

Charakterisierung der Eaf 1-Funktion für die Biogenese der Aminopeptidase 1

Dissertation

**zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen
Doktorgrades „Doctor rerum naturalium“
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

vorgelegt von

Tanja Christine Benkert

aus Nürnberg

Göttingen 2008

D7

Referent: Prof. Dr. K. von Figura
Institut für Biochemie II, Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie
der Georg-August-Universität zu Göttingen

Korreferent: Prof. Dr. G. H. Braus
Institut für Mikrobiologie und Genetik
der Georg-August-Universität zu Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 03.07.2008

Inhaltsverzeichnis

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	2
2.1 Hefe als Modelorganismus	2
2.2 Die Vakuole in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	2
2.3 Der sekretorische Transportweg.....	4
2.4 Autophagie	5
2.4.1 Funktion von Autophagie	8
2.5 Cytoplasm to vacuole targeting (Cvt)-Transportweg	8
2.6 Vergleich von Autophagie und Cvt-Transportweg	10
2.7 Regulierung von Autophagie.....	12
2.8 Autophagosomen	13
2.9 Degradation und Recycling	15
2.10 Die Aktivität der Aminopeptidase 1.....	16
2.11 Charakterisierung von Mutanten ohne Aminopeptidase 1-Aktivität	18
2.12 Fragestellung	21
3 MATERIAL UND METHODEN.....	22
3.1 Organismen.....	22
3.1.1. <i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	22
3.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme	22
3.2 Nährmedien	22
3.2.1 <i>Escherichia coli</i> -Medien	22
3.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Medien.....	23
3.3 Puffer	24
3.4 Größenstandards.....	25
3.4.1 DNA-Größenstandard	25
3.4.2 Protein-Größenstandards für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
3.5 Vektoren	26
3.6 Kultivierung von Mikroorganismen.....	27
3.6.1 Vermehrung von <i>E. coli</i> -Zellen.....	27
3.6.2 Vermehrung von <i>S. cerevisiae</i>	27
3.7 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen	27
3.8 Isolierung von DNA und RNA	28
3.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> über QIAprep Spin Plasmid Miniprep Säulen.....	28

3.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> über QIAprep Spin Plasmid Midiprep Säulen.....	28
3.8.3 Isolierung genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	29
3.8.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	30
3.8.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>S. cerevisiae</i>	30
3.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	32
3.10 Reinigung von DNA und RNA.....	32
3.10.1 Fällung von DNA durch Ethanol.....	32
3.10.2 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA.....	32
3.10.3 Aufreinigung DNase I behandelter RNA-Präparationen	33
3.11 Enzymatische Reaktionen mit DNA und RNA	33
3.11.1 <i>In vitro</i> Synthese spezifischer DNA-Fragmente mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
3.11.2 Reverse Transkription von RNA.....	35
3.11.3 Restriktionsverdau von DNA	35
3.11.4 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren	36
3.11.5 Ligation von DNA-Fragmenten.....	37
3.12 Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	38
3.12.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem QIAquick™ Gelextraktion-Kit	38
3.13 DNA-Sequenzierung.....	39
3.14 Transformationstechniken.....	40
3.14.1 Transformation von <i>E.coli</i> Zellen über Elektroporation.....	40
3.14.2 Transformation von Hefe nach der Lithiumacetat-Methode	41
3.15 Bestimmung des Paarungstyps	42
3.16 Vakuolenisolierung aus <i>S. cerevisiae</i>.....	43
3.17 α-Mannosidase-Aktivitäts-Assay	44
3.18 Ape1-Overlay-Assay.....	44
3.19 Biochemische Methoden	45
3.19.1 Ganzzellproteinextraktion aus Hefe	45
3.19.2 Alkalische Lyse von Hefezellen.....	46
3.19.3 Zellaufschluß zum Nachweis von hyperacetyliertem Histon H4	47
3.19.4 Bestimmung der Proteinkonzentration	47
3.19.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	48
3.19.6 Gelfärbung mit Coomassie Blue.....	49
3.19.7 Proteintransfer auf Membranen (Western Blot-Analyse).....	49
3.19.8 Proteindetektion mit spezifischen Antikörpern und ECL (Enhanced Chemoluminescence)	51
3.19.9 Entfernen membrangebundener Antikörper	52
3.19.10 <i>In situ</i> Immunfluoreszenz	53
3.20 Northern Blot-Analyse.....	55
3.20.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA-Molekülen	55
3.20.2 Northern Blot.....	55
3.20.3 Prähybridisierung, Hybridisierung und Autoradiographie	56
3.21 Southern Blot-Analyse	58
3.21.1 Southern Blot	58

3.21.2 Entfernen von ³² P-markierten Fragmenten von der Hybond ⁺ N-Membran..	59
3.22 Protease Sensitivitäts-Assay	59
3.23 Gelfiltration von Gesamtproteinlysat mit Superdex S200	61
4 ERGEBNISSE	64
4.1 Genomische Integration der Aminopeptidase 1 in WT und via-Mutanten ...	64
4.2 Analyse des ORFs YDR360W	69
4.2.1 Der Einfluss von ORF YDR360W auf die Aktivität der Aminopeptidase 1....	69
4.2.2 Transkriptionsstudien der ORFs YDR360W und YDR359C.....	71
4.3 Analyse des ORFs YDR359C	73
4.3.1 Der Einfluss des ORFs YDR359C auf die Aktivität der Aminopeptidase 1... 74	
4.3.2 Herstellung von eaf1-Deletionsstämmen	75
4.4 Charakterisierung von EAF1 in den Mutantenstämmen	78
4.5 Charakterisierung des Gens EAF1	81
4.5.1 Herstellung von EAF1-Konstrukten	81
4.5.2. Der Einfluss von EAF1-Verkürzungen auf die Aktivität der Ape1.....	82
4.6 Der Einfluss von Eaf1 auf die Expressions- und Transkriptionsrate der Aminopeptidase 1	84
4.7 α-Mannosidase-Aktivität im eaf1Δ-Stamm	87
4.8 Eaf1 und seine Funktion innerhalb des NuA4-Komplexes	88
4.9 Herstellung weiterer Deletionsmutanten des NuA4-Komplexes	91
4.10 Der Einfluss von Aminopeptidase 1-Überexpression auf die Wiederherstellung der Ape1-Aktivität in eaf1Δ-Stämmen	93
4.11 Eaf1 und Ape1-Interaktionen	96
4.11.1 Lokalisationsstudien von Eaf1 und Ape1	96
4.11.2 „Yeast two Hybrid“-Interaktionsstudien von Eaf1 und Ape1	98
4.12 Komplexassemblierung der Aminopeptidase 1 im eaf1Δ-Stamm	100
5 DISKUSSION	102
5.1 Suppression der Ape1-Aktivitätsdefizienz in den Mutanten via10 und via14	102
5.2 ORF YDR360W hat keinen Einfluss auf die Aminopeptidase 1-Aktivität ...	104
5.3 ORF YDR359C beeinflusst die Aminopeptidase 1-Aktivität	106
5.3.1 Eaf1 suppremiert den Aktivitätsverlust im Mutantenstamm via14-2	106
5.3.2 Analyse von Eaf1-Domänen für die Induktion der Ape1-Aktivität.....	107
5.3.3 Der Einfluss von Eaf1 innerhalb des NuA4-Komplexes	108
5.3.4 Eaf1 induziert die Aminopeptidase 1-Transkription und –Expression	109
5.3.5 Auswirkung einer Ape1-Überexpression auf die Ape1-Aktivität	110
5.4 Weitere NuA4-Deletionsmutanten haben keinen Einfluss auf die Aktivität der Ape1	111
5.5 HA-Eaf1 co-lokalisiert mit der Ape1 im Zytoplasma	112

5.6 Die Komplexassemblierung der Ape1 wird durch Deletion von <i>EAF1</i> nicht beeinträchtigt	113
5.7 Ausblick	114
6 LITERATURVERZEICHNIS	117
7 ANHANG	125
7.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>-Stämme	125
7.2 Oligonukleotide	128
7.2.1 Oligonukleotide für Klonierungen in die Hefevektoren <i>pYX141</i> , <i>142</i> , <i>242</i> und <i>132</i>	128
7.2.2 Oligonukleotide zur Klonierung der Hefevektoren <i>pYX-HA141</i> , <i>142</i> und <i>242</i>	128
7.2.3 Oligonukleotide für Klonierungen in die Hefevektoren <i>pYX-HA141</i> , <i>142</i> und <i>242</i>	128
7.2.4 Oligonukleotide für Klonierungen in „Yeast two Hybrid“-Vektor <i>pGADT7</i>	129
7.2.5 Oligonukleotide für Klonierungen in „Yeast two Hybrid“-Vektoren <i>pGBT9</i> und <i>pGBKT7</i>	129
7.2.6 Oligonukleotide zur Verifizierung der Deletionsstämme.....	129
7.2.7 Oligonukleotide für Sequenzierungen	130
7.2.8 Oligonukleotide zur Amplifikation des <i>HIS5⁺</i> -Gens aus <i>pFA6a-HIS3MX6</i>	130
7.2.9 Oligonukleotide zur Amplifikation von Sonden-DNA	131
DANKSAGUNG	

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ad	„auf Endvolumen auffüllen“
α -Maus-Ak	anti-Maus Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Amoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie (2.22×10^6 „counts per minute“)
c-terminal	carboxyterminal
Da	Dalton
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
g	Gramm
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
H ₂ O	Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
HRP	Meerrettichperoxidase
k	Kilo
kb	Kilobasen
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	„Messenger“ Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
MW	Molekulargewicht
μ g	Microgramm
μ l	Microliter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n-terminal	aminoterminal
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“

PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
rpm	„rounds per minute“
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	„Standard Saline Citrate“
Sek.	Sekunde
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TE	Tris/HCl EDTA
TEMED	N, N, N', N'Tetramethyldiamin
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
transf.	Transformiert
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Enzymeinheit (Unit)
UTR	„untranslated region“
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht zu Volumen
v/v	Volumenverhältnis

1 Zusammenfassung

In *Saccharomyces cerevisiae* wird die Leucin-Exopeptidase Aminopeptidase 1 (Ape1) als Vorläuferform im Zytoplasma synthetisiert, zu Homododecameren oligomerisiert, anschließend über den Cvt-Transportweg in die Vakuole transportiert und dort prozessiert.

Die Isolierung und Charakterisierung zweier Mutanten *via10* und *via14* (vacuole import and autophagocytosis) mit reduzierter, bzw. keiner Ape1-Aktivität, sollte weitere Details über die Biogenese des Proteins liefern. Mittels einer Komplementationsstudie wurde der ORF *YDR359C* identifiziert, der zum einen die Ape1-Aktivität in dem Mutantenstamm *via14* wiederherstellte, und zum anderen nach dessen Deletion zu einem kompletten Verlust dieser führte. *YDR359C* kodiert für das verifizierte Protein Eaf1 (**E**sa1-associated factor) und ist neben der katalytischen Untereinheit Esa1 Bestandteil des aus dreizehn Proteinen zusammengesetzten Histon-Acetyltransferase-Komplexes NuA4.

Hier konnte gezeigt werden, dass die Expression von Eaf1 die Transkription, Expression und Aktivität der Ape1 erhöht und somit direkt beeinflusst. Interessanterweise ist dies nicht ausschließlich auf einen transkriptionellen Effekt zurückzuführen, da ein induzierter Anstieg der Ape1-Expression alleine nicht im selben Maße zur Restauration der Aktivität führte. Die Deletion weiterer nicht-essentieller Untereinheiten des NuA4-Komplexes hatte ebenfalls keinen, bzw. nur minimalen Einfluss auf die Ape1-Aktivität. Des Weiteren konnte die Ape1-Aktivität sowohl durch amino- als auch carboxyterminal verkürzte Fragmente von Eaf1 wiederhergestellt werden. In *in situ* Immunfluoreszenzen konnte zwar eine Co-Lokalisation von Eaf1 und Ape1, bis jetzt jedoch keine direkte Interaktion der beiden Proteine gezeigt werden, was vermuten ließe, dass Eaf1 die Ape1-Aktivität unter Umständen nicht direkt, sondern in komplexgebundener Form beeinflusst. Der Verlust des *EAF1*-Gens beeinträchtigt weder die Prozessierung, noch die Komplexassemblierung der Ape1. Unsere Daten deuten daher auf eine neue Funktion des Proteins Eaf1, u.U. unter Beteiligung anderer Komponenten des NuA4-Komplexes oder durch Interaktion mit noch nicht identifizierten Bindungspartnern hin. Zukünftige Experimente werden dazu beitragen, den Mechanismus der Eaf1-abhängigen Biogenese der Aminopeptidase 1 aufzuklären.

2 Einleitung

2.1 Hefe als Modelorganismus

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* war der erste Eukaryot dessen komplette DNA-Sequenz im Jahre 1996 veröffentlicht wurde: etwa 6000 potentiell kodierende Gene verteilen sich auf sechzehn Chromosomen (Goffeau *et al.*, 1996). Hefe als Modelorganismus ist leicht zu manipulieren, während entsprechende Experimente, wie z.B. die Deletion eines Genes im Säugersystem langwieriger, teurer und schwieriger durchzuführen sind. Da Hefe- und Säugergene oft für ähnliche Proteine kodieren (Botstein und Fink, 1988), können Untersuchungen in Hefe ihre biologische Funktionen erkennen lassen und selbst bei der Analyse von Krankheitsgenen erste Anhaltspunkte liefern.

Wie für alle eukaryotischen Zellen, ist auch für die Hefezelle ihre zelluläre Kompartimentierung für den reibungslosen Ablauf biologischer Prozesse entscheidend. Eine große physiologische Rolle spielt dabei die Vakuole.

2.2 Die Vakuole in *Saccharomyces cerevisiae*

Die Vakuole ist als saures Kompartiment das Pendant zu Lysosomen in Säugerzellen. Mit ihrer großen Vielzahl von Hydrolasen, Endo- und Exoproteinasen (Jones *et al.*, 1997; van den Hazel *et al.*, 1996) ist sie neben dem Proteasom zuständig für intrazelluläre Proteolyse (Thumm und Wolf, 1998). Vor allem unter Nährstoffmangelbedingungen werden 85% der intrazellulär abgebauten Proteine in der Vakuole degradiert.

Die Vakuole dient als Speicherkompartiment für Aminosäuren, Ionen (z.B. Kalzium) und Phosphate. Sie ist zudem an der pH- und Osmoregulation beteiligt. Das saure Milieu wird durch die aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzte Vakuolen-ATPase (V-ATPase) aufrechterhalten, die für die Translokation von Protonen durch die Vakuolenmembran verantwortlich ist (Powell *et al.*, 2000). In *Saccharomyces cerevisiae* werden Proteine auf unterschiedlichen Wegen in die Vakuole transportiert (Abb.1):

- Sekretorischer Weg via Endoplasmatischem Retikulum (ER) und Golgi-Apparat
- Endozytose
- „Cytoplasm-to-vacuole targeting“ (Cvt)-Transportweg und Autophagie

Um die unterschiedlichen Transportwege zu untersuchen, werden bestimmte Markerproteine wie z.B. Carboxypeptidase Y und Aminopeptidase 1 beobachtet. Vakuoläre Proteasen werden in der Regel als inaktive Zymogene synthetisiert, die erst nach proteolytischer Spaltung des Propeptids aktiviert werden. Die Prozessierung findet in der Vakuole vor allem durch die Proteinase A (PrA, Pep4) statt. Die daraus entstehende niedermolekulare Form des Proteins kann mittels Polyacrylamidgelelektrophorese überwacht werden (Ammerer *et al.*, 1986).

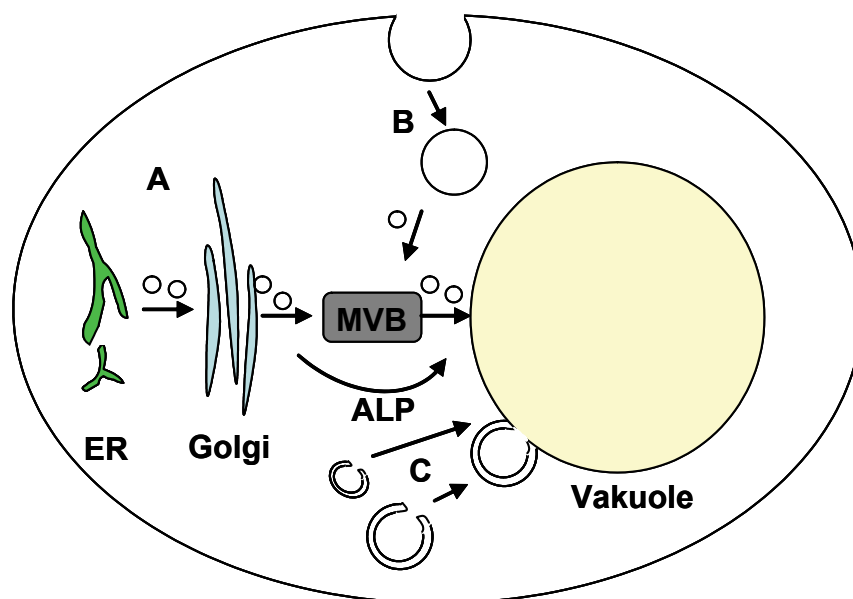


Abb.1: Proteintransport in die Vakuole.

A Sekretorischer Weg über ER und Golgi (CPY- und ALP-Transportweg), **B** Endozytose von Proteinen, **C** Autophagie oder Cvt-Weg.

2.3 Der sekretorische Transportweg

Viele vakuoläre Hydrolasen wie z.B. die Carboxypeptidase Y (CPY) oder Proteinase A (PrA) und vakuoläre Membranproteine wie beispielsweise eine Untereinheit der vakuolären ATPase (V-ATPase) Vph1 werden über den sekretorischen Weg in die Vakuole transportiert. CPY wird als inaktive Proform, Prepro-CPY synthetisiert und dann im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums nach Spaltung der Signalsequenz N-glykosyliert und phosphoryliert (Hasilik und Tanner, 1978; Hashimoto *et al.*, 1981). Das jetzt 67 kDa große Protein (p1) wird zusammen mit Proteinen, die segregiert oder in der Plasmamembran verankert werden, vom ER in den Golgi-Apparat transportiert, wo weitere Oligosaccharide zur Bildung der 69 kDa großen p2-CPY-Form angehängt werden. Im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) verlässt das Protein den sekretorischen Weg und wird durch einen rezeptorvermittelten Prozess in die Vakuole transportiert. Dabei enthalten die Aminosäurereste 24-27 der Prosequenz das Lokalisationssignal, d.h. ohne diese Aminosäuren kann das Protein nicht an seinen Rezeptor Vps10 binden und wird zu 90% segregiert. Der Rezeptor/Liganden-Komplex wird unter Beteiligung von Clathrin und der Dynamin-ähnlichen GTPase Vps1 in sog. Golgi-Transport-Vesikel verpackt. Clathrin bildet das Gerüst der Vesikel, während Vps1 für die Abstoßung der Vesikel am TGN benötigt wird. Das Cargo wird zu dem späten Endosomen/multivesikulären-Body (MVB) transportiert, wo die Pro-CPY und Vps10 dissoziieren (Deloche *et al.*, 2001). Vps10 gelangt zurück zum TGN, wo es weitere CPY-Proteine bindet (Cereghino *et al.*, 1995; Cooper *et al.*, 1996). Der Rezeptor erkennt neben CPY auch PrA und fehlgefaltete Proteine, die in der Vakuole degradiert werden (Hong *et al.*, 1996). Pro-CPY wird weiter zur Vakuole transportiert, wo das Propeptid durch vakuoläre Proteasen gespalten wird. Die Masse der gereiften, aktiven Form der CPY (mCPY) beträgt 61 kDa (Hemmings *et al.* 1981).

Einige Proteine, wie z.B. Vam3 werden in die Vakuole transportiert ohne das endosomale Netzwerk zu durchlaufen. Dieser Transportweg ist Clathrin unabhängig und ist nach seinem prominentesten Cargo-Protein, der Alkalischen Phosphatase (ALP) benannt (Piper *et al.*, 1997; Cowles *et al.*, 1997). Im TGN werden ALP und Vam3 in AP3 Adaptorprotein-Vesikel verpackt. Der AP3-Komplex besteht aus 4 Proteinen: Apl6 (β -Adaptin Homolog), Apl5 (δ -Adaptin Homolog), Apm3 (μ -Untereinheit Homolog) und Aps3 (σ -Untereinheit Homolog) und assoziiert mit Vps41,

das bei der Fusion der Vesikel mit der Vakuolenmembran beteiligt sein könnte (Darsow *et al.*, 2001).

2.4 Autophagie

Unter Autophagie (griech.: „auto“ sich selbst; „phagie“ essen) versteht man den Transport zytosolischen Materials bis hin zu ganzen Organellen, wie z.B. Mitochondrien, in die Vakuole. Dieser Prozess wird durch Stickstoffmangelbedingungen induziert. Innerhalb von 24 Stunden werden annähernd 50% der gesamten intrazellulären Proteine degradiert. Ein Großteil des Abbaus (ca. 80%) findet dabei in der Vakuole statt, was eine Bereitstellung von Aminosäuren und weiteren Metaboliten für die hungernde Zelle gewährleistet (Teichert *et al.*, 1989). Es werden drei Arten von Autophagie unterschieden: Mikroautophagie, Makroautophagie und Chaperon-induzierte Autophagie (Tab.1). Mikroautophagie ist die Aufnahme zytosolischen Materials, was auch große Moleküle wie Glykogen oder sogar Ribosomen beinhaltet. Die Substrate werden hierbei direkt durch Einschnürung der vakuolären Membran in Form von Einzelmembranvesikeln internalisiert (Mortimore *et al.*, 1988).

Chaperon-induzierte Autophagie ist nur in höheren Eukaryoten beschrieben und umfasst die gerichtete Aufnahme von löslichen Proteinen mit entsprechenden „targeting“-Motiven, die entsprechende Rezeptoren der lysosomalen Membran binden. Die Substrate werden entfaltet und in das Lysosom aufgenommen (Cuervo und Dice, 1998; Dice 1990).

Makroautophagy wird meist nur mit Autophagie umschrieben, entsteht mit der Bildung von Autophagosomen, Doppelmembranvesikel mit einem Durchmesser von 300-900 nm. Die Bildung von Autophagosomen ist noch nicht abschließend geklärt. Als Entstehungsort wurde ein der Vakuole nahes Kompartiment, das sog. PAS (**pre-autophagosomal structure**) identifiziert (Suzuki *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2002). Kirisako *et al.* (1999) beschrieben die Formation der Vesikel als eine immer folgende Aneinanderreihung von Membranstrukturen am PAS. Nach Annäherung fusionieren die beiden Enden und schließen zytoplasmatisches Material als Doppelmembranvesikel ein. Große Autophagosomen könnten zum einen durch ein Aneinanderreihen von Vesikeln oder der Fusion kleiner Membranfragmente (Zisternen) gebildet werden (Reggiori und Klionsky, 2005). Der Ursprungsort der

Autophagosomenmembranen wird kontrovers diskutiert. Atg9 und Atg27 sind transmembrane Proteine am PAS, die an der Bildung von Autophagosomen beteiligt sind (Lang *et al.*, 2000; Yen *et al.*, 2007). Atg9 pendelt zwischen PAS und Mitochondrien, somit könnten wenigstens Teile der autophagosomalen Lipide aus diesem Organell stammen (Reggiori *et al.*, 2005). Später konnte Atg9 aus Säugerzellen (mAtg9) im Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) und späten Endosomen nachgewiesen werden (Young *et al.*, 2006). Demnach könnten autophagosomale Membranen sowohl aus den Mitochondrien (Reggiori *et al.*, 2005), dem ER und Trans-Golgi-Netzwerk, den Endosomen oder vielleicht sogar aus der Vakuole selbst stammen.

Bei Ankunft an der Vakuole fusionieren die äußere Membran der Autophagosomen mit der Vakuolenmembran und das autophagische Vesikel wird in das Vakuolenlumen entlassen, wo die Vesikel aufgebrochen werden (Baba *et al.*, 1994; Takeshige *et al.*, 1992) (Abb.2). Dies unterscheidet Autophagie von dem bereits beschriebenen Vorgang des sekretorischen Transportweges, wo Proteine in Einzelmembranvesikel mit der Vakuolenmembran fusionieren und der Inhalt direkt ins Lumen freigegeben wird. Die autophagischen Vesikel hingegen werden von vakuolären Proteinasen und vor allem von der Endoprotease B unter Beteiligung des sauren Milieus degradiert. Wird die Endoprotease B durch PMSF inhibiert oder deletiert, bzw. nach Deletion der *VMA*-Gene (Untereinheiten der V-ATPase), akkumulieren die autophagischen Vesikel im Lumen der Vakuole (Takeshige *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1997).

Tab.1: Zusammenfassung und Gegenüberstellung von Makro-, Mikroautophagie und Chaperon-induzierter Autophagie (chaperone-mediated autophagy, CMA):

Makroautophagie	Mikroautophagie	Chaperon-induzierte Autophagie
induzierbar (Nährstoffmangel)	konstitutiv	induzierbar (Nährstoffmangel)
Vesikel abhängig	Vesikel abhängig	direkt
Proteine/Organelle	Proteine/Organelle	Proteine
ungerichtet	ungerichtet	selektiv

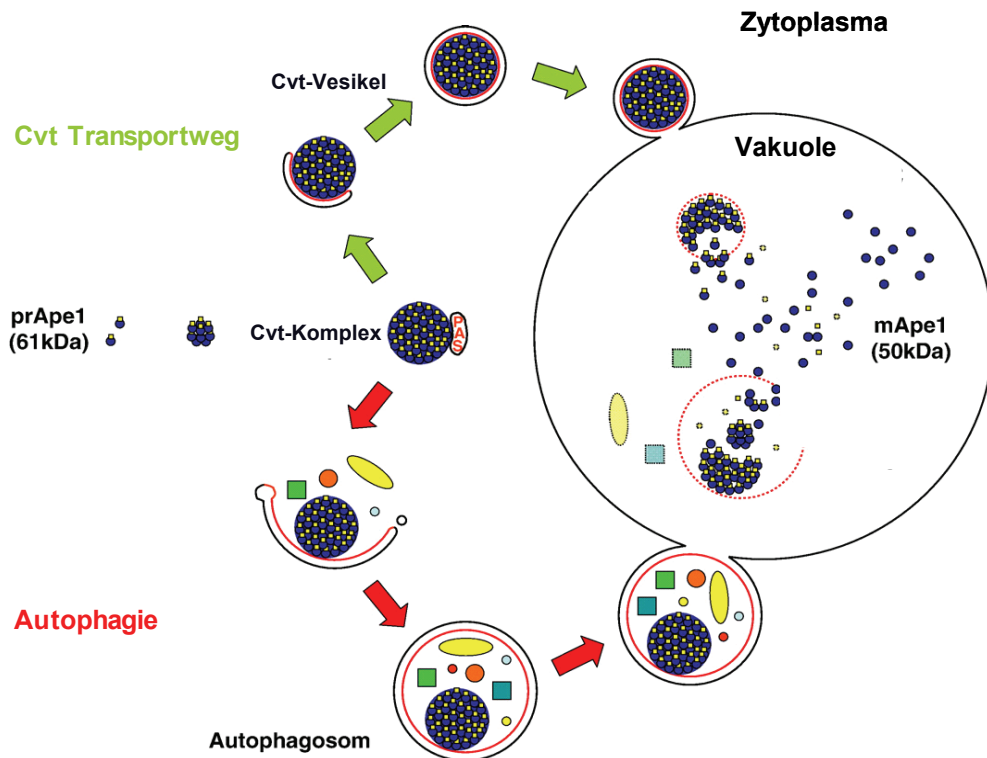


Abb.2: Cvt (Cytoplasm to Vacuole Targeting)-Transportweg und Autophagie haben ähnliche Mechanismen.

Amino-peptidase 1 (prApe1) wird im Zytoplasma synthetisiert, in Cvt-Vesikel verpackt und in die Vakuole transportiert. Unter Stickstoffmangelbedingungen wird Autophagie induziert. prApe1 wird zusammen mit intrazellulärem Material in Autophagosomen zur Vakuole transportiert, dort prozessiert (mApe1) und zytosolisches Material degradiert (nach Cebollero und Gonzalez, Review 2007).

2.4.1 Funktion von Autophagie

Unter normalen Wachstumsbedingungen und kurzen Hungerintervallen wird der Aminosäurehaushalt durch Proteindegradation im Proteasom mittels spezifischen Abbaus von ubiquitinylierten Proteinen geregelt (Ciehanover *et al.*, 1978). Beträgt die Hungerperiode mehrere Stunden, wird Autophagie induziert. Hefezellen reduzieren ihre Proteinsynthese unter Stickstoffmangelbedingungen, dieser Effekt wird in autophagiedefizienten Mutanten verstärkt. Zudem werden unter diesen Bedingungen bestimmte Proteine, wie z.B. das Hitzeschock-Protein Hsp26, die vakuoläre Aminopeptidase 1 (Ape1) und Carboxypeptidase Y (CPY) verstärkt synthetisiert (Tsukada und Oshumi, 1993). Autophagie ist ein limitierender Prozess und kann das Überleben der Zelle nur für kurze Zeit garantieren.

Autophagie findet auch zur Beseitigung von überschüssigen, nicht benötigten Organellen statt. In *S. cerevisiae* werden Peroxisomen, ubiquitär vorkommende Zellorganellen, zuständig für die β -Oxidation von Fettsäuren (Kunau *et al.*, 1988) nach Umsetzen von Ölsäurequelle auf Glucosemedium nicht mehr benötigt und daraufhin degradiert. Dieser Prozess wird auch als Pexophagie bezeichnet (Hutchins *et al.*, 1999).

2.5 Cytoplasm to vacuole targeting (Cvt)-Transportweg

Erste Hinweise auf diesen Autophagie-ähnlichen Transportweg in *S. cerevisiae* erhielt man durch Studien der vakuolären Hydrolase α -Mannosidase (Ams1; Yoshihisa und Anraku, 1990) und später mit der Erforschung des Proteins Aminopeptidase 1 (Ape1; Klionsky *et al.*, 1992). Ape1 ist eine Leucin-Exopeptidase und in der Vakuole aktiv. Sie wird als 61 kDa Vorläuferform prApe1 mit einem aminoterminalen Propeptid im Zytoplasma synthetisiert. Der ORF *YKL103C* (*APE1*, *YSC1*, *API*, *LAP4*) auf Chromosom XI kodiert für das aus 514 Aminosäuren bestehende Protein. Das aus 45 Aminosäuren bestehende Propeptid besitzt keine für den sekretorischen Transportweg typische Signalsequenz und ist nicht hydrophob (Cueva *et al.*, 1989), wird allerdings für den Transport in die Vakuole benötigt. Bei Mutation des Propeptids akkumuliert das Protein im Zytoplasma (Oda *et al.*, 1996).

α -Mannosidase (Ams1) ist das bis heute zweite identifizierte Protein, das wie die Ape1 direkt nach seiner Synthese im Zytoplasma in die Vakuole transportiert wird.

Der ORF *YGL156W* auf Chromosom VII kodiert für 1083 Aminosäuren (Molekulargewicht (MW) 124.5 kDa). Ams1 wird aus drei Isoformen, d.h. einem 107 kDa Polypeptid und den durch proteolytische Spaltung resultierenden 73 und 31 kDa Polypeptiden zusammengesetzt (Yoshihisa und Anraku, 1989). Das native Protein ist 560 kDa groß und hydrolysiert die Entfernung terminaler α -D-Mannose-Reste in der Vakuole.

Die Aminopeptidase 1 und die α -Mannosidase unterscheiden sich von Proteinen des sekretorischen Transportweges wie folgt: sie sind nicht glykosyliert und besitzen keine Standardsignalsequenz wie z.B. die der CPY, PrA oder PrB. Der Transport von Ape1 und Ams1 ist prozessierungsunabhängig von temperatursensitiven *sec12*- und *sec23*-Mutanten des sekretorischen Transportweges. Der vakuoläre Import und die Prozessierung der Ape1 erfolgen mit einer Halbwertszeit von ca. 30-45 Minuten (Klionsky *et al.*, 1992) verglichen mit einer nur sechsminütigen HWZ der CPY, Proteinase A oder Alkalischen Phosphatase. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde vermutet dass Ape1 und Ams1 über einen anderen als den sekretorischen Transportweg in die Vakuole transportiert werden.

Überexpression der Ams1 erhöht die Halbwertszeit der Prozessierung der Ape1, was auf einen gemeinsamen Transportmechanismus der beiden Proteine hinweist (Klionsky *et al.*, 1992). Abbildung 3 zeigt ein Modell, wie die Proteine Ape1 und Ams1 in die Vakuole gelangen.

Nach Synthese oligomerisiert die Aminopeptidase 1 zügig mit einer Halbwertszeit von ca. zwei Minuten zu einem Homododecamer. Der Rezeptor Atg19 (Cvt19) interagiert mit den aus mehreren Homododecameren bestehenden Ape1-Komplexen. Zu diesem Zeitpunkt oder zusammen mit Atg19 bindet die α -Mannosidase und bildet den sog. Cvt-Komplex. Dieser bindet nun an das Adaptor-ähnliche Protein Atg11 (Cvt9) und wird anschließend am PAS unter Beteiligung von unter anderem Atg8 (Aut7) in sog. Cvt-Vesikel verpackt und direkt, d.h. nicht über ER und Golgi-Apparat, zur Vakuole transportiert. Dort findet die Fusion mit der Vakuolenmembran statt. Der Innermembranvesikel wird ins Vakuolenlumen entlassen und anschließend von vakuolären Hydrolasen verdaut. In der Vakuole wird die prApe1 durch Proteinase A in ihre 50-51 kDa gereifte Form prozessiert (mApe1) (Trumbly and Bradley, 1983). Der Rezeptor Atg19 wird nach Ankunft in der Vakuole degradiert. Atg19 und somit auch die α -Mannosidase benötigen die Interaktion mit

Ape1, genauer den Cvt-Komplex, um in die Vakuole zu gelangen (Shintani *et al.*, 2002)

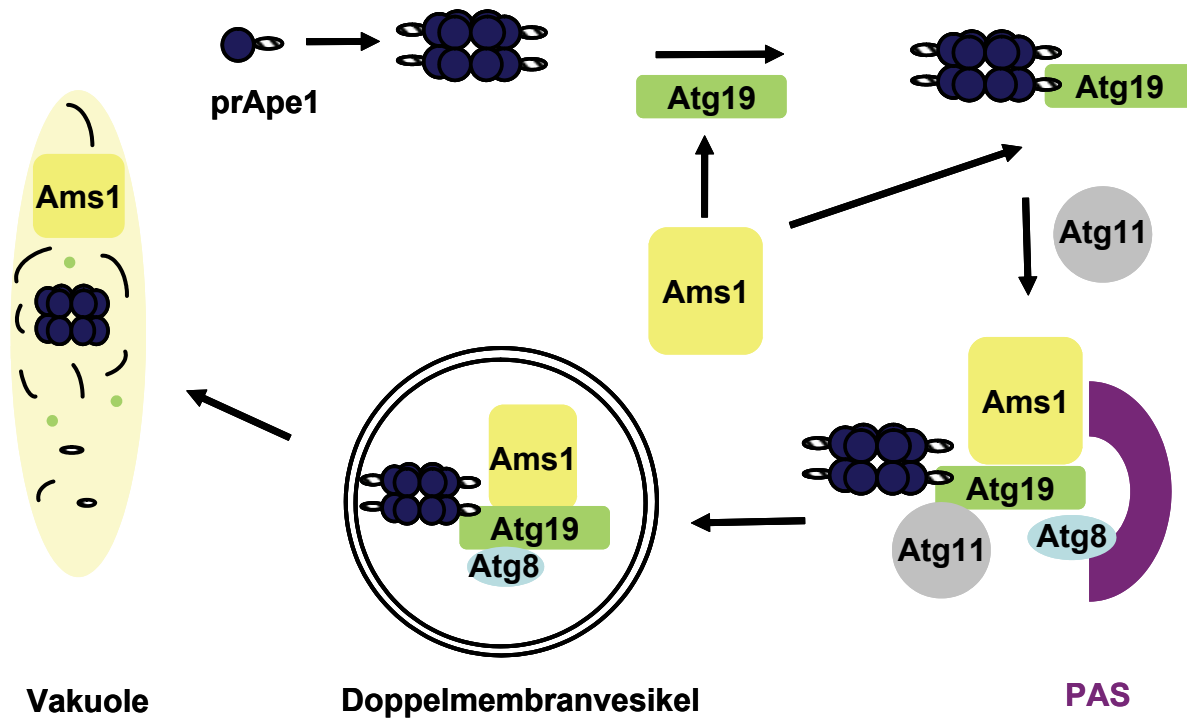


Abb.3: Modell für den Transport von Aminopeptidase 1 (Ape1) und α -Mannosidase (Ams1) in die Vakuole.

Ape1 homododecamerisiert im Zytoplasma und bildet große Komplexe (zur vereinfachten Darstellung wird hier nur ein Homododecamer gezeigt). Der Rezeptor Atg19 und α -Mannosidase binden. Der entstandene Cvt-Komplex wird am PAS in Doppelmembranvesikel verpackt und in die Vakuole transportiert.

2.6 Vergleich von Autophagie und Cvt-Transportweg

Autophagie ist ein ungerichteter, eher langsamer Prozess mit einer Halbwertszeit von mindestens zwölf Stunden (Scott *et al.*, 1996). Der ausschließlich unter Nährstoffmangel induzierte Prozess führt zur Bildung von Autophagosomen mit einem Durchmesser von 300-900 nm (Takeshige *et al.*, 1992). Nach Ankunft in der Vakuole, folgt die Degradation des transportierten Zellmaterials, d.h. der Proteine bis hin zu ganzen Organellen. Der Cvt-Transportweg ist dagegen auf zwei Proteine beschränkt (Ape1 und Ams1) und findet konstitutiv in logarithmisch wachsenden

Zellen mit einer Halbwertszeit von 30 bis 45 Minuten statt (Klionsky *et al.*, 1992, Scott *et al.*, 1996). Cvt-Vesikel weisen einen Durchmesser von ca. 150 nm auf und sind somit wesentlich kleiner als Autophagosomen.

Zwei Arten von Mutanten halfen die molekularen Vorgänge von Autophagie besser zu verstehen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen an Hefezellen mit Defekten vakuolärer Proteinasen zeigten unter Hungerbedingungen eine Anreicherung von kugelförmigen Membranstrukturen, sog. „Autophagic Bodies“ und führten zur Isolierung von sog. *apg* (**autophagy**)-Mutanten (Tsukada und Ohsumi, 1993). *Aut* (**autophagy**)-Mutanten wurden nach EMS-Mutagenese identifiziert. Hierbei wurden Hefestämme nach Degradationsdefekten der zytosolischen Fettsäuresynthase und dem Verlust zur Bildung autophagosomaler Vesikel unter Hungerbedingungen und Anwesenheit von PMSF (Inhibitor der Proteinase B) untersucht (Thumm *et al.*, 1994).

Ein Jahr später wurden wieder durch EMS-Mutagenese sog. *cvt* (**cytoplasm to vacuole targeting**)-Mutanten anhand von Western Blot-Analysen isoliert. Dabei handelte es sich um Zellen mit Defekten in der Reifung der Aminopeptidase 1 und demzufolge einer Akkumulation der Vorläuferform im Zytoplasma (Harding *et al.*, 1995).

Trotz morphologischer Unterschiede (Tab.2), konnten mit Hilfe von Komplementationsstudien an *apg*-, *aut*- und *cvt*-Mutanten (Scott *et al.*, 1996) eine große Vielzahl von Gemeinsamkeiten der beiden Prozesse identifiziert werden. Für ein besseres Verständnis, wurde die Nomenklatur der *AUT*-, *APG*- und *CVT*-Gene auf *ATG*-Gene (**Autophagy** verwandte Gene) standardisiert (Klionsky *et al.*, 2003). Bis heute sind 31 *ATG*-Gene identifiziert, wobei die Mehrzahl für Autophagie und Cvt-Transportweg relevant sind. Weiter gibt es auch Gene, die zwar für autophagozytotische Prozesse, wie die Fusion von Vesikeln und deren Abbau essentiell sind, allerdings nicht mit *ATG* bezeichnet werden.

Tab.2: Morphologische Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Autophagie und Cvt-Transportweg:

Autophagie	Cvt-Transportweg
induzierbar (Nährstoffmangel)	konstitutiv (bei Nährstoffmangel: Autophagie)
Vesikel abhängig	Vesikel abhängig
nicht selektiv (Proteine, Organelle)	selektiv (Ape1, Ams1)
langsam (HWZ >12 Stunden)	schnell (HWZ 30-45 Minuten)
Vesikelgröße 300-900 nm	Vesikelgröße 140-160 nm

2.7 Regulierung von Autophagie

Einer der Hauptregulatoren von Autophagie ist die Serin-Threonin Kinase Tor. Wie in Abbildung 4 illustriert, ist die Kinase unter normalen Wachstumsbedingungen aktiv. Gerät die Zelle unter Hungerstress, führt die Inaktivierung der Tor-Kinase zu einer teilweisen Dephosphorylierung des Proteins Atg13, was dessen Interaktion mit Atg17 und der Serin-Threonin Kinase Atg1 erhöht (Noda und Ohsumi, 1998; Kamada *et al.*, 2000; Kabeya *et al.*, 2005). Die Auswirkungen auf Atg1 werden hierbei kontrovers diskutiert, *in vivo* Studien haben allerdings gezeigt, dass eine Mutation der Kinase weniger den Prozess der Autophagie beeinflusst, als den Cvt-Transportweg inhibiert (Abeliovich *et al.*, 2003). Das Phosphoprotein Atg13 ist mit Vac8, einem vakuolären Membranprotein assoziiert und an der Vesikelbildung und damit dem Transport der Ape1 zur Vakuole beteiligt. Atg1 scheint außerdem mit den Proteinen Atg11, Atg20 und Atg24 einen Komplex zu bilden, der an dem Wechsel von Cvt-Weg zu Autophagie unter wechselnden Nährstoffbedingungen beteiligt sein könnte (Scott *et al.*, 2000). Atg17 ist maßgeblich an der Organisation des PAS beteiligt, vermutlich im Komplex mit den erst kürzlich identifizierten Proteinen Atg29 und Atg31 (Kawamata *et al.*, 2005; Kabeya *et al.*, 2007).

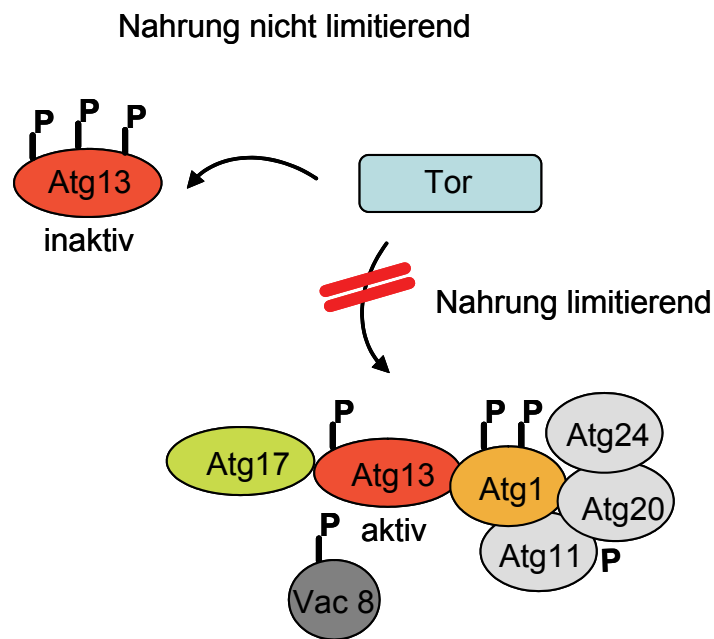


Abb.4: Regulation von Autophagie.

Hungerstress führt zur Inaktivierung der Tor-Kinase, die Dephosphorylierung von Atg13 führt zu dessen Aktivierung. Komplexbildung mit den Proteinen Vac8, bzw. Atg1 und Atg17 beeinflussen eine Vielzahl autophagozytischer Prozesse, wie beispielsweise die Bildung von Vesikeln (Abbildung abgeändert nach Levine und Kroemer, 2008).

2.8 Autophagosomen

Atg8 ist, wie bereits erwähnt, am Transport der Aminopeptidase 1 und der α -Mannosidase in die Vakuole beteiligt. In *atg8*-Mutantenstämmen sind die Vesikel in der Regel kleiner und in geringerer Anzahl nachweisbar, der Transport der Ape1 in die Vakuole findet allerdings statt. Es ist daher anzunehmen, dass Atg8 eher an der Ausdehnung, bzw. Erweiterung der Autophagosomen involviert ist (Kirisako *et al.*, 1999; Abeliovich *et al.*, 2000).

Die Funktion von Atg8 ist an eine kovalente Bindung des Proteins mit Phosphatidylethanolamin (PE) geknüpft. Die Bildung des Atg8-PE-Komplexes erinnert an das Ubiquitinierungssystem. Zuerst wird Atg8 carboxyterminal modifiziert. Die Cysteineprotease Atg4 entfernt dabei ein Arginin und hinterlässt C-terminal ein Glycin. Das E1-verwandte Protein Atg7 und das E2-verwandte Protein Atg3 katalysieren dann die Bindung von Atg8 mit PE (Schlumpberger *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2001) und die damit unter Beteiligung des Phosphatidylinositol 3-Kinase-Komplex

I, Atg9 und weiteren Proteinen (Atg12-Atg5 Komplex, Mae1/Atg21) verbundene Lokalisation am PAS. Die dynamische Interaktion von Atg8-PE wird erneut von Atg4 gespalten. Dieser Vorgang und die damit verbundene Loslösung von Atg8 vom PAS ist einer der essentiellen Schritte der Autophagie (Kirisako *et al.*, 2000).

