

**Identifizierung von Faktoren, die funktionell mit dem  
Sac1p Protein in *Saccharomyces cerevisiae* interagieren**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht – Karls – Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Chemikerin Angela Then

aus

Rheinfelden (Baden)

Heidelberg, im November 1999

# INAUGURAL-DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht – Karls – Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom-Chemikerin Angela Then  
aus  
Rheinfelden (Baden)

Tag der mündlichen Prüfung: \_\_\_\_\_

**Identifizierung von Faktoren, die funktionell mit dem  
Sac1p Protein in *Saccharomyces cerevisiae* interagieren**

Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Dobberstein  
Prof. Dr. Eduard Hurt

## Abkürzungen

$\alpha$ AA	$\alpha$ -Amino adipinsäure
AD(T)P	Adenosin-di(tri)phosphat
ARS	autonom replizierendes Segment
bp	Basenpaare
Can	Canavanin
CEN	zentromeres Segment
cNMP	cyklisches Nukleotidmonophosphat
CPY	Carboxypeptidase Y
cs	Kältesensitiv
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4'6,-diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	dATP, dCTP, dGTP, dTTP (2'-Desoxy(ribo)-)
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
5'FOA	5'Fluorooronsäure
GD(T)P	Guanosin-di(tri)phosphat
HC	Hartwell's-Complete Medium
His	Histidin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertoni-Medium
Lys	Lysin
MAPK	mitogen-aktivierte Protein Kinase, extrazellulär-regulierte Kinase (ERK)
mCi	MilliCurie
MEK	ERK-aktivierende Kinase; MAPKK, MAPK Kinase
MEKK	MEK Kinase, MAPKK Kinase
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte

## Abkürzungen

---

ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PC	Phosphatidylcholin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	PI3 Kinase
PI3P	Phosphatidylinositol-3-phosphat
PI3,5P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat
PI4,5P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PI3,4,5P <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PITP	Phosphatidylinositol-Phosphatidylcholin Transfer Protein
Pkc	Proteinkinase C
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ssDNA	Einzelstrang-DNA
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TE	Tris/EDTA
Tris	Tris-(Hydroxyl)-Aminomethan
Trp	Tryptophan
ts	Temperatursensitiv
Ura	Uracil
ü. N.	über Nacht
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
YPD	Hefeextrakt-Pepton-Glukose Medium

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Zelluläre Funktionen von Sac1p</b>	<b>2</b>
2.1.1	Sac1p ist am ATP-Transport in das ER beteiligt	2
2.1.2	Sac1p ist involviert in den Lipidmetabolismus	3
2.1.3	Sac1p ist an der Signalübertragung durch Phosphoinositide beteiligt	4
<b>2.2</b>	<b>Genetische Interaktionen in Hefe</b>	<b>6</b>
<b>2.3</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>11</b>
<b>3.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>11</b>
3.1.1	Bakterienmikrobiologie	11
3.1.2	Konstruktion verwendeter Plasmide	11
3.1.3	Klonierung mit Hilfe der <i>polymerase chain reaction</i> (PCR)	13
<b>3.2</b>	<b>Hefegenetische Methoden</b>	<b>13</b>
3.2.1	Mikrobiologische Methoden	13
3.2.2	Medien	13
3.2.3	Genetische Manipulation von Hefen	14
3.2.3.1	Transformation von Hefen	14
3.2.3.2	Plasmid-Rückgewinnung aus Hefe	14
3.2.3.3	Präparation genomischer Hefe-DNA	14
3.2.3.4	Tetradenanalyse	14
3.2.3.5	Konstruktion von Gendelektionen	14
3.2.3.5.1	Herstellung der Fragmente für die Gendelektionen	15
3.2.3.6	Konstruktion einer Gendelektion mittels pMPY-ZAP	15
3.2.3.7	Manipulation des Paarungstyps	16
3.2.3.8	PCR mit ganzen Hefezellen	16
3.2.3.9	<i>In vivo</i> Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS)	16
3.2.4	Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme	17
<b>3.3</b>	<b>Biochemische Methoden</b>	<b>20</b>
3.3.1	Herstellung und Analyse von Lipidextrakten	20
3.3.2	Herstellung von Mikrosomen	20
3.3.2.1	Lösungen	20
3.3.2.2	Protokoll	21
3.3.3	ATP-Transport-Messung	21
<b>3.4</b>	<b>Mikroskopie</b>	<b>22</b>
3.4.1	Fluoreszenzmikroskopie	22
3.4.2	Elektronenmikroskopie	22
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>23</b>
<b>4.1</b>	<b>Genetische Interaktionen von <i>SAC1</i> mit Komponenten des</b>	

<b>Translokationsapparates</b>	<b>23</b>
4.1.1 <i>sac1Δ sac61<sup>ts</sup></i> und <i>sac1Δ sac63<sup>ts</sup></i> , nicht aber <i>sac1Δ sac62<sup>ts</sup></i> sind synthetisch letal	25
4.1.1.1 <i>sac1-22</i> komplementiert den synthetisch letalen Phänotyp von <i>sac1Δ sac61<sup>ts</sup></i> und <i>sac1Δ sac63<sup>ts</sup></i>	26
<b>4.2 Synthetisch letaler Screen</b>	<b>27</b>
4.2.1 Planung des Screens	27
4.2.1.1 Konstruktion canavaninresistenter ( <i>can<sup>R</sup></i> ) Stämme	28
4.2.1.2 Konstruktion isogener Stämme mit unterschiedlichem Paarungstyp	30
4.2.1.3 Konstruktion der <i>sac1::HIS3</i> und <i>sac1::TRP1</i> Stämme	30
4.2.1.4 Konstruktion des Plasmids pAT1	31
4.2.2 Durchführung des Screens	34
4.2.3 Charakterisierung der erhaltenen Mutanten	36
4.2.3.1 Die Mutanten lassen sich in verschiedene Gruppen bezüglich des ATP-Transports einteilen	37
4.2.4 Identifikation von <i>Isa3-1</i> durch Komplementation mit einer chromosomalen Genbank	43
4.2.4.1 Zwei unterschiedliche genomische Fragmente komplementieren <i>Isa3-1 sac1Δ</i>	43
4.2.4.2 Ein Abschnitt von Chromosom VIII komplementiert <i>Isa3-1</i>	44
4.2.4.3 <i>Isa3-1</i> hat einen Zellwanddefekt	45
4.2.5 <i>Isa3-1</i> ist ein Allel von <i>SLT2</i>	45
4.2.5.1 Die <i>Isa3-1</i> Mutation liegt im aktive Zentrum der Kinase	47
4.2.5.2 Die anderen Mutanten lassen sich nicht durch die Überexpression von <i>SLT2</i> komplementieren	48
<b>4.3 Charakterisierung der Interaktionen von <i>SLT2</i> mit <i>SAC1</i></b>	<b>49</b>
4.3.1 <i>sac1Δ slt2 Δ</i> Zellen zeigen starken Wachstumsdefekt	49
4.3.2 <i>slt2Δ</i> Zellen zeigen reduzierten ATP-Transport	50
4.3.3 <i>slt2Δ</i> Zellen sind inositoluxotroph, zeigen aber keine veränderte Menge an Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI4P)	52
4.3.4 <i>sac1</i> und <i>slt2</i> Mutanten haben einen Zellwanddefekt	54
4.3.5 Fehlerhafte Anreicherung von Chitin zwischen Mutter- und Tochterzelle in <i>sac1Δ slt2Δ</i> Zellen führen zu einem Separationsdefekt	56
<b>4.4 Epistatische Analyse</b>	<b>62</b>
4.4.1 <i>SAC1</i> und <i>SLT2</i> sind parallel zueinander aktiv	63
<b>5 Diskussion</b>	<b>65</b>
<b>5.1 ATP-Transport und Translokation in das ER</b>	<b>65</b>
<b>5.2 Der synthetisch letale Screen</b>	<b>66</b>
<b>5.3 Die MAP Kinase Sl2p interagiert genetisch mit Sac1p</b>	<b>67</b>
<b>5.4 Der Sac1p Signalweg ist parallel zu der Sl2p MAPK Kaskade</b>	<b>71</b>
<b>6 Literatur</b>	<b>73</b>

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Sac1p ist ein integrales ER und Golgi Membranprotein der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Es ist beteiligt an der Regulation verschiedener zellulärer Aspekte. So reguliert Sac1p den mikrosomalen ATP-Transport. *In vitro* ist die ATP-Transportrate von *sac1Δ* Stämmen drastisch reduziert und die Sekretion ist verlangsamt. Außerdem spielt Sac1p eine Rolle im Phospholipid Metabolismus und ist an der Signalübertragung durch Phosphoinositide beteiligt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß *sac1Δ* synthetisch letal mit Sekretionsmutanten des Translokationsapparates ist. Die genetischen Interaktionen lassen sich nur mit den ATP-abhängigen Faktoren *SEC61* und *SEC63* nachweisen, nicht aber mit *SEC62*, dessen Funktion ATP-unabhängig ist. Diese Ergebnisse unterstreichen die regulatorische Funktion von Sac1p im ATP-Transport in das ER Lumen.

Um weitere Aufschlüsse über die Funktionen von Sac1p zu erhalten, wurde ein synthetisch letaler Screen mit *sac1Δ* durchgeführt. Isoliert wurden 12 Komplementationsgruppen, wovon nur zwei mehr als ein Allel enthalten. Die Mutanten wurden, unter Verwendung der ATP-Transport Daten, in vier Gruppen eingeteilt. Eine Mutante, *lsa3-1*, wurde weiter charakterisiert, wobei sich herausstellte, daß *lsa3-1* ein Allel von *SLT2* ist. Slt2p ist eine MAP Kinase, die in die Zellwandintegrität und in polarisiertes Wachstum involviert ist. Die *lsa3-1* Punktmutation führte zu einem Austausch von Asp<sub>153</sub> zu Asn<sub>153</sub> im katalytischen Zentrum von Slt2p.

Durch morphologische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die synthetisch letalen Interaktionen von *slt2* und *sac1* durch einen Zellseparationsdefekt verursacht werden, der durch osmotische Stabilisierung supprimiert werden kann. Die epistatische Analyse zeigte, daß Sac1p und Slt2p in parallelen Wegen aktiv sind.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten, zusammen mit veröffentlichten Daten, lassen die Hypothese zu, daß zum einen die Signalübertragung durch Phosphoinositide, an der Sac1p beteiligt ist, und zum anderen die Regulation der Expression und des Transports von Zellwandproteine, worin Slt2p involviert ist, für den Erhalt des Zellwand essentiell ist. Dies äußert sich unter normalen Wachstumsbedingungen in der gemeinsamen essentiellen Funktion von Sac1p und Slt2p bei der Bildung des Septums zwischen Mutter- und Tochterzelle.

## 2 EINLEITUNG

Sac1p ist ein unglycosyliertes, integrales Membranprotein des ER und Golgi-Apparates mit einem Molekulargewicht von 67 kDa (Whitters *et al.*, 1993). Identifiziert wurde das *SAC1* Gen (*suppressor of actin*) bei der Suche nach kältesensitiven (cs) Suppressoren für Aktin-Mutanten (Novick *et al.*, 1989). Das Aktincytoskelett ist in *sac1* Mutanten bei der restriktiven Temperatur delokalisiert (Novick *et al.*, 1989). Bei der Suche nach Suppressoren der *sec14-1<sup>ts</sup>* Mutation wurde ebenfalls das *SAC1* Gen isoliert, was zu der Interpretation führte, daß Sac1p ein Bindeglied zwischen sekretorischem Weg und Aktincytoskelett darstellt (Cleves *et al.*, 1989).

### 2.1 ZELLULÄRE FUNKTIONEN VON Sac1p

Sac1p zeigt verschiedene zelluläre Funktionen. Das Protein ist am ATP-Transport in Hefe-Mikrosomen beteiligt (Mayinger *et al.*, 1995) und ist in den Phospholipid und Phosphoinositid Metabolismus involviert (Rivas *et al.*, 1999), (Guo *et al.*, 1999). Sac1p scheint eine regulatorische Rolle über Modulation von Phosphoinositid Signalen in der Zelle einzunehmen.

#### 2.1.1 Sac1p ist am ATP-Transport in das ER beteiligt

Für die Translokation, Faltung und Modifikationen im ER wird ATP benötigt, das durch ein Transportsystem in das ER gelangen muß. Der mikrosomale ATP-Transport ist, wie auch der ADP/ATP-Transport der Mitochondrien, ein elektrogener Antiport (Mayinger *et al.*, 1995). Im Unterschied zu den Mitochondrien, ist im ER kein Membranpotential charakterisiert, das für die Regulation zuständig sein könnte. Daher wird angenommen, daß der ATP-Transport in das ER anders reguliert wird. Als ein regulatorischer Faktor wurde Sac1p identifiziert (Kochendorfer *et al.*, 1999), das biochemisch aus einer Fraktion, die ATP-Transport Aktivität zeigte, aufgereinigt wurde (Mayinger *et al.*, 1995). Die anschließend aus *sac1Δ* Stämmen isolierten Mikrosomen zeigten eine drastisch reduzierte ATP-Transportrate, außerdem war in diesen Stämmen der Transport und die Reifung von sekretorischen Proteinen (Präpro- $\alpha$ -

Faktor und Carboxypeptidase Y) vom ER zum Golgi stark verlangsamt (Mayinger *et al.*, 1995).

Der ausreichende Transport von ATP in das ER Lumen wird für die ATP-abhängigen Schritte der posttranslationalen Translokation von sekretorischen Proteinen benötigt. Vorläuferproteine binden in einer ATP-unabhängigen Reaktion an den potentiellen Signalsequenzrezeptor, der aus Sec62p, Sec71p und Sec72p besteht. In einem ATP-abhängigen Schritt wird durch Sec63p und Kar2p, das Hefehomolog zu BiP, das zu translozierende Protein an die Translokationspore weitergegeben. Sec61p ist eine strukturelle Komponente der Translokationspore, durch die die Proteine in einem weiteren ATP-abhängigen Schritt mit Hilfe von Kar2p und Sec63p durchgeschleust werden. Kar2p benötigt ATP, um die translozierten Proteine im Lumen des ER zu binden und korrekt zu falten (Lyman and Schekman, 1997).

### 2.1.2 Sac1p ist involviert in den Lipidmetabolismus

Mehrere Phänotypen von *sac1* Mutanten deuten auf eine Funktion von Sac1p im Phospholipid Metabolismus hin. Zum einen wird die *sec14<sup>ts</sup>* Mutation durch *sac1* Mutanten supprimiert (Whitters *et al.*, 1993). Widersprüchliche Modelle wurden für die Funktionen von Sac1p und Sec14p im Phospholipid Metabolismus postuliert. Sec14p tauscht das im ER und Golgi hergestellte Phosphatidylinositol (PI) gegen Phosphatidylcholin (PC) in Lipiddoppelschichten aus und dient somit als Sensor für die Zusammensetzung der Phospholipide in der Golgimembran, die essentiell für die Funktion des Golgi Komplexes ist (Kearns *et al.*, 1998). Von (Kearns *et al.*, 1998) wurde ein Modell vorgeschlagen, in dem Sec14p membrangebundenes PI einer PI-4-Kinase präsentiert und damit die Phosphoinositid Produktion regelt. Dagegen spricht, daß in (Phillips *et al.*, 1999) von einem Sec14p<sup>K66,239A</sup> Allel berichtet wird, dessen PI aber nicht PC Transfer Aktivität defekt ist. Dieses Allel stimuliert *in vivo* nicht die Phosphoinositid Produktion, ist aber in der Lage, die letalen Phänotypen von *sec14-1<sup>ts</sup>* und *sec14Δ* zu supprimieren. Dies deutet daraufhin, daß die Bindung von PC an Sec14p der essentielle Faktor für die Aktivität von Sec14p ist (Phillips *et al.*, 1999). Sec14p ist auch an der Aufrechterhaltung einer kritischen Konzentration an Diacylglycerol (DAG) im Golgi beteiligt, das für den vesikulären Transport wichtig ist. Auf zwei Wegen wird diese Konzentration reguliert. Zum einen wird durch die Bindung von PI an Sec14p über weitere Faktoren Phospholipase D (PLD) aktiviert, wodurch die Synthese von

DAG angeregt wird, zum anderen wird durch die Bindung von PC an Sec14p der Verbrauch an DAG im PC-Syntheseweg (CDP-Cholin Weg) reduziert (Rivas *et al.*, 1999). Allerdings gibt es neuere Daten, die zeigen, daß weder die Akkumulation von DAG im Golgi (Stock *et al.*, 1999), noch die PLD Aktivität (Phillips *et al.*, 1999) für die Suppression des letalen Phänotyps der *sec14-1<sup>ts</sup>* Mutation benötigt werden. Dagegen wird in (Rivas *et al.*, 1999) beschrieben, daß das in *sac1* Mutanten akkumulierte PI4P indirekt PLD aktiviert, wodurch der Umsatz an DAG, nicht aber die gesamte Menge erhöht wird. Die resultierende Hyperaktivität des CDP-Cholin Weges geht einher mit der Suppression von *sec14<sup>ts</sup>* in *sac1* Mutanten. Vermutlich werden alle Elemente des *SEC14*-abhängigen sekretorischen Weges durch einen bis jetzt unbekanntem Mechanismus koordiniert (Stock *et al.*, 1999).

Eine weitere Konsequenz des defekten Lipid Metabolismus ist das fehlende Wachstum der *sac1* Mutanten auf Inositol-freiem Medium. Wie in (Rivas *et al.*, 1999) gezeigt wurde, ist die Biosynthese von Inositol nicht defekt, da die Aktivierung der Transkription von *INO1*, das für die Inositol-1-Phosphat Synthase codiert (Carman and Zeimetz, 1996), dem Wildtyp entspricht.

### 2.1.3 Sac1p ist an der Signalübertragung durch Phosphoinositide beteiligt

Ein Teil der Sequenz von Sac1p, die Sac1-Domäne, zeigt Homologien zu dem Säugetier Synaptojanin und zu den Hefe Inositol Polyphosphat-5-Phosphatasen (Inp51p, Inp52p und Inp53p), die alle vier zu der Klasse der Inositol Polyphosphat 5-Phosphatasen (IP5Pasen) gehören. Die Sac1-Domäne ist eine 300 Aminosäure lange Sequenz und entspricht nicht der 5-Phosphatase-Domäne (McPherson *et al.*, 1996), (Guo *et al.*, 1999), (Majerus, 1996). *In vitro* wurde gezeigt, daß auch die Sac1-Domäne von IP5Pasen und Synaptojanin PI3,5P<sub>2</sub>, PI4P und PI3P zu PI hydrolysieren kann, nicht aber PI4,5P<sub>2</sub> (Guo *et al.*, 1999). Die erhöhte Menge an PI4P, PI3,5P<sub>2</sub> und PI3P und erniedrigte Menge an PI4,5P<sub>2</sub> in *sac1* Mutanten (Guo *et al.*, 1999), (Stock *et al.*, 1999) weisen deshalb auf eine Rolle von Sac1p in der Signalübertragung durch Phosphoinositide hin.

Phosphorylierte Produkte von Phosphatidylinositol spielen eine kritische Rolle in der Regulation von Membranverkehr, zusätzlich zu ihrer klassischen Rolle als Second Messenger in der Signaltransduktion an der Zelloberfläche. Phosphorylierung und Dephosphorylierung der polaren Köpfe von Phosphoinositiden (Polyphosphorylierten Inositol Lipiden) in

spezifischen intrazellulären Orten signalisiert entweder den Bedarf oder die Aktivierung von Proteinen, die essentiell für den vesikulären Transport sind. Im Unterschied zu anderen Kopfgruppen kann der Inositolring an mehreren Positionen modifiziert werden. Die Phosphorylierung an einer Position oder einer Kombination von Positionen (3', 4' oder 5') generiert fünf Stereoisomere, die als Regulatoren von vesikulären Transportreaktionen des Cytoskeletts und des Zellwachstums fungieren. In den als klassisch bekannten Signalwegen wird durch erhöhten Phosphatidylinositol Metabolismus die Phospholipase C aktiviert, die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PI4,5P<sub>2</sub>) in die beiden Second Messenger, DAG und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>), spaltet.

Weitere Signalwege werden auch durch membrangebundene Phosphoinositide reguliert. Die biologischen Funktionen der in *sac1* Mutanten angereicherten Phosphoinositide sind hier dargestellt. Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI3P) ist in *sac1* Mutanten angereichert (Guo *et al.*, 1999). Es konnte gezeigt werden, daß durch Mutationen im Hefe *VPS34* Gen, das für eine PI3 Kinase (PI3K) codiert, diese Zellen Carboxypeptidase Y (CPY) nicht mehr vom späten Golgi zur Vakuole transportieren können (Wurmser *et al.*, 1999). PI3P interagiert mit Proteinen, die ein Cystein-reiches Zinkfinger-ähnliches Motiv besitzen, der FYVE Domäne (Fruman *et al.*, 1999). PI3P und seine Bindungspartner mit FYVE Domäne sind an einer Vielzahl von Transportschritten beteiligt, die von Vesikeln ausgeführt werden. Das in humanen Zellen identifizierte Tumorsuppressor Gen, PTEN, codiert für eine Lipid Phosphatase, die das Phosphat an der 3' Position von 3-Phosphoinositiden entfernt, aber keine Homologien zu *SAC1* hat. Dies ist auch ein Hinweis auf die potentiell pathologische Relevanz von 3-Phosphoinositiden und PI3Ks (Leevers *et al.*, 1999). Ein weiteres Protein, Fab1p, bindet nicht nur PI3P an seine FYVE Domäne, sondern phosphoryliert es auch zu Phosphatidylinositol-3,5-bisphosphat (PI3,5P<sub>2</sub>), einem weiteren Lipid Second Messenger, der ebenfalls in *sac1* Mutanten angereichert ist (Guo *et al.*, 1999). PI3P agiert als Signal für den anterograden vakuolären Transport, während die Phosphorylierung zu PI3,5P<sub>2</sub> den retrograden vakuolären Efflux/Abbau reguliert (Wurmser *et al.*, 1999). Sac1p könnte also ein Regulator des vakuolären Transports sein.

