

**Untersuchungen zum Transport stickstoffhaltiger
Metabolite in *Saccharomyces cerevisiae***

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Markus Albertsen
aus Wil

Köln, 2002

Berichterstatter

Prof. Dr. Reinhard Krämer

Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt

Tag der Disputation: 13.01.2003

Kurzzusammenfassung

Die Vakuole des Ascomyceten *Saccharomyces cerevisiae* spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Speicherung stickstoffhaltiger Metabolite. Dabei werden zum Beispiel basische Aminosäuren sowie Polyamine in hohem Maße im vakuolären Lumen angereichert. Die dafür zuständigen Transportsysteme in der Vakuolenmembran sind zum größten Teil noch unbekannt. Im Rahmen eines europäischen Kooperationsprojektes wurden sämtliche Mitglieder zweier weitgehend uncharakterisierter Transporterfamilien mit einem Antikörperepitop versehen, sowie *lacZ*-Deletionsmutanten der entsprechenden Gene isoliert. Diese beiden Familien waren zum einen die *Multi-Drug-Resistance-* (*MDR-*) Familie, zum anderen die *Amino-Acid/Auxin-Permease-* (*AAAP-*) Familie. Durch die systematische Bestimmung der subzellulären Lokalisierung der Proteine sowie der Messung der Promotoraktivität bei Stickstoffmangel sollten Hinweise auf mögliche Funktionen einzelner Mitglieder beider Familien beim vakuolären Metabolittransport gefunden werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde eine Aktivierung der Expression bei zwei *MDR*-Genen unter Stickstoffmangel, sowie eine Repression bei vier *MDR*-Genen festgestellt. Das Genprodukt von ORF YCR023c konnte in der Vakuole lokalisiert werden; alle anderen untersuchten mutmaßlichen Transportproteine waren Plasmamembran-gebunden. Bei der Bestimmung der subzellulären Lokalisierung der vier mutmaßlichen Polyamintransporter Tpo1p, Tpo2p, Tpo3p und Tpo4p fiel auf, dass, entgegen der veröffentlichten Meinung, alle diese Proteine in der Plasmamembran lokalisiert sind. Die nähere Charakterisierung einer *TPO1*-Deletionsmutante zeigte, dass Tpo1p bei unphysiologisch hohen intrazellulären Spermidinkonzentrationen als Spermidin-Exporter funktioniert. Es wurden Hinweise für eine Funktion von Ycr023p, sowie dem nicht näher charakterisierten mutmaßlichen Transporter Ybr241p beim Polyamintransport gefunden.

Abstract

The vacuole of the ascomycete *Saccharomyces cerevisiae* has important functions for the storage of nitrogenous metabolites. Basic amino acids as well as polyamines are found to be highly accumulated inside the vacuolar lumen. Transport systems in the vacuolar membrane that are responsible for this activity are mostly unknown. In the course of a European cooperation project all members of two transporter families, most of which with unknown functions, have been epitope-tagged and *lacZ* deletion mutants of the respective genes have been isolated. These transporters group to the multi drug resistance (MDR) family and the amino acid/auxin permease (AAAP) family. By systematic determination of the subcellular localization and measurements of the promoter activity under nitrogen limitation hints should be found for a function of single members of these families in vacuolar metabolite transport. Activation of gene expression after nitrogen limitation was found for two genes, the expression was repressed in four others, all genes were encoding members of the MDR family. The gene product of ORF YCR023c was found to be localized in the vacuolar membrane, all other proteins tested were plasma membrane-bound. The four putative polyamine transporters Tpo1p, Tpo2p, Tpo3p, and Tpo4p, interestingly, were also found to be localized in the plasma membrane, in contrast to published postulations. Characterization of a *TPO1* deletion mutant showed that Tpo1p functions as spermidine exporter when cells are stressed with high spermidine concentrations. Evidences for a function of Ycr023p and of the uncharacterized putative transporter Ybr241p in polyamine transport are presented in this work.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Transportproteine in der Bäckerhefe	1
1.2	Die Vakuole in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.3	<i>Multi Drug Resistance</i>	4
1.4	Die <i>MDR</i> -Familie	5
1.5	Die <i>AAAP</i> - (<i>AVT</i> -) Familie	7
1.6	Polyamintransport in der Bäckerhefe	8
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit	9
2	Material und Methoden	10
2.1	Hefestämme, Nährmedien und Chemikalien	10
2.1.1	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	10
2.1.2	Chemikalien	11
2.2	Molekularbiologische Methoden	11
2.2.1	Bakterienstämme	11
2.2.2	Nährmedien für Bakterien	11
2.2.3	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	11
2.2.4	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	12
2.2.5	Präparation genomischer Hefe-DNA	13
2.2.6	Klonierung von DNA-Fragmenten	13
2.2.7	Konstruktion von Plasmiden	15
2.2.8	Hefetransformation	16
2.2.9	Genomische Modifizierung von Hefestämmen	17
2.3	Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)	19
2.4	β -Galaktosidase-Assays	19
2.5	Expressionsanalyse unter Stickstoffmangel	20
2.6	Proteinpräparation der Membranfraktion	20
2.7	Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western Blot	21
2.8	ECL-Immundetektionsverfahren	22
2.9	Ablösung der Antikörper von Membranen	22
2.10	Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation	23
2.10.1	Erstellung der Gradienten	23
2.10.2	Zentrifugation der Gradienten	23

2.10.3	Vorbereitung der Fraktionen für den Western Blot	24
2.11	Messung der Enzymaktivität in den Fraktionen	24
2.11.1	Cytochrom c-Oxidase	24
2.11.2	α -Mannosidase	25
2.12	HPLC-Analyse von Polyaminen	25
2.13	Polyaminimportmessung an ganzen Hefezellen	26
2.14	Messung der wachstumsabhängigen Polyaminabgabe	27
2.15	Polyamin-Exportmessungen	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Isolierung von Hefestämmen mit mutierten Genen für putative Transporter	28
3.1.1	Auswahl möglicher vakuolärer Transporter	28
3.1.2	Isolierung von <i>lacZ</i> -Deletionsmutanten putativer Transportproteine	29
3.1.3	Studien zum Expressionsniveau der putativen Transportergene	31
3.1.4	Isolierung von Stämmen mit 3xHA-markierten Genen	31
3.1.5	Analyse der 3xHA-markierten putativen Transportproteine im Western Blot	34
3.2	Untersuchungen zur Lokalisierung putativer Transportproteine	36
3.2.1	Evaluation der Methode	36
3.2.2	Lokalisierung von Mitgliedern der <i>MDR</i> -Familie	38
3.2.3	ORF YCR023c kodiert für ein vakuoläres Transmembranprotein	39
3.3	Untersuchungen zum Polyamintransporter Tpo1p	40
3.3.1	Isolierung von Hefestämmen mit modifiziertem <i>TPOI</i> -Gen	40
3.3.2	Tpo1p ist in der Plasmamembran lokalisiert	41
3.3.3	Die Sperminaufnahmerate ganzer Zellen wird nicht durch <i>TPOI</i> -Deletion vermindert	43
3.3.4	Hefezellen geben während des fermentativen Wachstums Putrescin in das umgebende Medium ab	44
3.3.5	Der Export von Putrescin fermentativ wachsender Hefezellen ist nach <i>TPOI</i> -Deletion unverändert	47
3.3.6	Tpo1p ist beteiligt am Export von akkumuliertem Spermidin	48
3.3.7	Der beobachtete Phänotyp der <i>TPOI</i> -Deletion ist komplementierbar	50
3.4	Die Identifizierung neuer Polyamintransporter	51
3.4.1	Hinweise auf eine Funktion von Ycr023p als vakuolärer Polyamintransporter	52

3.4.2	Das Genprodukt von ORF YBR241c teilt mit Tpo1p und Ycr023p ein gemeinsames Sequenzmotiv	53
3.4.3	Deletion von YBR241c führt nicht zu einer Verringerung der Sperminimportrate ganzer Zellen	54
4	Diskussion	56
4.1	Analyse der Promotoraktivität und der Lokalisierung putativer Transportproteine	56
4.2	Die Neucharakterisierung von Tpo1p	58
4.3	Die Suche nach neuen Polyamintransportern in der Bäckerhefe	61
5	Zusammenfassung	65
6	Anhang	67
7	Literatur	76

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
d	Tag(e)
DAH	Diaminohexan
dest.	destilliertes
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreit
EDTA	Natrium-ethylendiamin-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	et alii
G	Guanin
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxy)-1-piperazinethansulfonsäure
kb	Kilobasenpaare (1kb=10 ³ bp)
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
M	mol/l
mA	Miliampère
min	Minute(n)
NEM	N-Ethylmaleimid
OD _{nm}	Optische Dichte bei der angegebenen Wellenlänge (nm)
ORF	Offenes Leseraster

PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethansulfonylfourid
Put	Putrescin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
s.	siehe
SAM	S-Adenosylmethionin
s.o.	siehe oben
SD	Synthetic Dropout
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spd	Spermidin
Spm	Spermin
T	Thymin
Tris	Trishydroxyaminomethan
U	Units
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Anmerkungen zu den in dieser Arbeit verwendeten Bezeichnungen von DNA- und Proteinsequenzen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*:

Nach der allgemein üblichen Nomenklatur sind jedem Gen der Hefe *S. cerevisiae* zwei Bezeichnungen zuzuordnen: Der systematische (ORF-) Name gibt die relative Position eines offenen Leserasters im Hefegenom an; er besteht aus drei großen Buchstaben, einer stets dreizifferigen Zahl und dem Kleinbuchstaben „c“ oder „w“. Das von diesem ORF kodierte Protein wird mit dem gleichen Code bezeichnet, jedoch wird hier nur der erste Buchstabe groß geschrieben und der letzte Buchstabe durch ein „p“ ersetzt. Alle systematischen Namen sind nicht kursiv gesetzt.

Konnte einem offenen Leseraster eine Funktion zugeordnet werden, kommt ein zweiter Name (Gen-Name), bestehend aus drei kursiven Großbuchstaben und einer Zahl hinzu. Das von einem Gen kodierte Protein wird mit dem gleichen Code bezeichnet, jedoch wird hier wieder nur der erste Buchstabe groß geschrieben und ein „p“ hinter die Zahl gesetzt. Dieser Name wird nicht kursiv gesetzt.

Die Bezeichnung der einzelnen Gene und Proteine folgt der im Internet zugänglichen Datenbank „SDG: *Saccharomyces Genome Database*“ (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>).

1 Einleitung

1.1 Transportproteine in der Bäckerhefe

Alle lebenden Zellen sind von einer semipermeablen Lipid-Doppelschicht umgeben, und eukaryotische Zellen besitzen zusätzlich Membranen, die intrazelluläre Kompartimente voneinander abgrenzen. Durch diese Kompartimentierung werden unterschiedliche Reaktionsräume für die einzelnen Stoffwechselwege geschaffen, die eine komplexe Regulation der anabolen und katabolen Wege innerhalb der Zelle ermöglichen. Die Regulation des Flusses niedermolekularer Substanzen über die verschiedenen Membransysteme ist, zusammen mit der vesikulären Sortierung von Proteinen und Lipiden (Daum *et al.*, 1998; Harter und Reinhard, 2000), eine notwendige Form der Interaktion zwischen verschiedenen Zellkompartimenten bzw. zwischen der Zelle und dem sie umgebenden Medium. Sie wird durch eine Fülle verschiedener, in den Biomembranen eingelagerter Transportproteine bewirkt (Krämer, 1994).

Die 1996 abgeschlossene, vollständige Sequenzierung des Genoms der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996; Goffeau *et al.*, 1997a) eröffnete neue Wege, die in der Zelle vorliegenden Transporter in ihrer Gesamtheit zu erfassen (Nelissen *et al.*, 1997; Paulsen *et al.*, 1998; van Belle und André, 2001). Dabei lassen sich anhand der computergestützten Analyse von Sequenzähnlichkeiten die in diesem Organismus vorkommenden bekannten und mutmaßlichen Transportproteine in verschiedene Familien einteilen (Tabelle 1). Die mit Abstand größte dieser Familien stellt dabei mit mindestens 77 putativen Mitgliedern die *Major Facilitator Superfamily* dar, eine große Gruppe sekundärer Transporter, die für den Transport unterschiedlichster Substrate zuständig ist. Die Anzahl aller in *S. cerevisiae* vorkommenden Proteine, die als Untereinheiten von Transportsystemen fungieren liegt bei mindestens 256 (Paulsen *et al.*, 1998).

1.2 Die Vakuole in *Saccharomyces cerevisiae*

Transportproteine erfüllen in der Zelle ein breites Spektrum von Aufgaben. Besonders deutlich wird dies am Beispiel der Vakuole, die bei einer großen Anzahl von zellulären Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Dazu gehören unter anderem die cytosolische pH- und Ionenhomöostase (Bertl und Slayman, 1990; Miseta *et al.*, 1999), Entgiftungsprozesse (Li *et al.*, 1996) sowie die Speicherung von Metaboliten. Eine Reihe von Transportern der

Tabelle 1: Übersicht über die in *S. cerevisiae* vorkommenden Transporterfamilien. Die Zahlen in der rechten Tabellenspalte gibt die mutmaßliche Anzahl der Mitglieder der jeweiligen Familie an. Quelle: Paulsen *et al.*, 1998.

Transporterfamilie	Anzahl der Gene
Kanäle	
<i>Major intrinsic protein (MIP)</i>	4
<i>Voltage-sensitive iron channel</i>	2
<i>Chloride channel</i>	1
Carrier	
<i>Major facilitator superfamily (MFS)</i>	77
<i>Mitochondrial carrier family</i>	34
<i>Amino acid/polyamine/choline (APC)</i>	24
<i>Nucleobase:cation symporter</i>	9
<i>Amino acid/auxin permease (AAP)</i>	7
<i>Cation diffusion facilitator (CDF)</i>	5
Andere Familien	38
Primär aktive Transporter, Energiekopplung durch NTP-Hydrolyse	
<i>ABC-Transporter</i>	22
P-ATPase	16
F-ATPase	12
V-ATPase	13
Primär aktive Transporter, Energiekopplung durch Redoxreaktionen	
Protonen-transportierende Chinol:Cytochrom-c-Reduktase	10
Protonen-transportierende Cytochrom-Oxidase	12
Porine äußerer Organellmembranen	
Mitochondriale und plastidäre Porine	3
Transporter mit unbekanntem Mechanismus	11

vakuolären Membran wurde bereits identifiziert. So sind bisher zwei Proteine bekannt, die für die Anreicherung von Ca^{2+} -Ionen in der Vakuole verantwortlich sind und somit den Calciumhaushalt des Cytosols regulieren: Die P-Typ-ATPase Pmc1p (Cunningham *et al.*, 1994) und der Calcium/Protonen-Antiporter Vcx1p/Hum1p (Pozos *et al.*, 1995).

Weitere, bereits identifizierte Transportproteine der vakuolären Membran sind die ABC-Transporter Ycf1p, Bpt1p und Bat1p, welche sämtlich an Entgiftungsprozessen beteiligt sind. Ein wichtiger Weg zur Entgiftung lipophiler Toxine beinhaltet die Konjugation dieser Toxine mit Glutathion. Ycf1p und sein Paralog Bpt1p transportieren solche Glutathion-S-Konjugate

in die Vakuole (Li *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 2002). Bat1p vermittelt den vakuolären Transport der beim Abbau von Steroiden entstehenden Gallensäuren (Ortiz *et al.*, 1997).

Ebenfalls an Entgiftungsprozessen beteiligt scheinen die vakuolären Transporter Cot1p und Zrc1p zu sein. Beide Proteine gehören zur Familie der *Cation Diffusion Facilitator (CDF)* und transportieren Kationen von Übergangsmetallen wie Co^{2+} , Cd^{2+} oder Zn^{2+} , die in höheren Konzentrationen toxisch wirken, im Austausch gegen H^+ in die Vakuole (Conklin *et al.*, 1994). Der vakuoläre Zinktransporter Zrt3p hingegen transportiert Zn^{2+} -Ionen aus dem vakuolären Lumen in das Cytoplasma (MacDiarmid *et al.*, 2000). Dieses Mitglied der *ZIP-Familie (Zinc/Iron Permease)* ist für die Mobilisierung des vakuolären Zinkspeichers notwendig und wird nur bei Zink-Mangelbedingungen synthetisiert. Die Vakuole ist auch ein Speicherorganell für Eisen (Raguzzi *et al.*, 1988). Erst vor kurzem konnte Ccc1p als vakuolärer Eisen/Mangan-Transporter identifiziert werden (Li *et al.*, 2001).

Neben den oben beschriebenen genetisch identifizierten Transportern wurden mit Hilfe biochemischer Untersuchungen an isolierten Vakuolenvesikel oder ganzen isolierten Vakuolen eine Reihe weiterer Transportaktivitäten der Vakuolenmembran gefunden (Wada und Anraku, 1994). So besitzen Hefevakuolen mehrere aktive Transportsysteme für Aminosäuren. Im Detail wurden zehn Aminosäuren gefunden, die entgegen eines Konzentrationsgradienten in Vakuolenvesikel aufgenommen werden: Arginin, Lysin, Histidin, Tyrosin, Isoleucin, Glutamin, Tryptophan, Phenylalanin, Leucin und Asparagin (Sato *et al.*, 1984a). Die basischen Aminosäuren Arginin, Lysin und Histidin sind in der lebenden Hefezelle zum überwiegenden Teil in der Vakuole lokalisiert, wie mit Hilfe differenzieller Permeabilisierung von Hefezellen ermittelt werden konnte (Messenguy *et al.*, 1980; Kitamoto *et al.*, 1988, Hecker, 2002). Aufgrund transportkinetischer Erwägungen wurde auf die Existenz von sieben Importsystemen mit unterschiedlichen Substratspezifitäten in der Vakuolenmembran geschlossen (Sato *et al.*, 1984a). Die Existenz eines Arginin/Histidin-Antiporters wurde ebenfalls postuliert (Sato *et al.*, 1984b). Kürzlich konnten einige der für den vakuolären Aminosäuretransport verantwortlichen Transporter molekular identifiziert werden (Rusznak *et al.*, 2001, s. auch Abschnitt 1.5), zu Beginn dieser Arbeit (1999) war jedoch noch kein einziger vakuolärer Aminosäuretransporter bekannt.

Außer den oben erwähnten Aminosäuren werden noch weitere Metabolite aktiv in die Vakuole der Hefezelle sezerniert: Phosphationen werden nach ihrem Transport (Booth und Guidotti, 1997) zu Polyphosphat kondensiert, um so die osmotische Aktivität zu verringern. Es wird angenommen, dass positiv geladene Substanzen im vakuolären Lumen mit Polyphosphat assoziieren und so osmotisch inaktiviert werden, was am Beispiel von Arginin

gezeigt wurde (Dürr *et al.*, 1979). Der aktive Transport von S-Adenosylmethionin (Schwencke und De Robichon-Szulmajster, 1976), Polyaminen (Kakinuma *et al.*, 1992) und Purinribonukleosiden (Nagy, 1979) wurde ebenfalls nachgewiesen. Für sämtliche hier aufgezählte Metabolite konnte noch kein Aufnahmesystem molekular identifiziert werden; auf die vermeintlichen vakuolären Polyamintransporter wird in Abschnitt 1.6 näher eingegangen.

Bei der Betrachtung der einzelnen Transporterfamilien in *S. cerevisiae* zu Beginn dieser Arbeit 1999 fiel auf, dass insbesondere zwei dieser Familien hinsichtlich ihrer physiologischen Funktionen noch sehr wenig verstanden waren. Dies war zum einen die *Multi-Drug-Resistance-* (*MDR-*) Familie, bei der lediglich drei Mitglieder genauer charakterisiert waren (Kanazawa *et al.*, 1988, Ehrenhofer-Murray *et al.*, 1998, Alarco *et al.*, 1997), zum anderen die Familie der *AAAP* (*Amino Acid/Auxin Permeases*), die zu dieser Zeit in der Hefe noch kein einziges charakterisiertes Mitglied besaß. Vertreter dieser beiden Proteinfamilien wurden daher als mögliche Kandidaten für vakuoläre Metabolittransporter ausgewählt und bilden den Gegenstand der vorliegenden Arbeit; aus diesem Grund wird in den folgenden Abschnitten näher auf das Phänomen *Multi Drug Resistance* eingegangen sowie die beiden Transporterfamilien näher beschrieben.

1.3 *Multi Drug Resistance*

Multi Drug Resistance ist ein Phänomen, welches zunächst bei Tumorzellen von Säugern entdeckt wurde, da es dort einen häufigen Grund für die Resistenz von Tumoren gegenüber Chemotherapeutika darstellt (Bolhuis *et al.*, 1997). Der erste in höheren Eukaryoten entdeckte für ein solches Phänomen verantwortliche Transporter ist P-Glycoprotein, der in der Plasmamembran lokalisiert ist und ein breites Spektrum strukturell unterschiedlicher hydrophober Substanzen aus der Zelle transportiert (Borst und Elferink, 2002). P-Glycoprotein ist ein Mitglied der *ABC*-Familie und nutzt somit die Hydrolyse von ATP für den Export seiner Substrate. In einer Reihe von Tumoren und kultivierten Säugerzellen findet man eine Amplifikation des Gens für P-Glycoprotein. Die damit einhergehende Überexpression ermöglicht es den Zellen die Einwirkung einer aggressiven Chemotherapie zu überstehen (Borst *et al.*, 1993).

Multi Drug Resistance in der Bäckerhefe ist ebenfalls schon seit einiger Zeit bekannt (Leppert *et al.*, 1990). Der erste in *S. cerevisiae* entdeckte *ABC*-Transporter war der **a**-Faktor-Exporter Ste6p (Kuchler *et al.*, 1989). Obwohl Ste6p und P-Glycoprotein eine relativ hohe Sequenzähnlichkeit zeigen (McGrath und Varshavsky, 1989), führt eine Überexpression von

STE6 nicht zu erhöhter Toleranz gegenüber Toxinen. Mittlerweile werden eine ganze Reihe von *ABC*-Transportern in *S. cerevisiae* mit *Multi Drug Resistance* in Verbindung gebracht (Bauer *et al.*, 1999). Die drei am besten charakterisierten Vertreter stellen dabei die Proteine Pdr5p, Snq1p und Yor1p dar (Wolfger *et al.*, 2001). Alle drei Transporter sind in der Plasmamembran lokalisiert und transportieren ein breites Spektrum von amphiphilen Substraten aus der Zelle ohne dabei große Spezifität zu zeigen. Die Gene dieser drei Transporter stehen unter positiver Transkriptionskontrolle durch die Zinkfinger-Regulatoren Pdr1p und Pdr3p. *PDR1* wurde bereits 1973 als erstes *Multi-Drug-Resistance*-vermittelndes Gen in der Bäckerhefe entdeckt (Rank und Bech-Hansen, 1973); die Identifizierung von *PDR3* erfolgte 1994 (Delaveau *et al.*, 1994). Beide Regulatoren kontrollieren ein komplexes Netzwerk unterschiedlicher Gene sowohl positiv, als auch negativ (DeRisi *et al.*, 2000; Nawrocki *et al.*, 2001); Ziel dieser Regulation ist es anscheinend, die Zelle insgesamt insensitiver gegen die Einwirkung toxischer Substanzen zu machen.

1.4 Die *MDR*-Familie

Neben den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen *ABC*-Transportern existiert in *S. cerevisiae* noch eine relativ große Familie sekundärer Transporter, bei denen einzelne Mitglieder an *Multi Drug Resistance* beteiligt sind (Goffeau *et al.*, 1997b, Paulsen *et al.*, 1998; Sa-Correia und Tenreiro, 2002). Diese, als *MDR*-Familie bezeichnete Gruppe mutmaßlicher und charakterisierter Transporter ist Teil der *Major Facilitator Superfamily*, ihre Mitglieder besitzen 12 oder 14 mutmaßliche Transmembrandomänen. Für mehrere Mitglieder der *MDR*-Familie ist eine Pdr1p/Pdr3p-abhängige Regulation beschrieben.

Zu Beginn dieser Arbeit war noch relativ wenig über die Substrate dieser Proteine bekannt; beschrieben war lediglich Atr1p als Entgiftungssystem für Aminotriazole (Kanazawa *et al.*, 1988), Sge1p, das Resistenz gegen Kristallviolett und Ethidiumbromid vermittelt (Ehrenhofer-Murray *et al.*, 1998), sowie Flr1p (Alarco *et al.*, 1997; Brôco *et al.*, 1999), das für Fluconazol- Benomyl- und Methotrexat-Resistenz benötigt wird. Von dem vermutlichen Ionentransporter Hol1p waren eine Reihe dominanter Mutationen bekannt, die Hefezellen in die Lage versetzen, Histidinol (Gaber *et al.*, 1990), bzw. unspezifisch Kationen (Wright *et al.*, 1996) aus dem Medium aufzunehmen.

Tabelle 2: Übersicht über die derzeit veröffentlichten Daten zur *MDR*-Transporterfamilie in der Hefe *S. cerevisiae*. TMS: Transmembransegmente, PM: lokalisiert in der Plasmamembran, SGD: Information der Saccharomyces Genome Database (<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>) entnommen.

<i>ORF</i> -Name	der Literatur zu entnehmende Daten
<i>MDR</i> (14 TMS)	
YBR293w	induzierbar durch Acetat und Hitze (Gross und Watson, 1998)
YCL069w	
YDR119w	
YGR224w (<i>AZR1</i>)	PM, Resistenz gegen Azole (Tenreiro <i>et al.</i> , 2000), Nullmutanten sind hypersensibel gegen Polymyxin B (Rieger <i>et al.</i> , 1999).
YKR105c	
YML116w (<i>ATR1</i>)	PM, Aminotriazol-Resistenz (Kanazawa <i>et al.</i> , 1988)
YMR088c	
YMR279c	
YOR378w	
YPR198w (<i>SGE1</i>)	PM, Kristallviolett-, Methylmethansulfonat- und Ethidiumbromid-Resistenz (Jaquot <i>et al.</i> , 1997; Ehrenhofer-Murray <i>et al.</i> , 1998)
<i>MDR</i> (12 TMS)	
YBR008c (<i>FLR1</i>)	Fluconazol-Resistenz (Alarco <i>et al.</i> , 1997; Brôco <i>et al.</i> , 1999)
YBR043c	
YBR180w	
YCR023c	Mutante eventuell resistent gegen Allylglycin (Bianchi <i>et al.</i> , 1999)
YGR138c (<i>TPO2</i>)	Vermutlicher Polyamintransporter (Tomitori <i>et al.</i> , 2001)
YHR048w	
YIL120w (<i>QDR1</i>)	Chinidin-Resistenz (SGD), Expression durch Olein induzierbar (Karpichev und Small, 1998)
YIL121w	Expression bei Sporulation induziert (Chu <i>et al.</i> , 1998)
YJR124c	
YLL028w (<i>TPO1</i>)	Polyamin-Transporter (Tomitori <i>et al.</i> , 1999),
YNL065w	
YNR055c (<i>HOL1</i>)	PM, dominante Mutanten nehmen Histidinol auf (Gaber <i>et al.</i> , 1990)
YOR273c (<i>TPO4</i>)	Erhöhte Chinidin-Toleranz bei Überexpression (Delling <i>et al.</i> , 1998), vermutlicher Polyamintransporter (Tomitori <i>et al.</i> , 2001)
YPR156c (<i>TPO3</i>)	Vermutlicher Polyamintransporter (Tomitori <i>et al.</i> , 2001)

Inzwischen konnten weitere Substrate für einzelne Mitglieder dieser Familie beschrieben werden. Eine Liste sämtlicher Mitglieder der *MDR*-Familie zusammen mit den postulierten Funktionen ist in Tabelle 2 gegeben.

1.5 Die *AAAP*- (*AVT*-) Familie

Die *Amino-Acid/Auxin-Permease*- (*AAAP*-) Familie ist eine auf Eukaryoten beschränkte, höchst divergente Transporterfamilie (Young *et al.*, 1999) mit 11 putativen Transmembrandomänen. In höheren Pflanzen sind unter anderem Mitglieder dieser Transporterfamilie für die Aufnahme von Aminosäuren in Geweben, die von externen Aminosäuren abhängen (z. B. Samen) verantwortlich (Fischer *et al.*, 1995). Auxine, wie z. B. Indoleessigsäure, werden aus Geweben des Sprossapikalmeristems spezifisch exportiert und in einer Reihe von Zielgeweben innerhalb der Pflanze aufgenommen (Bennett *et al.*, 1996). Auch diese Aufnahmeaktivität wird mit Mitgliedern der *AAAP*-Familie in Verbindung gebracht. Neben dieser Funktion in höheren Pflanzen wurden Mitglieder dieser Familie als vesikuläre GABA- und Glycin-Transporter in *Caenorhabditis elegans* (McIntire *et al.*, 1997) und *Rattus norvegicus* (Chaudhry *et al.*, 1998) identifiziert, eine Beteiligung am Export neutraler Aminosäuren aus Lysosomen in Nervenzellen von *R. norvegicus* wurde ebenfalls nachgewiesen (Sagné *et al.*, 2001). Interessanterweise finden sich auch Na⁺-gekoppelte Aminosäuretransporter aus dieser Familie in der Plasmamembran von Zellen höherer Säugetiere (System-N-Transporter, vgl. Chaudhry *et al.*, 1999; Gu *et al.*, 2000); außerdem hat man mehrere Protonen-gekoppelte Aminosäuretransporter aus der *AAAP*-Familie in der Plasmamembran identifiziert, die aufgrund ihrer Eigenschaft α -Methylaminobuttersäure zu transportieren, als System-A-Transporter bezeichnet werden (Reimer *et al.*, 2000; Varoqui *et al.*, 2000).

In *S. cerevisiae* umfasst die *AAAP*-Familie sieben Mitglieder (Paulsen *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1999), die noch wenig erforscht sind. Russnak *et al.* postulierten 2001 die vakuoläre Lokalisierung aller *AAAP*-Proteine der Bäckerhefe; ein Mitglied dieser Familie (Avt1p) wurde als vakuoläres Glutamin-/Tyrosin-/Isoleucin-Importprotein identifiziert. Weitere Mitglieder dieser Familie (Avt3p, Avt4p, Avt6p) wurden als Aminosäureexporter der Vakuole klassifiziert. Aufgrund dieser Ergebnisse haben Russnak und Mitarbeiter für die sieben *AAAP*-Proteine der Hefe den Namen *AVT*- (*Amino-Acid-Vacuolar-Transport*-) Familie vorgeschlagen.