Atg12 ist ein weiteres Protein, das in einem Ubiquitin-ähnlichen System wirkt. Das carboxyterminale Glycin ist hier kovalent mit Lysin 149 des Proteins Atg5 verbunden. Diese Verbindung wird durch Atg7 (E1-verwandtes Enzym zur Atg12 Aktivierung) und Atg10 (E2-verwandtes Enzym zur Atg12 Konjugation) katalysiert (Tanida *et al.*, 1999). Ein weiteres Protein Atg16 oligomerisiert und interagiert mit der aminoterminalen Region von Atg5, was zur Bildung eines ca. 350 kDa multimeren Atg12-Atg5-Atg16-Komplexes führt (Kuma *et al.*, 2002). Nach bisherigem Wissensstand ist dieser Komplex am Wachstum der Membranen beteiligt. Atg12-Atg5 begünstigen die Assoziation von Atg8 an PE. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, dass dieser Komplex als E3-Enzym agiert (Abb.5).

Die Phosphatidylinositol 3-Kinase (Vps34) ist Teil zweier Komplexe, I und II, die am vesikulären Transport beteiligt sind. Phosphatidylinositol 3-Kinase-Komplex I (PtdIns 3-Kinase-Komplex I) besteht außerdem aus den Proteinen Vps15, Atg6 und Atg14 und ist essentiell für den Cvt-Transportweg und Autophagie. Seine molekulare Funktion ist noch nicht abschließend geklärt. Komplex I scheint jedoch während der Entstehung von Autophagosomen, d.h. im Rekrutieren verschiedener Atg-Proteine (u.a. Atg18, Atg20, Atg21 und Atg24) an den PAS eine zentrale Rolle zu spielen (Nice *et al.*, 2002; Stromhaug *et al.*, 2004). Im PtdIns 3-Kinase-Komplex II wird Atg14 durch Vps38 ersetzt. Komplex II wird für den Transport von Carboxypeptidase Y vom Golgi-Apparat zur Vakuole benötigt, hat allerdings keinen Einfluss auf Autophagie (Kihara *et al.*, 2001).

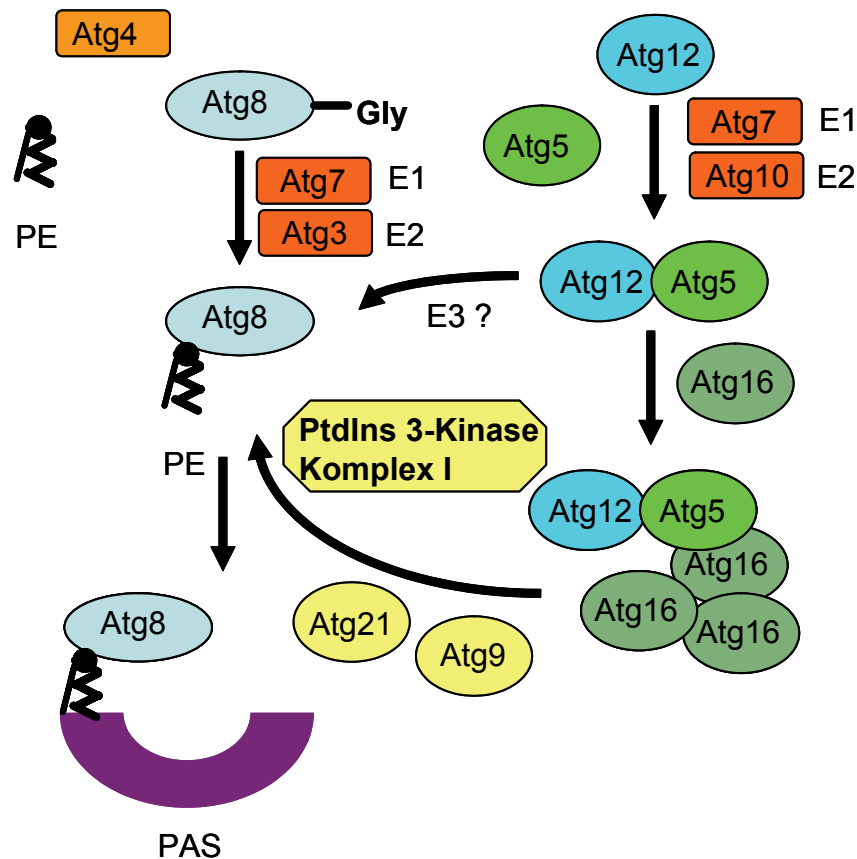


Abb.5: Atg8-PE und Atg12-Atg5-Atg16-Komplex sind entscheidend an der Bildung des Autophagosoms beteiligt.

Weitere Atg Proteine, wie Atg7, Atg3 und Atg10 agieren als, dem Ubiquitinierungssystem verwandte E1-, bzw. E2- Enzyme und katalysieren die Bildung des Atg12-Atg5-Komplexes, wie die Assoziation von Phosphatidylethanolamin (PE) an Atg8 (Abbildung abgeändert nach Levine und Kroemer, 2008).

2.9 Degradation und Recycling

Nach Fusion der Autophagosomen mit der Vakuole, werden die Einzelmembranvesikel und ihr zytosolischer Inhalt von vakuolären Hydrolasen degradiert. Proteinase B und höchstwahrscheinlich die putative Lipase Atg15 sind maßgeblich an der Lyse der Vesikel beteiligt (Epple *et al.*, 2001; Teter *et al.*, 2001).

Nach dem Verdau der Makromoleküle werden die Einzelkomponenten, wie z.B. Aminosäuren zur Wiederverwertung ins Zytoplasma exportiert. Das Membranprotein Atg22 und die zur selben Proteinfamilie gehörenden Proteine Avt3 und Avt4 vermitteln hierbei den Rücktransport von Aminosäuren aus der Vakuole. Dieser Aminosäurepool garantiert den Fortbestand der Proteinsynthese und damit der ganzen Zelle unter Stickstoffmangelbedingungen.

2.10 Die Aktivität der Aminopeptidase 1

In *S. cerevisiae* wurden bislang vier Aminopeptidasen identifiziert (Trumbly und Bradley, 1983). Die Zink-bindende Aminopeptidase 1 (Ape1, früher Lap4) ist als einzige in der Vakuole lokalisiert (Matile *et al.*, 1971; Frey und Röhm, 1978). Wie bereits erwähnt, kodiert der ORF *YKL103C* (*APE1*, *YSC1*, *API*, *LAP4*) auf Chromosom XI für das aus 514 Aminosäuren bestehende Protein mit vier potentiellen N-Glykosylierungsstellen (Cueva *et al.*, 1989; Chang und Smith, 1989). Die Aminopeptidase 1 wird als 61 kDa Vorläuferform (prApe1) im Zytoplasma synthetisiert. Das aus 45 Aminosäuren bestehende Propeptid ist nicht hydrophob und weist stattdessen N-terminal die Charakteristiken einer amphiphilen α -Helix auf. Das Propeptid besitzt keine für den sekretorischen Transportweg typische Signalsequenz (Cueva *et al.*, 1989), wird allerdings für den Transport in die Vakuole benötigt (Oda *et al.*, 1996). Das Protein wird unter normalen Wachstumsbedingungen direkt nach Synthese über den Cvt-Transportweg (HWZ ca. 45 Minuten), unter Stickstoffmangelbedingungen über Autophagie (Abb.2) in die Vakuole transportiert (Klionsky *et al.*, 1992). Die Prozessierung der Ape1 erfolgt durch einen zweistufigen Prozess in der Vakuole. Die 61 kDa prApe1 wird unter Bildung einer 55 kDa intermediären Form (iApe1) zu einem 50 kDa Protein gereift (mApe1, mature Ape1) (Seguí-Real *et al.*, 1995). Das berechnete Molekulargewicht der mApe1 liegt bei 45 kDa und somit ist das gelelektrophoretische Laufverhalten etwas langsamer als erwartet. Metz und Röhm (1976) erklärten diese Beobachtung mit einer Modifikation durch Oligosaccharide, Klionsky *et al.* (1992) konnten allerdings zeigen, dass das Protein nicht glykosyliert ist. Die Reifung des Proteins ist abhängig von Proteinase A und B. In Proteinase A (*pep4 Δ*)-Deletionsstämmen ist nur die Vorläuferform (prApe1) nachweisbar und nach Klionsky *et al.* (1992) ist dieses Protein nicht aktiv, was auf den Verlust der Reifung von Proteinase B, die Proteinase A abhängig ist, zurückzuführen ist (Hemmings *et al.*, 1981; Moehle *et al.*, 1989). Diese Daten sind widersprüchlich mit Arbeiten unserer Arbeitsgruppe, wo *pep4*-Deletionstämme eine vergleichbare Wildtyp-Aktivität aufweisen (Andrei-Selmer *et al.*, 2001). Proteinase B prozessiert dann die intermediäre Form (iApe1) zu der stabilen, reifen mApe1 (Seguí-Real *et al.*, 1995).

Nach Synthese der prApe1 oligomerisiert das Protein mit einer Halbwertszeit von zwei Minuten zu einem Homododecamer. In der Vakuole wird die Prosequenz unter Erhalt

des oligomerisierten Proteins gespalten, das Molekulargewicht der prozessierten Form entspricht dann ca. 600 kDa (Kim *et al.*, 1997). 2007 wurden Kristalle der Aminopeptidase 1 generiert (Adachi *et al.*, 2007), die Bildung eines Dodecamers wurde dabei verifiziert. Bis jetzt wurde noch keine Kristallstruktur der Ape1 in Hefe veröffentlicht. Abbildung 6 zeigt die Kristallstruktur der Ape2 des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa*, das 48% Sequenzhomologie zur Ape1 in Hefe aufweist. Die Assemblierung zum Homododecamer ist für die Aktivität der Aminopeptidase 1 unerlässlich.

Die Aminopeptidase 1 ist eine Leucin-Exopeptidase, die die Spaltung N-terminaler Leucine von Polypeptiden in der Vakuole katalysiert. Methodisch lässt sich die Aktivität der Ape1 durch Spaltung des Substrats H-Leucin- β -Naphthylamid photometrisch bestimmen (Trumbly und Bradley, 1983; Andrei-Selmer *et al.*, 2001; 3.18). H-Leucin- β -Naphthylamid wird von allen in *S. cerevisiae* vorkommenden Aminopeptidasen katalytisch gespalten, die Ape1 besitzt jedoch die höchste Spezifität.

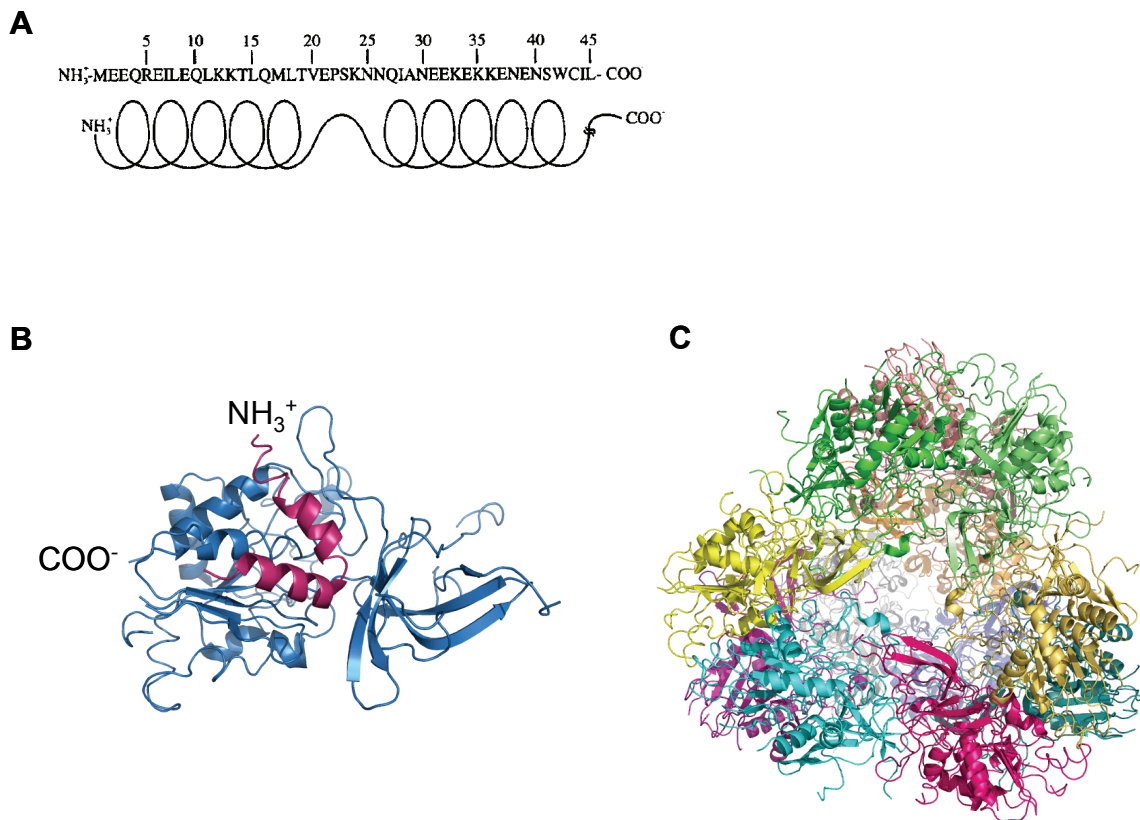


Abb.6: Sequenz des Ape1-Propeptids (*S. cerevisiae*) und Kristallstruktur der Ape2 aus *Pseudomonas aeruginosa*.

A Aminosäuresequenz und vorhergesagte Sekundärstruktur des Propeptids aus *S. cerevisiae*. Die ersten 18 Aminosäuren bilden eine amphipatische α -Helix, Aminosäuren 20-24 ein β -Faltblatt, gefolgt von einer zweiten α -Helix der letzten 20 Aminosäuren (Oda *et al.*, 1996). **B** Tertiärstruktur der Ape2 von *Pseudomonas aeruginosa*, das N-terminale Propeptid ist in violett dargestellt. **C** Homododacamerer-Komplex der Ape2 aus *Pseudomonas aeruginosa* (Min *et al.*).

2.11 Charakterisierung von Mutanten ohne Aminopeptidase 1-Aktivität

EMS-Mutagenese an Hefestämmen, defizient in allen vier Leucinaminopeptidasen, und anschließender Bestimmung der Ape1-Aktivität führte zur Isolierung von zwei Mutanten mit geringer (20%), bzw. keiner messbaren Aminopeptidase 1-Aktivität unter logarithmischen und hungerinduzierten Wachstumsbedingungen (Andrei-Selmer *et al.*, 2001). Die Mutanten wurden mit *via10* und *via14* für „vacuolar import and autophagocytosis“ bezeichnet. *APE1* wurde dabei als „single copy“-Plasmid (*pRS314-APE1* oder *pRS313-APE1*) in die Hefestämme transformiert. Die zwei

Mutanten zeigten eine geringere Expressionshöhe der Ape1 und eine Akkumulation der zytosolischen prApe1 im Vergleich zum Wildtyp (*WT*) in Western Blot-Analysen. Nach Induktion von Autophagie wurde ein Anstieg des prApe1-Imports in die Vakuole beobachtet, d.h. die Akkumulation von prApe1 in den Mutanten ist auf einen Defekt des Cvt-Transportweges zurückzuführen.

Zudem reagierte die prApe1 in beiden Mutanten sensitiver auf Proteasen wie Trypsin und Proteinase K. Des Weiteren wurde mit Glycerolgradienten die Assemblierung der prApe1 näher untersucht. In *WT*-Zellen akkumulieren 90% der pr- und mApe1 als Dodecamer, die Mutanten *via10* und *via14* zeigten hingegen Defekte in der Aggregation von prApe1-Komplexen, mApe1 akkumulierte weiterhin in Dodecameren. Die erhöhte Sensitivität auf Proteasen und die fehlerhafte Komplexassemblierung deuten auf eine nicht native Konformation der Ape1 in den Mutanten *via10* und *via14* hin.

Die Identifikation der *VIA10*- und *VIA14*-Gene könnte zur Charakterisierung neuer, evtl. Chaperon-ähnlicher Faktoren führen, die an der Formation nativer Ape1 Komplexe und der Ausbildung der Cvt-Vesikel beteiligt sind (Andrei-Selmer *et al.*, 2001). In zu diesem Zweck durchgeführten Komplementationsstudien wurden die Mutantenstämme mit einer „single copy“ genomischen DNA-Bank transformiert. Die DNA-Bank wurde aus dem parental *WT*-Stamm *C6C* (Kreuzung aus *SEY6211* (Robinson *et al.*, 1988) mit *II-17* (D.H. Wolf) transformiert mit *pRS313-APE1*) hergestellt. Genomische DNA wurde mit dem Restriktionsenzym *Sau3A I* verdaut und auf ein 1%-iges Agarosegel geladen. Banden von einer Größe zwischen 2000 und 5000 bp wurden aus dem Gel isoliert, aufgereinigt und in den mit *BamH I* verdauten Vektor *pRS316* kloniert und danach in *E.coli* (*DH5 α*) transformiert. Die aus den *E. coli*-Klonen isolierte DNA wurde in die Mutantenstämme *via10* und *via14* transformiert. Die Hefeklonen wurden mit Ape1-Overlay-Assays in Hinblick auf eine Wiederherstellung der Ape1-Aktivität untersucht. Bei diesem Screen wurde ein ca. 1.3 kb großer Genabschnitt auf Chromosom IV (Koordinaten: 1195168-1195325) isoliert. Dieser beinhaltet auf dem Watson-Strang einen kompletten ORF (*YDR360W*) und gegenüberliegend auf dem Crick-Strang den N-Terminus eines zweiten ORFs (*YDR359C*) (Abb.7), die sich mit 286 bp überlappen. *YDR360W* (435 bp) war bis dato ein hypothetischer ORF, wohingegen *YDR359C* (2949 bp) für ein beschriebenes Protein kodiert.

Chromosom IV

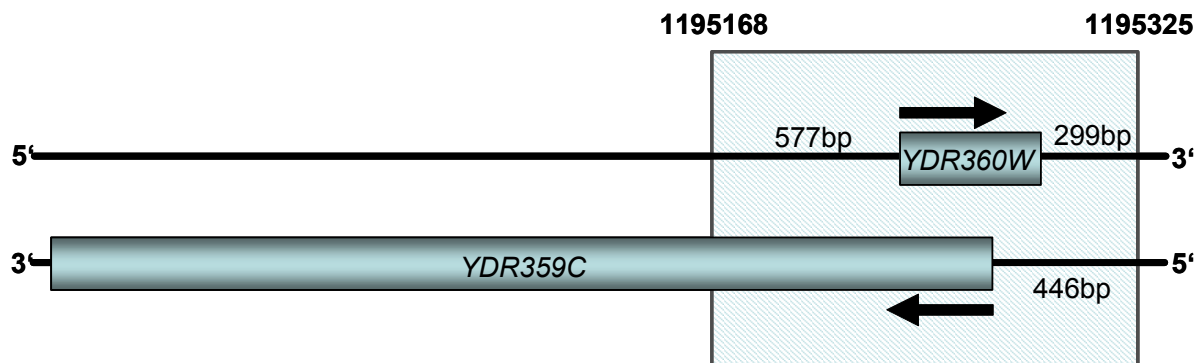


Abb.7: Genabschnitt auf Chromosom IV.

Durch Transformation einer „single copy“-DNA Bank wurde ein ca. 1.3 kb langer Genabschnitt (blau unterlegt) des Chromosoms IV mit den Koordinaten 1195168 bis 1195325 identifiziert, der eine Aktivierung der Ape1 in den *via* Mutanten bewirkt. Die beiden ORFs überlappen um 286 bp, entsprechend 95 Aminosäuren.

In der Dissertation von Pasupuleti Naga Rekha (2004) wurde der ORF *YDR360W* näher charakterisiert. Sequenzvergleiche des *WT*-Stammes mit den beiden Mutanten *via10* und *via14* zeigten, dass es auf diesem Genabschnitt keine Mutationen gab, die den Defekt erklären konnten. Deshalb wurde angenommen, dass *YDR360W* als Suppressor der Ape1-Aktivität fungiert. Das zu keiner klassifizierten Proteinfamilie gehörende Protein wurde *Suvia1* für „**sup**pressor of **via**“ genannt. Deletion des ORFs *YDR360W* (*ydr360wΔ*) führte zu einem Verlust der Aminopeptidase 1-Aktivität, während die Expression von *Suvia1* die Aktivität sowohl im *ydr360wΔ* Stamm, als auch in den beiden Mutanten wiederherstellte. *Suvia1* schien dabei die Ape1-Expression zu stabilisieren. Zudem war ein geringer Anstieg der Ape1-Expression zu beobachten. In der Studie wurde *Suvia1* zur Expressionskontrolle mit carboxyterminalem HA-„tag“ exprimiert. Das elektrophoretische Laufverhalten des Proteins entsprach nicht dem berechneten Molekulargewicht von 16 kDa, sondern lief langsamer bei ca. 48 kDa. *Suvia1*-HA wurde als zytoplasmatisches Protein beschrieben, das in mikroskopischen Untersuchungen in der Nähe des PAS lokalisierte. Eine Co-Lokalisation mit GFP-Atg8 konnte allerdings nicht bestätigt werden.

Zytosolisches *Suvia1*-HA eluiert von einer S200 Gelfiltrationssäule unter nicht denaturierenden Bedingungen bei ca. 200 kDa. *Suvia1*-HA könnte somit Teil eines

200 kDa Komplexes sein, der entscheidend die Konformation und damit die Aktivität der Ape1 beeinflusst.

2.12 Fragestellung

Die Aminopeptidase 1 (Ape1) ist eine Leucin-Exopeptidase, die die Spaltung N-terminaler Leucine von Polypeptiden in der Vakuole katalysiert. Ihre Aktivität kann mit der Spaltung des Substrats H-Leucin- β -Naphthylamid photometrisch verfolgt werden. Ape1 wird im Zytoplasma synthetisiert. Das Protein oligomerisiert zu einem sog. Cvt-Komplex, bestehend aus mehreren zu Homododecameren assemblierten Ape1-Molekülen, dem Ape1-Rezeptor Atg19 und dem Protein Ams1. Dieser wird in Cvt-Vesikeln verpackt in die Vakuole transportiert, wo das Protein unter Erhalt des Dodecamers prozessiert wird. Die komplizierten Vorgänge der Komplexassemblierung und Prozessierung sind noch weitgehend unerforscht.

Ein Komplementationsscreen an zwei Mutanten *via10* und *via14* führte zur Isolation eines bis dato zu keiner klassifizierten Proteinfamilie gehörenden Suppressorgens, *SUVIA1* (*YDR360W*) und dem 5'-Fragmentes des ORFs *YDR359C*. Dieser ORF kodiert für das verifizierte Protein Eaf1/ Vid21. Der Name Vid21 (**v**acuole **i**mport and **d**egradation) steht für eine potentielle Beteiligung des Proteins an dem Transport und der Degradation der Fruktose-1,6-bisphosphatase (FBPase) in der Vakuole (Hoffman und Chiang, 1996). Mit dem Namen Eaf1 (**E**sa1-**a**ssociated **f**actor) wurde das Protein 2004 als eine von dreizehn Untereinheiten des Histon Acetyltransferase Komplexes NuA4 (**n**ucleosome **a**cetyltransferase of **H4**) identifiziert (Krogan *et al.*, 2004).

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung der Proteine Suvia1 und Eaf1 für die Biogenese der Ape1 näher charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Organismen

3.1.1. *Escherichia coli*-Stämme

Tab.3: Genotyp der verwendeten *E.coli* Stämme

Stamm	Genotyp
XL1blue	<i>endA1, gyrA96, hsdR17</i> (r _K m _K), <i>lac, recA1, relA1, supE44, thi-1, F'</i> [<i>proAB, lacI^qZM15, TN10(Tet^r)</i>]
DH5α	f. Φ 80d <i>lacZM15(lacZya-argF)</i> , U169, <i>recA1, endA1, hsdR17</i> (r _K m _K)
BL21	F-, <i>ompT, hsdS</i> (r-B, m-B), <i>gal, dcm</i>

3.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Siehe Anhang

3.2 Nährmedien

Alle Mengenangaben beziehen sich auf ein Endvolumen von einem Liter. Die Reagenzien wurden in deionisiertem Wasser (dH₂O) gelöst und 20 bis 40 Minuten bei 120°C autoklaviert.

3.2.1 *Escherichia coli*-Medien

Lysogeny Broth-Medium (LB) 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl

SOC-Medium 20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0.58 g NaCl, 2.46 g MgSO₄, 4 g Glucose

Zur Herstellung ampicillin- oder kanamycinhaltigen Selektionsmedien wurde sterile Ampicillin-, bzw. Kanamycinlösung zu einer Endkonzentration von jeweils 50 µg/ml nach dem Autoklavieren zugegeben.

Agarplatten enthalten zusätzlich zu den oben genannten Inhaltsstoffen 20 g Agar.

3.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Medien

YP-Medium	20 g Pepton, 10 g Hefeextrakt
Geneticin-Medium	YP Medium versetzt mit Geneticin (G418, PAA), 200 mg/ml Endkonzentration
Benomyl-Medium	YP Medium versetzt mit in DMSO gelöstem Benomyl (Sigma), 5 oder 15 µg/ml Endkonzentration
SD-Leu-Medium	6.7 g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 1.205 g Aminosäurecocktail, 10 ml 100xAdenin, 100xUracil, 100xHistidin, nach dem Autoklavieren wurde 10 ml 100xTryptophan zugegeben
SD-His-Medium	6.7 g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 1.205 g Aminosäurecocktail, 10 ml 100xAdenin, 100xUracil, 100xLeucin, nach dem Autoklavieren wurde 10 ml 100xTryptophan zugegeben
SD-Ura-Medium	6.7 g Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 1.205 g Aminosäurecocktail, 10 ml 100xAdenin, 100xHistidin, 100xLeucin, nach dem Autoklavieren wurde 10 ml 100xTryptophan zugegeben
100xAminosäure-Lösungen	600 mg L-Leucin, 400 mg Adenin Hemisulfatsalz, 400 mg Uracil, 400 mg L-Histidin-HCL, jeweils in 200 ml deionisiertem Wasser gelöst und autoklaviert.
100xTrp	400 mg L-Tryptophan, gelöst in 200 ml deionisiertem Wasser und steril filtriert

Aminosäure-Cocktail 900 mg Lysin-HCL, 4500 mg L-Valin, 900 mg L-Isoleucin, 600 mg L-Arginin-HCL, 600 mg L-Methionin, 900 mg L-Tyrosin, 1500 mg L-Phenylalanin, 3000 mg L-Glutaminsäure, 11.25 g L-Serin, 12 g L-Threonin

Die Aminosäuren wurden gemörsert und 1.205 g pro Liter eingesetzt.

Agarplatten enthalten zusätzlich 20 g Agar pro Liter. Nach dem Abkühlen auf ca. 60°C wurde den Medien 2% Glucose oder 2% Galaktose aus einer 20% Glucose-, bzw. Galaktoselösung zugesetzt.

3.3 Puffer

10xTE-Puffer 100 mM Tris/HCl (pH7.5), 10 mM EDTA, mit H₂O ad 1 Liter

10xTAE-Puffer 48.4 g Tris, 11.42 ml Essigsäure (98%), 10 mM EDTA, mit H₂O ad 1 Liter

10xPBS-Puffer 14.4 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 2.4 g KH₂PO₄, 2 g KCl, 80 g NaCl mit H₂O ad 1 Liter

20xTBS-Puffer 150 mM (175.32 g) NaCl, 25 mM (60.57 g) Tris mit H₂O ad 1 Liter, pH7.4

20xSSC-Puffer 175.32 g NaCl, 88.22 g Trinatriumcitrat-2-hydrat mit H₂O ad 1 Liter, pH7.0

20xSCP-Puffer 2 M Natriumchlorid, 0.6 M Dinatrium-Hydrogen-Phosphat, 0.02 M EDTA, pH6.2

Weitere Puffer sind direkt zu den Methoden angegeben.

3.4 Größenstandards

3.4.1 DNA-Größenstandard

Hartley and Gregori *et al.* (1981)

1 Kb DNA-Leiter 1.0 mg/ml (Invitrogen) (Abb.8)

Von diesem Größenstandard wurden je 10 μ l auf ein Agarosegel aufgetragen.

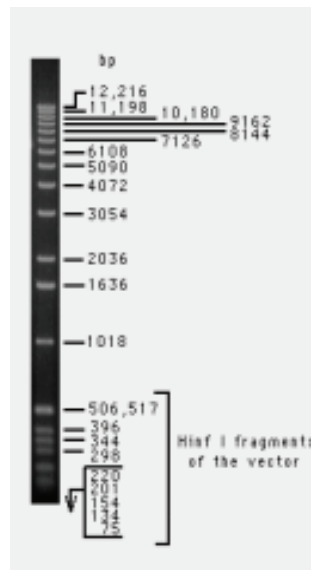


Abb.8: 1 Kb DNA-Leiter aufgetrennt auf einem 1%-igen Agarosegel.

3.4.2 Protein-Größenstandards für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Prestained Precision Plus Protein Marker All Blue (BioRad): 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 37 kDa, 50 kDa, 75 kDa, 100 kDa, 150 kDa, 250 kDa

Auftragsvolumen:

Mini-Gel: 6 μ l

Großes-Gel: 15 μ l

3.5 Vektoren

Tab.4: In dieser Arbeit verwendete Vektoren.

Vektor	Funktion	Selektion	Referenz
<i>YEp13</i>	Proteinexpression in Hefe, „genomic library vector“	Amp ^r , <i>LEU2</i>	Broach <i>et al.</i> , 1979: Nasmyth und Tatchell, 1980
<i>pFA6a-HIS3MX6</i>	Generation von Deletionsstämmen in Hefe	Amp ^r , <i>HIS3</i>	Wach <i>et al.</i> , 1994
<i>pGBT9</i>	<i>GAL4</i> -DNA-Bindevektor in Hefe (Y2H)	Amp ^r , <i>TRP1</i>	Clontech Laboratories, Inc.
<i>pGBKT7</i>	<i>GAL4</i> -DNA-Bindevektor in Hefe (Y2H)	Amp ^r , <i>TRP1</i>	Clontech Laboratories, Inc.
<i>pGADT7</i>	<i>GAL4</i> -Aktivierungsdomäne in Hefe (Y2H)	Amp ^r , <i>LEU2</i>	Clontech Laboratories, Inc.
<i>pRS313-316</i>	Proteinexpression in Hefe	Amp ^r , <i>HIS3</i> , <i>TRP1</i> , <i>LEU2</i> , bzw. <i>URA3</i>	Sikorski und Hieter <i>et al.</i> , 1989
<i>pRS303-306</i>	integrierende Vektoren zur Proteinexpression in Hefe	Amp ^r , <i>HIS3</i> , <i>TRP1</i> , <i>LEU2</i> , bzw. <i>URA3</i>	Sikorski und Hieter <i>et al.</i> , 1989
<i>pYX141, 142, 242 und 132</i>	Proteinexpression in Hefe, C-terminaler HA-tag	Amp ^r , <i>LEU2</i> , bzw. <i>TRP1</i>	Foreman und Davis, 1994; Hans-Dieter Schmitt, MPI Göttingen
<i>pYX141 und 242-3xHA</i>	Proteinexpression in Hefe, C-terminaler 3xHA-tag	Amp ^r , <i>LEU2</i>	diese Arbeit
<i>pYX141-, 142- und 242-HA</i>	Proteinexpression in Hefe, N-terminaler HA-tag	Amp ^r , <i>LEU2</i>	diese Arbeit

3.6 Kultivierung von Mikroorganismen

3.6.1 Vermehrung von *E. coli*-Zellen

E.coli Zellen wurden auf LB-Ampicillin oder Kanamycin-Platten bei 37°C im Brutschrank vermehrt. Flüssigkulturen von *E.coli* wurden in LB-Ampicillin oder Kanamycin-Medium bei 37°C in Reagenzgläsern (2-3 ml) oder in Erlenmeyerkolben (50 – 500 ml) auf einer Schüttelplattform bei 250 rpm angezogen.

3.6.2 Vermehrung von *S. cerevisiae*

Das Wachstum von Hefezellen auf Festmedium erfolgte bei 30°C im Brutraum oder Brutschrank. Anzuchten in Flüssigmedium wurden bei 30°C in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben bei 220 rpm im Brutraum oder Brutschrank geschüttelt. Eine frische Übernachtskultur wurde in der Regel 1:20 in YPD-Medium auf eine OD₆₀₀ 0.3-0.4 verdünnt und bis zum Erreichen der logarithmischen Phase (OD₆₀₀ von ca. 1.0) inkubiert.

3.7 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde durch photometrische Messungen bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Als Nullwert diente das Medium, in dem die Zellen angezogen wurden. Dabei entspricht einer optischen Dichte von OD₆₀₀ = 1, ca. 2×10^7 Zellen/ml (Hefe), bzw. ca. 3×10^8 Zellen/ml (*E.coli*).

3.8 Isolierung von DNA und RNA

3.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* über QIAprep Spin Plasmid Miniprep Säulen

QIAprep Spin Säulen, Puffer aus QIAprep Spin Plasmid Miniprep Set (Qiagen).
Genauere Angaben zu Puffern und Säulenmaterial sind dem QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit zu entnehmen.

2-3 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Ampicillin oder -Kanamycin Medium.

Die *E. coli*-Übernachtskulturen wurden abzentrifugiert und in 250 µl gekühltem P1 Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl P2 Lysepuffer und anschließend 350 µl N3 Neutralisationspuffer wurde das Zellysate bei 13000 rpm 10 Minuten sedimentiert, der klare Überstand auf eine QIAprep Minisäule aufgetragen und wieder 1 Minute zentrifugiert. Die an die Säulenmembran gebundene Plasmid-DNA wurde mit 750 µl PB Puffer gewaschen und die DNA am Ende durch Zugabe von 30-50 µl H₂O eluiert.

3.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* über QIAprep Spin Plasmid Midiprep Säulen

QIAprep Spin Säulen, Puffer aus HiSpeed Plasmid Midi Kit (Qiagen)

Genauere Angaben zu Puffern, Säulenmaterial und Vorgehensweise sind dem HiSpeed Plasmid Midi Kit zu entnehmen

50-100 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur in LB-Ampicillin- oder -Kanamycin-Medium.

3.8.3 Isolierung genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

SCE-Puffer: 1 M Sorbitol, 0.1 M Natriumcitrat, 0.06 M EDTA pH7.0

Sphäroblastierungspuffer: 2 mg Zymolyase 5000 (T20) und 0.8 µl 2-Mercaptoethanol in 1 ml SCE-Puffer

SDS-Lösung: 2% SDS, 0.1 M Tris/HCl pH9.0, 0.05 M EDTA

Ammoniumacetat-Lösung: 5 M Ammoniumacetat

Kaliumacetat-Lösung: 5 M Kaliumacetat

1xTE-Puffer

5 ml einer Übernachtskultur von *S. cerevisiae* in YPD-Medium wurden zwei Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Hefezellen in 1 ml H₂O gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 0.2 ml Sphäroblastierungspuffer resuspendiert und 30-60 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Proben wurden zwischenzeitlich 2-3 kurz geschüttelt. Der Abbau der Zellwände durch Zymolyase wurde anhand der Zellen vermengt mit einem Tropfen 0.1% SDS mikroskopisch verfolgt.

Nach Zugabe von 0.2 ml SDS-Lösung wurde die lysierte Probe gemischt und fünf Minuten bei 65°C erhitzt. Nach Hinzufügen von 0.2 ml 5 M Kaliumacetat folgte ein Kälteschritt für 20 Minuten bei 0°C. Die Probe wurde anschließend fünf Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, 400-500 µl des Überstands in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0.2 ml 5 M Ammoniumacetat gemischt, 1 ml Isopropanol zugegeben und bei 3000 rpm 15-30 Sekunden zentrifugiert. Das Pellet wurde in 90 µl 1xTE-Puffer gelöst.

Für den nächsten Reinigungsschritt wurde die gelöste DNA mit 10 µl 5 M Ammoniumacetat versetzt und mit 200 µl 100%-igem Ethanol gefällt. Nach einer kurzen Zentrifugation (30 Sekunden bei 3000 rpm) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das verbleibende Pellet zweimal in 80% Ethanol gewaschen.

Das getrocknete Pellet wurde in 50 µl 1xTE-Puffer gelöst. Für einen Restriktionsverdau wurden 5 µl dieser Lösung in einem Gesamtvolumen von 30 µl eingesetzt.

3.8.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Breaking Puffer: 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH8.0, 1% (w/v)

SDS, 2% (v/v) Triton X-100

Glasperlen (Ø 0.45 mm)

Phenol/Chloroform: im Verhältnis 1:1, äquibriert und überschichtet mit 1xTE-Puffer

100% Ethanol

70% Ethanol

3 M Natriumacetat pH5.2

1.5 ml einer Übernachtskultur wurden geerntet (1 Minute, 13000 rpm). Die Zellen wurden einmal in Wasser gewaschen und in 200 µl Breaking Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von ca. 200 µl Volumen Glasperlen und 200 µl Phenol/Chloroform wurden die Zellen 5 Minuten bei 4°C auf dem IKA-Vibrax bei maximaler Geschwindigkeit aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert (10 Minuten, 13000 rpm). 50 µl der obersten Phase wurden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die DNA mit 5 µl Natriumacetat und 140 µl kaltem 100%-igem Ethanol gefällt. Die Proben wurden 20 Minuten bei -80°C inkubiert. Nach Zentrifugation (10 Minuten, 13000 rpm) wurde der Überstand verworfen, das Pellet einmal mit 70%-igem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 30 µl H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Je 1-2 µl der aufgereinigten DNA wurden bei einer Transformation in *E. coli* eingesetzt.

3.8.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus *S. cerevisiae*

1xTE-Puffer

Glasperlen (Ø 0.45 mm)

Phenol/Chloroform: im Verhältnis 1:1, äquibriert und überschichtet mit 1xTE-Puffer

Cross RNA-Puffer 1: 0.3 M NaCl, 10 mM Tris pH7.5, 1 mM EDTA, 0.2% SDS

(Lagerung bei 4°C)

Cross RNA-Puffer 2: 1xTE-Puffer, 0.2% SDS

Eine frische Übernachtskultur von *S. cerevisiae* wurde auf eine OD₆₀₀ von 0.2 bis 0.3 in 20 ml YPD Medium verdünnt und 4 bis 5 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ 0.7- 0.8 durch Zentrifugation geerntet (3500 rpm, 3 Minuten, 4°C), mit eisgekühltem 1xTE-Puffer gewaschen und dabei in ein 2 ml Eppendorf-Reagenzgefäß überführt. Die Pellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Für den Zellaufschluss wurden ca. 250 µl Glasperlen, 350 µl Phenol/Chloroform und 350 µl Cross RNA Puffer I auf das gefrorene Pellet gegeben. Die Eppendorf-Reagenzgefäße wurden 15 Minuten im Kühlraum auf dem IKA-Vibrax bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation (14000 rpm, 10 Minuten, 4°C) wurde die obere wässrige Phase in einem 2 ml Eppendorfgefäß mit 1.5 ml gekühltem (-20°C) Ethanol gemischt und für 10 Min. bei -20°C gefällt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (10 Minuten, 14000 rpm) sedimentiert. Das Pellet wurde in Cross RNA Puffer II durch fünfminütige Inkubation bei 65°C unter leichtem Schütteln gelöst. Zur Konzentrationsbestimmung wurden die RNA-Proben 1:300 in 1xTE-Puffer verdünnt und die Absorption bei 260 nm im Spektralphotometer bestimmt. RNA-Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

DNase I Verdau gereinigter Gesamt-RNA

Mit einem DNase I Verdau wurden DNA-Kontaminationen aus RNA Proben entfernt.

DNase I Verdau:

40 µl RNA-Probe

2.5 µl 1 M Tris/HCl pH7.5 (in DEPC- H₂O)

0.5 µl 1 M MgCl₂ (in DEPC- H₂O)

0.1 µl DNase I (Invitrogen, 151 U/µl)

0.25 µl RNaseOUT Ribonuclease (Invitrogen, 40 U/µl)

ad 50 µl DEPC-H₂O

Der enzymatische Verdau wurde bei 37°C für mindestens 20 Minuten inkubiert. Die Aufreinigung erfolgte wie in Methode 3.12.1 beschrieben.

3.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde in Quarzküvetten photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Dabei entspricht der Absorptionswert von $OD_{260}=1$ einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA oder 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA.

3.10 Reinigung von DNA und RNA

3.10.1 Fällung von DNA durch Ethanol

Natriumacetat-Lösung: 3 M Natriumacetat pH5.5

100% und 70% Ethanol

1xTE-Puffer

Die Reinigung und Konzentrierung von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung erfolgte durch Fällung. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat pH5.5 gemischt und anschließend 2 Volumen 100%-igen Ethanol zugegeben, gut gemischt und für 10 Minuten bei -20°C inkubiert. Die präzipitierte DNA wurde durch zehnmütiges Zentrifugation bei 13000 rpm sedimentiert. Der Niederschlag wurde zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur oder in der Speed Vac Concentrator (Bachofer, Reutlingen) getrocknet und in einem kleinen Volumen (z.B. 20-50 μl) 1xTE-Puffer oder H_2O gelöst.

3.10.2 Phenol-Chloroform-Extraktion von DNA

P/C/TE: Phenol/Chloroform im Verhältnis 1:1, mit 1xTE-Puffer äquilibriert und überschichtet.

Proteine und andere Verunreinigungen wurden aus einer wässrigen DNA-Lösung durch Extraktion mit Phenol/Chloroform entfernt. Dazu wurde die Probe mit gleichem Volumen Phenol/Chloroform/TE gut gemischt (Vortex) und anschließend zur Phasentrennung 5 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige, DNA-

haltige Phase wurde in ein neues Reagenzgefäß überführt. Die extrahierte DNA wurde mit Natriumacetat und Ethanol präzipitiert (siehe 3.10.1).

3.10.3 Aufreinigung DNase I behandelter RNA-Präparationen

Phenol/Chloroform/Isopropanol im Verhältnis 25:24:1

Isopropanol

3 M Natriumacetat pH4.8

70% Ethanol (in DEPC-H₂O)

DEPC-H₂O

Zu der mit DNase I behandelten RNA-Probe wurde 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isopropanol gegeben und 2 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Die oberste, wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Durch Zugabe von 0.1 Volumen 3 M Natriumacetat und 1 Volumen Isopropanol wurde die RNA gefällt und anschließend 15 Minuten bei 13000 rpm (4°C) abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal in 70%-igem Ethanol gewaschen und bei 37°C getrocknet. Die RNA wurde in 20-50 ml DEPC-H₂O bei 42°C für 10 Minuten gelöst und bei -80°C gelagert. Die RNA-Konzentration wurde bei OD₂₆₀ bestimmt.

3.11 Enzymatische Reaktionen mit DNA und RNA

3.11.1 *In vitro* Synthese spezifischer DNA-Fragmente mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei diesem Verfahren erfolgt eine *in vitro* Amplifikation von linearen DNA-Fragmenten. Für diese enzymatische Reaktion werden zwei spezifische Primer benötigt, die das zu amplifizierende Fragment flankieren und deren Sequenz zu jeweils einem der beiden DNA-Stränge komplementär ist. Als Matrize kann sowohl Plasmid-DNA, cDNA als auch chromosomale DNA dienen.

Der PCR-Zyklus beginnt mit der Auftrennung des DNA-Doppelstranges, danach erfolgt eine Anlagerungsphase, in der sich Hybridmoleküle aus den DNA-Einzelsträngen und den Oligonukleotiden bilden. Während der Synthesephase bei ca. 72°C dienen die 3'-Enden der Primer als Ansatzstelle für die DNA-Polymerase.

Für analytische Zwecke wurde Taq-Polymerase (Roche) und für Klonierungen wurde aufgrund ihrer „proofreading“-Aktivität High Fidelity Polymerase (Roche) verwendet. Für eine sog. „Whole Cell“-PCR wurden Zellen einer durchschnittlichen großen Zellkolonie fünf Minuten in 10 ml Zymolyase Lösung (2.5 mg/ml Zymolyase T100 (Seikagaku), 1.2 M Sorbitol, 0.1 M di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat pH7.4) bei 37°C inkubiert. 2 µl dieser sphäroblastierten Zellen wurden in einem PCR-Ansatz eingesetzt.

Ein Standard-PCR-Ansatz für ein Gesamtvolumen von 50 µl enthält:

ca. 10 ng Plasmid-DNA, 2 µl sphäroblastierte Zellen oder 1 µl chromosomale DNA
 je 100 pmol Primer
 0.1 Volumen 10xPCR Reaction Buffer + MgCl₂ (Roche) oder 10xExpand High Fidelity Buffer + MgCl₂ (Roche)
 2 µl 10 mM dNTP-Mix (aus je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, Roche)
 1 µl Taq- oder High Fidelity Polymerase (Roche)

Programme der PCR Maschine (Eppendorf, Mastercycler gradient)

Zustand	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95°C	4 Minuten
	94°C	1 Minute
Anlagerung	53°C	1 Minute
Extension	72°C	1 Minute/1kb
Anzahl der Zyklen		29x
Ende	4°C	unendlich

Nach Beendigung der PCR Reaktion wurde das Produkt auf ein Agarosegel geladen. Die präperative Aufreinigung aus dem Gel erfolgte wie in Methode 3.12.1 beschrieben.