PI4P ist in *sac1* Mutanten angereichert (Guo *et al.*, 1999), (Stock *et al.*, 1999). Es wurde angenommen, daß PI4P kein Signalmolekül ist, sondern ein Zwischenprodukt darstellt, das entweder zu PI3,4P<sub>2</sub> oder PI4,5P<sub>2</sub> phosphoryliert wird (Martin, 1998). Allerdings deuten die erniedrigten PI4,5P<sub>2</sub> Mengen bei der Suppression der *sec14-1<sup>ts</sup>* Mutation durch die *sac1-22* Mutation auf eine direkte physiologische Funktion von PI4P, und nicht PI4,5P<sub>2</sub>, in *SEC14*-abhängiger Sekretion (Stock *et al.*, 1999). Zur Unterstützung dieser Bedeutung wurde von

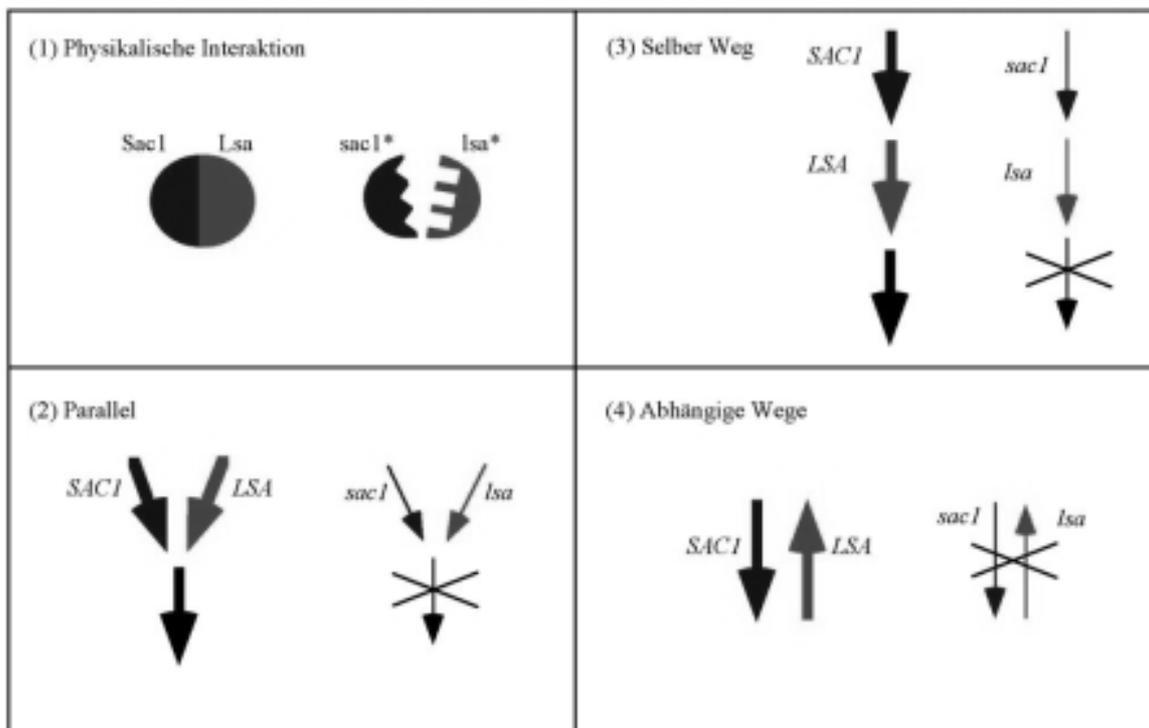
(Matsuoka, 1998) berichtet, daß entweder PI4P oder PI4,5P<sub>2</sub> die Bindung von Coat Proteinen an Liposomen in einem *in vitro* System zur Bildung von COPII-coated Vesikeln fördert.

Das in *sac1* Mutanten erniedrigte PI4,5P<sub>2</sub> (Stock *et al.*, 1999) ist beteiligt an der Regulation des Golgi Apparates, der Sekretion und des Cytoskeletts. An der Synthese von PI4,5P<sub>2</sub>, welches für einen kritischen Schritt in der Exocytose gebraucht wird, ist Sec14p durch Präsentieren von PI an eine membrangebundene PI4 Kinase und eine cytosolische PI-4-phosphat-5-Kinase, beteiligt (De Camilli *et al.*, 1996). Sec14p ist ebenfalls in der Koordination und/oder Kopplung des Phospholipid Metabolismus mit dem Vesikel Verkehr und der Regulation von Signaltransduktions Reaktionen involviert (Kearns *et al.*, 1998).

Physiologisch reguliert eine kompetitive Interaktion von löslichen und Lipid-gebundenen phosphorylierten Metaboliten von Inositol die Assoziation und Dissoziation von spezifischen Proteinen mit Membranen. Wahrscheinlich beeinflussen PIs die Regulation des Cytoskeletts, das auf verschiedene Wege Exo- und Endocytose reguliert. In Hefe beeinflussen Aktin Mutanten Sekretion und Endocytose, viele Aktin abhängige Proteine interagieren mit PI4,5P<sub>2</sub>, wodurch Veränderungen an der PI4,5P<sub>2</sub> Menge Einfluß auf die Aktin Funktion hat. (Übersicht in (De Camilli *et al.*, 1996).)

## 2.2 GENETISCHE INTERAKTIONEN IN HEFE

Die Hefe *S. cerevisiae* ist ein vorteilhafter Organismus, um zelluläre Mechanismen in Eukaryonten aufzuklären. Die Zellen lassen sich recht einfach, in ausreichender Menge und in kurzer Zeit kultivieren, sowohl die haploide als auch die diploide Form ist lebensfähig, genetische Manipulationen sind einfach durchzuführen und das gesamte Genom ist sequenziert und über Datenbanken zugänglich. Die Aufklärung der Funktion eines Proteins oder des dafür codierenden Gens kann über einen biochemischen oder einen genetischen Ansatz erfolgen, wobei die Kombination beider Methoden die meiste Information liefert. Bei der Suche nach Komponenten des sekretorischen Weges (Novick *et al.*, 1980) zum Beispiel, hat sich der genetische Ansatz als hervorragendes Werkzeug erwiesen, um diesen Stoffwechselweg aufzuklären.

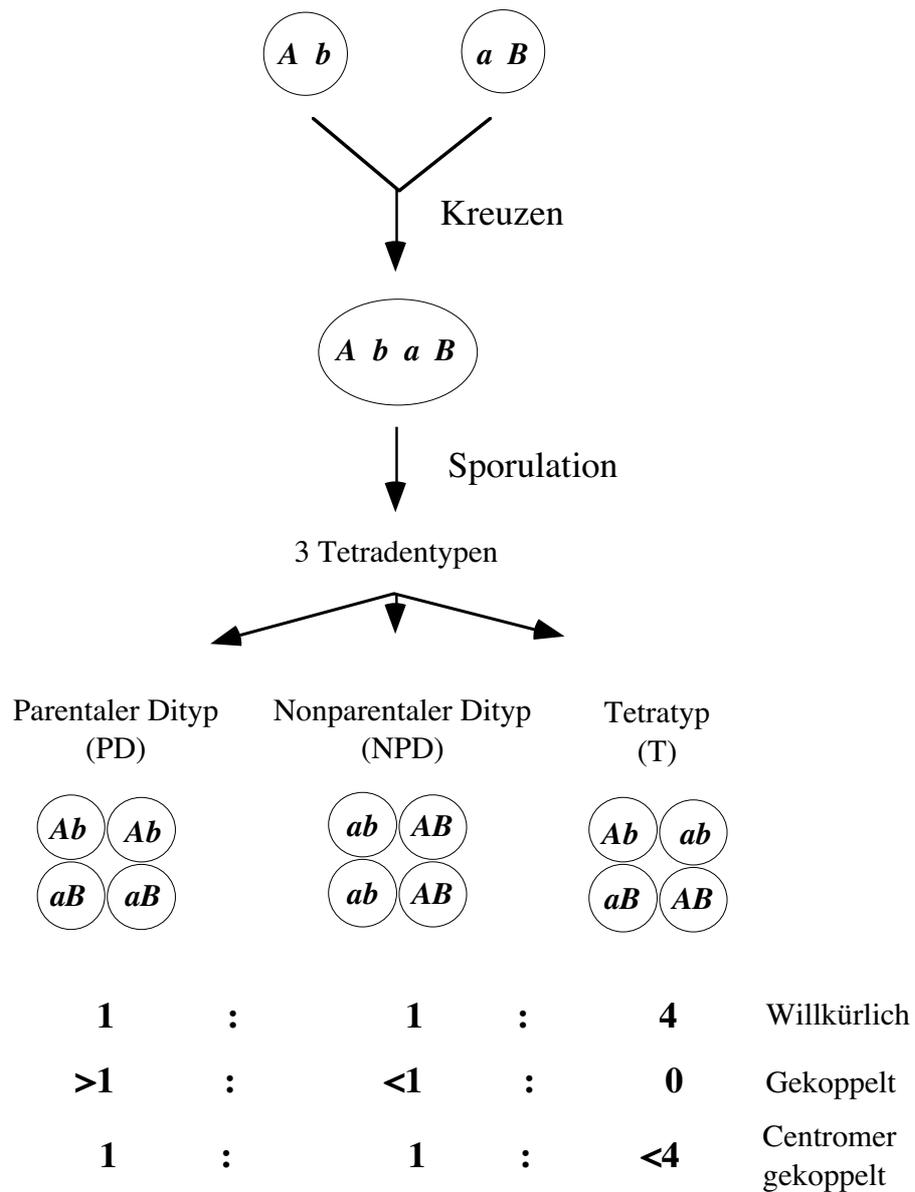


**Abbildung 1:** Vier verschiedene Möglichkeiten, worauf synthetisch letale Interaktionen zwischen zwei Genen beruhen können. Als Beispiel wurden *SAC1* und *LSA* (Letal mit *sac1*) verwendet. (1) Physikalische Interaktionen. (2) Sind parallel zueinander aktiv. (3) Sind im selben Weg aktiv. (4) Sind in voneinander abhängigen Wegen aktiv. Angepaßt aus (Doye and Hurt, 1995).

Eine spezielle Methode, genetische Zusammenhänge aufzudecken, ist die Suche nach synthetisch letalen Interaktionen mit einem mutierten Gen. Viele physikalisch und genetisch interagierende Komponenten der Kernpore wurden durch den Einsatz von synthetisch letalen Screens identifiziert (Doye and Hurt, 1995). Weitere synthetisch letale Screens wurden erfolgreich durchgeführt, um Gene zu identifizieren, die an der Morphogenese beteiligt sind (Bender and Pringle, 1991), (Costigan *et al.*, 1992), (Holtzman *et al.*, 1993), (Wang and Bretscher, 1995). Bei synthetisch letalen Screens werden zwei Mutationen in unterschiedlichen Genen gesucht, die alleine nicht letal sind, aber gemeinsam zum Tod der Zellen führen. Dieser Effekt wird auch synthetische oder synergistische Letalität genannt. Vier Möglichkeiten sind in Abb. 1 dargestellt, wodurch der Verlust einer essentiellen Funktion in den Zellen ausgelöst werden kann und damit zur synthetischen Letalität führt. (1) Physikalische Interaktion der beiden Genprodukte (Proteine), z. B. die Interaktion zwischen

Sec63p und Kar2p (Lyman and Schekman, 1995). (2) Die beiden Gene regulieren parallel zueinander einen gemeinsamen Weg, z. B. Vps1p und End4p. In *vps1* Mutanten ist der Transport vom Golgi zur Vakuole defekt, so daß End4p für den Transport über die Plasmamembran zur Vakuole benötigt wird (Nothwehr *et al.*, 1995). (3) Die beiden Gene sind im selben Weg hintereinander aktiv, z. B. Bet1p, das Synaptobrevin ähnlich ist, und Sec22p, die beide zum Transport vom ER zum Golgi benötigt werden (Newman *et al.*, 1990). (4) Die beiden Gene sind an voneinander abhängigen Wegen beteiligt, z. B. nuklearer Protein Import und nuklearer RNA Export (Doye and Hurt, 1995).

Wenn von zwei Genen bekannt ist oder vermutet wird, daß sie überlappende Funktionen haben, können die genetischen Interaktionen in Hefe durch die Herstellung von Doppelmutanten direkt getestet werden. Zwei haploide Stämme unterschiedlichen Paarungstyps, die je ein mutiertes Allel (a, b) der zu testenden Gene (A, B) enthalten, werden miteinander gekreuzt, der resultierende diploide Stamm (a/A, b/B) wird sporuliert und die jeweils vier Sporen einer ausreichenden Anzahl an Tetraden werden dissektiert (Abb. 2). Die vier Sporen in einem Ascus sind das Produkt einer einzigen meiotischen Teilung und können zu einer der drei Klassen von Tetraden gehören, parentaler Dityp (PD), nicht-parentaler Dityp (NPD) oder Tetratyp (T). Das Verteilungsmuster der drei verschiedenen Tetradentypen hängt von der chromosomalen Lage der beiden Loci zueinander und zu den Centromeren ab. Aus statistischen Gründen läßt sich dieses Verteilungsmuster erst bei einer größeren Anzahl an analysierten Tetraden ausrechnen (Adams *et al.*, 1997). Für die Identifizierung von synthetisch letalen Interaktionen ist die Anzahl und die Verteilung der nicht-lebensfähigen Sporen (a, b) von Interesse (Abb. 2).



**Abbildung 2:** Vereinfachtes Schema für die Analyse von genetischen Interaktionen zwischen den mutierten Allelen a und b. Liegen die Gene A und B weit entfernt voneinander, u. U. auf verschiedenen Chromosomen und ausreichend entfernt von den Centromeren, so ist die Verteilung der Gene willkürlich. Liegen diese zwei Gene dicht beieinander, aber entfernt vom Centromer, so ist die Verteilung der beiden gekoppelt. Bei der Analyse von einer ausreichenden Anzahl an Tetraden kann die Entfernung der beiden Gene voneinander berechnet werden. Liegt ein Gen dicht am Centromer, so äußert sich dies im Verteilungsmuster (gut erklärt in (Adams *et al.*, 1997)).

## 2.3 AUFGABENSTELLUNG

Sac1p hat verschiedene zelluläre Funktionen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Das Protein ist am ATP-Transport in das ER, am Phosphoinositid Metabolismus und an der polarisierten Sekretion beteiligt. Die genaue Rolle von Sac1p an diesen Vorgängen ist aber noch nicht bekannt. Außerdem ist die Deletion von *SAC1* nicht letal für die Zelle, sondern resultiert in den oben beschriebenen Phänotypen. Daher wurde ein genetischer Ansatz gewählt, um die Relevanz von *SAC1* im ATP-Transport und im Phosphoinositid Metabolismus aufzuklären.

Das für die Translokation und Faltung sekretorischer Proteine benötigte ATP wird mit Hilfe von Sac1p in das ER Lumen transportiert. Wegen der Abhängigkeit der beiden Prozesse voneinander wurde angenommen, daß *sac1Δ* synthetisch letal mit bestimmten Komponenten des Translokationsapparates ist. Daher sollten direkt die genetische Interaktion zwischen ATP-abhängigen Komponenten des Translokationsapparates und *sac1* Mutanten untersucht werden.

Weiterhin sollte ein synthetisch letaler Screen durchgeführt werden, um aus den isolierten Mutanten Rückschlüsse auf die Funktionen von *SAC1* zu ziehen. Mit einem solchen Screen können unvoreingenommen interagierende Faktoren identifiziert werden. Diese Faktoren können am ATP-Transport, am Phosphoinositid Metabolismus oder an der polarisierten Sekretion beteiligt sein. Unter anderem könnte dadurch der ATP-Transporter des ER identifiziert werden oder Komponenten isoliert werden, durch die Sac1p reguliert wird.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

Alle während dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, falls nicht anders erwähnt, von Merck oder Sigma bezogen und waren von der jeweils höchsten angebotenen Qualität. Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme und Polymerasen sowie ihre Puffer waren, soweit nicht anders angegeben, von Boehringer-Mannheim. Oligonukleotide wurden von der AG Dr. Frank (ZMBH, Heidelberg) hergestellt. DNA-Sequenzierungen wurden ebenfalls von der AG Dr. Frank (ZMBH, Heidelberg) durchgeführt. Radioaktive Chemikalien wurden von Amersham gekauft.

### 3.1 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Allgemeine molekularbiologische Methoden für die Klonierung in Plasmidvektoren wie Verdau von Plasmiden mit Restriktionsendonukleasen, Phosphatase-Behandlung, Auffüllen überhängender Enden nach Restriktionsverdau, Auftrennen der DNA mit Agarosegelen, Ligationen und Transformationen in kompetente *E. coli* wurden im wesentlichen nach den Vorschriften von (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt. Für die Präparation von Plasmiden aus *E. coli* wurden Systeme von Nucleobond und Qiagen verwendet und für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der „Easypure Kit“ der Firma BioZym verwendet.

#### 3.1.1 Bakterienmikrobiologie

Für molekularbiologische Standardklonierungsmethoden wurden während dieser Arbeit die Bakterienstämme MH1066 (Sikorski and Hieter, 1989), der ausschließlich für die Vektoren pMPY-ZAP, pMPY-3xHA und pMPY-3xMYC verwendet wurde, und DH5 $\alpha$  benutzt (Sambrook *et al.*, 1989). Das Wachstum aller DH5 $\alpha$ -Stämme erfolgte in LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989), dem, je nach Bedarf, 50  $\mu$ g/ml Ampicillin als Antibiotikum zugegeben wurde. Das Wachstum der MH1066-Stämme erfolgte in M9-Medium (Sambrook *et al.*, 1989), zu dem MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> und 1/100 Volumen 10 x YNB zugegeben wurde.

#### 3.1.2 Konstruktion verwendeter Plasmide

Als Klonierungsvektoren wurden – je nach Experiment – die folgenden Plasmide (Hefe-*E.coli*-shuttle-Vektoren) verwendet: Plasmide der Serien YCplac (Gietz and Sugino, 1988) und pRS (Sikorski and Hieter, 1989). Plasmide, die von anderen Gruppen erhalten wurden, sind in Tabelle 1 aufgelistet.

**YCplac22/SAC1:** [*CEN TRP1 SAC1*] pSAC1 wurde mit XbaI, AatII und NciII verdaut, das 2.4 kb großen XbaI-SAC1 Fragment, das die gesamte codierende Region von SAC1 enthielt, wurde aus dem Agarosegel isoliert, die Enden dieses Fragments wurden aufgefüllt und poliert und in den mit SmaI geschnittenen und dephosphorylierten Vektor YCplac22 ligiert.

Name des Plasmids		Ursprung
pSAC1	$2\mu$ URA3	Vytas Bankaitis
pRE128	<i>sac1::HIS3</i>	Vytas Bankaitis
pBKS	<i>LYS2 CAN1</i>	Frank Becker
pMPY-ZAP	<i>hisG:URA3:hisG</i>	(Schneider <i>et al.</i> , 1996)
pMPY-3xHA	<i>HA<sub>3</sub>:URA3:HA<sub>3</sub></i>	(Schneider <i>et al.</i> , 1995)
pMPY-3xMYC	<i>MYC<sub>3</sub>:URA3:MYC<sub>3</sub></i>	(Schneider <i>et al.</i> , 1995)
pSC9	<i>URA3 MAT<math>\alpha</math></i>	(Adams <i>et al.</i> , 1997)
pSC11	<i>URA3 MAT<math>\alpha</math></i>	(Adams <i>et al.</i> , 1997)
pCY204	<i>CEN URA3 HO</i>	(Adams <i>et al.</i> , 1997), (Russell <i>et al.</i> , 1986)
psac1-22	$2\mu$ URA3	Vytas Bankaitis
YEp352::MPK1	$2\mu$ URA3	(Helliwell <i>et al.</i> , 1998)

**Tabelle 1:** Plasmide von anderen Arbeitsgruppen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

**YCplacAT1:** [*CEN TRP1 LYS2 CAN1 SAC1*] Aus pBKS wurde mit XbaI das 9.5 kb große *LYS2/CAN1* Fragment isoliert und in das mit XbaI geschnittene Plasmid YCplac22/*SAC1* ligiert.

**pAT1:** [*CEN CAN1 LYS2 SAC1*] pAT2 wurde mit AatII und NsiI verdaut, um das *URA3* Gen herauszuschneiden. Mit Primern, die homologe Enden zu dem geschnittenen pAT2 haben, wurde per PCR ein 9.5 kb Fragment mit *LYS2* und *CAN1* aus pBKS heraus amplifiziert. Die beiden linearen Fragmente wurden zusammen in Hefe transformiert und ergaben durch homologe Rekombination (Ma *et al.*, 1987) das zirkuläre Plasmid pAT1.

Name	Sequenz
prAT1	5'GATATAATTA AATTGAAGCTCTAATTTGTGAGTTTAGTATACCTAGAGGCATCGCACAG3'
prAT2	5'GAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAA GTGCCCTAGAACTAGTGGATCCCC3'

**Tabelle 2:** Für die Amplifikation des 9.5 kb *LYS2/CAN1* Fragments verwendete Primer.

**pAT2:** [*CEN URA3 SAC1*] Das XbaI-*SAC1* Fragment (siehe YCplac22/*SAC1*) wurde in den mit XbaI geschnittenen Vektor YCplac33 subkloniert.

**pAT3:** [*CEN TRP1 sac1-22*] Das XbaI Fragment von *sac1-22* wurde in den mit XbaI geschnittenen Vektor YCplac22 subkloniert.

**pAT4:** [*CEN URA3 SLT2*] Der Vektor pRS306 wurde mit SmaI und EcoRI geschnitten. *SLT2* ( $\equiv$  *MPK1*) wurde aus dem Vektor YEp352::MPK1 isoliert, indem dieser mit SphI linearisiert wurde, die Enden aufgefüllt wurden und dann noch ein Verdau mit EcoRI durchgeführt wurde. Anschließend wurde das isolierte *SLT2* Fragment in den vorbereiteten Vektor ligiert.