1.6 Polyamintransport in der Bäckerhefe

Polyamine sind ubiquitär vorkommende aliphatische Amine, die durch Übertragung von Aminopropylgruppen auf das Diamin Putrescin (1,4-Diaminobutan) entstehen (Tabor und Tabor, 1984). Die Bildung von Putrescin ist die Schlüsselreaktion bei der Polyaminbiosynthese; sie ist abhängig von der Aktivität der Ornithin-Decarboxylase (Spe1p). Im weiteren Verlauf des Syntheseweges wird zunächst S-Adenosylmethionin (SAM) decarboxyliert, eine Reaktion, die durch die SAM-Decarboxylase (Spe2p) katalysiert wird. Das entstehende decarboxylierte SAM fungiert als Aminopropylgruppen-Donor in den folgenden Synthesereaktionen: Die Übertragung einer Aminopropylgruppe auf Putrescin führt zu Spermidin, der Transfer einer weiteren Aminopropylgruppe auf Spermidin führt zur Bildung von Spermin. Die beiden Reaktionen werden durch die Spermidin-Synthase (Spe3p) bzw. Spermin-Synthase (Spe4p/Spe40p) katalysiert. (White Tabor *et al.*, 1982).

Eine wesentliche biologische Funktion der Polyamine besteht in ihrer Assoziation mit anscheinend allen negativ geladenen Bestandteilen innerhalb der Zelle (Igarashi und Kashiwagi, 2000). Insbesondere sind Polyamine essenzielle Bestandteile biologisch funktioneller RNA-Moleküle. Die positiven Ladungen dieser Substanzen schirmen dabei die negativen Ladungen der Phosphatgruppen der RNA gegeneinander ab, wodurch deren Sekundär- und Tertiärstruktur moduliert wird. Nachgewiesen wurden Polyamine insbesondere als Bestandteile von Ribosomen und tRNA sowie in den Zellkernen der Eukaryoten bzw. den Nucleoiden von Prokaryoten. Inzwischen konnten bei einigen RNA-Molekülen Bindestellen für Polyamine identifiziert werden (Igarashi und Kashiwagi, 2000). Eine Funktion der Polyamine bei der Aktivitätsregulation verschiedener Ionenkanäle wird ebenfalls diskutiert (Williams, 1997).

Das Vorhandensein von Spermin und Spermidin ist für das Zellwachstum von *S. cerevisiae* essenziell. Hefemutanten, in denen die Polyaminbiosynthese durch entsprechende Mutationen ausgeschaltet wurde, sind, wenn nach einigen Zellzyklen die intrazelluläre Polyaminkonzentration durch Verdünnung unter einen kritischen Wert gefallen ist, nicht mehr in der Lage, auf Polyamin-freien Medien zu wachsen (Tabor und Tabor, 1984).

Für den Transport von Polyaminen sind in der Bäckerhefe eine Reihe von Systemen vorhanden: In der Plasmamembran existieren mehrere sättigbare und spezifische Aufnahmesysteme für Spermidin und Spermin (Maruyama *et al.*, 1994), die jedoch noch nicht molekular identifiziert werden konnten. Die Aktivität dieser Transportsysteme wird durch eine Reihe von Ser/Thr-spezifischen Proteinkinasen positiv reguliert (Ptk1p, Ptk2p, Npr1p, Sky1p; vgl. Kakinuma *et al.*, 1995; Nozaki *et al.*, 1996; Kaouass *et al.*, 1997; Kaouass *et al.*,

1998, Erez und Kahana, 2001). Schon seit einiger Zeit ist bekannt, dass Polyamine, insbesondere Spermidin, in der Vakuole akkumuliert werden: Isolierte vakuoläre Vesikel aus *S. cerevisiae* sind in der Lage, Polyamine aktiv zu importieren (Kakinuma *et al.*, 1992). Dieser Transport findet als Antiport mit Protonen statt und ist hoch affin für Spermin ($K_m = 0,2 \text{ mM}$) und Spermidin ($K_m = 0,7 \text{ mM}$); für Putrescin ist die Affinität geringer ($K_m = 2 \text{ mM}$). Über die Entdeckung von insgesamt vier Genen für vakuoläre Polyamintransporter (*TPO1* bis *4*) wurde 1999 und 2001 berichtet (Tomitori *et al.*, 1999; Tomitori *et al.*, 2001). In diesen Arbeiten wurde bei Überexpression dieser vier Gene eine erhöhte Toleranz der entsprechenden Hefestämme gegenüber toxischen Polyaminkonzentrationen im Wachstumsmedium festgestellt. Außerdem zeigten diese Überexpressionsstämme eine erhöhte Polyaminaufnahmerate in die Zelle. Da ebenfalls eine erhöhte vakuoläre Aufnahme beobachtet wurde, wurde geschlossen, es müsse sich um vakuoläre Transporter handeln. Direkte Lokalisierungsstudien wurden für keinen der beschriebenen Transporter publiziert. Alle vier Gene kodieren für Mitglieder der *MDR*-Familie.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Primäres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung von Metabolitransportern in der Vakuolenmembran der Bäckerhefe. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf den Aminosäuretransportern. Dabei wurden als potenzielle Kandidaten Mitglieder der in den Abschnitten 1.4 und 1.5 beschriebenen *MDR*- sowie *AAAP*-Familie ausgewählt. Die Isolierung von Hefestämmen mit Mutationen in den entsprechenden Genen wurde innerhalb einer europäischen Kooperation aufgeteilt. Mitglieder dieser Kooperation waren Mitarbeiter von Bruno André (Brüssel), Wolf Frommer (Tübingen), Isabel Calderon (Sevilla) und Reinhard Krämer (Köln). Für jedes Gen wurden im Wildtyphintergrund 23344c Deletionsmutanten, sowie Mutanten, bei denen die entsprechende Gensequenz durch eine Epitop-kodierende Sequenz verlängert wurde, isoliert. Anhand der systematischen Bestimmung der Lokalisierung sämtlicher Mitglieder dieser zwei Proteinfamilien sollten mögliche Kandidaten für vakuoläre Transporter ausgewählt werden; die Untersuchung der Promotoraktivität sollte hierbei zusätzliche Hinweise auf die Funktion der putativen Transportproteine liefern.

2 Material und Methoden

2.1 Hefestämme, Nährmedien und Chemikalien

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Hefestämme wurden ausgehend vom Wildtypstamm 23344c (MATa *ura3*) isoliert. Der Stamm ist eine Variante von Σ 1278b (Béchet *et al.*, 1970) und trägt die “*per1*”-Mutation nicht, die die meisten anderen allgemein verwendeten Laborstämme insensitiver gegen Ammoniumrepression macht (Roberg *et al.*, 1997; ter Schure *et al.*, 1999). Eine weitere Besonderheit dieses Stammes ist der Besitz zweier intakter Gene, die für Aquaporine kodieren: *AQP1* und *AQP2*. In vielen Laborstämmen sind beide Gene, in manchen nur das Gen *AQP2* defekt. *AQP1* kodiert für ein Aquaporin in der Plasmamembran, dem Genprodukt von *AQP2* konnte bisher noch keine Funktion zugewiesen werden (Laizé *et al.*, 2000).

2.1.1 Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Für die Hefekulturen wurden folgende Flüssigmedien verwendet:

YPD:	10 g/l	Hefeextrakt (Difco Laboratories, Detroit, USA)
	20 g/l	Pepton (Difco Laboratories, Detroit, USA)
	20 g/l	Glucose
SC:	6,7 g/l	Yeast Nitrogen Base (Difco Laboratories, Detroit, USA)
	20 mg/l	Uracil
	20 g/l	Glucose

Für die meisten Experimente wurde modifiziertes CBS-Medium nach Verduyn *et al.* (1992) verwendet. Dieses Medium wurde mit 1 % (*m/V*) Natriumsuccinat auf pH 5,8 gepuffert und mit 20 mg/l Uracil supplementiert. Die genaue Zusammensetzung ist im Anhang beschrieben.

Für Glycerinstammkulturen wurden die Zellen auf YPD-Medium angezogen und in 15 % (*m/V*) Glycerin bei -80°C gelagert. Bei Bedarf wurden Zellen auf YPD-Medium (Sherman *et al.*, 1986) mit 2 % Bacto-Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA) ausgestrichen und für 48 h bei 30°C inkubiert.

Vorkulturen wurden frisch von YPD-Festmedium angeimpft und bis zu einer Zelldichte von mindestens $\text{OD}_{600} = 6$ bei 30°C in Erlenmeyerkolben mit 4 Schikanen bei 130 Upm

geschüttelt. Ein Aliquot dieser Vorkulturen wurde in frischem Medium über Nacht unter den gleichen Bedingungen bis zur gewünschten Zelldichte inkubiert.

2.1.2 Chemikalien

Alle Chemikalien, wenn nicht anders vermerkt, entsprachen dem Reinheitsgrad “zur Analyse” und wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck AG (Darmstadt) und Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe) bezogen. Die verwendeten Lösungsmittel entsprachen dem Reinheitsgrad “für die HPLC” und wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Baker (Deventer, Niederlande) und Carl Roth GmbH&Co (Karlsruhe) bezogen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Bakterienstämme

In der Arbeit wurde der *Escherichia-coli*-Stamm DH5 α (Grant *et al.*, 1990) verwendet. Er hat den folgenden Genotyp: endA1 supE44 thi-1 λ recA1 gyrA96 relA1 Δ (lacIZYA-argF)U169 deoR (Φ 80dlac Δ (lacZ)M15) mcrA Δ (mrr hsdRMS mcrBC).

2.2.2 Nährmedien für Bakterien

Für die Anzucht der *E.-coli*-Zellen wurde LB-Medium verwendet:

10 g/l Trypton (Difco Laboratories, Detroit, USA)

5 g/l Hefe-Extrakt (Difco Laboratories, Detroit, USA)

10 g/l NaCl

Für die Selektion auf Anwesenheit des Vektors pDR199 wurde das Medium mit 50 mg/l Carbenicillin versetzt; Festmedium enthielt zusätzlich 2 % Bacto-Agar (Difco Laboratories, Detroit, USA).

2.2.3 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

5 ml LB-Flüssigmedium wurde mit einer Kolonie von DH5 α -Zellen beimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde in 250 ml SOB-Flüssigmedium überführt und so lange bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert, bis die OD₆₀₀ ungefähr 0,6 betrug. Die Kultur wurde für 10 min auf Eis inkubiert und die Zellen durch 10 min Zentrifugation (1500*g, 4°C) sedimentiert. Die sedimentierten Zellen wurden anschließend in 80 ml TB resuspendiert, erneut für 10 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (s.o.). Das

Zellpellet wurde anschließend in 20 ml TB-Puffer (0 °C) auf Eis resuspendiert und die erhaltene Zellsuspension langsam unter Schütteln mit 1,4 ml DMSO versetzt. Nach erneuter zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen in Aliquots von je 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

SOB-Medium:	20 g/l	Trypton (Difco Laboratories, Detroit, USA)
	5 g/l	Hefe-Extrakt (Difco Laboratories, Detroit, USA)
	0,6 g/l	NaCl
	0,2 g/l	KCl
	2,48 g/l	MgSO ₄ ·7 H ₂ O

Das Medium wurde autoklaviert und anschließend mit 10 ml durch Filtration sterilisierter 1 M MgCl₂-Lösung versetzt.

TB-Puffer:	10 mM	PIPES, pH 6,7
	15 mM	CaCl ₂
	250 mM	KCl
	55 mM	MnCl ₂

2.2.4 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Ein Aliquot von 200 µl kompetenter *E. coli*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut. Es wurde anschließend 1 µl Plasmid-DNA-Lösung oder 10 µl eines Ligationsansatzes hinzugegeben und die Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Nach 30 s Hitzeschock bei 42 °C wurden die Bakterien mit 800 µl SOC-Medium versetzt und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann auf LB-Medium (2 % Bacto-Agar) mit Carbenicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

SOC-Medium: Die Zusammensetzung des SOC-Mediums entsprach der des SOB-Mediums, es wurde lediglich 3,6 g/l Glucose hinzugefügt.

2.2.5 Präparation genomischer Hefe-DNA

Eine einzelne Kolonie des Hefestammes wurde in 10 ml YPD-Flüssigmedium angeimpft und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die Zellsuspension wurde 5 min zentrifugiert (1500*g, 10 °C), und das Sediment in 0,5 ml sterilem dest. Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurde das Zellpellet in 200 µl Lysispuffer (TSSTE) resuspendiert und

auf 300 µl Glasperlen (425 bis 600 µm, säuregewaschen, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) gegeben. Nach Zugabe von 200 µl Phenol wurde die Hefe durch dreiminütiges Schütteln aufgeschlossen, mit 200 µl TE-Puffer versetzt und 5 min zentrifugiert (17000*g, RT). Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 500 µl Chloroform gewaschen und die darin befindliche DNA anschließend durch Zugabe von 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (17000*g, RT, 2 min) wurde das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und in der Evaporatorzentrifuge getrocknet, bevor es in 400 µl TE-Puffer aufgenommen wurde. Um RNA zu beseitigen, wurden 8 µl RNase-Lösung (1 µg/µl, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) hinzugegeben und der Ansatz für 10 min bei 37 °C inkubiert. Es schloss sich eine weitere Ethanolfällung an. Die DNA wurde am Ende in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und bei –20 °C gelagert.

Lysispuffer (TSSTE):	2 % (V/V)	Triton X-100
	1 %	SDS
	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA
TE-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA

2.2.6 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.6.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Synthese der zu klonierenden DNA-Fragmente wurde die Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt (Mullis *et al.*, 1986). Ein zu diesem Zweck eingesetzter Reaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

84 µl	dest. Wasser
10 µl	10x Reaktionspuffer (Gibco-BRL, Eggenstein)
2 µl	dNTP-Mischung (jeweils 10 mM)
1 µl	Oligonucleotid-Primer #1 (100 pmol/µl)
1 µl	Oligonucleotid-Primer #2 (100 pmol/µl)
1 µl	genomische Hefe-DNA
1 µl	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl, Gibco-BRL, Eggenstein)
100 µl	

Reaktionszyklen:

1. 30 s, 95 °C
2. 30 s, 55 °C
3. 2 min, 72 °C

Die Schritte 1. bis 3. durchliefen 25 Zyklen. Um die Ausbeute der PCR-Reaktion zu überprüfen, wurden 10 µl des Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen. Das Produkt der PCR-Reaktion wurde anschließend mit 150 mM Natriumacetat und 70 % Ethanol gefällt und nach Waschen mit 70 % (V/V) Ethanol in 10 µl Reinstwasser gelöst.

2.2.6.2 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmiden erfolgte aus 3 ml eine LB-Übernachtskultur nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Hierfür wurde das GFXTM Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Freiburg) nach der Anleitung des Herstellers angewendet. Es wurde nach Lyse der Zellen und Abtrennung der denaturierten, nicht-löslichen Zellbestandteile der Überstand mit Hilfe einer Ionenaustauscher-Säule mit einer Glasfasermatrix aufgearbeitet. Die präparierte Plasmid-DNA wurde in 100 µl TE-Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert..

TE-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA

2.2.6.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten zur Restriktion oder Ligation wurden diese zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dies erfolgte in Gelen aus 1 % (m/V) Agarose, die in TAE-Puffer gelöst wurde. Mit Hilfe des QIAquickTM Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) wurden die DNA-Fragmente aus dem Gel isoliert, wobei die Durchführung nach dem Protokoll des Herstellers erfolgte.

TAE-Puffer: 40 mM Tris-Acetat, pH 8,2
1 mM EDTA

2.2.6.4 Restriktion und Ligation von DNA

Die Standard-Techniken wurden nach der Methode von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Die Restriktion von PCR-Fragmenten oder Vektor-DNA wurden nach den Angaben des Herstellers der Restriktionsenzyme (New England Biolabs, Frankfurt) durchgeführt. Ligationen wurden mit dem Ready-To-Go™ T4-DNA-Ligase-Lyophilisat (Amersham Pharmacia, Freiburg) durchgeführt.

2.2.6.5 Sequenzierung von DNA und Sequenzanalyse

Die Sequenzierreaktion wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) mit Modifikationen nach Zimmermann *et al.* (1990) durchgeführt. Bei der beschriebenen Methode wurden die Sequenzierprodukte über die ddNTPs mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Reaktion wurde mit Hilfe des ABT PRISM™ Big Dye Reaction Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach dem Protokoll des Herstellers ausgeführt. Die Sequenzierungsprodukte wurden kapillarelektrophoretisch mit Hilfe der automatischen Sequenzierapparatur ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Weiterstadt) getrennt und detektiert.

2.2.7 Konstruktion von Plasmiden

Die Plasmidkonstrukte pDR199 *TPO1* und pDR199 *TPO1-3xHA* wurden ausgehend vom Hefeexpressionsvektor pDR199 erstellt. Dieser Vektor ist ein Derivat von pDR195 (Rentsch *et al.*, 1995), der wiederum von YEplac 195 (Gietz und Sugino, 1988) abgeleitet wurde. Das Plasmid enthält eine Kopie des *PMA1*-Promotors und der Terminatorregion des *ADHI*-Gens.

1. pDR199 *TPO1*

Mit den Oligonukleotiden TPO1/1 und TPO1/2 wurde mittels PCR ein 1783-bp-Fragment erzeugt, welches die gesamte kodierende Sequenz von *TPO1* enthielt. Als Matrize diente dabei genomische Hefe-DNA vom Wildtyp-Stamm (23344c). Das PCR-Fragment wurde mit den Enzymen *XmaI* und *XhoI* in den Vektor pDR199 kloniert.

2. pDR199 *TPO1-3xHA*

Mit den Oligonukleotiden TPO1/1 und TPO1/3 wurde mittels PCR ein 1896-bp-Fragment erzeugt, welches die gesamte kodierende DNA-Sequenz des 3xHA-markierten *Tpo1p*

enthielt. Als Matrize diente bei dieser Reaktion genomische DNA vom Stamm RK 25.

Das PCR-Produkt wurde mit den Enzymen *XmaI* und *XhoI* in pDR199 kloniert.

Plasmidkarten beider im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Konstrukte sind im Anhang dargestellt (6.3).

2.2.8 Hefetransformation

Zur Einschleusung von Fremd-DNA in *S.-cerevisiae*-Zellen wurde die Lithiumacetat-Methode nach Gietz *et al.* (1995) angewendet. Eine Vorkultur des gewünschten Stammes wurde in 10 ml YPD-Flüssigmedium, supplementiert mit 100 mg/l Adenin-Sulfat, umgeimpft und über Nacht bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1500*g, 4 °C, 10 min), in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert, in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und erneut zentrifugiert (17000*g, RT, 5 s). Nach einem weiteren Waschen der Zellen in 1 ml sterilem Wasser wurden die Zellen in 1 ml TL1-Puffer überführt und erneut zentrifugiert. Sie wurden dann in 50 µl TL1 aufgenommen. Für die eigentliche Transformation wurde 5 µl Carrier-DNA, danach die Fremd-DNA und danach 300 µl TL2 hinzugegeben und für 30 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C (15 min) wurden die Zellen noch einmal mit 1 ml Wasser gewaschen. Danach wurden die Zellen entweder sofort auf SD Ura⁻-Medium (2 % Agar) ausplattiert (im Fall der Transformation der pDR199-Konstrukte) oder zunächst in 1 ml YPD-Flüssigmedium (supplementiert mit 100 mg/l Adenin-Sulfat) resuspendiert, für 4 h bei 29 °C unter Schütteln inkubiert und anschließend auf YPD-Medium (2 % Agar) mit 200 mg/l Geneticin[®] (Gibco-BRL, Eggenstein) ausplattiert.

TL1: 10 mM	Tris-HCl, pH 8,0	TL2: 10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
1 mM	EDTA	1 mM	EDTA
100 mM	LiOAc	100 mM	LiOAc
		40 % (m/V)	PEG 4000

Die Lösungen wurden für jeden Versuch frisch hergestellt.

Carrier-DNA: 10 mg/ml DNA aus Lachssperma in dest. Wasser. Die Lösung wurde vor jeder Transformation für 10 min bei 100 °C denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt.

SD Ura ⁻ :	6,7 g/l	Yeast Nitrogen Base (Difco Laboratories, Detroit, USA)
	20 g/l	Glucose

2.2.9 Genomische Modifizierung von Hefestämmen

Für die in diesem Abschnitt erwähnten Oligonukleotide wird folgendes Abkürzungsschema verwendet: Die für die Modifizierung eines bestimmten ORFs verwendeten Oligonukleotide tragen als einheitliche Nomenklatur die drei Buchstaben der systematischen Benennung der offenen Leseraster von *S. cerevisiae*, gefolgt von den Zahlen 1 bis 5. Sie werden im Folgenden als Yxx1 bis Yxx5 bezeichnet, wobei die Abkürzung “xx” für die letzten beiden, den jeweiligen ORF charakterisierenden Buchstaben steht. Eine Liste sämtlicher in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide ist im Anhang aufgeführt (6.2).

2.2.9.1 Herstellung der PCR-Fragmente für die genomischen Modifizierungen

Für die Erstellung der *lacZ*-Deletionsstämme wurde der Vektor pUG6lacZ (Boles *et al.*, 1998) als Matrize, sowie die Oligonucleotide Yxx1 und Yxx2 verwendet. Erwartet wurde hierbei jeweils ein Produkt von 4,6 kb. Die Amplifikation erfolgte unter folgenden PCR-Bedingungen:

1. 10 min 98°C
2. Pause bei 95°C, Zugabe von je 1 U *Taq*-Polymerase (Promega)
3. 30 sec 95°C
4. 30 sec 55°C
5. 3 min 72°C
6. 3 min 72°C

Die Schritte 3. bis 5. durchliefen 40 Zyklen. Um die Ausbeute der PCR-Reaktion zu überprüfen wurden jeweils 5 µl auf ein Agarosegel aufgetragen.

Die Synthese der PCR-Fragmente für die Erstellung der HA-Markierungen erfolgte mit dem Template pUG6-HA (Buziol *et al.*, 2002) und mit den Oligonukleotiden Yxx3 und Yxx2. Es wurde hier ein Produkt von 1,7 kb erwartet. Folgende Reaktionsbedingungen wurden angewendet:

1. 10 min 98°C
2. Pause bei 95°C, Zugabe von je 1 U *Taq*-Polymerase (Promega)
3. 30 sec 95°C
4. 30 sec 55°C
5. 2 min 72°C
6. 2 min 72°C

Die Schritte 3. bis 5. durchliefen 40 Zyklen. Ach hier wurde die Ausbeute der Reaktion auf einem Agarosegel überprüft.

2.2.9.2 Transformation der PCR-Fragmente

Die PCR-Reaktionsansätze wurden mit 150 mM Natriumacetat und 70 % Ethanol gefällt und nach Waschen in 70 % (V/V) Ethanol in 10 µl Reinstwasser gelöst. Die Transformation der PCR-Produkte erfolgte wie unter 2.2.6 beschrieben.

2.2.9.3 Kontrolle der korrekten Rekombination mittels PCR

Um das Zustandekommen der korrekten Rekombination zu überprüfen, wurden jeweils folgende Kontroll-PCR-Reaktionen durchgeführt:

1. Yxx4 und kanRE, erwartet: 3,4 kb bei den *lacZ*-Deletionen, 2,1 kb bei den HA-Stämmen
2. Yxx5 und kanFW, erwartet: 0,4 kb bei den *lacZ*-Deletionen und bei den HA-Stämmen

Ein PCR-Ansatz hatte die folgende Zusammensetzung:

38,5 µl dest. Wasser
5 µl 10x Reaktionspuffer
5 µl MgSO₄ (100 mM)
1 µl dNTP-Mischung (jeweils 10 mM)
0,25 µl Oligonucleotid-Primer #1 (100 pmol/µl)
0,25 µl Oligonucleotid-Primer #2 (100 pmol/µl)
50 µl

Zu diesem Reaktionsansatz wurde mit einem sterilen Zahnstocher ein Teil der zu analysierenden Hefekolonie gegeben. Um die Zellen aufzubrechen wurde der Ansatz zunächst für 15 min bei 98°C erhitzt. Erst anschließend wurde, nach Abkühlen auf 95 °C, 1 U *Taq*-DNA-Polymerase (Promega, Mannheim) hinzugefügt.

Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt:

1. 30 sec 95°C
2. 30 sec 55°C
3. 3 min 72°C

Die Schritte 1. bis 3. durchliefen 30 Zyklen. Die Analyse des amplifizierten DNA-Abschnittes erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese.

2.3 Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM)

Die Zelltrockenmasse wurde gravimetrisch bestimmt. Ein Aliquot einer Flüssigkultur wurde über gewogene Glasfaserfilter Typ F (Porengröße: 0,45 µm, Millipore, Eschborn) filtriert, mit etwa 10 ml destilliertem Wasser gewaschen und über Nacht bei 70 °C getrocknet. Nach erneutem Wiegen der Filter konnte die Biotrockenmasse berechnet werden.

2.4 β-Galaktosidase-Assays

Die Messung der β-Galaktosidase-Aktivität in den *lacZ*-Deletionen erfolgte nach Sambrook *et al.* (1989):

10 ml YPD wurden mit 200 µl einer Vorkultur des zu untersuchenden Hefestammes inokuliert. Die Kulturen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 1 bei 30°C herangezogen und anschließend durch 10 min Zentrifugation (1500*g, 4°C) geerntet. Nach Resuspension in 1,5 ml Z-Puffer wurde die OD₆₀₀ der erhaltenen Zellsuspension bestimmt. Für eine Aktivitätsmessung wurden 900 µl Z-Puffer mit 100 µl Zellsuspension vermischt. Mit einer Pasteurpipette wurden 1 Tropfen 0,1 %ige SDS-Lösung und 2 Tropfen Chloroform hinzugegeben und die Mischung anschließend für 15 min bei 30°C unter Schütteln äquilibriert. Es erfolgte dann die Zugabe von 200 µl ONPG-Lösung und eine anschließende Inkubation bei 30°C unter Schütteln. Die Inkubationszeit wurde genau bestimmt und betrug in den meisten Fällen 1 ½ bis 2 h. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 300 µl 1 M Na₂CO₃ abgestoppt, die Hefezellen durch 5 min Zentrifugation (17000*g, RT) abgetrennt und die Extinktion des Überstandes bei 420 nm bestimmt. Die Berechnung der β-Galaktosidase-Aktivität erfolgte nach folgender Formel:

$$A = \frac{1000 * OD_{420}}{t * 0,1 * OD_{600}}$$

mit	t	= Reaktionszeit in min
	OD ₄₂₀	= Extinktion des Reaktionsgemisches bei 420 nm (Nitrophenol-Signal)
	OD ₆₀₀	= Optische Dichte der eingesetzten Zellsuspension bei 600 nm
	A	= β -Galaktosidaseaktivität in U

Z-Puffer:	60 mM	Na ₂ HPO ₄
	40 mM	NaH ₂ PO ₄
	10 mM	KCl
	1 mM	MgSO ₄
	50 mM	β -Mercaptoethanol

Die Lösung wurde mit verdünnter Phosphorsäure auf pH 7,0 eingestellt.

ONPG-Lösung: 4 mg/ml ONPG in 0,1 M Kaliumphosphat (pH 7,0), steril filtriert.

2.5 Expressionsanalyse unter Stickstoffmangel

Für die Erzeugung von Stickstoffmangelbedingungen, wurden 10 ml einer Kultur des zu untersuchenden Hefestammes in logarithmischer Phase (ca. OD₆₀₀=1) zentrifugiert (17000*g, 4°C, 10 min) und die erhaltenen Zellen zweimal mit je 10 ml sterilem dest. Wasser gewaschen. Sie wurden dann in 10 ml SLA-Medium resuspendiert und für vier Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der β -Galaktosidase-Aktivität.

2.6 Proteinpräparation der Membranfraktion

Die Reinigung der Membranfraktion zum Nachweis HA-markierter Proteine erfolgte nach einem von Eckhard Boles (Düsseldorf) erhaltenen Protokoll:

Eine Vorkultur des zu untersuchenden Hefestammes wurde in 10 ml YPD auf OD₆₀₀=0,5 verdünnt und bei 30°C für etwa 4 h unter Schütteln inkubiert. Bei OD₆₀₀=3 wurden die Zellen abzentrifugiert (1500*g, 10 min) und in 3 ml Wasser aufgenommen. Die Suspension wurde auf zwei 1,5-ml-Reaktionsgefäße verteilt und für 8 min bei 17000*g zentrifugiert. Die Hefesedimente konnten zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren werden. Für die Proteinpräparation wurden ca. 250 μ l Glasperlen (\varnothing = 500 μ m) sowie 200 μ l Tris-Puffer (4°C) pro Reaktionsgefäß hinzugegeben und für 10 min in der Schwingmühle bei 4°C geschüttelt. Nach der Zugabe von weiteren 200 μ l Tris-Puffer (4°C) wurden die Aufschlüsse in ein neues Gefäß überführt; die Glasperlen wurden anschließend mit weiteren 200 μ l Tris-

Puffer (4°C) gewaschen und die Überstände vereinigt. Die Aufschlüsse wurden für 3 min zentrifugiert (800*g, 4°C), die Überstände in ein neues Gefäß überführt und erneut zentrifugiert (s.o.). Die so von Zelltrümmern befreiten Extrakte wurden dann für 45 min bei 17000*g (4 °C) zentrifugiert. Das erhaltene Membranpellet wurde in 400 µl Tris-Puffer mit 5 M Harnstoff (4 °C) aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurden die Sedimente in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

Tris-Puffer: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM NaCl
5 mM EDTA

Protease-Inhibitoren: Pepstatin und PMSF, jeweils 1 µg/ml.

2.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen durch Western Blot

Die zu untersuchenden Membranpräparationen wurden mittels denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem 12 %igem Gel getrennt und mittels Elektrotransfer auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (Kyhse-Andersen, 1984). Dieser Transfer erfolgte in einem Semiphor-Blottinggerät (Hoeffer Pharmacia Biotech, Freiburg). Für die Detektion der Proteine wurden die folgenden Bedingungen angewendet:

- Detektion des 3xHA-Epitops

Blocken: 5 % Magermilchpulver in TBST, 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

1. Antikörper: Anti-HA High Affinity (Roche, Mannheim), 100 ng/ml in TBST (1% BSA)
2. Antikörper: Anti-Ratte-IgG konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (Pierce, Rockford, USA), verdünnt 1:2500 in TBST (1% BSA)

- Detektion von Vph1p

Blocken: 5 % Magermilchpulver in TBST, 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

1. Antikörper: Anti-Vph1p, monoklonaler Antikörper aus der Maus als Hybridom-Kulturüberstand (erhalten von Patricia Kane, Syracuse, USA), verdünnt 1:50 in TBST (1% BSA)
2. Antikörper: Anti-Maus-IgG konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (Pierce, Rockford, USA), verdünnt 1:2500 in TBST (1% BSA)

- Detektion von Pma1p

Blocken: 5 % Magermilchpulver in TBST, 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

1. Antikörper: Anti-Pma1p, polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen (erhalten von Bruno André, Brüssel, Belgien), verdünnt 1:5000 in TBST (1% BSA)
2. Antikörper: Anti-Kaninchen-IgG konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (Roche, Mannheim), verdünnt 1:2500 in TBST (1% BSA)

Der Blot wurde jeweils 1 h mit den Antikörperlösungen inkubiert und dazwischen jeweils viermal für je 15 min mit TBST gewaschen.