3.11.2 Reverse Transkription von RNA

Puffer, dNTPs, RNase-freies H₂O und Enzym stammten aus dem Omniscript^R RT Kit (200) von Qiagen. Für die Reverse Transkription von RNA wurden eingesetzt:

2-5 µg RNA

2 µl poly-T18 Oligo (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTGCGGCCGC-3')

2 µl 10xPuffer RT

2 µl dNTP Mix (5 mM/dNTP)

1 µl Omniscript Reverse Transcriptase

ad 20 µl RNase-freies Wasser

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert und danach 10 Minuten bei 72°C abgestoppt. Für die anschließende PCR wurden 2.5 µl des RT-PCR Ansatzes und der mit DNase I behandelten Ausgangs-RNA als Kontrolle eingesetzt.

3.11.3 Restriktionsverdau von DNA

10xReaktionspuffer (NEBuffer 1,2,3,4 von New England BioLabs)

10xBSA (10 mg/ml)

Restriktionsenzyme (New England BioLabs)

6xDNA-Auftragspuffer: 30 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau in 1xTE-Puffer (steril filtriert)

Standard-Restriktionsansatz:

0.5-1 µg DNA

0.1 Volumen 10x Reaktionspuffer

50-100 µg BSA (falls empfohlen)

2-4 U Restriktionsenzym

ad 20 µl H₂O

Meist wurde 1-2 Stunden bei der für die jeweiligen Enzyme optimalen Temperatur inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 5 µl DNA-Auftragspuffer versetzt und über Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Restriktionsverdau für PCR-Produkte:

30 µl gereinigtes PCR-Produkt
0.1 Volumen NEBuffer
1 µl 10xBSA
10 U Restriktionsenzym
ad 40-50 µl H₂O
2-3 h bei 37°C

Die verdauten PCR-Produkte wurden mit 3 Volumen QG-Puffer versetzt und erneut mit dem QIAquick™ Gelextraktionskit (Methode 3.12.1) aufgereinigt. Das Elutionsvolumen betrug ca. 30-40 µl.

Restriktionsverdau für Vektor-DNA:

10 µl Vektor-DNA (ca. 5-10 µg)
0.1 Volumen NEBuffer
1 µl 10xBSA
10 U Restriktionsenzym
ad 30-50 µl H₂O
2-4 h bei 37°C

Die verdauten Vektoren wurden anschließend auf ein Agarosegel geladen und isoliert. Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick™ Gelextraktionskit (Methode 3.12.1).

3.11.4 Dephosphorylierung linearisierter Vektoren

10xDephosphorylierungspuffer (Roche)
Alkalische Phosphatase (Roche)
125 mM EDTA

Um an den freien 5'-Enden der linearisierten Vektoren die Phosphatgruppen zu entfernen und somit Religationen nach Vektorverdauen mit nur einem Enzym zu vermeiden, bzw. reduzieren wurden diese dephosphoryliert.

Der verdaute Vektor wurde mit 0.1 Volumen 10xDephosphorylierungspuffer und 1 U alkalische Phosphatase (Roche) versetzt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum

Abstoppen der Reaktion wurde 5 mM EDTA zugeben und der Ansatz 10 Minuten auf 65-75°C erhitzt.

3.11.5 Ligation von DNA-Fragmenten

10xLigasepuffer (NewEngland BioLabs)

T4-DNA-Ligase (NewEngland BioLabs)

Die Ligation doppelsträngiger linearer DNA-Fragmente ist Ausbildung einer Phosphodiester Bindung der 3'-Hydroxylgruppe eines Nukleotids mit der 5'-Phosphatgruppe eines anderen. Die T4-DNA-Ligase ist für diese kovalente Verknüpfung verantwortlich.

Standard Ligationsansatz:

2 µl linearisierte Vektor-DNA

4 µl PCR-Fragment

0.1 Volumen 10xLigasepuffer

2 U T4-DNA-Ligase

ad 10 µl H₂O

Der Ligationsansatz wurde 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 15°C inkubiert. Für die anschließende Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen wurden 2-5 µl des Ligationsansatzes eingesetzt.

3.12 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

6xDNA-Auftragspuffer: 30 % Glycerin, 0.25 % Bromphenolblau in 1x TE-Puffer

10xTAE-Puffer: 48.4 g Tris Base, 11.42 ml Essigsäure (98%), 20 ml 500 mM EDTA
pH8.0, ad 1 Liter H₂O

Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml)

Agarose (Roth)

Aufgrund ihrer negativen Ladung können Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. In der Regel wurden Gele mit 1-2% Agarose hergestellt. Dabei wurde die Agarose in 1xTAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und nach Abkühlen auf ca. 60°C Ethidiumbromid (Endkonzentration: 5 mg/ml) zugegeben. Die Agaroselösung wurde in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Das erhärtete Gel wurde in eine mit 1xTAE-Puffer gefüllte Gelkammer gesetzt und die mit 6xDNA-Auftragspuffer versetzten DNA Proben konnten aufgetragen werden. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung (5-12 V/cm).

DNA-Banden wurden durch Anregung der Fluoreszenz der Ethidiumbromid-DNA-Komplexe im UV-Licht nachgewiesen und photographiert oder für präperative Zwecke ausgeschnitten. Mit Hilfe eines Molekulargewichts-Standard (1Kb DNA-Leiter 1.0 mg/ml von Invitrogen) konnten die DNA-Fragmente zugeordnet werden.

3.12.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen mit dem QIAquick™ Gelextraktion-Kit

QG-Puffer: siehe QIAquick™ Gelextraktion Kit

PE-Puffer: siehe QIAquick™ Gelextraktion Kit

Elutionspuffer: 10 mM Tris/HCl pH8.5 oder H₂O

Die Isolierung erfolgte gemäß der Anleitung für QIAquickspin-Säulen (QIAquick Spin Handbook). Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde das entsprechende DNA-Fragment unter langwelligem UV-Licht (365 nm) aus dem Agarosegel ausgeschnitten und das Gelstück gewogen. Dann wurden 3 Volumen QG-Puffer dazugegeben und die Agarose durch Erhitzen auf 50°C (10 Minuten) im

Thermomixer unter Schütteln gelöst. Anschließend wurde die Probe auf eine QIAquickspin-Säule geladen. Nach Zentrifugation (14000 rpm, 1 Minute) wurde der Durchlauf verworfen und mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und erneut 1 Minute zentrifugiert. Nach Entfernen des Durchlaufes und einer weiteren Zentrifugation zur Entfernung aller Pufferreste wurde die Säule in ein 1.5 ml Eppendorf-Reagenzgefäß überführt, zum Eluieren der DNA 30-40 µl Elutionspuffer oder H₂O auf das Gelbett pipettiert und erneut eine Minute zentrifugiert.

3.13 DNA-Sequenzierung

Plasmid-DNA wurde mit einem ABI PRISM^R 3100 Sequenzierautomat (Applied Biosystems) nach Sanger sequenziert. Der Sequenziermix beinhaltet ein Gemisch aus allen vier unmarkierten und Fluoreszenz-markierte Nukleotiden.

Standard Sequenzieransatz:

1 µl Plasmid-DNA (0.2-0.5 mg)

1 µl 5'- oder 3'- Primer (100 pmol/□ml)

1.5 µl Sequenzierpuffer (ABI PRISM^R)

1.5 µl ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Premix

ad 10 µl HPLC-H₂O

Sequenzier-Programm:

Zustand	Temperatur	Zeit
Denaturierung	96°C	10 Sekunden
Anlagerung	50°C	5 Sekunden
Extension	60°C	4 Minuten
Anzahl der Zyklen		25x
Ende	4°C	unendlich

Danach wurde die Sequenzierreaktion von überschüssigen, freien Fluoreszenz-markierten dNTPs gereinigt. Das PCR-Produkt wurde mit 2 µl 3 M Natriumacetat (pH5.2) und 50 µl 95% Ethanol für fünf Minuten bei Raumtemperatur gefällt. Das Präzipitat wurde bei 13000 rpm für 20 Minuten sedimentiert. Das Pellet wurde danach mit 250 µl 75% Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 10 Minuten), getrocknet und anschließend in 15 µl Formamid gelöst.

3.14 Transformationstechniken

3.14.1 Transformation von *E.coli* Zellen über Elektroporation

Beim Elektroporationsverfahren werden die Zellmembranen der in Suspension befindlichen Empfängerzellen durch kurze elektrische Pulse hoher Feldstärke für hochmolekulare Moleküle durchlässig gemacht. Die Plasmid-DNA-Lösung sollte für die Transformation einen niedrigen Salzgehalt aufweisen um einen Kurzschluss zu vermeiden.

Herstellung elektrokompetenter *E.coli*-Zellen

LB-Flüssigmedium

kaltes, steriles H₂O

10% Glycerol

Eine Übernachtskultur *E.coli*-Zellen wurde 1:100 in 1000 ml LB-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 – 0.8 vermehrt (logarithmische Phase). Die Zellen wurden für 15 Minuten auf Eis gekühlt und durch Zentrifugation geerntet (4°C, 15 Minuten, 4000 g). Das Pellet wurde zunächst zweimal mit kaltem Wasser (1 Liter bzw. 0.5 Liter) und anschließend mit 20 ml 10%-igem Glycerol gewaschen. Die Zellen wurden schließlich in einem Endvolumen von 2-3 ml 10%-igem Glycerol resuspendiert. Die Suspension wurde in Aliquots von je 100 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei –80°C gelagert.

Elektroporation

Für Transformationen wurden 50 µl der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 0.3–0.5 µl Plasmid-DNA oder 2-5 µl eines Ligationsansatzes versetzt. Der Transformationsansatz wurde dann in eine vorgekühlte 0.2 cm breite, UV-bestrahlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe eines „Gene Pulsers“ (Biorad), der bei einem Vorwiderstand von 200 W einen Puls der Spannung 1.8 kV auslöste. Die gemessenen Zeitkonstanten lagen bei einer erfolgreichen Elektroporation bei 4.0-5.5 ms. Die Zellen wurden in 500 ml LB- oder SOC-Medium

aufgenommen und zur Regeneration für ca. 45 Minuten bei 37°C inkubiert. 50-100 ml bei Re-Transformationen oder der gesamte Ansatz bei Ligationen, wurden auf mit Antibiotika versetzten LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.14.2 Transformation von Hefe nach der Lithiumacetat-Methode

Waschpuffer: 0.1 M Lithiumacetat in 1x TE-Puffer, steril filtriert

PEG/LiAcetat-Puffer: 40% Polyethylenglycol und 0.1 M Lithiumacetat in 1x TE-Puffer, steril filtriert

Heringssperma-DNA (11 mg/ml, Sigma), 10 Minuten auf 95°C erhitzt

2-5 ml einer Hefe-Übernachtkultur wurden in 50 -100 ml YPD-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0.2-0.4 angeimpft und bei 30°C 4-5 Stunden bis zu einer von OD₆₀₀ 0.6-1.0 schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (3 Minuten, 2800 rpm), mit 10 ml Wasser und anschließend mit 10 ml Waschpuffer gewaschen, danach in 0.2 ml Waschpuffer resuspendiert und auf Eis gelagert. Für die Transformation wurden 5 µl Heringssperma-DNA und 5 µl der zu transformierenden DNA in einem 2.2 ml Eppendorf-Gefäß gemischt und mit 50 µl der Zellsuspension versetzt. Nach Zugabe von 300 µl PEG/LiAcetat-Puffer wurden die Ansätze erst für 30 Minuten bei 30°C und dann für 15 Minuten bei 45°C inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann auf Selektionsplatten (SD-Platten) ausplattiert und 2-5 Tage bei 30°C inkubiert. 4-8 Einzelklone wurden dann erneut auf Selektionsplatten vereinzelt und nach weiteren 2-3 Tagen getestet.

Integrative Transformation von Plasmiden oder PCR-Produkten

Bei Integration des transformierten Plasmids in das Hefegenom, wurde die Plasmid-DNA vor der Transformation enzymatisch geschnitten. Der Verdau wurde mit 20 mM EDTA gestoppt und 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Danach wurde das DNA-Gemisch präzipitiert (Methode 3.10.1) und in einem Endvolumen von 20 µl H₂O gelöst. 5 µl des linearisierten Plasmids wurden für eine Transformation eingesetzt.

Bei Integration von PCR-Produkten wurde das PCR-Produkt auf ein Agarosegel aufgetragen, die DNA ausgeschnitten und aufgereinigt (Methode 3.12.1). 5-10 µl der PCR wurden für die Transformation verwendet. Die Hefezellen wurden nach einem

Hitzeschritt kurz abzentrifugiert, mit 2 ml YPD-Medium versetzt und 2-3 Stunden bei 30°C schüttelnd (220 rpm) inkubiert. Nach der Regenerationsphase wurden die Zellen erneut kurz zentrifugiert und in 200 µl H₂O aufgenommen und auf entsprechenden Mangelmediumplatten selektioniert.

3.15 Bestimmung des Paarungstyps

Zur Bestimmung des Paarungstyps wurden die Testerstämme y93 (Mata) und y94 (Mata) verwendet. Diese beiden Stämme tragen das seltene Allel *his1*. Die zu testenden Stämme (A-D) wurden mit den Testerstämmen kreuzweise auf Histidin-Selektionsplatten ausgestrichen und 2-4 Tage bei 30°C inkubiert. Stämme mit unterschiedlichen Paarungstypen konnten sich paaren und wuchsen (Abb.9).

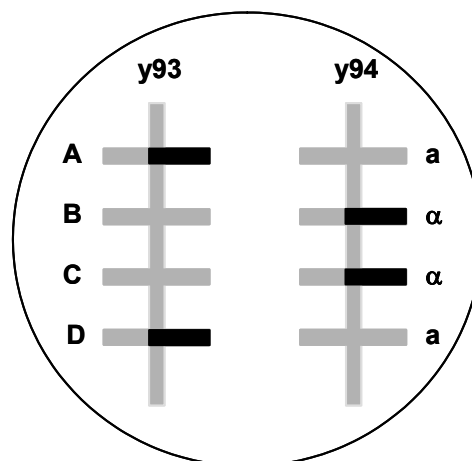


Abb.9: Beispiel zum Ausstrich einer Paarungstyp-Testerplatte.

Graue Balken – kein Wachstum, Schwarze Balken – Wachstum auf Histidin-Mangelmedium.

3.16 Vakuolenisolierung aus *S. cerevisiae*

(nach Bankaitis *et al.*, 1986)

10 mM Tris/SO₄, pH9.4, 10 mM DTT

0.6 M Sorbitol, 0.2 M Imidazol, pH6.5

0.2 M Sorbitol, 0.2 M Imidazol, pH6.5

Zymolyase T100 (Seikagaku) (1 mg/ml Endkonzentration in 0.6 M Sorbitol, 0.2 M Imidazol, pH6.5)

DEAE-Dextran (Sigma) (4 mg/ml 15% Ficoll)

15%, 8% und 4% Ficoll in 0.2 M Sorbitol, 0.2 M Imidazol, pH6.5

Ultra-Clear™ Tubes (14x89 mm, Beckmann)

500 OD Hefezellen wurden einmal in dH₂O gewaschen und anschließend in 20 ml 10 mM Tris/SO₄, pH9.4, 10 mM DTT resuspendiert und 20 Minuten bei 30°C schüttelnd (100 rpm) inkubiert. Nach Zentrifugation (3 Minuten, 4000 rpm) wurden die Zellen in 25 ml 0.6 M Sorbitol, 0.2 M Imidazol, pH6.5 mit 5 mg Zymolyase T100 für mindestens 30 Minuten bei 30°C (80 rpm) sphäroblastiert. Der Verlauf des Verbaus der Zellwände wurde photometrisch überprüft. Eine 1:10 Verdünnung sollte eine um mindestens 60-70% geringere OD₆₀₀ aufweisen als das ebenso verdünnte Ausgangsmaterial. Danach wurden die Proben 5 Minuten auf Eis gekühlt und anschließend zentrifugiert (3 Minuten, 3000 rpm bei 4°C). Das Pellet wurde in 1.5 ml 15% Ficoll langsam resuspendiert. Die Zellen wurden durch Titration von 450 µl DEAE-Dextran lysiert, 1 Minute auf Eis und anschließend 5 Minuten bei 30°C im Wasserbad inkubiert. 150 µl der Ansätze wurden für einen späteren α-Mannosidase - Aktivitäts-Assay zurückgehalten. Für den Gradienten wurde das restliche Zellmaterial auf den Boden eines Ultra-Clear™ Tubes pipettiert und mit 2 ml 8%, dann mit 4 ml 4% Ficoll überschichtet. Abschließend wurden noch 2 ml 0.2 M Sorbitol, 0.2 M Imidazol, pH6.5 pipettiert. Die Vakuolen konnten nach 90 minütiger Zentrifugation bei 30000 rpm (SW-41 Rotor) in der Ultrazentrifuge aus der Interphase zwischen 4 und 0% Ficoll isoliert werden. Zur Untersuchung der α-Mannosidaseaktivität wurde die Proteinkonzentration der Vakuolen anhand der Bradford-Methode (3.19.4) bestimmt.

3.17 α -Mannosidase-Aktivitäts-Assay

(nach Yoshihisa *et al.*, 1988)

20% Triton X-100

4 mM 4-Nitrophenyl- α -D-Mannopyranosid (N2127, Sigma) in 200 mM Natriumacetat, pH6.5

10 mM CuSO₄

0.2 M Sorbitol, 0.2 M Imidazol, pH6.5

10% TCA

1 M Glycin, pH10.4

6-12 μ g isolierte Vakuolen oder 100 μ g lysiertes Zellmaterial wurden mit 12.5 μ l Triton X-100, 9.75 μ l CuSO₄ und 100 μ l 4 mM Substrat auf ein Gesamtvolumen von 500 μ l gebracht. Als Hintergrund dienten Vakuolen, bzw. lysierten Zellen mit Puffer, ohne Substrat. Die Ansätze wurden 2 bis 4 Stunden bei 30°C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μ l 10% TCA gestoppt. Nach Zentrifugation (10 Minuten, 13000rpm) wurden 500 μ l in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 500 μ l 1 M Glycin zupipettiert. Die photometrische Auswertung erfolgte bei 400 nM.

3.18 Ape1-Overlay-Assay

Rundfilter Ø 80 mm (Schleicher&Schüll)

Chloroform

75 mM Tris/HCl pH7.5, 3 mM EDTA

200 mM H-Leucin- β -Naphtylamid in 1 ml Methanol

3% Agarose in H₂O

Glaspetrischalen Ø 90 mm

Einzelklone wurden auf Vollmedium- oder entsprechenden Selektionsplatten ausgestrichen. Nach 2 bis 3 Tagen Wachstum bei 30°C wurden die Zellen auf sterile Rundfilter gestempelt und mit der Kolonieseite nach oben zeigend, über Nacht auf neuen Mediumplatten inkubiert.

Die Filter wurden mit der Kolonieseite nach unten zeigend in einer Wanne gefüllt mit Chloroform für 50 Sekunden geschwenkt. Nach Abdampfen des Chloroforms wurden die lysierten Zellen in einer Glaspetrischale platziert. Für fünf Ansätze wurde 14 ml 75 mM Tris/HCl pH7.5, 3 mM EDTA und 6 ml 3% Agarose getrennt voneinander aufgekocht und anschließend vereinigt. Nach Abkühlen auf ca. 60°C konnte das Substrat (200 mM) dazupipettiert und alles gleichmäßig über die Filter verteilt werden. Die Hefestämme wurden hinsichtlich ihrer Aminopeptidase 1-Aktivität durch die Spaltung des Naphtylamids photometrisch bei 365 nm nach 5 und 20 Minuten getestet.

3.19 Biochemische Methoden

3.19.1 Ganzzellproteinextraktion aus Hefe

Aufschlusspuffer I: 50 mM Tris pH7.5, 1 mM EDTA

Aufschlusspuffer II: 10 µl/ml 0.1 M DTT und 10 µl/ml Pefablock (20 mg/ml) in

Aufschlusspuffer I

Glasperlen (Ø 0.45 mm)

6xSDS-Lämmli Ladepuffer: 350 mM TrisHCl pH6.8, 10% SDS, 30% Glycerol, 0.12 mg/ml Bromphenolblau, 20% β-Mercaptoethanol

50 ml einer exponentiell wachsenden Hefekultur (OD_{600} 0.8-1.5) wurde 2 Minuten bei 2800 rpm zentrifugiert und in 3 bis 10 ml Aufschlusspuffer I gewaschen. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis oder im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden in 200 bis 300 µl Aufschlusspuffer II aufgenommen und in ein 2.2 ml Eppendorfgefäß überführt. Zu der Zellsuspension wurden ca. 300 µl Glasperlen gegeben und zum Zellaufschluss 5 bis 10 Minuten im KIA-Vibrax geschüttelt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurde das Zelllysate geklärt. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach der Konzentrationsbestimmung nach Bradford wurde der Proteinextrakt mit 0.6 Volumen 6xSDS-Lämmli-Ladepuffer versetzt. Die Proteine wurden durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert. Die Proteinextrakte wurden bei -20°C gelagert.

3.19.2 Alkalische Lyse von Hefezellen

Lyse-Lösung: 1.85 M NaOH, 7.5% (v/v) β -Mercaptoethanol

1000xInhibitor-Mix: 20 μ g/ml Leupeptin, 20 μ g/ml Benzamidin, 10 μ g/ml Pepstatin A, 40 μ g/ml Aprotinin

Protease Inhibitor Complete EDTAfree (Roche)

100 mM PMSF in 100% Ethanol

50% (w/v) TCA

100% Aceton

1xSDS-Lämmli Ladepuffer

1 M Tris/HCl pH9.0

Für den Zellaufschluss durch alkalische Lyse wurden 1 OD₆₀₀ Zellen eingesetzt. Dazu wurden die Zellen abzentrifugiert (4 Minuten, 4000 rpm) und anschließend in 1 ml H₂O resuspendiert. Nach Zugabe der Proteaseinhibitoren wurden die Zellen mit 150 μ l Lyse-Lösung versetzt und unter mehrmaligem Vortexen 10 Minuten auf Eis lysiert. Danach wurden 150 μ l kaltes 50%-iges TCA zupipettiert, die Proben gevortext und mindestens 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Präzipitat 10 Minuten bei 13000 rpm (4°C) sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit Aceton gewaschen. Das Präzipitat wurde in 1xSDS-Lämmli Ladepuffer bei 30°C gelöst und danach sonifiziert. Bei Gelbfärbung wurde der pH mit 1 M Tris/HCl nachgestellt. Die Proben konnten bei -20°C gelagert werden.

3.19.3 Zellaufschluß zum Nachweis von hyperacetyliertem Histon H4

HSB Puffer: 45 mM HEPES-KOH pH7.4, 150 mM NaCl, 10% Glycerol, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40

1000xInhibitor-Mix: 20 µg/ml Leupeptin, 20 µg/ml Benzamidin, 10 µg/ml Pepstatin A, 40 µg/ml Aprotinin

Protease Inhibitor Complete EDTAfree (Roche)

100 mM PMSF in 100% Ethanol

Glasperlen (Ø 0.45 mm)

15 ml einer exponentiell wachsenden Hefekultur wurden geerntet (2 Minuten, 2800 rpm) und einmal mit Wasser gewaschen. Die Zellen wurden in 300 µl HSB Puffer resuspendiert und mit ca. 250 µl Glassperlen versetzt. Zum Zellaufschluss wurde die Suspension 5 Minuten bei 4°C im KIA-Vibrax geschüttelt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 13000 rpm (4°C) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit dem D_C-Proteinassay von BIORAD bestimmt.

3.19.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmung nach Bradford

Bovine Serum Albumin (BSA) Stock Lösung: 1 mg/ml

Bradford Reagenz (BIORAD)

Mit BSA wurde eine Verdünnungsreihe von 2-16 µg/ml Proteinkonzentration hergestellt. Für die Proteinbestimmung wurden 2-10 µl der Proteinlösungen eingesetzt. Das Probengesamtvolumen wurde mit Wasser auf 800 µl aufgefüllt. Danach wurden 200 µl Bradford Reagenz zupipettiert, gevortext und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 200 µl jedes Ansatzes wurden in Doppelwerten auf eine 96-Well-Platte pipettiert und die optische Dichte bei 595 nm im ELISA-Reader bestimmt.

Proteinbestimmung mit D_C-Proteinassay

Bovine Serum Albumin (BSA) Stock Lösung: 1 mg/ml

D_C-Reagenz A, S und B (BIORAD)

Mit BSA wurde eine Verdünnungsreihe von 2-16 µg/ml Proteinkonzentration hergestellt. Für die Proteinbestimmung wurden 2-10 µl der Proteinlösungen eingesetzt. Das Probengesamtvolumen wurde mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Auch hier wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. D_C-Reagenz S wurde 1:500 mit Reagenz A verdünnt und 25 µl zu den Proteinproben pipettiert. Danach wurden zügig 200 µl Reagenz B hinzugegeben. Die 96-Well-Platte wurde 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die optische Dichte der Proben wurde anschließend bei 690 nm im ELISA-Reader bestimmt.

3.19.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

4xTrenngel-Puffer: 1.5 M Tris/HCl pH8.8, 0.4% SDS

4xSammelgel-Puffer: 0.5 M Tris/HCl pH6.8, 0.4% SDS

5xLaufpuffer: 150g Glycin, 30g Tris, 5g SDS, 0.5 ml 0.1% Bromphenolblau auf 1 Liter auffüllen

30% Polyacrylamid

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)

10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)

10% Trenngel (8 ml):

2 ml 4xTrenngelpuffer

2.67 ml 30% Polyacrylamid

3.2 ml H₂O

80 µl 10% APS

8 µl TEMED

5% Sammelgel (3 ml)

0.75 ml 2xSammelgelpuffer

0.45 ml 30% Polyacrylamid

1.77 ml H₂O

30 µl 10% APS

3 µl TEMED

Für die gelelektrophoretische Analyse von Proteinen wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gele (Laemmli, 1970) verwendet, d.h. zuerst wurde zwischen zwei vertikalen Glasplatten (Minigel System von BIORAD oder eigens hergestellte grosse Gele) ein Trenngel gegossen und mit ca. 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisierung wurde das Isopropanol vollständig entfernt, das Trenngel

mit weitmaschigerem Sammelgel überschichtet und ein Teflonkamm eingesetzt. Nach dessen Polymerisation wurden die Glasplatten in eine Gellaufkammer (BIORAD) mit 1xLaufpuffer gespannt, der Kamm gezogen und mit Proteinproben beladen. Die Auftrennung erfolgte bei 20-40 mA für 2-3 Stunden.

3.19.6 Gelfärbung mit Coomassie Blue

Coomassie Färbelösung: 10% Essigsäure, 25% Isopropanol, 0.025% Coomassie Blue (G250)

Entfärbelösung: 10% Essigsäure

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine auf einem Polyacrylamidgel, wird dieses für 2-3 Stunden in Coomassie Färbelösung schüttelnd inkubiert. Die Entfärbung erfolgte wieder 2-5 Stunden bis die gewünschte Intensität erreicht wurde. Mit dieser Methode lassen sich Signale von 50-100 ng Protein sichtbar machen.

3.19.7 Proteintransfer auf Membranen (Western Blot-Analyse)

Über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennte Proteine wurden durch ein elektrisches Feld aus dem Gel auf eine PVDF- oder Nitrozellulose-Membran übertragen.

„Semi Dry“-Verfahren nach BIORAD

2xAnodenpuffer: 75 mM Tris/HCl pH7.4, 20% Methanol

2xKathodenpuffer: 20 mM Tris/HCl pH9.0, 40 mM ϵ -Aminocapronsäure, 20% Methanol

Nitrozellulose-Membran (Whatman, Schleicher und Schüll)

PVDF-Membran (Whatman, Schleicher und Schüll)

Filterpapier (Whatman)

Ponceau S-Lösung (Sigma): 0.5% PonceauS-Konzentrat in 1% Essigsäure

TBS-Tween-Milch: 5% Magermilchpulver, 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH7.4, 0.05% Tween 20

Blotaufbau:

Anode (+)

2 Lagen Filterpapier, getränkt in 1xAnodenpuffer
PVDF- (mit Methanol befeuchtet) oder Nitrozellulose-Membran
Polyacrylamidgel
2 Lagen Filterpapier, getränkt in 1xKathodenpuffer

Kathode (-)

Der elektrische Transfer der Proteine erfolgte bei 1 mA/cm² Gelfläche für 75 Minuten.
Der Erfolg des Transfers wurde durch ca. zweiminütiges Färben der Membran in Ponceau S-Lösung überprüft.

Nassblot („Wet Blot“)-Verfahren nach BIORAD

Nassblotpuffer: 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 20% Methanol (Methanol nach dem Verdünnen zugeben)

Nitrozellulose-Membran (Whatman, Schleicher und Schüll)

PVDF-Membran (Whatman, Schleicher und Schüll)

Filterpapier (Whatman)

Blotaufbau:

Anode (+)

Schwamm, getränkt in Nassblotpuffer
3 Lagen Filterpapier, getränkt in Nassblotpuffer
PVDF- (mit Methanol befeuchtet) oder Nitrozellulose-Membran
Polyacrylamidgel
3 Lagen Filterpapier, getränkt in Nassblotpuffer
Schwamm, getränkt in Nassblotpuffer

Kathode (-)

Der elektrische Transfer der Proteine erfolgte bei 250 mA für 3 Stunden oder 200 mA über Nacht.

Die Membran wurde zur Blockierung unspezifischer Bindestellen eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in TBS-Tween-Milch inkubiert.

3.19.8 Proteindetektion mit spezifischen Antikörpern und ECL (Enhanced Chemoluminescence)

Tab.5: Antikörper für Western Blot-Analysen

Antikörper	Funktion	Verdünnung in TBS-Tween-Milch
Hyperacetyliertes Histon H4 Penta (Upstate)	Kaninchen- α -hyperacetyl. H4 (prim. Ak)	1:1000
Ape1 Antiserum (aa 168-182 und aa191-210, Andrei-Selmer <i>et al.</i> , 2003)	Kaninchen- α -Ape1 (prim. Ak)	1:1000 bis 1:2000
Anti-HA 4C14 (Abcam)	Maus- α -HA (prim. Ak)	1:1000
Anti-HA 3F10 (Roche)	Ratte- α -HA (prim. Ak)	1:1000
Anti-HA.11 16B12 (Convance)	Maus- α -HA (prim. Ak)	1:1000
3-Phosphoglycerate Kinase (Molecular Probes)	Maus- α -PGK (prim. Ak)	1:1000
Carboxypeptidase Y (Molecular Probes)	Maus- α -CPY (prim. Ak)	1:1000
Anti-Maus-Meerettich Peroxidase-Konjugat (Dianova, Hamburg)	Ziege- α -Maus (sek. Ak)	1:10000
Anti-Ratte-Meerettich Peroxidase-Konjugat (Dianova, Hamburg)	Ziege- α -Ratte (sek. Ak)	1:10000
Anti-Kaninchen-Meerettich Peroxidase-Konjugat (Dianova, Hamburg)	Ziege- α -Kaninchen (sek. Ak)	1:10000

TBS-Tween-Milch: 5% Magermilchpulver, 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH7.4, 0.05% Tween 20

TBS-Tween: 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH7.4, 0.05% Tween 20

SuperSignal^R West Pico Chemiluminescent Substrat (Pierce)

SuperSignal^R West Femto Maximum Sensitivity Substrat (Pierce), wurde 1:10 mit Pico Chemiluminescent Substrat verdünnt

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die PVDF- oder Nitrozellulosemembran mit TBS-Tween-Milch für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur schüttelnd blockiert. Danach wurde ein bis zwei Stunden mit dem primären Antikörper inkubiert. Um das Volumen so gering wie möglich zu halten, wurde der Filter in einen Plastikbeutel eingeschweißt. Anschließend wurde die Membran kurz mit TBS-Tween gespült und dreimal 10 Minuten gewaschen. Danach wurde mit dem sekundären Antikörper 30 bis 60 Minuten schwenkend inkubiert. Der Filter wurde wieder dreimal 10 Minuten in TBS-Tween gewaschen, danach kurz mit Wasser gespült.

Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde die Membran fünf Minuten mit SuperSignal^R West Pico Chemiluminescent Substrat (Pierce) inkubiert. Das Prinzip der Nachweismethode beruht auf der Chemilumineszenz, die durch Meerrettichperoxidase ausgelöst wird. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Luminol. Bei der Reaktion wird Licht der Wellenlänge 420 nm emittiert, das über einen Detektor (Fuji LAS-1000) ausgewertet wird. Die Belichtungszeit lag in der Regel zwischen 10 Sekunden und 5 Minuten.

3.19.9 Entfernen membrangebundener Antikörper

„Stripping“-Puffer: 62.5 mM Tris/HCl pH6.8, 2% SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol

TBS-Tween: 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH7.4, 0.05% Tween 20

0.2 M NaOH

Die mit Antikörper gebundene Membran wurde mit 50 ml „Stripping“-Puffer 15 Minuten auf 50°C und danach weitere 15 Minuten unter dem Abzug abgekühlt. Die gelösten Antikörper wurden durch Waschen mit Wasser und TBS-Tween entfernt.

Eine weniger stringente Methode war die Inkubation der Membran mit 0.2 M NaOH (zwei Mal, mindestens 5 Minuten). Danach wurde der Filter gründlich mit Wasser und TBS-Tween gewaschen. Es wurde wie in Methode 3.19.8 beschrieben fortgeföhren.

3.19.10 *In situ* Immunfluoreszenz

Bei der *in situ* Immunfluoreszenz wurde die zelluläre Lokalisation von Proteinen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern untersucht.

Tab.6: Verwendete Antikörper bei *In situ* Immunfluoreszenz

Antikörper	Funktion	Verdünnung in BSA/PBS
anti-HA 3F10 (Roche)	Ratte- α -HA (prim. Ak)	1:200
Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)	Esel- α -Ratte (sek. Ak)	1:400

37% Formaldehyd

0.1 M Kaliumphosphat-Puffer pH6.4 (27.8 ml 1 M K_2HPO_4 und 72.2 ml 1 M KH_2PO_4 , ad 1 Liter H_2O)

Formaldehydpuffer: 0.1 M Kaliumphosphatpuffer, 3.7% Formaldehyd

Sorbitolpuffer: 1.2 M Sorbitol, 0.1 M Phosphat-Citrat pH5.9 (1.74 g K_2HPO_4 und 0.7 g Zitronensäure)

Monohydrat, ad 100 ml H_2O)

Zymolyase T100 (Seikagaku): 3 mg/ml Zymolyase in 10% Glucose, bei $-20^\circ C$ gelagert

Glusulase (Dupont de Nemours)

Methanol- und Aceton-Bad

0.1 % Polylysin (400K, Sigma P-1524)

BSA-PBS: 1% BSA in 1x PBS (0.04 M K_2HPO_4 , 0.01 M KH_2PO_4 , 0.15 M NaCl)

pd-DAPI: 100 mg p-Phenylendiamin in 10 ml PBS, pH8.0, 90 ml Glycerin und 0.05 $\mu g/ml$ DAPI

farbloser Nagellack

Eine logarithmisch wachsende Hefekultur ($OD_{600}=1$) wurde mit 0.1 Volumen 37% Formaldehyd 15 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur schüttelnd fixiert. 2 ml dieses Ansatzes wurden zentrifugiert (1 Minute, 4000 rpm), in 1 ml Formaldehyd-Puffer resuspendiert. Hierbei werden vorwiegend Aminogruppen quervernetzt. Die

Inkubationszeit bei 4°C betrug, abhängig vom Antikörper 2 bis 12 Stunden. Nach dreimaligem Waschen mit 0.1 M Kaliumphosphatpuffer und einmal mit Sorbitolpuffer wurden die Zellen in 0.2 ml Sorbitolpuffer resuspendiert und die Zellwände durch Zugabe von 5 µl Zymolyase T100 und 1 µl Glusulase verdaut (15-30 Min. bei 30°C). Der Verdau ist vollständig, wenn die Zellen unter dem Mikroskop schwarz erscheinen.

Die Zellen wurden nach Zentrifugation (2 Minuten, 4000 rpm) vorsichtig in Sorbitolpuffer gewaschen und anschließend in 100-200 µl Sorbitolpuffer resuspendiert. Die Probe konnte so bei +4°C gelagert werden.

In die Einbuchtungen eines Multiwell-Objektträgers wurden jeweils 5 µl 0.1% Polylysin pipettiert. Nach einer zweiminütigen Einwirkzeit wurde die Platte mit destilliertem Wasser gespült und getrocknet. Danach wurden je 2 µl Zellen auf die Einbuchtungen gegeben und der Objektträger zum Fixieren für 3 Minuten in ein -20°C kaltes Methanol- und 10 Sekunden in ein -20°C kaltes Aceton-Bad gestellt. Nach dem Verdampfen des Acetons folgte eine 1- bis 2-stündige Inkubation mit dem ersten Antikörper (verdünnt in BSA-PBS), wobei jeweils 5 µl Antikörperlösung auf die Zellen gegeben wurden. Die Platte wurde in dieser Zeit feucht und dunkel gelagert. Nach dreimaligem Waschen mit BSA-PBS wurde mit dem sekundären Antikörper wieder 1-2 Stunden unter gleichen Bedingungen inkubiert. Danach wurde viermal mit BSA-PBS gewaschen und die Platte getrocknet. Jeweils 2 µl pd-DAPI wurden auf die behandelten Einbuchtungen gegeben. Das Deckglas wurde auf dem Objektträger mit farblosem Nagellack fixiert. Die Präparate wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop von Zeiss Axioskop 2 mot plus (Objektiv: 100x1.45 Oil α Plan-Fluar) analysiert und mit der Software Axiovision 4.3 ausgewertet.

3.20 Northern Blot-Analyse

3.20.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA-Molekülen

Agarose (Roth)

DEPC-H₂O: im Verhältnis 1:1000, autoklaviert

10xMOPS-Puffer: 48.1 g MOPS, 16.6 ml 3 M NaAc, 20 ml 0.5 M EDTA pH8.0, ad 1 Liter DEPC-H₂O (steril filtriert, Flasche mit Alufolie verkleidet)

37% Formaldehyd

RNA-Probenpuffer: 10 ml Formamid, 3.5 ml 37% Formaldehyd, 2 ml 10x MOPS-Puffer, 3.8 mg

Xylencyanol, 3.8 mg Bromphenolblau (steril filtriert)

Für ein Agarose-Formaldehydgel (100 ml Ansatz) wurden 1.23 g Agarose in 87.5 ml DEPC-H₂O in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen auf ca. 65°C wurden 9.6 ml 10xMOPS-Puffer und 2.9 ml 37% Formaldehyd zugegeben. Die Lösung wurde in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen. 15-20 µg RNA wurden vor dem Beladen mit je 15 µl RNA-Probenpuffer vermischt und zur Denaturierung 15 Minuten bei 65°C inkubiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 60 bis 100 V durchgeführt.

3.20.2 Northern Blot

20xSSC-Puffer

50 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH7.0

RNA-Färbelösung: 0.04% Methylenblau in 0.5 M Natriumacetat pH5.5 (steril filtriert)

Filterpapier (Whatman, GB002)

Papiertücher

Parafilm

Hybond⁺N-Membran (Amersham Pharmacia)

Der Northern Blot beruht auf Kapillarkräfte, die die elektrophoretisch aufgetrennte RNA vom Gel auf eine Membran transferieren. Dazu wurde auf ein mit 10xSSC gefülltes Gefäß eine Glasplatte mit zwei dünnen, übereinander liegenden Filterpapiere gelegt, so dass diese an beiden Seiten in das Gefäß ragten. Das Gel

wurde mit der Beladungsseite nach unten auf die Filterpapiere gelegt und mit Parafilm seitlich begrenzt. Dann folgte die Hybond⁺N-Membran, auf die 4 bis 5 in 10xSSC getränkte, Whatman-Papiere folgten. Um die Kapillarwirkung zu verstärken wurden noch trockene Papiertücher aufgelegt, die durch ein Gewicht beschwert wurden. Nach 12 Stunden wurde der Blot abgebaut. Die Membran wurde kurz in 50 mM Natrium-Phosphat gewaschen, getrocknet und die RNA durch Bestrahlung eine 30-sekundige mit UV-Licht (312 nm) fixiert. Um die Qualität der RNA-Präparation und des Blots zu überprüfen, wurde die Membran für 2-3 Minuten in RNA-Färbepuffer gegeben und in H₂O entfärbt.

3.20.3 Prähybridisierung, Hybridisierung und Autoradiographie

Herstellung von ³²P-markierten Sonden

Rediprime II Random Prime Labelling System (Amersham Pharmacia, GE Healthcare)

³²P-dCTP (50 µCi/5 µl, Hartmann Analytic, Braunschweig)

Quick Spin S300 (Amersham Pharmacia)

1xTE-Puffer

Heringssperma-DNA (11 mg/ml, Sigma)

In dieser Arbeit wurden Sonden gegen das *HIS5⁺*-, *YDR360W*-, *URA3*-, *ACT1*-, *EAF1*- und *APE1*-Gen eingesetzt.

Das *APE1*-Fragment wurde durch Restriktionsenzymverdau (Kpn I/Pst I) des Plasmids *pRS313-APE1* isoliert. Die *HIS5⁺*-, *YDR360W*-, *URA3*-, *ACT1*- und *EAF1*-Fragmente wurden mittels PCR aus den Plasmiden *pRS316 (URA3)*, oder *pFA6a-HIS3MX6 (HIS5⁺)*, bzw. chromosomaler DNA amplifiziert.

100 ng der Matrizen-DNA wurden in H₂O (Gesamtvolumen: 45 µl) aufgenommen und 5-10 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Die DNA wurde im Isotopenlabor mit Rediprime II Random Prime Labelling System gemischt und mit 50 µCi ³²P-dCTP, 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die ³²P-markierten Fragmente wurden mit Hilfe einer Sephadex-Säule (Quick Spin S300, Amersham Pharmacia) von überschüssigen Nukleotiden gereinigt. Dazu wurde die DNA mit 150 µl 1xTE-Puffer versetzt und die Sephadex-Säule zur Entfernung des Puffers 1 Minute bei

3000 rpm zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss gestellt. Die radioaktiven Fragmente wurden genau auf die Schräge der Säule pipettiert und die Säule 2 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Die radioaktiv markierte DNA wurde mit Heringssperma-DNA versetzt und 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Die Sonde wurde in einem Bleibehälter bei +4°C gelagert.

Prähybridisierung und Hybridisierung

Rapid-hyb Buffer (GE Healthcare)

Zur Prähybridisierung wurde die Membran mit Rapid-hyb Buffer für mindestens 15 Minuten bei 65°C im Hybridisierungsofen vorbehandelt. Die radioaktiv markierte DNA wurde mit 3 ml Rapid-hyb Buffer gemischt und auf die Membran gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65°C unter Rotation.

Waschen der hybridisierten Membran

2xSCP-Puffer, 0.2% SDS

0.2xSCP-Puffer, 0.2% SDS

Die Hybridisierungslösung wurde in einem 50 ml Reaktionsgefäß (Falcon) in einem Plexiglasbehälter bei +4°C gelagert. Die Membran wurde in der Hybridisierungsröhre zunächst kurz mit 2xSCP-Puffer, 0.2% SDS gespült und dann dreimal 10 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurde sie zwei- bis dreimal 10 Minuten 0.2xSCP-Puffer, 0.2% SDS inkubiert. Southern Blots wurden stringenter mit auf 50°C vorgewärmten Puffer bei 65°C gewaschen. Das Ende des Waschvorgangs wurde mit dem Geigerzähler überprüft, die Membran sollte noch ca. 100 IPS aufweisen. Anschließend wurde die Membran auf einem Filterpapier getrocknet und eingeschweißt. Danach wurde eine Phosphoimager-Platte (BAS-MP 2025P, Fuji) aufgelegt. Die Inkubation hing von der Intensität der vorhandenen Signale ab und lag in der Regel zwischen 4 Stunden und 3 Tagen. Die Platte wurde in einem Phosphoimager (PMI™ System, Biorad) ausgelesen.

3.21 Southern Blot-Analyse

Um die Integration von Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten mit homologen, flankierenden Enden in *S. cerevisiae* zu überprüfen, wurden Southern Blot Analysen durchgeführt. Im Vergleich zum Northern Blot, werden hier DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Membran transferiert. Die Hybridisierung der Membran (Hybond⁺N, Amersham Pharmacia) erfolgte wie in Methode 3.20.3 beschrieben.

Verdau genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

5 µl genomische DNA
3 µl 10xNEBuffer (BioLabs)
1 µl RNAse (1 mg/ml, in H₂O, 10 Minuten gekocht)
1 µl Enzym
ad 30 µl H₂O
bei 37°C über Nacht verdaut

Die verdaute DNA wurde mit 5 µl 6xDNA-Auftragspuffer versetzt und auf ein 0.8%-iges Agarosegel zusammen mit dem DNA-Standard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei ca. 40 V. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht (312 nm) mit einem anliegenden Lineal photographiert.

3.21.1 Southern Blot

0.25 M Salzsäure
Denaturierungspuffer: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl
20xSSC-Puffer: 175.32 g NaCl, 88.22 g Trinatriumcitrat-2-hydrat in 1 l H₂O, pH7.0
50 mM Natrium-Phosphat-Puffer, pH7.0
Hybond⁺N-Membran (Amersham Pharmacia)
Filterpapier (Whatman, GB002)

Um die DNA partiell zu depurinieren wurde das Gel 20 Minuten in 0.25 M Salzsäure geschwenkt. Zur Denaturierung der DNA wurde das Gel anschließend zweimal 20

Minuten in 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl gewaschen. Der Blotaufbau erfolgte wie unter Methode 3.20.2 beschrieben. Allerdings wurde beim Southern Blot Denaturierungspuffer, anstatt 10xSSC-Puffer (Northern Blot) für den Transfer der DNA auf die Membran eingesetzt. Der Kapillarblot erfolgte wiederum über Nacht. Die Membran wurde kurz in 50 mM Natrium-Phosphat-Puffer geschwenkt und getrocknet. Die DNA wurde auf der Membran durch UV-Licht (312 nm) fixiert.