**pAT5:** [*URA3 SLT2*] Dieses Plasmid wurde genauso hergestellt wie pAT4, mit dem Unterschied, daß als Ausgangsvektor pRS316 verwendet wurde.

**pAT6:** [ $2\mu$  *LYS2 SAC1*] *SAC1* wurde aus pAT2 mit SmaI und SalI herausgeschnitten und in den ebenfalls mit SmaI und SalI geschnittenen Vektor pRS425 ligiert.

### 3.1.3 Klonierung mit Hilfe der *polymerase chain reaction* (PCR)

Unter anderem für die Amplifikation des 9.5 kb *LYS2/CAN1* Fragment, das zur Herstellung von pAT1 verwendet wurde, wurde die Polymerase TaKaRa ExTaq von der Firma TaKaRa Biomedicals, Japan, verwendet. Diese hat die Eigenschaft, längere Produkte mit weniger Fehlern herstellen zu können. Es wurde das Protokoll des Herstellers verwendet:

< 1 $\mu$ g DNA	5 min 95°C	
100 pmol Primer I	25 Zyklen:	1 min 95°C
100 pmol Primer II		1 min 55°C
10 $\mu$ l Ex Taq 10 x Puffer		1min/kb 72°C
8 $\mu$ l 2,5 mM dNTPs	5 min 72°C	
H <sub>2</sub> O	+4°C	
0,3 $\mu$ l TaKaRa Ex Taq (5 units/ $\mu$ l)		
$\Sigma V = 100 \mu$ l		

## 3.2 HEFEGENETISCHE METHODEN

### 3.2.1 Mikrobiologische Methoden

Allgemeine Methoden der Hefemikrobiologie wie die Erzeugung diploider Stämme aus haploiden Stämmen durch Kreuzung, Sporulation diploider Zellen, Zerlegung von sporulierten Asci und Tetradenanalyse wurden nach (Adams *et al.*, 1997) durchgeführt. Das Wachstum von Hefen in Flüssigmedien wurde durch Bestimmung der Absorption (optischen Dichte, OD) bei 600 nm mit einem Photometer verfolgt. 1 OD<sub>600</sub> entspricht dabei etwa  $3 \times 10^7$  Zellen/ml. Um die Zelldichte sehr genau zu bestimmen (für Transformationen mit hoher Effizienz), wurde eine Neugebauer Zählkammer verwendet.

### 3.2.2 Medien

Alle Hefestämme wurden in Standardmedien inkubiert (Adams *et al.*, 1997). Vollmedien enthielten 1% Hefeextrakt, 2% Bacto-Peptone (beides von Gibco) und 2% Glukose (YPD). Für die Herstellung selektiver Medien wurde das Protokoll für Hartwell's Complete (HC) Medium (Adams *et al.*, 1997) verwendet. 5'-Fluorooronsäure-haltige Platten (5'FOA), Canavanin-haltige Platten (Can) und  $\alpha$ -Aminoadipinsäure-haltige Platten ( $\alpha$ AA) wurden ebenfalls nach (Adams *et al.*, 1997) hergestellt und verwendet. Inositolfreies Medium wurde nach (Klig *et al.*, 1985) hergestellt. Zur Herstellung fester Medien wurde den oben beschriebenen Medien 2% Agar (Gibco) zugegeben. Um Zellwanddefekte zu testen, wurden entweder Calcofluor Weiß (CFW) Platten durch Zugabe von 0.02 mg/ml CFW oder SDS Platten durch Zugabe von 0.03% SDS zu dem entsprechenden Medium hergestellt (Igual *et al.*, 1996).

### 3.2.3 Genetische Manipulation von Hefen

#### 3.2.3.1 Transformation von Hefen

Zur Transformation von Plasmiden wurde die modifizierte Lithiumacetat Methode angewendet. Für die Konstruktion von Gendelektionen durch Transformation mit linearen DNA Fragmenten oder die Transformation mit der chromosomalen Genbank, wurde das Transformationsprotokoll für hohe Effizienz mit der Lithiumacetat-Methoden von (Adams *et al.*, 1997) verwendet.

#### 3.2.3.2 Plasmid-Rückgewinnung aus Hefe

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Hefe erfolgte nach der Vorschrift von (Hoffman and Winston, 1987). 1.5  $\mu$ l der wässrigen Phase wurden in *E. coli* transformiert, Plasmid-enthaltende positive Klone amplifiziert und die DNA aufgereinigt.

#### 3.2.3.3 Präparation genomischer Hefe-DNA

Standardmäßig erfolgte die Präparation von genomischer Hefe-DNA nach dem Protokoll von (Hoffman and Winston, 1987). Die gewonnene DNA war frei von RNA und wurde in TE (pH 8.0) bei 4°C gelagert.

#### 3.2.3.4 Tetradenanalyse

Die Sporulation diploider Hefestämme wurde entweder wie in (Adams *et al.*, 1997) beschrieben oder in 1% Kaliumacetat-Flüssigkultur bei RT durchgeführt. Um den Ascus der Tetraden abzubauen, wurde 1 ml der Sporulationskultur pelletiert, zwei mal mit Wasser gewaschen und dann in ca. 1 ml Wasser aufgenommen. 200  $\mu$ l dieser Hefelösung wurden mit 200  $\mu$ l Zymolyaselösung gemischt, 10 Minuten bei RT inkubiert und danach auf Eis gestellt. 18  $\mu$ l dieser Lösung wurden vorsichtig auf eine YPD-Platte aufgetragen, so daß die Platte in zwei Hälften geteilt wurde. Nach dem Trocknen der Platte wurden die Tetraden zerlegt.

Zymolyase-Lösung: 2 mg Zymolyase  
15 mg DTT  
2 ml SE-Lösung

(immer frisch ansetzen)

SE-Lösung: 0.12 g Tris  
0.97 g EDTA  
pH 8.0 mit NaOH  
Wasser  
 $\Sigma V = 100$  ml

#### 3.2.3.5 Konstruktion von Gendelektionen

Um die verschiedenen Gendelektionen herzustellen, wurde die auf PCR-basierende ein-Schritt Methode (Baudin *et al.*, 1993) (Lorenz *et al.*, 1995) verwendet. Diese Technik nutzt aus, daß homologe Rekombination in Hefe sehr effizient mit linearen DNA Fragmenten stattfindet, wobei eine Homologie von  $\sim 40$  bp ausreichend ist. Die Primer wurden so ausgewählt, daß sich 40 nt des Zielgens am 5' Ende des Primers befanden, gefolgt von der Sequenz, um den gewünschten Marker von einem Plasmid der pRS400-Serie (Sikorski and Hieter, 1989) zu amplifizieren. Da diese Sequenz immer die gleiche war, konnte der Marker nach Belieben ausgewählt werden. Es wurde exakt nach dem Protokoll von (Adams *et al.*, 1997) gearbeitet.

Gen	Name der Primer	Sequenz
<i>SAC1</i>	SAC1/5-pRS400	5'CGTAAGATGCAATGGCATAGAGTGAAATTGTTAAT TGATCAGATTGTACTGAGAGTGCAC3'
<i>SAC1</i>	SAC1/3-pRS400	5'TATCGTAGCACCTAAAACGGTCAAGGCTGCGCAA TGATCCTGTGCGGTATTTACACCG3'
<i>SLT2</i>	SLT2-5'	5'AGTAGAAATAATTGAAGGGCGTGTATAACAATTCT GGGAGAGATTGTACTGAGAGTGCAC3'
<i>SLT2</i>	SLT2-3'	5'TCTATGGTGATTCTATACTTCCCCGGTTACTTATAGT TTTCTGTGCGGTATTTACACCG3'
<i>PKC1</i>	PKC1-3disr	ATATAAAATTAATAAATCATGGCATGACCTTTTCTC GACTCACTATAGGGAGACCG
<i>PKC1</i>	PKC1-5disr	TATAGTATCACACATATAGGGAGCAGTTTACAGTCCA CATACGATTTAGGTGACAC

**Tabelle 3:** Alle für die verschiedenen Gendeletionen verwendeten Primer.

### 3.2.3.5.1 Herstellung der Fragmente für die Gendeletionen

Die in (Adams *et al.*, 1997) beschriebene Methode wurde leicht modifiziert. Das PCR-Gemisch wurde wie angegeben angesetzt, nur das PCR Zyklus Profil wurde verändert:

10 - 100 ng linearisierte DNA	5 min 95°C	
25 pmol Primer I	25 Zyklen:	1 min 95°C
25 pmol Primer II		1 min 50°C
5 µl 10 x Puffer		1min/kb 72°C
5 µl 2 mM dNTPs	5 min 72°C	
H <sub>2</sub> O	+4°C	
0.2 µl Taq (5 units/µl)		
ΣV = 50 µl		

### 3.2.3.6 Konstruktion einer Gendeletion mittels pMPY-ZAP

Name des Primers	Sequenz
CAN1/5-ZAP	5'CGAGAGTAAATGGCGAGGATACGTTCTCTATGGAGGA TGGAGGGAACAAAAGCTGG3'
CAN1/3-ZAP	5'CACCATTGAATTTTGGTGCAAAAGCCGTGAAACCTTGA ATCTATAGGGCGAATTGG3'
CAN1-5	5'GTATCCATTGCGCTCTTTCCCG3'
CAN1-3	5'GAGATATAGGCGGCAGCAAAGC3'

**Tabelle 4:** Verwendete Primer: Mit den Primern CAN1/5-ZAP und CAN1/3-ZAP wurde das lineare DNA-Fragment für die Deletion hergestellt, mit CAN1-5 und CAN1-3 wurde die Deletionen per PCR analysiert.

Da die Anzahl der Marker in einem Hefestamm begrenzt ist, wurde für die Konstruktion von ATY6211 aus SEY6210 das *CAN1* Gen in zwei Schritten gegen das bakterielle *hisG* Gen ersetzt. Die Deletion reicht von Base 209 bis 1533 nach dem Start Codon in *CAN1*. Dazu wurde der Vektor pMPY-ZAP mit *NaeI* linearisiert und als Vorlage in die PCR eingesetzt.

Als Primer wurden CAN1/5-ZAP und CAN1/3-ZAP verwendet (Tabelle 4). Das erhaltene 2.1 kb große Fragment (5'-40 nt *CAN1-hisG:URA3:hisG*-40 nt *CAN1-3'*) wurde aufgereinigt und zur Transformation eingesetzt. Die Kolonien wurden auf HC-Ura Platten selektiert und per PCR analysiert. Die positiven Klone wurden in YPD hochgezogen, so daß das *URA3* Gen und eine Kopie des *hisG* Gens durch interne homologe Rekombination herausfallen konnte. Für Kolonien, bei denen dieser Prozess stattgefunden hatte, wurde auf 5'FOA-Platten selektiert. Die hochgewachsenen Kolonien wurden wieder in der PCR analysiert. Als analytische Primer wurden beide Male CAN1-5 und CAN1-3 eingesetzt (Tabelle 4). Es wurde exakt nach der beschriebenen Prozedur (Schneider *et al.*, 1996) gearbeitet.

### 3.2.3.7 Manipulation des Paarungstyps

In zwei Schritten wurde aus ATY6211 (*MAT $\alpha$* ) der isogenen *MATa* Stamm ATY6213 hergestellt. Dazu wurde ATY6211 mit dem mit EcoRI linearisierten Plasmid pSC11 transformiert. Die positiven Klone wurden auf HC-Ura selektiert und anschließend in YPD hochgezogen. Diese Kultur wurde mit Wasser gewaschen, verdünnt und ein Teil davon auf einer 5'FOA-Platte ausgestrichen. Von den hochgewachsenen Kolonien wurden 72 Kolonien und der Ausgangsstamm auf eine YPD Platte aufgetragen und nach dem Hochwachsen mit einem *MATa* und einem *MAT $\alpha$*  Testerstamm gekreuzt. Es wurde exakt nach dem Protokoll von (Adams *et al.*, 1997) gearbeitet.

### 3.2.3.8 PCR mit ganzen Hefezellen

Für die Überprüfung der erfolgten Manipulationen im Genom der Hefezellen wurde eine analytische PCR durchgeführt. Die eingesetzten Primer (siehe Anhang) wurden so gewählt, daß sie sich außerhalb der veränderten Region anlagern. Von dem zu analysierenden Stamm wurden wenige Hefezellen als Vorlage eingesetzt, anstatt aufgereinigte genomische DNA einzusetzen. Diese Methode läßt sich gut auf zu amplifizierende Fragmente unter ~2 kb anwenden. Es wurde exakt nach dem Protokoll von (Adams *et al.*, 1997) gearbeitet.

### 3.2.3.9 *In vivo* Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS)

Für die *in vivo* Mutagenese der Stämme ATY6215 und ATY6216 nach (Adams *et al.*, 1997) wurden Zellen in YPD-Medium bei 30°C bis in die stationäre Phase (~1.3 x 10<sup>8</sup> Zellen/ml) hochgezogen. 2 x 10<sup>8</sup> Zellen wurden geerntet, zwei mal mit sterilem Wasser gewaschen und in 1.0 ml sterilem 0.1 M Natrium-Phosphatpuffer (pH 7) resuspendiert. Die exakte Zelldichte wurde mittels einer Neugebauer Zählkammer bestimmt. Diese Suspension wurde halbiert, zu dem einen Aliquot wurden 15  $\mu$ l EMS zugegeben, das andere diente als nicht-mutagenisierte Kontrolle, um später die Überlebensrate zu bestimmen. Beide Gefäße wurden eine Stunde bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend pelletiert, in sterilem Wasser aufgenommen, in ein frisches Gefäß überführt und dann zwei mal mit 5% Natrium Thiosulfat gewaschen. Die mutagenisierten Zellen wurden in 500  $\mu$ l Wasser aufgenommen und um den Faktor 8.3 x 10<sup>-5</sup> verdünnt (2.5  $\mu$ l auf 30 ml). Davon wurden je 210  $\mu$ l auf insgesamt 110 YPD Platten ausgestrichen. Die Referenz wurde 2 x 10<sup>-5</sup> fach verdünnt und es wurden je 100  $\mu$ l auf insgesamt vier YPD Platten ausgestrichen. Die Platten wurden drei Tage bei 25°C inkubiert.

### 3.2.4 Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme

Alle Hefestämme, die während dieser Arbeit von anderen Arbeitsgruppen erhalten wurden, sind in Tabelle 5 aufgelistet und alle Hefestämme, die während dieser Arbeit konstruiert wurden, sind in Tabelle 6 aufgelistet.

**YM1864(5):** Die Stämme YM1864 und YM1865 wurden zwar im Labor von Vytas Bankaitis hergestellt, aber die Deletion des *SAC1* Gens wurde dort nicht mehr verifiziert. Hierzu wurde mit den beiden Stämmen YM1864 und YM1865 eine analytische PCR mit ganzen Hefezellen durchgeführt. Mit den Primern SAC1 3in2 und SAC1 5in wurde für *sac1::HIS3* ein Fragment von 2.1 kb amplifiziert. Mit den gleichen Primern zeigt die Wildtyp Kontrolle ein Fragment von 0.9 kb.

Name	Genotyp	Ursprung
YM1862	<i>MATa ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 met<sup>R</sup> can<sup>R</sup> reg1-501 LEU2::GAL1-lacZ</i>	(Hovland <i>et al.</i> , 1989)
YM1863	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 can<sup>R</sup> reg1-501 LEU2::GAL1-lacZ</i>	(Hovland <i>et al.</i> , 1989)
YM1864	YM1862 <i>sac1::HIS3</i>	Vytas Bankaitis
YM1865	YM1863 <i>sac1::HIS3</i>	Vytas Bankaitis
SEY6210	<i>MAT<math>\alpha</math> trp1-delta901 leu2-3,112 his3-delta200 ura3-52 lys2-801 suc2-delta9</i>	(Hong <i>et al.</i> , 1996)
J51-5c	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 leu2-3-112 his4 trp1 ade2-101 ptl1 (sec63<sup>ts</sup>)</i>	David Meyer
RSY529	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 leu2,3-112 his4-6/9 sec62-1<sup>ts</sup></i>	(Lyman and Schekman, 1997)
YOO98	<i>MATa trp1 his3 ura3 ade2 sec61-2<sup>ts</sup></i>	Stefan Jentsch
YOO08	<i>MATa leu2 ura3 trp1 his4 sec61-3<sup>ts</sup></i>	Stefan Jentsch
RSY926	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101 ura3-52 his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>1 trp1<math>\Delta</math>1 suc2 sec71::LEU2</i>	(Lyman and Schekman, 1997)
RSY1006	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-101 lys2-801 his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>1 sec71::HIS3</i>	(Lyman and Schekman, 1997)
YG0038	<i>MATa ade2-101 ura3-52 leu2,3-112 trp1 lys2 kar2-203<sup>ts</sup></i>	(te and Aebi, 1994)
YG0041	<i>MATa ade2-101 ura3-52 leu2,3-112 his3<math>\Delta</math>200 lys2 kar2-159<sup>ts</sup></i>	(te and Aebi, 1994)
YG0044	<i>MATa ade2-101 ura3-52 his3 lys2 kar2-1<sup>ts</sup></i>	(te and Aebi, 1994)
ATY355 (W303 1A)	<i>MATa ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+</i>	Ralf Jansen
ATY356 (W303 1B)	<i>MAT<math>\alpha</math> ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+</i>	Ralf Jansen
ATY357 (#72)	<i>MAT <math>\alpha</math> his3 leu2 ade2 trp1 ura3 can1-100 bni1::URA3</i>	Ralf Jansen
ATY358 (#73)	<i>MAT a his3 leu2 ade2 trp1 ura3 can1-100 bni1::URA3</i>	Ralf Jansen
ATY373 (#470)	<i>MATa/MAT<math>\alpha</math> ade2-1/ade2-1 trp1-1/trp1-1 can1-100/can1-100 leu2-3,112/leu2-3,112 his3-11,15/his3-11,15 ura3/ura3 GAL psi+</i>	Ralf Jansen
TSY807	<i>MATa his3-delta200 leu2-3,112 lys2-801 ura3-52</i>	Tim Stearns

**Tabelle 5:** Verwendete Hefestämme

**ATY307:** Die beiden Stämme RSY529 und YM1864 {pAT2} wurden gekreuzt, der resultierende diploide Stamm sporuliert und die Tetraden wurden dissektiert. Die aus den Sporen hochgewachsenen Kolonien wurden auf 5'FOA Platten ausgestrichen und

anschließend nach den beiden Phänotypen ts (für *sec62-1*) und cs (für *sac1::HIS3*) untersucht. Es wurde der Stamm gewählt, der sowohl ts als auch cs war.

**ATY308:** Die beiden Stämme YOO98 und YM1865 {pAT2} wurden gekreuzt, der resultierende diploide Stamm sporuliert und die Tetraden wurden dissektiert. Die aus den Sporen hochgewachsenen Kolonien wurden nach dem ts Phänotypen für *sec61-2* und auf HC-His Platten (für *sac1::HIS3*) untersucht. Es wurde der Stamm gewählt, der sowohl ts als auch His<sup>+</sup> war.

**ATY309/ATY310:** Die beiden Stämme YOO08 und YM1864 {pAT2} wurden gekreuzt, der resultierende diploide Stamm sporuliert und die Tetraden wurden dissektiert. Die aus den Sporen hochgewachsenen Kolonien wurden nach dem ts Phänotypen für *sec61-3* untersucht, und wurden auf 5'FOA Platten ausgestrichen, auf denen die Doppelmutanten *sac1Δ sec61-3* nicht wachsen können. Mit diesen Stämmen wurde weitergearbeitet.

Name	Genotyp
ATY307	<i>sec62-1 sac1::HIS3</i> pAT2
ATY308	<i>MATα his3-200 ura3-52 ade2-101 trp1 sec61-2 sac1::HIS3</i> pAT2
ATY309	<i>MATα his3-200 ura3-52 ade2-101 trp1 can<sup>R</sup> sec61-3 sac1::HIS3</i> pAT2
ATY311-1/-2	<i>MAT α ura3-52 leu 2,3-112 his4 his3-200 trp1 ade2-101 can<sup>R</sup>(-1) sec63 sac1::HIS3</i> pAT2
ATY331	<i>MATα trp1-delta901 leu2-3,112 his3 delta200 ura3-52 lys2-801 suc2-delta9 can1::hisG sac1::HIS3 slt2::TRP1</i> pAT1
ATY336	<i>MATα trp1-delta901 leu2-3,112 his3-delta200 ura3-52 lys2-801 suc2-delta9 can1::hisG</i>
ATY337	<i>slt2::HIS3 (slt2::TRP1)</i>
ATY338	<i>MATα trp1-delta 901 leu2-3,112 his3-delta 200 ura3-52 lys2-801 suc2-delta 9 can1::hisG</i>
ATY339	<i>slt2::HIS3 (slt2::TRP1)</i>
ATY352	<i>trp1-delta901 leu2-3,112 his3-delta200 ura3-52 lys2-801 suc2-delta9 can1::hisG sac1::TRP1 slt2::HIS3</i>
ATY359-1/-2	<i>bni1::URA3 sac1::TRP1</i>
ATY6211	<i>MATα trp1-delta901 leu2-3,112 his3-delta200 ura3-52 lys2-801 suc2-delta9 can1::hisG</i>
ATY6212	<i>MATα trp1-delta901 leu2-3,112 his3-delta200 ura3-52 lys2-801 suc2-delta9 can1::hisG sac1::TRP1</i>
ATY6213	<i>MATα trp1-delta901 leu2-3,112 his3-delta200 ura3-52 lys2-801 suc2-delta9 can1::hisG</i>
ATY6214	<i>MATα trp1-delta901 leu2-3,112 his3-delta200 ura3-52 lys2-801 suc2-delta9 can1::hisG sac1::HIS3</i>
ATY6215	ATY6212 pAT1
ATY6216	ATY6214 pAT1
ATY6218	<i>MATα trp1-delta901 leu2-3,112 his3-delta200 ura3-52 lys2-801 suc2-delta9 can1::hisG sac1::TRP1</i>
ATY6219	ATY6218 pAT1
ATY369	ATY373 <i>pkc1::HIS3MX</i>
ATY371	<i>MATα ade2-1 trp1-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi<sup>+</sup> pkc1::HIS3MX</i>

**Tabelle 6:** In dieser Arbeit konstruierte Hefestämme

**ATY311/ATY312/ATY313:** Die beiden Stämme J51-5c und YM1864 {pAT2} wurden gekreuzt, der resultierende diploide Stamm sporuliert und die Tetraden wurden dissektiert. Die aus den Sporen hochgewachsenen Kolonien wurden nach dem ts Phänotyp für *sec63* untersucht und wurden auf 5'FOA Platten ausgestrichen, auf denen die *sac1Δ sec63* Doppelmutanten nicht wachsen können. Mit diesen Stämmen wurde weitergearbeitet.