TBST: 10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
0,05 % (m/V)	Tween 20

2.8 ECL-Immundefektionsverfahren

Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase bildet nach Zugabe von Luminol und Wasserstoffperoxid ein chemilumineszierendes Produkt. Hierzu wurde die Membran nach dem letzten Waschschrift den Angaben des Herstellers (Pierce, Rockford, USA) entsprechend behandelt. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Chemilumineszenz mit Hilfe einer gekühlten CCD-Kamera (Fujifilm) sichtbar gemacht.

2.9 Ablösung der Antikörper von Membranen

Nach dem Nachweis der Proteinen durch das ECL-Immundefektionsverfahren konnte die Membran von den an ihr haftenden Antikörpern befreit werden. Zu diesem Zweck wurde die Membran für 30 min bei Raumtemperatur in Stripping-Puffer geschüttelt und anschließend für 30 min mit TBST gewaschen. Danach konnte der immunologische Nachweis von Proteinen wiederholt werden.

Stripping-Puffer:	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	0,05 % (m/V)	Tween 20
	2% (m/V)	SDS
	0,7% (V/V)	β -Mercaptoethanol

2.10 Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation

2.10.1 Erstellung der Gradienten

Die diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten wurden durch vorsichtiges Überschichten von 10 x 1 ml Saccharose-Lösung (in 10 mM HEPES, pH 7,5, 1 mM MgCl₂) der Konzentrationen 18% (m/V) bis 54% (m/V) in 4%-Inkrementen hergestellt. Die verwendeten Zentrifugenröhrchen fassten insgesamt 12 ml, so dass pro Gradient 2 ml Zelllysat aufgetragen werden konnte.

S/K-Puffer:	1,2 M	Sorbit
	0,1 M	Kaliumphosphat, pH 7,5

Lysis-Puffer:	0,3 M	Sorbit
	20 mM	TEA-Acetat, pH 7,2
	1 mM	EDTA

Protease-Inhibitoren: Pepstatin und PMSF, jeweils 1 μ g/ml.

2.10.2 Zentrifugation der Gradienten

Die Auftrennung der Membranfraktionen im Saccharosegradienten erfolgte nach Sorin *et al.* (Protokoll leicht verändert): Eine Vorkultur des zu untersuchenden Hefestammes wurde in 600 ml YPD auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,5 verdünnt und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 2 bis 3 bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durch Zugabe von 6 ml 1 M NaN₃-Lösung getötet und abzentrifugiert (1500*g, 4 °C, 10 min). Nach dem Resuspendieren der Zellen in 60 ml S/K-Puffer wurden 60 mg *Lysing Enzymes* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) hinzugefügt und die Zellsuspension 45 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die erfolgte Sphäroblastierung wurde unter dem Mikroskop überprüft. Alle folgenden Arbeiten wurden kalt durchgeführt: Die Sphäroblasten wurden abzentrifugiert (500*g, 4 °C, 10 min) und zweimal mit je 20 ml S/K-Puffer gewaschen. Danach wurden die Sphäroblasten in ca. 4 ml Lysis-Puffer resuspendiert und im Dounce-Homogenisator mit 30

Stößen aufgeschlossen. Nicht-lysierte Zellen und Zelltrümmer wurden durch zweimaliges Zentrifugieren (500*g, 4 °C, 3 min) entfernt. Das so gereinigte Zelllysate wurde auf zwei diskontinuierliche Saccharose-Gradienten (s. o.) aufgetragen und für 2 h bei 40000 Upm (Beckmann Sw41Ti) zentrifugiert. Die Gradienten wurden manuell von oben nach unten in 1-ml-Schritten fraktioniert, die Saccharosekonzentrationen refraktometrisch bestimmt und Fraktionen mit gleichen Konzentrationen vereinigt, so dass 12 Fraktionen mit je 2 ml Volumen erhalten wurden.

2.10.3 Vorbereitung der Fraktionen für den Western Blot

Jeweils 1 ml der einzelnen Fraktionen wurde mit 4 ml Tris-Puffer (2.6) verdünnt und für 1 h bei 48000 Upm (Beckmann 50.3Ti, 4°C) zentrifugiert. Die erhaltenen Membransedimente wurden in je 400 µl Tris-Puffer mit 5 M Harnstoff resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (17000*g, 4 °C, 45 min) wurden die Pellets in je 100 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 3 min im Wasserbad auf 100°C erhitzt.

SDS-Probenpuffer:	50 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	2 % (V/V)	β-Mercaptoethanol
	2 % (m/V)	SDS
	10 % (V/V)	Glycerin
	0,02 % (m/V)	Bromphenolblau

2.11 Messung der Enzymaktivität in den Fraktionen

2.11.1 Cytochrom c-Oxidase

1 ml Kaliumphosphat-Puffer (100 mM, pH 7,2) wurde mit 50 µl Cytochrom c-Lösung (1 mM, reduziert durch Zugabe von etwas Natriumdithionit) versetzt. Nach Zugabe von 50 µl Probe wurde die Enzymreaktion photometrisch über die Abnahme der Extinktion bei 550 nm verfolgt. Bei der Berechnung der Enzymaktivität wurde ein spezifischer Extinktionskoeffizient des reduzierten Cytochrom c von 21100 l/mol*cm angenommen.

2.11.2 α-Mannosidase

Die Bestimmung der Aktivität der α-Mannosidase erfolgte nach Ehrenhofer-Murray *et al.* (1998): 300 µl 100 mM MES/NaOH, pH 6,5 mit 0,067 % Triton wurden mit 50 µl PNPM-Lösung, 100 µl dest. Wasser und 50 µl Probe vermischt. Dieser Ansatz wurde für 120 min bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion mit 600 µl 1 M Na₂CO₃-

Lösung wurde die Extinktion bei 400 nm gegen eine Negativkontrolle gemessen. Für die Berechnung der Enzymaktivität wurde ein spezifischer Extinktionskoeffizient des Nitrophenolats von 18400 l/mol*cm angenommen.

PNPM-Lösung: 10 mM p-Nitrophenyl- α -D-mannopyranosid in dest. H₂O

2.12 HPLC-Analyse von Polyaminen

Die Quantifizierung von Polyaminen erfolgte modifiziert nach Price *et al.* (1992) nach Überführung in die fluoreszierenden Dansylderivate. Dazu wurden 400 μ l der zu analysierenden Probe mit 40 μ l 100 μ M Diaminohexan intern standardisiert, mit 600 μ l 20 % (m/V) Dansylchlorid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) in Aceton für 30 min bei 60 °C im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 μ l 100 mg/ml L-Prolin gestoppt und überschüssiges Aceton 30 min lang bei 60 °C im Dunkeln abgedampft. Die dansylierten Polyamine wurden in 500 μ l Toluol extrahiert, bei Raumtemperatur im Stickstoffstrom zur Trockne eingeengt und in 75 μ l Methanol gelöst zur HPLC-Analyse eingesetzt.

Die Trennung erfolgte an Hypersil ODS 5 (CS-Chromatographieservice, Langerwehe) 125 x 4,6 mm Trennsäulen mit 40 x 4,6 mm Vorsäulen auf einem HP 1100 HPLC-System mit Fluoreszenzdetektor der 1100er Serie (Agilent Technologies, Waldbronn). Jeweils 10 μ l der derivatisierten Polyamine wurden injiziert. Es wurde ein Stufengradient (Tabelle 3) mit Laufmittel A: Reinstwasser und Laufmittel B: Methanol bei einem Volumenfluss von 0,5 ml/min zur Trennung verwendet. Zur Fluoreszenzdetektion wurde eine Anregungswellenlänge von 340 nm und eine Detektionswellenlänge von 540 nm gewählt. Die Auswertung erfolgte mittels der HP Chemstation v 6.03 Software.

Tabelle 3: Elutionsgradient zur Trennung von dansylierten Polyaminen, modifiziert nach Price *et al.* (1992).

Zeit [min]	Laufmittel B [% (V/V)]	Flussrate [ml/min]
0	75	0,5
7	80	0,5
8	95	0,5
10	100	0,5
14	Ende	0,5

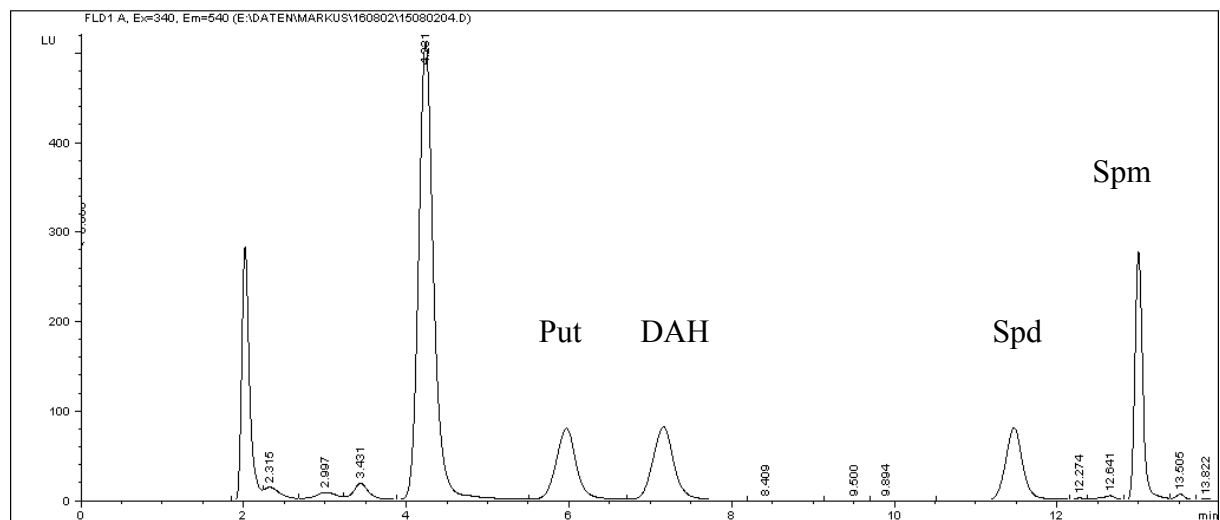


Abb 1: Chromatogramm der Trennung von 10 μl eines dansyl-derivatisierten Polyamin-Standardgemischs an Hypersil ODS 5 125 x 4,6 mm. Die Ausgangskonzentration der Polyamine betrug jeweils 10 μM .

2.13 Polyaminimportmessung an ganzen Hefezellen

Die Messung der Sperminaufnahme ganzer Hefezellen erfolgte, mit einigen Abweichungen, nach Tomitori *et al.* (1999). Die Zellen wurden in 10 ml SC-Medium bis zu einer OD_{600} von 1,0 angezogen. Nach dreimaligem Waschen in Glucose-HEPES-Puffer wurden die Zellen im gleichen Puffer auf OD_{600} von 1,0 suspendiert. Die Transportmessung wurde eingeleitet durch die Zugabe von 200 μl 500 μM [^{14}C]Spermin (12000 Counts Gesamtaktivität) zu 800 μl Zellsuspension (Externe Sperminkonzentration: 100 μM). Die Inkubation erfolgte unter Rühren bei 30 °C. In definierten Zeitabständen wurden 100- μl -Aliquots entnommen und durch Nitrocellulose-Filter (Porengröße: 0,45 μm , Millipore; Eschborn) filtriert, die vorher mit Stop-Lösung äquilibriert wurden. Die Filter wurden sofort mit 5 ml Stop-Lösung gewaschen und die aufgenommene Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

Glucose-HEPES-Puffer:	20 mM	Na-HEPES, pH 7,2
	10 mM	Glucose

Stop-Lösung:	100 mM	LiCl
	1 mM	Spermin

2.14 Messung der wachstumsabhängigen Polyaminabgabe

Der zu untersuchende Hefestamm wurden in Succinat-gepuffertem CBS-Medium auf eine OD_{600} von 0,5 angeimpft und bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. In definierten Zeitabständen wurden Proben der Zellsuspension entnommen, die Zellen sofort abzentrifugiert (17000*g, RT, 3 min) und die Polyaminkonzentration im Überstand bestimmt.

2.15 Polyamin-Exportmessungen

Die Zellen wurden in Succinat-gepuffertem CBS-Medium bis zu einer OD_{600} von 1 bis 1,5 angezogen. Dem Medium waren Putrescin oder Spermidin in einer Konzentration von 10 mM zugesetzt. Nach dreimaligem Waschen in Succinat-gepuffertem CBS-Medium wurden die Zellen in demselben Medium resuspendiert und bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Es wurden 500- μ l-Aliquots in definierten Zeitabständen entnommen. Die Hefezellen wurden durch 3 min Zentrifugation (17000*g, RT) entfernt und der Polyamingehalt im Überstand wie beschrieben bestimmt (2.11). Für die Bestimmung des Polyamingehalts der Zellen wurden 500 μ l Zellsuspension entnommen und die Zellen abzentrifugiert (17000*g, RT, 3 min). Das Sediment wurde in 800 μ l 10 mM Na-PIPES, pH 6,8 resuspendiert und mit 200 μ l 50 % Trichloressigsäure in H₂O versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei 65 °C wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (s.o.) und die Polyaminkonzentration im Überstand bestimmt (Gesamtaufschluss nach Tomitori *et al.*, 2001).

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung von Hefestämmen mit mutierten Genen für putative Transporter

3.1.1 Auswahl möglicher vakuolärer Transporter

Im Rahmen einer europäischen Kooperation wurden nach *in-silico*-Untersuchungen offene Leseraster des Genoms der Bäckerhefe ausgewählt, deren Genprodukte zwei Familien von Transportproteinen zuzuordnen waren. Dies war zum einen der Familie der *Multi-Drug-Resistance*-Transporter innerhalb der *Major Facilitator Superfamily* mit insgesamt 24 Vertretern (*MDR*-Familie, s. 1.4), zum anderen eine kleine Gruppe von sieben putativen Transportern, die Ähnlichkeit zu Auxin- und Aminosäurepermeasen höherer Pflanzen aufweisen (*AAAP*-Familie, s. 1.5). Einigen Mitgliedern der *MDR*-Familie war schon zu Beginn dieser Arbeit eine breite Vielfalt von Substraten zugeordnet (Rieger *et al.*, 1999; Kanazawa *et al.*, 1988; Ehrenhofer-Murray *et al.*, 1998; Alarco *et al.*, 1997; Gabor *et al.*, 1990), zum größten Teil war diese Familie jedoch noch nicht charakterisiert. Mögliche Funktionen für Mitglieder der *AAAP*-Familie in der Hefe waren zu Beginn dieser Arbeit völlig unbekannt. Inzwischen wurden einige Proteine dieser Familie als vakuoläre Aminosäuretransporter beschrieben (Rusnak *et al.*, 2001), weshalb sie in *AVT*-Familie (*amino acid vacuolar transport*) umbenannt wurde. Eine Liste sämtlicher innerhalb des Kooperationsprojektes untersuchten ORFs, sowie die bekannten der Literatur zu entnehmenden Daten wird in Tabelle 2 (Einleitung) gegeben.

Die experimentelle Strategie des Kooperationsprojektes umfasste die systematische Isolierung von Deletionsmutanten der ausgewählten Gene sowie die Isolierung von Hefestämmen, die mit einem Antikörper-Epitop versehene Proteinfusionen der kodierten Membranproteine jeweils als einzige Version synthetisierten. Durch die Charakterisierung dieser Mutanten sollten Transporter der vakuolären Membran identifiziert werden, die für den Import oder für die Mobilisierung von Speichermetaboliten verantwortlich sind. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf den zu Beginn der Analysen noch völlig unidentifizierten Aminosäuretransportern der Vakuolenmembran (Sato *et al.*, 1984).

Die gezielte genomische Mutagenese eines Gens (*gene targeting*) ist ein Verfahren, dem besonders in der Hefegenetik große Bedeutung zukommt. Hierbei wird mittels PCR ein DNA-Fragment erzeugt, das aufgrund homologer Abschnitte in der Lage ist, an genau definierter Stelle in das Hefegenom integrativ zu rekombinieren und eine dort befindliche Genregion in

der gewünschten Weise zu verändern. Dieses Verfahren wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Isolierung von Hefestämmen angewendet, bei denen zum einen die ausgewählten Gene für putative Transporter durch eine *lacZ-kanMX*-Deletionskassette ersetzt waren, zum anderen diese Gene durch ein dreifaches HA-Epitop (3xHA) verlängert waren, was eine gezielte Detektion der kodierenden Proteine mit entsprechenden Antikörpern erlaubte.

3.1.2 Isolierung von *lacZ*-Deletionsmutanten putativer Transportproteine

Es wurden Hefestämme isoliert, bei denen die offenen Leseraster YGR138c (*TPO2*), YJR124c, YOR273c (*TPO4*) bzw. YPR156c (*TPO3*) jeweils durch eine *lacZ-kanMX*-Deletionskassette ersetzt waren. Stämme in denen die Gene der übrigen Mitglieder der zwei untersuchten Proteinfamilien durch *lacZ* ausgetauscht waren, wurden von den Kooperationspartnern erhalten (eine komplette Liste der in dieser Arbeit untersuchten Hefestämme ist im Anhang enthalten). Nachfolgend sind exemplarisch die Schritte für die Isolierung und Verifizierung der Stämme RK 15 und RK 16 wiedergegeben; in beiden Stämmen ist der ORF YGR138c (*TPO2*) deletiert.

Das *kanMX*-Modul (Güldener *et al.*, 1996) besteht aus einem dominanten Kanamycin-Resistenzgen (*kan^r*) aus *E. coli*, das mit der *TEF*-Promotor- und *TEF*-Terminatorsequenz aus *Ashbya gossypii* fusioniert wurde, flankiert von *loxP*-Sequenzen. Auf den für die Isolierung der *lacZ*-Deletionsmutanten verwendeten Plasmid pUG6*lacZ* (Boles *et al.*, 1998) befand sich außerdem das Gen für die β -Galaktosidase aus *E. coli*. Mit Hilfe der Oligonukleotide YGR1 und YGR2 (Tabelle 4, Anhang) und pUG6*lacZ* als Matrize wurde ein 4,6-kb-PCR-Fragment erzeugt, welches die *lacZ-kanMX*-Deletionskassette enthielt und von jeweils 45 bp der 5'- bzw. 3'-untranslatierten Region von YGR138c flankiert wurde (Abb. 2A). Nach der integrativen Rekombination in das Hefegenom waren die erhaltenen Stämme (RK 15 und RK 16) durch die Expression des *kan^r*-Markers resistent gegen Geneticin[®] (G418-Sulfat) und wurden mittels PCR auf die korrekte Insertion der Deletionskassette überprüft (Abb. 2B).

Alle weiteren Stämme wurden mit der gleichen Strategie isoliert. Insgesamt wurden 9 *lacZ*-Deletionsmutanten isoliert, deren Charakterisierung zum Teil nachfolgend beschrieben wird.

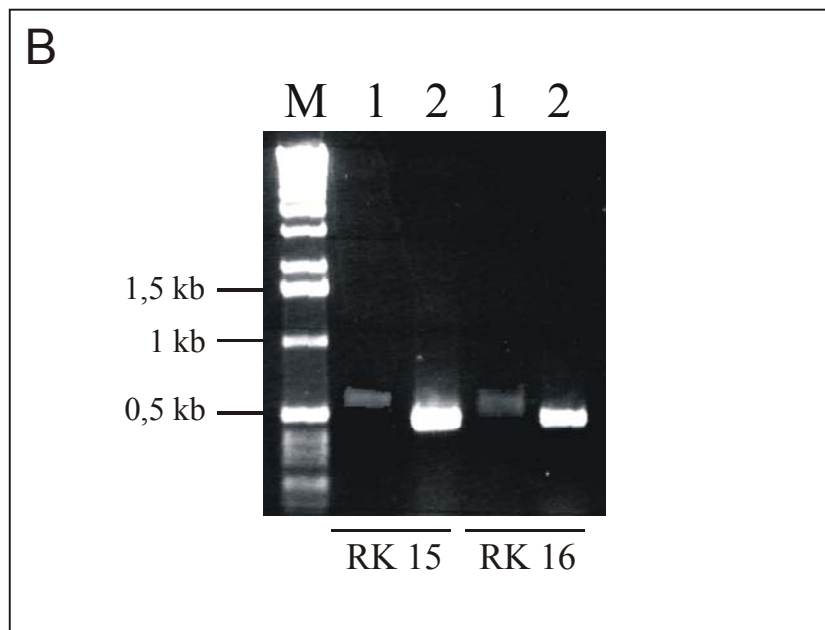
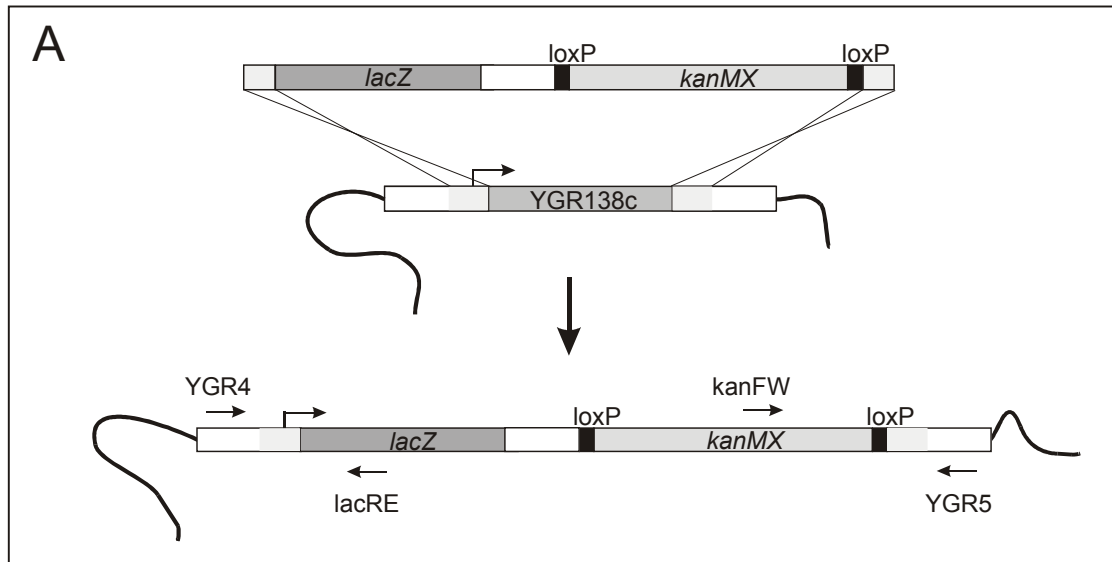


Abb. 2: Die Isolierung der *TPO2*-Deletionsstämme RK 15 und RK 16. A: Schematische Darstellung der integrativen Rekombination der *lacZ-kanMX*-Deletionskassette in das Hefegenom. Die für die PCR-Kontrolle verwendeten Oligonukleotide sind mit einem Pfeil in Leserichtung eingezeichnet. B: PCR-Kontrolle der beiden isolierten Stämme (RK 15 und RK 16). Es wurden jeweils zwei PCR-Reaktionen mit DNA aus den beiden rekombinanten Stämmen durchgeführt. 1: Oligonukleotide YGR4 und lacRE, erwartet: jeweils 597 bp. 2: Oligonukleotide kanFW und YGR5, erwartet: 401 bp.

3.1.3 Studien zum Expressionsniveau der putativen Transportergene

Die innerhalb unserer Kooperation durchgeführte systematische Isolierung von *lacZ*-Deletionsmutanten putativer Transportproteine erlaubte es, die Aktivität der jeweiligen Promotoren unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zu untersuchen. Da das Ziel unseres gemeinsamen Projektes die Identifizierung neuer vakuolärer Transporter für stickstoffhaltige Metabolite (vor allem Aminosäuren) war, wurde als besondere Stoffwechselbedingung eine Limitierung der N-Quelle gewählt. Hierzu wurden die Zellen vor Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität für vier Stunden in SLA-Medium inkubiert, das lediglich 50 μ M Ammoniumsulfat enthielt (Lorenz und Heitmann, 1998). Die dabei gemessene Aktivität wurde mit der von Zellen verglichen, die in Vollmedium (YPD) gewachsen waren (Abb. 3). Die Enzymaktivität war in allen Fällen relativ niedrig; es wurden Werte von maximal ca. 10 U gemessen. Die drei Gene YMR088c (*NVTI*), YBR043c und YJR001w waren durch Stickstofflimitation induzierbar. Eine deutliche Verringerung der Promotoraktivität bei N-Limitation war bei YNL065w (*HOX1*), YML116w (*ATRI*), YNR055c (*HOLI*) und YGR138c (*TPO2*) zu beobachten. YIL121w war deutlich exprimiert, zeigte jedoch keine stickstoffabhängige Regulation. Bei allen anderen, hier nicht erwähnten ORFs war keine β -Galaktosidaseaktivität zu messen, ein Befund, der höchstwahrscheinlich auf das geringe Expressionsniveau vieler Transportproteine zurückzuführen ist.

3.1.4 Isolierung von Stämmen mit 3xHA-markierten Genen

Für die Bestimmung der subzellulären Lokalisierung der vermutlichen Transporter wurden Hefestämme isoliert, bei denen jeweils folgende offene Leseraster um eine 3xHA-kodierende Sequenz verlängert waren: YBL089w, YEL064c, YIL088c, YGR138c (*TPO2*), YJR124c, YNL101w, YOR273c (*TPO4*) und YPR156c (*TPO3*). Es wurden für jeden ORF mindestens zwei Stämme isoliert und mittels analytischer PCR überprüft. Weitere Stämme, die 3xHA-modifizierte Versionen der in der Kooperation bearbeiteten ORFs synthetisierten wurden zuzüglich von den Kooperationspartnern erhalten (s. Anhang für eine vollständige Liste). Die Strategie für die Isolierung der Stämme ist nachfolgend exemplarisch für YGR138c (*TPO2*) gezeigt (Stämme RK 6 und RK 7).

Mit Hilfe einer PCR wurde mit den Oligonukleotiden YGR3 und YGR2 (Tabelle 4, Anhang) ein 1,7-kb-DNA-Molekül synthetisiert, welches aus der kodierenden Sequenz des 3x HA-

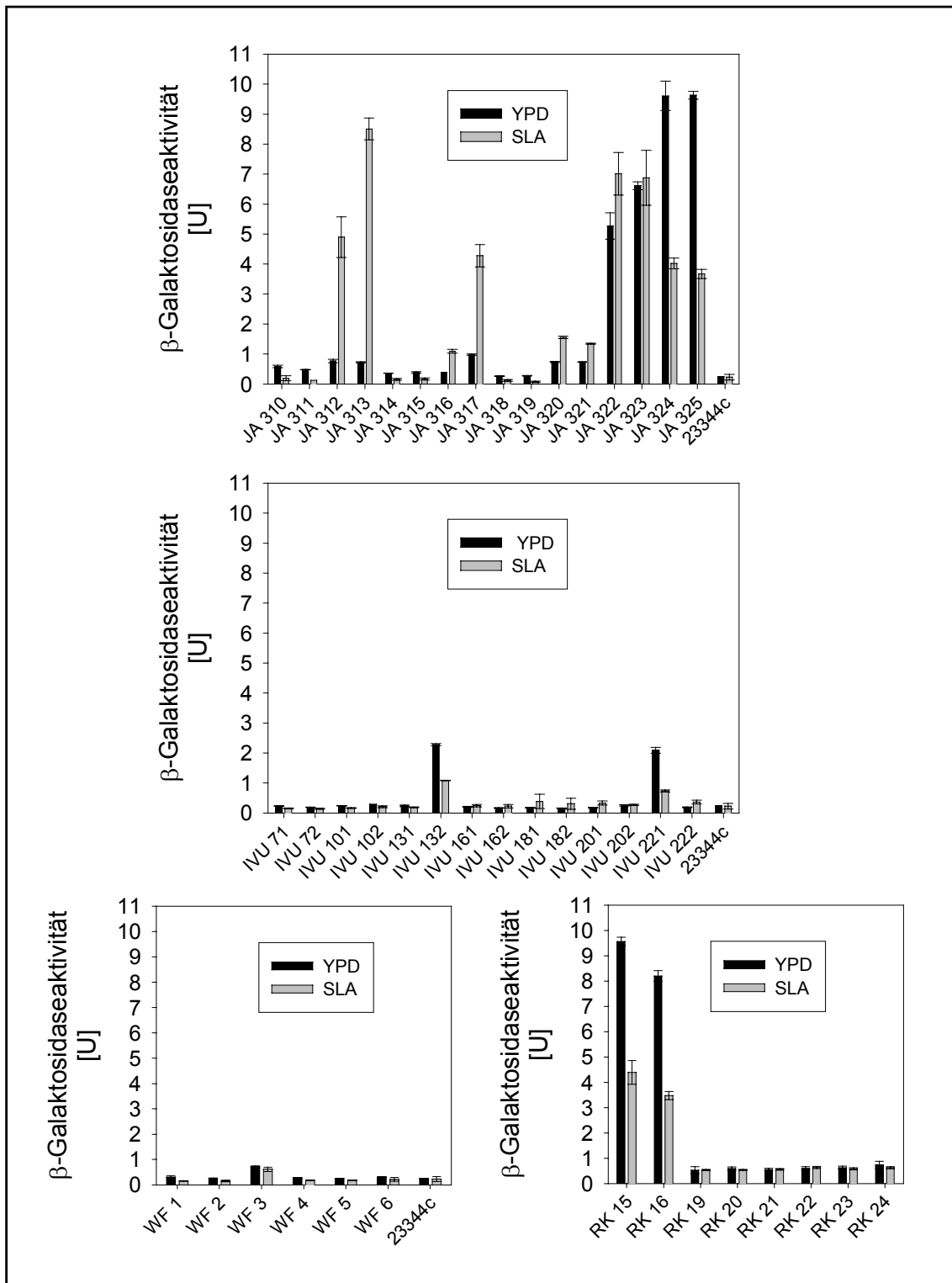


Abb. 3: Systematische Analyse aller im Rahmen des Kooperationsprojektes isolierten Hefestämme mit Promotor-*lacZ*-Fusionen. Die β -Galaktosidaseaktivität jedes Stammes wurde bei Stickstoffüberschuss (YPD) sowie nach vierstündigem Stickstoffmangel bestimmt (SLA). Die Genotypen der einzelnen Stämme sind dem Anhang zu entnehmen.