3.21.2 Entfernen von ³²P-markierten Fragmenten von der Hybond⁺N-Membran

Die radioaktiv markierte Hybond⁺N-Membran wurde in kochendes 0.1%-iges SDS gelegt und darin für mindestens 30 Minuten unter Abkühlung der Flüssigkeit schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Membran mit dem Geigerzähler gemessen, dabei sollte die Membran nicht mehr als 30 IPS ausweisen. Um SDS-Reste zu entfernen, wurde diese anschließend intensiv mit Wasser gewaschen und konnte danach erneut prähybridisiert werden.

3.22 Protease Sensitivitäts-Assay

0.1 M Tris/SO₄ pH9.4, 10 mM DTT

Sphäroblastierungspuffer: 0.6 M Sorbitol

50 mM KH₂PO₄ pH7.5

10 mM DTT

0.2% Glucose

Alles gelöst in YP-Medium

Zymolyase T20, 0.5-1 mg/500D Zellen in Sphäroblastierungspuffer

Sorbitol/Pipes-Puffer: 200 mM Sorbitol, 20 mM Pipes pH6.8

4 mg/ml DEAE-Dextran in Sorbitol/Pipes-Puffer

100 mM PMSF in EtOH

Triton X-100

1 mg/ml Trypsin (SERVA) in Sorbitol/Pipes-Puffer

1 mg/ml Proteinase K (Roth) in Sorbitol/Pipes-Puffer

TCA/Aceton: 20%TCA und 80% Aceton

100% Aceton

1xSDS-Laufpuffer, 3% β-Mercaptoethanol

100OD einer logarithmisch wachsende Hefekultur (OD_{600} 0.6-1.1) wurden bei 2800 rpm für zwei min zentrifugiert und einmal mit dH_2O gewaschen. Das Zellpellet wurde in 10 ml 0.1 M Tris/ SO_4 pH9.4, 10 mM DTT resuspendiert und 15 min, bei 30°C schüttelnd (200 rpm) inkubiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 3000 rpm (4°C), wurden die Zellen in 16.6 ml Sphäroblastierungspuffer resuspendiert und weitere 15-30 min bei 30°C und 60 rpm sphäroblastiert. Danach wurde bei 2000 rpm, für zwei Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde sehr vorsichtig in ca. 1400 μ l Sorbitol/Pipes-Puffer resuspendiert und die Zellen mit 120-180 μ g DEAE-Dextran lysiert. Die Zellen wurden danach fünf Minuten bei 30°C und anschließend eine Minute auf Eis inkubiert.

Für die Lyse Kontrolle, wurden 144 μ l der lysierten Sphäroblasten mit 0.7 μ l PMSF bei 6000 g für 5 min (4°C) zentrifugiert. Pellet und Überstand wurden auf ein 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel geladen.

Für den Protease Sensitivitäts-Assay wurde pipettiert:

Detergenz (D) Triton X-100

Enzym (E) Trypsin oder Proteinase K

-D	-D	+D	
-E	+E	+E	
144	144	144	μ l lysierte Sphäroblasten
56	46	42	μ l Sorbitol/Pipes-Puffer
-	-	4	μ l Triton X-100 (Endkonzentration 0.2%)
-	10	10	μ l Trypsin oder Proteinase K (Endkonzentration 50 μ g/ml)

Die Assay-Ansätze wurden 30 min auf Eis inkubiert, danach wurde 1 μ l PMSF zugegeben und weitere 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden 1:1 mit TCA/Aceton gefällt. Die mit Aceton gewaschenen Pellets wurden zügig mit 200 μ l 1xSDS-Ladepuffer versetzt und resuspendiert. 50 μ l wurden auf ein 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel geladen.

3.23 Gelfiltration von Gesamtproteinlysat mit Superdex S200

50 mM di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat pH7.0, 150 mM NaCl (mit HPLC-H₂O und filtriert)

1000xInhibitor-Mix: 20 µg/ml Leupeptin, 20 µg/ml Benzamidin, 10 µg/ml Pepstatin A, 40 µg/ml Aprotinin

Protease Inhibitor Complete EDTAfree (Roche)

100 mM PMSF in 100% Ethanol

Standard: 5 µl Tyroglobulin (50 mg/ml) – 669 kDa –

3 µl Ferretin (50 mg/ml) – 440 kDa –

3 µl Myosin HC (4.3 mg/ml) – 205 kDa –

10 µl Transferrin (50 mg/ml) – 81 kDa –

7 µl Ovalbumin (50 mg/ml) – 43 kDa –

4 µl Ribonuclease A (50 mg/ml) – 13.7 kDa –

Der Standardansatz wurde mit 50 mM di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat pH7.0, 150 mM NaCl auf 100 µl aufgefüllt. Davon wurden 3 µl mit 47 µl Puffer auf eine Superdex S200 PC 3.2/3.0 (Pharmacia Biotech) geladen. Bei einer Superdex S200 liegt die optimale Trennung zwischen 10 und 600 kDa.

100 ml einer exponentiell wachsenden Hefekultur (OD₆₀₀ 0.8-1.5) wurden zwei Minuten bei 2800 rpm zentrifugiert, 2 Mal mit Wasser gewaschen und in 300 µl 50 mM di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat pH7.0, 150 mM NaCl zusammen mit Protease Inhibitoren resuspendiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis oder im Kühlraum bei 4°C durchgeführt. Zu der Zellsuspension wurden ca. 300 µl Glasperlen gegeben und zum Zellaufschluss 5 bis 10 Minuten im KIA-Vibrax geschüttelt. Nach zehnmütiger Zentrifugation bei 13000 rpm wurde das Zelllysat geklärt. Der proteinhaltige Überstand wurde in 1.5 ml (9.5x38 mm) Microfuge^R Tubes Polyallomer (Beckman) überführt und 30 Minuten bei 40000 rpm (TLA-55) zentrifugiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (Methode 3.19.4) wurden 50 µl der Probe auf eine Superdex S200 Säule geladen und mit der SMART (µ Separation Unit, Pharmacia Biotech) analysiert.

Dabei wurden Fraktionen zu 30 μ l automatisch gesammelt und anschließend mit 6 μ l 50% TCA gefällt, zweimal mit 100% Aceton gewaschen und anschließend in 1xSDS-Lämmli Ladepuffer gelöst. Die Proteine wurden durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert, über eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse untersucht.

4 Ergebnisse

4.1 Genomische Integration der Aminopeptidase 1 in *WT* und *via*-Mutanten

In den Arbeiten von Cornelia Andrei-Selmer (Dissertation von 1999, Andrei-Selmer *et al.*, 2001) und Pasupuleti Naga Rekha (Dissertation von 2004) wurden Untersuchungen zur Aktivität der Aminopeptidase 1 mit Hefestämmen durchgeführt, die das *APE1*-Gen transformiert auf „single copy“-Plasmiden trugen (*pRS313* und *pRS314*). Die episomale Expression der Ape1 erlaubte es zwischen verschiedenen Auxotrophiemarkern zu wählen, jedoch erforderte die Charakterisierung weiterer Gene Doppeltransformationen und Wachstum der Hefen auf Medien mit zwei Selektionsmarkern. Dieses System zeigte sich anfällig für Schwankungen in der Ape1-Aktivität und der gezeigte Einfluss des Gens *YDR360W* konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden Plasmide hergestellt, die durch Integration in das Hefegenom eine Überexpression der Proteine verhindern. Da nach erfolgter Integration alle Zellen einer Kultur genetisch identisch sind, wird die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verbessert und gleichzeitig ein stabiles System geschaffen, das es erlaubt die zu testenden Stämme auf Vollmedium, ohne Selektion auf das transformierte Gen, zu kultivieren.

Um das Gen *APE1* in den *URA3*-Locus des Hefegenoms zu integrieren, wurde das Plasmid *pRS313-APE1* mit dem Restriktionsenzym *Sa*I verdaut. Das dadurch isolierte *APE1*-Gen mit endogener 5'-Promotor- und 3'-Terminator-Sequenzen von insgesamt ca. 5 kb Länge wurde anschließend in den ebenfalls mit *Sa*I geschnittenen integrativen Vektor *pRS306* kloniert. Die richtige Orientierung des eingefügten Konstrukts wurde durch Restriktionsenzymverdau überprüft. Das mit *Stu* I linearisierte Plasmid wurde in die Hefestämme *y25* (C6C ohne *pRS313-APE1*), *y27* (*via10* ohne *pRS313-APE1*) und *y28* (*via14* ohne *pRS313-APE1*) mittels homologer Rekombination am genomischen *URA3*-Locus integriert (Abb.10 und verwendete Hefestämme siehe Anhang). Erfolgreiche Integration wurde durch Selektion auf Uracil-Prototrophie erzielt und durch Southern Blot-Analysen verifiziert.

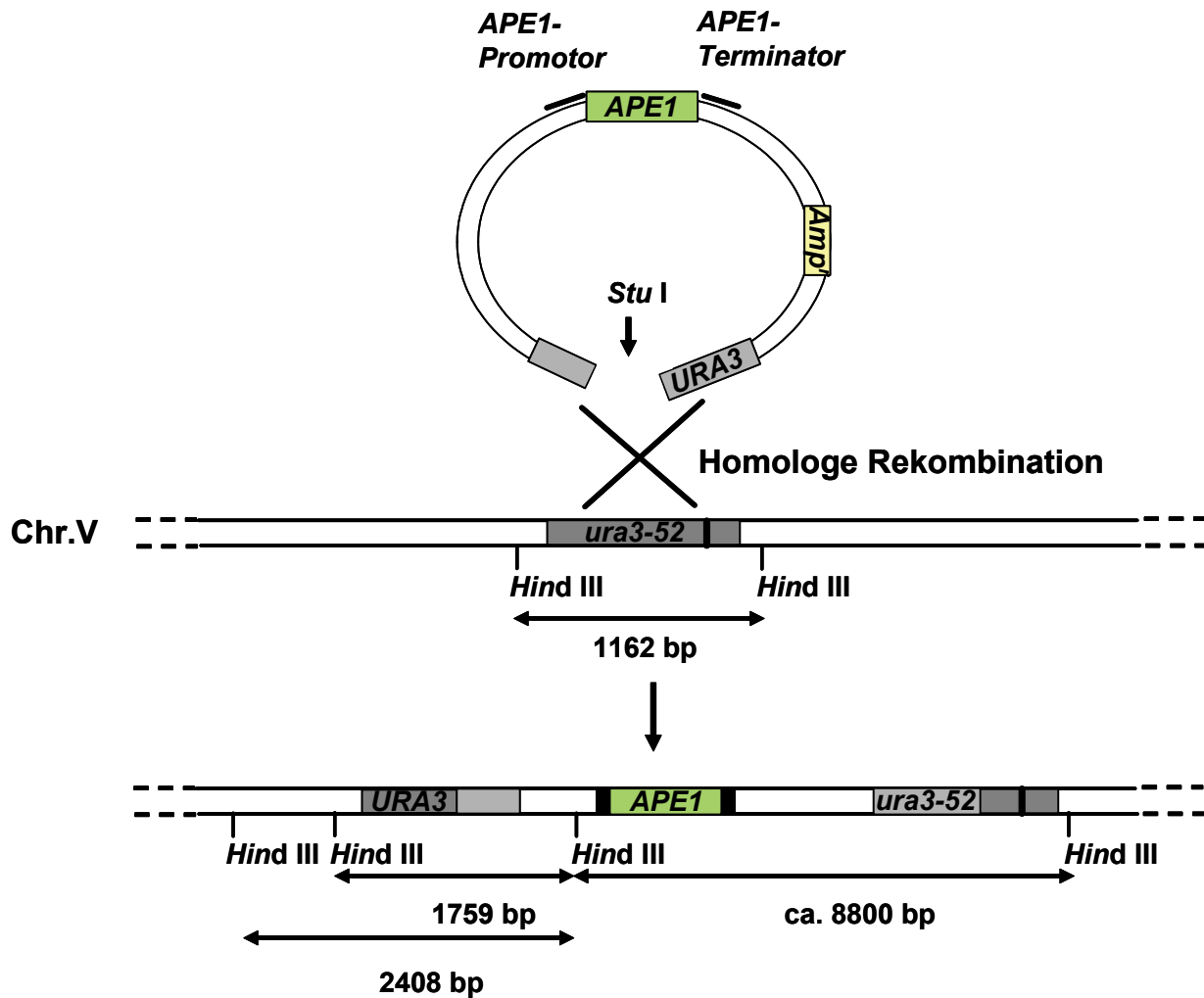


Abb.10: Schematische Darstellung der homologen Rekombination des integrativen Hefepiasmids *pRS306-APE1*.

Die Mutation des endogenen *ura3-52*-Allels ist durch einen schwarzen Balken angedeutet. Nach homologer Rekombination des Plasmids werden die Hefezellen Uracil-prototroph.

Dazu wurde die chromosomale DNA des Wildtypstammes y25 und von je zwei ausgewählten Transformanden mit dem Restriktionsenzym *Hind* III geschnitten, über ein 0.8%-iges Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde anschließend mit einem ³²P-markierten DNA-Fragment des *URA3*-Gens hybridisiert. Wie in Abb.10 illustriert, entstehen bei einer korrekten Integration der *APE1* zwei, bzw. drei Fragmente mit ca. 8800 bp und 1759 bp, bzw. 2408 bp. Dies konnte in Southern Blot-Analysen bestätigt werden (Abb.11). Integrationen in den *URA3*-Locus der Stämme y25 und y28 ergaben zwei Signale von 8800 bp und 2408 bp Länge, wohingegen die Integration in y27 in drei Signalen von 8800 bp, 2408 bp und 1759 bp Länge resultierte, was entweder auf einen unvollständigen Verdau der ersten beiden Transformanden oder auf Verlust der dem *URA3*-Locus sehr nahen Schnittstelle (Abb.10) zurückzuführen ist. Die so generierten Stämme aus y25, y27 und y28 werden in dieser Arbeit mit *WT* (y96), *via10-2* (y43) und *via14-2* (y46) bezeichnet. Der Stamm *ydr360wΔ* (y26) konnte nicht für die homologe Rekombination der *APE1* in den *URA3*-Locus verwendet werden, da hier der *URA3*-Locus komplett deletiert war (*ura3Δ0*).

Die erfolgreiche Expression des integrierten *APE1*-Gens wurde mit Western Blot-Analysen überprüft (Abb.12). Die Ausgangsstämme y25, y27 und y28 zeigten ein schwaches prApe1-Signal. In diesen Stämmen ist das *APE1*-Gen mutiert und wird auch schwach exprimiert, die prApe1 kann aber nicht mehr prozessiert werden (parentaler Stamm II-17, H. D. Wolf). Der *WT*-Stamm mit integrierter *APE1* exprimiert ca. 50% weniger Ape1 als der Ursprungstamm C6C, der das *APE1*-Gen auf dem „single copy“-Plasmid *pRS313* trägt (Andrei-Selmer *et al.*, 2001). Im Vergleich zu C6C zeigt der *WT*-Stamm eine um ca. 20% verminderte Aktivität des Proteins im Ape1-Overlay-Assay (Daten nicht gezeigt). Dieser Unterschied lässt sich durch die zwei- bis fünffach höhere Kopienzahl des Plasmids in C6C im Vergleich zum nur einfach integrierten *APE1*-Gen im *WT*-Stamm erklären. Die Mutantenstämme *via10-2* und *via10* zeigten ähnliche Ape1-Expressionshöhen, allerdings akkumuliert *via10* etwas mehr prApe1. Auch hier lässt sich der Unterschied in der Expressionsrate durch die erhöhte Kopienzahl des Plasmids erklären. Der Mutantenstamm *via14-2* mit integrierter *APE1* zeigte eine leicht erhöhte Ape1-Expression im Vergleich zur Ursprungsmutante *via14*, transformiert mit *pRS313-APE1*. *Via14* besitzt eine um zehnmal geringere Transformationsrate als der *WT*-Stamm und die Isolation transformierter Plasmide (3.8.4) aus *via14* erwies sich als sehr schwierig. Damit ist

bei diesem Stamm eine verstärkte Tendenz zum Plasmidverlust wahrscheinlich. Jedoch besitzt auch *via14-2* eine niedrigere Expressionsrate als der *WT*-Stamm. Mit der Integration der *APE1* in das Hefegenom wurde ein System geschaffen, das es erlaubt, die Ape1-Expression und -Aktivität verlässlich und kontinuierlich, d.h. beispielsweise ohne Plasmidverlust oder variable mRNA-Mengen, zu bestimmen.

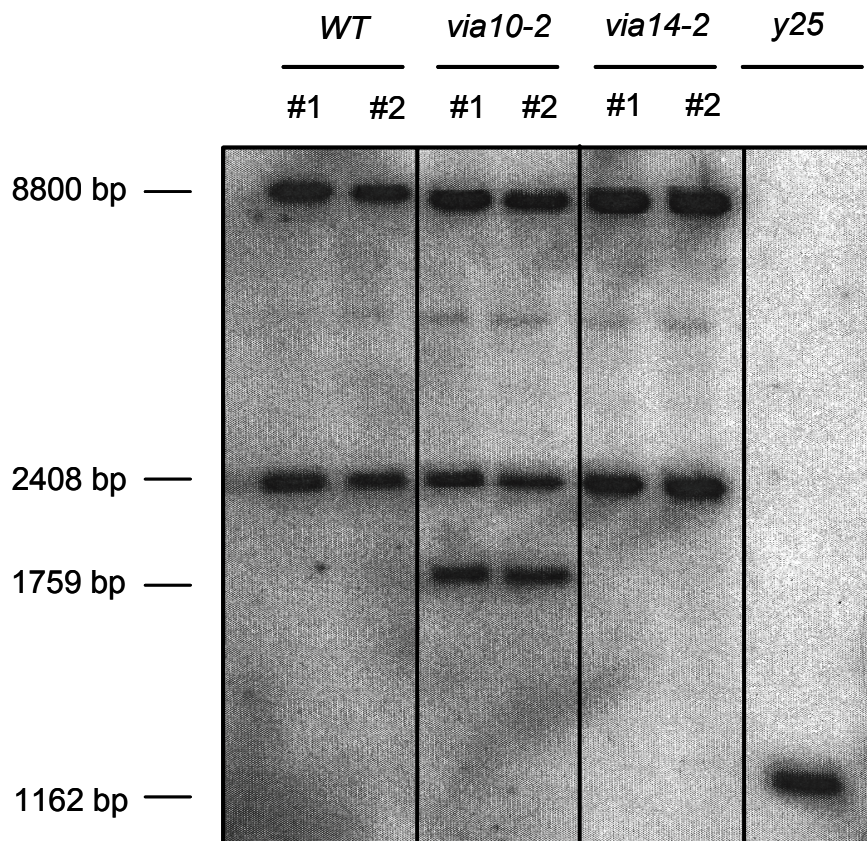


Abb.11: Southern Blot-Analyse zum Integrationsnachweis des Plasmids *pRS306-APE1* in den *URA3*-Locus der Hefestämme *y25*, *y27* und *y28*.

Genomische DNA der Stämme *y25*, *WT* (*y25 ura3::pRS306 APE1*), *via10-2* (*y27 ura3::pRS306 APE1*) und *via14-2* (*y28 ura3::pRS306 APE1*) wurde isoliert und mit dem Restriktionsenzym *Hind* III verdaut. Nach elektrophoretischer Auftrennung über ein 0.8%-iges Agarosegel, wurde die DNA auf eine Nylon-Membran transferiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einem ^{32}P -markierten DNA-Fragment des *URA3*-Gens aus *S. cerevisiae*.

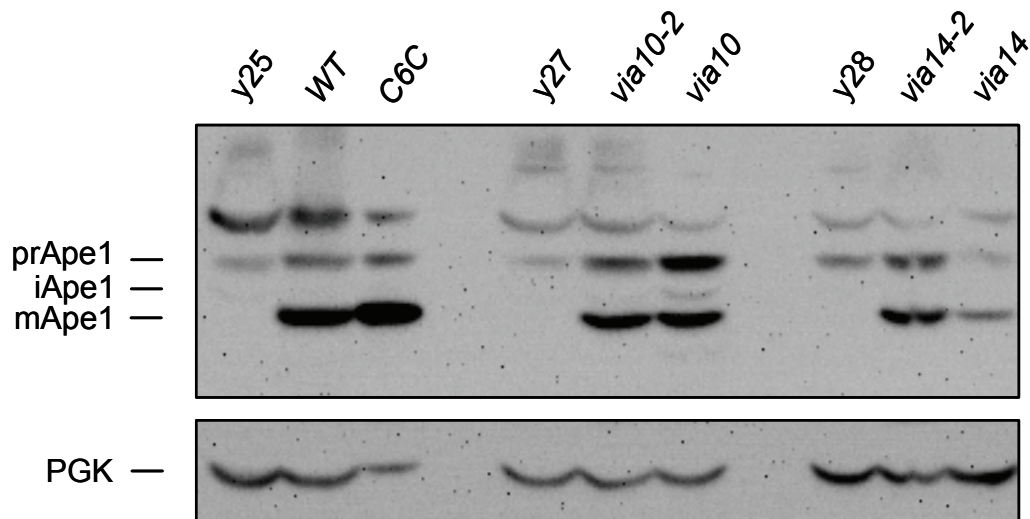


Abb.12: Western Blot-Analyse zum Nachweis der Ape1-Expression nach Integration des Gens in das Hefegenom.

1 OD Zellen der Stämme y25, WT (y96), C6C (y12), y27, *via10-2* (y43), *via10* (y89), y28, *via14-2* (y46), *via14* (y91) wurden mittels alkalischer Lyse aufgeschlossen und über ein 10%-iges Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mit dem „semi dry“ Elektrobplot-Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit anti-Ape1 Serum inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit einem Meerrettichperoxidase konjugierten anti-Kaninchen Antikörper und Chemilumineszenz. PGK (45 kDa) diente als Ladekontrolle.

4.2 Analyse des ORFs *YDR360W*

In der Dissertation von Pasupuleti Naga Rekha (2004) wurde gezeigt, dass der ORF *YDR360W* (*SUVIA1*; **s**uppressor of **v***ia*) die Aktivität der Aminopeptidase 1 in den Mutantenstämmen wiederherstellen konnte, und dass eine Deletion dieses ORFs zu einem Verlust der Ape1-Aktivität führte. Nachdem nun die Ape1 in das Hefegenom integriert wurde, sollten diese Ergebnisse, vor allem in Hinblick auf eine weitere Charakterisierung von *YDR360W* verifiziert werden.

4.2.1 Der Einfluss von ORF *YDR360W* auf die Aktivität der Aminopeptidase 1

Die Ursprungsmutanten *via10* und *via14* zeigten eine um 80%, bzw. vollständig reduzierte Aktivität der Aminopeptidase 1 (Andrei-Selmer *et al.*, 2001). Nach der Integration der Aminopeptidase 1 ins Hefegenom wurde die Aktivität der Hefestämme *WT*, *via10-2* und *via14-2* in Ape1-Overlay-Assays (3.18) bestimmt. Die gemessene Aktivität des *WT*-Stammes wurde mit 100% festgelegt, während die Mutanten *via10-2* und *via14-2* keine Aktivität der Ape1 zeigten (Abb.13). Daraufhin wurden die zwei Mutanten mit den *cen*-Plasmiden *pYX132-YDR360W*, bzw. *pYX141-YDR360W* und dem *2 μ* -Plasmid *pYX242-YDR360W* zur Expression von aminoterminal markierten HA-Fusionsproteinen transformiert. In jeweils acht Einzelklonen wurde anschließend die Ape1-Aktivität bestimmt. Weder die Expression auf einem „single copy“ *cen*- noch einem „high copy“ *2 μ* -Plasmid konnten den Verlust der Aminopeptidase 1-Aktivität in den Mutantenstämmen wiederherstellen. Diese Beobachtung, dass *Ydr360w* keinen Einfluss auf die Ape1-Aktivität hatte, stand im Widerspruch zu vorhergehenden Ergebnissen aus der Dissertation von P.N. Rekha (2004). Ebenso führte die Transformation der Plasmide in die Ursprungsmutanten *via10* und *via14* zu keiner Reaktivierung des Enzyms. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass die Stämme *via10* und *via10-2* einen hohen Hintergrund, nach Transformation der Leervektoren *pYX141* und *pYX242* aufwiesen, der mit der *WT*-Aktivität vergleichbar war (Abb.13). Bei den Mutantenstämmen *via14* und *via14-2* hingegen wurde keine Leervektor-stimulierte Hydrolase-Aktivität festgestellt.

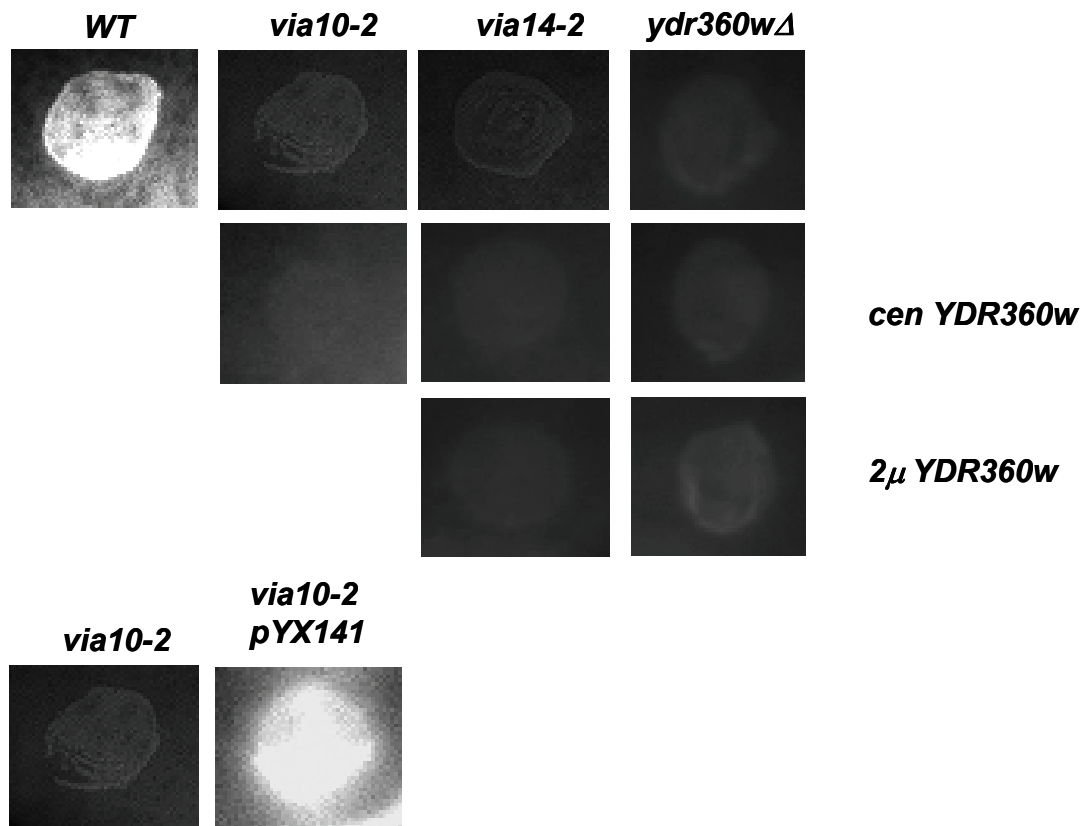


Abb.13: Ape1-Overlay-Assay zur Bestimmung der Aminopeptidase 1-Aktivität.

Einzelkolonien der Stämme *WT* (y96), *via10-2* (y43), *via14-2* (y46) und *uvia1Δ* (y10) wurden auf Vollmediumplatten ausgestrichen. Die Stämme *via10-2* transf. mit *pYX132-YDR360W*, *via14-2* transf. mit *pYX141-YDR360W* (y154), *via14-2* transf. mit *pYX242-YDR360W* (y155), *ydr360wΔ* transf. mit *pYX141-YDR360W* (y34), *uvia1Δ* transf. mit *pYX242-YDR360W* (y35), *via10-2* transf. mit *pYX141* (y148) wurden auf Tryptophan-, bzw. Leucin-Mangelmedium ausgestrichen. Nach zwei bis drei Tagen Wachstum bei 30°C wurden die Zellen auf sterile Rundfilter gestempelt und nach 24 h Inkubation wurden die Zellen lysiert und mit dem Substrat H-Leucin-β-Naphtylamid überschichtet. Die Spaltung des Naphtylamids wurde photometrisch bei 365 nm verfolgt.

4.2.2 Transkriptionsstudien der ORFs *YDR360W* und *YDR359C*

Es konnte gezeigt werden, dass die Transformation des Gens *YDR360W* (*SUVIA1*) die Aminopeptidase 1-Aktivität weder in den Mutantenstämmen noch im *ydr360wΔ*-Stamm beeinflusste. Die beobachtete, stark reduzierte Ape1-Aktivität des *svia1Δ*-Stammes (Abb.13) deutete jedoch auf eine Rolle des Genabschnitts um den ORF *YDR360W* hin (Dissertation P.N. Rekha). Das chromosomale DNA-Fragment, das den Ape1-Reifungsdefekt der *via*-Mutanten supplemierte, enthielt den putativen ORF *YDR360W*, sowie 862 bp des Aminoterminus' des 2949 bp großen ORFs *YDR359C*, die sich um 286 bp teilweise überlappen (Abb.7).

Um zu klären, auf welchem der zwei ORFs der beobachtete Effekt, also die Wiederherstellung der Ape1-Aktivität beruhte, wurde nun deren Transkription mittels Northern Blot-Analysen untersucht. Dazu wurde aus logarithmisch wachsenden und gehungerten Zellen des Stammes *SEY6210* Gesamt-RNA isoliert. Diese zwei unterschiedlichen Wachstumsphasen wurden gewählt, um zu überprüfen, ob die ORFs *YDR360W* und *YDR359C* eventuell nur zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle transkribiert werden oder konstitutiv aktiv sind. Die eingesetzten Sonden entsprachen der gesamten *YDR360W*-, bzw. der *YDR359C*-DNA, die sich überlappten und somit jeweils beide Transkripte detektieren sollten (Abb.14A). Abb.14B und C zeigen, dass in *ydr360Δ*- und *eaf1Δ*-Zellen keine mRNA nachweisbar war, während in *YDR360W*-überexprimierenden Zellen mehrere Banden zu sehen sind. Sowohl in logarithmisch wachsenden, wie in gehungerten Zellen war ein schwaches Signal auf Höhe der 26S *rRNA* zu detektieren (Abb.14B). Dieses konnte in Northern Blot-Analysen mit überexprimiertem Eaf1-Protein dem *YDR359C*-Transkript zugeordnet werden (Abb.14C). Nach Überexpression von *YDR360W* (Abb.14B) konnten keine der Signale unterhalb der 18S *rRNA* eindeutig der *YDR360W*-mRNA zugeordnet werden, da diese ebenso nach Überexpression des Proteins Eaf1 detektiert wurden. Dieses Ergebnis wurde 2006 durch eine genomweite Transkriptionsanalyse, unter Anwendung eines „tiling arrays“ (Affimetrix) bestehend aus ca. 6.5 Millionen Oligonukleotiden beider Stränge und einer Überlappung um jeweils 17 Nukleotiden, unterstützt. (Huber *et al.*, 2006; www.ebi.ac.uk/huber-srv/queryGene). In dieser Studie konnte die Transkription von *YDR360W* in exponentiell wachsenden Zellen ebenfalls nicht gezeigt werden

(Abb.15). Somit ist davon auszugehen, es sich bei *YDR360W* mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen nicht-proteinkodierenden ORF handelt.

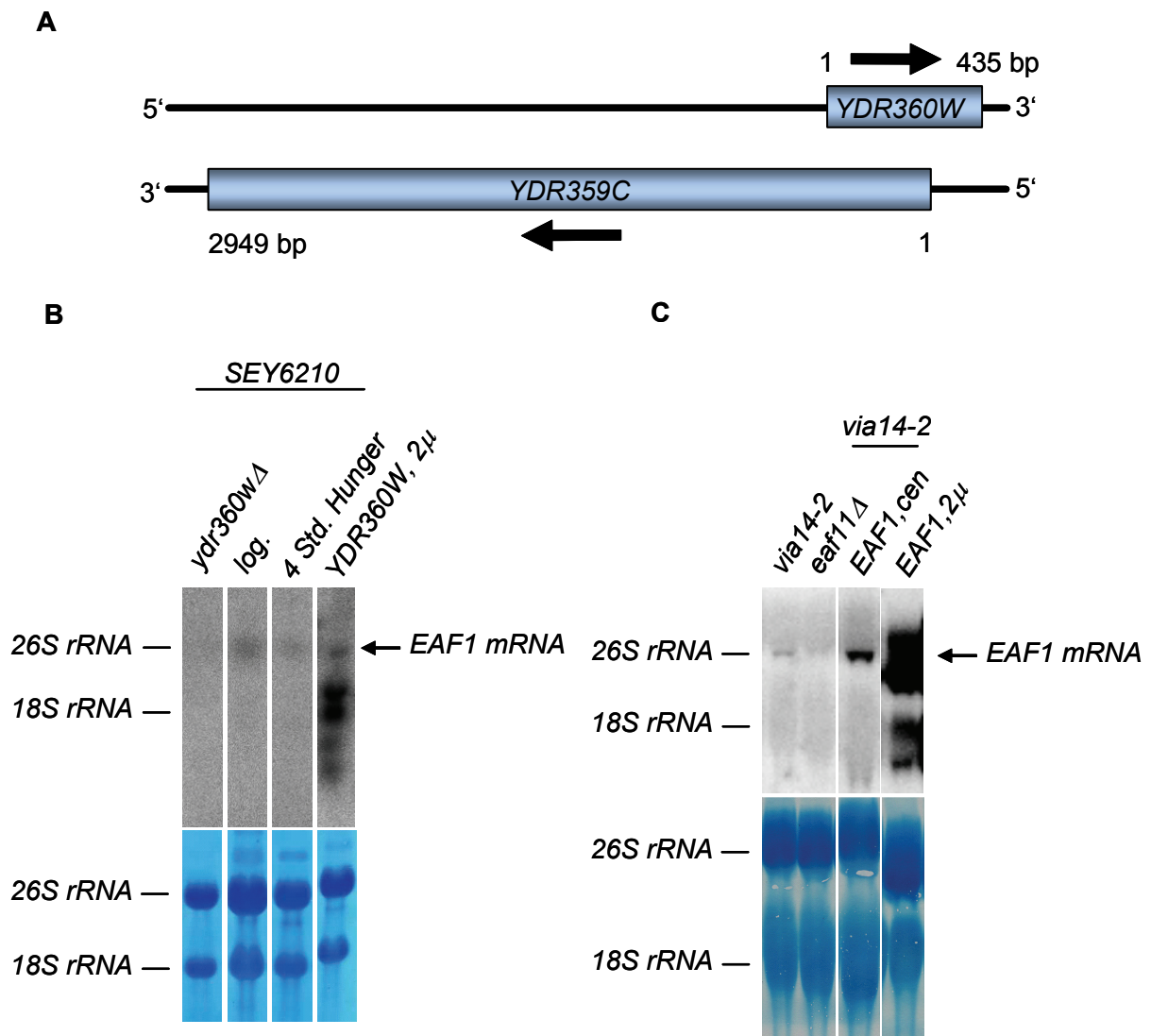


Abb.14: Northern Blot-Analysen zur Überprüfung der Transkription der ORFs *YDR360W* und *YDR359C*.

A Schematische Darstellung der ORFs *YDR360W* und *YDR359C* auf Chromosom IV des Hefegenoms. Die Pfeilrichtungen geben die Leserichtung auf Transkriptionsebene an. **B** Northern Blot-Analyse mit logarithmisch wachsenden (OD_{600} 1) und für vier Stunden in Stickstoffmangelmedium gehungerten Zellen. Es wurden 10 μ g Gesamt-RNA auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde mit einer 32 P-markierten Sonde des ORFs *YDR360W* hybridisiert. Die einzelnen Spuren stammten von einer Membran und wurden lediglich in eine gewünschte Reihenfolge gebracht. **C** Northern Blot-Analyse mit logarithmisch wachsenden Zellen (OD_{600} 1). Die 32 P-markierte Sonde entsprach dem ORF *YDR359C* (*EAF1*). Alle Spuren stammten von einer Membran. Die mit Methylblau gefärbte Nylonmembran zeigt, dass jeweils gleiche Mengen zu 15 μ g Gesamt-RNA pro Spur aufgetragen wurden.

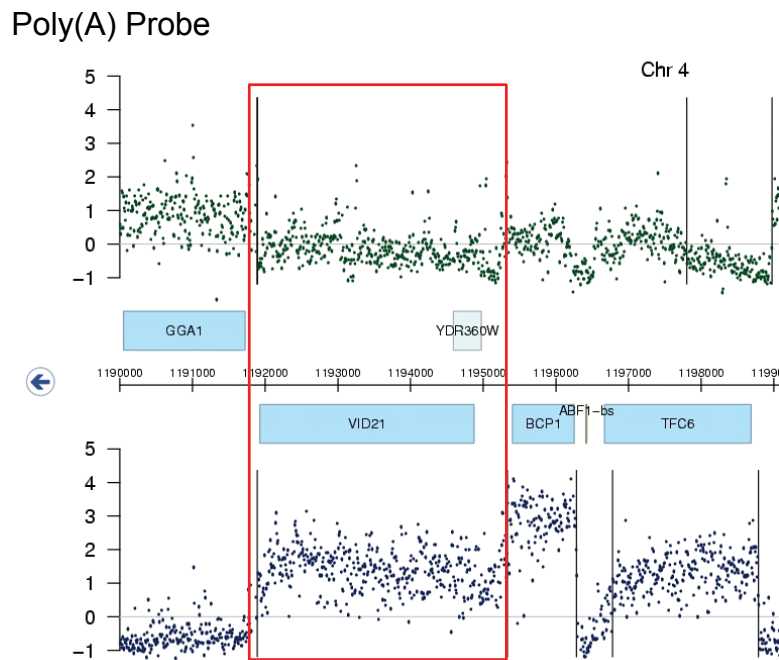


Abb.15: „Tiling array“ in *S. cerevisiae*.

Die Y-Achse entspricht der Hybridisierungsintensität der cDNA aus poly(A) RNA und die X-Achse den genomischen Koordinaten. Jeder Punkt deckt sich mit einem Oligonukleotid. Der Watson-Strang ist in grün und der Crick-Strang in blau dargestellt. Annotierte ORFs sind mit blauen, fragwürdige ORFs in hellblauen Boxen unterlegt. Die vertikale Linie verweist auf die einzelnen Segmentgrenzen, während die horizontale Linie den Schwellenwert des Hintergrunds anzeigt (Abbildung abgeändert nach www.ebi.ac.uk/huber-srv/queryGene).

4.3 Analyse des ORFs *YDR359C*

Der gefundene Plasmidabschnitt enthielt den zweiten ORF *YDR359C* nicht komplett, sondern nur 862 bp des Aminoterminus' des 2949 bp großen Proteins, sowie 446 bp der 5'-UTR (untranslated region). Dieser ORF ist verifiziert und kodiert für das nicht essentielle Protein Eaf1 (**E**sa1-**a**ssociated **f**actor). Eaf1 ist Teil des Histon-Acetyltransferase-Komplexes NuA4 (**n**ucleosome **a**cetyltransferase of **H**4; Krogan *et al.*, 2004) mit der katalytischen Untereinheit Esa1. In der Literatur wird das Protein auch als Vid21 (**v**acuole import and **d**egradation) bezeichnet.

4.3.1 Der Einfluss des ORFs *YDR359C* auf die Aktivität der Aminopeptidase 1

Um zu testen, inwieweit die Eaf1-Proteinexpression die Aktivität der Ape1 beeinflusst, wurde *EAF1* zur Markierung mit C-terminalem HA-„tag“ in das *pYX*-Vektor-System kloniert. Dazu wurde der Locus *YDR359C* mittels Polymerasekettenreaktion aus der *WT*-cDNA amplifiziert und nach Restriktionsenzymverdau mit den Enzymen *EcoR* I und *Hind* III in die Vektoren *pYX141* und *pYX242*, bzw. *pYX132* kloniert. Diese Konstrukte wurden in die Stämme *via10-2* und *via14-2* transformiert und in Ape1-Overlay-Assays getestet. Abb.16 zeigt, dass die Expression von Eaf1 den Ape1-Aktivitätsverlust im Stamm *via14-2* wiederherstellen konnte. Dabei erreichte die Expression des *cen*-Plasmids ca. 80% der Aktivität des *2μ*-Plasmids. Die Expression des Proteins im Stamm *via10-2* hatte keinen Einfluss auf die Ape1-Aktivität.

Somit konnte gezeigt werden, dass nicht *YDR360W*, sondern der auf dem Crick-Strang liegende ORF *YDR359C* an der Aktivierung der Aminopeptidase 1 beteiligt ist.

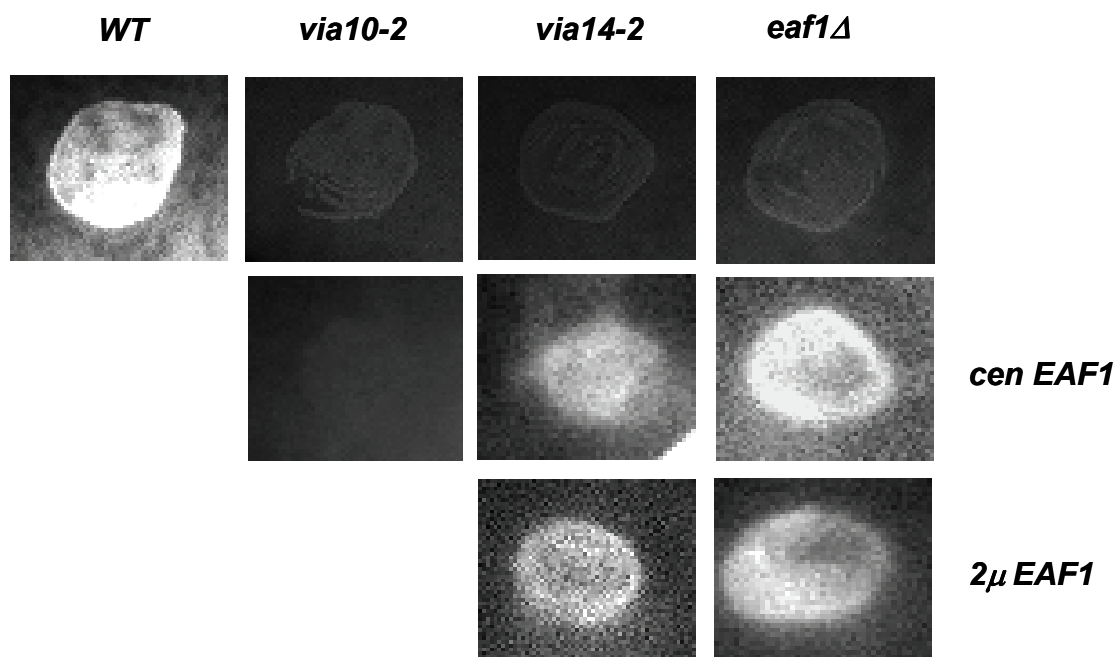


Abb.16: Der Einfluss von Eaf1 auf die Aktivität der Aminopeptidase.

Einzelkolonien der Stämme *WT* (y96), *via10-2* (y43), *via14-2* (y46) und *eaf1Δ* (y126) wurden auf Vollmediumplatten ausgestrichen. Die Ape1-Aktivität der Stämme *via10-2* transf. mit *pYX132-YDR359C* (y234), *via14-2* transf. mit *pYX141-YDR359C* (y158), *via14-2* transf. mit *pYX242-YDR359C* (y159), *eaf1Δ* transf. mit *pYX141-YDR359C* (y170) und *eaf1Δ* transf. mit *pYX242-YDR359C* (y172) wurde durch Spaltung des Substrats H-Leucin-β-Naphtylamid photometrisch bei 365 nm verfolgt.