**ATY6211:** In zwei Schritten wurde in dem Stamm SEY6210 das *CAN1* Gen durch das bakterielle *hisG* Gen ersetzt. Mit Hilfe des pMPY-Vektors wurde verfahren, wie unter Kapitel 3.2.3.6 beschrieben.

**ATY6212:** Wie unter Kapitel 3.2.3.5 beschrieben, wurde in dem Stamm ATY6211 das *SAC1* Gen durch das *TRP1* Gen ersetzt. Die Deletion reicht von bp 1363 bis bp 1887 der codierenden Region von *SAC1* (Cleves *et al.*, 1989).

**ATY6213:** Um den zu ATY6211 (*MAT $\alpha$* ) isogenen *MATa* Stamm ATY6213 herzustellen, wurde ATY6211 mit dem mit EcoRI linearisierten Plasmid pSC11 transformiert. Es wurde exakt nach dem Protokoll von (Adams *et al.*, 1997) gearbeitet.

**ATY6214:** Wie unter Kapitel 3.2.3.5 beschrieben wurde in dem Stamm ATY6213 das *SAC1* Gen durch das *HIS3* Gen ersetzt. Die Deletion reicht von bp 1363 bis bp 1887 der codierenden Region von *SAC1* (Cleves *et al.*, 1989).

**ATY6218:** Wie unter Kapitel 3.2.3.5 beschrieben wurde in dem Stamm ATY6213 das *SAC1* Gen durch das *TRP1* Gen ersetzt. Die Deletion reicht von bp 1363 bis bp 1887 der codierenden Region von *SAC1* (Cleves *et al.*, 1989).

**ATY331:** Im Stamm ATY6216 wurde der gesamte ORF (bp 1 - 1460) von *SLT2* durch *TRP1* ersetzt. Es wurde vorgegangen, wie in Kapitel 3.2.3.5 beschrieben. In den Stämmen ATY6211, ATY6213 und SEY6210 wurde ebenfalls *SLT2* mit *TRP1* deletiert (ATY337, ATY339 und ATY344) und in den Stämmen ATY6211, ATY6213 und TSY807 wurde *SLT2* mit *HIS3* deletiert (ATY336, ATY338 und ATY341).

**ATY352:** Die beiden Stämme ATY338 und ATY6212 wurden gekreuzt, der resultierende diploide Stamm sporuliert und die Tetraden wurden dissektiert. Es wurden die Kolonien gewählt, die sowohl auf Histidin-freiem als auch auf Tryptophan-freiem Medium wachsen konnten (*slt2::HIS3 sac1::TRP1*).

**ATY359:** Die beiden Stämme ATY358 und ATY6212 wurden gekreuzt, der resultierende diploide Stamm sporuliert und die Tetraden wurden dissektiert. Es wurden die Kolonien gewählt, die sowohl auf Uracil-freiem als auch auf Tryptophan-freiem Medium wachsen konnten (*bni1::URA3 sac1::TRP1*).

**ATY369:** Im Stamm ATY373 wurde der gesamte ORF (bp 1 - 3456) von *PKC1* durch *HIS3* ersetzt. Die *HIS3MX* Kasette und die Primer für die Amplifikation des Fragments für die Deletion wurden von der Arbeitsgruppe von M. Hall (Biozentrum Basel) erhalten. Es wurde vorgegangen, wie in Kapitel 3.2.3.5 beschrieben.

**ATY371:** Der Stamm ATY369 wurde sporuliert, die resultierenden Tetraden wurden nach dem Protokoll der „Random Spore Analysis“ (Adams *et al.*, 1997) behandelt. Die so vereinzelt Sporen wurden auf HC-His + 1 M Sorbitol ausplattiert, damit nur *pkc1::HIS3* Zellen hochwachsen können. Auf diese Weise wurde ein Stamm isoliert.

### 3.3 BIOCHEMISCHE METHODEN

#### 3.3.1 Herstellung und Analyse von Lipidextrakten

Die Zellen wurden über Nacht bei 30°C in Inositol-freiem Medium mit 0.1 mM Inositol hochgezogen, am Morgen auf 0.3 OD<sub>600</sub> eingestellt und noch mal für ein bis zwei Teilungen inkubiert. 3 OD<sub>600</sub> Zellen in 3 ml wurden 20 Minuten bei 25°C mit 1 µCi [<sup>14</sup>C]-myo-Inositol markiert, dann pelletiert, zwei Mal mit eiskaltem Wasser gewaschen, in 0.3 ml Wasser resuspendiert, 1.2 ml Ethanol zugegeben und 45 Minuten bei 95°C im Wasserbad erhitzt. Danach wurden 2 ml 0.1 M KCl 0.1 N HCl, 7.5 ml CHCl<sub>3</sub>/MeOH/1 N HCl (495:990:15) und 2.5 ml CHCl<sub>3</sub> zugegeben und gut gemischt. Es wurden noch mal 2.5 ml 2 M KCl 0.01 N HCl zugegeben, gut gemischt und dann zentrifugiert, um die beiden Phasen zu trennen. Die obere (wässrige) Phase wurde verworfen und die untere (organische) wurde mit 7.6 ml 2 M KCl 0.01 N HCl gewaschen. Anschließend wurde die organische Phase im Stickstoffstrom getrocknet und die isolierten Lipide in 50 – 100 µl CHCl<sub>3</sub>/MeOH/1 N HCl (495:990:15) aufgenommen.

Die Lipide wurden per Dünnschichtchromatographie aufgetrennt und in der Jodkammer angefärbt, die radioaktiven Signale wurden durch Fluorographie mit Hilfe eines BAS1000 Phosphoimager (Fuji, Japan) und der vom Hersteller gelieferten Software (MacBas 2.0) analysiert. Als Laufmittel wurde 1-Propylacetat/2-Propanol/Ethanol/6% aq. NH<sub>4</sub>OH (3:9:3:9) verwendet, die benutzten Platten waren TLC silica gel HL plate von Analtech Uniplate, USA (Katalog Nr. 46011).

#### 3.3.2 Herstellung von Mikrosomen

In den aus dem Screen erhaltenen Mutanten wurde der ATP-Transport in das ER gemessen. Zu diesem Zweck wurden Mikrosomen isoliert. Dazu wurde zuerst die Zellwand mit Zymolyase verdaut, das Enzym wurde danach über Zentrifugation durch ein Sucrose/Ficoll-Kissen entfernt. Anschließend wurden die Zellen homogenisiert und die Mitochondrien und andere schwere Zellbestandteile mittels Zentrifugation durch ein Sucrose-Kissen von den Mikrosomen getrennt. Die Mikrosomen wurden durch einen weiteren Zentrifugationsschritt angereichert.

##### 3.3.2.1 Lösungen

Tris-Sulfat Puffer:	100 mM Tris-Sulfate pH 9.4 plus 10 mM DTT
Sorbitol-Puffer:	1.2 M Sorbitol 20 mM K <sub>p</sub> Puffer pH 7.4 5 mM DTT (frisch zugegeben)
Spheroblasten-Medium:	Sorbitol-Puffer, der mit YPD statt Wasser angesetzt wurde
Sucrose/Ficoll-Puffer:	0.8 M Sucrose 1.5% (w/v) Ficoll 400 20 mM HEPES pH 7.4
Membran-Lyse-Puffer:	50 mM KOAc 2 mM EDTA 20 mM HEPES pH 7.4 2 mM DTT (frisch zugegeben)

0.5 M Sucrose:	0.5 M Sucrose 50 mM KOAc 2 mM EDTA 20 mM HEPES pH 7.4 1 mM DTT (frisch zugegeben)
1.0 M Sucrose:	wie unter 0.5 M Sucrose beschrieben, aber mit 1.0 M Sucrose
Membran-Puffer:	0.25 M Sucrose 50 mM KOAc 1 mM DTT (frisch zugegeben) 20 mM HEPES pH 7.4 20 $\mu$ g/ml PMSF

### 3.3.2.2 Protokoll

Eine 1 l Hefekultur wurde über Nacht bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1.0 – 1.5 hochgezogen. Die Zellen wurden pelletiert, mit Tris-Sulfat-Puffer (ohne DTT) gewaschen und das Volumen des Pellets notiert. Dieses Pellet wurde entweder bei –80°C gelagert oder gleich weiterverarbeitet. Das Pellet wurde in 20 ml Tris-Sulfat-Puffer (mit DTT) resuspendiert und 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Zellen wieder pelletiert und einmal mit Sorbitol-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde bis zu einem Endvolumen von 20 ml in Spheroblasten-Medium aufgenommen, das 20 mg Zymolyase enthielt. Während der 90 minütigen Inkubation bei 30°C mit langsamem Schütteln wurde die Zellwand abgebaut. Anschließend wurde die Suspension auf 10 ml 0.8 M Sucrose-Ficoll-Kissen geschichtet und 15 Minuten bei 4°C und 5000 rpm im Sorvall SS-34 Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Spheroblasten-Pellet wurde in Membran-Lyse-Puffer mit 50  $\mu$ l PMSF bis zu einem Endvolumen von 20 ml aufgenommen und im Potter homogenisiert. Dazu wurden 20 ml 0.5 M Sucrose zugegeben, gemischt, dieses Homogenat wurde dann auf 10 ml 1.0 M Sucrose geschichtet und dann 15 Minuten bei 4°C und 8000 rpm im Sorvall HB-4 Rotor zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand und die Interphase wurden vorsichtig abgenommen und die darin enthaltenen Mikrosomen 30 Minuten bei 4°C und 15000 rpm im Sorvall SS-34 Rotor pelletiert. Das resultierende Membranpellet wurde vorsichtig in einer angemessenen Menge Membran-Puffer resuspendiert. 10  $\mu$ l der Suspension wurden 1:100 in 2% SDS verdünnt, um die OD<sub>280</sub> zu bestimmen und die Ausbeute zu berechnen. Für die Messung des ATP-Transports wurden drei Aliquots auf 10 OD<sub>280</sub>/ml in je 300  $\mu$ l eingestellt. Die Membranen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

### 3.3.3 ATP-Transport-Messung

Um den ATP-Transport ins ER zu untersuchen, wurde die ATP-Menge gemessen, die in einer bestimmten Zeit in Hefe-Mikrosomen durch aktiven Transport aufgenommen wurde. Radioaktiv markiertes ATP wurde zu den Mikrosomen gegeben und nach bestimmten Zeitabständen wurden die Mikrosomen auf Anionenaustauschersäulen gegeben, um nicht-aufgenommenes ATP zu entfernen, welches an das Säulenmaterial bindet. Die verbliebene ATP-Menge im Säulendurchfluß, d. h. in die Mikrosomen transportiertes ATP, wurde anhand eines Szintillationszählers ermittelt.

Als erstes wurden kleine Glassäulen mit 150 mg Dowex in 500  $\mu$ l 250 mM Sucrose 10 mM HEPES gefüllt, die präparierten Mikrosomen wurden auf Eis aufgetaut und es wurde

nochmals die  $OD_{280}$  der Proben bestimmt. Um den mitochondrialen ADP/ATP Transporter zu inhibieren, der mit den Mikrosomen aufgereinigt wurde und dadurch das Ergebnis des Transports in das ER verfälscht, wurden vor Beginn der Messung  $3 \mu\text{l}$   $10 \text{ mM}$  Atractylosid (ATR) zugegeben und dann 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor  $15 \mu\text{l}$   $1 \text{ mM}$  [ $^{14}\text{C}$ ]ATP zugegeben wurden. Nach 20, 40, 70, 120 und 300 Sekunden wurden  $50 \mu\text{l}$  des radioaktiven Gemischs auf die Säule gegeben, mit  $100 \mu\text{l}$   $250 \text{ mM}$  Sucrose  $10 \text{ mM}$  HEPES nachgespült und vorsichtig eluiert. Für die Bestimmung des Nullwerts wurde zum restlichen Membranenansatz  $10 \mu\text{l}$   $10\%$  Triton X-100 zugegeben, um die Mikrosomen aufzulösen, und dann ebenfalls über die Säule gegeben. Das gesamte Eluat wurde in Szintillationsflüssigkeit gegeben, die „counts per minute (cpm)“ wurden im Szintillationsgerät gemessen und die Auswertung erfolgte dann folgendermaßen:

- aufgenommenes ATP (pmol): Von den cpm der jeweiligen Probe wurde der Nullwert abgezogen, und der so erhaltene Wert wurde durch die spezifische Aktivität des eingesetzten [ $^{14}\text{C}$ ]ATP geteilt.
- aufgenommenes ATP ( $\mu\text{mol/g}$  protein): Da  $1 OD_{280}$  der Membranen  $3.5 \text{ mg/ml}$  Protein entsprechen und  $50 \mu\text{l}$  Mikrosomen eingesetzt wurden, wurde der Wert des aufgenommenen ATPs mit  $3.5$  multipliziert und durch  $50$  und die  $OD_{280}$  der jeweiligen Probe dividiert.

## 3.4 MIKROSKOPIE

### 3.4.1 Fluoreszenzmikroskopie

Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurden  $\sim 10^7$  Zellen in  $70\%$  Ethanol fixiert und dann mit  $50 \text{ ng/ml}$  DAPI angefärbt. Für die Auswertung wurde ein UV-Filter verwendet (Adams *et al.*, 1997).

Für das Anfärben des Chitins in der Zellwand wurden zu  $\sim 10^7$  Zellen im Medium  $100 \mu\text{g/ml}$  Calcofluor Weiß gegeben und kurz inkubiert. Für die Auswertung wurde ein UV-Filter verwendet (Adams *et al.*, 1997).

### 3.4.2 Elektronenmikroskopie

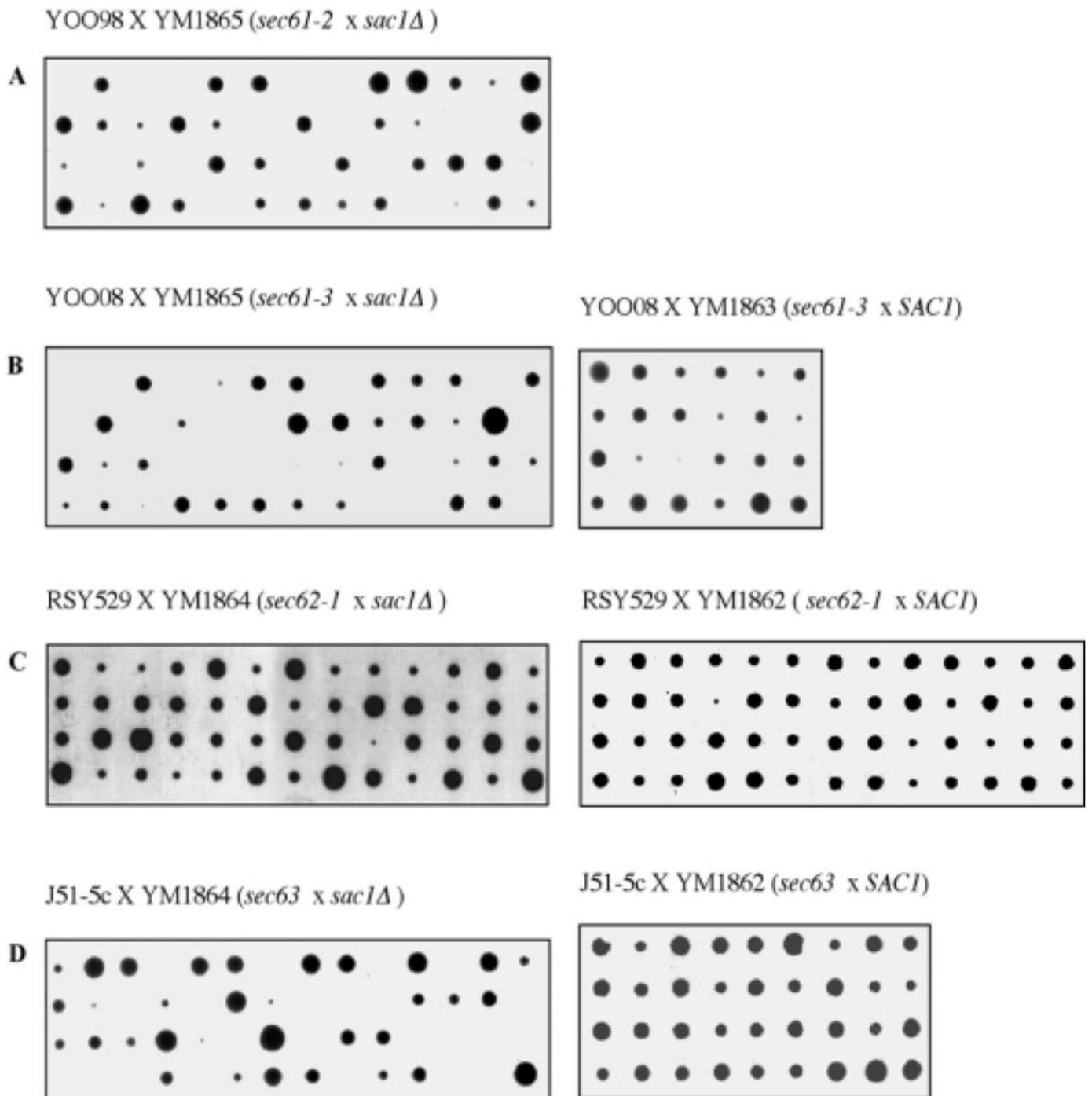
Die Zellen einer Übernachtskultur wurden zwei Mal mit  $100 \text{ mM}$  Citratpuffer pH 4.7 gewaschen und dann nach dem Protokoll von Frank Vogel (MDC Berlin-Buch) in  $4\%$  Formaldehyd,  $0.5\%$  Glutaraldehyd in  $100 \text{ mM}$  Citratpuffer pH 4.7 bei  $30^\circ\text{C}$  fixiert. Die weitere Fixierung mit  $1\%$  Osmium Tetroxid in PBS und die Aufnahmen am Laser Scanning Elektronen Mikroskop wurde am MPI für Entwicklungsbiologie in Tübingen von Jürgen Berger und Heinz Schwarz durchgeführt.

## 4 ERGEBNISSE

Der Ergebnisteil ist in drei Kapitel unterteilt. Im ersten Teil wird auf den Zusammenhang zwischen Energie-abhängiger Translokation von sekretorischen Proteinen und Transport der benötigten Energie in das ER Lumen eingegangen (Kochendorfer *et al.*, 1999). Im zweiten Teil wird nach Faktoren gesucht, die gemeinsam mit *SAC1* eine essentielle zelluläre Funktion haben. Einer dieser isolierten Faktoren und seine gemeinsame Funktion mit *SAC1* wird im dritten Teil beschrieben.

### 4.1 GENETISCHE INTERAKTIONEN VON *SAC1* MIT KOMPONENTEN DES TRANSLOKATIONS- APPARATES

ATP wird für die Translokation und Faltung von sekretorischen Proteinen im ER benötigt (Lyman and Schekman, 1997) und muß daher aus dem Cytosol in das ER Lumen transportiert werden, woran Sac1p beteiligt ist (Mayinger *et al.*, 1995). Zu Beginn dieser Arbeit war noch nicht klar, ob Sac1p direkt oder als regulatorischer Faktor an dem ATP-Transport in das ER Lumen beteiligt ist. In der Zwischenzeit wurde von (Kochendorfer *et al.*, 1999) gezeigt, daß Sac1p ein regulatorischer Faktor ist. *In vitro* war gezeigt worden, daß eine Deletion des *SAC1* Gens einen reduzierten ATP-Transport in das ER Lumen und verlangsamte Reifung von Vorläuferproteinen in Hefe zur Folge hat (Mayinger *et al.*, 1995). Falls sich diese *in vitro* Daten auf *in vivo* Verhältnisse übertragen lassen, sollten sich genetische Interaktionen zwischen Komponenten des Translokationsapparates und *SAC1* nachweisen lassen. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit als erstes untersucht, was für Auswirkungen *in vivo* die Deletion von *SAC1* in *sec61*, *sec62* bzw. *sec63* Mutanten auf die Zelle hat.



**Abbildung 3:** Gezeigt sind die folgenden Tetradenanalysen: **(A)** YOO98 x YM1865 (*sec61-2* x *sac1Δ*). **(B)** YOO08 x YM1865 (*sec61-3* x *sac1Δ*), links und Kontrolle YOO08 x YM1863 (*sec61-3* x *SAC1*) rechts. **(C)** RSY529 x YM1864 (*sec62-1* x *sac1Δ*), links und Kontrolle RSY529 x YM1862 (*sec62-1* x *SAC1*) rechts. **(D)** J51-5c x YM1864 (*sec63* x *sac1Δ*), links und Kontrolle J51-5c x YM1862 (*sec63* x *SAC1*) rechts. Die Sporen einer Tetrade wurden untereinander abgelegt.