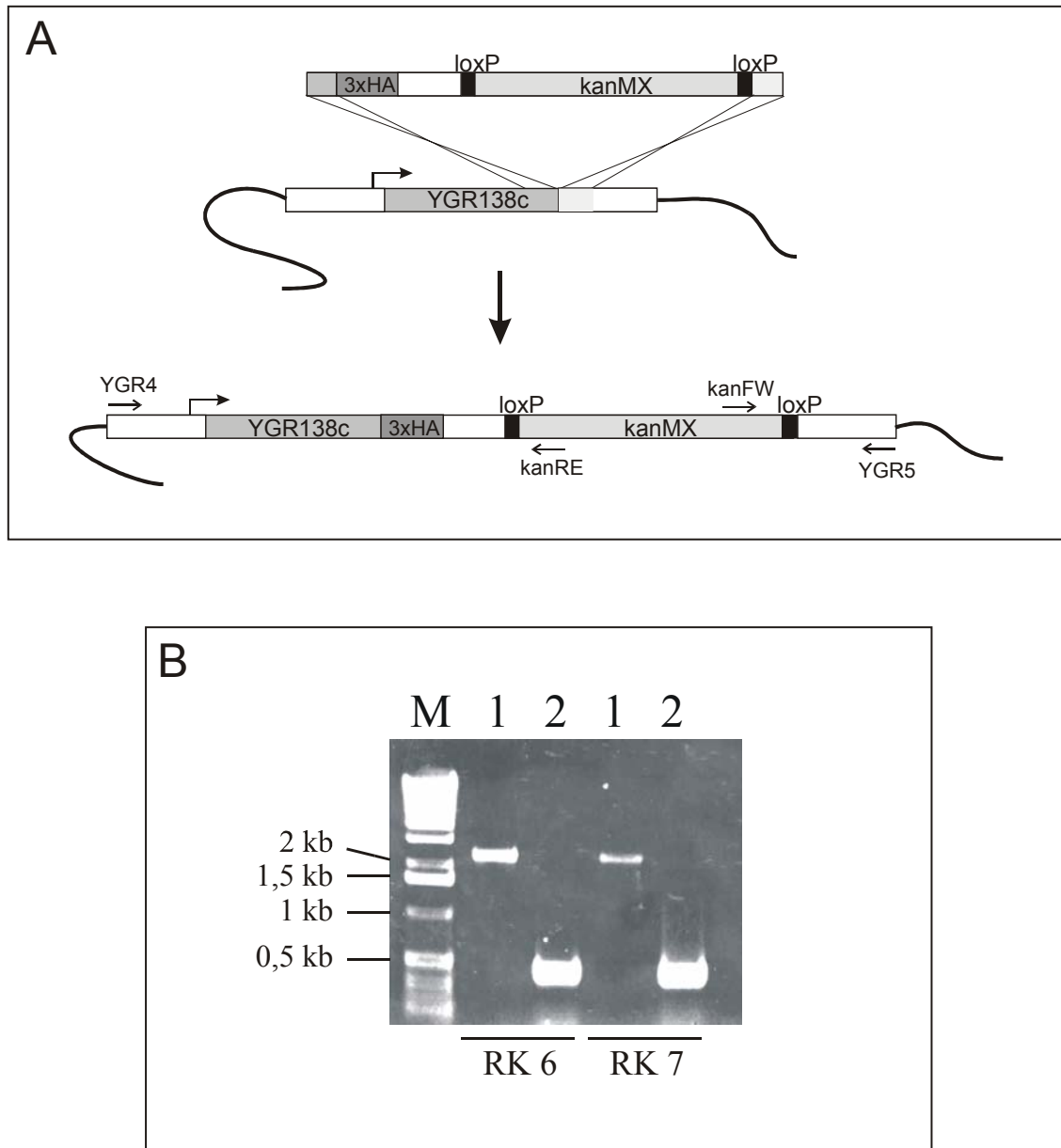


Abb. 4: Die Isolierung der Stämme RK 6 und RK 7. Beide Stämme exprimieren 3xHA-markierte Versionen des Gens *TPO2* (YGR138c). A: Schematische Darstellung des Rekombinationsereignisses. Die für die PCR-Kontrolle verwendeten Oligonukleotide sind mit einem Pfeil in Leserichtung eingezeichnet. B: PCR-Kontrolle der beiden isolierten Stämme (RK 6 und RK 7). Es wurden jeweils zwei PCR-Reaktionen mit DNA aus den beiden rekombinanten Stämmen durchgeführt. 1: Oligonukleotide YGR4 und kanRE, erwartet: 2390 bp. 2: Oligonukleotide YGR5 und kanFW, erwartet: 401 bp.

Epitops bestand, gefolgt von dem *kanMX*-Modul. Als Matrize diente dabei das Plasmid pUG6-HA (Buziol *et al.*, 2002). Das erhaltene Molekül war flankiert von jeweils 45 bp der Region unmittelbar vor und hinter dem Stop-Codon von YGR138c, so dass bei der homologen Rekombination ein Austausch dieses Codons mit der *3xHA-lacZ*-Kassette

stattfand (Abb. 4A). Die korrekte Rekombination der auf diese Weise isolierten Stämme (RK 6 und RK 7) wurde mittels analytischer PCR überprüft (Abb. 4B).

Alle weiteren im Rahmen dieser Arbeit isolierten Stämme mit 3xHA-markierten Genen wurden mit analoger Strategie isoliert. Insgesamt wurden 17 solcher Stämme hergestellt, deren Charakterisierung zum Teil in dieser Arbeit beschrieben wird.

3.1.5 Analyse der 3xHA-markierten putativen Transportproteine im Western Blot

Von sämtlichen innerhalb der Kooperation isolierten Stämmen mit 3xHA-markierten Genen wurden Gesamtmembranpräparationen hergestellt, die im Western Blot auf die Expression der markierten Gene getestet wurden. Die Hefestämme wurden dabei in Vollmedium (YPD) bis zum Erreichen einer OD_{600} von 3 angezogen.

Nur bei einem Teil der Stämme gelang ein immunologischer Nachweis der 3xHA-markierten Proteine. Dabei ist zu bemerken, dass als Wachstumsbedingung in diesem Fall ausschließlich Vollmedium gewählt wurde, somit also nur eine Wachstumsbedingung getestet wurde. Tabelle 4 fasst die Ergebnisse der Promotoranalysen, sowie der immunologischen Untersuchungen zusammen. Man erkennt, dass die Detektierbarkeit im Western Blot nicht immer mit den Ergebnissen der Promotoranalysen korreliert. Bei allen anderen, in dieser Tabelle nicht erwähnten offenen Leserastern war weder β -Galaktosidaseaktivität in den Deletionsstämmen, noch ein immunologischer Nachweis der HA-markierten Proteinfusion möglich.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Analyse der Promotoraktivität sowie des immunologischen Nachweises der einzelnen, innerhalb der Kooperation isolierten Hefestämme.

Name des lacZ- Deletionsstammes	ORF	Promotoranalyse des lacZ- Stammes (β -Galaktosidaseaktivität in U)		immunologischer Nachweis (YPD- Medium)
		YPD-Medium	SLA-Medium	
RK 15	YGR138c (<i>TPO2</i>)	9,56±0,17	4,39±0,47	+
RK 16	YGR138c (<i>TPO2</i>)	8,20±0,22	3,47±0,16	
RK 19	YJR124c	keine Aktivität	keine Aktivität	(+)
RK 20	YJR124c			
RK 21	YOR273c (<i>TPO4</i>)	keine Aktivität	keine Aktivität	+
RK 22	YOR273c (<i>TPO4</i>)			
RK 23	YPR156c (<i>TPO3</i>)	keine Aktivität	keine Aktivität	+
RK 24	YPR156c (<i>TPO3</i>)			
JA 312	YMR088c	0,76±0,06	4,89±0,68	-
JA 313	YMR088c	0,72±0,02	8,51±0,36	
JA 316	YBR043c	0,39±0,01	1,09±0,06	-
JA 317	YBR043c	0,98±0,02	4,27±0,37	
JA 320	YJR001w	0,73±0,02	1,55±0,04	-
JA 321	YJR001w	0,73±0,01	1,34±0,02	
JA 322	YIL121w	5,27±0,44	7,01±0,71	+
JA 323	YIL121w	6,61±0,13	6,88±0,92	
JA 324	YNL065w	9,61±0,49	4,02±0,18	+
JA 325	YNL065w	9,63±0,13	3,67±0,15	
WF 1	YCR023c	keine Aktivität	keine Aktivität	+
WF 2	YCR023c			
WF 3	YDR119w	0,71±0,03	0,62±0,08	+
IVU 132	YML116w	2,28±0,04	1,08±0,01	-
IVU 221	YNR055c	2,09±0,1	0,73±0,04	-

3.2 Untersuchungen zur Lokalisierung putativer Transportproteine

Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Stämme mit HA-markierten Genen wurden isoliert, um eine Bestimmung der subzellulären Lokalisierung putativer Transporter zu ermöglichen. Stämme, die nach Wachstum in Vollmedium ein immunologisch deutlich nachweisbares Fusionsprotein synthetisierten, sollten sich gut lokalisieren lassen. Als analytische Methode wurde dabei die Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation ausgewählt, da hierfür alle technischen Voraussetzungen im Labor gegeben waren und keine Fluoreszenzmikroskopie benötigt wird.

3.2.1 Evaluation der Methode

Es wurde zunächst untersucht, ob mit der von Sorin *et al.* (1997) beschriebenen Methode der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation eine befriedigende Trennung der verschiedenen Organellmembranen auch mit unserem Stamm erreicht werden kann. Zu diesem Zweck wurden nach einer solchen isopyknischen Zentrifugation eines entsprechenden Zelllysats die erhaltenen Fraktionen bezüglich der Aktivität organellspezifischer Leitenzyme untersucht. Ausgewählt wurde hierbei die α -Mannosidase als Leitenzym der Vakuole, sowie die Cytochrom-c-Oxidase als Mitochondrien-spezifisches Enzym. Für die Beschreibung der unterschiedlichen Verteilungen wird im Folgenden die Fraktion mit der geringsten Saccharosekonzentration als Fraktion 1, die mit der höchsten Konzentration als Fraktion 12 bezeichnet. Während die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase ein einzelnes Maximum in den Fraktionen 10 und 11 besaß, war die spezifische Aktivität der α -Mannosidase am höchsten in den Fraktionen 1 und 2, hatte jedoch ein weiteres Maximum in den Fraktionen 7 bis 10 (Abb. 5B). Die Gesamtproteinkonzentration war in Fraktion 2 maximal und fiel bis zu Fraktion 7 linear ab. Die Untersuchung der einzelnen Fraktionen im Western Blot mit Hilfe spezifischer Antikörper bestätigte die Anreicherung vakuolärer Membranen in dem oben beschriebenen Bereich des Gradienten (Abb. 6). Ein Antikörper, der gegen die 100-kDa-Untereinheit der vakuolären ATPase (Vma1p) gerichtet ist, detektierte zwei Proteinmaxima, deren Verteilung genau der Verteilung der Mannosidaseaktivität entsprach. Eindeutig ließ sich auch die Verteilung der Plasmamembran bestimmen. Ein Antikörper, der die Plasmamembran-ATPase erkannte, lieferte ein deutliches Signal in den Fraktionen 10 bis 12 (Abb. 6). Eine Anreicherung mitochondrialer Membranen in den entsprechenden Fraktionen konnte mit Hilfe der immunologischen Nachweismethode nicht gezeigt werden, da der von mir getestete, gegen die

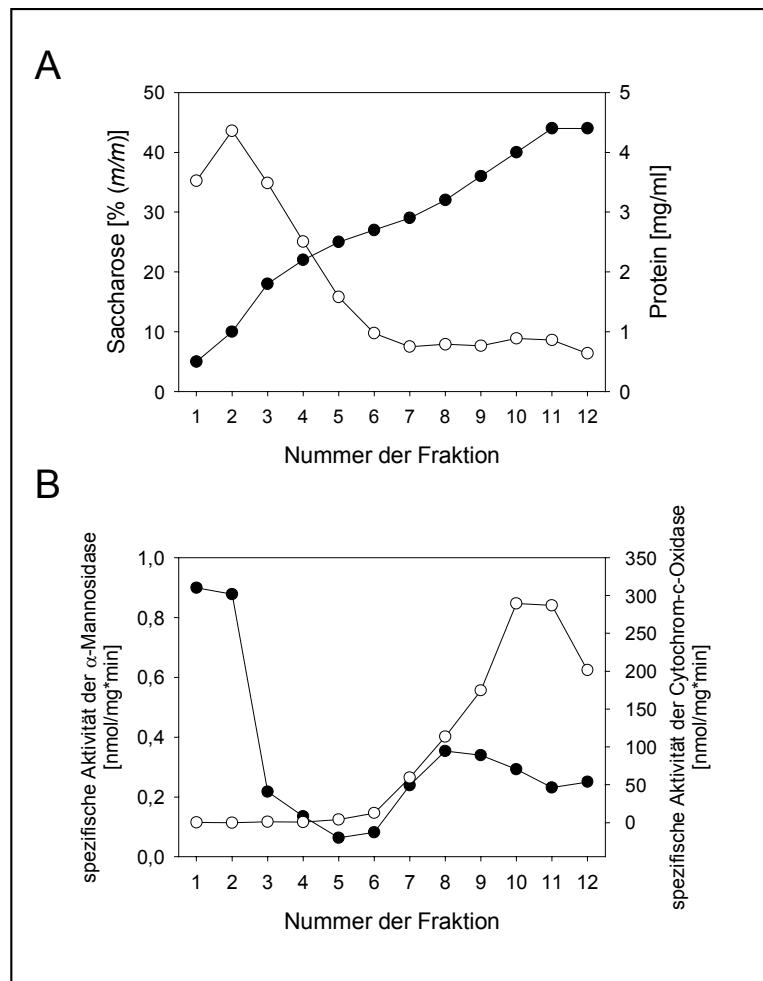


Abb. 5: Evaluation der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation nach Sorin *et al.* (1997). A: Verteilung von Saccharose (●) und Gesamtprotein (○) in den einzelnen Fraktionen des Gradienten. B: Spezifische Aktivität der α -Mannosidase (●) und der Cytochrom-c-Oxidase (○) in den einzelnen Fraktionen des Gradienten.

Untereinheit III der Cytochrom-c-Oxidase gerichtete Antikörper kein erkennbares Signal lieferte.

Die Verteilung der spezifischen Aktivitäten der ausgewählten Leitenzyme, sowie die Ergebnisse der immunologischen Analysen zeigen, dass sich mit der von Sorin *et al.* beschriebenen Methode der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation vakuoläre Membrananteile deutlich von Plasmamembrananteilen abtrennen ließen, so dass diese Methode für eine Bestimmung der Lokalisierung der 3xHA-markierten putativen Transportproteine geeignet war.

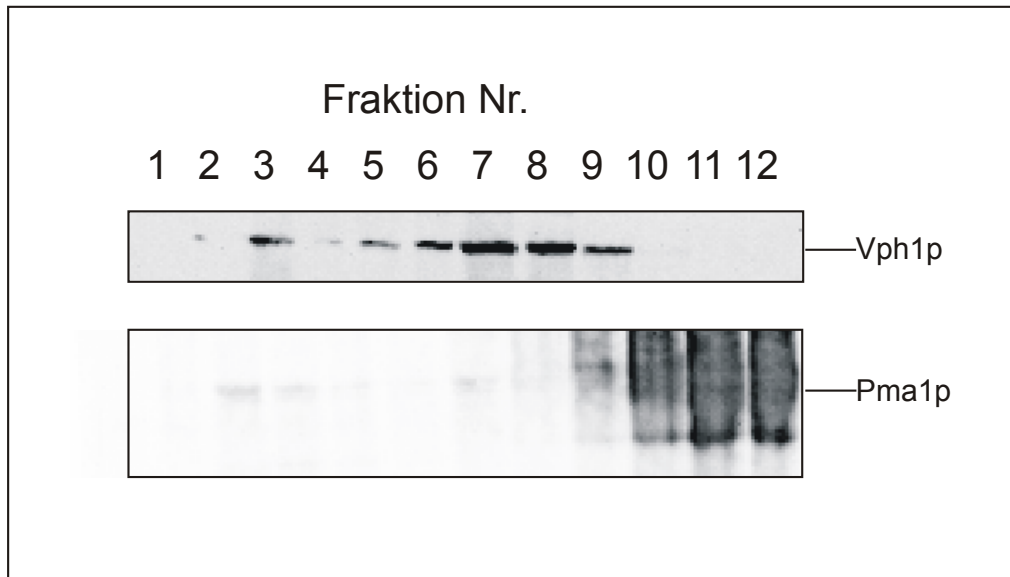


Abb. 6: Immunologischer Nachweis der Proteine Vph1p und Pma1p nach der Fraktionierung eines Zellysats von Stamm RK 11.

3.2.2 Lokalisierung von Mitgliedern der *MDR*-Familie

Mit Hilfe der beschriebenen Fraktionierungsmethode wurde die subzelluläre Lokalisierung von vier, zum Zeitpunkt der Analyse schlecht oder gar nicht charakterisierten Mitgliedern der *MDR*-Familie bestimmt. Ausgewählt wurden dabei die Hefestämme, die HA-markierte Proteine nach Wachstum in Vollmedium so stark exprimierten, dass diese im Western Blot nachgewiesen werden konnten (3.1.5). Es handelte sich hierbei um die von mir isolierten Stämme RK 6 (*TPO2-3xHA*), RK 13 (*TPO3-3xHA*), RK 11 (*TPO4-3xHA*), sowie den von Bruno André erhaltenen Stamm JA 336 (*YIL121w-3xHA*). Die Analyse der einzelnen Fraktionen im Western Blot ergab, dass alle vier Proteine im gleichen Bereich des Saccharosegradienten akkumulieren, der im vorherigen Versuch (3.2.1) als Plasmamembran identifiziert wurde (Abb. 7). Dieser Befund war überraschend, da Tpo2p, Tpo3p und Tpo4p als vakuoläre Polyamintransporter postuliert waren (Tomitori *et al.*, 2001).

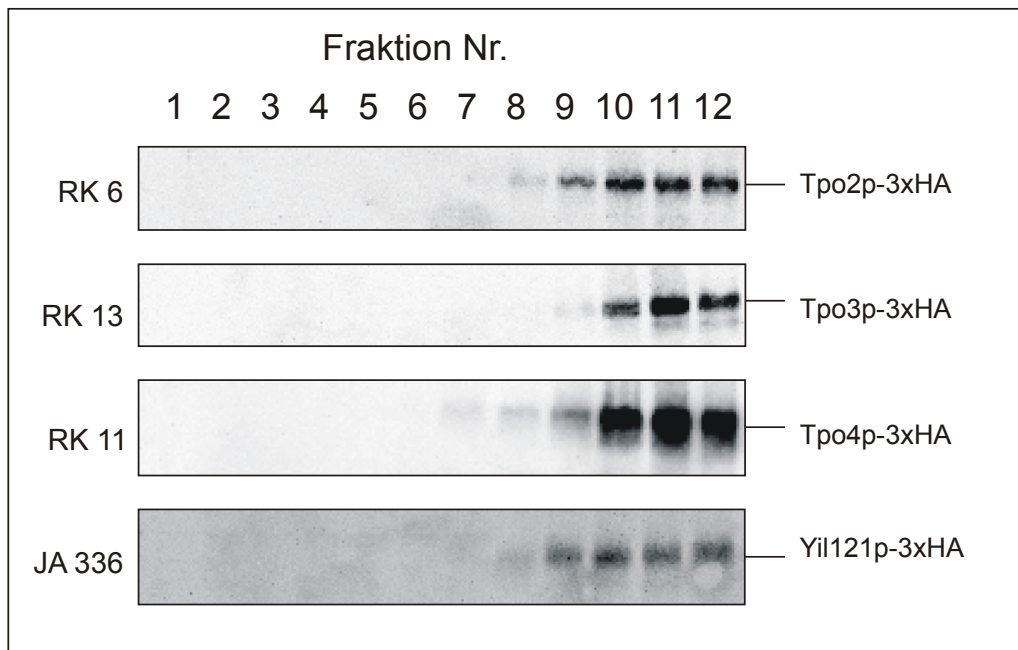


Abb. 7: Subzelluläre Lokalisierung von Tpo2p, Tpo3p, Tpo4p und Yil121p. Die Zellysate der links aufgeführten Stämme wurden mit Hilfe der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert und jeweils mit einem α -HA-Antikörper immunologisch untersucht. Man erkennt, dass alle hier untersuchten 3xHA-markierten Proteine in dem der Plasamamembran entsprechenden Bereich akkumulieren.

3.2.3 ORF YCR023c kodiert für ein vakuoläres Transmembranprotein

Es wurde eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation mit einem Zellysate von Stamm WF 7 durchgeführt. Dieser Stamm besitzt eine 3xHA-markierte Version des ORFs YCR023c, einem Mitglied der *MDR*-Familie, als einzige Genkopie. Dieses offene Leseraster ist noch völlig uncharakterisiert; berichtet wurde lediglich eine erhöhte Toleranz gegenüber Allylglycin in Stämmen, die diesen ORF nicht mehr besitzen (Bianchi *et al.*, 1999). Des weiteren wurde eine entfernte Ähnlichkeit zum Spermidinexporter Blt aus *Bacillus subtilis* erwähnt (Tomitori *et al.*, 1999).

Die Verteilung der mit dem α -HA-Antikörper erkannten Proteinbanden entsprach ziemlich genau der Verteilung der 100-kDa-Untereinheit der V-ATPase (Abb. 8). Zwei Maxima waren erkennbar; zum einen in den Fraktionen 7 bis 9, zum anderen, schwächer erkennbar, in Fraktion 1 bis 3. Damit konnte gezeigt werden, dass die HA-markierte Proteinfusion in der vakuolären Membran lokalisiert ist, was höchstwahrscheinlich auch für die unmodifizierte Proteinversion gilt.

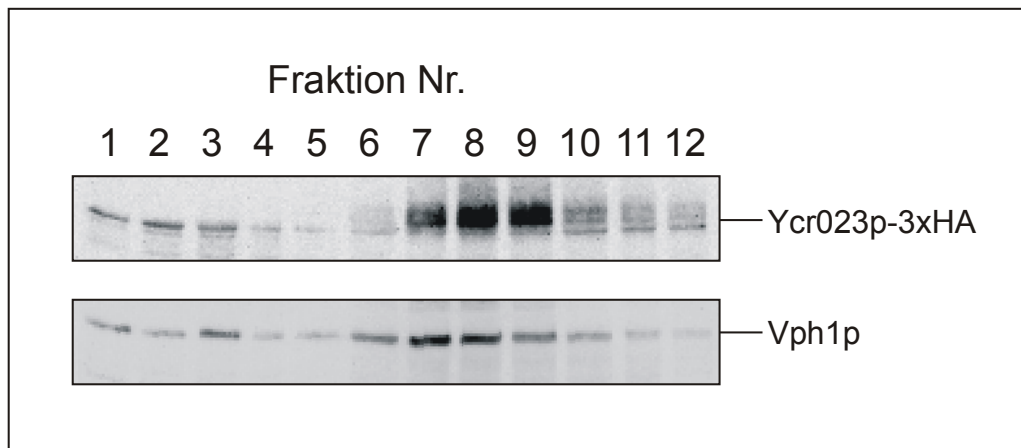


Abb. 8: Subzelluläre Lokalisierung von Ycr023p-3xHA. Ein Zelllysat des Stammes WF 7 wurde fraktioniert und die einzelnen Fraktionen im Western Blot immunologisch analysiert. Man erkennt, dass die Verteilung der 3xHA-markierten Ycr023p-Fusion der Verteilung der 100-kDa-Untereinheit der V-ATPase entspricht.

3.3 Untersuchungen zum Polyamintransporter Tpo1p

3.3.1 Isolierung von Hefestämmen mit modifiziertem *TPO1*-Gen

Die überraschende Lokalisierung der drei putativen Polyamintransporter Tpo2p, Tpo3p und Tpo4p in der Plasmamembran (3.2.2) warf die Vermutung auf, der am besten charakterisierte Polyamintransporter der Bäckerhefe, Tpo1p, könnte, anders als von Tomitori *et al.* (1999) postuliert, ebenfalls Plasmamembran-gebunden sein. Es wurde daher zum einen ein Stamm isoliert, in dem das *TPO1*-Gen durch eine *lacZ-kanMX*-Deletionskassette ersetzt war (Stamm RK 26), zum anderen wurde ein Stamm erstellt, der eine 3xHA-markierte Version von Tpo1p synthetisierte (Stamm RK 25). Die Isolierung beider Stämme erfolgte analog zu der Isolierung der übrigen in dieser Arbeit beschriebenen Hefestämme (3.1.2, 3.1.4). Die Western Blot Analyse einer Membranpräparation von RK 25 mit dem α -HA-Antikörper ergab eine Bande, deren apparentes Molekulargewicht genau der berechneten Größe von Tpo1p entsprach (64 kDa, vgl. Abb. 10). Die analytische PCR des Stammes RK 26 bewies, dass die eingesetzte *lacZ-kanMX*-Deletionskassette an der richtigen Stelle in das Genom integriert wurde und das *TPO1*-Gen in diesem Stamm nicht mehr vorhanden ist (Abb 9).

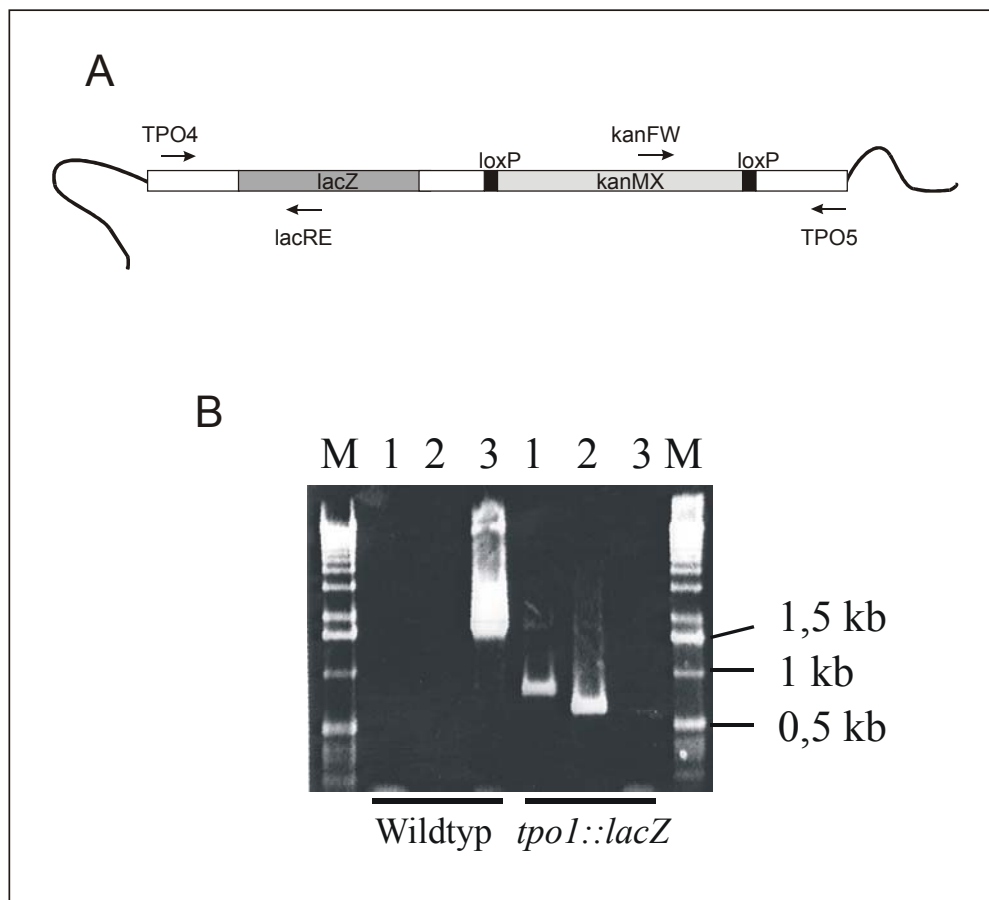


Abb. 9: Die Isolierung des *TPO1*-Deletionsstammes RK 26. A: Schematische Darstellung des *TPO1*-Genlokus nach der integrativen Rekombination der *lacZ-kanMX*-Deletionskassette. Die für die PCR-Kontrolle verwendeten Oligonukleotide sind mit einem Pfeil in Leserichtung eingezeichnet. B: PCR-Kontrolle des isolierten Stammes (RK 25). Es wurden jeweils zwei PCR-Reaktionen mit DNA aus dem rekombinanten Stamm sowie dem Wildtyp 23344c durchgeführt. 1: Oligonukleotide *kanFW* und *TPO5*, erwartet: 640 bp beim rekombinanten Stamm. 2: Oligonukleotide *TPO4* und *lacRE*, erwartet: 544 bp beim rekombinanten Stamm. 3: Oligonukleotide *TPO1/1* und *TPO1/2*, erwartet: 1783 bp beim Wildtyp. Dieser PCR-Ansatz amplifiziert die gesamte kodierende Sequenz von *TPO1*.

3.3.2 *Tpo1p* ist in der Plasmamembran lokalisiert

Es wurde die Fraktionierung eines Zelllysats vom Stamm RK 25 im Saccharosegradienten durchgeführt und die einzelnen Fraktionen im Western Blot analysiert (Abb. 10A). Da bei dieser Fraktionierung das Magnesium im Gradientenpuffer durch EDTA ersetzt war, ist der vom α -*Vma1p*-Antikörper erkannte vakuoläre Bereich hier etwas in Richtung der leichteren Fraktionen verschoben. Deutlich ist zu erkennen, dass die Verteilung des 3xHA-markierten

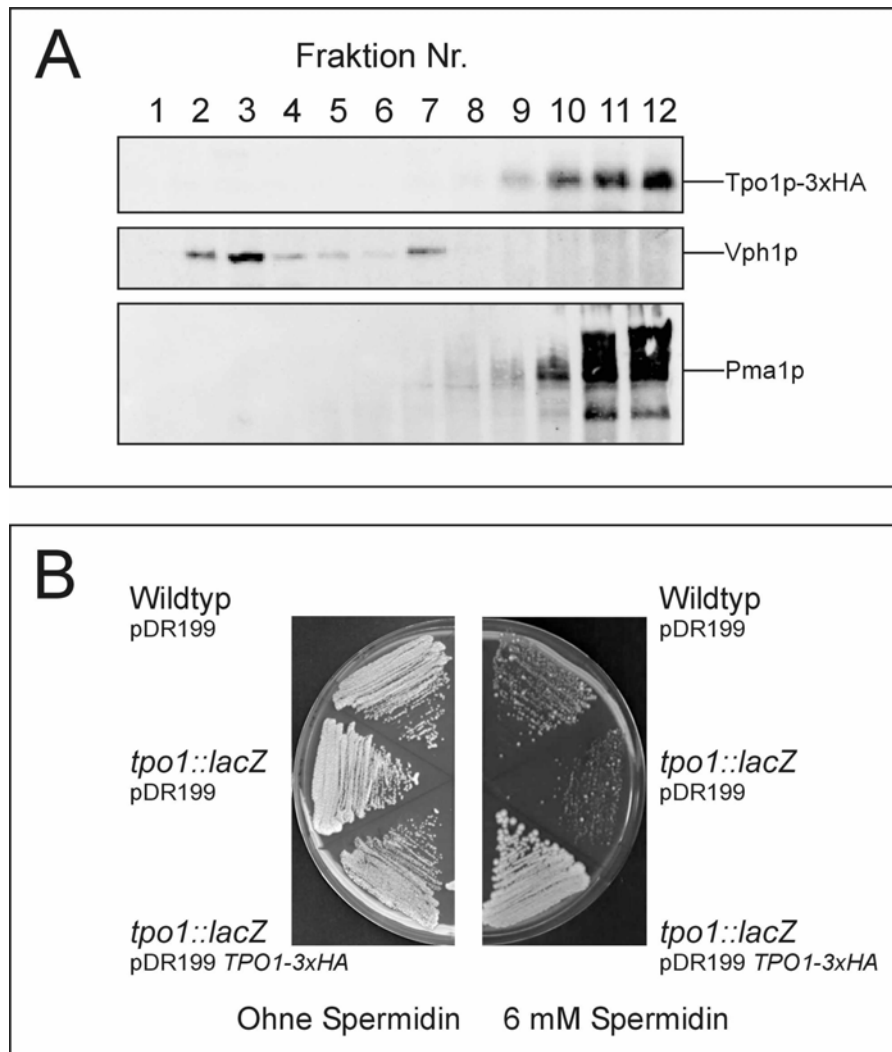


Abb. 10: Tpo1p ist in der Plasmamembran lokalisiert. A: Subzelluläre Verteilung der 3xHA-markierten Tpo1p-Fusion. Ein Zellysate des Stammes RK 25 wurde mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert und die einzelnen Fraktionen immunologisch analysiert. Man erkennt, dass die Verteilung von Tpo1p-3xHA der Verteilung der Plasmamembran-ATPase Pma1p entspricht. B: Funktionalität der Tpo1p-3xHA-Fusion. Gezeigt ist das Wachstum von Wildtyp (23344c) und *tpo1::lacZ*-Mutanten, jeweils mit dem Leervektor pDR199 transformiert, sowie das Wachstum der *tpo1::lacZ*-Mutante, transformiert mit einem Plasmid, das die *TPO1-3xHA*-Genfusion überexprimiert. Das Wachstum wurde getestet auf SD Ura⁻ Festmedium dem 6 mM Spermidin zugesetzt wurden (rechts). Um zu kontrollieren, ob alle Stämme ohne Spermidinstress gleichmäßig wachsen, wurden die Zellen ebenfalls auf SD Ura⁻ ohne Spermidin ausgestrichen (links).