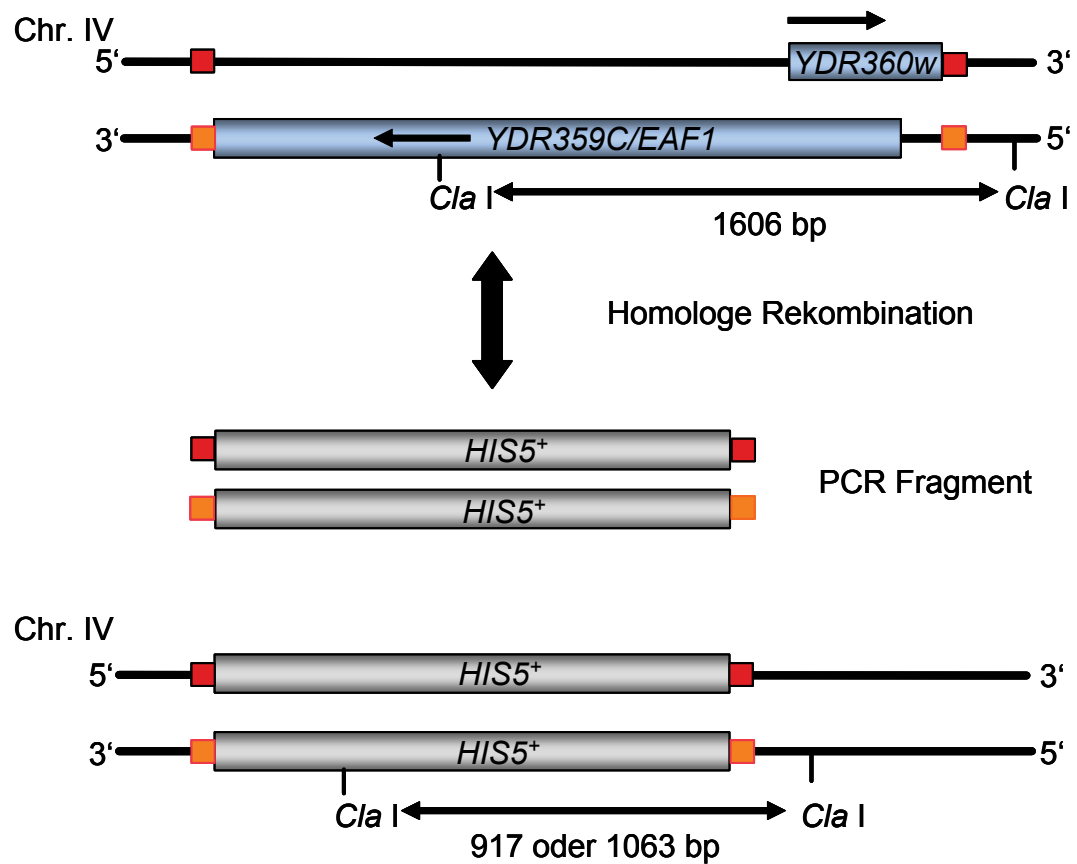
4.3.2 Herstellung von *eaf1*-Deletionsstämmen

Um den Aktivierungseffekt von Eaf1 besser zu verstehen, wurde der ORF *YDR359C* einzeln und zusammen mit ORF *YDR360W* mittels homologer Rekombination des *HIS3*-Markergens deletiert. Das *Schizosaccharomyces pombe HIS3*-Homolog *HIS5⁺* (Erickson und Hannig, 1995) wurde mit 45 bp komplementären 5'- und 3'-Enden der genomischen DNA der ORFs *YDR359C*, bzw. *YDR360W* aus dem Plasmid *pFA6a-HIS3MX6* amplifiziert (Longtine *et al.*, 1998) und in den *WT*-Stamm (y96) transformiert (3.14.2) (Abb.17). Nach erfolgreicher Integration in das Hefegenom wird der Defekt des *his3Δ1* mutierten Stammes aufgehoben und die Hefen wurden Histidin-prototroph.

Southern Blot-Analysen (3.21) bestätigten die Integration des *HIS5⁺*-Gens in den Genlocus *YDR359C*, bzw. *YDR359C* und *YDR360W*. Dazu wurde chromosomale DNA des Wildtypstammes y96 und die der Transformanden mit dem Restriktionsenzym *Cla*I verdaut. Nach erfolgtem Transfer der DNA auf eine Nylonmembran wurde diese entweder mit einem ³²P-markierten DNA-Fragment des *YDR360W*- oder des *YDR359C*-Gens, bzw. *HIS5⁺*-Gens hybridisiert. Mit radioaktiv markierten Sonden für das *YDR360W*- oder das *YDR359C*-Gen waren im *WT*-Stamm eine 1606 bp Bande nachweisbar, die in den Deletionsstämmen fehlte. Umgekehrt lieferte die *HIS3*-Sonde nur in den integrierten Stämmen ein Signal mit der Größe von 917 bp (Deletion der Loci *YDR359C* und *-360W*), bzw. 1063 bp (Deletion des Locus *YDR359C*) (Abb.17). In dieser Arbeit wurde vorwiegend mit y126 gearbeitet; dieser Stamm wurde zur Vereinfachung mit *eaf1Δ* bezeichnet.

Zur Bestimmung der Ape1-Aktivität wurden Ape1-Overlay-Assays durchgeführt, in denen sowohl die Stämme y206 und 207, als auch *eaf1Δ* eine vollständige Inaktivierung zeigten. In *EAF1*-Transformanden konnte die Expression des Proteins den Aktivitätsverlust des *eaf1Δ*-Stammes komplementieren (Abb.16). *EAF1* ist kein essentielles Gen, seine Deletion führte allerdings zu einem stark reduzierten Wachstum bei 30°C und einem Ausbleiben dessen bei 37°C. Auch die Mutanten *via10-2* und *via14-2* konnten bei 37°C nicht mehr anwachsen, wobei die Duplikationsrate des Stammes *via10-2* bei 30°C der des *WT*-Stammes stark ähnelte. *Via14-2* zeigte wie *eaf1Δ* eine verlangsamte Anfangsphase nach Überimpfen der in G1-Phase arretierten, stationären Übernachtskultur, erreichte allerdings dieselbe Dichte wie der *WT*-Stamm (Abb.18).

A



B

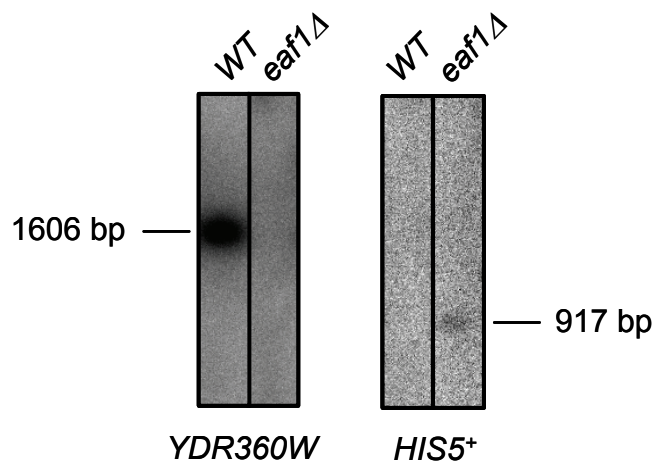


Abb.17: Herstellung der Deletionsstäme *eaf1Δ*.

A *HIS5⁺* wurde mit 45 bp komplementären Überhängen (rot und orange) zur genomischen DNA am 5'- und 3'-Ende der ORFs *YDR359C* und *YDR360W* aus dem Plasmid *pFA6a-HIS3MX6* amplifiziert. Durch homologe Rekombination integrierte das PCR-Fragment in den Genlocus des Chromosoms IV. **B** Southern Blot-Analyse zum Nachweis der *eaf1*-Deletion. Genomische DNA der Stämme WT (y96) und *eaf1Δ* (y126) wurde mit dem Restriktionsenzym *Cla I* verdaut. Die Hybridisierung der Nylonmembran erfolgte mit einem ³²P-markiertem DNA-Fragment des Gens *YDR360W*, bzw. *HIS5⁺*.

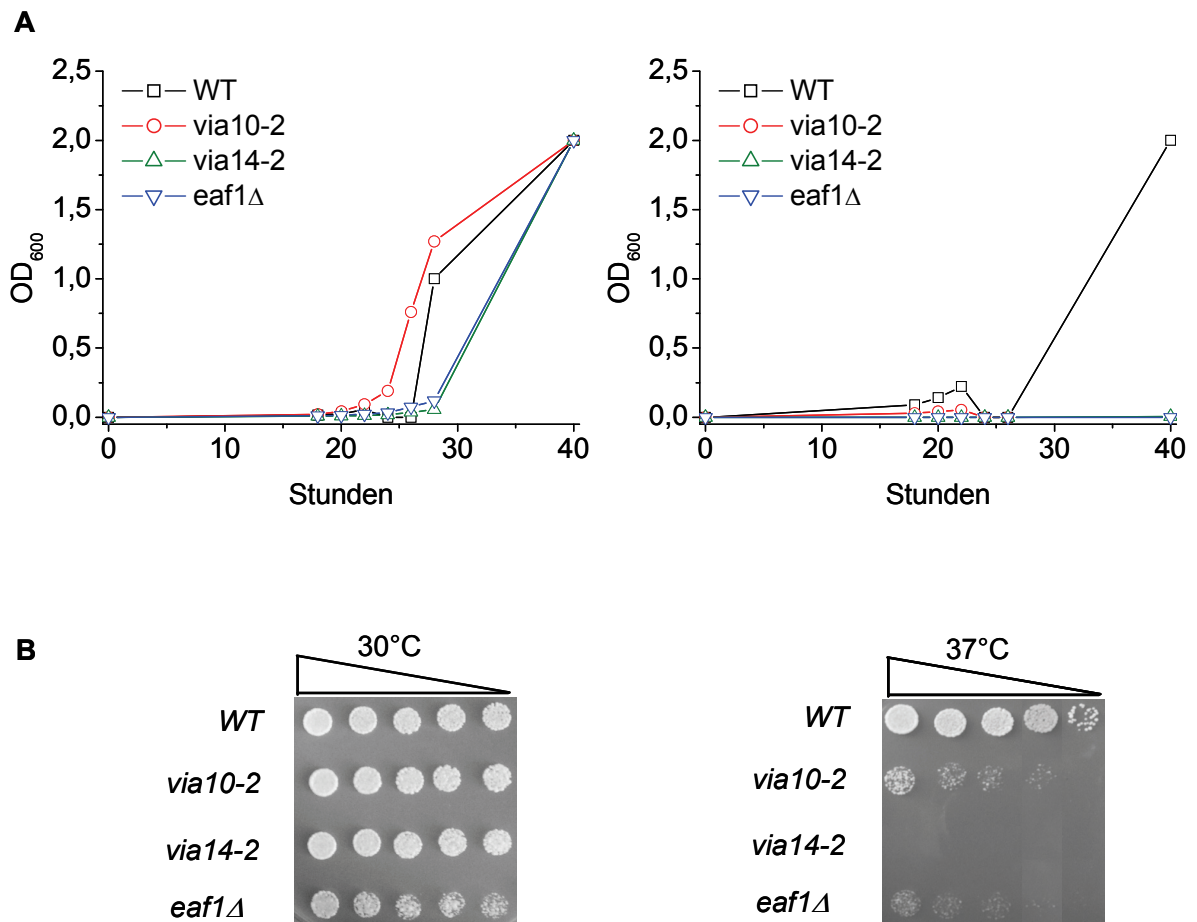


Abb.18: Wachstum der Stämme WT-, *via10-2*-, *via14-2*- und *eaf1Δ* bei 30°C und 37°C.

A Stationäre Übernachtskulturen wurden 1:1000 in Vollmedium überimpft und 40 Stunden bei 30°C, bzw. 37°C schüttelnd inkubiert. **B** Stationäre Übernachtskulturen wurden auf eine OD₆₀₀ von 0.1 in dH₂O verdünnt, daraus wurde eine fünffach fortlaufende Verdünnung hergestellt, wobei jeweils 5 µl Zellsuspension auf den Vollmediumplatten aufgebracht wurden. Die Platten wurden zwei Tage bei 30°C, bzw. vier Tage bei 37°C inkubiert.

4.4 Charakterisierung von *EAF1* in den Mutantenstämmen

Wie in Abbildung 16 gezeigt, stellt die Expression von Eaf1 die Aktivität der Aminopeptidase 1 in dem Mutantenstamm *via14-2* und Deletionsstamm *eaf1Δ* wieder her. Um zu untersuchen, ob Eaf1 die Ursache des Aktivitätsverlustes der beiden Mutanten ist, wurden die Mutantenstämme *via10-2* und *via14-2* bezüglich der Expression dieses Genlocus' näher analysiert.

Da kein Antikörper für endogenes Eaf1 zur Verfügung stand, konnte die Expression des Proteins nicht in Western Blot-Analysen nachgewiesen werden. Um Mutationen und ein damit verbundenes Ausbleiben der Expression zu überprüfen, wurde der *YDR359C*-Locus des *WT*-, *via10-2*- und *via14-2*-Stammes sequenziert. Dazu wurde ihre genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *Hind* III verdaut, um anschließend aus den Genfragmenten, *EAF1*, inklusive 508 bp der 5'- und 168 bp der 3'-UTR zu amplifizieren. Die Sequenzierung zeigte, dass die Mutantenstämme in dem 3625 bp großen Fragment zwar eine Insertion eines Cytidins an Position -78 vor dem Startcodon aufwiesen, ansonsten aber nicht mutiert waren und deshalb transkribiert werden sollten. Da die zusätzliche Base auch im *WT*-Stamm vorhanden war, ist davon auszugehen, dass dies keinen Einfluss auf den beobachteten Rückgang der Ape1-Aktivität hatte und entweder stammesspezifisch oder auf einen falschen Eintrag in der veröffentlichten Genomsequenz zurückzuführen ist.

Eine bekannte Funktion von Eaf1 ist seine Beteiligung an der Hyperacetylierung des Histons H4, d.h. in *eaf1Δ*-Stämmen ist hyperacetyliertes H4 kaum mehr nachweisbar (Krogan *et al.*, 2004). Um die Mutanten in Hinblick auf diese beschriebene Funktion hin zu untersuchen, wurden aus den *WT*-, *via10-2*-, *via14-2*- und *eaf1Δ*-Stämmen Proteinextrakte hergestellt (3.19.3). Nach Auftrennung über ein 15%-iges Polyacrylamidgel wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran im Nassblotverfahren transferiert und mit einem Antikörper gegen hyperacetyliertes Histon H4 für eine Stunde in TBS/Tween inkubiert. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgt mit einem anti-Kaninchen HRP-konjugiertem Zweitantikörper ebenfalls in TBS/Tween. Wie in Abbildung 19 dargestellt, war die Hyperacetylierung des Histons H4 in den Mutantenstämmen gegenüber dem Wildtypstamm unverändert deutlich, währenddessen sie im *eaf1*-Deletionsstamm stark reduziert war. Abhängig von der Expressionsstärke von Eaf1 (*cen* oder 2μ) konnte zunehmend hyperacetyliertes H4 in dem *eaf1Δ*-Stamm nachgewiesen werden.

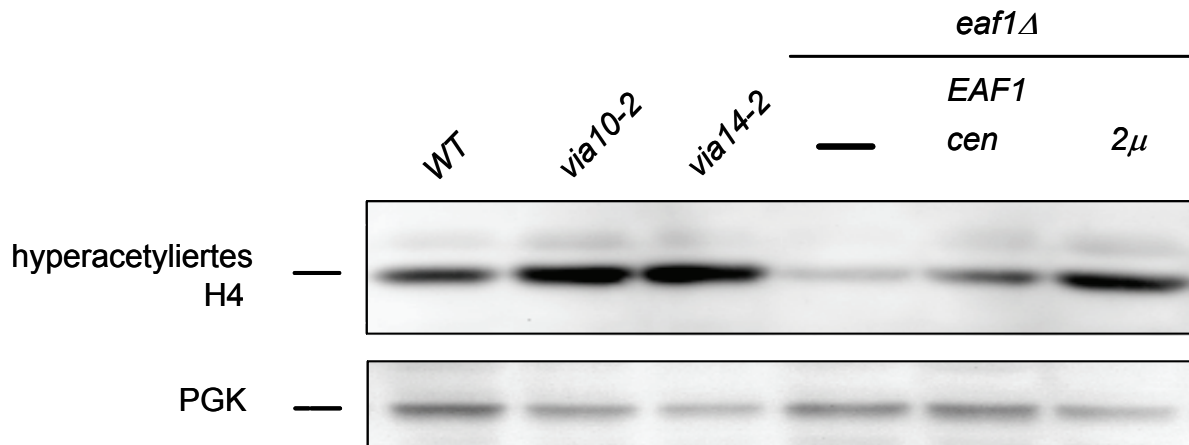


Abb.19: Western Blot-Analyse zur Bestimmung von hyperacetylierten Histon H4.

Ganzzellproteinextrakte aus *WT*, *via10-2*, *via14-2*, *eaf1Δ*, *eaf1Δ* transf. mit *pYX141-EAF1* (y170) und *eaf1Δ* transf. mit *pYX242-EAF1* (y172) wurden über ein 15%-iges Polyacrylamidgel separiert und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit anti-hyperacetylierten H4 Penta Antikörper und anti-PGK als Ladekontrolle inkubiert.

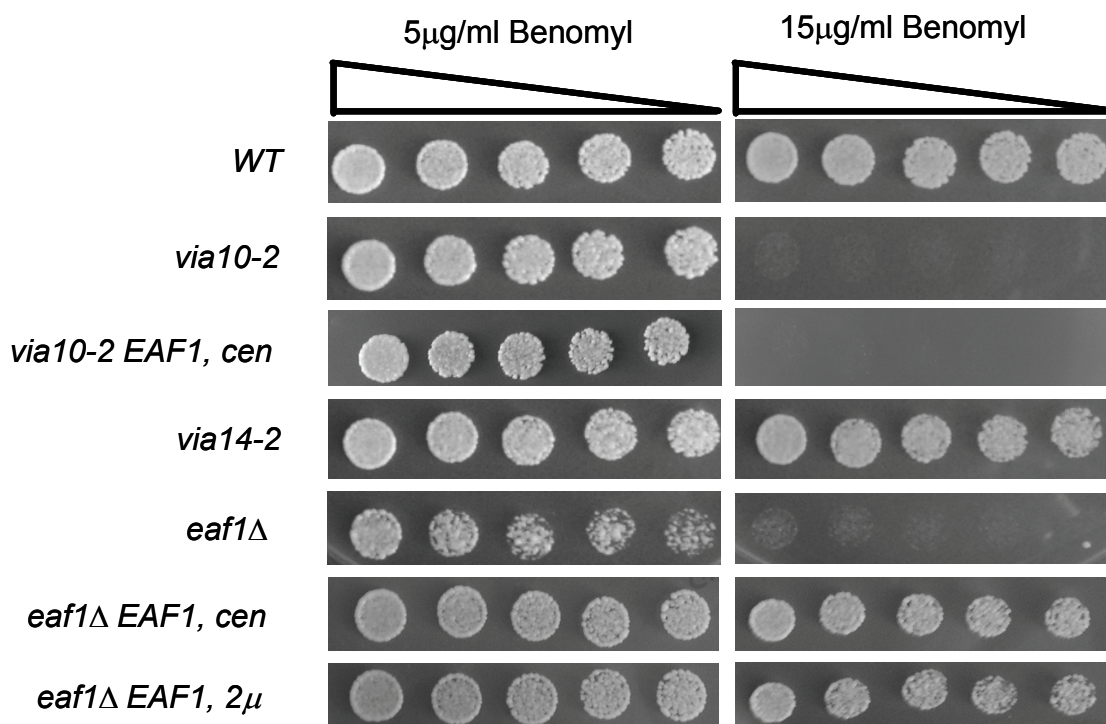


Abb.20: Einfluss von Benomyl auf das Wachstum von WT-, Deletions- und Mutantenstämmen.

Übernachtkulturen der Stämme *WT* (y96), *via10-2* (y43), *via10-2* transf. mit *pYX141-EAF1* (y156), *via14-2* (y46), *eaf1Δ* (y126), *eaf1Δ* transf. mit *pYX141-EAF1* (y170), *eaf1Δ* transf. mit *pYX242-EAF1* (y172) wurden mit dH_2O auf eine Anfangs- OD_{600} von 0.1 verdünnt. Daraus wurde eine fünffach fortlaufende Verdünnung hergestellt, wobei jeweils 5 μl Zellsuspension auf den mit 5, bzw. 15 $\mu\text{g/ml}$ Benomyl behandelten Vollmediumplatten ausgebracht wurden. Die Platten wurden zwei Tage bei 30°C inkubiert.

Um den Stamm *eaf1*Δ und die zwei Mutanten *via10-2* und *via14-2* auf einen Defekt in Kinetochor- und Spindel-Kontrollpunkt hin zu untersuchen, wurde ihr Wachstumsverhalten auf Medium mit der Mikrotubuli destabilisierenden Chemikalie Benomyl (Kobor *et al.*, 2004) bestimmt. Dazu wurden die Hefestämme zusammen mit dem *WT* auf 5, bzw. 15 μg/ml Benomyl enthaltende Vollmediumplatten ausplattiert.

Auf das Wachstumsverhalten des *WT*- und *via14-2*-Stammes zeigte die Chemikalie keinen Einfluss. Die Stämme *via10-2* und *eaf1*Δ hingegen zeigten bei einer Konzentration von 5 μg/ml einen leichten Wachstumsdefekt, und konnten bei einer Konzentration von 15 μg/ml nicht mehr anwachsen, was auf einen Defekt der Mikrotubuli hindeutet. Durch Transformation von *EAF1* konnte dieser Effekt im Deletionsstamm komplementiert werden, wohingegen die Expression von *Eaf1* das Wachstumsverhalten der Mutante *via10-2* nicht beeinflusste (Abb.20).

Die Sequenzierung des ORFs *YDR359C*, Western Blot-Analysen zum Nachweis des hyperacetylierten H4 und das Wachstum auf Benomyl bestätigten, dass *Eaf1* als funktionelles Protein in beiden *via*-Mutantenstämmen vorlag.

4.5 Charakterisierung des Gens *EAF1*

4.5.1 Herstellung von *EAF1*-Konstrukten

Der ORF *YDR359C* (*EAF1*, *VID21*) kodiert mit seinen 2949 bp für ein 982 Aminosäure großes Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von 112 kDa. Eaf1 ist eine von dreizehn Untereinheiten des Histon-Acetyltransferase-Komplexes NuA4 (**n**ucleosome **a**cetyltransferase of **H4**) (Krogan *et al.*, 2004). Das Protein besitzt zwei Domänen, eine HSA- (**H**elicase/**S**ANT-**A**ssociated) und eine SANT- (**S**wi3-**A**da2-**N**CoR-**T**FIIB) Domäne und C-terminal eine Glutamin (Q)-reiche Region (Doyon und Côté, 2004). Die HSA-Domäne liegt zwischen den Aminosäuren (As) 347 und 418 und entspricht einer potentiellen DNA-Binderegion (Szerlong *et al.*, 2008). SANT-Domänen kommen in einer Vielzahl von Chromatin-Komplexen vor und erkennen die DNA-Sequenz YAAC(G/T)G (Aasland *et al.*, 1996). In Eaf1 liegt dieses Motiv zwischen den Aminosäuren 646 bis 706. Die Funktion der C-terminalen Glutamin-reichen Region ist noch unbekannt. Ihre Deletion zeigt keinen Phänotyp und hat keinerlei Effekt auf die Assemblierung des NuA4-Komplexes (Auger *et al.*, 2008). Eaf1 ist im Kern lokalisiert, ein potentielles Kernlokalisationssignal (NLS; **n**uclear **l**ocalization **s**equence) KKCLK liegt um Aminosäure 100.

Um die Funktion von Eaf1, vor allem in Hinblick auf die Wiederherstellung der Aminopeptidase 1-Aktivität durch das Protein näher zu untersuchen, wurden Verkürzungen hergestellt. Das aminoternale Fragment des Proteins (1-862 bp) entspricht dem im Komplementationsanalyse gefundenen Genabschnitt (Abb.7). Diese Verkürzung sollte demnach Ape1-Aktivität in dem Stamm *via14-2* induzieren können. Ein bis Aminosäure 283 C-terminal verkürztes Fragment enthält alle bekannten Domänen des Proteins (Abb.21). Die Verkürzungen wurden mittels Polymerasekettenreaktion aus dem Konstrukt *pYX141-EAF1* amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *Hind* III verdaut und in die Hefevektoren *pYX141*, *pYX142* und *pYX242* kloniert. Zusätzlich wurde die potentielle NLS KKCLK an Position 100 mutiert. Dazu wurden zwei PCRs durchgeführt. Die amplifizierten Fragmente überlappen und sind in ihrer potentiellen NLS-Sequenz mutiert. Beide PCR-Produkte wurden isoliert und für eine neue PCR mit den endständigen 5'- und 3'-Primern eingesetzt.

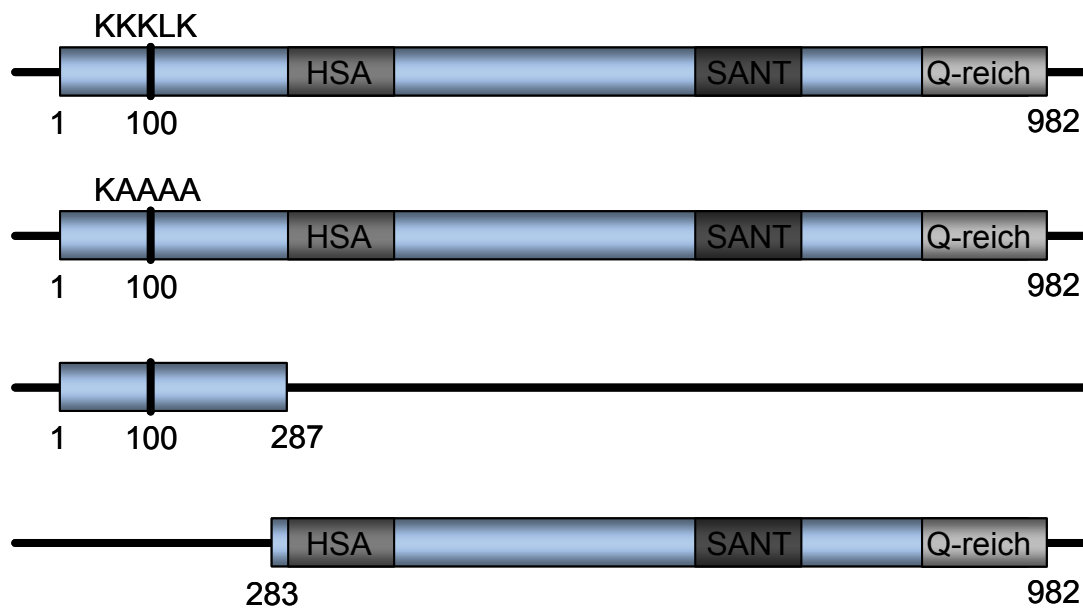


Abb.21: Schematische Darstellung von Eaf1 mit klonierten Verkürzungen.

Eaf1 besitzt die DNA-bindenden Domänen HSA (As 347-418) und SANT (As 646-706) und eine Glutamin (Q)-reiche Region am C-Terminus. Das potentielle Kernlokalisierungssignal KKKLK an Aminosäureposition 100 wurde zu KAAAA mutiert. Es wurden zwei Verkürzungen des Proteins in die Hefevektoren *pYX141* und *pYX242* kloniert: *EAF1* 1-862 bp (Aminosäuren 1 bis 287), und *EAF1* 847-2946 bp (Aminosäuren 283-982).

4.5.2. Der Einfluss von *EAF1*-Verkürzungen auf die Aktivität der Ape1

Um nun die Funktion von Eaf1 in der Wiederherstellung der Aminopeptidase 1-Aktivität zu charakterisieren, wurden die in Abb.21 beschriebenen *EAF1*-Konstrukte in den Stamm *eaf1Δ* transformiert und in Ape1-Overlay-Assays untersucht. Als Referenzstämme wurden *eaf1Δ* transformiert mit *pYX141-EAF1*, bzw. *pYX242-EAF1* und *eaf1Δ* transformiert mit Leervektor *pYX141*, bzw. *pYX242* auf jeder Platte neben den zu testenden Stämmen ausgestrichen. Somit konnten innerhalb einer Platte die jeweilige Aktivität der getesteten Hefen semi-quantitativ bestimmt werden (Abb.22). Wie bereits erwähnt (4.5.1), sollte die Verkürzung *EAF1* 1-862 bp in der Lage sein Ape1-Aktivität zu induzieren. Mit dem *cen*-Konstrukt konnte eine 20%-ige Aktivität im Vergleich zum vollständigen Protein nachgewiesen werden, mit höherer Expressionsrate (2μ) stieg diese Aktivität auf 60% an. Die N-terminale Verkürzung (847-2946 bp) war geringfügig aktiver, hier entsprach die messbare Ape1-Aktivität bereits bei geringer Expressionsrate (*cen*) 60% der Gesamtprotein-Kontrolle. Die

Mutation des potentiellen Kernlokalisierungssignals an Aminosäureposition 100 zeigte gegenüber dem *WT*-Stamm eine unveränderte Aktivität.

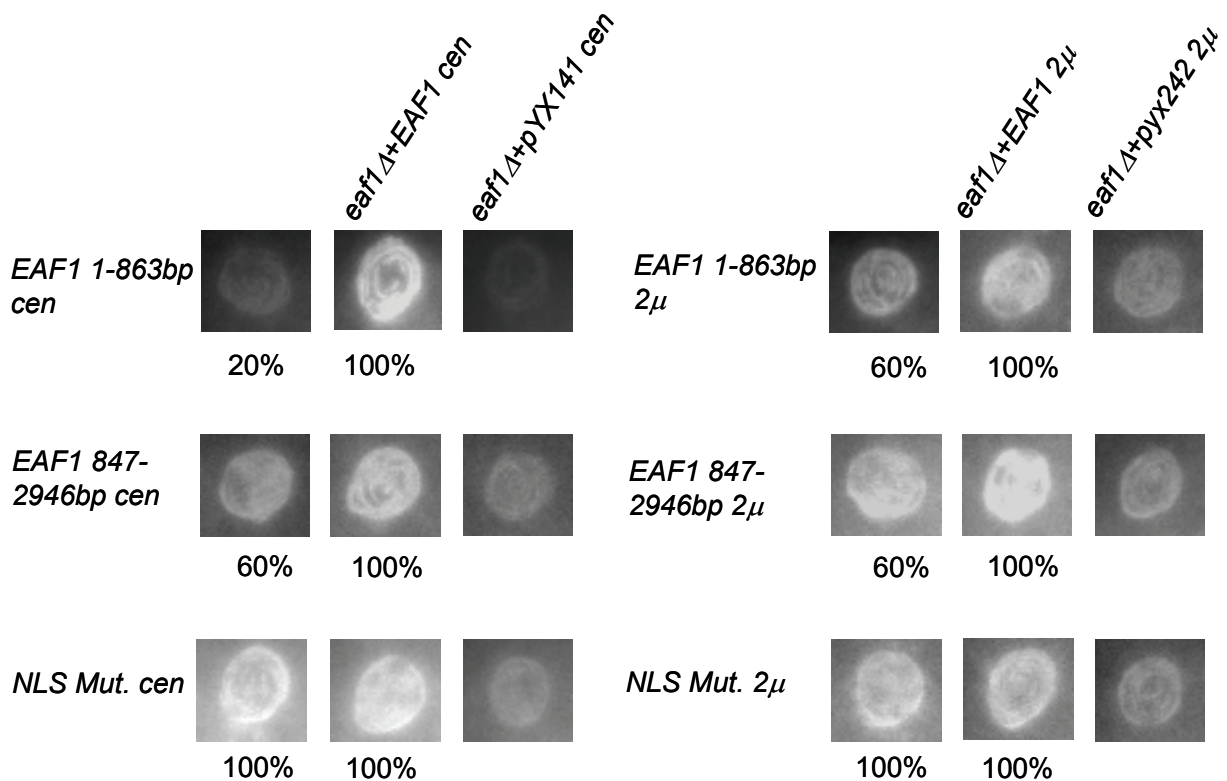


Abb.22: Aminopeptidase 1-Aktivitätsbestimmung in *EAF1* transformierten Hefen.

Aminopeptidase 1-Aktivität wurde durch Spaltung des Substrats H-Leucin- β -Naphthylamid bei folgenden Stämmen bestimmt und mit den Referenzstämmen *eaf1Δ* transf. mit *pYX141-EAF1* (y170), bzw. *pYX242-EAF1* (y172) als Positivkontrolle und *eaf1Δ* transf. mit *pYX141* (y162), bzw. *pYX242* (y164) als Negativkontrolle verglichen: *eaf1Δ* transf. mit *pYX141-EAF1 1-862 bp* (y189); *eaf1Δ* transf. mit *pYX242-EAF1 1-862 bp* (y191); *eaf1Δ* transf. mit *pYX141-EAF1 847-2946 bp* (y193); *eaf1Δ* transf. mit *pYX242-EAF1 847-2946 bp* (y195); *eaf1Δ* transf. mit *pYX141-EAF1 NLS Mutation* (y197); *eaf1Δ* transf. mit *pYX242-EAF1 NLS Mutation* (y199).

4.6 Der Einfluss von Eaf1 auf die Expressions- und Transkriptionsrate der Aminopeptidase 1

Wie in Ape1-Overlay-Assays gezeigt (Abb.16 und Abb.22) erhöht die Expression von Eaf1 die Aktivität der Aminopeptidase 1. Wie aber beeinflusst ein Protein mit beschriebener Kernlokalisierung die Aktivität der zytosolischen, bzw. vakuolären Aminopeptidase 1? Wie bereits erwähnt, ist die Ape1-Proteinexpression in den *via*-Mutanten im Vergleich zum *WT*-Stamm bis zu 50% reduziert (Abb.12 und Andrei-Selmer *et al.*, 2001). Um nun die Ape1-Expressionsrate des *eaf1*-Deletionsstammes, sowie den Einfluss der Eaf1-Expression auf die Mutanten- und Deletionsstämme zu bestimmen, wurden jeweils 1 OD Zellen logarithmisch wachsender Hefekulturen durch alkalische Lyse aufgeschlossen und die Ape1-Expression mittels Western Blot-Analysen bestimmt. Um sicher zu stellen, dass während des Zellaufschlusses keine Degradation des Ape1-Proteins stattfand, wurde ein *pep4Δ*-Stamm (y75) als Kontrolle mitgeführt, in dem eine Mutation der Proteinase A die Reifung der prApe1 verhindert.

Wie in Abb.23 A und C gezeigt, war nach Deletion der ORFs *YDR359C* und *YDR360W* (*eaf1Δ*) die Expression der Aminopeptidase 1 im Vergleich zum *WT* Stamm um über 50% reduziert. Die Transformation des *EAF1*-Gens in Stamm *eaf1Δ* erhöht diese wieder auf über *WT*-Niveau. Der Anstieg der Ape1-Expressionsrate durch die Eaf1-Expression war in den Mutantenstämmen *via10-2* und *via14-2* weniger deutlich ausgeprägt und konnte auch auf mRNA-Ebene mittels Northern Blot-Analysen nicht bestätigt werden.

In bis zur stationären Phase ($OD_{600} > 2$) gewachsene Hefekulturen kann aufgrund des Transportes durch Autophagozytose untersucht werden, ob die Prozessierung der Aminopeptidase 1 stattfindet, d.h. die prApe1 zur mApe1 reift (Klionsky *et al.*, 1992). Im Vergleich zum Wildtypstamm *C6C* zeigten die Mutanten *via10* und *via14* zwar eine geringfügig erhöhte Akkumulation der prApe1, eine Prozessierung des Proteins fand jedoch statt (Andrei-Selmer *et al.*, 2001). Sowohl die Stämme mit integrierter *APE1* (*WT*, *via10-2* und *via14-2*), als auch die Deletion von *EAF1* hatte keinen Einfluss auf den Reifungsprozess, d.h. in stationär gewachsenen Zellen konnte ausschließlich die prozessierte mApe1 nachgewiesen werden (Abb.23A).

Um zu überprüfen, ob Veränderungen der Aminopeptidase 1-Level bereits auf transkriptioneller Ebene stattfinden, oder ob es sich um Unterschiede in der Stabilität

des Proteins nach seiner Synthese handelt, wurden zunächst Northern Blot-Analysen durchgeführt. Dazu wurde isolierte RNA aus logarithmisch wachsenden Hefekulturen der Stämme *WT*, *via10-2*, *via14-2*, *eaf1Δ* und *eaf1Δ* transformiert mit *EAF1* oder *YDR360W* über ein Formaldehydgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels dem Kapillarblotverfahren auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde mit einem ³²P-markierten *APE1*-Fragment hybridisiert. Die *APE1*-mRNA migriert auf Höhe der *18S rRNA*, was in Hefe einer Größe von 2000 bp entspricht. Als Kontrolle wurde die RNA eines *ape1Δ*-Stammes verwendet, bei dem kein Signal sichtbar war. Die Stämme *via10-2* und *eaf1Δ* zeigten etwas geringere mRNA-Mengen als der *WT*-Stamm. Der Stamm *via14-2* war in seiner Transkriptionsrate mit dem *WT* vergleichbar. Nach Transformation von *EAF1* in den Deletionsstamm wurde ein Anstieg der *APE1*-mRNA beobachtet, während die Transformation von *YDR360W* keinerlei Einfluss auf die Transkriptionsrate hatte. Somit stand in den *via*-Mutanten und in den *eaf1Δ*-Stämmen die Transkription des *APE1*-Gens in direktem Zusammenhang mit der Ape1-Expression. Ob dies auch mit der bereits beschriebenen Aktivität der Aminopeptidase 1 korrelierte, musste noch geklärt werden (graphisch dargestellt in Abb.23C).

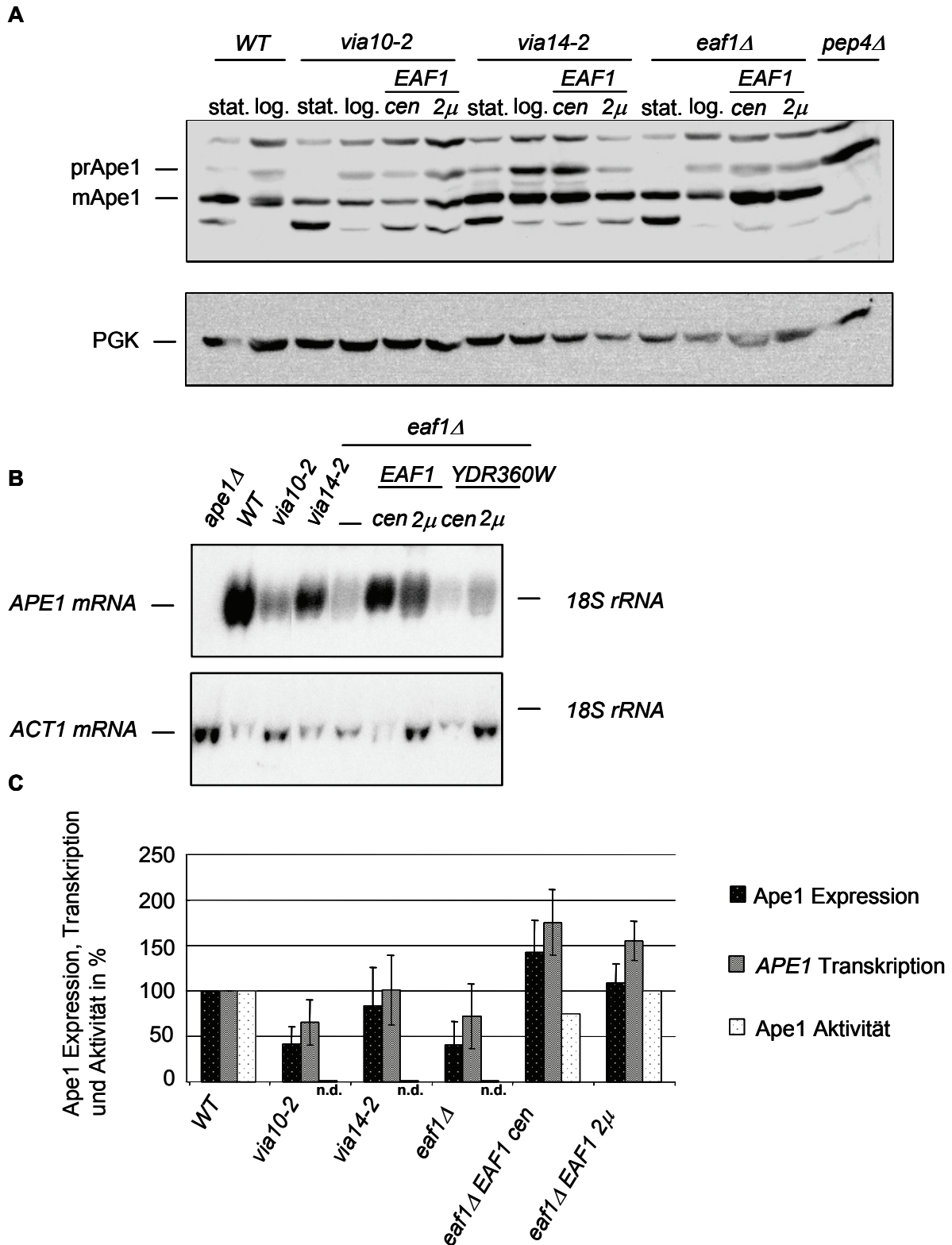


Abb.23: Expression und Transkription der Aminopeptidase 1 in Abhängigkeit von Eaf1-Expression

A Western Blot-Analyse von Ganzzellproteinextrakten aus stationär ($OD_{600} > 2$) und logarithmisch ($OD_{600} = 1$) wachsenden Zellen. Jeweils 1 OD Zellen der Stämme *WT* (y96), *via10-2* (y43), *via10-2* transf. mit *pYX141-EAF1* (y156), *via10-2* transf. mit *pYX242-EAF1* (y157), *via14-2* (y46), *via14-2* transf. mit *pYX141-EAF1* (y158), *via14-2* transf. mit *pYX242-EAF1* (y159), *eaf1Δ* (y126), *eaf1Δ* transf. mit *pYX141-EAF1* (y170), *eaf1Δ* transf. mit *pYX242-EAF1* (y172) und *pep4Δ* (y75) als Lyse Kontrolle

wurden über alkalische Lyse aufgeschlossen, auf einem 10%-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit anti-Ape1 Serum und anti-PGK inkubiert. **B** Northern Blot-Analyse der Stämme *ape1Δ* (y109), *WT*, *via10-2*, *via14-2*, *eaf1Δ*, *eaf1Δ* transf. mit *pYX141-EAF1* (y170), *eaf1Δ* transf. mit *pYX242-EAF1* (y172), *eaf1Δ* transf. mit *pYX141-YDR360W* (y166) und *eaf1Δ* transf. mit *pYX242-YDR360W* (y168). Je 20 µg RNA wurden auf eine Nylon-Membran transferiert. Die Membran wurde mit einem ³²P-markierten *APE1*-Fragment und nach dessen Entfernung mit einem ³²P-markierten *ACT1*-Fragment hybridisiert. **C** Graphische Darstellung der Ape1-Expression in Western Blot-Analysen (n=7), Transkription durch Northern Blot-Analysen (n=3) und Aktivität bestimmt in Ape1-Overlay-Assays (n>15); n.d. - nicht detektierbar.

4.7 α-Mannosidase-Aktivität im *eaf1Δ*-Stamm

Wie bereits einleitend beschrieben, wird die α-Mannosidase (Ams1) zusammen mit der Aminopeptidase 1 über den Cvt-Transportweg in die Vakuole transportiert. Ams1 bindet entweder zeitgleich oder kurz versetzt mit dem Rezeptor Atg19 an die homododecamerisierte Form der Ape1; somit kommt es zur Ausbildung des sog. Cvt-Komplexes (Abb.3). Die α-Mannosidase benötigt dabei die Interaktion mit der Ape1, genauer dem Cvt-Komplex, um in die Vakuole zu gelangen (Shintani *et al.*, 2002). Da in den Mutanten- und *eaf1Δ*-Stämmen sowohl die Aktivität, als auch die Expression der Ape1 reduziert war, sollte untersucht werden, ob dies auch die Aktivität der α-Mannosidase beeinflusste. Die vakuoläre Ams1-Aktivität ist durch katalytische Spaltung des Substrats 4-Nitrophenyl-α-D-Mannopyranosid messbar (3.17). CuSO₄ in Verbindung mit Triton X-100 hemmt diese Reaktion, was darauf hindeutet, dass das aktive Zentrum des Enzyms auf der Innenseite der Vakuolenmembran liegt (Yoshihisa *et al.*, 1988). Um die Aktivität der α-Mannosidase in den Mutanten- und dem Deletionsstamm zu bestimmen, wurden Vakuolen isoliert (3.16) und mit dem Substrat 4-Nitrophenyl-α-D-Mannopyranosid in Anwesenheit von Triton X-100 für zwei bis vier Stunden bei 30°C inkubiert. Die katalytische Spaltung des Substrats wurde bei einer Wellenlänge von 400 nm bestimmt. Zur Auswertung der spezifischen Aktivität wurden die Werte des enzymatisch umgesetzten Substrates der Proben mit Triton X-100 von den Werten mit Triton X-100 und CuSO₄ subtrahiert. Die Ams1-Aktivität des *WT*-Stammes wurde jeweils auf 100% festgelegt. Es zeigte sich, dass die ermittelten Aktivitäten der *via*-Mutanten und der Deletionsmutante *eaf1Δ* durchschnittlich um 60%, bzw. 70% geringer waren als die des Wildtyps (Abb.24).

Dies könnte darauf hindeuten, dass die erniedrigte Ape1-Expressionsrate und eventuell sogar der Verlust der Aminopeptidase 1-Aktivität direkten Einfluss auf die α -Mannosidaseaktivität nimmt.

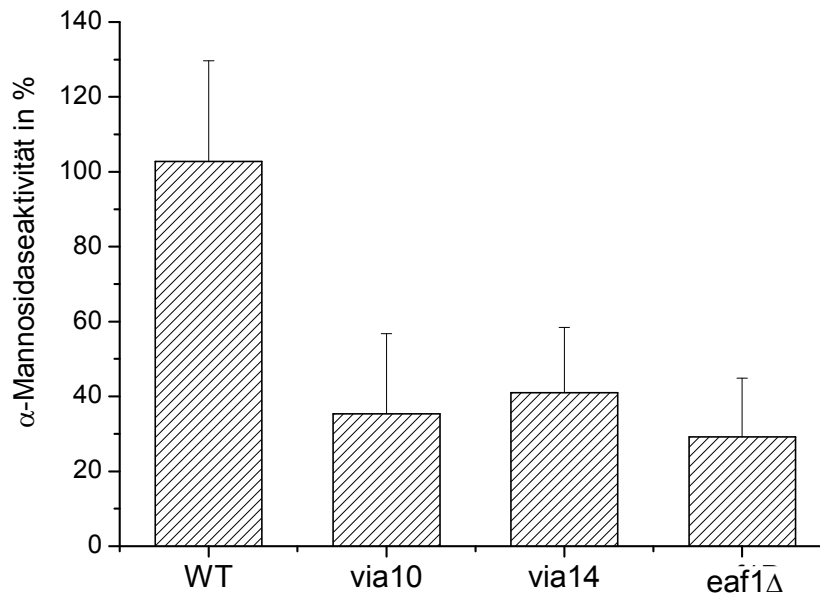


Abb.24: α -Mannosidaseaktivität in WT, Mutantenstämmen und Deletionsstamm *eaf1 Δ* .

