Vaduva, M. Boguta, N. C. Martin und A. K. Hopper (1997) *MDP1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in mitochondrial/cytoplasmic protein distribution, is identical to the ubiquitin protein ligase gene *RSP5*. Genetics 145, 595-603

## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Alanin
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Albumin Bovine Fraction V
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
Ci	Curie
<sup>14</sup> C	radioaktives Kohlenstoffisotop
D	Aspartat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
2-DOG	2-Desoxy-D-Glukose
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FOA	5-fluoro-orotic acid
G418	Geneticin
HMW	Molekulargewichtsstandard „High molecular weight, prestained“
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
K	Lysin
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobasen
<i>K. lactis</i>	<i>Kleuveromyces lactis</i>
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria-Bertani Medium
LiAc	Lithiumacetat
Mal	Maltose
MCS	multiple cloning site
MeOH	Methanol

---

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
NaAc	Natriumacetat
NaI	Natriumiodid
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NBT	4-Nitroblautetrazoliumchlorid
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
ONPG	2-Nitrophenyl-β-d-galaktopyranosid
<sup>33</sup> P	radioaktives Phosphorisotop
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Raf	Raffinose
RbCl <sub>2</sub>	Rubidiumchlorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
<sup>35</sup> S	radioaktives Schwefelisotop
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ts	temperatursensitiv
Ura	Uracil
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktosid
YNB	Yeast Nitrogen Base
WT	Wildtyp

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Cornelis P. Hollenberg danke ich für die Betreuung dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. Eckhard Boles möchte ich mich für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung dieser Arbeit und insbesondere seine ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Prof. R. Wagner danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Vielen Dank an Herrn Prof. Joris Winderickx von der Katholischen Universität in Leuven für die Einladung in seinem Labor die „Microarray“-Experimente durchzuführen. Außerdem bedanke ich mich bei An Tanghe für die freundliche Aufnahme und die große Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Experimente.

Ich möchte mich ebenfalls bei allen Mitgliedern der AG Boles Roman Wieczorke, Judita Makuc, Silke Dlugai, Jessica Becker, Tanja Hamacher, Silke Hippler, Claudia Trunk, Dörthe Voss und Anja Diezemann für das ausgesprochen gute Arbeitsklima, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und für die Hilfe bei der Bewältigung der vielen kleinen und großen Probleme des Laboralltags bedanken.

Allen übrigen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit.

Frau Anna Nagy danke ich dafür, dass sie jederzeit auf wundersame Weise alle fehlenden Laborgeräte beschafft.

Ein riesengroßes Dankeschön gilt meinen Eltern und Thomas für die unermüdliche Unterstützung in allen Lebenslagen.

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name: Stefanie Krampe  
Wohnort: Ziegeleiweg 50  
40591 Düsseldorf  
Geburtsdatum: 17.7.1972  
Geburtsort: Mülheim an der Ruhr  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig

## Schul Ausbildung

1979 – 1983 Grunds chule in Mülheim  
1983 - 1992 Luisenschule, Gymnasium in Mülheim  
Juni 1992 Allgemeine Hochschulreife

## Ausbildung

1992 - 1998 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
1997 – 1998 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Heinrich-  
Heine-Universität Düsseldorf  
Thema: „Molekulargenetische und proteinchemische  
Charakterisierung von Hexosetransportproteinen der  
Hefe *Saccharomyces cerevisiae*“  
März 1998 Diplom der Biologie  
seit April 1998 Doktorandin am Institut für Mikrobiologie der Heinrich-  
Heine-Universität Düsseldorf  
Thema: „Molekularbiologische und physiologische  
Untersuchungen zum Hexosetransport unter Hunger-  
bedingungen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*“



### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Diese Arbeit wurde weder in dieser noch in ähnlicher Form bei einer anderen Institution vorgelegt.

Düsseldorf, den 18.5.2001