Tpo1p genau der Verteilung des Plasmamembran-Markers Pma1p entspricht. Damit konnte gezeigt werden, dass die Tpo1p-3xHA-Fusion in der Plasmamembran lokalisiert ist.

Um eine Fehllokalisierung der Proteinfusion auszuschließen, wurde deren Funktionalität bestimmt. Hierzu wurde die Beobachtung genutzt, dass Stämme ohne funktionelles *TPO1*-Gen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Polyaminen aufweisen (Tomitori *et al.*, 1999). Dieser Effekt ist besonders gut zu beobachten, wenn im Wachstumsmedium die

Magnesiumkonzentration auf 50 μM limitiert wird, da diese Bedingung zu einer erheblich erhöhten Empfindlichkeit gegenüber dem Medium zugesetzten Polyaminen führt (Maruyama *et al.*, 1994). Der wahrscheinliche Grund für dieses Phänomen liegt in dem hemmenden Effekt von Magnesiumionen auf den Polyaminimport von Hefezellen. Wird diese Hemmung aufgrund von Magnesiumlimitation vermindert, kommt es zu einer starken intrazellulären Akkumulation extern zugesetzter Polyamine, was die verstärkte Empfindlichkeit der Zellen erklärt. Es wurde untersucht, ob eine plasmidkodierte Version des 3xHA-markierten *TPOI*-Gens in der Lage ist, den oben beschriebenen Hypersensitivitäts-Phänotyp der *TPOI*-Deletionsmutante aufzuheben oder wenigstens zu vermindern. Hierzu wurde das Plasmid pDR199 *TPOI-3xHA* in den *tpo1::lacZ*-Stamm RK 26 transformiert. Von diesem Plasmid wird die *TPOI-3xHA*-Fusion unter Kontrolle des relativ starken *PDR1*-Promotors exprimiert. Anschließend wurde das Wachstum der erhaltenen Hefe auf Magnesium-limitiertem Minimalmedium in Gegenwart von 6 mM Spermidin getestet und mit dem Wachstum von Wildtyp- und *tpo1::lacZ*-Zellen, jeweils mit dem Leervektor transformiert, verglichen (Abb. 10B). Es zeigte sich, dass die Spermidintoleranz nach Transformation des *TPOI-3xHA*-Konstruktes erheblich erhöht war, was auf Funktionalität der plasmidkodierten Proteinfusion schließen lässt. Das stärkere Wachstum, verglichen mit dem Wildtypstamm, deutete an, dass es unter Kontrolle des *PMA1*-Promotors zu einer Überexpression kam. Da die Funktionalität des 3xHA-markierten Tpo1p nachgewiesen wurde, kann man schließen, dass die Lokalisierung dieser Fusion in der Plasmamembran der Lokalisierung des unmodifizierten Tpo1-Proteins entspricht.

3.3.3 Die Sperminaufnahmerate ganzer Zellen wird nicht durch *TPOI*-Deletion vermindert

Da Tpo1p eindeutig in der Plasmamembran lokalisiert ist, sollte dieser Transporter dort entweder am Import oder am Export von Polyaminen beteiligt sein. Da bislang in der Literatur äußerst widersprüchliche Aussagen darüber vorlagen, ob eine Deletion des *TPOI*-Gens einen Einfluss auf die Polyaminimportrate hat (s. Einleitung), wurde die Sperminaufnahmerate vom Wildtyp und den *tpo1::lacZ*-Stamm RK 26 bei einer Sperminkonzentration von 100 μM bestimmt. Spermin wurde deshalb gewählt, weil, nach den Aussagen einer Publikation (Tomitori *et al.*, 2001) ein Unterschied in der Sperminaufnahmerate ganzer Zellen zwischen Wildtyp und einer *TPOI*-Deletionsmutante gemessen wurde. Da außerdem eine Deletion des *TPOI*-Gens deutlich die Spermin-

Sensitivität von Hefezellen erhöht (Tomitori *et al.*, 1999), sollte diese Substanz ein Substrat dieses Transporters sein.

Die Sperminaufnahme ganzer Zellen war über den beobachteten Zeitraum von 15 min linear. Es konnten jedoch keine Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Sperminaufnahme zwischen Wildtyp- und *tpo1::lacZ*-Zellen festgestellt werden (Abb. 11). Bei beiden Stämmen lag die beobachtete Importrate im Bereich von etwa 1,2 nmol/mg BTM*min. Somit konnte kein Hinweis auf eine Beteiligung von Tpo1p am Sperminimport über die Plasmamembran gefunden werden.

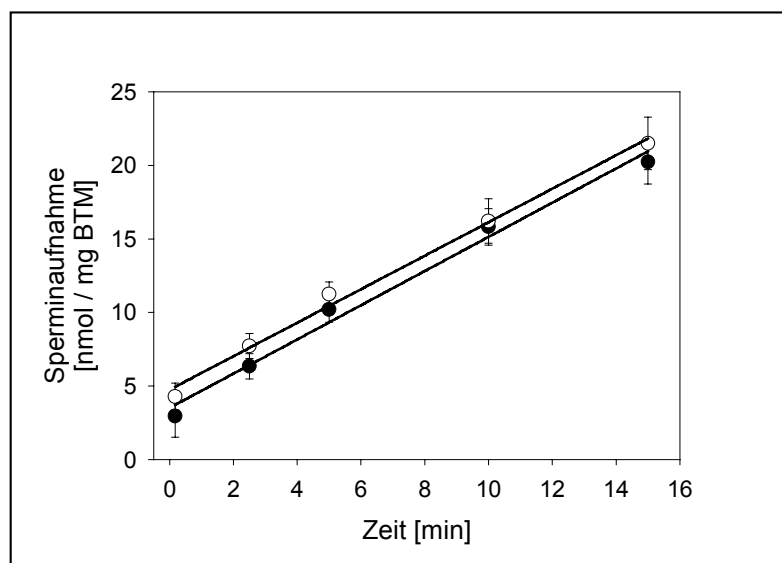


Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der Sperminaufnahme von Wildtyp- (●) und *tpo1::lacZ*-Zellen (○) bei einer externen Sperminkonzentration von 100 μ M. Gezeigt ist der Mittelwert aus fünf Messungen sowie die Standardabweichung (Fehlerbalken).

3.3.4 Hefezellen geben während des fermentativen Wachstums Putrescin in das umgebende Medium ab

Da die Deletion des *TPO1*-Gens eine erhöhte Sensitivität der betroffenen Hefezellen gegenüber Polyaminen bewirkt, auf der anderen Seite, dessen Überexpression die Toleranz der Zellen gegenüber diesen Verbindungen erhöht, ist eine Beteiligung von Tpo1p an der Entgiftung überschüssiger Polyamine wahrscheinlich. Diese Entgiftung kann theoretisch entweder in die Vakuole oder in das extrazelluläre Medium erfolgen.

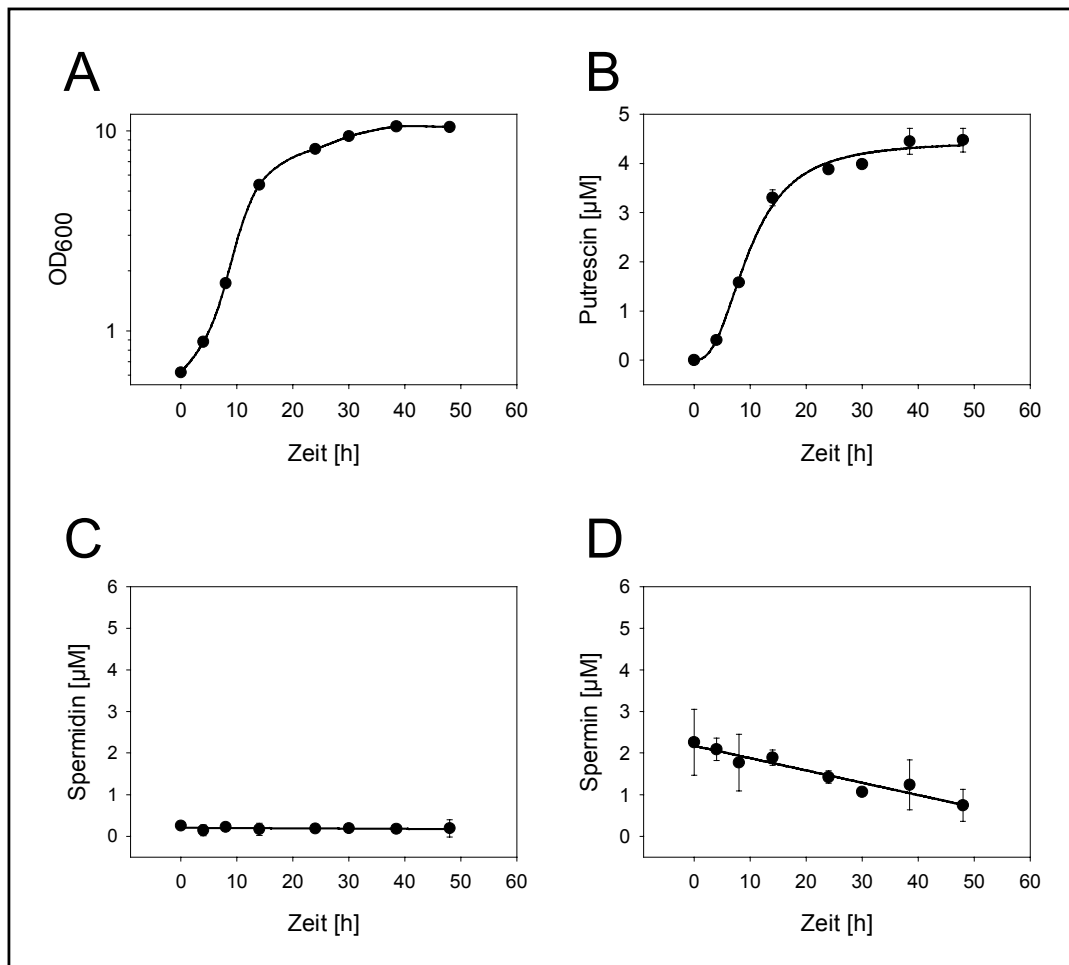


Abb. 12: Wachstumsabhängige Abgabe von Putrescin in der fermentativen Wachstumsphase. A: Zeitlicher Verlauf des Wachstums von Wildtyp-Zellen (23344c). Gezeigt ist die Änderung der OD₆₀₀ während des Wachstums. B: Putrescin, C: Spermidin und D: Spermin im Medium während des Wachstums der Wildtyp-Zellen.

Für eine Reihe von Mikroorganismen wurde ein wachstumsabhängiger Export von Putrescin in das umgebende Medium beschrieben (Schiller *et al.*, 2000; Davis und Ristow, 1989). Die physiologische Signifikanz dieses Phänomens ist noch weitgehend unklar; wahrscheinlich ist jedoch eine Regulation der intrazellulären Konzentration dieses Schlüsselmetabolits der Polyaminbiosynthese (Igarashi und Kashiwagi, 2000). Da in der Literatur bislang noch keine Daten darüber vorliegen, ob auch die Bäckerhefe dieses Exkretionsverhalten zeigt, wurde dies zunächst überprüft, um im Folgenden zu untersuchen, ob Tpo1p an diesem Prozess beteiligt sein könnte.

Es wurden Wildtypzellen in Succinat-gepuffertem CBS-Medium auf eine optische Dichte von OD₆₀₀ = 0,5 inokuliert und bis zum Erreichen der stationären Phase bei 30 °C unter Schütteln

inkubiert. Das Wachstum des Stammes wurde durch Bestimmen der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt, gleichzeitig wurde in definierten Zeitabständen der Polyamingehalt des Mediums bestimmt (Abb. 12). Nach etwa 20 h war der diauxische Übergang von fermentativer zu respiratorischer Wachstumsphase erreicht. Die optische Dichte der Kultur lag dabei bei etwa $OD_{600} = 7$. Die Putrescinkonzentration im Medium stieg bis zum Erreichen dieses Übergangs parallel zum Wachstum der Zellen stetig an und blieb dann auf einem konstanten Niveau von ca. $4 \mu\text{M}$ (Abb. 12B). Spermidin wurde nicht abgegeben (Abb. 12C). Bei der Bestimmung der Sperminkonzentration im Medium zeigte sich, dass das Medium schon zu Beginn des Experiments mit ca. $2 \mu\text{M}$ Spermin kontaminiert war. Im Verlauf des Wachstums der Zellen sank die Sperminkonzentration auf etwa $1 \mu\text{M}$, was auf eine Aufnahme dieser Substanz schließen lässt (Abb. 12D). Da der K_m -Wert des hochaffinen Polyamin-Aufnahmesystems bei etwa $(6 \pm 4) \mu\text{M}$ liegt (Maruyama *et al.*, 1994), kann ein solcher Transport auch bei dieser geringen Konzentration leicht stattfinden. Um Klarheit darüber zu gewinnen, warum der Putrescinefflux auf die fermentative Wachstumsphase beschränkt ist, wurde der intrazelluläre Polyamingehalt von Wildtypzellen in der frühen logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 1$) und von Zellen, die sich im diauxischen Übergang befanden ($OD_{600} = 7$; vgl. Hans *et al.*, 2001) bestimmt (Abb. 13). Während der

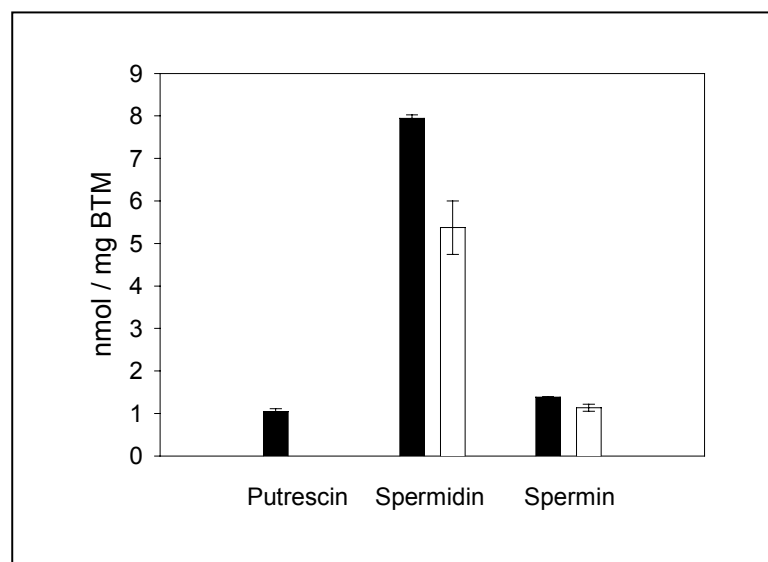


Abb. 13: Gesamt-Polyamingehalt von Wildtyp-Zellen (23344c) in der früh-logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 1$, schwarze Balken) und während des diauxischen Übergangs ($OD_{600} = 7$, weiße Balken). Die Bestimmung erfolgte jeweils in drei voneinander unabhängigen Kulturen.

Spermingehalt der Zellen in beiden Fällen gleich war, war der Spermidinegehalt im diauxischen Übergang verglichen mit den Zellen in der früh-logarithmischen Phase um etwa 25 % verringert. Interessanterweise war Putrescin in Zellen der Übergangsphase nicht mehr nachweisbar, was das Einstellen der Putrescinexkretion in dieser Phase erklärt.

3.3.5 Der Export von Putrescin fermentativ wachsender Hefezellen ist nach *TPO1*-Deletion unverändert

Um herauszufinden, ob Tpo1p am Putrescinexport fermentativ wachsender Hefezellen beteiligt sein könnte, wurden Wildtyp- und *tpo1::lacZ*-Stamm (RK 26) in Succinat-gepuffertem CBS-Medium auf jeweils $OD_{600} = 0,5$ inokuliert und bei 30 °C bis zum Erreichen der stationären Phase unter Schütteln inkubiert. Der Polyamingehalt des Mediums wurde dabei wieder mittels RP-HPLC verfolgt. Das Wachstum der beiden Stämme, gemessen an der optischen Dichte der Flüssigkulturen, war identisch (Abb. 14A). Die Abgabe von Putrescin in das umgebende Medium war auch in der *tpo1::lacZ*-Mutante zu beobachten und weder im Bezug auf die Exportrate, noch bezüglich der maximal im Medium erreichten Putrescinkonzentration von der Abgabe des Wildtypstammes zu unterscheiden (Abb. 14B). Somit konnte kein Hinweis auf eine Beteiligung von Tpo1p am wachstumsabhängigen Putrescinexport gefunden werden.

Um zu kontrollieren, ob eine Beteiligung von Tpo1p am Putrescinexport nach Erhöhung der intrazellulären Putrescinkonzentration nachweisbar ist, wurden Zellen in Gegenwart von 10 mM Putrescin in Succinat-gepuffertem CBS-Medium angezogen und der Putrescinausstrom nach Resuspendieren in Amin-freiem Medium verfolgt. Der intrazelluläre Putrescingehalt war unter diesen Bedingungen um etwa das fünffache erhöht. Bezüglich des Putrescineffluxes wurde eine relativ starke statistische Streuung beobachtet; es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen Wildtyp und *tpo1::lacZ*-Mutante festgestellt werden (nicht gezeigt).

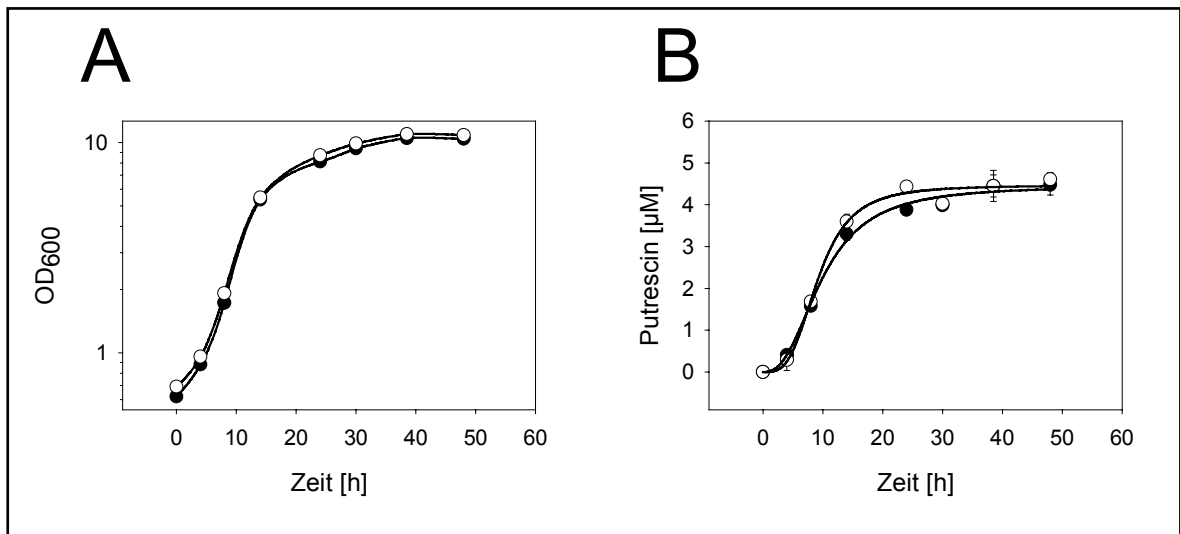


Abb. 14: Wachstumsabhängiger Putrescineexport von Wildtyp- (●) und *tpol::lacZ*-Zellen (○). A: Wachstumskurve beider Stämme. B: Zeitlicher Verlauf der Putrescinesekretion.

3.3.6 Tpo1p ist beteiligt am Export von akkumuliertem Spermidin

Da unter normalen Wachstumsbedingungen weder Spermidin noch Spermin in das umgebende Medium abgegeben wird, wurde versucht, die intrazelluläre Konzentration dieser Substanzen zu erhöhen um damit eine Exportaktivität der Zellen zu provozieren. Da aufgrund der beobachteten Sperminkontamination im Medium (Text) die Sperminbestimmungen mit einem hohen Fehler behaftet waren, wurden die Messungen auf Spermidin beschränkt.

Wildtyp- und *tpol::lacZ*-Zellen wurden in Succinat-gepuffertem CBS-Medium, supplementiert mit 10 mM Spermidin über Nacht bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 1,5 angezogen. Unter diesen Wachstumsbedingungen akkumulierten beide Stämme Spermidin, so dass der intrazelluläre Spermidingehalt etwa um den Faktor vier erhöht war (Abb. 15B). Dieses intrazellulär angereicherte Spermidin wurde nach Resuspendieren in Polyamin-freiem Medium wieder abgegeben. Es zeigte sich dabei, dass diese Spermidinabgabe im *tpol::lacZ*-Stamm, verglichen mit dem Wildtyp, mit einer signifikant erniedrigten Rate ablief (Abb. 15A). Diese Erniedrigung war nicht auf eine geringere Vorbeladung der *TPO1*-Mutanten zurückzuführen, da beide Stämme nach Wachstum in Gegenwart von 10 mM Spermidin die gleiche intrazelluläre Spermidinkonzentration aufwiesen (Abb. 15B). Da die Messungen mit einer ziemlich hohen Standardabweichung behaftet waren, musste eine statistische

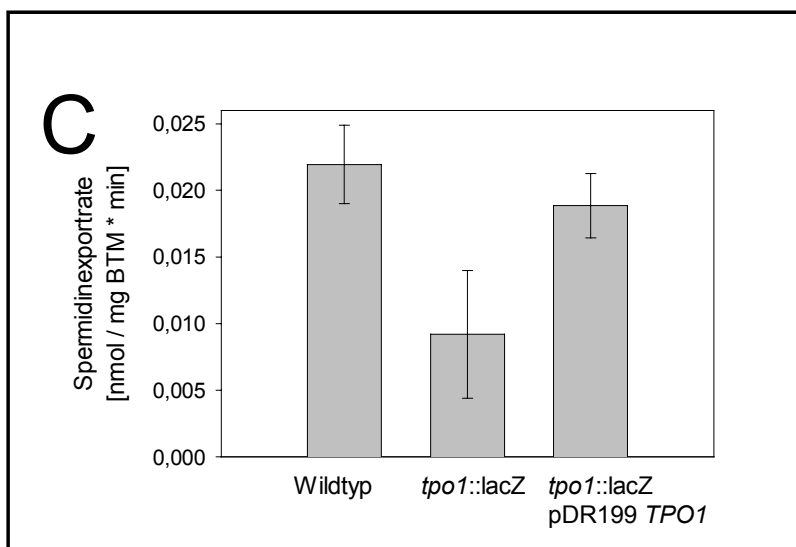
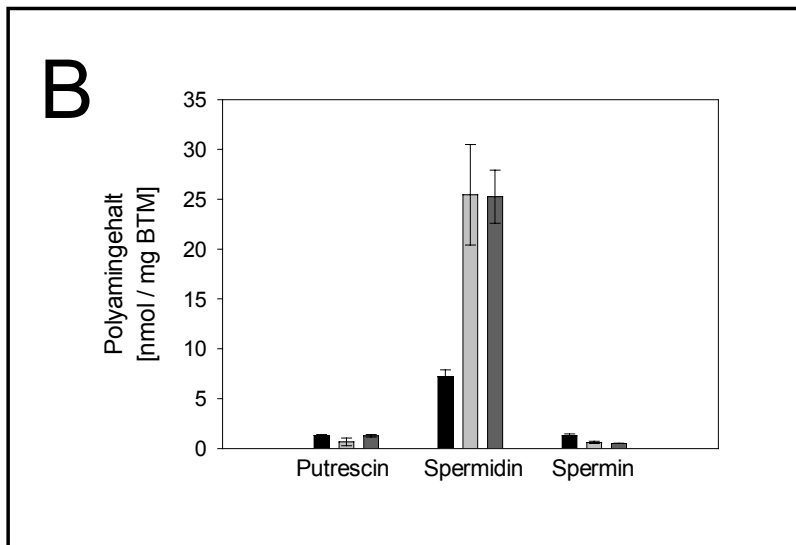
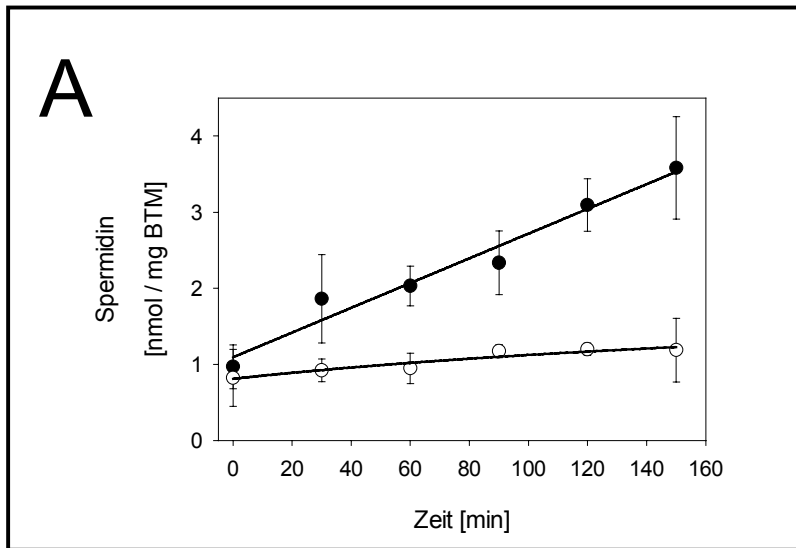


Abb. 15 (vorherige Seite): Tpo1p ist beteiligt am Export von akkumuliertem Spermidin. A: Zeitlicher Verlauf der Spermidinabgabe von Wildtyp- (●) und *tpo1::lacZ*-Zellen (○). Die Zellen wurden durch Wachstum in Gegenwart von 10 mM Spermidin vorbeladen und anschließend in Amin-freiem Medium resuspendiert. Die Spermidinexkretion wurde mittels RP-HPLC verfolgt. Gezeigt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen sowie die Standardabweichung (Fehlerbalken). B: Intrazellulärer Polyamingehalt von Hefezellen in der früh-logarithmischen Wachstumsphase. Linke Balken: Wildtyp (23344c), gewachsen in Abwesenheit von Polyaminen. Mittlere Balken: Wildtyp, gewachsen in Gegenwart von 10 mM Spermidin. Rechte Balken: *tpo1::lacZ*-Stamm, gewachsen in Gegenwart von 10 mM Spermidin. Der Polyamingehalt wurde jeweils in drei voneinander unabhängigen Kulturen bestimmt. C: Initiale Spermidinexportrate von Wildtyp-, *tpo1::lacZ*-Zellen und von *tpo1::lacZ*-Zellen transformiert mit einem Plasmid, das *TPO1* überexprimiert. Im Fall der zwei erstgenannten Stämme repräsentieren die Balken den Mittelwert von 15 unabhängigen Bestimmungen; die Exportrate des letztgenannten Stammes wurde vierfach bestimmt.

Absicherung des beobachteten Phänotyps erfolgen. Zu diesem Zweck wurde die initiale Spermidineffluxrate von Wildtyp und *tpo1::lacZ*-Stamm von jeweils 15 unabhängigen Kulturen bestimmt. Es zeigte sich hierbei, dass diese Rate im Deletionsstamm verglichen mit dem Wildtypstamm auf $(49 \pm 28) \%$ vermindert war (Abb. 15C).

3.3.7 Der beobachtete Phänotyp der *TPO1*-Deletion ist komplementierbar

Um zu bestätigen, dass der unter 3.3.7 beschriebene Exportphänotyp tatsächlich auf das fehlende *TPO1*-Gen zurückzuführen ist, wurde eine plasmidkodierte Version dieses Gens in den *tpo1::lacZ*-Stamm transformiert. Das *TPO1*-Gen wurde hierbei unter Kontrolle des *PMA1*-Promotors überexprimiert (Konstrukt pDR199 *TPO1*). Bei der Bestimmung der initialen Spermidineffluxrate nach Wachstum in Gegenwart von 10 mM Spermidin zeigte sich, dass der Stamm Spermidin mit einer dem Wildtyp vergleichbaren Rate exportiert (Abb. 15C). Dagegen zeigte der *tpo1::lacZ*-Stamm nach Transformation mit dem Leervektor (pDR199) in etwa die gleiche Spermidinexportrate, wie ohne dieses Plasmid (nicht gezeigt). Damit konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Verlangsamung des Spermidinexports in der *TPO1*-Mutante nur auf das Fehlen dieses Gens zurückzuführen ist und durch die Einführung einer funktionellen Genkopie revertiert werden kann.

Als Kontrolle, ob das plasmidkodierte *TPO1*-Gen funktionell exprimiert wird, wurde das Wachstum der transformierten *tpo1::lacZ*-Mutante in Gegenwart von 50 μ M Spermidin unter Magnesiumlimitation, wie unter 3.3.2 beschrieben, getestet. Als Vergleich dienten hierbei wieder der Wildtyp- und der *tpo1::lacZ*-Stamm, die beide mit dem Leervektor pDR199 transformiert wurden (Abb. 16). Das Wachstum des Deletionsstammes mit dem *TPO1*-Konstrukt war gegenüber den beiden mit dem Leervektor transformierten Stämmen deutlich

erhöht, woraus geschlossen werden kann, dass das plasmidkodierte Tpo1-Protein in der Zelle synthetisiert wird. Wie beim *TPO1-3xHA*-Konstrukt muss auch hier von einer Überexpression ausgegangen werden, da die Spermidintoleranz deutlich höher als beim Wildtyp lag.