Isolierte Vakuolen der Stämme WT (y12 und y96), *via10* (y89), *via14* (91) und *eaf1 Δ* (y126) wurden mit dem Substrat 4-Nitrophenyl α -D-Mannopyranosid in Anwesenheit von Triton X-100 oder Triton X-100 mit CuSO₄ für zwei bis vier Stunden bei 30°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte photometrisch bei 400 nm.

4.8 Eaf1 und seine Funktion innerhalb des NuA4-Komplexes

Eaf1 ist Teil des NuA4-Komplexes und maßgeblich an der Hyperacetylierung des Histons H4 beteiligt (Krogan *et al.*, 2004 und Abb.19). Kobor *et al.* (2004) beschrieben eine Hypersensitivität von Kinetochor- und Spindel-Kontrollpunkt Mutanten auf die Mikrotubuli destabilisierende Chemikalie Benomyl. Es konnte gezeigt werden, dass diese ebenfalls einen negativen Einfluss auf das Wachstum des *eaf1*-Deletionsstammes hatte (Krogan *et al.*, 2004 und Abb.20). Außerdem war zu beobachten, dass nach Deletion des *EAF1*-Gens die Hefezellen temperatursensitiv wurden (Abb.18). Um zu überprüfen, ob dies in einem direkten Zusammenhang mit der Wiederherstellung der Aminopeptidase 1-Aktivität (Abb.16)

stand, wurden Stämme mit verkürzten *EAF1*-Konstrukten sowohl auf mit Benomyl behandelten, als auch auf Vollmediumplatten bei 30°C und 37°C inkubiert (Abb.25A). Es wurde festgestellt, dass der N-terminus des Proteins (*EAF1* 1-862 bp) vor allem als „single copy“ exprimiertes Protein kaum in der Lage war auf 15 µg/ml Benomyl, bzw. bei 37°C zu wachsen. Die N-terminale Verkürzung der Basenpaare 847-2946 hingegen entsprach vor allem bei hoher Expressionsrate (2µ) annähernd dem Wachstumsverhalten des kompletten *EAF1*-Konstruktes. Die Mutation des potentiellen Kernlokalisations signals hatte keinen Einfluss auf das untersuchte Wachstumsverhalten. Des Weiteren wurde überprüft, inwieweit die verkürzten Eaf1-Fragmente in der Lage waren die Hyperacetylierung des Histons 4 zu regulieren. Wie in Abb.25B gezeigt, bedarf es des C-terminalen Teils des Proteins, um sowohl die Hyperacetylierung von H4, als auch die Expression der Aminopeptidase 1 zu stimulieren.

Das Wachstum der Hefen mit verschiedenen *EAF1*-Konstrukten auf Benomylhaltigen Vollmediumplatten oder bei 37°C und ihre Fähigkeit Histon H4 zu hyperacetylieren, stand in direktem Zusammenhang mit der ermittelten Ape1-Aktivität der Konstrukte in Ape1-Overlay-Assays. Dies ließ vermuten, dass die hier beschriebenen Beobachtungen Teil der Funktionen von Eaf1 innerhalb des NuA4-Komplexes sind.

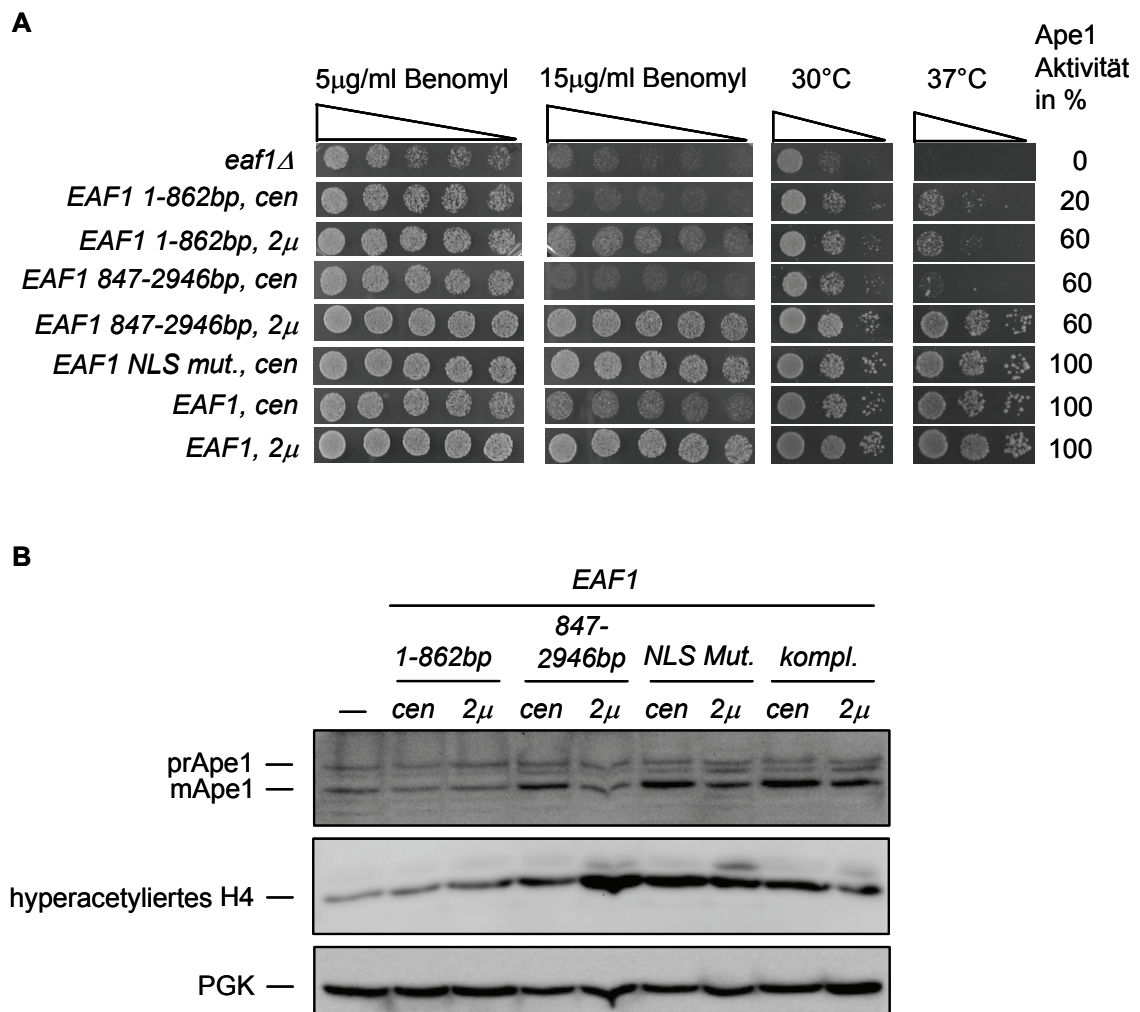


Abb.25: Wachstumsverhalten und Hyperacetylierung von Histon H4 durch N- und C-terminale Eaf1-Verkürzung des Stammes *eaf1Δ*.

A Übernachtskulturen der Stämme *eaf1Δ*, *eaf1Δ* transf. mit *pYX141-EAF1 1-862 bp* (y189); *eaf1Δ* transf. mit *pYX242-EAF1 1-862 bp* (y191); *eaf1Δ* transf. mit *pYX141-EAF1 847-2946 bp* (y193); *eaf1Δ* transf. mit *pYX242-EAF1 847-2946 bp* (y195); *eaf1Δ* transf. mit *pYX141-EAF1 NLS Mutation* (y197); *eaf1Δ* transf. mit *pYX242-EAF1 NLS Mutation* (y199), *eaf1Δ* transf. mit *pYX141-EAF1* (y170) und *eaf1Δ* transf. *pYX242-EAF1* (y172) wurden mit H₂O auf eine Anfangs-OD₆₀₀ von 0.1 verdünnt. Daraus wurde eine fünffach fortlaufende Verdünnung hergestellt, auf den mit 5, bzw. 15 µg/ml Benomyl behandelten Vollmediumplatten zwei Tage bei 30°C inkubiert. Zur Bestimmung des Wachstumsverhaltens wurden die Übernachtskulturen mit H₂O auf eine Anfangs-OD₆₀₀ von 0.1 verdünnt, woraus dann eine 1:10 und 1:100 Verdünnung hergestellt wurde. Die Prozentangaben zur Ape1-Aktivität beziehen sich auf die Prozentangaben in Abbildung 22. **B** Western Blot-Analysen mit den Eaf1-Verkürzungen. Ganzzelllysate wurden über ein 15%-iges Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Nassblotverfahren auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit anti-hyperacetylierten H4 Penta, polyklonalem anti-Ape1 und anti-PGK Antikörper inkubiert.

4.9 Herstellung weiterer Deletionsmutanten des NuA4-Komplexes

Der Histon-Acetyltransferase-Komplex NuA4 besteht aus dreizehn Untereinheiten (Abb.26A). Das Protein Esa1 ist die katalytische Untereinheit des Komplexes, das die Acetylierung der Histone H4 und H2A in Abhängigkeit der beiden Proteine Eaf1 und Yng2 reguliert (Doyon und Côté, 2004, Krogan *et al.*, 2004). Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Deletion des Proteins Eaf1 zu einem Verlust der Ape1-Aktivität führt.

Neben Eaf1 enthält der NuA4-Komplex sechs weitere nicht-essentielle Proteine (Abb.26A). Um zu untersuchen, ob die Deletion weiterer Untereinheiten ebenfalls zum Verlust der Aminopeptidase 1-Aktivität führt, wurden jeweils die Proteine Yng2 (ORF *YHR090C*), Yaf9 (ORF *YNL107W*), Eaf3 (ORF *YPR023C*), Eaf5 (ORF *YEL018W*), Eaf6 (ORF *YLR082C*) und Eaf7 (ORF *YNL136W*) deletiert. Dazu wurden wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben das *HIS3*-Homolog aus *Schizosaccharomyces pombe HIS5⁺* mit 45 bp komplementäre 5'- und 3'-Enden der genomischen DNA der entsprechenden ORFs aus dem Plasmid *pFA6a-HIS3MX6* amplifiziert und in den *WT*-Stamm (y96) transformiert. Nach erfolgreicher Integration mittels homologer Rekombination wurden die Hefestämme Histidin-prototroph. Die Integrationen wurden mit Polymerasekettenreaktion an Ganzzelllysaten überprüft. Zum einen wurden Oligonukleotide eingesetzt, die das jeweilige Gen amplifizierten und somit nur in der *WT*-Kontrolle ein PCR-Produkt ergaben und zum anderen Oligonukleotide, die ca. 300 bp des Genoms und ca. 700 bp des integrierten Konstrukts amplifizierten und damit nur in den Deletionsstämmen bei korrekter Integration des PCR-Produktes ein Signal ergaben (Abb.26B).

Der Verlust des *EAF1*-Genes führte zu einem kompletten Verlust der Ape1-Aktivität. Nach Deletion weiterer Untereinheiten des NuA4-Komplexes wurde deren Einfluss auf die Ape1-Aktivität in Overlay-Assays getestet. Die Stämme *WT* und *eaf1Δ* dienten dabei als Positiv-, bzw. Negativkontrolle. Die Deletionsstämmen *yng2Δ*, *eaf5Δ*, *eaf6Δ* und *eaf7Δ* unterschieden sich nicht in der Ape1-Aktivität vom *WT*-Stamm. Das Protein Yng2 wird zusammen mit Eaf1 für die Acetylierung des Histons H4 benötigt. Die Transformation des *YNG2*-Genes in den *eaf1Δ*-Stamm führte zu keinerlei Aktivitätsgewinn. Bei den Stämmen *eaf3Δ* und *yaf9Δ* war ein Rückgang der Ape1-Aktivität um etwa 20% bis 30% zu beobachten. Keine der Deletionen führte zu einem Totalverlust der Ape1-Aktivität (Abb.27). Diese deutet auf eine Funktion des Proteins

Eaf1 außerhalb seiner beschriebenen Rolle als Untereinheit des NuA4-Komplexes hin.

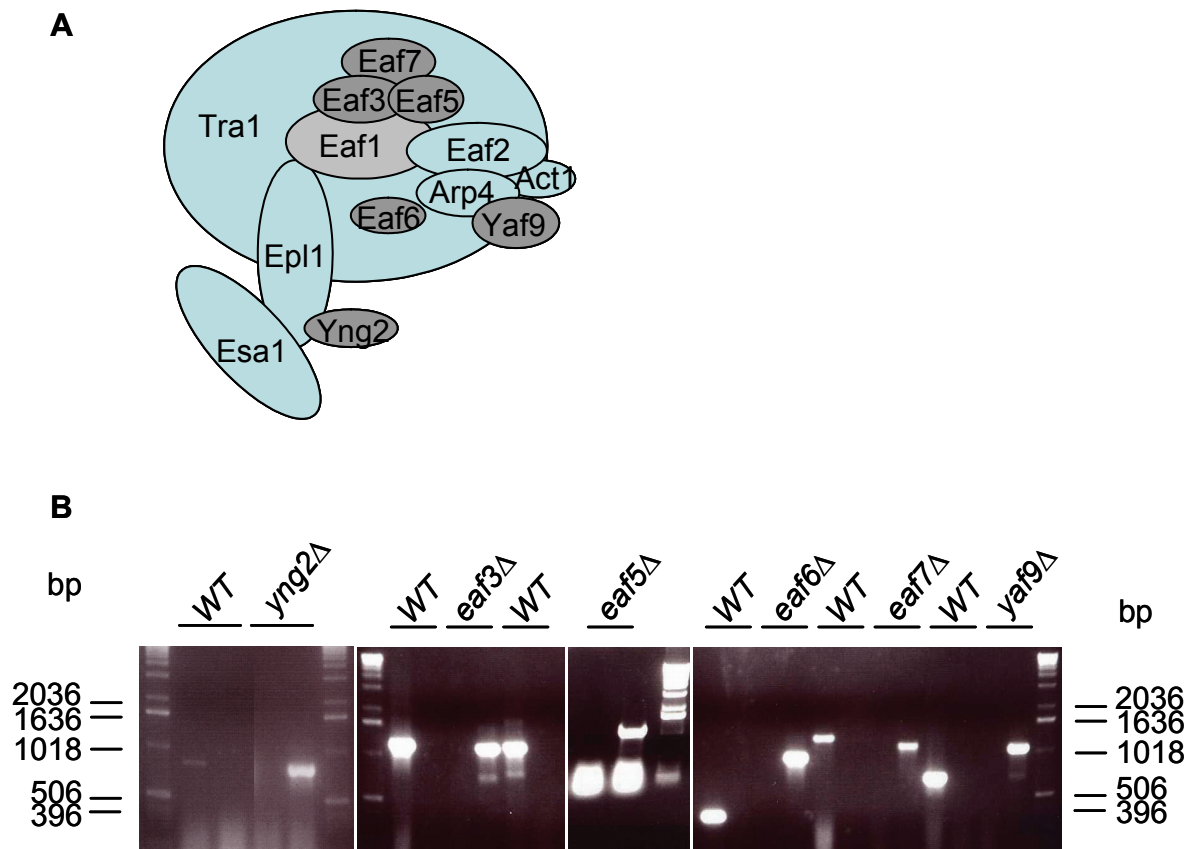


Abb.26: Deletionsstämme des NuA4-Komplexes.

A Schematische Darstellung des aus essentiellen (blau) und nicht-essentiellen (grau) Proteinen zusammengesetzten NuA4-Komplexes (Abbildung abgeändert nach Hancock *et al.*, 2006).

B Ganzzell-PCR zur Verifizierung der Deletionsstämme *yng2Δ* (y210), *eaf3Δ* (y249), *eaf5Δ* (y250), *eaf6Δ* (y252), *eaf7Δ* (y255) und *yaf9Δ* (y256). Die DNA des WTs (y96) und der Deletionsstämme wurden jeweils mit den Oligonukleotiden TB90/87 (WT - 849 bp, *yng2Δ* - kein Signal (k.S.)) und TB84/56 (WT - k.S., *yng2Δ* - ca.700 bp), TB131/132 (WT - 1203 bp, *eaf3Δ* - k.S.) und TB128/56 (WT - k.S., *eaf3Δ* - ca. 1000 bp), TB127/134 (WT - 1137 bp, *eaf5Δ* - k.S.) und TB127/56 (WT - k.S., *eaf5Δ* - ca. 1000 bp), TB135/136 (WT - 339 bp, *eaf6Δ* - k.S.) und TB141/56 (WT - k.S., *eaf6Δ* - ca. 900 bp), TB137/138 (WT - 1275 bp, *eaf7Δ* - k.S.) und TB130/56 (WT - k.S., *eaf7Δ* - ca. 1000 bp) oder TB139/140 (WT - 682 bp, *yaf9Δ* - k.S.) und TB126/56 (WT - k.S., *yaf9Δ* - ca. 1000 bp) amplifiziert.

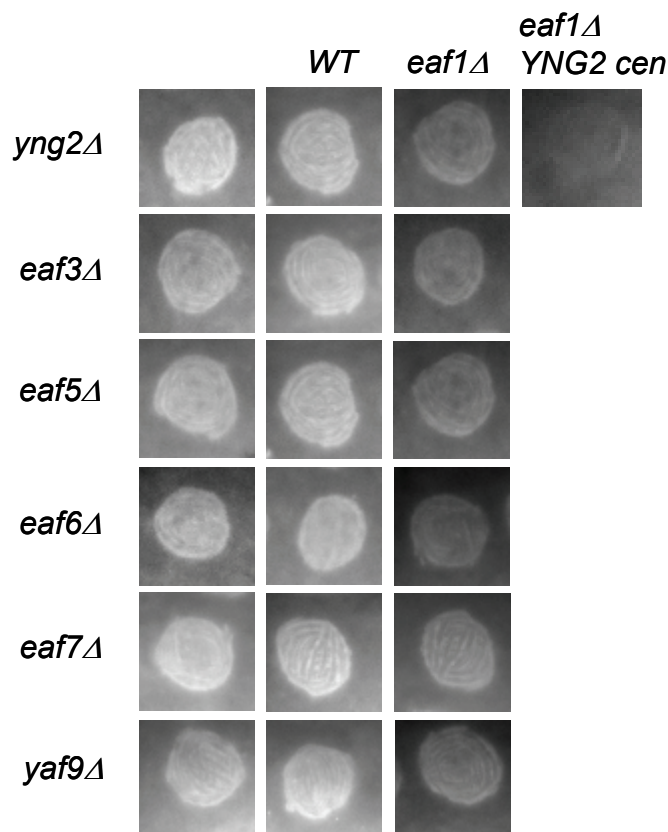


Abb.27: Ape1-Aktivität in Deletionsstämmen des NuA4-Komplexes.

Ape1-Overlay-Assay zur Bestimmung der Aminopeptidase 1-Aktivität durch Spaltung des Substrats H-Leucin-β-Naphtylamid. Die zu testenden Deletionsstämme befanden sich jeweils mit dem WT (100% Aktivität) und *eaf1*Δ (keine Aktivität) auf einer Platte.

4.10 Der Einfluss von Aminopeptidase 1-Überexpression auf die Wiederherstellung der Ape1-Aktivität in *eaf1*Δ-Stämmen

NuA4 ist an der Regulation der Transkription beteiligt. Wir beobachten durch Expression der Untereinheit Eaf1 einen Anstieg der Aminopeptidase 1-Expression und gleichzeitig eine Wiederherstellung ihrer Aktivität in *eaf1*-Deletionsstämmen und der Mutante *via14-2*. Um zu klären, ob die Aktivität der Ape1 alleine auf eine erhöhte Expression des Proteins zurückzuführen ist, wurde das Gen *APE1* in verschiedenen Hefestämmen überexprimiert und anschließend die Ape1-Aktivität bestimmt. Dazu wurde *APE1* mittels Polymerasekettenreaktion aus dem Konstrukt *pRS313-APE1*

amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Hind*III verdaut und die Hefevektoren *pYX141 (cen)*, *pYX142 (cen*)*, *pYX242 (2 μ)* und *pYX132 (cen*)* mit C-terminalen HA-„tag“ kloniert. Es wurde beobachtet, dass eine C-terminal markierte Aminopeptidase 1 in ihrer Proform akkumuliert, da diese nicht mehr prozessiert werden kann (Daten nicht gezeigt). Folglich wurde durch das Einfügen eines Stopcodons in das verwendete Oligonukleotid TB93 eine Expression des Fusionsproteins verhindert. Die Konstrukte wurden in die Stämme *eaf1 Δ* , *via10-2* und *via14-2* transformiert und die Expression der Ape1 in Western Blot-Analysen überprüft (Abb.28A). Die Expressionsraten der mApe1 wurden mit Hilfe des LAS Fuji Bearbeitungsprogramm AIDA quantifiziert. Nach Transformation der Konstrukte wurde eine gleich bleibende (*cen*), um Faktor zwei (*cen**), bzw. um Faktor vier (*2 μ*) erhöhte Expression der Ape1 in dem *eaf1 Δ* -Stamm im Vergleich zum *WT*-Stamm ermittelt. Nach Transformation von *EAF1* hingegen ist die mApe1-Expression (*cen* und *2 μ*) um ca. 20% gestiegen. In den *via*-Mutanten wurde die Expressionsrate der mApe1 um Faktor vier (*via10-2*), bzw. fünf (*via14-2*) erhöht.

Anschließend wurde mittels Ape1-Overlay-Assays überprüft, ob die so gesteigerte Expression der Aminopeptidase 1 ausreichend ist, um die Aktivität des Enzyms wiederherzustellen (Abb.28B). In *eaf1 Δ* -Stämmen konnte die Aktivität nach vierfach gesteigerter mApe1-Expression (*2 μ* -Vektor) wiederhergestellt werden und, wie bereits in vorhergehenden Versuchen bestätigt (Abb.16), zeigte die Expression von *EAF1 (cen)* ebenfalls eine deutliche Ape1-Aktivität. In *via14-2* führte eine Überexpression der Ape1 ebenfalls zur Wiederherstellung der Ape1-Aktivität, während diese in der Mutante *via10-2* keinerlei Einfluss hatte. Dies zeigt, dass zur vollständigen Restauration der Ape1-Aktivität eine vier- bis fünffache Überexpression von Ape1 nötig ist, während die Expression von *Eaf1* zu einem Anstieg der Ape1-Expression von nur ca. 20% führt. Dieser ist aber ausreichend, um Ape1-Aktivität zu induzieren.

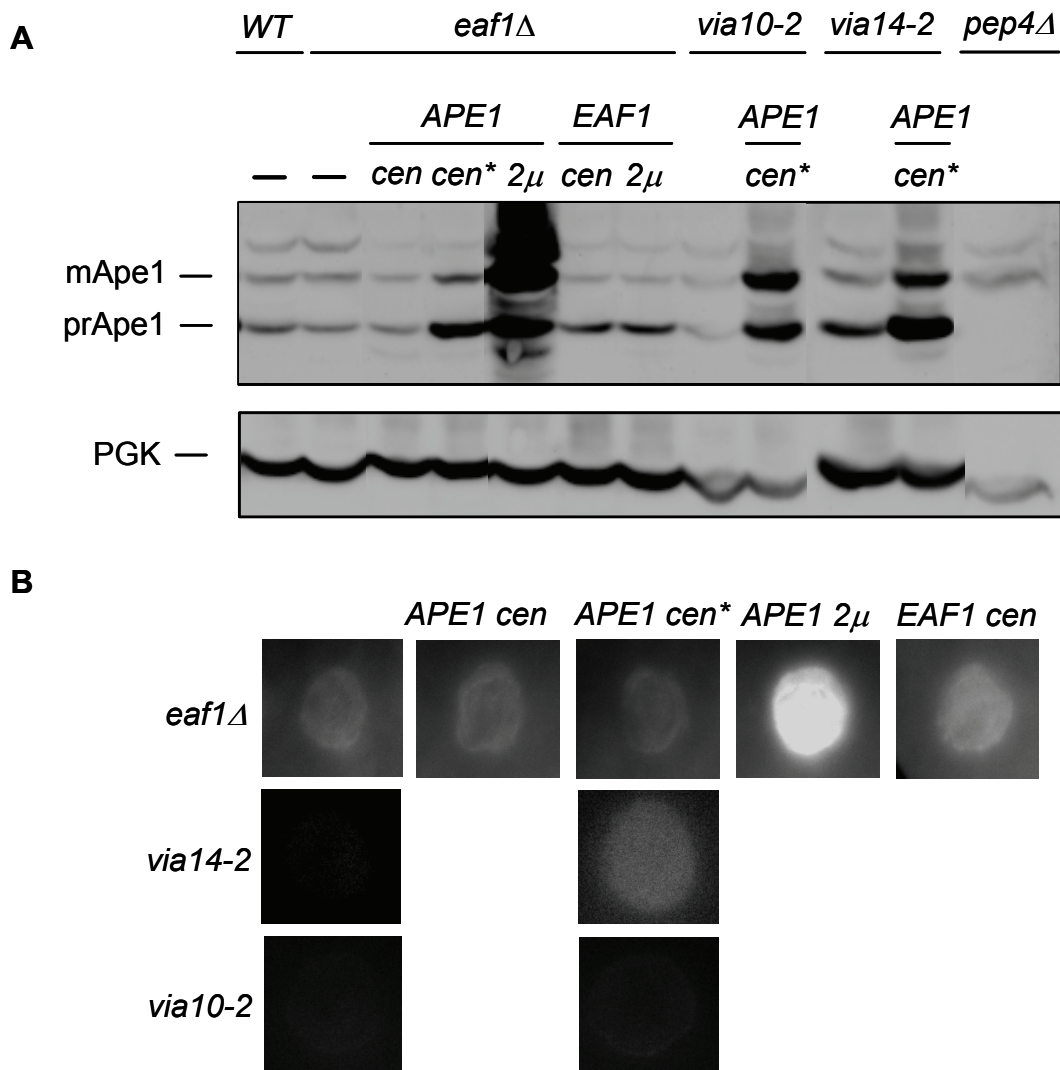


Abb.28: Expression und Aktivität der Aminopeptidase nach Überexpression in den Stämmen *eaf1Δ*, *via10-2* und *via14-2*.

A Western Blot-Analyse mit Ganzzellproteinextrakten logarithmisch wachsenden Zellen. Jeweils 1 OD Zellen der Stämme *WT* (y96), *eaf1Δ* (y126), *eaf1Δ* transf. mit *pYX141-APE1*, *eaf1Δ* transf. mit *pYX142-APE1* (y228), *eaf1Δ* transf. mit *pYX242-APE1*, *eaf1Δ* transf. mit *pYX141-EAF1* (y170), *eaf1Δ* transf. mit *pYX242-EAF1* (y172), *via10-2* (y43), *via10-2* transf. mit *pYX132-APE1* (y236), *via14-2* (y46), *via14-2* transf. mit *pYX142-APE1* (y220) und *pep4Δ* als Lysekontrolle wurden über alkalische Lyse aufgeschlossen. Nach elektrophoretischer Auftrennung, wurde das 10%-ige Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran transferiert und anti-Ape1 Serum und anti-PGK inkubiert. *cen* – Promotor 786; *cen** – Promotor TPI. **B** Ape1-Overlay-Assay nach Überexpression von Ape1 in den Stämmen *eaf1Δ* (y126), *via10-2* (y43) und *via14-2* (y46).

4.11 Eaf1 und Ape1-Interaktionen

Bisher konnte gezeigt werden, dass die Expression von Eaf1 die Transkription des *APE1*-Gens und somit dessen Expressionsrate begünstigt, was im Ape1-Overlay-Assay zur Wiederherstellung der Ape1-Aktivität führt (Abb.16 und Abb.23). Da eine um Faktor zwei gesteigerte Expressionsrate der Aminopeptidase 1 die Aktivität der Ape1 in dem *eaf1Δ*-Stamm nicht beeinflusst (Abb.28), ist davon auszugehen, dass der Beitrag von Eaf1 nicht ausschließlich auf einem transkriptionellen Effekt beruht. Im Folgenden sollte geklärt werden, auf welche Weise das Protein Eaf1 die Aktivität der Ape1 induziert.

4.11.1 Lokalisationsstudien von Eaf1 und Ape1

Eaf1 wird als Kernprotein beschrieben, während die Aminopeptidase 1 im Zytoplasma synthetisiert und nach ihrer Assemblierung in die Vakuole transportiert wird (Krogan *et al.*, 2004; Frey und Röhm, 1978). Um zu überprüfen, ob diese zwei Proteine trotz ihrer in der Literatur beschriebenen, unterschiedlichen Kompartimentierung interagieren und vielleicht so die Aktivität der Ape1 beeinflussen, wurde eine *in situ* Immunfluoreszenz durchgeführt. Da bislang Eaf1-HA-Fusionskonstrukte in Western Blot-Analysen nicht nachweisbar waren, obwohl die Hefen einen Plasmid-abhängigen Phänotyp zeigten, sollte dieses Experiment mit aminoterminalen statt mit carboxyterminalen markiertem Eaf1 durchgeführt werden. Dazu wurde die HA-„tag“-exprimierende Sequenz des „Yeast two Hybrid“-Vektors *pGADT7* mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert und das entstehende PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I verdaut und in die Vektoren *pYX141*, -142 und -242 kloniert. Die richtige Orientierung des HA-Fragments wurde durch Sequenzierung bestätigt. Die klonierten Vektoren wurden als *pYX141-HA*, -142-*HA* und 242-*HA* bezeichnet. Eaf1 wurde anschließend aus dem *pYX141-EAF1*-Konstrukt mit C-terminalen Stopcodon amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *Apa* I und *Hind* III geschnitten und in die Vektoren *pYX141-HA*, -142-*HA* und 242-*HA* kloniert. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot-Analyse (Abb.29A). Die HA-Eaf1-Expression unter Verwendung von *cen**- und *2μ*-Vektoren lieferte ein schwaches, bzw. ein starkes Signal in erwarteter Laufrichtung. Mit dem

„single copy“-Vektor *pYX141-HA* war diese wahrscheinlich zu gering, um mit dem anti-HA Antikörper (Roche) detektiert zu werden.

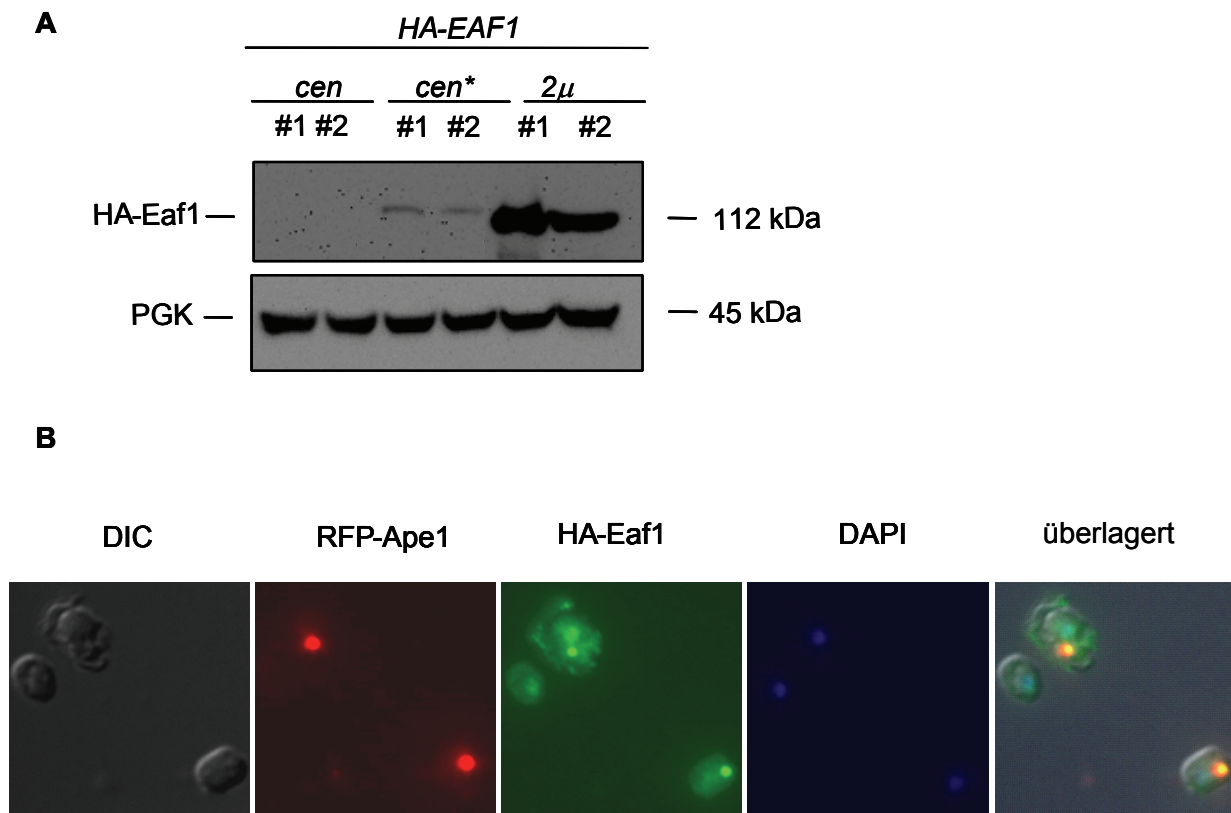


Abb.29: Western Blot-Analyse und *in situ* Immunfluoreszenz zur Lokalisation von HA-Eaf1.

A Western Blot-Analyse der Stämme *WT* transf. mit *pYX141-HA-EAF1* (*cen*), *pYX142-HA-EAF1* (*cen**) und *pYX242-HA-EAF1* (*2μ*). 1 OD logarithmisch wachsender Zellen wurden über alkalische Lyse aufgeschlossen, über ein 10%-iges Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit anti-HA (1:1000) und anti-PGK (1:5000) Antikörper inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit HRP-konjugierten anti-Ratte, bzw. anti-Maus-Antikörpern und Chemilumineszenz. **B** *in situ* Immunfluoreszenz des Stammes *WT* transf. mit *pYX142-HA-EAF1* und *pRS313-RFP-APE1*. Logarithmisch wachsende Zellen wurden mit anti-HA (1:200) und anti-Ratte Alexa Fluor 488 (1:400) inkubiert.

Für die *in situ* Immunfluoreszenz wurde *HA-EAF1* zusammen mit *RFP-APE1* (Konstrukt *pRS313-RFP-APE1*, freundlicherweise von Michael Thumm zur Verfügung gestellt) in den *WT*-Stamm transformiert. Logarithmisch wachsende Zellen wurden mit anti-HA Antikörper (Roche, 1:200) und danach mit Alexa 488 markierten Zweitantikörper (Molecular Probes, 1:400) inkubiert. HA-Eaf1 konnte wie erwartet im Kern lokalisiert werden; zusätzlich wurde eine Akkumulation des Fusionsproteins im Zytoplasma beobachtet. In 60% von insgesamt 100 ausgezählten Zellen wurde eine Co-Lokalisation mit dem RFP-Ape1-Signal bestimmt (Abb.29B). RFP-Ape1 sammelt

sich in logarithmisch wachsenden Zellen am PAS und kann erst in der stationären Phase auch in der Vakuole detektiert werden (Klionsky *et al.*, 1992 und persönliche Korrespondenz mit der Arbeitsgruppe von Prof. Michael Thumm). HA-Eaf1 ist somit sowohl im Kern, als auch am PAS im Zytoplasma zusammen mit dem RFP-Ape1-Signal lokalisiert.

4.11.2 „Yeast two Hybrid“-Interaktionsstudien von Eaf1 und Ape1

In situ Immunfluoreszenzen haben gezeigt, dass Eaf1 nicht nur im Kern, sondern auch als punktuelle Struktur im Zytoplasma, d.h. in der Umgebung des PAS lokalisiert ist und dort mit der Aminopeptidase 1 co-lokalisiert. Um zu klären, ob die beiden Proteine auch interagieren, wurden „Yeast two Hybrid“-Studien durchgeführt (Abb.30A).

Für die Expression der Fusionsproteine wurde das Gen *APE1* mittels Polymerasekettenreaktion aus dem Plasmid *pRS313-APE1* amplifiziert und mit den Restriktionsenzymen *Nco* I und *Sal* I, bzw. *Sma* I und *Sal* I verdaut und in die DNA-bindenden Vektoren *pGBKT7* und *pGBT9* kloniert. Nach Verdau mit den Enzymen *Nco* I und *Sma* I wurde *APE1* in den Vektor mit der Aktivierungsdomäne, *pGADT7* kloniert. N- und C-terminale Verkürzungen des Gens *EAF1* wurden aus dem Plasmid *pYX141-EAF1* amplifiziert und nach Verdau mit den Restriktionsenzymen *EcoR* I und *Sal* I in die DNA-bindenden Vektoren *pGBKT7* und *pGBT9* kloniert. Nach dem Verdau mit *EcoR* I und *Sma* I wurden die Konstrukte in den Vektor *pGADT7* kloniert (Abb.30B). Die Plasmide wurden in den Hefestamm *AH109* transformiert und auf Platten ohne die Aminosäuren Tryptophan und Leucin selektioniert. Um eine potentielle Interaktion der Aminopeptidase 1 mit Eaf1 zu testen, wurde die Transkription der Reportergene *HIS3* und *ADE1* mittels Selektionsplatten überprüft (Abb.30C). Durch die gezeigte Interaktion der Proteine p53 und SV40-T Antigen wurde die Funktionalität des Versuchs sichergestellt. Nach Expression der Ape1 fusioniert mit der *GAL4*-Bindedomäne und Eaf1 fusioniert mit der Aktivierungsdomäne konnte kein Wachstum auf Histidin- oder Adenin-Mangelmedium nachgewiesen werden. Die Reportergene wurden demnach nicht transkribiert, was auf eine fehlende Wechselwirkung der Fusionsproteine schließen ließ. Eine potentielle Interaktion der Proteine sollte auch nach Austausch der Domänen, d.h. bei Expression der Eaf1 mit der DNA-bindenden- und Ape1 mit

Aktivierungsdomäne getestet werden. Vorversuche zeigten jedoch, dass die Expression Eaf1 mit DNA-bindender Domäne selbstaktivierend wirkte (Abb.30C, rechte Seite). Die Expression der jeweiligen Fusionsproteine wurde mit Western Blot-Analysen überprüft (Daten nicht gezeigt).

Eine direkte Interaktion der Proteine Ape1 und Eaf1 konnte im „Yeast two Hybrid“-System nicht gezeigt werden.

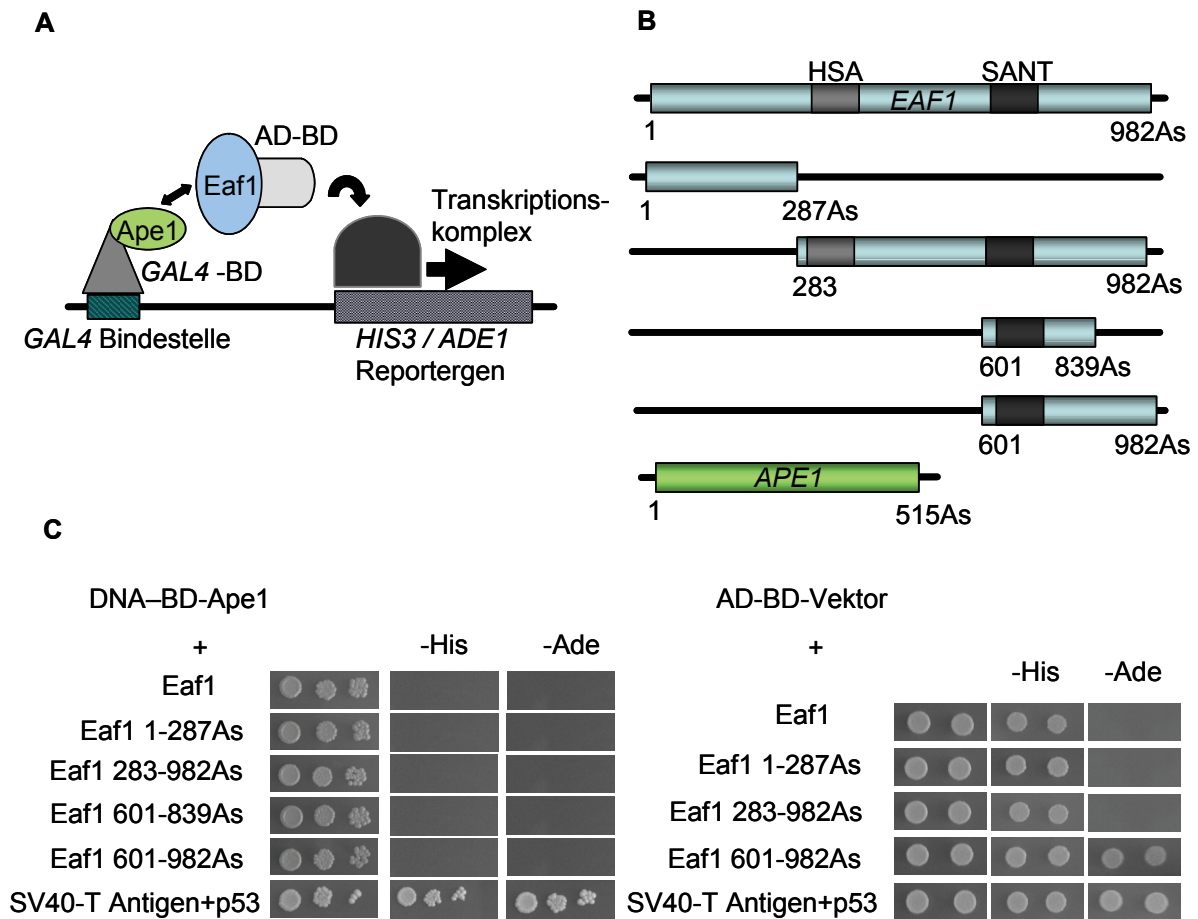


Abb.30: „Yeast two Hybrid“-Studien zur Überprüfung potentieller Interaktion der Proteine Ape1 und Eaf1.

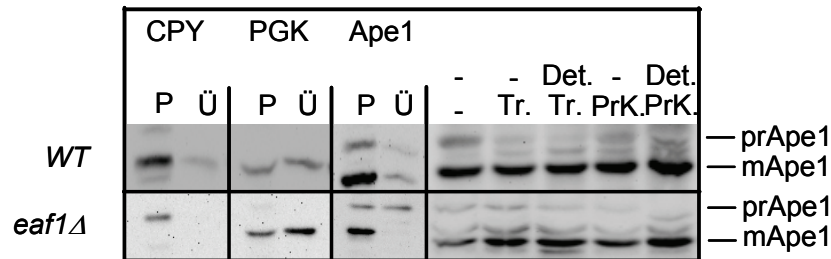
A Schematische Darstellung eines „Yeast two Hybrid“-Experiments. Das Reporter gen (hier *HIS3* oder *ADE1*) wird transkribiert nachdem ein funktioneller Transkriptionsfaktor an die *GAL4*-Bindestelle der DNA bindet. BD - Bindedomäne; AD - Aktivierungsdomäne. **B** N- und C-terminale Verkürzungen von EAF1 und APE1, die in die Vektoren *pGBKT7* und *pGBT9* (beide mit DNA-BD) oder *pGADT7* (AD-BD) kloniert wurden. **C** Wachstum der Hefestämme *AH109* transformiert mit *pGBKT7-APE1* und den jeweiligen *EAF1*-Konstrukten in *pGADT7* auf Tryptophan/Leucin-, Tryptophan/Leucin/Histidin-, bzw. Tryptophan/Leucin/Histidin/Adenin-Mangelmedium (linke Seite) und Wachstum der Hefestämme *AH109* transformiert mit *pGADT7*-Vektor und den jeweiligen *EAF1*-Konstrukten in *pGBT9* auf Tryptophan/Leucin-, Tryptophan/Leucin/Histidin-, bzw. Tryptophan/Leucin/Histidin/Adenin-Mangelmedium (rechte Seite).

4.12 Komplexassemblierung der Aminopeptidase 1 im *eaf1Δ*-Stamm

Die native Konformation der akkumulierten prApe1 ist in den *via* Mutanten beeinträchtigt, was das Protein sensitiver für Proteasen wie Trypsin oder Proteinase K macht. Während die prApe1 des *WT*-Stammes erst durch die unspezifischere Proteinase K in Gegenwart von Detergenz prozessiert wurde, war bei den Mutanten ein Abbau nach Zugabe von Trypsin und Detergenz zu beobachten (Andrei-Selmer *et al.*, 2001). Um zu überprüfen, ob der Ape1-Aktivitätsverlust in den *eaf1Δ* Stämmen auf eine Fehlfaltung, bzw. eine gestörte Komplexassemblierung zurückzuführen ist, wurde die Sensitivität des Proteins auf die Proteasen Trypsin und Proteinase K untersucht (3.22). Dazu wurden logarithmisch wachsende Hefekulturen des *WT*- und *eaf1Δ*-Stammes mit Zymolyase 20T sphäroblastiert und anschließend mit DEAE-Dextran lysiert. Um die Vollständigkeit des Lysevorgangs zu überprüfen, wurden die Zelllysate bei 5000 g zentrifugiert und somit die vakuoläre Fraktion von der zytosolischen getrennt. Bei einer kompletten Lyse der Zellen sollte die Carboxypeptidase Y (CPY) in der Pellet- und die 3-Phosphoglycerat Kinase (PGK) in der Überstand-Fraktion zu finden sein. Ebenso sollte sich die mApe1 im Pellet, also in der noch intakten Vakuole befinden. Wie in Abbildung 31A gezeigt, waren sowohl die CPY als auch die mApe1 in der vakuolären Fraktion enthalten, während PGK überwiegend im Überstand detektiert wurde. Eine wahrscheinliche Erklärung hierfür ist eine unvollständige Lyse der Zellen. Auf eine Verlängerung der Inkubation mit DEAE-Dextran wurde jedoch bewusst verzichtet, da dies zu einer verstärkten Vakuolendegradation führte (Daten nicht gezeigt). Die lysierten Zellen wurden in Abwesenheit von Proteaseinhibitoren mit den Proteasen Trypsin und Proteinase K mit und ohne Detergenz für 30 Minuten bei 4°C verdaut. Anschließend wurde mit Western Blot-Analysen die Sensitivität der Aminopeptidase 1 auf beide Proteasen überprüft. Dabei zeigten sowohl der *WT*- als auch der *eaf1Δ*-Stamm keine erhöhte Sensitivität auf die Behandlung mit Trypsin oder Proteinase K; nach Zugabe von Proteinase K und Triton X-100 war in beiden Stämmen eine geringe Prozessierung der prApe1 sichtbar. Die Aminopeptidase 1 reagierte nach Deletion von *EAF1* nicht sensitiver auf den Verdau mit Proteasen, wie es in den *via*-Mutanten beobachtet wurde, was daraus schließen lässt, dass das Protein korrekt gefaltet vorliegt. Dieses wurde mittels einer Auftrennung von Gesamtzelllysat über eine Gelfiltrationssäule (Superdex S200) verifiziert (3.23). In anschließenden Western Blot-Analysen mit anti-

Ape1 Serum konnte gezeigt werden, dass der homododecamere Komplex und dessen Zwischenstufen in *WT*- und *eaf1Δ*-Stämmen in denselben Fraktionen, d.h. zwischen ca. 600 und 300 kDa und als Monomer bei 50 kDa eluiert (Abb.31B). Auffällig war lediglich eine Reduktion der monomeren Isoform im *eaf1Δ*-Stamm. Auch in diesem Experiment ergab sich somit kein Hinweis auf eine fehlerhafte Komplexassemblierung der Ape1 in Abwesenheit von Eaf1.