#### 4.1.1 *sac1Δ sec61<sup>ts</sup>* und *sac1Δ sec63<sup>ts</sup>*, nicht aber *sac1Δ sec62<sup>ts</sup>* sind synthetisch letal

Hier wurde der direkte genetische Ansatz gewählt, um die Interaktionen von *SAC1* mit *SEC61*, *SEC62* bzw. *SEC63* zu untersuchen. Dazu wurden *sac1Δ* Stämme (YM1864 und YM1865) mit den jeweiligen *sec61<sup>ts</sup>*, *sec62<sup>ts</sup>* und *sec63<sup>ts</sup>* (*pil1<sup>ts</sup>*) Stämmen gekreuzt und die Diploiden anschließend sporuliert. Bei der darauf folgenden Tetradenanalyse sollten im Falle von synthetisch letalen Interaktionen aus den Sporen der Doppelmutanten keine Kolonien hochwachsen. Ist die Doppelmutante allerdings lebensfähig, so sollten alle vier Sporen einer Tetrade hochwachsen. Für die genaue Analyse der Tetraden ist die chromosomale Lage der untersuchten Gene zueinander und zu den Centromeren wichtig. Da *SAC1*, *SEC61*, *SEC62* und *SEC63* auf verschiedenen Chromosomen und entfernt von den jeweiligen Centromeren liegen, segregieren sie bei der Meiose unabhängig voneinander. Dies sollte sich in dem Verhältnis der drei verschiedenen Tetradentypen PD:NPD:T (Abb. 2) widerspiegeln, das unter diesen Voraussetzungen 1:1:4 sein sollte (siehe Einleitung). Falls die Doppelmutation von *sac1Δ* mit *sec61<sup>ts</sup>*, *sec62<sup>ts</sup>* oder *sec63<sup>ts</sup>* letal ist, so sollten diese Sporen nicht hochwachsen. Der *sac1Δ* Stamm wurde mit zwei allelen *sec61* Stämmen, einem *sec62* und einem *sec63* Stamm gekreuzt und anschließend die Tetradenanalyse durchgeführt. In Abb. 3 (A – D) sind die dissektierten Tetraden abgebildet, in Tabelle 7 sind die Ergebnisse der Analyse zusammengefaßt. Die relativ hohe

Analysierte Mutationen	Anzahl Tetraden	Anzahl lebensfähiger Sporen			
		1	2	3	4
<i>sec61-2 x sac1Δ</i>	26	-	6	17	3
<i>sec61-3 x SAC1</i>	8	-	-	-	8
<i>sec61-3 x sac1Δ</i>	27	-	7	13	7
<i>sec62-1 x SAC1</i>	13	-	-	-	13
<i>sec62-1 x sac1Δ</i>	29	2	-	6	21
<i>sec63 x SAC1</i>	9	-	-	-	9
<i>sec63 x sac1Δ</i>	38	7	12	12	7

**Tabelle 7:** Ergebnisse der Tetradenanalysen. Aus der Anzahl der lebensfähigen Sporen und deren Verteilung lassen sich synthetisch letale Interaktionen für *SAC1* mit *SEC61* bzw. *SEC63* ableiten (siehe Text).

Anzahl an weniger als vier lebensfähigen Sporen einer Tetrade im Fall von *sac1Δ sec61* und *sac1Δ sec63* im Vergleich zu der Kontrolle zeigt, daß diese Kombinationen synthetisch letal sind, während keine genetische Interaktion zwischen *sac1Δ* und

*sec62* gezeigt werden konnte. Um aus den dissektierten Tetraden die genaue Verteilung der Tetradentypen auszurechnen und eine (statistisch fundierte) Aussage zu treffen, hätten noch mehr Tetraden dissektiert werden müssen.

#### 4.1.1.1 *sac1-22* komplementiert den synthetisch letalen Phänotyp von *sac1Δ sec61<sup>ts</sup>* und *sac1Δ sec63<sup>ts</sup>*

Sac1p spielt sowohl im Phospholipid Metabolismus eine Rolle (Rivas *et al.*, 1999), als auch im ATP-Transport in das ER (Mayinger *et al.*, 1995). Um zu unterscheiden, welcher Defekt für die synthetisch letalen Interaktionen von *sac1Δ* mit *sec61-2* und *sec63* verantwortlich ist, wurde das *sac1-22* Allel eingesetzt. Wie *sac1Δ* Zellen haben *sac1-22* Zellen ebenfalls einen Defekt im Phospholipid Metabolismus, zeigen aber Wildtyp ATP-Transport (Kearns *et al.*, 1997). Die Ausgangsstämme (ATY307, ATY308, ATY311) waren mit dem Plasmid pAT2 (*CEN URA3 SAC1*) transformiert worden, um die synthetische Letalität von *sac1Δ sec61<sup>ts</sup>* und *sac1Δ sec63<sup>ts</sup>* zu supprimieren. Dadurch waren die Zellen auf Normalmedium lebensfähig und konnten auf 5'FOA-Platten, die gegen den *URA3* Marker selektieren, getestet werden. Zusätzlich wurden diese Stämme mit dem Plasmid pAT3 (*CEN TRP1 sac1-22*) transformiert. Wie in Abb. 4 zu sehen ist,



**Abbildung 4:** Dargestellt ist das Wachstum verschiedener Hefestämme auf einer Kontrollplatte (YPD) und einer selektiven Platte (5'FOA), mit der gegen *URA3* Plasmide selektiert wird. Links ist gezeigt, wie die Stämme aufgetragen wurden. Die Platten wurden fünf Tage bei 25°C inkubiert. Wie zu sehen ist, komplementiert das *sac1-22* Allel den synthetisch letalen Phänotyp von *sac1Δ sec61-2* und *sac1Δ sec63*.

sind die Stämme *sac1Δ sec61-2* und *sac1Δ sec63* nicht ohne das funktionstüchtige *SAC1* Gen lebensfähig. Wie ebenfalls in Abb. 4 zu sehen ist, komplementiert *sac1-22* den synthetisch letalen Phänotyp von *sac1Δ sec61-2* und *sac1Δ sec63*, woraus geschlossen werden kann, daß die synthetische Letalität von dem Mangel an ATP im ER verursacht wird.

## 4.2 SYNTHETISCH LETALER SCREEN

Sac1p ist an mehreren zellulären Prozessen beteiligt, ATP-Transport in das ER (Mayinger *et al.*, 1995), Phospholipid Metabolismus (Rivas *et al.*, 1999) und Anordnung des Aktin Cytoskeletts (Novick *et al.*, 1989). Wie Sac1p den Zusammenhang zwischen den verschiedenen Funktionen koordiniert, ist nicht bekannt. Neuere Daten deuten auf eine Funktion als Polyphosphoinositid Phosphatase in Phosphoinositid Signalwegen hin (Guo *et al.*, 1999). Eine unvoreingenommene Suche nach weiteren interagierenden Faktoren sollte zur Aufklärung der Funktionen von Sac1p beitragen. Da die Deletion des *SAC1* Gens nicht letal ist, war eine Grundvoraussetzung für die Durchführung eines synthetisch letalen Screen erfüllt. Wie in der Einleitung beschrieben, können in einem synthetisch letalen Screen Faktoren identifiziert werden, die oberhalb, unterhalb oder parallel zu einer Signaltransduktionskaskade, bzw. in diesem Fall zu *SAC1*, aktiv sind. So sollte es möglich sein, Komponenten des ATP-Transport Systems des ERs zu identifizieren, wie z. B. den ATP-Transporter oder weitere regulatorische Proteine desselben. Auch könnten Gene identifiziert werden, deren Produkte an Phosphoinositid Signalwegen beteiligt sind, oder die eine Sac1p-abhängige Rolle bezüglich des Aktin Cytoskeletts spielen.

### 4.2.1 Planung des Screens

Für den Screen wurde zum einen ein centromeres Plasmid (pAT1) benötigt, das das funktionstüchtige *SAC1* Gen und Marker enthält, gegen die selektiert werden kann. Centromere Plasmide liegen in niedriger Kopienzahl (1-2) in der Zelle vor, pro Generation verliert ~ 1 % der Zellen diese Plasmide und sie segregieren bei der Meiose wie ein Chromosom (Ausubel, 1993). Als Selektionsmarker wurden die *CAN1* und *LYS2* Gene verwendet. Das *CAN1* Gen codiert für die Argininpermease, die Arginin und Canavanin

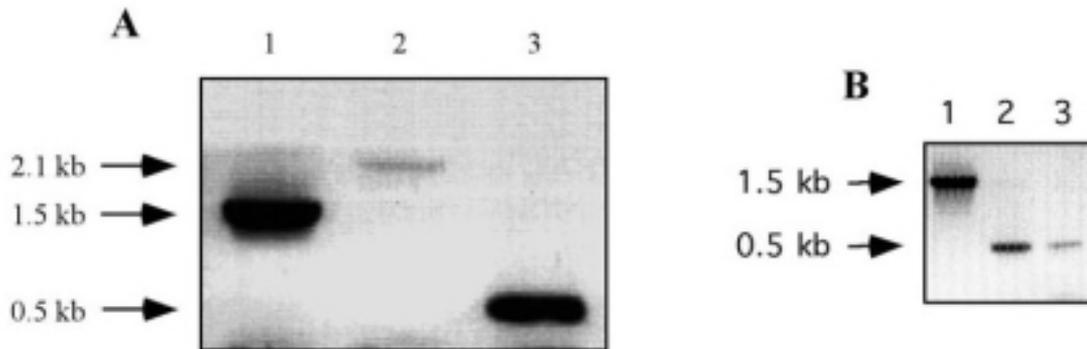
aus dem Medium aufnimmt (Adams *et al.*, 1997), wobei Canavanin (Can) ein toxisches Analog von Arginin ist. Das Genprodukt von *LYS2* ist am Lysin-Stoffwechsel beteiligt, für den  $\alpha$ -Aminoadipinsäure ( $\alpha$ AA) ein toxisches Substrat ist (Zaret and Sherman, 1985). Mit diesen beiden Markern kann auf  $\alpha$ AA und Can Platten gegen das Plasmid und für synthetisch letale Interaktionen mit *sac1* $\Delta$  nach der EMS Mutagenese selektiert werden.

Zum anderen wurden Ausgangsstämme für den Screen benötigt, die bestimmte Merkmale aufweisen, damit die Selektion für synthetisch Letale mit *sac1* $\Delta$  erfolgreich durchgeführt werden kann. Die Stämme mußten resistent gegen  $\alpha$ AA und Canavanin (*can*<sup>R</sup>) sein. Dazu wurde die vorhandene *lys2* Mutation ausgenutzt und das *CAN1* Gen deletiert. Unter anderem für das Rückkreuzen der erhaltenen Mutanten mit den Ausgangsstämmen wurden isogene Stämme beider Paarungstypen benötigt. Daher wurde nach der *CAN1* Deletion der isogene Stamm des anderen Paarungstyps konstruiert. Außerdem mußte die Deletion von *SAC1* in den beiden isogenen Stämmen mit zwei unterschiedlichen Markern erfolgen, damit diese bei der Selektion für Diploide ausgenutzt werden können. Dazu wurde in dem *MAT $\alpha$*  Stamm *SAC1* mit *HIS3* deletiert und in dem isogenen *MAT $\alpha$*  Stamm wurde *SAC1* mit *TRP1* deletiert. Zwei weitere Marker waren vorhanden (*ura3*, *leu2*), um Plasmide in die resultierenden Mutanten zu transformieren, z. B. die genomische Bank zur Identifikation des mutierten Gens.

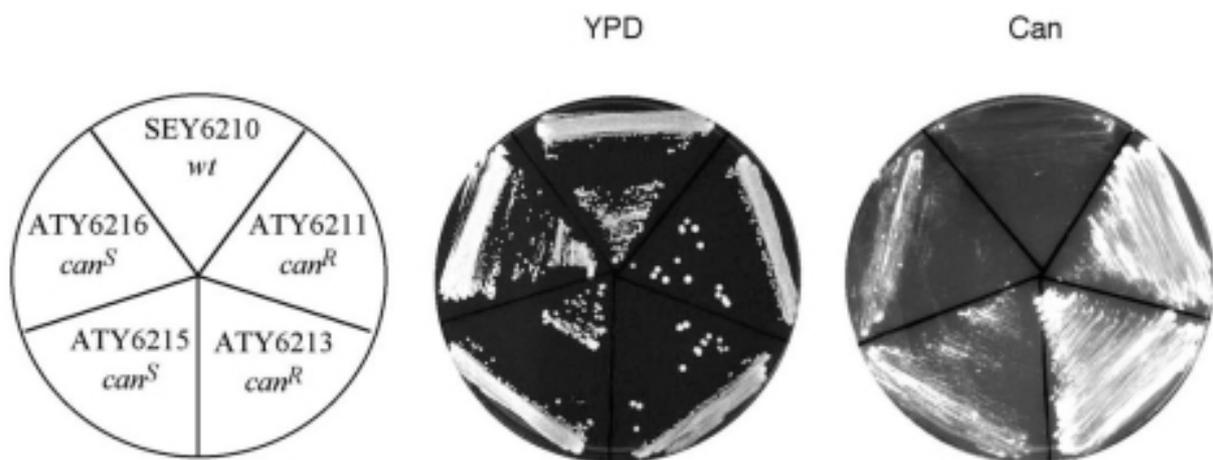
#### 4.2.1.1 Konstruktion canavaninresistenter (*can*<sup>R</sup>) Stämme

Zur Einführung der Canavaninresistenz als Marker für die Selektion nach synthetisch Letalen mit *sac1* $\Delta$ , wurde SEY6210 als Ausgangsstamm gewählt, in dem zunächst das *CAN1* Gen deletiert wurde. Dazu wurde, wie in Kapitel 3.2.3.6 beschrieben, verfahren. Mit den resultierenden Positiven wurden zur Überprüfung PCRs mit ganzen Hefezellen (Kapitel 3.2.3.8) durchgeführt. In Abb. 5A ist das Agarosegel mit den analytischen PCRs gezeigt. Wie erwartet, läuft das amplifizierte Wildtyp Fragment bei 1.5 kb, während das Produkt (*can1::hisG:URA3::hisG::can1*) direkt nach der Transformation bei 2.1 kb läuft. Nach der Selektion gegen das *URA3* Gen ist das amplifizierte Fragment (*can1::hisG::can1*) nur noch 0.5 kb groß. Der resultierende Stamm wurde ATY6211 genannt. In Abb. 5B ist die analytische PCR mit den *CAN1*-Primern für Stämme ATY6212 und ATY6214 gezeigt. In Abb. 6 ist das Wachstum der Stämme SEY6210, ATY6211, ATY6213, ATY6215 und ATY6216 auf Platten ohne und mit Canavanin gezeigt. Der Ausgangsstamm SEY6210 kann nicht wachsen (*can*<sup>S</sup>), während die Stämme ATY6211 und

ATY6213 *can<sup>R</sup>* sind, und damit wachsen können. In den Stämmen ATY6215 und ATY6216 wurde das funktionstüchtige *CAN1* Gen auf dem Plasmid wieder eingeführt, so daß diese wieder *can<sup>S</sup>* sind.



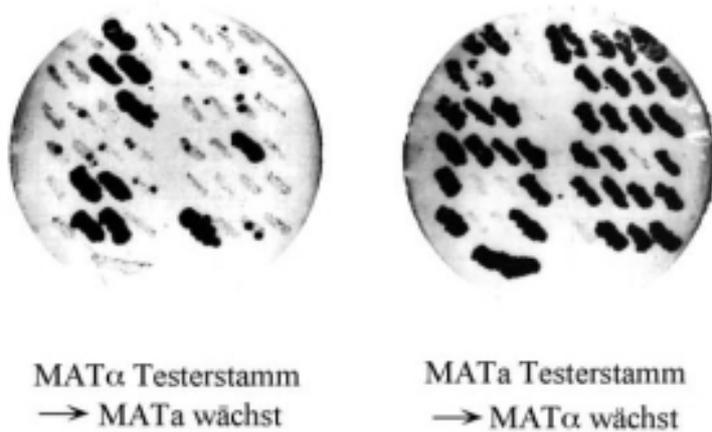
**Abbildung 5:** Analytische PCRs zur Bestätigung der Deletion des *CAN1* Gens. Als Primer wurden *CAN1*-5' und *CAN1*-3' verwendet. **(A)** 1: SEY6210 (*wt*), 2: nach Integration des *hisG::URA3::hisG* Fragments, 3: ATY6211, nach Selektion gegen *URA3 (can1::hisG)*. **(B)** Überprüfung der Stämme für den Screen vor der Transformation mit dem Plasmid mit pAT1. 1: SEY6210 (*wt*), 2: ATY6212, 3: ATY6214.



**Abbildung 6:** Die Deletion des *CAN1* Gens wurde *in vivo* auf Platten ohne und mit Canavanin überprüft. Der Kontrollstamm, SEY6210 (*wt*) zeigt auf Can Platten kein Wachstum, während die Stämme ATY6211 und ATY6213 durch die Deletion Canavanin Resistenz zeigen. Die Stämme ATY6215 und ATY6216 zeigen durch das Plasmid pAT1 (*CAN1*, *LYS2*, *SAC1*) wieder Canavanin Sensitivität. Die beiden Stämme wurden von selektiven Platten (HC-Lys) auf die Can Platten ausgestrichen, damit sie nicht das Plasmid verlieren können. Links ist dargestellt, wie die Stämme auf den Platten ausgestrichen sind, in der Mitte ist die Kontrollplatte gezeigt, auf der alle Stämme wachsen können.

#### 4.2.1.2 Konstruktion isogener Stämme mit unterschiedlichem Paarungstyp

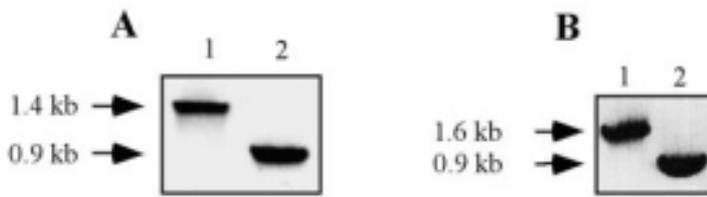
Um zwei isogene Stämme mit unterschiedlichem Paarungstyp zu erhalten, wurde in dem Stamm ATY6211 in zwei Schritten der *MAT $\alpha$*  Locus gegen den *MATa* Locus ausgetauscht (siehe Kapitel 3.3.7). In Abb. 7 sind die beiden Platten nach dem Kreuzen mit den Testerstämmen gezeigt. Es wurde ein *MATa* Stamm gewählt, der sich mit dem *MAT $\alpha$*  Stamm kreuzen ließ. Dieser Stamm wurde ATY6213 genannt. Damit waren isogene Stämme mit unterschiedlichem Paarungstyp vorhanden.



**Abbildung 7:** Kreuzung der veränderten Stämme mit zwei Testerstämmen zur Bestimmung des Paarungstyps. 72 isolierte Kolonien wurden auf eine YPD-Platte aufgetragen und mit dem *MAT $\alpha$*  und dem *MATa* Testerstamm gekreuzt und über Nacht bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die zwei Platten auf selektive Platten replica plattiert. Durch den Genotyp der Testerstämmen können nur Diploide auf den selektiven Platten hochwachsen. Dadurch läßt sich der Paarungstyp eindeutig bestimmen. Links können nur *MATa* Stämme wachsen, während rechts nur *MAT $\alpha$*  Stämme Wachstum zeigen.

#### 4.2.1.3 Konstruktion der *sac1::HIS3* und *sac1::TRP1* Stämme

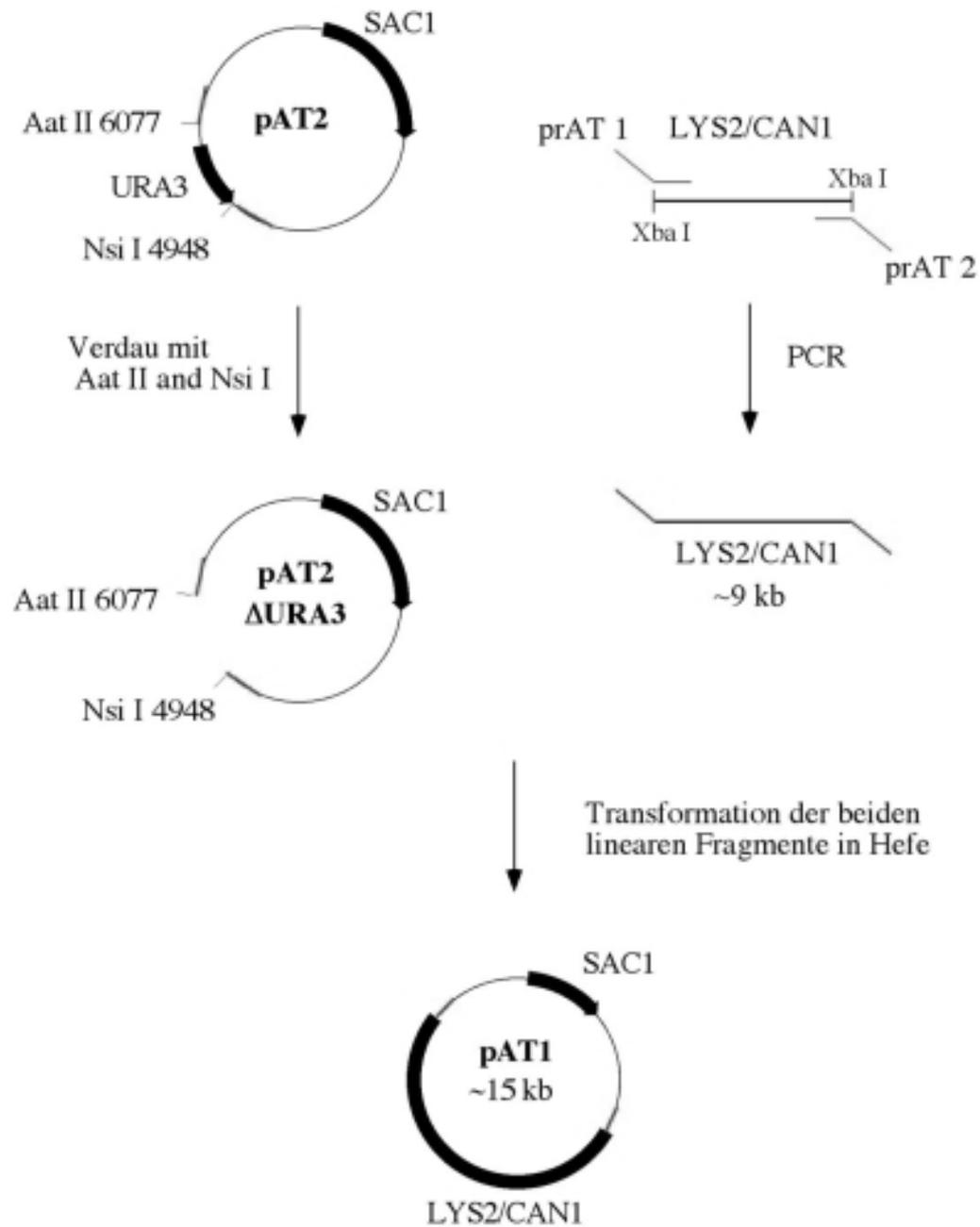
Für die Deletion des *SAC1* Gens wurde entweder der *HIS3* oder *TRP1* Marker eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.3.5). Mit analytischen Primern (*SAC1-3in2* und *SAC1-5in*), die an die flankierenden Sequenzen der veränderten Region anlagern, wurden die Deletionen mittels PCR überprüft. Während beim Wildtyp ein Fragment von 0.9 kb amplifiziert wurde, wurde im Fall von *sac1::TRP1* ein Fragment von 1.4 kb, und im Fall von *sac1::HIS3* ein Fragment von 1.6 kb amplifiziert. Wie in Abb. 8A gezeigt, wurde im Stamm ATY6211 das *SAC1* Gen erfolgreich mit *TRP1* deletiert und der resultierende Stamm wurde ATY6212 genannt. Wie in Abb. 8B gezeigt, wurde im Stamm ATY6213 das *SAC1* Gen erfolgreich mit *HIS3* deletiert und der resultierende Stamm wurde ATY6214 genannt.