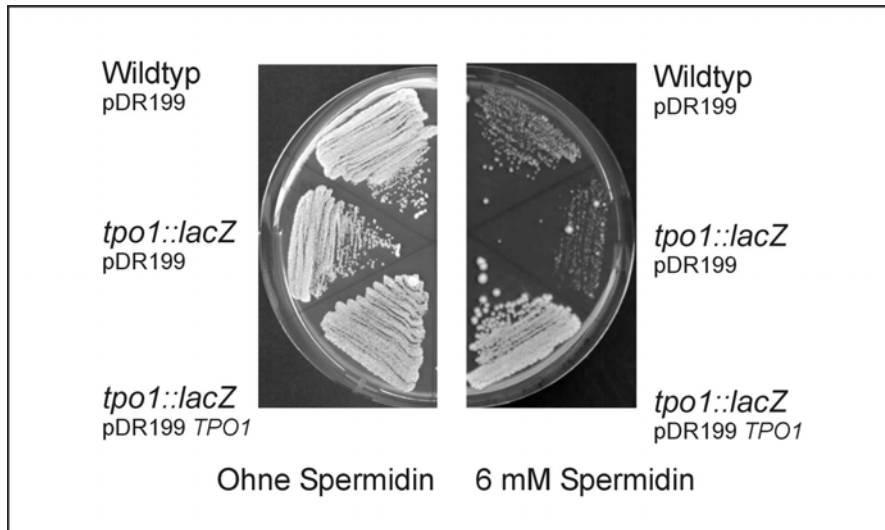


Abb. 16: *TPO1* wird vom Plasmid pDR199 *TPO1* funktionell exprimiert. Gezeigt ist das Wachstum von Wildtyp (23344c) und *tpo1::lacZ*-Mutanten, jeweils mit dem Leervektor pDR199 transformiert, sowie das Wachstum der *tpo1::lacZ*-Mutante, transformiert mit dem Plasmid pDR199 *TPO1*. Das Wachstum wurde getestet auf SD Ura⁻ Festmedium dem 6 mM Spermidin zugesetzt wurden (rechts). Um gleichmäßiges Wachstum zu kontrollieren wurden die Zellen ebenfalls auf SD Ura⁻ ohne Spermidin ausgestrichen (links).

3.4 Die Identifizierung neuer Polyamintransporter

Die Suche nach neuen Polyamintransportern in eukaryotischen Organismen hat, trotz intensiver Bemühungen während der letzten zehn Jahre, bislang zu keinen nennenswerten Erfolgen geführt (s. Einleitung). So sind z.B. Aufnahmesysteme für Polyamine (mit Ausnahme von *GPT1* aus *Candida albicans*) noch in keiner eukaryotischen Zelle molekular identifiziert worden. Innovative und auch ungewöhnliche Denkansätze sind daher vonnöten. Im Folgenden wird die Identifizierung eines gemeinsamen Sequenzmotivs bei Tpo1p, einem charakterisierten, und Ycr023p (3.2.3), einem im Rahmen dieser Arbeit identifizierten putativen vakuolären Polyamintransporter, beschrieben. Dieses Sequenzmotiv wurde verwendet, um nach neuen Transportern für Polyamine in der Bäckerhefe zu suchen.

3.4.1 Hinweise auf eine Funktion von Ycr023p als vakuolärer Polyamintransporter

Um eine Vorstellung von der Membrantopologie von Tpo1p und Ycr023p zu erhalten, wurde mit Hilfe eines *Hidden Markov* Modells die wahrscheinliche Lage der Transmembranhelices beider Proteine vorhergesagt (Krogh *et al.*, 2001). Beide Transmembranproteine zeigen nach dieser Vorhersage eine ähnliche Topologie mit jeweils 12 hydrophoben α -Helices, die vermutlich innerhalb der Membran liegen (Abb. 17). Auffallend ist bei Tpo1p die lange N-terminale Extension, die eine Reihe von putativen Phosphorylierungsstellen enthält (Tomitori *et al.*, 2001). Bei der Betrachtung der vorhergesagten cytoplasmatischen Schleifen zwischen Transmembranhelix 6 und 7 war außerdem auffallend, dass bei beiden Proteinen die unmittelbar nach Transmembranhelix 6 folgenden vier Aminosäurereste identisch waren (Sequenz: Glu-Glu-Thr-His). Diese Sequenz beinhaltet einen für die Funktion von Tpo1p essentiellen Glutamarest (Tomitori *et al.*, 2001). Diese Ähnlichkeit, in Verbindung mit der Sequenzähnlichkeit beider Proteine zum Spermidinexporter Blt aus *Bacillus subtilis* (Tomitori *et al.*, 1999) und der vakuolären Lokalisierung von Ycr023p (3.2.3) ließen vermuten, bei Ycr023p könnte es sich um einen vakuolären Polyamintransporter handeln. Bestärkt wurde diese Vermutung durch Berichte von erhöhter Resistenz gegenüber D,L-Allylglycin nach Deletion von ORF YCR023c (Bianchi *et al.*, 1999). Bei dieser Substanz handelt es sich um einen Inhibitor der Sperminsynthese, der in Maus-Fibroblasten die intrazelluläre Sperminkonzentration senkt (Huang *et al.*, 1994). Der Ausfall einer Polyamin-Transportaktivität nach Deletion des ORFs könnte eine Erklärung für den beschriebenen Resistenzphänotyp liefern: Die cytosolische Sperminkonzentration ist möglicherweise nach Deletion des ORFs leicht erhöht, wodurch die Giftwirkung des Allylglycins abgeschwächt werden könnte.

Die weitere Charakterisierung von ORF YCR023c wurde von Rolf Hecker und Inga Bellahn durchgeführt. Bei diesen Analysen konnte gezeigt werden, dass die subzelluläre Verteilung der Polyamine zwischen Cytosol und Vakuole von einer Deletion von YCR023c nicht beeinflusst wird (Hecker, 2002), sowie die Spermintransportrate und die Menge an maximal akkumuliertem Spermin bei vakuolären Vesikeln aus einer YCR023c-Deletionsmutante nicht von der von Wildtyp-Vesikeln zu unterscheiden ist (Bellahn, 2002). Somit konnten leider keine weiteren Hinweise auf eine Funktion von Ycr023p als vakuolären Polyamintransporter gefunden werden.

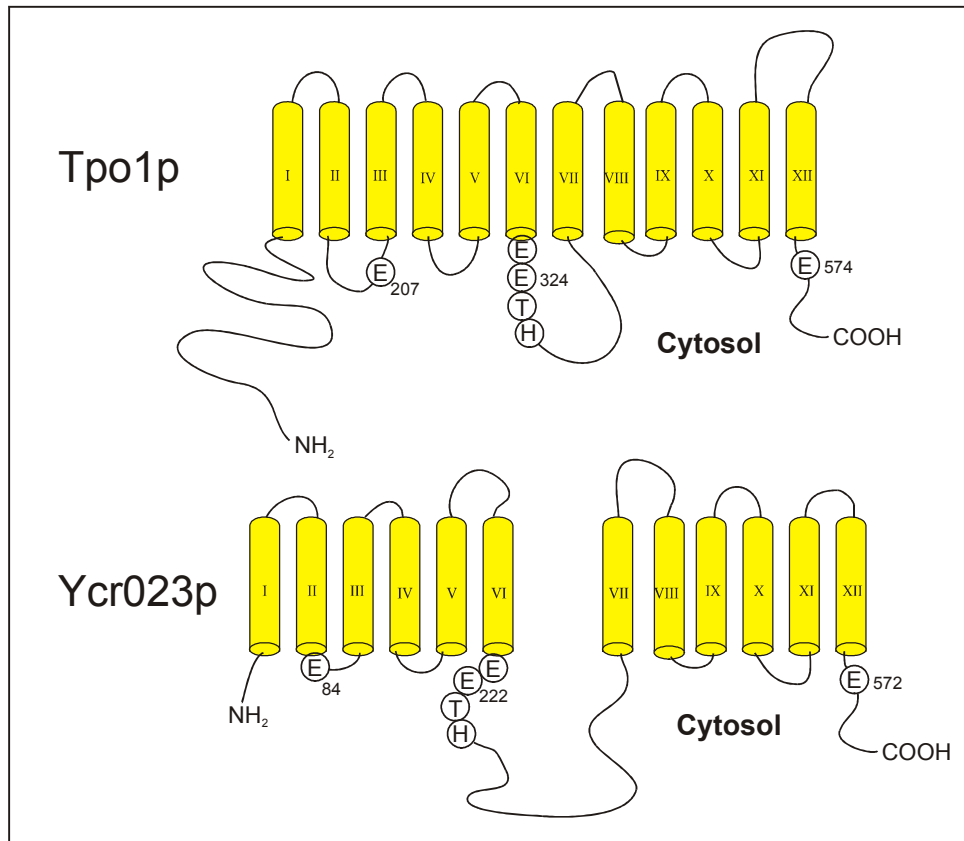


Abb. 17: Die putative Membrantopologie von Tpo1p und Ycr023p. Hervorgehoben sind in dieser Darstellung die drei für Tpo1p essenziellen Glutamatreste, sowie das EETH-Motiv.

3.4.2 Das Genprodukt von ORF YBR241c teilt mit Tpo1p und Ycr023p ein gemeinsames Sequenzmotiv

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Datenbankrecherche zur Häufigkeit des identifizierten Sequenzmotivs EETH durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass diese Sequenz nur bei insgesamt 17 Hefeproteinen vorkommt. Darunter befindet sich nur noch ein einziges Protein der *Major Facilitator Superfamily*, nämlich das Genprodukt des ORFs YBR241c. Dieses offene Leseraster kodiert für ein noch uncharakterisiertes Mitglied der *Hexose Transporter Family*. Eine Analyse der Sequenzähnlichkeit zu Tpo1p und Ycr023p mit Hilfe des Programmes FASTA ergab zu Ycr023p 32,5 % Sequenzidentität und zu Tpo1p 19,27 % Sequenzidentität, somit also keine nähere Verwandtschaft. Die Vorhersage der Membrantopologie mit Hilfe eines *Hidden Markov Modells* (Krogh *et al.*, 2001) ergab 12 putative Transmembrandomänen. Die EETH-Sequenz befindet sich auch hier in der cytoplasmatischen Schleife zwischen Helix 6 und 7, wenn auch nicht direkt im Anschluss an Helix 6 (Abb. 18). Das Vorkommen einer so seltenen Sequenz in einem nicht näher mit

Tpo1p und Ycr023p verwandten Protein ließ mich die Hypothese aufstellen, beim Ybr241-Protein könnte es sich um einen Polyamintransporter handeln. Da alle bislang charakterisierten Mitglieder der *Hexose Transporter Family* offensichtlich in der Plasmamembran lokalisiert sind (Wieczorke et al., 1999), erschien mir eine Beteiligung am Plasmamembrantransport hier am wahrscheinlichsten.

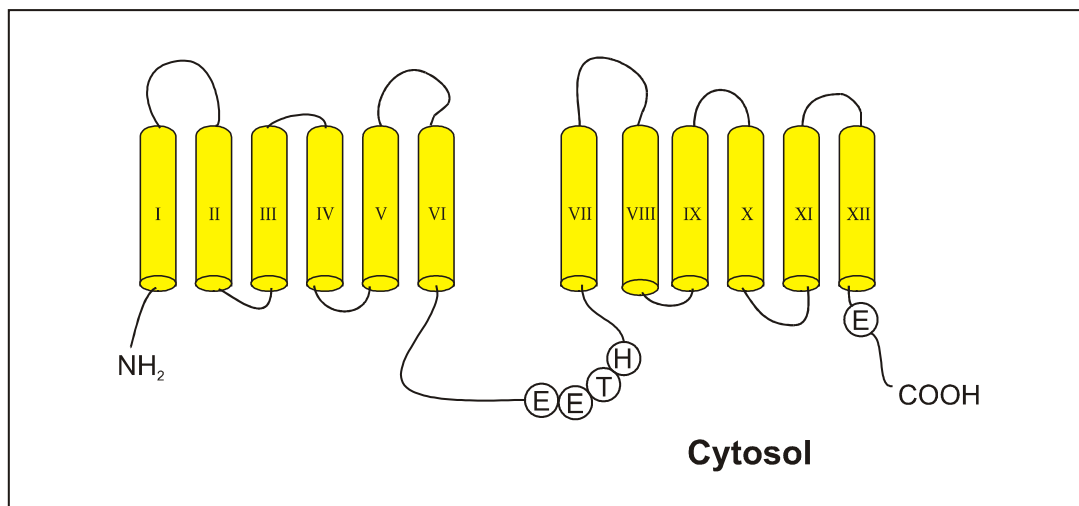


Abb. 18: Die putative Membrantopologie von Ybr241p. Hervorgehoben sind das EETH-Motiv, sowie ein Glutamatrest, das sich an ähnlicher Position befindet, wie ein für Tpo1p essenzielles Glutamat.

3.4.3 Deletion von YBR241c führt nicht zu einer Verringerung der Sperminimportrate ganzer Zellen

Um herauszufinden, ob Ybr241p am Polyaminimport über die Plasmamembran beteiligt sein könnte, wurde schließlich ein Hefestamm isoliert, in dem ORF YBR241c durch ein *loxP-kanMX-loxP*-Modul ersetzt war. Es wurde die Sperminimportrate dieses Stammes bei einer externen Sperminkonzentration von 100 μM bestimmt und mit der des Wildtypstammes verglichen (Abb. 19). Die Importrate betrug bei beiden Stämmen in etwa 1,0 nmol/mg BTM*min, war also nicht voneinander zu unterscheiden.

Somit konnte kein Hinweis dafür gefunden werden, dass es sich bei Ybr241p um einen Polyamintransporter der Plasmamembran handelt.

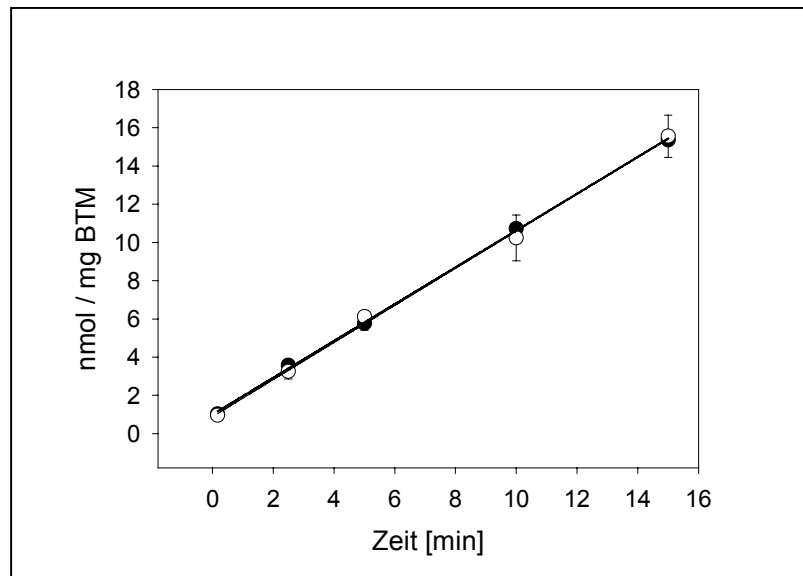


Abb. 19: Zeitlicher Verlauf der Sperminaufnahme von Wildtyp- (●) und *ybr241c::kanMX*-Zellen (○) bei einer externen Sperminkonzentration von 100 μM . Gezeigt ist der Mittelwert aus drei Messungen sowie die Standardabweichung (Fehlerbalken).

4 Diskussion

4.1 Analyse der Promotoraktivität und der Lokalisierung putativer Transportproteine

Die Sequenzierung ganzer Genome unterschiedlicher Organismen erlaubt es, komplette Inventurlisten aller putativen, in einem Organismus vorkommenden Transportproteine aufzustellen. *Saccharomyces cerevisiae* besitzt nach solchen Aufstellungen circa 250 offene Leseraster, die für vermutliche bzw. charakterisierte Transporter kodieren (Paulsen *et al.*, 1998). Die Einteilung dieser Gene in Familien und anschließende Vergleiche mit bereits bekannten Vertretern anderer Organismen ist ein wichtiges Werkzeug für die Suche nach neuen Transportern in diesem bedeutenden eukaryotischen Modellorganismus. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nach vakuolären Transportern für Metabolite in der Bäckerhefe gesucht werden.

Der Transport von Proteinen in die Vakuole findet auf drei unterschiedlichen Wegen statt. Den Hauptweg stellt dabei der sogenannte Carboxypeptidase-Y- (CPY-) Weg dar, der nach der Exopeptidase CPY benannt wurde, die gewöhnlich im vakuolären Lumen lokalisiert ist. Für dieses Protein konnte eine aus vier Aminosäuren bestehende Targeting-Sequenz charakterisiert werden (Valls *et al.*, 1990), die für die Bindung an seinen Sorting-Rezeptor Vps10p essenziell ist (Marcusson *et al.*, 1994). Allerdings scheinen sowohl die Targeting-Sequenz, als auch der Rezeptor für CPY spezifisch zu sein. Andere Sorting-Sequenzen für diesen Weg, den anscheinend die meisten vakuolären Proteine beschreiten, konnten bislang noch nicht identifiziert werden. Der zweite Transportweg, benannt nach der vakuolären alkalischen Phosphatase (ALP) wird von vakuolären Proteinen beschriftet, die in einer cytoplasmatischen Domäne zwei aufeinanderfolgende Leucinreste (bzw. ein Leucin- und ein Valinrest) besitzen, sowie an der Position -4, bezogen auf die beiden Leucinreste, ein Glutamatrest aufweisen (Darsow *et al.*, 1998). Dieses sogenannte "saure Dileucinmotiv" ist die zweite Targetingsequenz, die für vakuoläre Proteine der Bäckerhefe charakterisiert werden konnte. Bislang konnten allerdings lediglich zwei Proteine diesem Transportweg zugeordnet werden. Auch für den dritten Transportweg, den sogenannten *CVT*-Weg (*cytoplasm to vacuole targeting*, vgl. Klionsky, 1998) konnte bislang keine Konsensussequenz identifiziert werden. Die experimentelle Fahndung nach neuen vakuolären Transportern kann also nicht anhand der *in-silico*-Suche nach charakteristischen Sequenzmotiven erfolgen,

sondern sollte von der direkten Bestimmung der subzellulären Lokalisierung der mutmaßlichen Transporter ausgehen.

Zur Bestimmung dieser subzellulären Lokalisierung stehen dem Forscher eine Reihe von Methoden zur Verfügung. Eine Fusion des zu untersuchenden Proteins mit *GFP* (grün-fluoreszierendes Protein) erlaubt mittels Fluoreszenzmikroskopie die Lokalisationsbestimmung *in vivo*. Dieser Weg wurde im Rahmen dieser Arbeit aus folgenden Gründen nicht beschritten: Zum einen ist das *GFP* relativ groß, somit kann man die Gefahr der Fehllokalisierung als relativ hoch einschätzen. Zum zweiten ist für eine Lokalisierung mittels Fluoreszenzmikroskopie ein relativ hohes Expressionsniveau der zu untersuchenden Gene notwendig. Mit hoher Wahrscheinlichkeit wäre für die relativ schwach exprimierten putativen Transportergene eine Überexpression notwendig, wodurch eine weitere Gefahr der Fehllokalisierung gegeben wäre. Das dritte Gegenargument ist die fehlende technische Voraussetzung zur Fluoreszenzmikroskopie in unserem Labor. Aus diesen Gründen entschied ich mich, zusammen mit unseren Kooperationspartnern, die von uns ausgewählten mutmaßlichen Transportergene genomisch mit einem Antikörperepitop zu versehen, um die so modifizierten Gene unter Kontrolle des nativen Promotors und am natürlichen Genort zu exprimieren. Als experimentelle Methode wurde die Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation gewählt, da sie eine feine Trennung aller Organellmembranen erlaubt und somit eine präzise Lokalisierung der markierten Proteine ermöglicht.

Das primäre Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung vakuolärer Transporter für stickstoffhaltige Speichermetabolite. Im Rahmen dieser Bemühungen wurden eine Anzahl mutmaßlicher Transportproteine aus der *MDR*- und *AAAP*-Familie mit einer dreifachen HA-Epitop-Sequenz versehen, welche in mehreren Fällen die Bestimmung der subzellulären Lokalisierung erlaubte. Obwohl der Nachweis der markierten Proteine im Western Blot um einiges sensitiver ist als der Nachweis mittels Fluoreszenzmikroskopie, gelang dies jedoch nur bei einer Minderheit der untersuchten ORFs. Die Analyse der Promotoraktivität der untersuchten Gene hat klar gezeigt, dass in den meisten Fällen die Genexpression nur äußerst schwach war, zu schwach um einen Nachweis im Western Blot zu ermöglichen. Da die gemessene Promotoraktivität nicht immer mit dem Nachweis im Western Blot korrelierte (Tabelle 3), ist auch fraglich, ob die innerhalb unserer Kooperation isolierten Hefestämme in jedem Fall den korrekten Genotyp besaßen.

Da in erster Linie nach Transportern für stickstoffhaltige Metabolite gesucht wurde, war es sinnvoll, die Expression einzelner Gene unter Stickstoffmangel zu untersuchen. Der Aufbau eines vakuolären Speicherpools ist sicherlich nur dann sinnvoll, wenn ein Überschuss einer

guten Stickstoffquelle wie Ammonium oder Glutamat besteht. Kitamoto *et al.* konnten 1988 zeigen, dass es bei einem Downshift auf Medium ohne Stickstoffquelle zu einer Mobilisierung des vakuolären Aminosäurepeichers kommt. Solch eine Mobilisierung geht wahrscheinlich mit einer Inaktivierung der Aminosäureimporter einher, und auch die Expression der kodierenden Gene sollte unter Stickstoffmangel reprimiert sein. Globale Ansätze zur Bestimmung der Genexpression bei Stickstofflimitation liegen bereits vor (Gasch *et al.*, 2000), aufgrund der geringen Abundanz der mRNA-Moleküle der von uns untersuchten Transporter sind jedoch vorliegende Daten, die mit Hilfe von Micro-Arrays ermittelt worden sind, wenig hilfreich. Aus diesem Grund wurde in einem generellen Ansatz die Promotoraktivität bei Stickstoffüberschuss und –mangel bestimmt. Dabei konnten tatsächlich einige ORFs gefunden werden, bei denen die entsprechenden Promotor-lacZ-Fusionen auf eine Inaktivierung der Promotoren bei Stickstoffhunger schließen ließen. Interessanterweise befand sich unter diesen Genen YGR138c (*TPO2*), der für einen mutmaßlichen Polyaminexporter kodiert. Die Drosselung der Aktivität dieses Plasmamembran-ständigen Transporters bei einem Mangel an Stickstoff macht in diesem Fall durchaus Sinn, sollte doch ein Exporter einer stickstoffhaltigen Substanz unter Stickstofflimitation inaktiviert werden. Aufgrund der geringen Expression konnte eine Lokalisierung nur bei fünf Mitgliedern der *MDR*-Familie durchgeführt werden. Dabei stellte sich heraus, dass eines vakuolär lokalisiert war, die vier anderen sich hingegen in der Plasmamembran befanden. Das im Rahmen dieser Arbeit als vakuoläres mutmaßliches Transportprotein klassifizierte Protein Ycr023p ist, neben Ymr088p, das bislang einzige *MDR*-Protein, dem eine vakuoläre Lokalisierung nachgewiesen werden konnte (B. André, persönliche Mitteilung). Auf die weitere Charakterisierung von Ycr023p wird in Abschnitt 4.3 der Diskussion näher eingegangen. Die vier in der Plasmamembran lokalisierten Proteine waren, neben den mutmaßlichen Polyamintransportern Tpo2p, Tpo3p und Tpo4p der bislang uncharakterisierte *MDR*-Transporter Yil121p.

4.2 Die Neucharakterisierung von Tpo1p

Die Bestimmung der subzellulären Lokalisierung eines zu untersuchenden Proteins ist ein essenzieller Bestandteil jeder Charakterisierung. Bei der systematischen Analyse putativer *MDR*-Transporter konnten 3xHA-markierte Versionen von Tpo1p-4p, die als vakuoläre Proteine postuliert waren, eindeutig in der Plasmamembran lokalisiert werden. Obwohl Proteinmodifizierungen, wie es das C-terminale Verlängern der Proteinsequenz mit einem HA-Epitop darstellt, zu Fehllokalisierung führen kann, ermutigte mich dieses Resultat, eine Neucharakterisierung von Tpo1p, dem am besten beschriebenen Polyamintransporter der

Hefe, durchzuführen und eine Beteiligung dieses Transporters am Polyamintransport über die Plasmamembran nachzuweisen. Bestärkt wurde ich dabei durch die Beobachtung, dass die HA-modifizierte Tpo1p-Version funktionell ist und somit höchstwahrscheinlich im gleichen Kompartiment wie die native Tpo1p-Version lokalisiert ist. Allerdings muss man hier einräumen, dass eine Entgiftungsfunktion sowohl von einem Transporter in der Plasmamembran, als auch von einem vakuolär lokalisierten Transporter wahrgenommen werden kann; somit also eine Fehllokalisierung in diesem Fall nicht unbedingt zu einem Ausfall der Funktion des Proteins führen muss. Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene Beteiligung von Tpo1p am zellulären Export von Spermidin sollte jedoch keinen Zweifel mehr an der Plasmamembran-Lokalisierung von Tpo1p lassen. Die Lokalisierung der übrigen TPO-Transporter allerdings basiert allein auf Daten von HA-modifizierten Versionen dieser Proteine; weitere Experimente wären daher erforderlich um eindeutige Aussagen zur Funktion von Tpo2p, Tpo3p und Tpo4p zu treffen.

Die Beobachtung, dass Tpo1p ein plasmamembranständiger Transporter ist lässt theoretisch zwei mögliche Funktionen zu: Export oder Import von Polyaminen. Da der Sperminimport ganzer Hefezellen nach *TPO1*-Deletion unverändert ist, vermutete ich, dass dieser Transporter am Polyaminexport beteiligt ist. Bestärkt wird diese Vermutung durch die Tatsache, dass *TPO1* eine erhöhte Resistenz gegenüber Polyaminen vermittelt; somit also der Export dieser Substanzen die wahrscheinlichere Funktion des kodierten Transporters ist. Der Export von Polyaminen während der Zellteilung, vor allem von Putrescin als Schlüsselmetabolit bei der Polyaminbiosynthese (s. Einleitung), wurde bei einigen Mikroorganismen, vor allem aber bei kultivierten Säugerzellen beobachtet. Für die Bäckerhefe wurde ein solches Phänomen bisher nicht beschrieben. Die bei den Untersuchungen entdeckte wachstumsabhängige Putrescinssekretion während der fermentativen Wachstumsphase war nach *TPO1*-Deletion unverändert, so dass eine Beteiligung bei diesem Export eher unwahrscheinlich erscheint. Allerdings lässt sich nicht ausschließen, dass andere Transporter nach dem Ausfall der *TPO1*-Funktion ihre Exportaktivität erhöhen und somit keine Verringerung dieser Aktivität beobachtet werden kann. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass nach dem diauxischen Übergang kein intrazelluläres Putrescin mehr nachgewiesen werden konnte. Wahrscheinlich ist der Übergang zum respiratorischen Wachstum für die Zelle ein Signal, das unter anderem eine langsame Verknappung der Kohlenstoffquelle anzeigt. Somit werden in dieser Phase vermutlich Speichermetabolite der Vakuole mobilisiert und die Biosynthese generell auf das Notwendigste beschränkt. Ein Einstellen der

Polyaminbiosynthese würde logischerweise einhergehen mit einer drastischen Verringerung der intrazellulären Putrescinkonzentration.

Ein Problem bei der Bestimmung von sekretiertem Polyamin stellte die Kontamination des Mediums mit Spermin dar, die nicht zu vermeiden war. Die Schwierigkeit, völlig Amin-freie Medien herzustellen ist in diesem Zusammenhang bekannt und wurde bereits von einer anderen Arbeitsgruppe beobachtet (Balasundaram *et al.*, 1991). Möglicherweise spielt der Reinheitsgrad der verwendeten Chemikalien hierbei eine entscheidende Rolle. Auch der Vorgang des Autoklavierens wird in diesem Zusammenhang als mögliche Quelle für Verunreinigungen diskutiert (Balasundaram *et al.*, 1991), kommt allerdings in meinem Fall nicht Betracht, da das in dieser Arbeit für die Exportmessungen verwendete Medium stets durch Filtrieren sterilisiert wurde.

Neben der oben beschriebenen physiologischen Putrescinexkretion existieren in der Zelle weitere Mechanismen zur Entgiftung überschüssiger Polyamine. Wenn Zellen beispielsweise in Gegenwart hoher Polyaminkonzentrationen wachsen, muss ein Mechanismus zur Entgiftung dieser überschüssigen Polyamine existieren, die zunächst aufgrund der Aktivität von Importern in die Zelle gelangen. Eine Möglichkeit für eine solche Entgiftung, die auch von der Zelle genutzt wird, ist der Transport in die Vakuole. Da jedoch diese Form der Entsorgung mit einer Anreicherung der potenziell toxischen Substanzen in der Vakuole einhergeht, ist diese Möglichkeit recht energieaufwendig. Der Export in das extrazelluläre Milieu stellt da sicherlich die energetisch sinnvollere Variante der Entgiftung dar. Beim Versuch, eine Beteiligung von Tpo1p an einem solchen Prozess nachzuweisen, wurden Hefezellen in Gegenwart von Polyaminen angezogen. Anschließend wurde der Efflux dieser Substanzen nach Resuspendieren in Amin-freiem Medium verfolgt. Dabei konnte eindeutig festgestellt werden, dass die Abgabe von Spermidin nach entsprechender Vorbeladung von einer *TPOI*-Deletion negativ beeinflusst wird. Die beobachtete Verlangsamung des Spermidin-Effluxes war statistisch signifikant und konnte durch die Transformation eines Tpo1p-kodierenden Plasmids komplementiert werden. Damit konnte bewiesen werden, dass der beobachtete Phänotyp der *tpo1::lacZ*-Mutante RK 26 eine direkte Konsequenz des fehlenden *TPOI*-Gens ist und nicht etwa auf unspezifische Genschäden, wie sie während einer Hefetransformation mitunter auftreten, zurückzuführen ist.

Eine wichtige Frage, die in diesem Zusammenhang diskutiert werden sollte ist, weshalb die Exportaktivität, trotz Überexpression des *TPOI*-Gens, nur auf das Wildtypniveau steigt, während doch das Plasmid die Spermidintoleranz der *tpo1::lacZ*-Mutante bei den Wachstumstests auf festem Medium sehr viel stärker als auf Wildtypniveau steigern lässt.