A



B

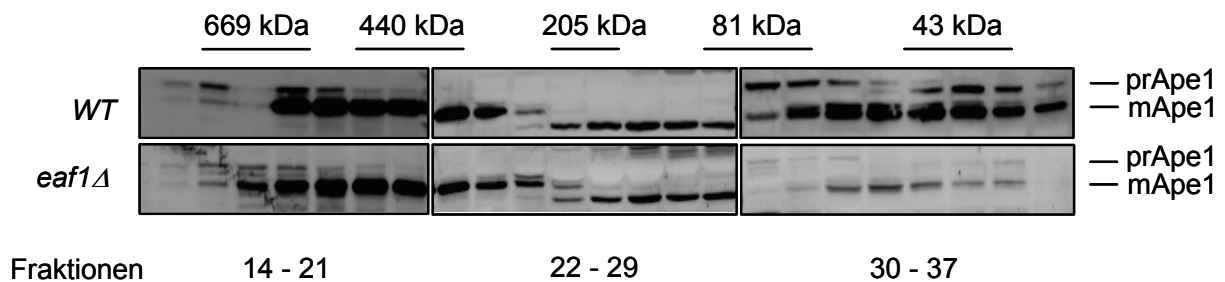


Abb.31: Die Komplexassemblierung der Aminopeptidase 1 in den Stämmen *WT* und *eaf1Δ*.

A Zellen einer logarithmisch wachsenden Hefekultur der Stämme *WT* (y96) und *eaf1Δ* (y126) wurden sphäroblastiert und mit DEAE-Dextran lysiert. Zur Subfraktionierung der zytosolischen (Ü) und vakuolären Fraktion (P) wurde das Lysat bei 5000 g zentrifugiert. Die lysierten Zellen wurden in Abwesenheit (-) und Anwesenheit von Triton X-100 (Det.) mit Trypsin (Tr.) oder Proteinase K (PrK.) inkubiert. Die Zellfraktionen und mit Proteasen behandelten Zellen wurden auf einem 10%-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit anti-CPY, anti-PGK und mit anti-Ape1 Serum inkubiert. **B** Logarithmisch wachsende Zellen der Stämme *WT* und *eaf1Δ* wurden mittels Glasperlensaufschluss lysiert. 200 µg Gesamtprotein wurde über eine Gelfiltrationssäule in 30 µl Fraktionen eluiert. Die Proben wurden mit TCA gefällt und per Western Blot mit anti-Ape1 Serum analysiert.

5 Diskussion

5.1 Suppression der Ape1-Aktivitätsdefizienz in den Mutanten *via10* und *via14*

Die Aminopeptidase 1 (Ape1) ist eine Leucin-Exopeptidase, welche die Spaltung aminoterminaler Leucine von Polypeptiden in der Vakuole von *Saccharomyces cerevisiae* katalysiert. Das Protein wird, wie viele andere Peptidasen, als Vorläuferform im Zytoplasma synthetisiert und oligomerisiert anschließend zu Homododecameren. Diese bilden zusammen mit dem Ape1-Rezeptor Atg19 und der α -Mannosidase (Ams1) den sog. Cvt (**C**ytoplasm to **V**acuole **T**argeting)-Komplex, der in Vesikeln verpackt über den Cvt-Transportweg in die Vakuole transportiert wird. Dort wird unter Abspaltung des Propeptids die prApe1 zur mApe1 („mature“ Ape1) prozessiert (Klionsky *et al.*, 1992). Experimentell kann die Aktivität der Ape1 durch Spaltung des Substrats H-Leucin- β -Naphthylamid verfolgt werden (3.18).

Um die Biogenese der Ape1-Aktivität besser zu verstehen wurde eine EMS-Mutagenese an Hefestämmen durchgeführt, die zur Isolierung zweier Mutanten, welche unter logarithmischen und hungerinduzierten Wachstumsbedingungen nur geringe, bzw. keine Ape1-Aktivität zeigten, führte (Andrei-Selmer *et al.*, 2001). Die mit *via10* und *via14* (**via** - **v**acuole **i**mport and **a**utophagocytosis) bezeichneten Mutanten zeigten eine verringerte Ape1-Expression und unter logarithmischen Wachstumsbedingungen eine erhöhte Akkumulation der prApe1 im Zytosol. Der Verlust der Ape1-Aktivität, eine fehlerhafte Komplexassemblierung der prApe1 und ihre erhöhte Sensitivität auf Proteasen, ließen auf eine nicht native Konformation des Proteins in den zwei Mutanten schließen (Andrei-Selmer *et al.*, 2001). Zur Identifikation der für diesen Phänotyp verantwortlichen Gene, wurden Komplementationsstudien durchgeführt und ein ca. 1.3 kb großer Genabschnitt auf Chromosom IV isoliert, der die Aktivität der Ape1 wiederherstellte. Der Genabschnitt beinhaltete den 435 bp großen ORF *YDR360W* und auf dem Gegenstrang den Aminoterminal (862 bp) des 2949 bp großen ORFs *YDR359C*, die sich um 286 bp überlappen (Abb.7). In der Dissertation von P.N. Rekha wurde der ORF *YDR360W* in Hinblick auf die Restauration der Ape1-Aktivität verifiziert. Sequenzvergleiche ergaben, dass dieser ORF in den *via*-Mutanten intakt war, und das bis *dato* zu keiner klassifizierten Proteinfamilie gehörende Protein wurde als *Suvia1* (**s**uppressor of **via**)

bezeichnet. Der N-Terminus des ORFs *YDR359C* ist Teil des Proteins Eaf1 (**Esa1-associated factor**). Dieses Protein bildet mit zwölf weiteren Untereinheiten den NuA4 (**nucleosome acetyltransferase of H4**)-Komplex. Seine katalytische Untereinheit Esa1 ist für die Acetylierung des Histons H4 und der Histon H2A-Variante Htz1 verantwortlich. Weiter reguliert der Komplex eine Vielzahl von zellulären Ereignissen, wie Transkription, DNA-Reparatur und Chromosomen-Segregation (Krogan *et al.*, 2004; Doyon und Côté, 2004; Squatrito *et al.*, 2006; Altaf *et al.*, 2007; Thomas und Voss, 2007).

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung der Proteine Suvia1 und Eaf1 für die Biogenese der Ape1 weiter charakterisiert werden.

Das bisher verwendete System zur Untersuchung der Ape1-Aktivität beruhte auf Hefestämmen mit episomalem *APE1*-Gen auf „single copy“-Plasmiden. Dies hatte vor allem bei der EMS-Mutagenese den großen Vorteil, dass durch sog. Plasmidverlustexperimente und anschließender Retransformation der *APE1* ausgeschlossen werden konnte, dass die beobachtete phänotypische Veränderung durch eine Mutation der Ape1 ausgelöst wurde (Andrei-Selmer *et al.*, 2001). Allerdings hatte dieses System den Nachteil, dass episodale Plasmide in unterschiedlichen Kopienzahlen in der Zelle vorlagen, was Aussagen über einen Zusammenhang von exprimierten Proteinmengen und Aktivität verhinderten. Ein weiterer Nachteil war, dass für die Charakterisierung weiterer Gene Doppeltransformationen, verbunden mit der Selektion der Hefestämme auf zwei Auxotrophie markern, nötig waren. Vor allem in Ape1-Overlay-Assays (3.18) zur Bestimmung der Ape1-Aktivität wurden große Schwankungen beobachtet, so dass das *APE1*-Gen jeweils in den *URA3*-Locus des Ausgangstammes y25 und den beiden Mutantenstämmen integriert wurde. Die Expression der integrierten *APE1* wurde in Western Blot-Analysen (Abb.12) untersucht. Der neu generierte *WT*-Stamm zeigte gegenüber dem Ursprungsstamm C6C eine um ca. 50% verringerte Ape1-Expression. Dies ließ sich mit der zwei- bis fünffach höheren Kopienzahl des episomalen Plasmids im Stamm C6C erklären. Auch der neu generierte Stamm *via10-2* exprimierte geringfügig weniger Ape1 als die Ursprungsmutante *via10*, was ebenfalls auf die höhere Kopienzahlen des Plasmids zurückzuführen war. *Via14-2* dagegen zeigte eine erhöhte Ape1-Expression im Vergleich zu Stamm *via14*, in welchem die Ape1-Expression nur schwer in Western Blot-Analysen nachzuweisen war (Andrei-Selmer *et al.*, 2001). Es wurde beobachtet, dass die Mutanten *via14* und

via14-2 eine zehnmal geringere Transformationsrate als die *WT*-Stämme C6C und y96 besaßen, und Versuche Plasmide aus diesen Stämmen zu isolieren, erwiesen sich als sehr schwierig (Daten nicht gezeigt). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in *via14* transformierte episomale Plasmide nicht stabil vererbt werden, während ein Verlust des *APE1*-Gens nach Integration auszuschließen ist. Dies könnte die beobachteten Schwankungen der Ape1-Expression erklären. Die Ape1-Aktivität der beiden *WT*-Stämme unterschied sich entsprechend ihrer Expressionshöhen und der Kopienzahl des *APE1*-Gens, d.h. der Stamm C6C war um ca. 50% aktiver als der neu generierte *WT*-Stamm (y96). Die Mutante *via10-2* zeigte mit integriertem *APE1*-Gen keine Aktivität mehr, während in *via10* noch 20% der *WT*-Aktivität zu detektieren war (Andrei-Selmer *et al.*, 2001). Dieser Unterschied ist auch auf die erhöhte Kopienzahl des episomalen *APE1*-Gens in *via10* zurückzuführen. Die Mutanten *via14* und *via14-2* hatten beide keine messbare Ape1-Aktivität. Die hergestellten Hefestämme mit integrierter *APE1* erwiesen sich als stabil und lieferten reproduzierbare Ergebnisse, weshalb in dieser Arbeit ausschließlich mit diesen Stämmen gearbeitet wurde.

5.2 ORF *YDR360W* hat keinen Einfluss auf die Aminopeptidase 1-Aktivität

In der Dissertation von P.N. Rekha wurde gezeigt, dass die Expression des ORFs *YDR360W* zur Wiederherstellung der Ape1-Aktivität führte. Diese Daten sollten nun verifiziert und ORF *YDR360W* näher charakterisiert werden. Nach Transformation von *YDR360W-HA* in die Mutantenstämme *via10-2* und *via14-2* und den Deletionsstamm *ydr360w Δ* konnte jedoch keine Ape1-Aktivität im Overlay-Assay detektiert werden (Abb.13). Auch die Transformation in die Ursprungsstämme *via10* und *via14* konnten den Einfluss des Proteins Ydr360w nicht bestätigen. Es wurde stattdessen beobachtet, dass die Vektoren *pYX141* oder *pYX242*, die zur Expression von C-terminal HA-markierten Proteinen verwendet wurden in den Mutantenstämmen *via10* und *via10-2* einen hohen, in seiner Intensität mit dem *WT*-Stamm vergleichbaren Hintergrund zeigten. Die verwendeten Vektoren trugen das *LEU2*-Gen als Selektionsmarker. Bei Verwendung des Vektors *pYX132*, welcher an dessen Stelle das *TRP1*-Gen enthält, war die Hintergrundaktivität gering (Daten nicht

gezeigt). Somit interferierte höchstwahrscheinlich die Expression des *LEU2*-Auxotrophiemarkers mit dem Substrat H-Leucin- β -Naphthylamid und verhinderte eine korrekte Bestimmung der Ape1-Aktivität in den Stämmen *via10* und *via10-2*. Dies erklärt zudem, warum die Expression von *YDR360W* in *pYX141* oder *-242* ursprünglich zur Identifikation von Suvia1 als verantwortliches Protein für die Wiederherstellung der Ape1-Aktivität im Mutantenstamm *via10* führte (Dissertation P.N. Rekha).

In *S. cerevisiae* gibt es 2997 überlappende ORFs (>100 Codons). Bei ca. 90% dieser ORFs ist lediglich einer davon proteinkodierend (Cebrat *et al.*, 1998). Wie bereits erwähnt und in Abbildung 7 illustriert, überlappen *YDR359C* und *YDR360W* um 286 bp, dies entspricht 66% des ORFs *YDR360W*. Da der größere der beiden ORFs eindeutig verifiziert war, sollte nun geklärt werden, ob und wenn ja, zu welchem Zeitpunkt ORF *YDR360W* in der Zelle transkribiert wird. Es wurden Northern Blot-Analysen mit logarithmisch wachsenden und gehungerten Zellen durchgeführt, die zwar die Transkription des ORFs *YDR359C*, allerdings nicht die von *YDR360W* zeigen konnten (Abb.14). 2006 wurde eine Transkriptomanalyse des Genoms von *Saccharomyces cerevisiae* unter Anwendung eines „tiling arrays“ veröffentlicht (Huber *et al.*, 2006). Auch hier konnte die Transkription des ORFs *YDR360W* nicht bestätigt werden (Abb.15). Zusammenfassend ist deshalb zu schließen, dass es sich bei *YDR360W* mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um einen nicht-proteinkodierenden ORF handelt.

5.3 ORF *YDR359C* beeinflusst die Aminopeptidase 1-Aktivität

Um zu überprüfen, ob der zweite, nur partiell vorgefundene ORF *YDR359C* die Aktivität der Ape1 beeinflusst, wurde das Gen zur Expression mit C-terminalen HA-„tag“ in die Vektoren *pYX141*, *-132*, und *-242* kloniert und anschließend in die Stämme *via10-2* (nur *pYX132*-Konstrukte) und *via14-2* transformiert. In Ape1-Overlay-Assays konnte gezeigt werden, dass *YDR359C* die Aktivität der Ape1 im Stamm *via14-2* wiederherstellte, wobei die Expression des „single copy“-Plasmids ca. 80% der Aktivität des „high copy“-Plasmids, welches mit der *WT*-Aktivität von 100% vergleichbar war, erreichte. Hingegen führte die Expression des Proteins im Stamm *via10-2* zu keiner Wiederherstellung der Ape1-Aktivität (Abb.16). *YDR359C* kann Ape1-Aktivität demnach nur in der Mutante *via14-2*, nicht aber in *via10-2* induzieren.

Um nun den Verlust des ORFs *YDR359C* in Hinblick auf die Ape1-Aktivität näher zu untersuchen, wurden Deletionsstämme hergestellt, wobei entweder der ORF *YDR359C* alleine oder zusammen mit *YDR360W* durch das Homolog des *HIS3*-Gens aus *Schizosaccharomyces pombe* ersetzt wurden (Abb.17). Beide Stämme zeigten im Ape1-Overlay-Assay keine Aktivität der Ape1. *YDR359C* hat folglich direkten Einfluss auf die Funktionalität der Ape1. Dies wurde durch Transformation des *YDR359C*-HA-Konstrukts bestätigt, welches die Aktivität abhängig von der jeweiligen Expressionsstärke komplementieren konnte (Abb.16).

5.3.1 Eaf1 supplemiert den Aktivitätsverlust im Mutantenstamm *via14-2*

Als nächstes sollte geklärt werden, wie dieser ORF den Aktivitätsverlust der beiden Mutantenstämmen *via10-2* und vor allem *via14-2* beeinflusste. Sequenzvergleiche von Mutantenstämmen und *WT*-Stamm zeigten keine Unterschiede, weshalb davon auszugehen ist, dass der ORF *YDR359C* in den Mutantenstämmen intakt ist und deshalb transkribiert werden sollte. Eine definitive Aussage über die Proteinexpression ließ sich aber mangels eines Eaf1-Antikörpers nicht machen.

Krogan *et al.* (2004) beschreiben einen direkten Einfluss von Eaf1 auf die Hyperacetylierung des Histons H4. In Abb.19 gezeigten Versuchen wurde die Funktionalität des Proteins in den Mutantenstämmen daraufhin untersucht. Es konnte

kein Rückgang der H4 Hyperacetylierung festgestellt werden, es war im Gegenteil sogar ein Anstieg im Vergleich zum *WT*-Stamm zu beobachten (Abb.19). Die Acetylierung von Histonen wird mit transkriptioneller Aktivierung in direkten Zusammenhang gebracht. Dabei führt die Acetylierung der Lysin-Reste am Aminoterminus der Histone H3 und H4 zu der Neutralisation ihrer positiven Ladung, was mit einer Verringerung der DNA-Affinität einhergeht und somit zur Dekompaktierung des Chromatins beiträgt (Vettese-Dadey *et al.*, 1996; Grunstein, 1997). Die gesteigerte H4 Hyperacetylierung in den Mutantenstämmen lässt sich, mit den durch ungerichtete EMS-Mutagenese entstandenen multiplen Mutationen und der damit erhöhten Transkriptionsaktivität in diesen Hefen erklären. Sowohl eine Vielzahl von Kinetochore- und Spindelkontrollpunkt-Mutanten, als auch der *eaf1Δ*-Stamm reagieren hypersensitiv auf die Mikrotubuli destabilisierende Chemikalie Benomyl (Kobor *et al.*, 2004; Krogan *et al.*, 2004). Die Mutante *via14-2* zeigte in Anwesenheit von Benomyl keinerlei Wachstumsveränderungen, wohingegen in *via10-2* zwar ein Defekt der Mikrotubulistabilität beobachtet wurde, dieser jedoch Eaf1-unabhängig war. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Eaf1 zwar die Ape1-Aktivität des Mutantenstammes *via14-2* wiederherstellen kann, dieser Effekt allerdings nicht auf die Komplementation eines mutierten *EAF1*-Gens zurückzuführen ist, sondern es sich hierbei um einen Suppressor-Phänotyp handelt.

5.3.2 Analyse von Eaf1-Domänen für die Induktion der Ape1-Aktivität

Eaf1 ist ein 112 kDa großes Protein mit zwei beschriebenen Domänen und einem Motiv: einer HSA- (Helicase/**S**ANT-**A**ssociated), einer SANT- (**S**wi3-**A**da2-**N**CoR-**T**FIIIB)-Domäne und einer Glutamin-reichen Region. Um den Einfluss verschiedener Abschnitte des Eaf1-Proteins auf die Ape1-Aktivität zu untersuchen, wurden amino- und carboxyterminale Verkürzungen hergestellt (Abb.21) und in Overlay-Assays getestet (Abb.22).

Es konnte gezeigt werden, dass der Hauptanteil des Ape1-Aktivitätsgewinns durch den C-Terminus des Proteins induziert wurde. Dieser Teil des Proteins beinhaltet alle Domänen und sollte demnach funktionell dem Gesamtprotein weitestgehend entsprechen. Allerdings konnte auch der wesentlich kleinere N-Terminus (Aminosäuren 1 bis 287) Ape1-Aktivität wiederherstellen (Abb.22). Zum einen erklärt dieser Befund weshalb das Gen im Komplementationsscreen gefunden wurde, da

der identifizierte Genabschnitt nur diesen Teil des Proteins beinhaltet (Abb.7). Zum anderen wiederum ist es erstaunlich, dass beide, N- und C-terminale Verkürzungen Ape1-Aktivität induzieren. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Aminopeptidase 1 und Eaf1 nicht direkt interagieren, sondern Eaf1 als Teil eines Komplexes wirkt und Proteinfragmente Komplexpartner binden oder blockieren.

5.3.3 Der Einfluss von Eaf1 innerhalb des NuA4-Komplexes

Eine beschriebene Funktion des Proteins Eaf1 innerhalb des NuA4-Komplexes ist die Hyperacetylierung von Histon H4. Außerdem führt die Deletion des Genlocus *YDR359C* zu einer Hypersensitivität auf die mikrotubulidestabilisierende Chemikalie Benomyl (Krogan *et al.*, 2004 und Kapitel 4.4). Nachdem gezeigt wurde, dass die Eaf1 N- und C-terminalen Verkürzungen die Ape1-Aktivität wiederherstellen, sollte überprüft werden, ob der Rückgewinn der Aktivität in Zusammenhang mit den Funktionen des Proteins als Teil des Kernkomplexes stehen (4.8). Es wurde beobachtet, dass der Aminoterminus mit den Aminosäuren 1 bis 287 im Vergleich zum Deletionsstamm die Hyperacetylierung von H4 kaum steigern konnte. Zusätzlich hatte die Expression dieses Fragmentes keinen Einfluss auf die Ape1-Expression und das Wachstum der Hefen auf 15 µg/ml Benomyl-haltigen Vollmediumplatten war vor allem unter „single copy“-Expressionsbedingungen mit dem des *eaf1Δ*-Stammes vergleichbar. Dieses C-terminal verkürzte, niedrigexprimierte Konstrukt war allerdings, wenn auch nicht in vollem Maße in der Lage Ape1-Aktivität zu komplementieren. Die N-terminale Verkürzung (Aminosäuren 283 bis 981), welches einen wesentlich stärkeren Einfluss auf die Ape1-Aktivität hatte, zeigte auch eine gesteigerte H4 Hyperacetylierung, verbunden mit einem Anstieg der Ape1-Expression und unter starken Expressionsbedingungen (2µ) normales Wachstum unter Einfluss von Benomyl oder erhöhter Temperatur (Abb.25). Dies deutete darauf hin, dass der durch die Eaf1-Verkürzungen induzierte Rückgewinn der Ape1-Aktivität möglicherweise in direktem Zusammenhang mit der beschriebenen Funktion des Proteins innerhalb des NuA4-Komplexes steht. Die Mutation des potentiellen Kernlokalisationssignals scheint keinen Einfluss, weder auf das Wachstumsverhalten, auf die Expression der Ape1 oder die Hyperacetylierung von H4, noch auf die Wiederherstellung der Ape1-Aktivität zu nehmen. Jedoch könnte das Protein ein zweites Signal am C-terminus besitzen und somit auch nach

Mutation des N-terminus nicht beeinträchtigt sein oder Eaf1 gelangt mittels eines anderen Proteins in den Kern und benötigt somit das eigene Kernlokalisierungssignal nicht. *In situ* Immunfluoreszenzen und Zellfraktionierungen könnten zur Klärung der Lokalisation des Proteins und seiner Verkürzungen abschließend beitragen.

5.3.4 Eaf1 induziert die Aminopeptidase 1-Transkription und –Expression

Bis jetzt konnten wir unsere Beobachtung, dass zum einen die Deletion des Genlocus' *YDR359C* zu einem Verlust der Ape1-Aktivität führte, und dass zum anderen nach Transformation von *YDR359C/EAF1* Ape1-Aktivität in dem Mutantenstamm *via14-2* und in der Deletionsmutante wiederhergestellt, bzw. komplementiert wurde, nicht auf eine konkrete Funktion des Proteins Eaf1 zurückführen. Western und Northern Blot-Analysen zeigten, dass die Stämme *via10-2* und *eaf1Δ* eine um 40 bis 60% geringere *APE1*-Transkription und Ape1-Expression im Vergleich zum *WT*- oder *via14-2*-Stamm aufwiesen (4.6). Nach Transformation von *EAF1* wurde schon unter niedrigen Expressionsbedingungen (*cen*) ein Anstieg der Ape1-Expression bis zu 40% im Vergleich zum *WT* beobachtet, welcher in direktem Zusammenhang mit der Transkription des *APE1*-Gens stand (Abb.23C). Die Transformation von *EAF1* in die beiden Mutantenstämme *via10-2* und *via14-2* führten allerdings nur zu einer geringen Steigerung der Ape1-Expression (Abb.23A), was auf RNA-Ebene verifiziert wurde. Da in diesen Zellen das endogene Eaf1-Protein nicht mutiert und somit funktionell ist, resultierte eine Überexpression des Proteins in einen milderen Phänotyp, im Vergleich mit dem Deletionstamm *eaf1Δ*. Der NuA4-Komplex ist an der Genregulation beteiligt und wird an Promotorregionen verschiedener, stark transkribierter Gene rekrutiert (Robert *et al.*, 2004). Sollte der Einfluss des Proteins Eaf1 auf die Ape1-Aktivität ausschließlich in Zusammenhang mit dem NuA4-Komplex stehen, könnten Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) - Assays Aufschluss geben, ob sich der Komplex in der Promotorregion des *APE1*-Gens befindet und dessen Transkription reguliert. Zur Durchführung dieses Versuches, bei dem die Protein-DNA-Interaktion über Co-Immunopräzipitation nachgewiesen wird, wurde das Protein mit N-terminalem HA-„tag“ kloniert und die Expression mit anti-HA Antikörpern in Western Blot-Analysen überprüft (Abb.29A), zusätzlich wurden Eaf1-spezifische Peptidantikörper hergestellt, die zur Zeit getestet werden.

Wie einleitend beschrieben, wird neben der Ape1 auch die α -Mannosidase (Ams1) über den Cvt-Transportweg in die Vakuole transportiert. Dabei benötigt die Ams1 die Interaktion mit seinem Cargo-Protein Ape1 und deren Rezeptor Atg19 (Thumm, 2002; Abb.3). In dieser Arbeit sollte nach beobachtetem Rückgang der Ape1-Aktivität und -Expression, der Einfluss der Ape1 auf die Aktivität der vakuolären α -Mannosidase untersucht werden (4.7). Sowohl in den beiden Mutantenstämmen *via10* und *via14* als auch in dem Deletionsstamm *eaf1 Δ* wurde ein Rückgang der Ams1-Aktivität um mindestens 50% im Vergleich zu den *WT*-Stämmen *C6C* und *y96* beobachtet. In den Mutantenstämmen und dem Deletionsstamm ist die Ape1-Expression reduziert. Wirkt sich dieser Rückgang an Ape1 auf den Transport von Ams1 aus, würde dieses Ergebnis in Einklang mit dem beschriebenen Modell, nämlich dass das Protein Ape1 für den Transport der Ams1 essentiell ist, stehen. Der Verlust der Ape1-Aktivität könnte auch einen negativen Einfluss auf die Ams1-Aktivität haben, dies konnte allerdings nicht abschließend geklärt werden. Stattdessen stellt sich die Frage, ob die beobachtete Reduktion der Ams1-Aktivität auf die reduzierte Ape1-Expression und somit auf einen eingeschränkten Transport zurückzuführen ist, oder ob die Expression der Ams1 selbst reduziert war. Dies konnte abschließend nicht geklärt werden, da für Expressionsstudien an Ams1 kein endogener Antikörper zur Verfügung stand und eine Quantifizierung der Proteinexpression aufgrund von drei Ams1-Isoformen erschwert ist (Yoshihisa und Anraku, 1989). In diesem Fall würden eventuell Northern Blot-Analysen klären, ob der beobachtete Rückgang der Ams1-Aktivität in direktem Zusammenhang mit der Ape1-Expression steht.

5.3.5 Auswirkung einer Ape1-Überexpression auf die Ape1-Aktivität

Sollte der Einfluss des Proteins Eaf1 auf eine reduzierte *APE1*-Transkription und somit -Expression, also auf den Einfluss des NuA4-Komplex zurückzuführen sein, müsste die Expression der Ape1 alleine schon in der Lage sein, Ape1-Aktivität in den Stämmen *via14-2* und *eaf1 Δ* zu induzieren. In Ape1-Overlay-Assays ließ sich allerdings beobachten, dass erst eine um 400%, bzw. 500% (2μ) gesteigerte Ape1-Expression die Ape1-Aktivität wiederherstellen konnte, während nach Transformation des *EAF1*-Gens im Deletionsstamm *eaf1 Δ* , bzw. im Stamm *via14-2* ein Anstieg der

Ape1-Expression um maximal 20% im Vergleich zum *WT* zu beobachten war, die ebenfalls Ape1-Aktivität induzierte (Abb.28). Dies führte zu dem Schluss, dass zum einen die Ape1-Expressionshöhe die Aktivität der Ape1 beeinflusst und dass zum anderen das Protein Eaf1 nicht nur die Expression reguliert, sondern darüber hinaus eventuell an der Stabilität oder der Faltung der Ape1, die sich dann positiv auf die Aktivität des Proteins auswirkt, beteiligt ist.

5.4 Weitere NuA4-Deletionsmutanten haben keinen Einfluss auf die Aktivität der Ape1

Der NuA4-Komplex besteht aus dreizehn Untereinheiten, sechs davon sind essentiell, inklusive der Acetyltransferase Esa1, und sieben werden für das Überleben der Zelle nicht benötigt (Doyon und Côté, 2004; Abb.26A). Zur Verifizierung unserer Hypothese, dass zwar Eaf1 die Aktivität der Ape1 beeinflusst, dies aber nicht nur auf einen transkriptionellen Effekt zurückzuführen ist, wurden die sechs verbleibenden nicht-essentiellen Untereinheiten Yng2, Eaf3, Eaf5, Eaf6, Eaf7 und Yaf9 jeweils im *WT*-Stamm deletiert und die Ape1-Aktivität bestimmt. Durch Deletion der Proteine Yng2, Eaf5, Eaf6 und Eaf7 war die Ape1-Aktivität nicht beeinflusst. Die Deletion der Gene *EAF3* und *YAF9* führten jeweils zu einem geringen Rückgang (20, bzw. 30%) der Ape1-Aktivität im Vergleich zum *WT*-Stamm (Abb.27), ein kompletter Verlust wurde bei keinem der getesteten Stämme beobachtet. Auch die Transformation des *YNG2*-Gens in den *eaf1Δ*-Stamm hatte keinen Einfluss auf die Aminopeptidase 1. Yng2 interagiert direkt mit Eaf1 und ist ebenfalls an der Hyperacetylierung der Histone H4 und H2A beteiligt (Krogan *et al.*, 2004). Diese Daten unterstreichen erneut, dass der beobachtete Effekt, der totale Rückgang der Ape1-Aktivität, zwar in direktem Zusammenhang mit Eaf1, möglicherweise aber nicht zwangsläufig mit Eaf1 als Bestandteil des NuA4-Komplexes steht. Die Reduktion der Aktivität nach Deletion der Gene *EAF3* und *YAF9* könnte eher darauf hindeuten, dass diese Proteine mit Eaf1 interagieren und unabhängig von NuA4 die Ape1-Aktivität regulieren. Eine Interaktion dieser drei Proteine konnte mit TAP-„tag“ markiertem Esa1 jedenfalls nicht ausgeschlossen werden (Mitchell *et al.*, 2008).

5.5 HA-Eaf1 co-lokalisiert mit der Ape1 im Zytoplasma

Der Nachweis der Eaf1-Expression in Western Blot-Analysen gestaltete sich schwierig. Das Protein wurde bis *dato* in *pYX*-Hefevektoren exprimiert (3.5), die das Protein C-terminal mit einem HA-„tag“ fusionierten, deren Expression aber nur phänotypisch oder auf transkriptioneller Ebene nachweisbar waren. Auch der Austausch des einfachen HA-„tags“ mit einem dreifachen führte zu keinem positiven Ergebnis, so dass die Vermutung nahe liegt, dass der exprimierte HA-„tag“ unter Umständen maskiert und deshalb in Western Blot-Analysen nicht nachweisbar ist. Dies ist allerdings eher unwahrscheinlich, da die Proteinproben denaturiert waren und somit alle Peptide frei zugänglich sein sollten. Auch könnte der C-Terminus aus noch unbekanntem Gründen nach Expression des Proteins abgespalten werden und deshalb von Antikörpern nicht mehr detektiert werden. Da die carboxyterminale Fusion eines „tags“ nicht den gewünschten Erfolg brachte, wurden die Vektoren mit aminoterminalen HA-„tags“ versehen. Die Expression von HA-Eaf1 konnte dann sowohl in Western Blot-Analysen, als auch in *in situ* Immunfluoreszenz-Experimenten nachgewiesen werden (Abb.29). Dabei konnte gezeigt werden, dass HA-Eaf1 nicht nur im Kern, sondern auch als punktuelle Struktur im Zytoplasma zusammen mit RFP-Ape1 co-lokalisiert. RFP-Ape1 befindet sich in logarithmisch wachsenden Zellen am PAS und kann erst in der stationären Phase in der Vakuole nachgewiesen werden (Klionsky *et al.*, 1992). Diese Beobachtungen müssen nun weiter verifiziert werden, indem zum einen HA-Eaf1-Verkürzungen auch auf ihre zelluläre Verteilung hin untersucht werden, sowohl in *in situ* Immunfluoreszenzen, als auch in Zellfraktionierungsexperimenten. Die Detektion von HA-Eaf1 im Zytoplasma, genauer am PAS könnte auch auf eine Akkumulation des Proteins durch dessen Überexpression in der Hefezelle zurückzuführen sein. Western Blot-Analysen zeigten allerdings keine starke Expression des Proteins. Ein Vergleich mit endogenen Proteinmengen war bisher mangels Antikörper jedoch nicht möglich. Aus diesem Grund wurden Peptid-Antikörper generiert, die momentan getestet werden. Eine Überexpression von Eaf1 und somit die Gefahr Artefakte in Hinblick der zellulären Verteilung des Proteins zu riskieren, würde sich auch durch Integration eines „tags“ vor das Startcodon des Genlocus *YDR359C* reduzieren.

Die Co-Lokalisation von RFP-Ape1 und HA-Eaf1 müsste zum einen in *eaf1Δ*- und *ape1Δ*-Stämmen untersucht werden, um den Einfluss der jeweiligen endogenen Proteine zu minimieren, und zum anderen in einem *atg19Δ*-Stamm. Atg19 ist der Ape1-Rezeptor, der nach Synthese und Oligomerisierung der Ape1 bindet und somit die Rekrutierung der Cvt-Vesikel in die Vakuole reguliert (Thumm, 2002). Bei Verlust von Atg19 akkumuliert die Ape1 am PAS und wird unter logarithmischen Wachstumsbedingungen nicht mehr in die Vakuole transportiert. Deshalb eignet sich dieses System um eine Abhängigkeit von HA-Eaf1-Lokalisation und -Prozessierung vom Cvt-Transportweg zu testen. Eine direkte Interaktion von Eaf1 und Ape1 konnte bis jetzt in „Yeast two Hybrid“-Studien nicht nachgewiesen werden (Abb.30). Das Expressieren beider Gene als HA- oder Myc-„tag“-Fusionsproteine, könnte deren Faltung negativ beeinflusst haben (4.10), so dass eine mögliche Interaktion mit diesem System nicht nachgewiesen werden kann. Außerdem könnten auch die in der Hefe endogen exprimierten Proteine Ape1 und Eaf1 den Nachweis stören. Nachdem jetzt ein funktioneller „tag“ zur Verfügung steht, sollten Co-Immunopräzipitationen weitere Hinweise auf eine mögliche direkte Interaktion der Proteine Eaf1 und Ape1 geben, bzw. zur Identifikation noch unbekannter Interaktionspartner führen.

5.6 Die Komplexassemblierung der Ape1 wird durch Deletion von EAF1 nicht beeinträchtigt

Da in den *via*-Mutanten die Komplexassemblierung der prApe1 beeinträchtigt war, was die Mutantenstämme sensitiver auf die Behandlung mit Proteasen reagieren ließ (Andrei-Selmer *et al.*, 2001), sollte nun untersucht werden, ob die Deletion des Proteins Eaf1 und der damit verbundene Verlust der Ape1-Aktivität auf einen Defekt der Ape1-Komplexassemblierung, d.h. einer nicht nativen Konformation des Proteins zurückzuführen war. Die Sensitivität der Stämme *WT* und *eaf1Δ* wurde jeweils mit den Proteasen Trypsin und Proteinase K in An- und Abwesenheit des Detergenz Triton X-100 in sog. Protease Sensitivitäts-Assays getestet (Abb.31A). Die Aminopeptidase 1 beider Stämme wurde erst nach Zugabe der unspezifischen Proteinase K und Triton X-100 geringfügig prozessiert, was auf korrekt gefaltetes Protein in *WT*- und *eaf1Δ*-Stämmen zurückzuführen ist. Zusätzlich wurde die intakte

Komplexassemblierung der Ape1 in Gelfiltrationsexperimenten verifiziert, in denen zu beobachten war, dass das Protein in *WT*- und *eaf1Δ*-Stämmen in den gleichen Fraktionen eluierte (Abb.31B). Der beobachtete Rückgang der monomeren Isoform der Ape1 im *eaf1Δ*-Stamm lässt sich mit der bereits beschriebenen reduzierten Expressionshöhe des Proteins im Vergleich zum *WT* erklären. Schlussfolgernd ist zu sagen, dass nach Deletion des *EAF1*-Gens die Ape1-Expression zwar reduziert ist, die Deletion aber nicht deren Synthese und die anschließende Oligomerisierung und Prozessierung beeinflusst. Dennoch besitzt der unter diesen Bedingungen gebildete Ape1-Komplex keine enzymatische Aktivität.

5.7 Ausblick

Mit Eaf1 wurde hier ein Protein isoliert, das maßgeblich an der Aktivierung der vakuoläre Aminopeptidase 1 beteiligt ist. Zum einen führte die Expression des Eaf1-HA Konstrukts zur Wiederherstellung der Ape1-Aktivität in der Mutante *via14-2*, zum anderen resultiert die Deletion des *EAF1*-Gens in einem kompletten Verlust der Ape1-Aktivität und einer Reduktion der Ape1-Expression. In der Literatur wird die Funktion von Eaf1 vor allem als Teil des Acetyltransferase-Komplexes NuA4 beschrieben, wo es zusammen mit dem Protein Yng2 an der Hyperacetylierung des Histons H4 beteiligt ist (Krogan *et al.*, 2004). Außerdem wird dem Protein eine exklusive Rolle im Zusammenhalt und der Assemblierung durch unabhängige Interaktionen mit funktionellen Teilkomplexen von NuA4 zugeschrieben (Auger *et al.*, 2008; Mitchell *et al.*, 2008). Ob der beobachtete Effekt, also der Einfluss von Eaf1 auf die Aktivität der Aminopeptidase 1 auf eine dem NuA4-Komplex unabhängige Funktion zurückzuführen ist, konnte hier nicht abschließend geklärt werden.

Die Tatsache, dass sowohl die N- als auch die C-terminalen Verkürzungen von Eaf1 Ape1-Aktivität induzieren konnten, spricht für eine komplexgebundene Funktion des Proteins. Da diese Verkürzungen funktionell in Hinblick auf die Hyperacetylierung von H4, der Expression des *APE1*-Gens und dem Wachstum der Hefen auf Benomyl-haltigem Medium und der erhöhten Temperatur von 37°C in direktem Zusammenhang mit beschriebenen Aufgaben des NuA4 korrelierten, deutet auf eine Beteiligung dieses Komplexes hin. Andererseits zeigte sich, dass erst eine massive Überexpression der Ape1 ihren Aktivitätsverlust ausgleicht, während eine unter

Beteiligung von Eaf1 induzierte viel geringere Ape1-Expression schon ausreichte, denselben Effekt zu erzielen. Zudem führten die Deletionen der verbleibenden nicht-essentiellen Proteine des NuA4 zu keinem, bzw. nur sehr mildem Phänotyp. Dies spricht zum einen wieder für eine Funktion des Eaf1 unabhängig des NuA4-Komplexes, könnte allerdings zum anderen auch das oben genannte Model unterstützen, dass Eaf1 das zentrale Element für den Zusammenhalt und die Assemblierung des Komplexes darstellt. So wurde anhand von TAP-markiertem Esa1-Protein gezeigt, dass die jeweilige Eliminierung der Proteine Eaf3, Eaf5, Eaf6, Eaf7 und Yaf9 keinen Einfluss auf die Assoziation der verbleibenden Untereinheiten hatte, während die Deletion von Eaf1 zu einem dramatischen Rückgang der Komplex-Integrität führte und nur die Bindung der Proteine Epl1 und Yng2 an Esa1-TAP nachweisbar war (Mitchell *et al.*, 2008).

Die Lokalisation des Proteins außerhalb des Nukleus' und dessen eventuelle Co-Lokalisation mit RFP-Ape1 sprechen ebenfalls für eine Kern-unabhängige Funktion des Proteins, allerdings nicht zwangsläufig unabhängig vom NuA4-Komplex. Neuesten Studien einer genomweiten „synthetically lethal“ (SL) „synthetic genetic array“ (SGA)-Analyse belegen, dass der NuA4-Komplex unter Umständen nicht nur, wie bisher angenommen, an nukleären Vorgängen beteiligt ist, sondern beispielsweise auch beim Proteintransport, genauer dem vesikulären Transport, bei der Stress-Antwort, der Arginin-Biosynthese und der Ubiquitinierung eine Rolle spielt (Mitchell *et al.*, 2008). Es bleibt allerdings zu klären, ob diese Beobachtungen auf transkriptionelle Effekte oder - eher unwahrscheinlich - auf direkte Interaktionen des NuA4-Komplexes zurückzuführen sind. Aufgrund der großen Vielfalt der gefundenen zellbiologischen Prozesse, könnte der hier beobachtete Effekt, die Wiederherstellung der Ape1-Aktivität in Abhängigkeit des Proteins Eaf1, sowohl auf Eaf1 alleine, als auch auf eine noch nicht bekannte Funktion des NuA4-Komplexes zurückzuführen sein.

Zukünftige Experimente, wie z. B. ChIP-Assays könnten einen potentiellen Einfluss des Proteins auf die Transkription des *APE1*-Gens klären. Zudem würden Zellfraktionierungsexperimente und *in situ* Immunfluoreszenzen mit verschiedenen Deletionsmutanten Aufschluss über die Lokalisation und Prozessierung des HA-Eaf1-Proteins geben. Mit Co-Immunopräzipitationen könnte eine mögliche Interaktion mit der Ape1 untersucht werden und eventuell neue Interaktionspartner identifiziert werden. Außerdem würde ein Komplementationsscreen mit den Stämmen *eaf1*Δ und

via10-2, zum einen zur Klärung der Funktion von Eaf1 beitragen und zum anderen zur Identifikation der „VIA“-Gene führen, die für den Mutantenphänotyp direkt verantwortlich sind.