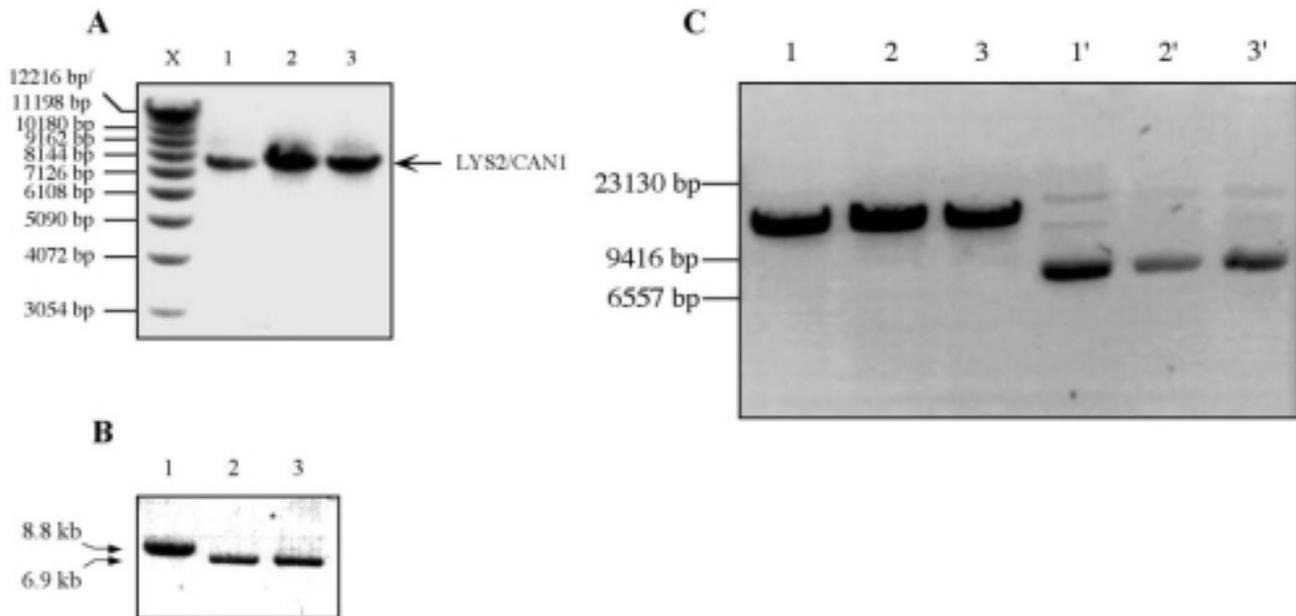
**Abbildung 8:** Gezeigt ist die PCR Analyse zweier *sac1* Mutanten. Als Primer wurden SAC1-3in2 und SAC1-5in verwendet. (A) Deletion von *SAC1* mit dem *TRP1* Marker. 1: ATY6212 (*sac1::TRP1*), 2: ATY6211 (*wt*). (B) Deletion von *SAC1* mit dem *HIS3* Marker. 1: ATY6214 (*sac1::HIS3*), 2: ATY6213 (*wt*).

#### 4.2.1.4 Konstruktion des Plasmids pAT1

Für die Selektion der synthetisch Letalen mit *sac1Δ* sollten die funktionstüchtigen *CAN1*, *LYS2* und *SAC1* Gene Bestandteile des centromeren Plasmids sein. Das Schema in Abb. 9 zeigt das Prinzip, nach dem pAT1 hergestellt wurde (siehe auch Kapitel 3.1.2). In Abb. 10A sind die Produkte aus der PCR zur Herstellung des 9.5 kb *LYS2/CAN1* Fragments dargestellt. Es wurden drei PCRs mit verschiedenen Konzentrationen an Polymerase angesetzt. In allen Reaktionen wurde ein Produkt gleicher Größe amplifiziert, die Ausbeute bei der Verwendung von 2 Einheiten Polymerase war am höchsten. In Abb. 10B wurde pAT2 zuerst mit AatII (8.0 kb) und anschließend mit NsiI (6.9 kb + 1.1 kb) verdaut und auf das Gel aufgetragen. Das 1.1 kb Fragment des herausgeschnittenen *URA3* Markers ist dabei nicht mehr zu erkennen. Nach der Herstellung der beiden linearen Fragmente wurden diese zusammen in Hefezellen transformiert und auf HC-Lys Platten für das durch homologe Rekombination entstandene zirkuläre Plasmid selektiert. Dieses wurde dann aus den Hefezellen isoliert, in *E. coli* amplifiziert und dann analysiert. In Abb. 10C ist das Plasmid pAT1 vor (zirkulär) und nach (linear) dem Restriktionsverdau mit SacI zu sehen. Das Plasmid pAT1 wurde in die Stämme ATY6212 und ATY6214 transformiert. Die resultierenden Stämme wurden ATY6215 und ATY6216 genannt und auf Can Platten (Abb. 6) und auf Inositol-freien Platten (Abb. 11) getestet. Die Stämme sind *can<sup>S</sup>*, nicht mehr inositolauxotroph und für das Plasmid wurde auf HC-Lys Platten selektiert. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, daß alle drei Gene (*CAN1*, *SAC1* und *LYS2*) funktionstüchtig sind.



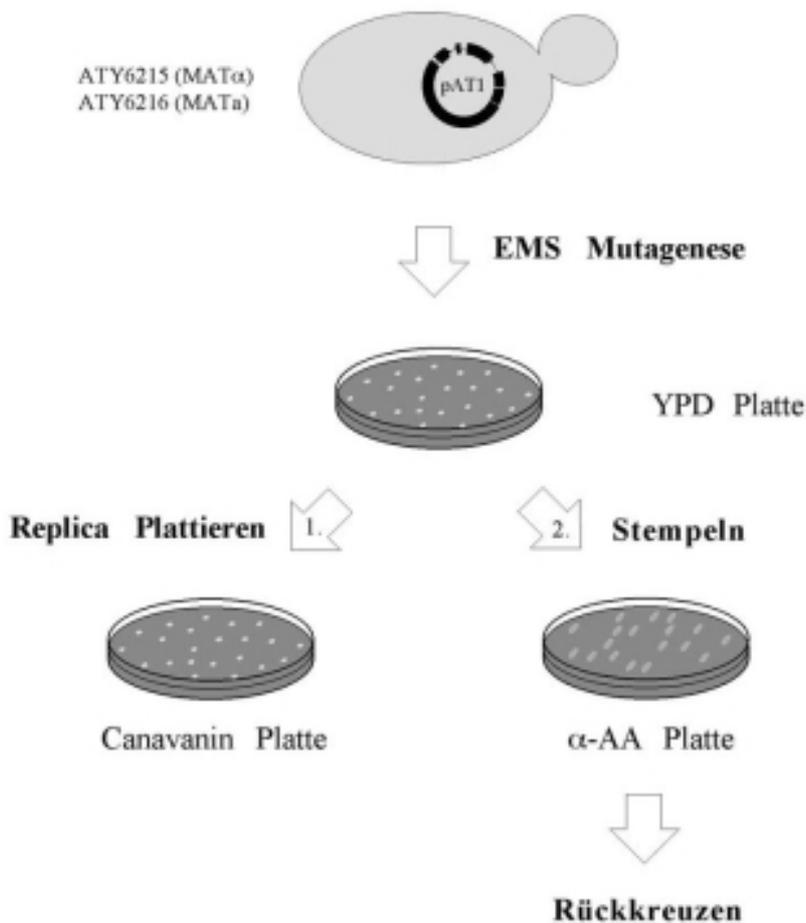
**Abbildung 9:** Schema der Konstruktion von pAT1, dem Plasmid für den Screen. Als Ausgangsvektor wurde pAT2 verwendet, aus dem der *URA3* Marker entfernt wurde. Um die *CAN1* und *LYS2* Marker in das Plasmid zu integrieren, wurden zwei Primer konstruiert, deren Enden (rot) homolog zu den freien Enden des geschnittenen Plasmids (rot) waren und mit denen die Marker mit Hilfe des pBKS-Plasmids amplifiziert wurden. Durch Transformation der beiden linearen Fragmente in Hefe entstand das zirkuläre Plasmid pAT1.



**Abbildung 10:** Gezeigt sind die Agarosegele der verschiedenen Fragmente zur Konstruktion von pAT1. **(A)** Agarosegel nach der Amplifikation der *CAN1* und *LYS2* Marker mit den Primern prAT1 und prAT2. X: Boehringer DNA-Standard, 1: 2,5 U TaKaRa/100 µl Reaktion, 2: 2,0 U TaKaRa/100 µl Reaktion, 3: 1,5 U TaKaRa/100 µl Reaktion. **(B)** Herausschneiden des *URA3* Markers aus pAT2 mit AatII und NsiI. 1: pAT2 linearisiert mit AatII, 2 und 3: pAT2 nach Verdau mit AatII und NsiI, 1,1 kb wurden herausgeschnitten (*URA3*). **(C)** Analyse des fertigen Plasmids pAT1. Spuren 1, 2, 3: Das Plasmid wurde mit SacI linearisiert. Spuren 1', 2', 3': Das zirkuläre Plasmid.



**Abbildung 11:** Die Hefestämme für den Screen wurden auf einer Kontrollplatte (Mitte) und einer Inositol-freien Platte (rechts) nach dem Schema auf der linken Seite aufgetragen. SEY6210 (*wt*) zeigt Wachstum, die beiden *sac1Δ* Stämme (ATY6212 und ATY6214) zeigen kein Wachstum, und diese beiden Stämme mit dem Plasmid pAT1 (ATY6215 und ATY6216) zeigen wieder Wachstum auf den Inositol-freien Platten. *In vivo* wurde damit bestätigt, daß pAT1 (*SAC1*) die Inositolautotrophie von *sac1Δ* komplementieren kann.



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Durchführung des synthetisch letalen Screens.

#### 4.2.2 Durchführung des Screens

In Abb. 12 ist schematisch die Durchführung des Screens aufgezeigt. Jeweils eine Übernachtskultur der Stämme ATY6215 und ATY6216 wurde mit EMS (Ethylmethansulfonat) mutagenisiert (siehe Kapitel 3.2.3.9) und anschließend auf YPD Platten hochgezogen. Durch Vergleich mit der nicht-mutagenisierten Kontrolle ergab sich eine Überlebensrate von  $\sim 15\%$ . Insgesamt wuchsen  $\sim 32000$  mutagenisierte Kolonien hoch. Diese wurden auf Can und YPD Platten replica plattiert, um gegen das Plasmid pAT1 (*CANI LYS2 SAC1*) zu selektieren. Nach Vergleich der Can Platten mit den dazugehörigen YPD Platten wurden nach fünf Tagen 594 Kolonien ausgewählt, die nicht oder schlecht auf den Can Platten wuchsen. Diese wurden von den YPD Platten genommen und auf frische YPD Platten ausgestrichen. Die hochgewachsenen Zellen wurden je auf eine Can,  $\alpha$ AA und YPD Platte gestempelt. Nach fünf Tagen Inkubation bei  $25^{\circ}\text{C}$  wurden 95 Stämme ausgewählt, die weder auf Can noch auf  $\alpha$ AA Platten aber auf YPD Platten

wachsen konnten. Diese Stämme wurden mit den Ausgangsstämmen ATY6215 bzw. ATY6216 (je nach Paarungstyp) gekreuzt ( $\rightarrow$  Rückkreuzen). Durch das Rückkreuzen sollte ausgeschlossen werden, daß die synthetisch letalen Interaktionen mit *sac1 $\Delta$*  von Mutationen in mehr als einem Gen verursacht werden. Die Diploiden wurden auf HC-Trp-His Platten selektiert. Zum einen wurde auf Can und  $\alpha$ AA Platten getestet, ob die jeweilige Mutation dominant oder rezessiv war. Alle Diploiden wuchsen auf Can Platten hoch, und somit waren alle Mutationen rezessiv. Zum anderen wurden die Diploiden sporuliert und die Tetraden dissektiert. Die hochgewachsenen Sporen wurden von der YPD Platte auf Can, HC-Trp und HC-His Platten replica plattiert. Außerdem wurden sie auf Platten mit *MATa* und *MAT $\alpha$*  Testerstämmen replica plattiert, um den Paarungstyp zu bestimmen. Von 69 Mutanten wurde je eine Spore ausgewählt, die aus einer vollständigen Tetrade stammte. Eine Tetrade war dann vollständig, wenn die Verteilung der genetischen Marker wie folgt aussah. Zwei Sporen mußten *sac1::HIS3* sein, die anderen zwei *sac1::TRP1*; zwei Sporen mußten *MATa*, die anderen zwei *MAT $\alpha$*  sein; und den synthetisch letalen Phänotyp mußten zwei der vier Sporen zeigen. Für das weitere Rückkreuzen wurde nun auch der Stamm ATY6219 (*MATa sac1::TRP1*) eingesetzt, damit die Diploiden weiterhin auf HC-Trp-His Platten selektiert werden konnten. Nach der zweiten Runde Rückkreuzen trafen diese Kriterien noch auf 57 Stämme zu und nach der dritten Runde auf 38 Stämme. Diese Stämme wurden alle mit dem Plasmid pAT2 (*SAC1 URA3*) transformiert. Mit diesem Plasmid sollten die Stämme wieder auf Can und  $\alpha$ AA Platten wachsen, da die Zellen nun nicht mehr von pAT1 abhängig waren und es verlieren konnten. Wurden die Stämme aber von Can Platten anschließend auf 5'FOA Platten ausgestrichen, sollten sie kein Wachstum mehr zeigen. Dieser Test wurde für alle Mutanten mit und ohne pAT2 durchgeführt. Nach der Auswertung wurde die Anzahl der Positiven auf 17 reduziert. Die erhaltenen Mutanten wurden *lsa* genannt („letal mit *sac1 $\Delta$* “).

gescreente Kolonien:	~ 32000
Überlebensrate:	~ 15%
Positive nach Can Selektion:	594
Positive nach $\alpha$ AA Selektion:	95
Positive nach 1. Rückkreuzen:	69
Positive nach 2. Rückkreuzen:	57
Positive nach 3. Rückkreuzen:	38
Positive nach 5'FOA Selektion mit pAT2:	17
Komplementationsgruppen:	12

**Tabelle 8:** Statistik des Screens.

### 4.2.3 Charakterisierung der erhaltenen Mutanten

Wie oben schon beschrieben, waren alle erhaltenen Mutationen rezessiv. Um Aufschluß über die Anzahl der erhaltenen Gene zu bekommen, wurden die Komplementationsgruppen bestimmt, indem jede Mutante mit jeder anderen gekreuzt wurde. Dazu wurden je ~ 10 µl von zwei Übernachtskulturen unterschiedlichen Paarungstyps auf einer YPD Platte gemischt, bei 30°C inkubiert, und nach ~ 4 h wurde unter dem Mikroskop die Bildung von Zygoten beobachtet. War dies der Fall wurden die entstandenen diploiden Zellen weiter über Nacht bei 30°C inkubiert und dann auf Can Platten auf ihr Wachstum untersucht. Waren die Mutationen verschiedene Allele des selben Gens, dann war kein Wachstum auf Can Platten sichtbar. Es wurde eine Komplementationsgruppe mit vier Allelen (*lsa1-1* bis *lsa1-4*), eine Komplementationsgruppe mit drei Allelen (*lsa2-1* bis *lsa2-3*) und 10 weitere Komplementationsgruppen mit je einem Allel (*lsa3-1* bis *lsa12-1*) gefunden (Tabelle 9). Weiter wurde getestet, ob die Stämme bei 14°C, 30°C und 37°C wachsen können. Zwei Stämme (*lsa1-3* und *lsa4-1*) zeigten einen kältesensitiven Phänotyp, vier Stämme zeigten einen thermosensitiven Phänotyp (*lsa1-1*, *lsa2-1*, *lsa5-1* und *lsa8-1*) und *lsa1-4* zeigte kälte- und thermosensitives Verhalten (Tabelle 9).

Name	#	Phänotyp	<i>sac1-22</i> Komplementation	CFW sens 0.02 mg/ml CFW
<i>lsa1-1</i>	286	ts	nein	ja
<i>lsa1-2</i>	455		nein	nein
<i>lsa1-3</i>	486	cs	ja	nein
<i>lsa1-4</i>	519	ts und cs	ja	ja
<i>lsa2-1</i>	25	ts	ja	ja
<i>lsa2-2</i>	125		ja	ja
<i>lsa2-3</i>	573		nein	nein
<i>lsa3-1</i>	135		nein	ja
<i>lsa4-1</i>	242	cs	ja	nein
<i>lsa5-1</i>	349	ts	ja	ja
<i>lsa6-1</i>	353		nein	nein
<i>lsa7-1</i>	397		nein	nein
<i>lsa8-1</i>	452	ts	nein	ja
<i>lsa9-1</i>	476		ja	nein
<i>lsa10-1</i>	485		nein	nein
<i>lsa11-1</i>	537		nein	nein
<i>lsa12-1</i>	591		ja	nein

**Tabelle 9:** Zusammenfassung der ersten phänotypischen Charakterisierung der isolierten Mutanten.

#### 4.2.3.1 Die Mutanten lassen sich in verschiedene Gruppen bezüglich des ATP-Transports einteilen

Wie schon in Kapitel 4.1.1.1 beschrieben, wurde auch hier wieder das *sac1-22* Allel genutzt (Kearns *et al.*, 1997), um die Mutanten in zwei Obergruppen bezüglich des ATP-Transports einzuteilen (Tabelle 9). Entweder war die Komplementation mit dem Wildtyp ATP-Transport ausreichend oder es wurde zusätzlich die Komplementation anderer Funktionen von Sac1p benötigt. Alle Mutanten wurden deshalb mit dem Plasmid pAT3 (*sac1-22 TRP1*) transformiert. Die Zellen (mit und ohne pAT3) wurden auf YPD, Can und  $\alpha$ AA Platten ausgestrichen. Bei acht Stämmen (*lsa1-3*, *lsa1-4*, *lsa2-1*, *lsa2-2*, *lsa4-1*, *lsa5-1*, *lsa9-1* und *lsa12-1*) konnte der synthetisch letale Phänotyp von *sac1-22* komplementiert werden, bei den anderen neun nicht (*lsa1-1*, *lsa1-2*, *lsa2-3*, *lsa3-1*, *lsa6-1*, *lsa7-1*, *lsa8-1*, *lsa10-1* und *lsa11-1*). Wie in Tabelle 9 zu sehen, war die Komplementation nicht allelspezifisch für jede Komplementationsgruppe.

Um eine Aussage treffen zu können, ob eine spezielle Mutante am ATP-Transport in das ER beteiligt sein könnte, wurde von allen Stämmen Mikrosomen präpariert und der ATP-Transport gemessen. Aus den Transportexperimenten lassen sich zwei Parameter bestimmen. Zum einen die Menge an aufgenommenem ATP oder Kapazität des Transports (Abb. 13) und zum anderem die Aufnahmerate (Abb. 14). Die Kapazität des Transports wird beeinflusst durch das Volumen der Mikrosomen, während die Aufnahmerate von der relativen Anzahl der Transporter in der Membran und deren Aktivität abhängig ist. Als Wildtyp-Kontrolle wurden ATY6215 und ATY6216 eingesetzt. Bei je acht Stämmen war die Kapazität höher (*lsa1-1*, *lsa1-3*, *lsa2-2*, *lsa5-1*, *lsa8-1*, *lsa10-1*, *lsa11-1* und *lsa12-1*) bzw. niedriger (*lsa1-2*, *lsa1-4*, *lsa2-1*, *lsa2-3*, *lsa3-1*, *lsa4-1*, *lsa6-1* und *lsa7-1*) und bei einem Stamm (*lsa9-1*) entsprach sie dem Wildtyp. Diese Ergebnisse lassen sich in keine Korrelation mit den Komplementationsgruppen oder den Ergebnissen aus der Komplementation mit *sac1-22* bringen.