Höchstwahrscheinlich ist dies eine Folge der unterschiedlichen experimentellen Bedingungen: Die Funktionalität des *TPOI*-Konstruktes wurde unter Magnesiummangel getestet. Bei dieser Bedingung kommt es zu einer erheblich verstärkten Aufnahme extern zugesetzter Polyamine, die höchstwahrscheinlich die intrazelluläre Konzentration dieser Verbindungen viel stärker erhöht als es bei den Exportmessungen der Fall war. Beide Experimente sind somit nicht direkt vergleichbar.

Die Daten, die in dieser Arbeit präsentiert werden, lassen den Schluss zu, dass *Tpo1p* an der Entgiftung von überschüssigem Spermidin beteiligt ist. Diese Beobachtung ist interessant im Kontext einiger kürzlich erschienener Publikationen, nach denen dieser Transporter die Resistenz gegen so verschiedene Substanzen wie Chinidin und Cycloheximid (do Valle Matta *et al.*, 2001), Mycophenolsäure (Desmoucelles *et al.*, 2002), sowie die Herbizide 2-Methyl-4-chlorphenoxyessigsäure und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (Teixeira und Sa-Correia, 2002) vermittelt. Eine ähnlich breite Substratpalette wurde auch für andere *multi drug* Transporter wie dem Transporter *Blt* aus *Bacillus subtilis* beschrieben, der auch in der Lage ist, Spermidin aus der Zelle zu exportieren (Woolridge *et al.*, 1997). Im Fall dieses Transporters lässt die Organisation des entsprechenden Gens, nämlich seine Assoziation mit einem Gen für ein Spermidin-acetylierendes Enzym im gleichen Operon sogar auf eine primäre Funktion bei der Spermidin-Entsorgung schließen. Da *Saccharomyces cerevisiae* keine Polyamin-Acetylasen besitzt, somit also Polyamine nicht abbauen kann, bildet der Transport in diesem Organismus die einzige Entgiftungsmöglichkeit überschüssiger Mengen an Polyaminen. *Tpo1p*, und vermutlich auch die übrigen drei *TPO*-Transporter, sind wohl für diese Aktivität in der Bäckerhefe verantwortlich. Es wäre interessant zu untersuchen, ob eine Deletion aller vier *TPO*-Transporter die Polyaminexportaktivität vollständig unterbindet.

4.3 Die Suche nach neuen Polyamintransportern in der Bäckerhefe

Polyamine stellen essenzielle Substanzen in allen lebenden Zellen dar. Ihr ubiquitäres Vorkommen, zusammen mit der bemerkenswerten evolutiven Konservierung der Regulationssysteme ihrer Biosynthese (Ivanov *et al.*, 2000) unterstreichen nachdrücklich die physiologische Bedeutung dieser Substanzen. Besondere Relevanz besitzen Polyamine für schnell proliferierende Zellen. Eine signifikant erhöhte Rate der Polyaminbiosynthese wurde für eine Reihe von Tumorzellen beschrieben (Khuhawar und Qureshi, 2001), ebenso eine verstärkte Polyamin-Aufnahmeaktivität (Grillo und Colombatto, 1994). Schätzungen zufolge könnte eine Inhibition der Ornithin-Decarboxylase zusammen mit der Blockierung von Polyamin-Aufnahmesystemen eine effektive Strategie für die Behandlung von bis zu 95 %

der im Menschen anzutreffenden Krebsformen sein (Patel und Wang, 1997; Clément *et al.*, 1995). Die Identifizierung von Polyamin-Aufnahmesystemen in Eukaryoten ist daher, gerade in Hinblick auf mögliche Nutzen in der Krebstherapie, ein wichtiger Gegenstand in der derzeitigen Forschung. Entsprechende Untersuchungen in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* könnten auch hier Paradigmen für Eukaryoten schaffen.

Experimentelle Strategien bei der Suche nach Polyaminimportern bei Hefen waren zum einen die Suche nach Mutanten, die in der Lage sind, in der Gegenwart toxischer Polyaminanaloga zu wachsen, zum anderen die Suche *in silico* anhand von Sequenzähnlichkeiten zu bekannten prokaryotischen Polyamintransportern. Bei der ersten Strategie wurde vorausgesetzt, dass die Polyamin-ähnlichen Toxine, die zumeist die Enzyme der Polyamin-Biosynthese kompetitiv inhibieren, über die gleichen Transporter in die Zelle gelangen wie die Polyamine selbst. Man hoffte, dabei Mutanten zu finden, bei denen die Polyaminaufnahme gestört ist. Diese Strategie hat bei *Saccharomyces cerevisiae* zur Identifizierung von vier Ser/Thr-spezifischen Proteinkinasen geführt, die den Polyaminimport positiv regulieren. Vermutlich ist es die Redundanz der Importsysteme, die eine Identifizierung über einen genetischen Screen bisher verhindert hat. Die letztere Strategie hat bislang lediglich die Identifizierung der vier *TPO*-Transporter ermöglicht (s. 4.2), wobei hier nach Ähnlichkeiten zum Spermidin-Exporter Blt aus *Bacillus subtilis* gesucht wurde. Weitere Möglichkeiten für *in-silico*-Studien sind begrenzt, da Polyaminimport bei Prokaryoten im Wesentlichen mittels ABC-Transporter erfolgt (in erster Linie dem potABCD-System), während der Polyaminimport der Hefe von einer funktionierenden Plasmamembran-ATPase abhängt, somit also sekundäre Transportsysteme für diese Aktivität verantwortlich sein müssen (Erez und Kahana, 2001). Die Entdeckung einer vermutlichen Polyamin-Transportaktivität des Plasmamembran-Transporters Gpt1p in *Candida albicans* führte auch zu keinen neuen Möglichkeiten in dieser Hinsicht. In *Saccharomyces cerevisiae*, einem nahen Verwandten von *C. albicans*, existiert zwar ein GABA-Transporter, der eine geringe Ähnlichkeit zu Gpt1p aufweist. Für diesen Transporter (Uga4p, vgl. André *et al.*, 1993) wurde allerdings bislang keine Funktion als Polyaminimporter beschrieben. Beide in den letzten Jahren verfolgten Strategien haben also, zumindest in Bezug auf die Identifizierung der Polyaminimporter in *S. cerevisiae*, in Sackgassen geführt, so dass alternative Ansätze angezeigt sind.

Eine Reihe von Hinweisen sprechen für eine Funktion von Ycr023p als vakuolären Polyamintransporter: Neben der Ähnlichkeit zum Spermidinexporter Blt ist hierbei vor allem die Allylglycin-Resistenz der Deletionsmutante zu nennen. Allerdings ist Allylglycin eine Substanz mit mehreren unterschiedlichen toxischen Wirkungen auf die Zelle. Neben der

bereits erwähnten Hemmung der Sperminsynthese, sei hier noch als Beispiel die Wirkung als Cysteinanalog genannt (Zheng *et al.*, 1994). Der beschriebene Resistenzphänotyp der YCR023c-Deletionsmutante muss also nicht unbedingt auf einer eingeschränkten Spermintransportaktivität der Vakuolenmembran zurückzuführen sein. Diese Einschätzung wird bestätigt durch die weitere Charakterisierung dieses vakuolären Transporters, die von Inga Bellahn und Rolf Hecker durchgeführt wurde. Weder bei der Untersuchung der subzellulären Polyaminverteilung zwischen Cytosol und Vakuole, noch bei der Messung der Spermin-Aufnahmeaktivität isolierter vakuolärer Vesikel konnte ein Einfluss der Deletion dieses ORFs auf die untersuchten Parameter festgestellt werden. Ebenso unverändert war die Verteilung der Aminosäuren zwischen Cytosol und Vakuole (Hecker, 2002). Sicherlich ist es möglich, dass eine Redundanz der vakuolären Aufnahmesysteme die fehlende Ycr023p-Aktivität in der Deletionsmutante verschleiert; weitere Aufnahmemessungen an vakuolären Vesikeln mit einer entsprechenden Überexpressionsmutante könnten zur Klärung dieser Frage beitragen.

Bei einem Vergleich der Aminosäuresequenzen von Tpo1p und Ycr023p fiel auf, dass die Sequenz unmittelbar im Anschluss der sechsten mutmaßlichen Transmembrandomäne über vier Aminosäurereste identisch war (EETH-Sequenz). Kashiwagi *et al.* konnten 2000 beim Putrescintransporter PotE aus *Escherichia coli* drei Glutamatreste identifizieren, die für die Funktion von PotE essenziell sind und vermutlich bei der Substratbindung eine Rolle spielen. Insbesondere das mittlere der drei Glutamatreste, das unmittelbar der sechsten Transmembranhelix folgt, scheint einen starken Einfluss auf die Transportaktivität von PotE zu besitzen. Glutamatreste befinden sich auch bei Tpo1p und Ycr023p an ähnlichen Stellen (Igarashi und Kashiwagi, 2001 und eigene Beobachtung), und im Fall von Tpo1p gibt es Hinweise auf die Bedeutung dieser Aminosäurereste für die Funktionalität dieses Proteins (Tomitori *et al.*, 2001). Eines dieser essenziellen Glutamatreste (das mittlere) ist Teil der von mir identifizierten EETH-Sequenz. Ein generelles Sequenzmerkmal für Polyamintransporter der Hefe kann dieses Motiv sicherlich nicht sein, da Tpo2p, Tpo3p und Tpo4p diese Sequenz nicht besitzen; dennoch könnte diese Sequenzähnlichkeit im Kontext einer essenziellen Aminosäure auf eine ähnliche Funktion der beiden Transporter hinweisen.

Eine interessante Beobachtung stellt die relative Seltenheit der EETH-Sequenz dar. Bei einer entsprechenden Datenbankrecherche konnte festgestellt werden, dass diese Sequenz nur noch bei einem einzigen weiteren Protein der *Major Facilitator Superfamily* vorkommt; einem nicht näher charakterisiertem Mitglied der *Hexose Transporter Family*. Die Tatsache, dass ein relativ seltenes Sequenzmotiv bei nicht näher miteinander verwandten *MFS*-Proteinen an

ähnlicher Stelle auftaucht ließen mich vermuten, bei diesem Protein, Ybr241p, könnte es sich ebenfalls um einen Polyamintransporter handeln. Obwohl die Wahrscheinlichkeit, dass ein putativer Hexosetransporter Polyamine transportiert eher als gering einzuschätzen ist, entschloss ich mich, angesichts der Wichtigkeit des Forschungsgegenstands, diese Möglichkeit dennoch zu überprüfen. Leider liegen keine Daten zur subzellulären Lokalisierung dieses Proteins vor. Ich überprüfte daher lediglich, ob Ybr241p am Polyaminimport über die Plasmamembran beteiligt sein könnte. Um Hinweise darauf zu finden, wurde eine YBR241c-Deletionsmutante isoliert und die Sperminaufnahmeaktivität dieser Mutante mit dem Wildtyp verglichen. Die Aufnahmeleistungen beider Stämme waren nicht voneinander zu unterscheiden. Auch hier muss man die Möglichkeit einräumen, dass eine Redundanz in den Transportsystemen eine Beteiligung von Ybr241p bei den Aufnahmemessungen mit der Deletionsmutante verdeckt hat. Auch hier wäre also die Isolierung einer Überexpressionsmutante eine probate Strategie die Substrate dieses putativen Transporters zu ermitteln.

5 Zusammenfassung

Die Vakuole der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* erfüllt wichtige Aufgaben in der zellulären pH- und Ionenhomöostase, bei Entgiftungsprozessen, bei der hydrolytischen Zersetzung von Makromolekülen und bei der Speicherung von Metaboliten. Unter anderem werden stickstoffhaltige Metabolite wie basische Aminosäuren oder Polyamine im vakuolären Lumen angereichert. Die dafür zuständigen vakuolären Transportsysteme konnten bis heute nur sehr schlecht charakterisiert werden. In einem breiten Ansatz, neue Transportproteine für stickstoffhaltige Metabolite in der vakuolären Membran der Hefe zu identifizieren, wurden sämtliche Mitglieder zweier Gruppen putativer Transportproteine auf genomischer Ebene mit einem Antikörperepitop versehen. Außerdem wurden Hefestämme isoliert, bei denen die entsprechenden Gene durch ein *lacZ*-Gen ersetzt waren. Diese beiden Gruppen waren zum einen die *Multi-Drug-Resistance-* (*MDR-*) Familie mit 24 mutmaßlichen Vertretern in der Hefe; zum anderen die *Amino-Acid/Auxin-Permease-* (*AAAP-*) Familie, von denen die Bäckerhefe sieben Mitglieder besitzt. Mit Hilfe der isolierten *lacZ*-Deletionen sollte eine systematische Analyse der Promotoraktivität unter Stickstoffmangelbedingungen durchgeführt werden, sowie die subzelluläre Lokalisierung der putativen Transporter mit Hilfe der Epitop-markierten Proteinversionen bestimmt werden.

Bei der Analyse der Promotoraktivität wurden zwei *MDR*-Gene gefunden, die bei Stickstoffmangel aktiviert werden; eine Repression trat bei vier Vertretern der *MDR*-Familie auf. Die überwiegende Mehrheit der isolierten *lacZ*-Deletionen zeigte keine β -Galaktosidaseaktivität. ORF YIL121w war zwar deutlich exprimiert, eine stickstoffabhängige Regulation war jedoch nicht festzustellen.

Die Analyse der subzellulären Lokalisierung der 3xHA-markierten putativen Transporter ergab eine vakuoläre Lokalisierung der Ycr023p-3xHA-Fusion, alle anderen untersuchten Proteine waren in der Plasmamembran lokalisiert.

Eine Lokalisierung in der Plasmamembran wurde auch für 3xHA-markierte Versionen der putativen Polyamintransporter Tpo1p, Tpo2p, Tpo3p und Tpo4p ermittelt; für diese Proteine war aufgrund indirekter physiologischer Befunde in der Literatur bislang eine vakuoläre Lokalisierung postuliert. Um Hinweise auf die physiologische Rolle von Tpo1p zu erhalten, wurde eine *TPO1*-Deletionsmutante im Hinblick auf unterschiedliche Polyamintransportaktivitäten der Plasmamembran untersucht. Dabei wurde eine bislang nicht beschriebene Putrescinssekretion fermentativ wachsender Hefezellen beobachtet, die von einer *TPO1*-Deletion jedoch nicht beeinflusst wurde. Spermidin und Spermin wurde nicht

exportiert. Bei einem Wachstum der Hefezellen in Gegenwart von Spermidin kam es jedoch zu einer deutlichen intrazellulären Anreicherung dieses Polyamins, das, nach Resuspendieren in Amin-freiem Medium, wieder abgegeben wurde. Die initiale Rate dieses Exports war in der *TPO1*-Deletion nur etwa halb so hoch wie beim Wildtyp, so dass man eine Beteiligung des Tpo1-Transporters an diesem Prozess postulieren kann.

Bei dem Versuch, Substrate für den vakuolären putativen Transporter Ycr023p zu identifizieren, wurden mehrere Hinweise gefunden, die für eine Beteiligung dieses Proteins am Polyamintransport sprechen. Unter anderem wurde ein Sequenzmotiv entdeckt, das insgesamt nur bei drei der bekannten *MFS*-Transporter vorkommt und sich bei Ycr023p und Tpo1p an der gleichen Stelle bezogen auf die Transmembrandomänen befindet. Der dritte Transporter mit diesem Motiv ist das uncharakterisierte Protein Ybr241p. Die Messung der Sperminaufnahmerate eines *YBR241c*-Deletionsstammes ergab jedoch keine Unterschiede zum Wildtyp.

6 Anhang

6.1 CBS-Medium nach Verduyn *et al.* (1992)

1000x Vitaminlösung

D-Biotin	0,05 g
Ca-D-Panthotenat	1,00 g
Nikotinsäure	1,00 g
myo-Inosit	25,00 g
Thiaminhydrochlorid	1,00 g
Pyridoxalhydrochlorid	1,00 g
p-Aminobenzoesäure	0,20 g

Biotin wurde in 10 ml 0,1 M NaOH gelöst, mit Reinstwasser auf 0,75 l aufgefüllt und der pH-Wert mit 1 M HCl auf 6,5 eingestellt. Danach wurden unter pH-Kontrolle alle weiteren Bestandteile einzeln zugesetzt. Das Gesamtvolumen wurde mit Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt, der pH erneut kontrolliert. Die sterilfiltrierten Aliquots konnten 6 Monate bei 4 °C gelagert werden.

1000x Spurenelementelösung

Na ₂ EDTA	15 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4,5 g
MnCl ₂ ·2H ₂ O	1,0 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,3 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,3 g
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,4 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4,5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	3,0 g
H ₃ BO ₃	1,0 g
KI	0,1 g

EDTA und Zinksulfat wurden in 0,75 l Reinstwasser gelöst und der pH-Wert mit 1 M NaOH auf 6,0 eingestellt. Alle weiteren Komponenten wurden einzeln unter pH-Kontrolle gelöst und der pH-Wert mit 1 M HCl auf 4,0 eingestellt. Sterilfiltrierte Aliquots wurden bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

10x Natriumsuccinatpuffer

Bernsteinsäure 100 g/l

Der pH-Wert wurde mit 6 M NaOH auf 5,5 eingestellt, auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt und die sterilfiltrierte Stammlösung bei 4 °C gelagert.

Standardzusammensetzung

Glucose	20 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
1000x Vitaminlösung	1 ml
1000x Spurenelemente	1 ml
Uracil	0,05 g
10x Natriumsuccinatpuffer	0,1 l

Die Lösung wurde mit Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert.

6.2 Oligonukleotide

Tabelle 4: Liste der für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Abschnitte, die homolog zu Sequenzbereichen der pUG6-Derivate waren, sind grau unterlegt. Im Fall der Oligonukleotide TPO1/1, TPO1/2 und TPO1/3 wurde die PCR-Reaktion dazu benutzt, Sequenzbereiche aus dem Hefegenom mit Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Xma*I bzw. *Xho*I zu flankieren. Diese Sequenzen sind unterstrichen.

Name	Sequenz 5'-3'
YBL2	TAG AAA TAC GAA AAG TAA TGT ACA AAC <u>GCA TAG GCC ACT AGT</u> <u>GGA TCT G</u>
YBL3	GTA GCT TCA CTA TCA GCG ATT GTA TTT TTG GGC ACA TCA TCA CAT <u>GCC GGT GCT GGA TCC GGT</u>
YBL4	CGA GGC GGA AAT TGC TAG AAG
YBL5	TTC CTG GGT AAT GTC ACC AGT
YEL2	GTA ACT AAA CTA GTT TTT TAA AAC CCA GCA GAA AGA AAA AAT ACC <u>GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G</u>
YEL3	ATT ATT GAT GCA GTT AAT GGT TCT GAT GGA CAG CAC TGC CAA ATA <u>GCC GGT GCT GGA TCC GGT</u>
YEL4	CCG AAC CTA GAA CCA AAT GTC
YEL5	CCT TTG TTA GGT TGC GCA TTC
YIL2	TAC TAT ATA CTG TTT TAT ACT TCT CTT GCA TGA CTA TTG GTC CAT <u>GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G</u>
YIL3	TTT TTG TCA TTG TAT GTA ACT GTA TTC AAC CGT TCA GAT GAA GCC <u>GCC GGT GCT GGA TCC GGT</u>
YIL4	TTC ATT GGC CAA CGC AGT CCT
YIL5	ATC CGA TGT AGT GTA ACG GCT
YGR1	TCC ATC TAA TAA CTA ATC ACA AAA ATA ATA CAC AAA ACA AAT ATG <u>TTC GTA CGC TGC AGG TCG AC</u>
YGR2	TGA ATG ACT AGA ACA TCA TTA TTT TTA CCG GAA ACT TGC ACC AGC <u>GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G</u>
YGR3	CAT AAG TTG TCC AAG AAG GAC TAT TCC ATC GAC AGT GTT GAG ATG <u>GCC GGT GCT GGA TCC GGT</u>
YGR4	TAC AAC TTC CTT CTC CTA CTA
YGR5	TAT GAC TTC AGG AAG AGT AGC
YJR1	ATT GCA GAA GGA TTT ACC AAT ATT TCT AAA GTT AAC GTA ACC ATG <u>TTC GTA CGC TGC AGG TCG AC</u>
YJR2	AAT GAT CTA CAC ATG TTT CTA AGT CAC TCT ACA TTT GCT GCT GCA <u>GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G</u>

Tabelle 4 Fortsetzung

Name	Sequenz 5'-3'
YJR3	TTT TTA GGA GTG GAC GCT AAA ATT AAA AAG CAA ATG AAC CGC CAT GCC GGT GCT GGA TCC GGT
YJR4	CGA GAG TTG AAG TGC CCT TCA
YJR5	TCT TCT TTG TAC ACT CTA TTG
YNL1	TAA TCT GGA ATC AAC ATA ACA ATA TCC TAG AAC ACA TCA TCA ATG TTC GTA CGC TGC AGG TCG AC
YNL2	CCT CGA TTC CAA ATA AAT TCT TTA TGA AGC AAC AAC ATA TAT CGT GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G
YNL3	ATT GCA AGC ATG CTT TAT ACG TCT TAC CAG AGT ATA TTC GGT GTC GCC GGT GCT GGA TCC GGT
YNL4	AAG CGA ACA CGT TCA TCA ATG
YNL5	ATT CTG GCA ATC TTG AAC TTG
YOR1	AAG AAG CAT AGA CAT CGT ATA CAT ATA TTT TAA GTT TTA CTA ATG TTC GTA CGC TGC AGG TCG AC
YOR2	TTT ACT ATT TGA ATA TAT GCA ATT GTG ATC TGT CTT AAG ACC TTT GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G
YOR3	TAT TCG TAT ACG GAA ATG GCC ACC GAT GCT TCC GCC AGA ATG GTT GCC GGT GCT GGA TCC GGT
YOR4	GCA CTC GTG CTT ACA TGC TAA
YOR5	AAA TTT GGT TTT GCC AAC AGC
YPR1	TTA ATT TTG CAT TAG TAC TCC TCT AGC CAA AGA TAA ACA GAA ATG TTC GTA CGC TGC AGG TCG AC
YPR2	ACT ATA ATT TTT CAT TAT TAT GCT CGA TTC GTA AAA TCG TTA CTC GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G
YPR3	AGA CAT AAG TTA TCC AAG AAG GAT TAT TCC ATA GAT AGT ATT GAA GCC GGT GCT GGA TCC GGT
YPR4	GTC AGC TGT CCT GTT ACA ACC
YPR5	CTC ACG GTT TGA AGG TCA ATC
TPO1	TTT TTT TTA GTC AAA GAA GCA AGA GAA AAC TAG ACA GAG ACA ATG TTC GTA CGC TGC AGG TCG AC
TPO2	AAA AAT GCA AAT ATA GAA AGA GCA TGA TTT CTG CTT TTC TTT TTC GCA TAG GCC ACT AGT GGA TCT G
TPO3	TAT GGT GAA TCT ATC AGA AAG AAA TCC AAG TAT GCT TAC GCC GCT GCC GGT GCT GGA TCC GGT
TPO4	CGT CTA TGT CGC TAT GAA GCC
TPO5	GGC GAT GAG AAG AAC AAT AGC

Tabelle 4 Fortsetzung

Name	Sequenz 5'-3'
TPO1/1	GCG TCC CCG GGA TGT CGG ATC ATT CTC CCA TT
TPO1/2	GCG TCC TCG AGT TAA GCG GCG TAA GCA TAC TT
TPO1/3	GCG TCC TCG AGT TAG GCG GCG TAG TCA GGA AC
kanFW	CCT CGA CAT CAT CTG CCC
kanRE	GGA TGT ATG GGC TAA ATG

6.3 Plasmidkarten

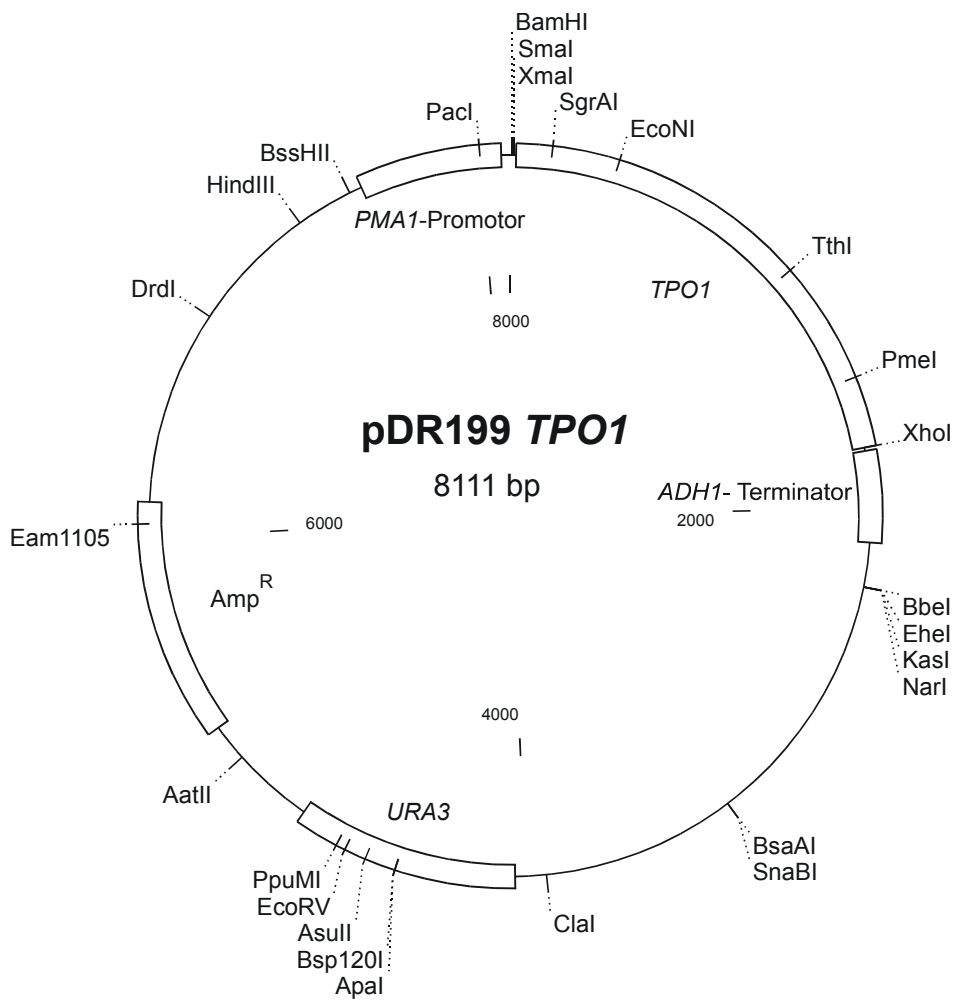


Abb. 20: Plasmidkarte des Konstruktes pDR199 TPO1.

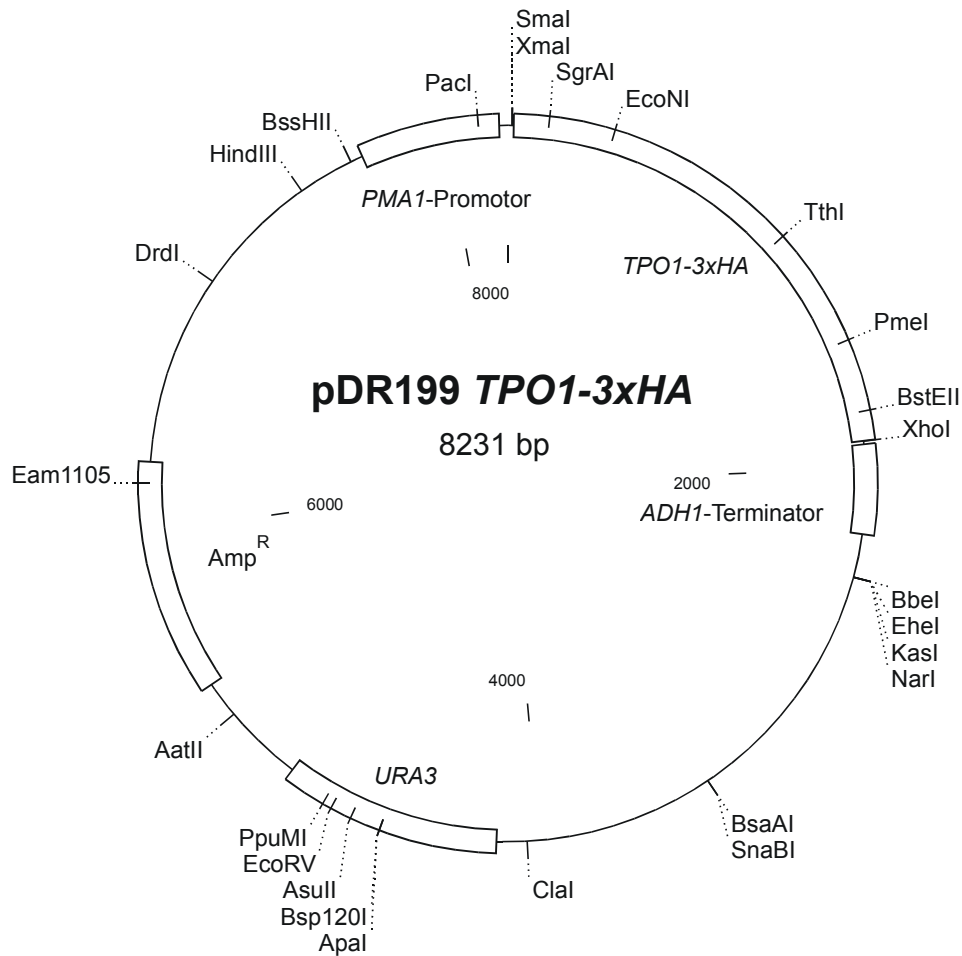


Abb. 21: Plasmidkarte des Konstruktes pDR199 *TPO1-3xHA*.

6.4 Hefestämme

Tabelle 5: Liste der für diese Arbeit verwendeten Hefestämme.