6 Literaturverzeichnis

Aasland R, Stewart AF, Gibson T (1996) The SANT domain: a putative DNA-binding domain in the SWI-SNF and ADA complexes, the transcriptional co-repressor N-CoR and TFIIIB. *Trends Biochem Sci.* **21**(3):87-8 Review

Abeliovich H, Dunn WA Jr, Kim J, Klionsky DJ (2000) Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps. *J Cell Biol.* **151**(5):1025-34

Abeliovich H, Zhang C, Dunn WA Jr, Shokat KM, Klionsky DJ (2003) Chemical genetic analysis of Apg1 reveals a non-kinase role in the induction of autophagy. *Mol Biol Cell.* **14**(2):477-90

Adachi W, Suzuki NN, Fujioka Y, Suzuki K, Ohsumi Y, Inagaki F (2007) Crystallization of *Saccharomyces cerevisiae* aminopeptidase 1, the major cargo protein of the Cvt pathway. **63**(3):200-3

Altaf M, Saksouk N, Côté J (2007) Histone modifications in response to DNA damage. *Mutat Res.* **618**(1-2):81-90 Review

Ammerer G, Hunter CP, Rothman JH, Saari GC, Valls LA, Stevens TH (1986) *PEP4* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. *Mol Cell Biol.* **6**(7):2490-9

Andrei-Selmer C, Knüppel A, Satyanarayana C, Heese C, Schu PV (2001) A new class of mutants deficient in dodecamerization of aminopeptidase 1 and vacuolar transport. *J Biol Chem.* **276**(15):11606-14

Auger A, Galarneau L, Altaf M, Nourani A, Doyon Y, Utlely RT, Cronier D, Allard S, Côté J (2008) Eaf1 is the platform for NuA4 molecular assembly that evolutionarily links chromatin acetylation to ATP-dependent exchange of histone H2A variants. *Mol Cell Biol.* **28**(7):2257-70

Baba M, Takeshige K, Baba N, Ohsumi Y (1994) Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J Cell Biol.* **124**(6):903-13

Bankaitis,VA, Johnson, LM and Emr, SD (1986) Isolation of yeast mutants defective in protein targeting to the vacuole. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**(23): 9075–9079

Botstein D, Fink GR (1988) Yeast: an experimental organism for modern biology *Science* **240**(4858):1439-43

Broach JR, Strathern JN, Hicks JB (1979) Transformation in yeast: development of a hybrid cloning vector and isolation of the *CAN1* gene. *Gene.* **8**(1):121-33

- Cereghino JL, Marcusson EG, Emr SD** (1995) The cytoplasmic tail domain of the vacuolar protein sorting receptor Vps10p and a subset of VPS gene products regulate receptor stability, function, and localization. *Mol Biol Cell* **6**(9):1089-102
- Cebollero E, Gonzalez R.** (2007) Autophagy: from basic research to its application in food biotechnology. *Biotechnol Adv.* **25**(4):396-409 Review
- Cebrat S, Mackiewicz P, Dudek MR** (1998) The role of the genetic code in generating new coding sequences inside existing genes. *Biosystems.* **45**(2):165-76
- Chang YH, Smith JA** (1989) Molecular cloning and sequencing of genomic DNA encoding aminopeptidase I from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **264**(12):6979-83
- Ciehanover A, Hod Y, Hershko A** (1978) A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* **81**(4):1100-5
- Cooper AA, Stevens TH** (1996) Vps10p cycles between the late-Golgi and prevacuolar compartments in its function as the sorting receptor for multiple yeast vacuolar hydrolases. *J Cell Biol.* **133**(3):529-41
- Cowles CR, Snyder WB, Burd CG, Emr SD** (1997) Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component *EMBO J.* **16**:2769-2782
- Cuervo AM, Dice JF** (1998) Lysosomes, a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J Mol Med.* **76**(1):6-12 Review
- Cueva R, García-Alvarez N, Suárez-Rendueles P** (1989) Yeast vacuolar aminopeptidase ysc1. Isolation and regulation of the *APE1 (LAP4)* structural gene. *FEBS Lett.* **259**(1):125-9
- Darsow T, Katzmann DJ, Cowles CR, Emr SD** (2001) Vps41p function in the alkaline phosphatase pathway requires homo-oligomerization and interaction with AP-3 through two distinct domains. *Mol Biol Cell* **12**(1):37-51
- Deloche O, Yeung BG, Payne GS, Schekman R** (2001) Vps10p transport from the trans-Golgi network to the endosome is mediated by clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell* **12**(2):475-85
- Dice JF** (1990) Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci.* **15**(8):305-9 Review
- Doyon Y, Côté J** (2004) The highly conserved and multifunctional NuA4 HAT complex. *Curr Opin Genet Dev.* **14**(2):147-54 Review
- Epple UD, Suriapranata I, Eskelinen EL, Thumm M** (2001) Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *J Bacteriol.* **183**(20):5942-55

- Erickson FL, Hannig EM** (1995) Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* his1 and his5 cDNAs. *Yeast* **11**(2):157-67
- Foreman PK, Davis RW** (1994) Cloning vectors for the synthesis of epitope-tagged, truncated and chimeric proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **144**(1):63-8
- Frey J, Röhm KH** (1978) Subcellular localization and levels of aminopeptidases and dipeptidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. **527**(1):31-41
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG** (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**(5287):546, 563-7 Review
- Grunstein M** (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**(6649):349-52. Review
- Hancock LC, Behta RP, Lopes JM** (2006) Genomic analysis of the Opi-phenotype. *Genetics* **173**(2):621-34
- Harding TM, Morano KA, Scott SV, Klionsky DJ** (1995) Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol.* **131**(3):591-602
- Hartley JL, Gregori TJ** (1981) Cloning multiple copies of a DNA segment. *Gene* **13**(4):347-53
- Hashimoto C, Cohen RE, Zhang WJ, Ballou CE** (1981) Carbohydrate chains on yeast carboxypeptidase Y are phosphorylated. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**(4):2244-8
- Hasilik A, Tanner W** (1978) Biosynthesis of the vacuolar yeast glycoprotein carboxypeptidase Y. Conversion of precursor into the enzyme. *Eur J Biochem.* **85**(2):599-608
- Hemmings BA, Zubenko GS, Hasilik A, Jones EW** (1981) Mutant defective in processing of an enzyme located in the lysosome-like vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **78**(1):435-9
- Hong E, Davidson AR, Kaiser CA** (1996) A pathway for targeting soluble misfolded proteins to the yeast vacuole. *J Cell Biol.* **135**(3):623-33
- Huber W, Toedling J, Steinmetz LM** (2006) Transcript mapping with high-density oligonucleotide tiling arrays. *Bioinformatics* **22**(16):1963-70
- Hutchins MU, Veenhuis M, Klionsky DJ** (1999) Peroxisome degradation in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway. *J Cell Sci.* **112** (22):4079-87
- Jones EW, Webb GC, Hiller MA** (1997) Biogenesis and function of the yeast vacuole. molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* Vol. III. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p 363– 469

- Kabeya Y, Kamada Y, Baba M, Takikawa H, Sasaki M, Ohsumi Y** (2005) Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Mol Biol Cell*. **16**(5):2544-53
- Kabeya Y, Kawamata T, Suzuki K, Ohsumi Y** (2007) Cis1/Atg31 is required for autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*. **356**(2):405-10
- Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, Ohsumi Y** (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*. **150**(6):1507-13
- Kawamata T, Kamada Y, Suzuki K, Kuboshima N, Akimatsu H, Ota S, Ohsumi M, Ohsumi Y** (2005) Characterization of a novel autophagy-specific gene, *ATG29* *Biochem Biophys Res Commun*. **338**(4):1884-9
- Kihara A, Noda T, Ishihara N, Ohsumi Y** (2001) Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. **152**(3):519-30
- Kim J, Huang WP, Klionsky DJ** (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**(1):51-64
- Kim J, Huang WP, Strømhaug PE, Klionsky DJ** (2002) Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *J Biol Chem* **277**:763–73
- Kim J, Scott SV, Oda MN, Klionsky DJ** (1997) Transport of a large oligomeric protein by the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J Cell Biol*. **137**(3):609-18
- Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M, Yoshimori T, Noda T, Ohsumi Y** (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol*. **147**(2):435-46
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T, Ohsumi Y** (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**(2):263-76
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA Jr, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, Ohsumi Y** (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*. **5**(4):539-45
- Klionsky DJ, Cueva R, Yaver DS** (1992) Aminopeptidase I of *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the vacuole independent of the secretory pathway. *J Cell Biol*. **119**(2):287-99

- Kobor MS, Venkatasubrahmanyam S, Meneghini MD, Gin JW, Jennings JL, Link AJ, Madhani HD, Rine J** (2004) A protein complex containing the conserved Swi2/Snf2-related ATPase Swr1p deposits histone variant H2A.Z into euchromatin. *PLoS Biol.* **2**(5):E131
- Krogan NJ, Baetz K, Keogh MC, Datta N, Sawa C, Kwok TC, Thompson NJ, Davey MG, Pootoolal J, Hughes TR, Emili A, Buratowski S, Hieter P, Greenblatt JF** (2004) Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**(37):13513-8
- Kuma A, Mizushima N, Ishihara N, Ohsumi Y** (2002) Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem.* **277**(21):18619-25
- Kunau, W.-H., Böhne, S., Moreno de la Garza, M., Kionka, C., Mateblowski, M., Schultz-Borchard, U. und Thieringer, R.** (1988) Comparative enzymology of β -oxidation. *Biochem. Soc. Trans.* **16**:418-420
- Laemmli, UK** (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 *Nature* **227**, 680 – 685
- Lang T, Reiche S, Straub M, Bredschneider M, Thumm M** (2000) Autophagy and the cvt pathway both depend on AUT9. *J Bacteriol* **182**:2125–33
- Levine B, Kroemer G** (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**(1):27-42 Review
- Longtine MS, McKenzie A 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR** (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**(10):953-61
- Matile P, Cortat M, Wiemken A, Frey-Wyssling A** (1971) Isolation of glucanase-containing particles from budding *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **68**(3):636-40
- Metz G, Röhm KH.** (1976) Yeast aminopeptidase I. Chemical composition and catalytic properties. *Biochim Biophys Acta.* **429**(3):933-49
- Moehle CM, Dixon CK, Jones EW** (1989) Processing pathway for protease B of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* **108**(2):309-25
- Min, T., Burley, S., Shapiro, L** Crystal structure of putative aminopeptidase 2 from *Pseudomonas Aeruginosa*, wird veröffentlicht
- Mitchell L, Lambert JP, Gerdes M, Al-Madhoun AS, Skerjanc IS, Figeys D, Baetz K** (2008) Functional dissection of the NuA4 histone acetyltransferase reveals its role as a genetic hub and that Eaf1 is essential for complex integrity. *Mol Cell Biol.* **28**(7):2244-56

- Mortimore GE, Lardeux BR, Adams CE** (1988) Regulation of microautophagy and basal protein turnover in rat liver. Effects of short-term starvation. *J Biol Chem.* **263**(5):2506-12
- Nakamura N, Matsuura A, Wada Y, Ohsumi Y** (1997) Acidification of vacuoles is required for autophagic degradation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem.* **121**(2):338-44
- Nasmyth KA, Tatchell K** (1980) The structure of transposable yeast mating type loci. *Cell* **19**(3):753-64
- Nice DC, Sato TK, Strømhaug PE, Emr SD, Klionsky DJ** (2002) Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy. *J Biol Chem.* **277**(33):30198-207
- Noda T, Ohsumi Y** (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem.* **273**(7):3963-6
- Oda MN, Scott SV, Hefner-Gravink A, Caffarelli AD, Klionsky DJ** (1996) Identification of a cytoplasm to vacuole targeting determinant in aminopeptidase I. *J Cell Biol.* **132**(6):999-1010
- Piper RC, Bryant NJ, Stevens TV** (1997) The membrane protein alkaline phosphatase is delivered to the vacuole by a route that is distinct from the VPS-dependent pathway. *J. Cell Biol.* **138**:531-545
- Powell B, Graham LA, Stevens TH** (2000) Molecular characterization of the yeast vacuolar H⁺-ATPase proton pore. *J Biol Chem.* **275**(31):23654-60
- Reggiori F, Klionsky DJ** (2005) Autophagosomes: biogenesis from scratch? *Curr Opin Cell Biol* **17**:415–22
- Reggiori F, Shintani T, Nair U, Klionsky DJ** (2005) Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy* **1**(2):101-9
- Robert F, Pokholok DK, Hannett NM, Rinaldi NJ, Chandy M, Rolfe A, Workman JL, Gifford DK, Young RA** (2004) Global position and recruitment of HATs and HDACs in the yeast genome. *Mol Cell* **16**(2):199-209
- Robinson JS, Klionsky DJ, Banta LM, Emr SD** (1988) Protein sorting in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. *Mol Cell Biol.* **8**(11):4936-48
- Schlumpberger M, Schaeffeler E, Straub M, Bredschneider M, Wolf DH, Thumm M** (1997) AUT1, a gene essential for autophagocytosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* **179**(4):1068-76
- Scott SV, Hefner-Gravink A, Morano KA, Noda T, Ohsumi Y, Klionsky DJ** (1996) Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**(22):12304-8

Scott SV, Nice DC 3rd, Nau JJ, Weisman LS, Kamada Y, Keizer-Gunnink I, Funakoshi T, Veenhuis M, Ohsumi Y, Klionsky DJ (2000) Apg13p and Vac8p are part of a complex of phosphoproteins that are required for cytoplasm to vacuole targeting. *J Biol Chem.* **275**(33):25840-9

Seguí-Real B, Martínez M, Sandoval IV (1995) Yeast aminopeptidase I is post-translationally sorted from the cytosol to the vacuole by a mechanism mediated by its bipartite N-terminal extension. *EMBO J.* **14**(22):5476-84

Shintani T, Huang WP, Stromhaug PE, Klionsky DJ (2002) Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Dev Cell* **3**(6):825-37

Sikorski RS, Hieter PA (1989) System of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**(1):19-27

Squatrito M, Gorrini C, Amati B (2006) Tip60 in DNA damage response and growth control: many tricks in one HAT. *Trends Cell Biol.* **16**(9):433-42 Review

Strømhaug PE, Reggiori F, Guan J, Wang CW, Klionsky DJ (2004) Atg21 is a phosphoinositide binding protein required for efficient lipidation and localization of Atg8 during uptake of aminopeptidase I by selective autophagy. *Mol Biol Cell.* **15**(8):3553-66

Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* **20**:5971-81

Szerlong H, Hinata K, Viswanathan R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Cairns BR (2008) The HSA domain binds nuclear actin-related proteins to regulate chromatin-remodeling ATPases. *Nat Struct Mol Biol.* Apr 13

Takehige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol.* **119**(2):301-11

Tanida I, Mizushima N, Kiyooka M, Ohsumi M, Ueno T, Ohsumi Y, Kominami E (1999) Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell.* **10**(5):1367-79

Teichert U, Mechler B, Müller H, Wolf DH (1989) Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J Biol Chem.* **264**(27):16037-45

Teter SA, Eggerton KP, Scott SV, Kim J, Fischer AM, Klionsky DJ (2001) Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase. *J Biol Chem.* **276**(3):2083-7

Thomas T, Voss AK (2007) The diverse biological roles of MYST histone acetyltransferase family proteins. *Cell Cycle.* **6**(6):696-704 Review

- Thumm M** (2002) Hitchhikers guide to the vacuole-mechanisms of cargo sequestration in the Cvt and autophagic pathways. *Mol Cell* **10**(6):1257-8
- Thumm M, Egner R, Koch B, Schlumpberger M, Straub M, Veenhuis M, Wolf DH** (1994) Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **349**(2):275-80
- Thumm M, Wolf DH** (1998) From proteasome to lysosome: studies on yeast demonstrate the principles of protein degradation in the eukaryote cell. *Adv Mol Cell Biol A. J. Rivett. Greenwich: JAI Press*, **27**:41–67
- Tsukada M, Ohsumi Y** (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **333**(1-2):169-74
- Trumbly RJ, Bradley G** (1983) Isolation and characterization of aminopeptidase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **156**:36-48
- van den Hazel HB, Kielland-Brandt MC, Winther JR** (1996) Review: biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast* **12**:1–16
- Vettese-Dadey M, Grant PA, Hebbes TR, Crane- Robinson C, Allis CD, Workman JL** (1996) Acetylation of histone H4 plays a primary role in enhancing transcription factor binding to nucleosomal DNA in vitro. *EMBO J.* **15**(10):2508-18
- Wach A, Brachat A, Pöhlmann R, Philippsen P** (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**(13):1793-808
- Yen WL, Legakis JE, Nair U, Klionsky DJ** (2007) Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9. *Mol Cell Biol* **18**:581–93
- Yoshihisa T, Anraku Y** (1989) Nucleotide sequence of *AMS1*, the structure gene of vacuolar alpha-mannosidase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* **163**(2):908-15
- Yoshihisa T, Anraku Y** (1990) A novel pathway of import of alpha-mannosidase, a marker enzyme of vacuolar membrane, in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **265**(36):22418-25
- Yoshihisa T, Ohsumi Y, Anraku Y** (1988) Solubilization and purification of alpha-mannosidase, a marker enzyme of vacuolar membranes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **263**(11):5158-63
- Young AR, Chan EY, Hu XW, Köchl R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J, Tooze SA** (2006) Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci.* **119**(18):3888-900

7 Anhang

7.1 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Stamm	Synonym	Genotyp	Referenz
y10	<i>suvia</i> Δ	<i>Mata</i> α , <i>ura3</i> Δ 0, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2-3</i> , -112, <i>trp1-289</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lap1</i> , <i>lap2</i> , <i>lap3</i> , <i>lap4</i> ; YDR360W:: <i>kanMX4</i> ; transf. mit pRS313-APE1	P.N. Rekha
y12	C6C	<i>Mata</i> α , <i>ura3-52</i> , <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2-3</i> , -112, <i>trp1-289</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lap1</i> , <i>lap2</i> , <i>lap3</i> , <i>lap4</i> ; transf. mit pRS313-APE1	Andrei-Selmer et al., 2001
y25		<i>Mata</i> α ; <i>ura3-52</i> ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2-3</i> , -112; <i>trp1-289</i> ; <i>ade2-101</i> ; <i>lap1</i> ; <i>lap2</i> ; <i>lap3</i> ; <i>lap4</i>	diese Arbeit
y26	<i>ydr360w</i> Δ	<i>Mata</i> α , <i>ura3</i> Δ 0, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2-3</i> , -112, <i>trp1-289</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lap1</i> , <i>lap2</i> , <i>lap3</i> , <i>lap4</i> ; YDR360W:: <i>kanMX4</i>	diese Arbeit
y27		<i>Mata</i> α ; <i>ura3-52</i> ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2-3</i> , -112; <i>trp1-289</i> ; <i>ade2-101</i> ; <i>lap1</i> ; <i>lap2</i> ; <i>lap3</i> ; <i>lap4</i> EMS Mutagenese	diese Arbeit
y28		<i>Mata</i> α ; <i>ura3-52</i> ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2-3</i> , -112; <i>trp1-289</i> ; <i>ade2-101</i> ; <i>lap1</i> ; <i>lap2</i> ; <i>lap3</i> ; <i>lap4</i> EMS Mutagenese	diese Arbeit
y34		<i>Mata</i> α ; <i>ura3</i> Δ 0 <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2-3</i> , -112, <i>trp1-289</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lap1</i> , <i>lap2</i> , <i>lap3</i> , <i>lap4</i> ; YDR360W:: <i>kanMX4</i> ; transf. mit pRS313-APE1 und pYX141-YDR360W	diese Arbeit
y35		<i>Mata</i> α ; <i>ura3</i> Δ 0 <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2-3</i> , -112, <i>trp1-289</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lap1</i> , <i>lap2</i> , <i>lap3</i> , <i>lap4</i> ; YDR360W:: <i>kanMX4</i> ; transf. mit pRS313-APE1 und pYX242-YDR360W	diese Arbeit
y43	<i>via10-2</i>	<i>Mata</i> , <i>ura3</i> ::pRS306-APE1, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2-3</i> , -112, <i>trp1-289</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lap1</i> , <i>lap2</i> , <i>lap3</i> , <i>lap4</i> , EMS Mutagenese	diese Arbeit
y46	<i>via14-2</i>	<i>Mata</i> α , <i>ura3</i> ::pRS306-APE1, <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2-3</i> , -112, <i>trp1-289</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lap1</i> , <i>lap2</i> , <i>lap3</i> , <i>lap4</i> , EMS Mutagenese	diese Arbeit
y89	<i>via10</i>	<i>Mata</i> α ; <i>ura3-52</i> ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2-3</i> , -112, <i>trp1-289</i> ; <i>ade2-101</i> ; <i>lap1</i> ; <i>lap2</i> ; <i>lap3</i> ; <i>lap4</i> ; EMS Mutagenese; transf. mit pRS313-APE1	Andrei-Selmer et al., 2001
y70	SEY6210	<i>Mata</i> α ; <i>ura3-53</i> ; <i>his3</i> - Δ 200; <i>leu2-3</i> , -112; <i>trp1</i> - Δ 901; <i>suc2</i> - Δ 9; <i>lys2-801</i>	Robinson et al., 1988
y71	SEY6211	<i>Mata</i> α ; <i>ura3-53</i> ; <i>his3</i> - Δ 200; <i>leu2-3</i> , -112; <i>trp1</i> - Δ 901; <i>suc2</i> - Δ 9; <i>lys2-801</i>	Robinson et al., 1988
y72	<i>ll-17</i>	<i>Mata</i> α ; <i>ura3-52</i> ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2-3</i> , -112; <i>trp1-289</i> , <i>lap1</i> ; <i>lap2</i> ; <i>lap3</i> ; <i>lap4</i>	D.H. Wolf
y75	<i>pep4</i> Δ	<i>Mata</i> α ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; YPL154C:: <i>kanMX4</i>	Euroscarf
y82	<i>ydr360w</i> Δ (Original)	<i>Mata</i> α ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; YDR360W:: <i>kanMX4</i>	Euroscarf
y87	C6A	<i>Mata</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3</i> Δ 1, <i>leu2-3</i> , -112, <i>trp1-289</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lap1</i> , <i>lap2</i> , <i>lap3</i> , <i>lap4</i> ; transf. mit pRS313-APE1	C. Andrei-Selmer
y91	<i>via14</i>	<i>Mata</i> α , <i>ura3-52</i> , <i>his3</i> \square 1, <i>leu2-3</i> , -112, <i>trp1-289</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lap1</i> , <i>lap2</i> , <i>lap3</i> , <i>lap4</i> , EMS Mutagenese, transf. mit pRS313-APE1	Andrei-Selmer et al., 2001
y93	YR320	<i>Mata</i> α , <i>his1-123</i> ; <i>Mata</i> α -Testerstamm	M.Thumm
y94	YR312	<i>Mata</i> , <i>his1-123</i> ; <i>Mata</i> -Testerstamm	M.Thumm
y96	WT	<i>Mata</i> α ; <i>ura3</i> ::pRS306-APE1; <i>leu2-3</i> , -112; <i>trp1-289</i> ; <i>ade2-101</i> ; <i>lap1</i> ; <i>lap2</i> ; <i>lap3</i> ; <i>lap4</i>	diese Arbeit
y109	<i>ape1</i> Δ	<i>Mata</i> α ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0; YKL103c:: <i>kanMX4</i>	Euroscarf
y126	<i>eaf1</i> Δ	<i>Mata</i> α ; <i>ura3</i> ::pRS306-APE1; <i>leu2-3</i> , -112; <i>trp1-289</i> ; <i>ade2-101</i> ; <i>lap1</i> ; <i>lap2</i> ; <i>lap3</i> ; <i>lap4</i> ; YDR359C und YDR360W:: <i>HIS3MX6</i>	diese Arbeit
y143	BY4741	<i>MATa</i> ; <i>his3</i> Δ 1; <i>leu2</i> Δ 0; <i>met15</i> Δ 0; <i>ura3</i> Δ 0	Euroscarf

y148		<i>Mata, ura3::pRS306-APE1, his3Δ1, leu2-3, -112, trp1-289, ade2-101, lap1, lap2, lap3, lap4, EMS Mutagenese; pYX141</i>	diese Arbeit
y149		<i>Mata, ura3::pRS306-APE1, his3Δ1, leu2-3, -112, trp1-289, ade2-101, lap1, lap2, lap3, lap4, EMS Mutagenese; pYX242</i>	diese Arbeit
y150		<i>Mata, ura3::pRS306-APE1, his3Δ1, leu2-3, -112, trp1-289, ade2-101, lap1, lap2, lap3, lap4, EMS Mutagenese; pYX141-YDR360W</i>	diese Arbeit
y151		<i>Mata, ura3::pRS306-APE1, his3Δ1, leu2-3, -112, trp1-289, ade2-101, lap1, lap2, lap3, lap4, EMS Mutagenese; pYX242-YDR360W</i>	diese Arbeit
y152		<i>Mataα, ura3::pRS306-APE1, his3Δ1, leu2-3, -112, trp1-289, ade2-101, lap1, lap2, lap3, lap4, EMS Mutagenese; transf. mit pYX141</i>	diese Arbeit
y153		<i>Mataα, ura3::pRS306-APE1, his3Δ1, leu2-3, -112, trp1-289, ade2-101, lap1, lap2, lap3, lap4, EMS Mutagenese; transf. mit pYX242</i>	diese Arbeit
y154		<i>Mataα, ura3::pRS306-APE1, his3Δ1, leu2-3, -112, trp1-289, ade2-101, lap1, lap2, lap3, lap4, EMS Mutagenese; transf. mit pYX141-YDR360W</i>	diese Arbeit
y155		<i>Mataα, ura3::pRS306-APE1, his3Δ1, leu2-3, -112, trp1-289, ade2-101, lap1, lap2, lap3, lap4, EMS Mutagenese; transf. mit pYX242-YDR360W</i>	diese Arbeit
y156		<i>Mata, ura3::pRS306-APE1, his3Δ1, leu2-3, -112, trp1-289, ade2-101, lap1, lap2, lap3, lap4, EMS Mutagenese; transf. mit pYX141-EAF1</i>	diese Arbeit
y157		<i>Mata, ura3::pRS306-APE1, his3Δ1, leu2-3, -112, trp1-289, ade2-101, lap1, lap2, lap3, lap4, EMS Mutagenese; transf. mit pYX242-EAF1</i>	diese Arbeit
y158		<i>Mataα, ura3::pRS306-APE1, his3Δ1, leu2-3, -112, trp1-289, ade2-101, lap1, lap2, lap3, lap4, EMS Mutagenese; transf. mit pYX141-EAF1</i>	diese Arbeit
y159		<i>Mataα, ura3::pRS306-APE1, his3Δ1, leu2-3, -112, trp1-289, ade2-101, lap1, lap2, lap3, lap4, EMS Mutagenese; transf. mit pYX242-EAF1</i>	diese Arbeit
y162		<i>Mataα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YDR359C und YDR360W::HIS3MX6; transf. mit pYX141</i>	diese Arbeit
y164		<i>Mataα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YDR359C und YDR360W::HIS3MX6; transf. mit pYX242</i>	diese Arbeit
y166		<i>Mataα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YDR359C und YDR360W::HIS3MX6; transf. mit pYX141-YDR360W</i>	diese Arbeit
y168		<i>Mataα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YDR359C und YDR360W::HIS3MX6; transf. mit pYX242-YDR360W</i>	diese Arbeit
y170		<i>Mataα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YDR359C und YDR360W::HIS3MX6; transf. mit pYX141-EAF1</i>	diese Arbeit
y172		<i>Mataα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YDR359C und YDR360W::HIS3MX6; transf. mit pYX242-EAF1</i>	diese Arbeit
y189		<i>Mataα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YDR359C und YDR360W::HIS3MX6; transf. mit pYX141-EAF1 1-862 bp</i>	diese Arbeit

y191		<i>Matα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YDR359C und YDR360W::HIS3MX6; transf. mit pYX242-EAF1 1-862bp</i>	diese Arbeit
y193		<i>Matα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YDR359C und YDR360W::HIS3MX6; transf. mit pYX141-EAF1 847-2946 bp</i>	diese Arbeit
y195		<i>Matα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YDR359C und YDR360W::HIS3MX6; transf. mit pYX242-EAF1 847-2946 bp</i>	diese Arbeit
y197		<i>Matα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YDR359C und YDR360W::HIS3MX6; transf. mit pYX141-EAF1 NLS Mutation</i>	diese Arbeit
y199		<i>Matα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YDR359C und YDR360W::HIS3MX6; transf. mit pYX242-EAF1 NLS Mutation</i>	diese Arbeit
y206		<i>Matα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YDR359C::HIS3MX6; Klon #1</i>	diese Arbeit
y207		<i>Matα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YDR359C::HIS3MX6; Klon #4</i>	diese Arbeit
y210	<i>yng2Δ</i>	<i>Matα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YHR090C::HIS3MX6; Klon #5</i>	diese Arbeit
y213	<i>AH109</i>	<i>Matα, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, MEL1, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	Clontech
y220		<i>Matα, ura3::pRS306-APE1, his3Δ1, leu2-3, -112, trp1-289, ade2-101, lap1, lap2, lap3, lap4, EMS; transf. mit pYX142-APE1</i>	diese Arbeit
y228		<i>Matα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YDR359C und YDR360W::HIS3MX6; transf. mit pYX142-APE1</i>	diese Arbeit
y234		<i>Mata, ura3::pRS306-APE1, his3Δ1, leu2-3, -112, trp1-289, ade2-101, lap1, lap2, lap3, lap4, EMS Mutagenese; transf. mit pYX132-YDR360W</i>	diese Arbeit
y236		<i>Mata, ura3::pRS306-APE1, his3Δ1, leu2-3, -112, trp1-289, ade2-101, lap1, lap2, lap3, lap4, EMS Mutagenese; transf. mit pYX132-APE1</i>	diese Arbeit
y249	<i>eaf3Δ</i>	<i>Matα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YPR023C::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
y250	<i>eaf5Δ</i>	<i>Matα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YEL018W::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
y252	<i>eaf6Δ</i>	<i>Matα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YJR082C::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
y255	<i>eaf7Δ</i>	<i>Matα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YNL136W::HIS3MX6</i>	diese Arbeit
y256	<i>yaf9Δ</i>	<i>Matα; ura3::pRS306-APE1; leu2-3, -112; trp1-289; ade2-101; lap1; lap2; lap3; lap4; YNL107W::HIS3MX6</i>	diese Arbeit

Nicht alle in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme wurden in die Stammsammlung aufgenommen. Einige Stämme, wie beispielsweise die für *in situ* Immunfluoreszenzen wurden für die jeweiligen Experimente immer neu transformiert. Die hier in grau aufgeführten Hefestämme werden in der Arbeit nur erwähnt, aber in Abbildungen nicht direkt aufgeführt.

7.2 Oligonukleotide

7.2.1 Oligonukleotide für Klonierungen in die Hefevektoren *pYX141*, *142*, *242* und *132*

5'-Primer/ 3'-Primer	Sequenz	Funktion
TB22/ TB29	5'-CGCGAATTCATGATGGGAGTCGCAGCTG-3' 5'-CGCAAGCTTGAAGGGATAAGGA-3'	Amplifikation des <i>YDR360W</i> -Fragments
TB34/ TB35	5'-CGCGAATTCATGTCCTCACGTCCAAGT-3' 5'-CGCAAGCTTTTGTGTTTTGGAACCT-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments
TB34/ TB66	5'-CGCGAATTCATGTCCTCACGTCCAAGT-3' 5'-TTATTAATTTACATCCGCCGCTGCCGCTTTTGTTA TGGGAGT-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments bp 1-322 zur Mutation der potentiellen NLS
TB65/ TB35	5'-ACTCCCATAACAAAAGCGGCAGCGCGGATGTAAAT TTAATAA-3' 5'-CGCAAGCTTTTGTGTTTTGGAACCT-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments bp 279-2946 zur Mutation der potentiellen NLS
TB34/ TB67	5'-CGCGAATTCATGTCCTCACGTCCAAGT-3' 5'-CGCAAGCTTTAAGGGCAAAGCCTGGG-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments bp 1-862
TB68/ TB35	5'-CGCGAATTCATGCAGGCTTTGCCCTTAG-3' 5'-CGCAAGCTTTTGTGTTTTGGAACCT-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments bp 847-2946
TB91/ TB93	5'-CGCCCATGGAGGAACAACGTGAAAT-3' 5'-CGCAAGCTTTCACAACCTCGCCGAAT-3'	Amplifikation des <i>APE1</i> -Fragments
TB90/ TB87	5'-CGCCCATGGATCCAAGTTTAGTTTTA-3' 5'-CGCAAGCTTGTTACGTTTTCTT-3'	Amplifikation des <i>YNG2</i> -Fragments

7.2.2 Oligonukleotide zur Klonierung der Hefevektoren *pYX-HA141*, *142* und *242*

5'-Primer/ 3'-Primer	Sequenz	Funktion
TB120/ TB121	5'-CGCGAATTCGCCGCCATCATGGAG-3' 5'-CGCGAATTCGGCCTCCATGGCCA-3'	Amplifikation des <i>MYC</i> -Tags aus <i>pGBKT7</i>
TB122/ TB123	5'-CGCGAATTCGCCGCCATGGAGTAC-3' 5'-CGCGAATTCAGTGGCCTCCATGGC-3'	Amplifikation des <i>HA</i> -Tags aus <i>pGADT7</i>

7.2.3 Oligonukleotide für Klonierungen in die Hefevektoren *pYX-HA141*, *142* und *242*

5'-Primer/ 3'-Primer	Sequenz	Funktion
TB45/ TB124	5'-CGCGGGCCCTGTCCTCACGTCCAAGT-3' 5'-CGCAAGCTTTCATTGTTTTGGAACCT-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments
TB45/ TB125	5'-CGCGGGCCCTGTCCTCACGTCCAAGT-3' 5'-CGCAAGCTTTCATAAGGGCAAAGCCTGGG-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments bp 1-862
TB143/ TB124	5'-CGCGGGCCCTGCAGGCTTTGCCCTTAG-3' 5'-CGCAAGCTTTCATTGTTTTGGAACCT-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments bp 847-2946

7.2.4 Oligonukleotide für Klonierungen in „Yeast two Hybrid“-Vektor *pGADT7*

5'-Primer/ 3'-Primer	Sequenz	Funktion
TB34/ TB98	5'-CGCGAATTCATGTCCTCACGTCCAAGT-3' 5'-CGCGAGCTCTCATTGTTTTTGGAACCTTTG-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments
TB34/ TB99	5'-CGCGAATTCATGTCCTCACGTCCAAGT-3' 5'-CGCGAGCTCTCATAAGGGCAAAGCCTGGG-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments bp 1-862
TB68/ TB98	5'-CGCGAATTCATGCAGGCTTTGCCCTTAG-3' 5'-CGCGAGCTCTCATTGTTTTTGGAACCTTTG-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments bp 847-2946
TB97/ TB98	5'-CGCGAATTCCTTGAGCGTCAATTGATTGAC-3' 5'-CGCGAGCTCTCATTGTTTTTGGAACCTTTG-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments bp 1803-2946
TB101/ TB102	5'-CGCCCATGGAGGAACAACGTGAAATACTG-3' 5'-CGCCCCGGGTCACAACCTCGCCGAATTCAT-3'	Amplifikation des <i>APE1</i> -Fragments

7.2.5 Oligonukleotide für Klonierungen in „Yeast two Hybrid“-Vektoren *pGBT9* und *pGBKT7*

5'-Primer/ 3'-Primer	Sequenz	Funktion
TB34/ TB95	5'-CGCGAATTCATGTCCTCACGTCCAAGT-3' 5'-CGCGTCGACTCATTGTTTTTGGAACCTTTG-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments
TB34/ TB96	5'-CGCGAATTCATGTCCTCACGTCCAAGT-3' 5'-CGCGTCGACTCATAAGGGCAAAGCCTGGG-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments bp 1-862
TB68/ TB95	5'-CGCGAATTCATGCAGGCTTTGCCCTTAG-3' 5'-CGCGTCGACTCATTGTTTTTGGAACCTTTG-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments bp 847-2946
TB97/ TB95	5'-CGCGAATTCCTTGAGCGTCAATTGATTGAC-3' 5'-CGCGTCGACTCATTGTTTTTGGAACCTTTG-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments bp 1803-2946
TB105/ TB103	5'-CGCCCCGGGGGAGGAACAACGTGAAATACTG-3' 5'-CGCGTCGACTCACAACCTCGCCGAATTCAT-3'	Amplifikation des <i>APE1</i> -Fragments
TB101/ TB103	5'-CGCCCATGGAGGAACAACGTGAAATACTG-3' 5'-CGCGTCGACTCACAACCTCGCCGAATTCAT-3'	

7.2.6 Oligonukleotide zur Verifizierung der Deletionsstämme

5'-Primer/ 3'-Primer	Sequenz	Funktion
TB90/ TB87	5'-CGCCCATGGATCCAAGTTTAGTTTTA-3' 5'-CGCAAGCTTGTTACGTTTTCTT-3'	Amplifikation des ORFs <i>YHR090C</i>
TB84/ TB56	5'-AAGAAGGATATGCAAGTTTATATTGGACAACA TAACCAATAGAAGATGCGGATCCCCGGGTTAATTAA -3' 5'-CCACGGACAGCACCCATTGC-3'	Amplifikation des deletierten ORFs <i>YHR090C</i>
TB131/ TB132	5'-CGCGGGCCCTCGTTGATTTGGAGCAGGAA-3' 5'-CGCAAGCTTTCACATACCTAAAGCCACTCCTTCG-3'	Amplifikation des ORFs <i>YPR023C</i>
TB128/ TB56	5'-CTTCACCAACTCCGATATA-3' 5'-CCACGGACAGCACCCATTGC-3'	Amplifikation des deletierten ORFs <i>YPR023C</i>
TB127/ TB134	5'-GTCTCATCAATTTGTTTGTAG-3' 5'-CGCAAGCTTTCACTCTAGTGCTCTTCTCA-3'	Amplifikation des ORFs <i>YEL018W</i>
TB125/ TB56	5'-CGCAAGCTTTCATAAGGGCAAAGCCTGGG-3' 5'-CCACGGACAGCACCCATTGC-3'	Amplifikation des deletierten ORFs <i>YEL018W</i>

TB135/ TB136	5'-CGCGGATCCTACTGATGAGCTGAAAAGT -3' 5'-CGCAAGCTTTCAGTCGTTTTGTGATTGGCC-3'	Amplifikation des ORFs <i>YLR082C</i>
TB141/ TB56	5'-GTGAAGACGAGGATGATGA-3' 5'-CCACGGACAGCACCCATTGC-3'	Amplifikation des deletierten ORFs <i>YLR082C</i>
TB137/ TB138	5'-CGCGGATCCTGTAGTACATTGGACA-3' 5'-CGCAAGCTTTCATTTTTTATTTTCGTAGCCTGC-3'	Amplifikation des ORFs <i>YNL136W</i>
TB130/ TB56	5'-TTGGCATTATCTCTGTATT-3' 5'-CCACGGACAGCACCCATTGC-3'	Amplifikation des deletierten ORFs <i>YNL136W</i>
TB139/ TB140	5'-CGCGGATCCTGCTCCGACAATAAGCAAAAAG-3' 5'-CGCAAGCTTTCAACTTCCGTTAATGGCTTC-3'	Amplifikation des ORFs <i>YNL107W</i>
TB126/ TB56	5'-GACCTGTAACCATGTCTGGC-3' 5'-CCACGGACAGCACCCATTGC-3'	Amplifikation des deletierten ORFs <i>YNL107W</i>

7.2.7 Oligonukleotide für Sequenzierungen

Primer	Sequenz	Funktion
pYX Sequ.141	5'-GGTGTGCTTTACGAACAGCGCTGG-3'	Sequenziert vor MCS von <i>pYX141</i>
pYX Sequ.242	5'-GCTTAAATCTATAACTACA-3'	Sequenziert vor MCS von <i>pYX142</i> und 242
TB39	5'-GCCACTTGAGTCAACTATGG-3'	Sequenziert <i>EAF1</i> von bp 500
TB40	5'-TAAGAAGACTTGGATTATGG-3'	Sequenziert <i>EAF1</i> von bp 1000
TB41	5'-ATTGACACCAAGTTACTTCT-3'	Sequenziert <i>EAF1</i> von bp 1500
TB42	5'-CAATTGGGAATTGATTAGTG-3'	Sequenziert <i>EAF1</i> von bp 2000
TB45.1	5'-CCAATACCTTCAAATGGC-3'	Sequenziert <i>EAF1</i> von bp 2526
TB108	5'-GCGCCGGTGATGCCGGCCACGAT-3'	Sequenziert <i>YEp13</i> ; Lybarger <i>et al.</i> , 1999
TB109	5'-CTACTTGGAGCCACTATCGACTAC-3'	Sequenziert <i>YEp13</i> ; Lybarger <i>et al.</i> , 1999

7.2.8 Oligonukleotide zur Amplifikation des *HIS5⁺*-Gens aus *pFA6a-HIS3MX6*

5'-Primer/ 3'-Primer	Sequenz	Funktion
TB32/ TB31	5'-TTACAGAGAACAGAGTGTTACGCCAACATACTAAACCAGA GAAGTATGCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3' 5'-TGC GGCGTAACTACAAAATTTCTGGTTCTTCCCCCTTTCGA ACCGTTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'	Zur Deletion von <i>YDR360W</i> und <i>YDR359C</i>
TB32/ TB33	5'-TTACAGAGAACAGAGTGTTACGCCAACATACTAAACCAGA GAAGTATGCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3' 5'-TTATTTAGAGACATCATAATCAAAGTACAGTTTCCGCCTC AAAGTTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'	Zur Deletion von <i>YDR359C</i>

TB84/ TB85	5'-AAGAAGGATATGCAAGTTTATATTGGACAACATAACCAATAG AAGATGCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3' 5'-TAGTGAAATGAGGTCATTTCAGTCTCAAAAAGGTATTTTTGTT CATTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC -3'	Zur Deletion von <i>YHR090C</i>
TB18/ TB19	5'-ACATTACTTGTGACCACCTATTTACGGCATCACAAAGAAAG CGAGATGCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3' 5'-TACTATGGCTGTTATGAAAATACCGTTGTTCCGGGTGCAGTG ATCTTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'	Zur Deletion von <i>YNL107W</i>
TB112/ TB113	5'-TCTGTGAGGCCTCGTCACTGGATTTACCCTATTGAAGAA CGTATAATGCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3' 5'-AAGAACTAATACTAGAAATAATCCCAAGCTAG AATATAAACGTCTTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'	Zur Deletion von <i>YPR023C</i>
TB116/ TB117	5'-GATACTTCTGCGTGCCGGAGTAACCAGAATCAAAGGAACGCA TAGATGCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3' 5'-AATGTTACAAGACTTTAGATTTTCGAAGTGTGCCTACTATCT CCTTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'	Zur Deletion von <i>YEL018W</i>
TB114/ TB115	5'-TTTCCATCATCTTTCCGTTTGTACCAACCTACGCCTAGAAGA AAATGCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3' 5'-TTTTAGAGCGGTCAAGCAACGTAAATACCAACGTGTGCTATC GCATTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'	Zur Deletion von <i>YLR082C</i>
TB110/ TB111	5'-TAGAAGTTGCTAGCTGCTAGTGAAGAAAAGGGAATCGTGG ATGTGATGCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3' 5'-GGAACGGATGAGCGTTTATTATCGCGATCTATATATGAGC AGTGATTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC -3'	Zur Deletion von <i>YNL136W</i>

7.2.9 Oligonukleotide zur Amplifikation von Sonden-DNA

5'-Primer/ 3'-Primer	Sequenz	Funktion
TB20/ TB21	5'-CTGGAGTTAGTTGAAGCATTAGGTC-3' 5'-CCAACAATAATAATGTCAGATCC-3'	Amplifikation des <i>URA3</i> -Fragments aus <i>pRS306</i>
TB27/ TB28	5'-TGAGAGTTGCCCCAGAAGA-3' 5'-TCAATACCGGCAGATTCCA-3'	Amplifikation des <i>ACT1</i> -Fragments aus genomischer DNA
TB36/ TB35	5'-CGCGGATCCATGTCCTCACGTCCAAGT-3' 5'-CGCAAGCTTTTGTGTTTGGAACCT-3'	Amplifikation des <i>EAF1</i> -Fragments aus genomischer DNA
TB22/ TB29	5'-CGCGAATTCATGATGGGAGTCGAGCTG-3' 5'-CGCAAGCTTGAAGGGATAAGGA-3'	Amplifikation des <i>YDR360W</i> - Fragments aus <i>pYX141</i> - <i>YDR360W</i>
TB55/ TB56	5'-CTGTTTCAGGAGCGCAAGGCGTT-3' 5'-CCACGGACAGCACCCATTGC-3'	Amplifikation des <i>HIS5⁺</i> -Fragments aus <i>pFA6a</i> - <i>HIS3MX6</i>

Danksagung

Ein herzlicher Dank geht an Prof. Kurt von Figura für die Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Gerhard Braus möchte ich für seine Bemühungen als Korreferent danken.

Vielen Dank an Prof. Peter Schu für die Bereitstellung des interessanten, herausfordernden Themas. Danke für Deine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung in den letzten drei Jahren und dass Du mir die Freiheit gegeben hast, meinen eigenen Ideen nachzugehen.

Neben Prof. Peter Schu, möchte ich auch den zwei weiteren Mitgliedern meines Thesis Committees, Prof. Michael Thumm und Prof. Gerhard Braus für die Anregungen und wertvollen Vorschläge bezüglich meines Projektes herzlich danken.

Es war ein großes Privileg dem Graduiertenkolleg 521 unter Leitung von Prof. Detlef Doenecke anzugehören. Ich möchte vor allem ihm und allen beteiligten Doktoranden für ihre große Hilfsbereitschaft, Organisation der lehrreichen Seminare und die gute Zeit danken.

In diesen drei Jahren hatte ich viel Glück mit meinen Kollegen und möchte deshalb den „übrig gebliebenen“ der Biochemie II, Rosi, Tanja, Anika, Petra, Yvonne, Jörn, Sebastian, Evelyn, Katrin, Nicole, Ellen, Markus, Florian, Martina, Matthias, Tobias, Ina, Klaus und Torben für das kollegiale Klima, ihre Freundschaft und hilfreichen, wissenschaftlichen Diskussionen danken. Vor allem Olaf, Jutta, Karthik und Jenny haben dazu beigetragen, dass die Arbeit viel Spaß gemacht hat. Bei Karthik und Jenny möchte ich mich zusätzlich für den regen wissenschaftlichen Austausch, ihr Interesse und leckeres indisches Essen und Kuchen bedanken.

Ein riesengroßer Dank geht an meine Familie. An meine Eltern Marianne und Helmut und meiner Schwester Katrin für ihre ständige, liebevolle Unterstützung, an meinen Mann Guido, der mich immer bestärkt und mir Kraft gibt und an meinen Sohn Felix, der in den letzten Jahren toll mitgearbeitet hat und uns beiden somit ermöglichte, berufstätig zu sein.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Staatsangehörigkeit: deutsch

Geburtsort: Nürnberg

Geburtsdatum: 30.05.1974

Schulische Ausbildung

1980-1984 Grundschule Schwaig b. Nürnberg

1984-1986 Hauptschule Schwaig b. Nürnberg

1986-1990 Veit-Stoss Realschule, Nürnberg

1990-1994 Peter-Vischer Gymnasium, Nürnberg

Wissenschaftliche Ausbildung

1995-2001 Studium: Diplom-Biologie an der Friedrich-Alexander-Universität,
Erlangen-Nürnberg

Hauptfach: Biochemie

2000-2001 Diplomarbeit an der Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg

Thema: Zellzyklusregulierte Transkription in *Saccharomyces cerevisiae*: Identifikation regulatorischer Domänen von Swi6

2005-2008 Dissertation an der Georg-August-Universität, Göttingen

Thema: Charakterisierung der Eaf1-Funktion für die Biogenese der Aminopeptidase 1

Sonstige Berufserfahrung

2001-2003 University of Manchester, Manchester (UK)

Research Assistant (zytologische und biochemische Charakterisierung von Integrinen in Zusammenarbeit mit Sanofi-Pharma, Frankfurt)