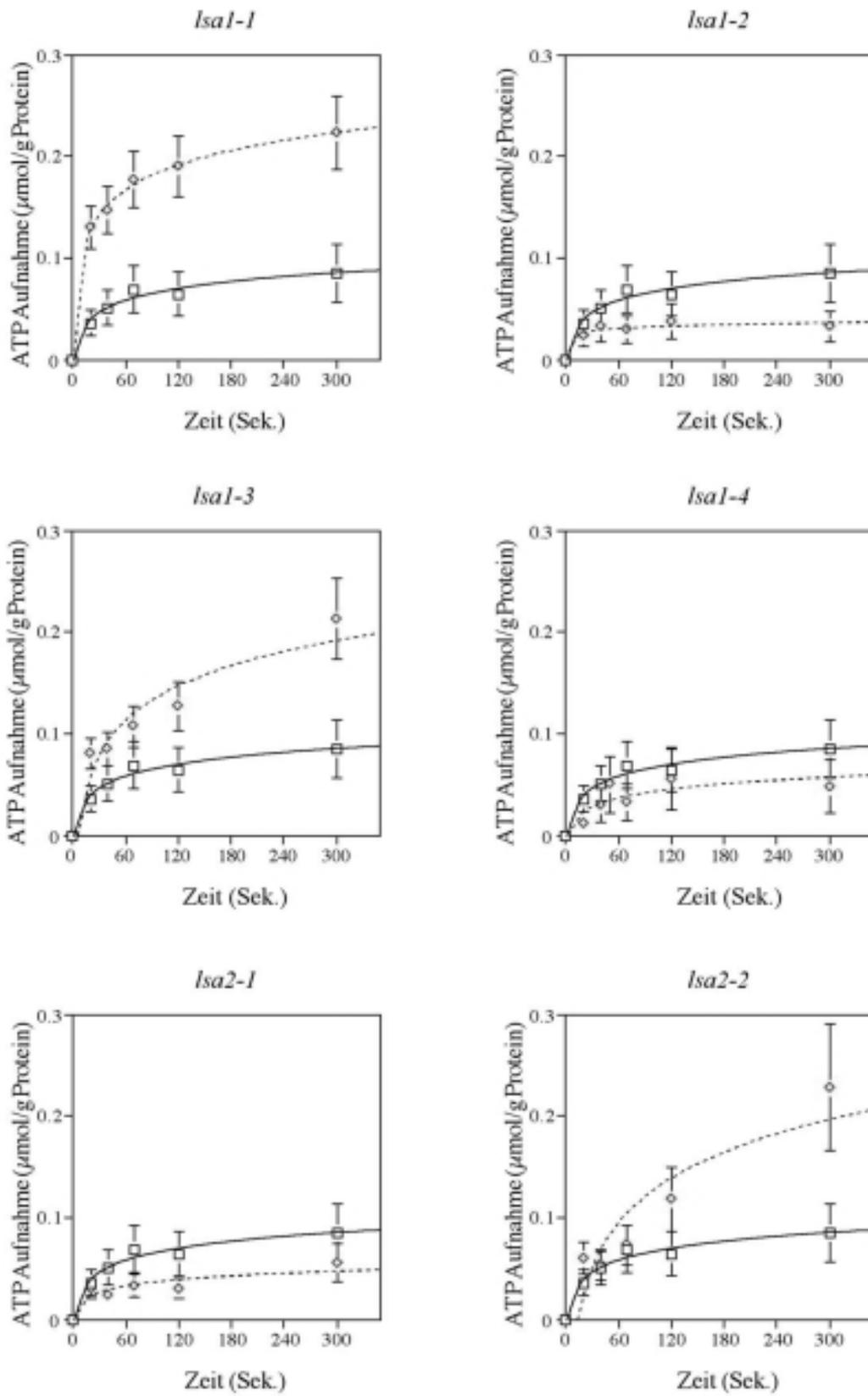
Da die Kapazität des ATP-Transports nur die Eigenschaften der Mikrosomen widerspiegelt, also von deren Volumen abhängig ist, aber nichts über die Aktivität des Transporters aussagt, wurde außerdem die Geschwindigkeitskonstante des Transports aus den Meßwerten für 20, 40 und 70 Sekunden bestimmt. Es wurde angenommen, daß der ATP-Transport als Reaktion erster Ordnung abläuft. Bei halblogarithmischer Auftragung ergibt die Steigung der resultierenden Geraden die Ratenkonstante ( $k_{\text{cat}}$ ) des Transports an (Kramer and Klingenberg, 1977). Meist entsprach sie dem Wildtyp; bei *lsa2-1*, *lsa2-2*,

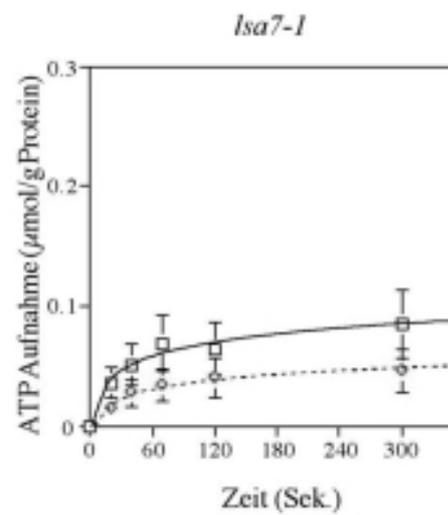
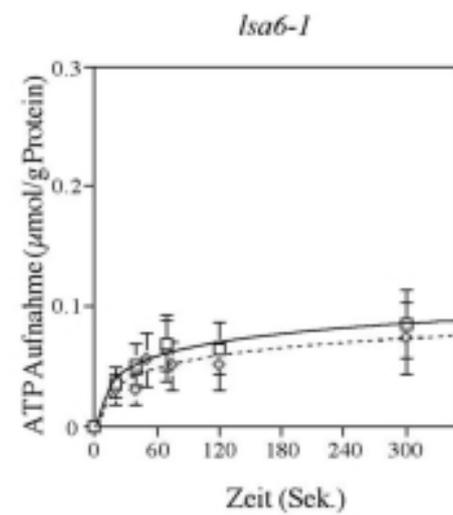
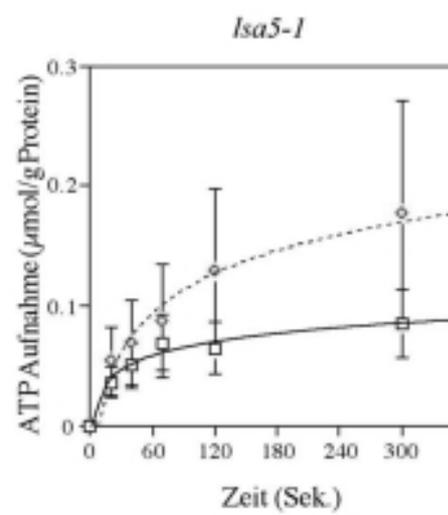
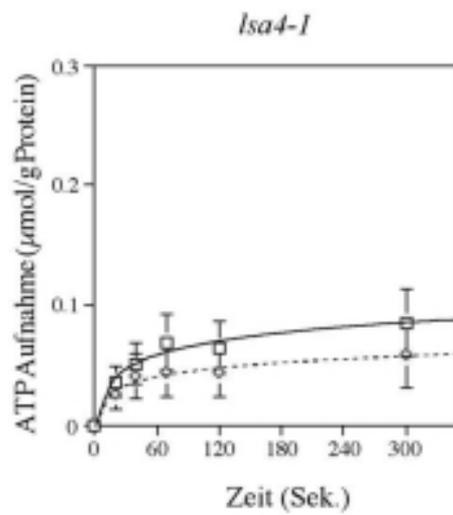
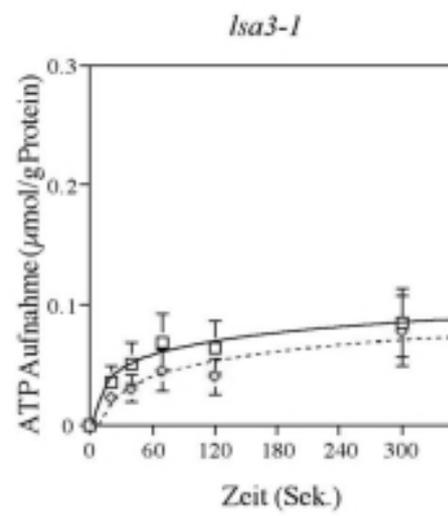
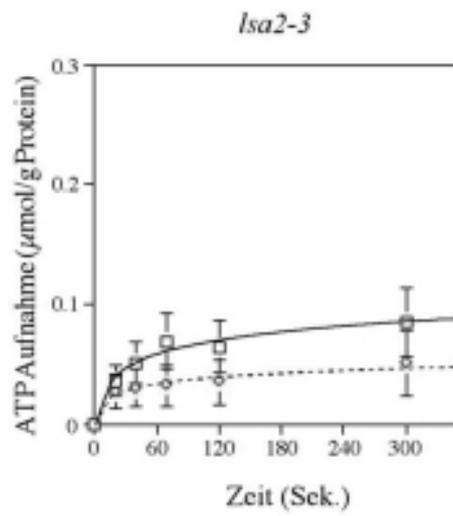
*lsa3-1*, *lsa5-1* und *lsa12-1* verlief der Transport langsamer (Abb. 14) und bei *lsa1-2* und *lsa2-3* konnte die Kinetik nicht bestimmt werden.

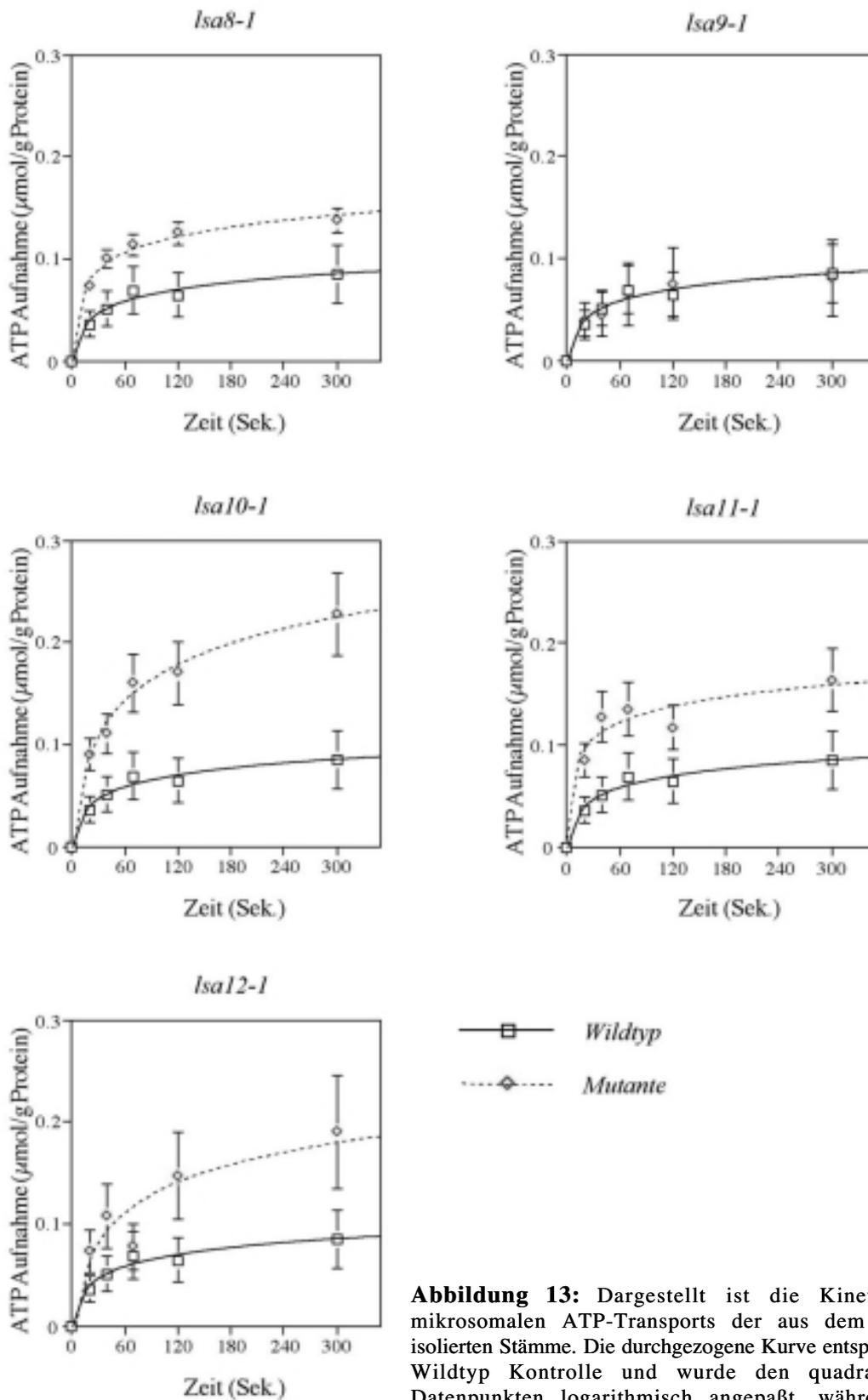
Die oben in zwei Gruppen eingeteilten Stämme wurden weiter anhand der gerade beschriebenen ATP-Transportrate unterteilt:

- > Bei den Stämmen *lsa2-1*, *lsa2-2*, *lsa5-1* und *lsa12-1* komplementiert *sac1-22* den synthetisch letalen Phänotyp und die ATP-Transportrate ist verlangsamt.
- > Bei den Stämmen *lsa1-3*, *lsa1-4*, *lsa4-1* und *lsa9-1* komplementiert *sac1-22* den synthetisch letalen Phänotyp und die ATP-Transportrate entspricht Wildtyp.
- > Bei den Stämmen *lsa1-1*, *lsa6-1*, *lsa7-1*, *lsa8-1*, *lsa10-1* und *lsa11-1* komplementiert *sac1-22* nicht den synthetisch letalen Phänotyp und die ATP-Transportrate entspricht Wildtyp.
- > Der Stamm *lsa3-1* bildet alleine die Gruppe, in der das *sac1-22* Allel nicht den synthetische letalen Phänotyp komplementiert und die ATP-Transportrate verlangsamt ist.

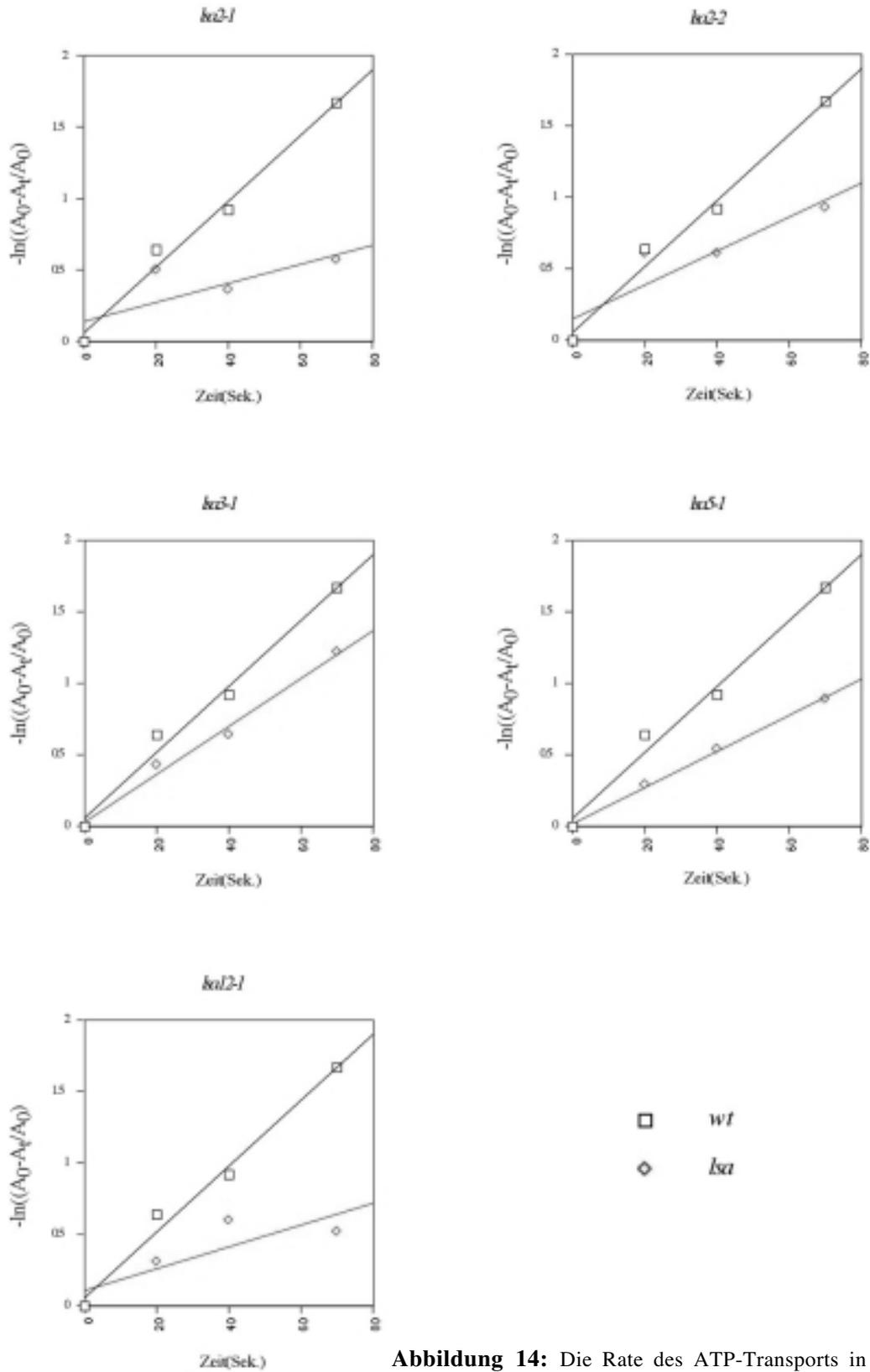
Wie in Kapitel 4.1 gezeigt wurde, sind die Doppelmutationen von *sac1Δ* und *sec61<sup>ts</sup>* bzw. *sec63<sup>ts</sup>* synthetisch letal, und das *sac1-22* Allel komplementiert die synthetische Letalität. Daher wurden alle isolierten Stämme, bei denen mit dem *sac1-22* Allel komplementiert werden konnte (*lsa1-3*, *lsa1-4*, *lsa2-1*, *lsa2-2*, *lsa4-1*, *lsa5-1*, *lsa9-1* und *lsa12-1*), mit dem *sac1Δ sec61-3<sup>ts</sup>* (ATY309) Stamm bzw. dem *sac1Δ sec63<sup>ts</sup>* (ATY311-1) Stamm gekreuzt. Die resultierenden Diploiden zeigten alle auf Can, αAA und 5'FOA Platten Wachstum (Daten nicht gezeigt). Daraus wurde geschlossen, daß in dem Screen kein Allel von *SEC61* oder *SEC63* gefunden wurde.







**Abbildung 13:** Dargestellt ist die Kinetik des mikrosomalen ATP-Transports der aus dem Screen isolierten Stämme. Die durchgezogene Kurve entspricht der Wildtyp Kontrolle und wurde den quadratischen Datenpunkten logarithmisch angepaßt, während die gestrichelte Kurve den rautenförmigen Datenpunkten logarithmisch angepaßt wurde und zu der jeweiligen Mutante gehört.



**Abbildung 14:** Die Rate des ATP-Transports in das ER wurde halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt sind nur die vom Wildtyp abweichenden Raten. Nach der Gleichung  $kt = -\ln[A_0/(A_0-A_t)]$  wurde  $-\ln[A_0/(A_0-A_t)]$  gegen die Zeit  $t$  aufgetragen, wobei  $A_t$  die transportierte Menge an ATP zum Zeitpunkt  $t$  und  $A_0$  die gesamte transportierbare Menge an ATP darstellt. Die  $A_0$ -Werte wurden extrapoliert und zur Berechnung von  $-\ln[A_0/(A_0-A_t)]$  verwendet.

#### 4.2.4 Identifikation von *lsa3-1* durch Komplementation mit einer chromosomalen Genbank

Als erstes zu identifizierendes Gen wurde das *lsa3-1* Allel ausgesucht. Es ist der einzige Stamm, der erniedrigten (Abb. 13) und verlangsamten (Abb. 14) ATP-Transport zeigt und in dem die synthetische Letalität nicht durch das *sac1-22* Allel komplementiert wird (Tabelle 9). Dies deutet auf eine regulatorische Funktion von *LSA3* in Bezug auf den ATP-Transport in das ER. Die chromosomale Hefebank von (Rose *et al.*, 1987) wurde für die Identifikation von dem *LSA3* Gen, in dem die Mutation durch das EMS eingeführt wurde, verwendet. Die Bank basiert auf dem centromeren YCp50 Vektor, der mit BamHI geschnitten wurde und in den die chromosomale DNA, die partiell mit SauIIIa geschnitten worden war, ligiert wurde (BamHI und SauIIIa erzeugen kompatible Enden). Die Größe der hineinligierten Fragmente wurde mit 10 bis 15 kb angegeben und die Anzahl der benötigten unabhängigen Transformanten, um das Genom zu 99.9% abzudecken, mit 8900.

##### 4.2.4.1 Zwei unterschiedliche genomische Fragmente komplementieren *lsa3-1 sac1Δ*

Der *lsa3-1* Stamm wurde mit 1.6  $\mu$ g der chromosomalen Hefebank transformiert und auf HC-Ura Platten ausplattiert. Es wuchsen  $\sim$  12000 unabhängige Kolonien hoch. Diese wurden auf Can Platten replica plattiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Mit den auf Can Platten hochgewachsenen Kolonien wurde weitergearbeitet und nochmals auf Can und  $\alpha$ AA Platten gestempelt. Wurde auf beiden Platten Wachstum beobachtet (also Verlust des pAT1 Plasmids und Komplementation durch ein genomisches Fragment), wurden diese Stämme auf 5'FOA Platten gestempelt, worauf sie kein Wachstum zeigen sollten. Zwei Kolonien erfüllten diese Voraussetzungen. Da auch *SAC1* in der chromosomalen Hefebank vertreten war, wurde direkt mit den Hefezellen, die auf Can und  $\alpha$ AA Platten wuchsen, eine PCR durchgeführt, bei der die Primer SAC1-3in2 und SAC1-5in eingesetzt wurden. War *SAC1* isoliert worden, so konnte ein Fragment von 0.9 kb amplifiziert werden. Dies war der Fall für eins der beiden Plasmide. Aus dem anderen Stamm wurde das Plasmid, welches nicht *SAC1* enthielt, isoliert und nochmals zurück in den ursprünglichen *lsa3-1* Stamm transformiert. Es wurde getestet, ob das Plasmid noch immer den synthetisch letalen Phänotyp komplementieren kann. Dies traf zu, und das isolierte Plasmid wurde p135-1 genannt und weiter charakterisiert.