Name	Genotyp	Quelle
JA 310	MAT α yil120w::lacZ kanMX ura3	B. André
JA 311	MAT α yil120w::lacZ kanMX ura3	B. André
JA 312	MAT α ymr088c::lacZ kanMX ura3	B. André
JA 313	MAT α ymr088c::lacZ kanMX ura3	B. André
JA 314	MAT α ybr293w::lacZ kanMX ura3	B. André
JA 315	MAT α ybr293w::lacZ kanMX ura3	B. André
JA 316	MAT α ybr043c::lacZ kanMX ura3	B. André
JA 317	MAT α ybr043c::lacZ kanMX ura3	B. André
JA 318	MAT α ykr105c::lacZ kanMX ura3	B. André
JA 319	MAT α ykr105c::lacZ kanMX ura3	B. André
JA 320	MAT α yjr001w::lacZ kanMX ura3	B. André

Tabelle 5 Fortsetzung

Name	Genotyp	Quelle
JA 321	MAT α yjr001w:: <i>lacZ kanMX ura3</i>	B. André
JA 322	MAT α yil121w:: <i>lacZ kanMX ura3</i>	B. André
JA 323	MAT α yil121w:: <i>lacZ kanMX ura3</i>	B. André
JA 324	MAT α ynl065w:: <i>lacZ kanMX ura3</i>	B. André
JA 325	MAT α ynl065w:: <i>lacZ kanMX ura3</i>	B. André
JA 326	MAT α YIL120w-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 327	MAT α YIL120w-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 328	MAT α YMR088c-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 340	MAT α YMR088c-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 329	MAT α YBR293w-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 330	MAT α YBR293w-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 331	MAT α YBR043c-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 332	MAT α YBR043c-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 333	MAT α YKR105c-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 341	MAT α YKR105c-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 334	MAT α YJR001w-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 335	MAT α YJR001w-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 336	MAT α YIL121w-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 337	MAT α YIL121w-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 338	MAT α YNL065w-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 339	MAT α YNL065w-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 342	MAT α YKL146w-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
JA 343	MAT α YKL146w-3xHA <i>kanMX ura3</i>	B. André
WF 1	MAT α ycr023c:: <i>lacZ kanMX ura3</i>	W. Frommer
WF 2	MAT α ycr023c:: <i>lacZ kanMX ura3</i>	W. Frommer
WF 3	MAT α ydr119w:: <i>lacZ kanMX ura3</i>	W. Frommer
WF 4	MAT α ydr119w:: <i>lacZ kanMX ura3</i>	W. Frommer
WF 5	MAT α ypr198w:: <i>lacZ kanMX ura3</i>	W. Frommer
WF 6	MAT α ymr279c:: <i>lacZ kanMX ura3</i>	W. Frommer
WF 7	MAT α YCR023c-3xHA <i>kanMX ura3</i>	W. Frommer
WF 8	MAT α YCR023c-3xHA <i>kanMX ura3</i>	W. Frommer
WF 9	MAT α YDR119w-3xHA <i>kanMX ura3</i>	W. Frommer
WF 10	MAT α YDR119w-3xHA <i>kanMX ura3</i>	W. Frommer
WF 11	MAT α YPR198w-3xHA <i>kanMX ura3</i>	W. Frommer

Tabelle 5 Fortsetzung

Name	Genotyp	Quelle
WF 12	MAT α YPR198w-3xHA kanMX ura3	W. Frommer
WF 13	MAT α YMR279c-3xHA kanMX ura3	W. Frommer
WF 14	MAT α YMR279c-3xHA kanMX ura3	W. Frommer
IVU 71	MAT α yer119c::lacZ kanMX ura3	I. Calderon
IVU 72	MAT α yer119c::lacZ kanMX ura3	I. Calderon
IVU 101	MAT α yor378w::lacZ kanMX ura3	I. Calderon
IVU 102	MAT α yor378w::lacZ kanMX ura3	I. Calderon
IVU 131	MAT α yml116w::lacZ kanMX ura3	I. Calderon
IVU 132	MAT α yml116w::lacZ kanMX ura3	I. Calderon
IVU 161	MAT α yhr048w::lacZ kanMX ura3	I. Calderon
IVU 162	MAT α yhr048w::lacZ kanMX ura3	I. Calderon
IVU 181	MAT α ygr224w::lacZ kanMX ura3	I. Calderon
IVU 182	MAT α ygr224w::lacZ kanMX ura3	I. Calderon
IVU 201	MAT α yjl163c::lacZ kanMX ura3	I. Calderon
IVU 202	MAT α yjl163c::lacZ kanMX ura3	I. Calderon
IVU 221	MAT α ynr055c::lacZ kanMX ura3	I. Calderon
IVU 222	MAT α ynr055c::lacZ kanMX ura3	I. Calderon
IVU 81	MAT α YER119c-3xHA kanMX ura3	I. Calderon
IVU 82	MAT α YER119c-3xHA kanMX ura3	I. Calderon
IVU 111	MAT α YOR378w-3xHA kanMX ura3	I. Calderon
IVU 112	MAT α YOR378w-3xHA kanMX ura3	I. Calderon
IVU 141	MAT α YML116w-3xHA kanMX ura3	I. Calderon
IVU 142	MAT α YML116w-3xHA kanMX ura3	I. Calderon
IVU 171	MAT α YHR048w-3xHA kanMX ura3	I. Calderon
IVU 172	MAT α YHR048w-3xHA kanMX ura3	I. Calderon
IVU 191	MAT α YGR224w-3xHA kanMX ura3	I. Calderon
IVU 192	MAT α YGR224w-3xHA kanMX ura3	I. Calderon
IVU 211	MAT α YJL163c-3xHA kanMX ura3	I. Calderon
IVU 212	MAT α YJL163c-3xHA kanMX ura3	I. Calderon
IVU 231	MAT α YNR055c-3xHA kanMX ura3	I. Calderon
IVU 232	MAT α YNR055c-3xHA kanMX ura3	I. Calderon
RK 1	MAT α YBL089w-3xHA kanMX ura3	diese Arbeit
RK 2	MAT α YBL089w-3xHA kanMX ura3	diese Arbeit

Tabelle 5 Fortsetzung

Name	Genotyp	Quelle
RK 3	MAT α YEL064c-3xHA kanMX ura3	diese Arbeit
RK 4	MAT α YEL064c-3xHA kanMX ura3	diese Arbeit
RK 5	MAT α YIL088c-3xHA kanMX ura3	diese Arbeit
RK 6	MAT α YGR138c-3xHA kanMX ura3	diese Arbeit
RK 7	MAT α YGR138c-3xHA kanMX ura3	diese Arbeit
RK 8	MAT α YJR124c-3xHA kanMX ura3	diese Arbeit
RK 9	MAT α YJR124c-3xHA kanMX ura3	diese Arbeit
RK 10	MAT α YNL101w-3xHA kanMX ura3	diese Arbeit
RK 11	MAT α YOR273c-3xHA kanMX ura3	diese Arbeit
RK 12	MAT α YOR273c-3xHA kanMX ura3	diese Arbeit
RK 13	MAT α YPR156c-3xHA kanMX ura3	diese Arbeit
RK 14	MAT α YPR156c-3xHA kanMX ura3	diese Arbeit
RK 15	MAT α ygr138c::lacZ kanMX ura3	diese Arbeit
RK 16	MAT α ygr138c::lacZ kanMX ura3	diese Arbeit
RK 19	MAT α yjr124c::lacZ kanMX ura3	diese Arbeit
RK 20	MAT α yjr124c::lacZ kanMX ura3	diese Arbeit
RK 21	MAT α yor273c::lacZ kanMX ura3	diese Arbeit
RK 22	MAT α yor273c::lacZ kanMX ura3	diese Arbeit
RK 23	MAT α ypr156c::lacZ kanMX ura3	diese Arbeit
RK 24	MAT α ypr156c::lacZ kanMX ura3	diese Arbeit
RK 25	MAT α TPO1-3xHA kanMX ura3	diese Arbeit
RK 26	MAT α tpo1::lacZ kanMX ura3	diese Arbeit
RK 36	MAT α ybr241c::kanMX ura3	diese Arbeit

7 Literatur

- Alarco, A. M., Balan, I., Talibi, D., Mainville, N. und Raymond, M. (1997).** AP1-mediated multidrug resistance in *Saccharomyces cerevisiae* requires *FLR1* encoding a transporter of the major facilitator superfamily. *J. Biol. Chem.* **272**: 19304-19313.
- André, B., Hein, C., Grenson, M. und Jauniaux, J. C. (1993).** Cloning and expression of the *UGA4* gene coding for the inducible GABA-specific transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **237**: 17-25.
- Balasundaram, D., Tabor, C. W., Tabor, H. (1991).** Spermidine or spermine is essential for the aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **88**: 5872-5876.
- Bauer, B. E., Wolfger, H. und Kuchler, K. (1999).** Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **1461**: 217-236.
- Béchet, J., Grenson, M. und Wiame, J. M. (1970).** Mutations affecting the repressibility of arginine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **12**: 31-39.
- Bellahn, I. (2002).** Biochemische Charakterisierung vakuolärer Vesikel aus *Saccharomyces cerevisiae*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.
- Bennett, M. J., Marchant, A., Green, H. G., May, S. T., Ward, S. P., Millner, P. A., Walker, A. R., Schulz, B. und Feldmann, K. A. (1996).** *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**: 948-950.
- Bertl, A. und Slayman, C. L. (1990).** Cation-selective channels in the vacuolar membrane of *Saccharomyces*: dependence on calcium, redox state, and voltage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**: 7824-7828.

Bianchi, M. M., Sartori, G., Vandenbol, M., Kaniak, A., Uccelletti, D., Mazzoni, C., DiRago, J. P., Carignani, G., Slonimski, P. P., and Frontali, L. (1999). How to bring orphan genes into functional families. *Yeast* **15**: 513-526.

Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.

Boles, E., de Jong-Gubbels, P. und Pronk, J. T. (1998). Identification and characterization of *MAE1*, the *Saccharomyces cerevisiae* structural gene encoding mitochondrial malic enzyme. *J. Bacteriol.* **180**: 2875-2882.

Bolhuis, H., van Veen, H. W., Poolman, B., Driessen, A. J. und Konings, W. N. (1997). Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 55-84.

Booth, J. W. und Guidotti, G. (1997). Phosphate transport in yeast vacuoles. *J. Biol. Chem.* **272**: 20408-20413.

Borst, P. und Elferink, R. O. (2002). Mammalian abc transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* **71**: 537-592.

Borst, P., Schinkel, A. H., Smit, J. J., Wagenaar, E., Van Deemter, L., Smith, A. J., Eijdens, E. W., Baas, F. und Zaman, G. J. (1993). Classical and novel forms of multidrug resistance and the physiological functions of P-glycoproteins in mammals. *Pharmacol. Ther.* **60**: 289-299.

Brôco, N., Tenreiro, S., Viegas, C. A. und Sa-Correia, I. (1999). *FLR1* gene (ORF YBR008c) is required for benomyl and methotrexate resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its benomyl-induced expression is dependent on *pdr3* transcriptional regulator. *Yeast* **15**: 1595-1608.

Buziol, S., Becker, J., Baumeister, A., Jung, S., Mauch, K., Reuss, M. und Boles, E. (2002). Determination of *in vivo* kinetics of the starvation-induced Hxt5 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2**: 283-291.

Chaudhry, F. A., Reimer, R. J., Bellocchio, E. E., Danbolt, N. C., Osen, K. K., Edwards, R. H. und Storm-Mathisen, J. (1998). The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J.Neurosci.* **18**: 9733-9750.

Chaudhry, F. A., Reimer, R. J., Krizaj, D., Barber, D., Storm-Mathisen, J., Copenhagen, D. R. und Edwards, R. H. (1999). Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell* **99**: 769-780.

Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P. O., and Herskowitz, I. (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* **282**: 699-705.

Clément, S., Delcros, J. G. und Feuerstein, B. G. (1995). Spermine uptake is necessary to induce haemoglobin synthesis in murine erythroleukaemia cells. *Biochem. J.* **312**: 933-938.

Conklin, D. S., Culbertson, M. R. und Kung, C. (1994). Interactions between gene products involved in divalent cation transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **244**: 303-311.

Cunningham, K. W. und Fink, G. R. (1994). Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking *PMCI*, a homolog of plasma membrane Ca^{2+} ATPases. *J.Cell Biol.* **124**: 351-363

Darsow, T., Burd, C. G. und Emr, S. D. (1998). Acidic di-leucine motif essential for AP-3-dependent sorting and restriction of the functional specificity of the Vam3p vacuolar t-SNARE. *J.Cell Biol.* **142**: 913-922.

Daum, G., Lees, N. D., Bard, M. und Dickson, R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 1471-1510.

Davis, R. H. und Ristow, J. L. (1989). Uptake, intracellular binding, and excretion of polyamines during growth of *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.* **271**: 315-322.

Delaveau, T., Delahodde, A., Carvajal, E., Subik, J. und Jacq, C. (1994). *PDR3*, a new yeast regulatory gene, is homologous to *PDR1* and controls the multidrug resistance phenomenon. *Mol. Gen. Genet.* **244**: 501-511.

Delling, U., Raymond, M. und Schurr, E. (1998). Identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes conferring resistance to quinoline ring-containing antimalarial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 1034-1041

DeRisi, J., van den Hazel, B., Marc, P., Balzi, E., Brown, P., Jacq, C. und Goffeau, A. (2000). Genome microarray analysis of transcriptional activation in multidrug resistance yeast mutants. *FEBS Lett.* **470**: 156-160.

Desmoucelles, C., Pinson, B., Saint-Marc, C. und Daignan-Fornier, B. (2002). Screening the yeast "disruptome" for mutants affecting resistance to the immunosuppressive drug, mycophenolic acid. *J. Biol. Chem.* **277**: 27036-27044.

do Valle Matta, M. A., Jonniaux, J. L., Balzi, E., Goffeau, A. und van den Hazel, B. (2001). Novel target genes of the yeast regulator Pdr1p: a contribution of the *TPO1* gene in resistance to quinidine and other drugs. *Gene* **272**: 111-119.

Dürr, M., Urech, K., Boller, T., Wiemken, A., Schwencke, J. und Nagy, M. (1979). Sequestration of arginine by polyphosphate in vacuoles of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch. Microbiol.* **121**: 169-175.

Ehrenhofer-Murray, A. E., Seitz, M. U. und Sengstag, C. (1998). The Sge1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* is a membrane-associated multidrug transporter. *Yeast* **14**: 49-65

Erez, O. und Kahana, C. (2001). Screening for modulators of spermine tolerance identifies skyl1, the SR protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, as a regulator of polyamine transport and ion homeostasis. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 175-184.

Fischer, W. N., Kwart, M., Hummel, S. und Frommer, W. B. (1995). Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **270**: 16315-16320.

- Gaber, R. F., Kielland-Brandt, M. C. und Fink, G. R. (1990).** *HOLI* mutations confer novel ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 643-652.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D. und Brown, P. O. (2000).** Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol. Cell.* **11**: 4241-4257.
- Gietz, R. D. und Sugino, A. (1988).** New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**: 527-534.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R. und Woods, R. A. (1995).** Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**: 355-360.
- Goffeau, A., Aert, R., Agostini-Carbone, M. L. et al. (1997a).** The yeast genome directory. *Nature* **387** (supplement): 1-105.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davies, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. und Oliver, S. G. (1996).** Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546, 563-567.
- Goffeau, A., Park, J., Paulsen, I. T., Jonniaux, J. L., Dinh, T., Mordant, P. und Saier, M. H. Jr. (1997b).** Multidrug-resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames with the major facilitator superfamily. *Yeast* **13**: 43-54.
- Grant, S. N. G., Jessee, J., Bloom, F. R. und Hanahan, D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**: 4645-4649.
- Grillo, M. A. und Colombatto, S. (1994).** Polyamine transport in cells. *Biochem. Soc. Trans.* **22**: 894-898.

Gross, C. und Watson, K. (1998). Application of mRNA differential display to investigate gene expression in thermotolerant cells of *Saccharomyces cerevisiae* *Yeast* **14**: 431-442.

Gu, S., Roderick, H. L., Camacho, P. und Jiang, J. X. (2000). Identification and characterization of an amino acid transporter expressed differentially in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**: 3230-3235.

Güldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. und Hegemann, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* **24**: 2519-2524.

Hans, M. A., Heinzle, E. und Wittmann, C. (2001). Quantification of intracellular amino acids in batch cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 776-779.

Harter, C. und Reinhard, C. (2000). The secretory pathway from history to the state of the art. *Subcell. Biochem.* **34**: 1-38.

Hecker, R. (2002). Untersuchung subzellulärer Metabolitverteilungen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln.

Huang, H., Linares, P. N., Adolphe, M. und Villanueva, V. R. (1994). Simultaneous inhibition of spermidine and spermine and cell division. *Biogenic Amines* **10**: 259-271

Igarashi, K. und Kashiwagi, K. (1999). Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem. J.* **344**: 633-642.

Igarashi, K. und Kashiwagi, K. (2000). Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **271**: 559-564.

Ivanov, I. P., Matsufuji, S., Murakami, Y., Gesteland, R. F. und Atkins, J. F. (2000). Conservation of polyamine regulation by translational frameshifting from yeast to mammals. *EMBO J.* **19**: 1907-1917.

Jacquot, C., Julien, R., and Guilloton, M. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* MFS superfamily *SGE1* gene confers resistance to cationic dyes. *Yeast* **13**: 891-902.

Kakinuma, Y., Maruyama, T., Nozaki, T., Wada, Y., Ohsumi, Y. und Igarashi, K. (1995). Cloning of the gene encoding a putative serine/threonine protein kinase which enhances spermine uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**: 985-992.

Kakinuma, Y., Masuda, N. und Igarashi, K. (1992). Proton potential-dependent polyamine transport by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1107**: 126-130.

Kanazawa, S., Driscoll, M., and Struhl, K. (1988). *ATR1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a transmembrane protein required for aminotriazole resistance. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 664-673.

Kaouass, M., Audette, M., Ramotar, D., Verma, S., De Montigny, D., Gamache, I., Kaouass, M., Gamache, I., Ramotar, D., Audette, M. und Poulin, R. (1998). The spermidine transport system is regulated by ligand inactivation, endocytosis, and by the Npr1p Ser/Thr protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**: 2109-2117.

Karpichev, I. V. und Small, G. M. (1998). Global regulatory functions of Oaf1p and Pip2p (Oaf2p), transcription factors that regulate genes encoding peroxisomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 6560-6570

Kashiwagi, K., Kuraishi, A., Tomitori, H., Igarashi, A., Nishimura, K., Shirahata, A. und Igarashi, K. (2000). Identification of the putrescine recognition site on polyamine transport protein PotE. *J. Biol. Chem.* **275**: 36007-36012.

- Khuhawar, M. Y. und Qureshi, G. A. (2001).** Polyamines as cancer markers: applicable separation methods. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **764**: 385-407.
- Kitamoto, K., Yoshizawa, K., Ohsumi, Y. und Anraku, Y. (1988).** Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **170**: 2683-2686.
- Klein, M., Mamnun, Y. M., Eggmann, T., Schuller, C., Wolfger, H., Martinoia, E. und Kuchler, K. (2002).** The ATP-binding cassette (ABC) transporter Bpt1p mediates vacuolar sequestration of glutathione conjugates in yeast. *FEBS Lett.* **520**: 63-67.
- Klionsky, D. J. (1998).** Nonclassical protein sorting to the yeast vacuole. *J. Biol. Chem.* **273**: 10807-10810.
- Krämer, R. (1994).** Functional principles of solute transport systems: concepts and perspectives. *Biochim. Biophys. Acta* **1185**: 1-34.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. und Sonnhammer, E. L. (2001).** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**: 567-580.
- Kuchler, K., Sterne, R. E. und Thorner, J. (1989).** *Saccharomyces cerevisiae* STE6 gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *EMBO J.* **8**: 3973-3984.
- Kyhse-Andersen, J. (1984).** Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**: 203-209.
- Laizé, V., Tacnet, F., Ripoche, P. und Hohmann, S. (2000).** Polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* aquaporins. *Yeast* **16**: 897-903.
- Leppert, G., McDevitt, R., Falco, S. C., Van Dyk, T. K., Ficke, M. B. und Golin, J. (1990).** Cloning by gene amplification of two loci conferring multiple drug resistance in *Saccharomyces*. *Genetics* **125**: 13-20.

- Li, L., Chen, O. S., McVey Ward, D. und Kaplan, J. (2001).** *CCCI* is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. *J. Biol. Chem.* **276**: 29515-29519.
- Li, Z. S., Szczypka, M., Lu, Y. P., Thiele DJ und Rea PA (1996).** The yeast cadmium factor protein (*YCF1*) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J. Biol. Chem.* **271**: 6509-6517
- MacDiarmid, C. W., Gaither, L. A. und Eide, D. (2000).** Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **19**: 2845-2855
- Marcusson, E. G., Horazdovsky, B. F., Cereghino, J. L., Gharakhanian, E. und Emr, S. D. (1994).** The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the *VPS10* gene. *Cell* **77**: 579-586.
- Maruyama, T., Masuda, N., Kakinuma, Y. und Igarashi, K. (1994).** Polyamine-sensitive magnesium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1194**: 289-295
- McGrath, J. .P. und Varshavsky, A. (1989).** The yeast *STE6* gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature* **340**: 400-404.
- McIntire, S. L., Reimer, R. J., Schuske, K., Edwards, R. H. und Jorgensen, E. M. (1997).** Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* **389**: 870-876.
- Messenguy, F., Colin, D. und ten Have, J. P. (1980).** Regulation of compartmentation of amino acid pools in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control. *Eur. J. Biochem.* **108**: 439-447.
- Miseta, A., Kellermayer, R., Aiello, D. P., Fu, L. und Bedwell, D. M. (1999).** The vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchanger Vcx1p/Hum1p tightly controls cytosolic Ca^{2+} levels in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett.* **451**: 132-136

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* **24**: 17-27.

Nagy, M. (1979). Studies on purine transport and on purine content in vacuoles isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **558**: 221-232.

Nawrocki, A., Fey, S. J., Goffeau, A., Roepstorff, P. und Larsen, P. M. (2001). The effects of transcription regulating genes *PDR1*, *pdr1-3* and *PDR3* in pleiotropic drug resistance. *Proteomics* **1**: 1022-1032.

Nelissen, B., De Wachter, R. und Goffeau, A. (1997). Classification of all putative permeases and other membrane plurispanners of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 113-134

Nozaki, T., Nishimura, K., Michael, A. J., Maruyama, T., Kakinuma, Y. und Igarashi, K. (1996). A second gene encoding a putative serine/threonine protein kinase which enhances spermine uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**: 452-458.

Ortiz, D. F., St Pierre, M. V., Abdulmessih, A. und Arias, I. M. (1997). A yeast ATP-binding cassette-type protein mediating ATP-dependent bile acid transport. *J. Biol. Chem.* **272**: 15358-15365

Patel, A. R. und Wang, J. Y. (1997). Polyamines modulate transcription but not posttranscription of c-myc and c-jun in IEC-6 cells. *Am. J. Physiol.* **273**: 1020-1029.

Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., Nelissen, B., Goffeau, A. und Saier, M. H. Jr (1998). Unified inventory of established and putative transporters encoded within the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **430**: 116-125

Pozos, T. C., Sekler, I. und Cyert, M. S. (1996). The product of *HUM1*, a novel yeast gene, is required for vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ exchange and is related to mammalian $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchangers. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 3730-3741

- Price, N. P. J., Firmin, J. L. und Gray, D. O. (1992).** Screening for amines by dansylation and automated high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **598**: 51-57.
- Raguzzi, F., Lesuisse, E. und Crichton, R. R. (1988).** Iron storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **231**: 253-258.
- Rank, G. H. und Bech-Hansen, N. T. (1973).** Single nuclear gene inherited cross resistance and collateral sensitivity to 17 inhibitors of mitochondrial function in *S. cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **126**: 93-102.
- Reimer, R. J., Chaudhry, F. A., Gray, A. T. und Edwards, R. H. (2000).** Amino acid transport system A resembles system N in sequence but differs in mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**: 7715-7720.
- Rentsch, D., Laloi, M., Rouhara, I., Schmelzer, E., Delrot, S. und Frommer, W. B. (1995).** *NTR1* encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* **370**: 264-268.
- Rieger, K. J., El-Alama, M., Stein, G., Bradshaw, C., Slonimski, P. P., and Maundrell, K. (1999).** Chemotyping of yeast mutants using robotics. *Yeast* **15**: 973-986.
- Roerg, K. J., Rowley, N. und Kaiser, C. (1997).** Physiological regulation of membrane protein sorting late in secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biol.* **137**: 1469-1482.
- Russnak, R., Konczal, D. und McIntire, S. L. (2001).** A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. *J. Biol. Chem.* **276**: 23849-23857.
- Sa-Correia, I. und Tenreiro, S. (2002).** The multidrug resistance transporters of the major facilitator superfamily, 6 years after disclosure of *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *J. Biotechnol.* **98**: 215-226.

Sagné, C., Agulhon, C., Ravassard, P., Darmon, M., Hamon, M., El Mestikawy, S., Gasnier, B. und Giros, B. (2001). Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **98**: 7206-7211.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **74**: 5463-5467.

Sato, T., Ohsumi, Y. und Anraku, Y. (1984a). Substrate specificities of active transport systems for amino acids in vacuolar-membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence of seven independent proton/amino acid antiport systems. *J. Biol. Chem.* **259**: 11505-11508

Sato, T., Ohsumi, Y. und Anraku, Y. (1984b). An arginine/histidine exchange transport system in vacuolar-membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **259**: 11509-11511

Schiller, D., Kruse, D., Kneifel, H., Krämer, R. und Burkovski A. (2000). Polyamine transport and role of potE in response to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **182**: 6247-6249.

Schwencke, J. und De Robichon-Szulmajster, H. (1976). The transport of S-adenosyl-L-methionine in isolated yeast vacuoles and spheroplasts. *Eur. J. Biochem.* **65**: 49-60.

Sherman, F., Fink, G. R. und Hicks, J. B. (1986). Laboratory course manual for methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sorin, A., Rosas, G. und Rao, R. (1997). *PMR1*, a Ca²⁺-ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. *J. Biol. Chem.* **272**: 9895-9901.

Teixeira, M. C. und Sá-Correia, I. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* resistance to chlorinated phenoxyacetic acid herbicides involves Pdr1p-mediated transcriptional activation of *TPO1* and *PDR5* genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**: 530-537.

Tenreiro, S., Rosa, P. C., Viegas, C. A. und Sa-Correia, I. (2000). Expression of the *AZRI* gene (ORF YGR224w), encoding a plasma membrane transporter of the major facilitator superfamily, is required for adaptation to acetic acid and resistance to azoles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**: 1469-1481.

ter Schure, E. G., van Riel, N. A. W. und Verrips, C. T. (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 67-83.

Tomitori, H., Kashiwagi, K., Asakawa, T., Kakinuma, Y., Michael, A. J. und Igarashi, K. (2001). Multiple polyamine transport systems on the vacuolar membrane in yeast. *Biochem. J.* **353**: 681-688

Tomitori, H., Kashiwagi, K., Sakata, K., Kakinuma, Y. und Igarashi, K. (1999). Identification of a gene for a polyamine transport protein in yeast. *J. Biol. Chem.* **274**: 3265-3267

Torossian, K. und Poulin, R. (1997). The *STK2* gene, which encodes a putative Ser/Thr protein kinase, is required for high-affinity spermidine transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 2994-3004.

Valls, L. A., Winther, J. R. und Stevens, T. H. (1990). Yeast carboxypeptidase Y vacuolar targeting signal is defined by four propeptide amino acids. *J. Cell Biol.* **111**: 361-368.

Van Belle, D. und André, B. (2001). A genomic view of yeast membrane transporters. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 389-398.

Varoqui, H., Zhu, H., Yao, D., Ming, H. und Erickson, J. D. (2000). Cloning and functional identification of a neuronal glutamine transporter. *J. Biol. Chem.* **275**: 4049-4054.

Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A. und van Dijken, J. P. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* **8**: 501-517.

Wada, Y. und Anraku, Y. (1994). Chemiosmotic coupling of ion transport in the yeast vacuole: its role in acidification inside organelles. *J. Bioenerg. Biomembr.* **26**: 631-637.

White Tabor, C. und Tabor, H. (1984). Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 749-790.

White Tabor, C., Tabor, H., Tyagi, A. K. und Cohn, M. S. (1982). The biochemistry, genetics, and regulation of polyamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fed. Proc.* **41**: 3084-3088.

Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C. P. und Boles, E. (1999). Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **464**: 123-128

Williams, K. (1997). Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem. J.* **325**: 289-297.

Wolfger, H., Mamnun, Y. M. und Kuchler, K. (2001). Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Res. Microbiol.* **152**: 375-389.

Woolridge, D. P., Vazquez-Laslop, N., Markham, P. N., Chevalier, M. S., Gerner, E. W. und Neyfakh, A. A. (1997). Efflux of the natural polyamine spermidine facilitated by the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Blt. *J. Biol. Chem.* **272**: 8864-8866.

Wright, M. B., Howell, E. A. und Gaber, R. F. (1996). Amino acid substitutions in membrane-spanning domains of Hoi1, a member of the major facilitator superfamily of transporters, confer nonselective cation uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **178**: 7197-7205.

Young, G. B., Jack, D. L., Smith, D. W. und Saier, M. H. Jr. (1999). The amino acid/auxin:proton symport permease family. *Biochim. Biophys. Acta* **1415**: 306-322.

Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L. und Dean, D.R. (1994). Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product. *Biochemistry* **33**: 4714-4720.

Zimmermann, J., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J., Erfle, H., Stucky, K., Kristensen, T. und Ansorge, W. (1990). A simplified protocol for fast plasmid DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* **18**: 1067.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Reinhard Krämer betreut worden.

Markus Albertsen

Köln, den 06.03.03

Teilpublikationen:

Albertsen, M., Bellahn, I., Krämer, R. und Waffenschmidt, S. (2003). Localization and function of the yeast multidrug transporter Tpo1p. *J. Biol. Chem.*, *in press*

Lebenslauf

21.07.1974	geboren in Wil (Schweiz)
August 1981 - Juli 1985	Grundschule in Leverkusen
August 1985 - Mai 1994	Besuch des Werner-Heisenberg-Gymnasiums in Leverkusen
27.05.1994	Allgemeine Hochschulreife
Oktober 1994 - September 1999	Studium der Biologie an der Universität zu Köln
11.10.1996	Diplom-Vorprüfung
November 1998 - August 1999	Diplomarbeit im Max-Delbrück-Labor in der Max-Planck-Gesellschaft (Köln) in der Arbeitsgruppe von Dr. Nils Johnsson Titel der Arbeit: Lokalisation und Interaktionen der β -Untereinheit des SRP-Rezeptors <i>in vivo</i>
27.09.1999	Abschluss als Diplom-Biologe
November 1999 - Januar 2003	Promotionsarbeit im Institut für Biochemie der Universität zu Köln bei Prof. Dr. R. Krämer

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Krämer und Sabine Waffenschmidt für die Begutachtung dieser Arbeit, ebenso möchte ich mich für die interessante Aufgabenstellung und engagierte Betreuung bedanken.

Bei meinen Kollegen Rolf Hecker und Inga Bellahn möchte ich mich für die stete Freundlichkeit bedanken, durch die mir die Arbeit im Labor sehr viel leichter wurde, auch wenn man es mir nicht immer angemerkt hat.

Besonderer Dank gilt Klaus Bollig für seine umfangreichen Korrekturen des Manuskripts. Bedanken möchte ich mich auch bei Andreas Burkovski und Heike Laser, die mir wertvolle Tipps und Verbesserungsvorschläge zu Teilen dieser Arbeit geliefert haben.

Gabi Sitek danke ich für eine (fast) immer volle Kaffeekanne, für verständnisvolle Gespräche und für ihre engagierte Hilfsbereitschaft.

Allen Kollegen danke ich für das gute Arbeitsklima, durch das mir die Zeit am Institut für Biochemie mit Sicherheit in schöner Erinnerung bleiben wird.