#### 4.2.4.2 Ein Abschnitt von Chromosom VIII komplementiert *lsa3-1*

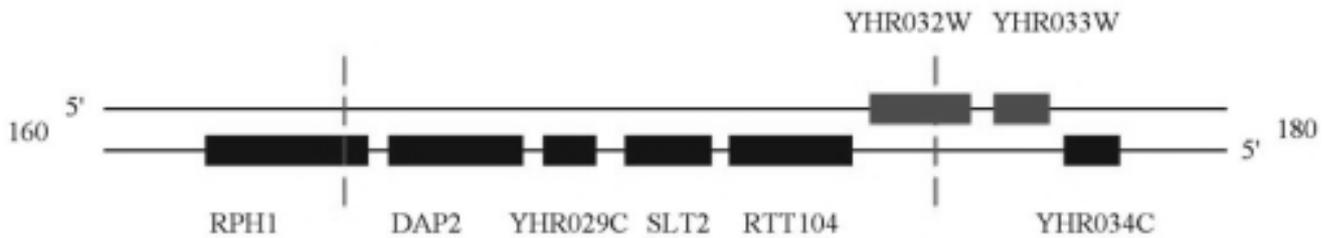
Das gesamte Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist sequenziert und auf Datenbanken<sup>1</sup> verfügbar. Daher wurden zwei Primer hergestellt, die vor und nach der BamHI Schnittstelle im Vektor YCp50 anlagern (siehe oben). Da die chromosomale Bank in die BamHI Schnittstelle kloniert wurde, konnte mit diesen Primern das 5' und 3' Ende des chromosomalen Fragments ansequenziert werden. Mit diesen beiden Sequenzen konnte die chromosomale Herkunft und die Anzahl der ORFs auf diesem Fragment genau bestimmt werden. Die Sequenzierung des komplementierenden Plasmids von *lsa3-1* ergab ein Fragment von Chromosom VIII, das von 164481 bp bis 174402 bp reicht. (Abb. 15). Diese Region enthält vier ORFs, von denen drei für bekannte Proteine codieren (*DAP2*, *SLT2* und *RTT104*) und einer unbekannt ist (YHR029C). *DAP2* codiert für die Dipeptidyl Aminopeptidase B, einem integralen glycosylierten Membranprotein der Vakuole (Roberts *et al.*, 1989), das an der Proteindegradation in der Vakuole beteiligt ist. *RTT104* codiert für ein nicht weiter charakterisiertes Protein. Rtt104p hat Ähnlichkeiten (37%) mit Pif1p, einem mitochondrialen DNA Reparatur- und Rekombinationsprotein. Durch Sequenzhomologien wurden dem Protein Funktionen als Hydrolase, Helikase, ATPase und DNA-bindendes Protein vorhergesagt<sup>2</sup>. Die Proteinsequenz des offenen Leserahmens YHR029C zeigt im N-Terminus leichte Ähnlichkeit zu einer möglichen Thymidylat Synthase<sup>3</sup>. Der wahrscheinlichste Kandidat für synthetisch letale Interaktionen mit *sac1Δ*, scheint eine Mutation in *SLT2*, auch *MPK1* genannt, zu sein. *SLT2* codiert für ein Homolog der MAP Kinase Familie. *SLT2* Mutanten zeigen einen Defekt in der Zellwandstruktur, der sich unter anderem in der Lyse der Zellen äußert (Martin *et al.*, 1993). Außerdem zeigen die Mutanten delokalisiertes Aktin und Chitin, Bestandteile des Cytoskeletts und der Zellwand (Mazzoni *et al.*, 1993). Auch von *sac1* Mutanten ist bekannt, daß Aktin und Chitin bei der nichtpermissiven Temperatur (14°C) delokalisiert ist (Novick *et al.*, 1989). Anhand dieser Fakten wurde vermutet, daß *sac1Δ* und ein Allel von *SLT2* die synthetisch letalen Interaktionen verursachen. Die anschließenden Analysen wurden daher zunächst auf *SLT2* ausgerichtet.

---

<sup>1</sup> Hefedatenbank: <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>

<sup>2</sup> Hefedatenbank: <http://www.proteome.com/databases/YPD/reports/RTT104.html>

<sup>3</sup> Hefedatenbank: <http://www.proteome.com/databases/YPD/reports/YHR029C.html>



**Abbildung 15:** Zwischen den gestrichelten Linien ist das chromosomale Fragment dargestellt, das den synthetisch letalen Phänotyp von *sac1Δ las3-1* komplementiert. Es enthält vier komplette ORFs von Chromosom VIII, die für drei bekannte Proteine und ein unbekanntes codieren. Das Plasmid wurde p135-1 genannt.

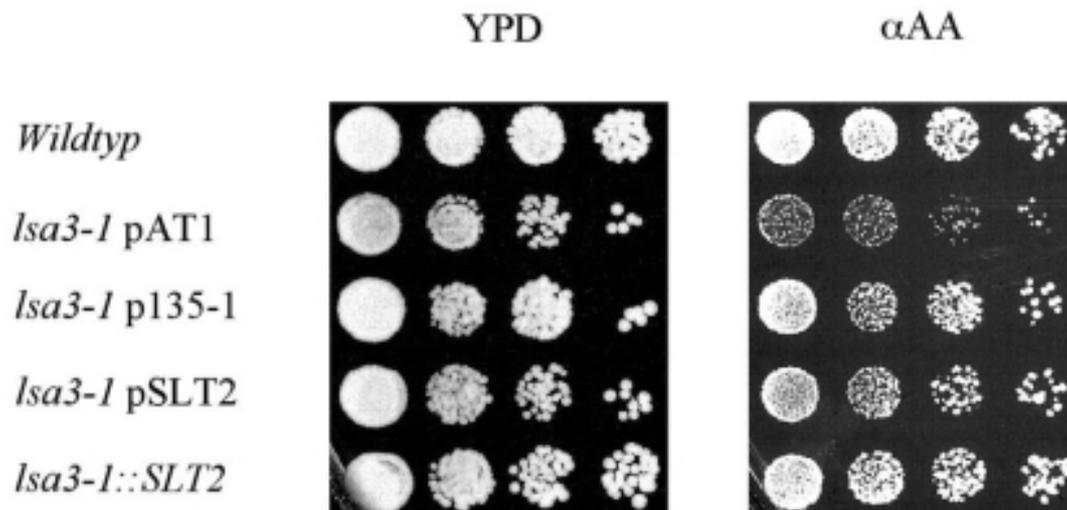
#### 4.2.4.3 *lsa3-1* hat einen Zellwanddefekt

Von *slt2* Mutanten ist in (Martin *et al.*, 1993) beschrieben, daß sie einen Zellwanddefekt haben. Um zu testen, ob auch *lsa3* Mutanten einen Zellwanddefekt aufweisen, wurde die Sensitivität zu Calcofluor Weiß (CFW) getestet. CFW Sensitivität ist ein Indikator für Zellwanddefekte. Der Farbstoff CFW blockiert die Polymerisation von Chitin, wodurch die Zellwand geschwächt wird (Madden *et al.*, 1997), (Igual *et al.*, 1996), (Ram *et al.*, 1994). Daher wurde der *lsa3-1* Stamm und anschließend alle anderen Mutanten auf YPD Platten mit 0.02 mg/ml CFW ausgestrichen und das Wachstum verglichen (Daten nicht gezeigt). Der *lsa3-1* Stamm konnte auf diesen Platten nicht wachsen, genauso wie sechs weitere Stämme (*lsa1-1*, *lsa1-4*, *lsa2-1*, *lsa2-2*, *lsa5-1* und *lsa8-1*; Tabelle 9). Dies deutet darauf hin, daß diese Stämme einen Zellwanddefekt haben. Der Zellwanddefekt von *lsa3-1* ist konsistent mit der Vermutung, daß *lsa3-1* ein Allel von *SLT2* ist.

#### 4.2.5 *lsa3-1* ist ein Allel von *SLT2*

Wenn *lsa3-1* ein Allel von *SLT2* ist, dann muß eine funktionstüchtige Kopie von *SLT2* auf einem Plasmid den synthetisch letalen Phänotyp von *sac1Δ las3-1* komplementieren. Dazu wurde der *lsa3-1* Stamm mit dem Plasmid YE352::*MPK1* (M. Hall, Biozentrum, Basel) transformiert und anschließend auf Can und  $\alpha$ AA Platten getestet. Während der Stamm ohne Plasmid kein Wachstum zeigte, konnte das Plasmid den synthetisch letalen Phänotyp von *lsa3-1 sac1Δ* komplementieren, wodurch die Zellen wachsen konnten (Daten nicht gezeigt). Das verwendete Plasmid lag in hoher Kopienzahl vor ( $2\mu$ ), wodurch *SLT2* auch

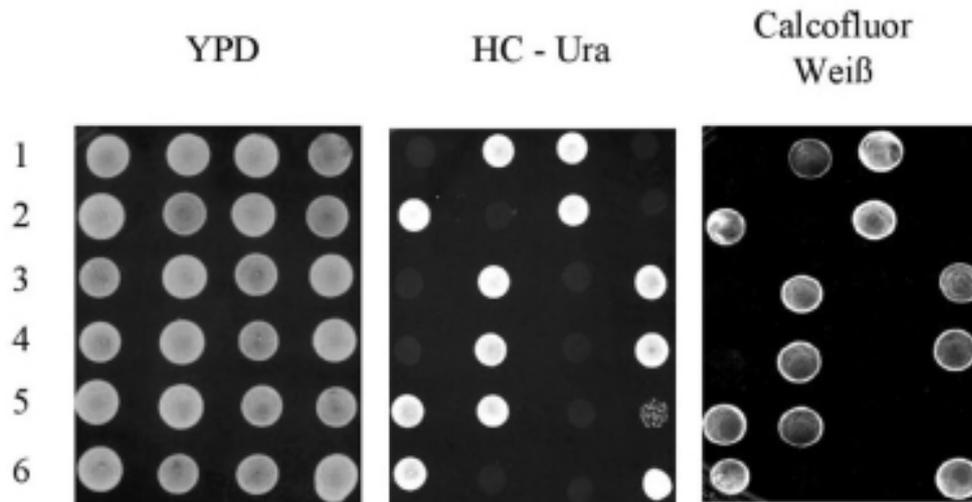
ein Suppressor des letalen Phänotyps von *lsa3-1 sac1Δ* sein könnte. Daher wurde *SLT2* für einen weiteren Komplementationstest auf ein centromeres (pAT5, *URA3*) Plasmid subkloniert und in den *lsa3-1* Stamm transformiert. Mit diesem Stamm wurde die Komplementation auf  $\alpha$ AA Platten getestet. Wie in Abb. 16 zu sehen ist, zeigt der *lsa3-1* Stamm mit dem aus der Genbank isolierten Plasmid und mit pAT5 Wachstum, das mit dem Wildtyp vergleichbar ist.



**Abbildung 16:** Der synthetisch letale Phänotyp des *lsa3-1* Allels mit *sac1Δ* wird durch das Gen der MAP Kinase Sl2p komplementiert. Eine Verdünnungsreihe der jeweiligen Stämme ist auf eine Kontrollplatte links und eine  $\alpha$ AA Platte, die gegen das Plasmid pAT1 selektiert, aufgetragen. pAT1: *CEN, SAC1, LYS2, CAN1*. p135-1: Komplementierendes Plasmid, das aus der Hefebank isoliert wurde. pSLT2: pAT5 (*CEN, SLT2, URA3*). *lsa3-1::SLT2*: pAT4 (*SLT2, URA3*) integriert in das Chromosom des *lsa3-1* Stammes an den *SLT2* Locus. Auf  $\alpha$ AA Platte zeigt der *lsa3-1* Stamm einen starken Wachstumsdefekt, den die Plasmide p135-1, pSLT2 und das integrierte pAT4 komplementieren, gezeigt durch wiederhergestelltes Wachstum auf der  $\alpha$ AA Platte. Die Anfangskonzentration der zu stempelnden Zellen betrug  $10^7$  Zellen/ml. In der Verdünnungsreihe wurde jeweils 1:5 verdünnt.

Um zu unterscheiden, ob *lsa3-1* ein Allel von *SLT2* ist oder ein Suppressor, der in niedriger Kopienzahl ausreichend ist, wurde *SLT2* auf ein integratives (pAT4, *URA3*) Plasmid subkloniert. Das Plasmid wurde mit PflMI verdaut, transformiert und damit an den *SLT2* Locus im *lsa3-1* Stamm integriert (*lsa3-1::SLT2*). Damit liegen in dem *lsa3-1* Stamm am *SLT2* Locus zwei Kopien von *SLT2*, getrennt durch den *URA3* Marker, vor. Wie in Abb. 16 zu sehen ist, komplementiert auch das integrierte pAT4 den synthetisch letalen Phänotyp von *lsa3-1 sac1Δ*. Dieser *lsa3-1::SLT2* (*MATα*) Stamm wurde mit dem *lsa3-1* (*MATα*) Stamm gekreuzt und die Tetradenanalyse durchgeführt. Die erhaltenen Sporen wurden auf YPD, HC-Ura und CFW Platten gestempelt. Damit wurde hier die CFW Sensitivität des *lsa3-1* Stammes ausgenutzt, die schneller und leichter zu analysieren war, als die Can oder  $\alpha$ AA Sensitivität. Abb. 17 zeigt sechs unabhängige Tetraden.

Insgesamt wurden 12 Tetraden analysiert. Immer zwei der hochgewachsenen Sporen aus einer Tetrade sind  $Ura^+$  und die gleichen Sporen können auch auf CFW Platten wachsen, das heißt, der CFW sensitive Phänotyp wird komplementiert. Dementsprechend sind die anderen zwei Sporen einer Tetrade  $Ura^-$  und können nicht auf CFW wachsen. Da für alle 12 Tetraden eine Cosegregation von  $Ura^+$  mit dem CFW resistenten Phänotyp beobachtet wurde, kann daraus geschlossen werden, daß der *URA3* Marker und das integrierte *SLT2* am gleichen Locus wie *lsa3-1* sind, und damit *lsa3-1* ein Allel von *SLT2* ist.



**Abbildung 17:** Durch Auftragen der Tetraden auf Uracil-freien und CFW Platten wurde getestet, ob der *LSA3* Locus mit dem *SLT2* Locus gekoppelt ist. Der Stamm *lsa3-1 MATa* wurde mit dem Stamm *lsa3-1::SLT2 MATa* gekreuzt. Die dissektierten Tetraden wurden auf YPD hochgezogen und dann auf YPD, HC-Ura und CFW Platten gestempelt. Da das linearisierte Plasmid pAT4 (*SLT2*, *URA3*) mit PflMI in der codierenden Region von *SLT2* geschnitten wurde, fand die Integration im *lsa3-1* Stamm am *SLT2* Locus statt. Der *URA3* Marker ist daher an das *SLT2* Gen gekoppelt. Je zwei der hochgewachsenen Sporen sind  $Ura^+$  und CFW resistent, d. h. zeigen nicht mehr den synthetisch letalen Phänotyp. Da der *URA3* Marker und die Komplementation durch das *SLT2* Gen zusammen segregieren, wurde geschlossen, daß *lsa3-1* ein Allel von *SLT2* ist.

#### 4.2.5.1 Die *lsa3-1* Mutation liegt im aktive Zentrum der Kinase

Es wurden fünf unabhängige Kulturen von *lsa3-1* über Nacht bei 30°C angezogen, um jeweils die genomische DNA zu präparieren. Je 1  $\mu$ l dieser DNA wurde als Vorlage in die PCR eingesetzt, als Primer wurden SLT2-A und SLT2-E verwendet. Die Produkte (~ 1.7 kb) wurden aufgereinigt und mit den Primern SLT2-A, MPK1-1, MPK1-2, MPK1-3, SLT2-E zum Sequenzieren gegeben. Durch Sequenzvergleich wurde festgestellt, daß sich an Position 457 der codierenden Region statt Guanin Adenin befindet ( $G_{457} \rightarrow A_{457}$ ). Dadurch ändert sich auch die Proteinsequenz, Asparaginsäure ( $D_{153}$ ) wird durch Asparagin ( $N_{153}$ ) ersetzt. Das Allel *lsa3-1* wurde daher in *slt2-153N* umbenannt. In (Hanks *et al.*, 1988) wurde die Sequenz der cAMP-abhängigen Protein Kinase (cAPK, Proteinkinase A,

PKA) mit Sequenzen weiterer Proteinkinasen verglichen. Die im *slt2-153N* Allel mutierte Asparaginsäure ist in allen verglichenen Proteinkinasen vorhanden (Abb. 18) und agiert als katalytische Base der Phosphat-Transfer-Reaktion (Taylor *et al.*, 1993). Durch die Röntgenstrukturanalyse der Proteinkinase A zeigte sich, daß die Rückgrat-Carbonylgruppe der Asparaginsäure an der Bildung von Wasserstoffbrücken zur Stabilisierung der räumlichen Struktur für die Bindung von MgATP beteiligt ist. Wird die Asparaginsäure 166 in cAPK gegen Alanin ausgetauscht, so sinkt die Aktivität auf 0.4%,  $k_{cat}$  ist 350-370-fach niedriger, und  $K_M$  ist 1.5-fach erhöht (Taylor *et al.*, 1993) (Bossemeyer *et al.*, 1993).

Schwein Pka	162	VLHR <b>D</b> LKP	169
Ratte Erk2	143	VLHR <b>D</b> LKP	150
Maus p38	146	IIHR <b>D</b> LKP	153
Hefe Cdc28	131	ILHR <b>D</b> LKP	138
Hefe Hog1	139	VIHR <b>D</b> LKP	146
Hefe Slc2	149	VLHR <b>D</b> LKP	156
slt2-153N	149	VLHR <b>N</b> LKP	156

**Abbildung 18:** Dargestellt ist die hochkonservierte Region in Proteinkinasen um das katalytische Zentrum. Die Asparaginsäure ist die katalytische Base für die Phosphat-Transfer Reaktion.

#### 4.2.5.2 Die anderen Mutanten lassen sich nicht durch die Überexpression von *SLT2* komplementieren

Da *SLT2* Bestandteil einer MAP Kinase Kaskade ist, wäre es möglich, daß noch andere Faktoren dieser Kaskade mit *SAC1* interagieren. Oft kann durch die Überexpression eines Proteins die Mutation in einem anderen, das oberhalb in der Kaskade agiert, supprimiert werden. Alle isolierten Stämme wurden daher mit dem Plasmid YEp352::MPK1 transformiert und auf Can und  $\alpha$ AA Platten auf Komplementation untersucht. Bei keinem dieser Stämme konnte das Wachstum auf Can und  $\alpha$ AA Platten wiederhergestellt werden (Daten nicht gezeigt). Daraus wurde geschlossen, daß wahrscheinlich kein weiterer Faktor dieses MAP Kinase Weges in dem Screen gefunden wurde. Dies kann aber erst definitiv geschlossen werden, wenn alle Mutanten identifiziert sind.

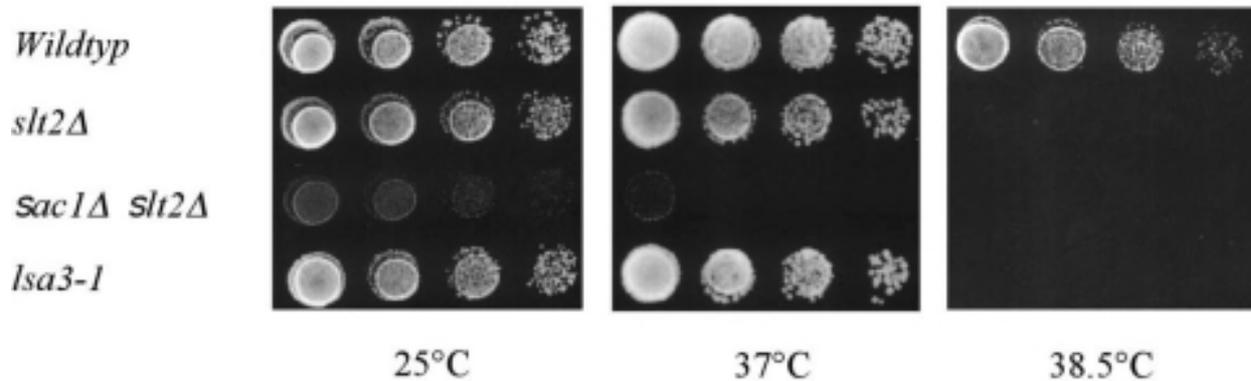
### 4.3 CHARAKTERISIERUNG DER INTERAKTIONEN VON *SLT2* MIT *SAC1*

Slt2p gehört zu der Familie der MAP Kinasen. Die Aktivierung von Slt2p erfolgt über eine Kaskade (Gustin *et al.*, 1998). *slt2* Mutanten zeigen eine Vielzahl von Phänotypen. Der Zellwanddefekt der *slt2* Stämme führt bei höheren Temperaturen zur Lyse der Zellen (Mazzoni *et al.*, 1993). Deshalb sind die Zellen ts, was durch osmotische Stabilisierung verhindert werden kann (Watanabe *et al.*, 1995). Weiter sind Aktin und Chitin bei 37°C delokalisiert (Mazzoni *et al.*, 1993). Ebenfalls bei 37°C sind sekretorische Vesikel, die sich in Wildtyp Zellen in der entstehenden Tochterzelle befinden, überall im Cytosol verteilt zu finden (Mazzoni *et al.*, 1993). Diese Phänotypen wurden auch in Mutanten des Cytoskeletts gefunden. Außerdem wurden ähnliche Aktin und Chitin Defekte auch in *sac1* Mutanten beobachtet (Novick *et al.*, 1989). *sac1* Mutanten zeigen zusätzlich noch einen Defekt im ATP-Transport in das ER (Mayinger *et al.*, 1995), Inositolauxotrophie (Whitters *et al.*, 1993) und eine erhöhte Menge an Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI4P) (Guo *et al.*, 1999). Um zu überprüfen, ob Slt2p und Sac1p in ihren bis dahin spezifischen Funktionen weitere Überlappungen zeigen, wurden die spezifischen Phänotypen der jeweiligen Mutante, *slt2* oder *sac1*, in der anderen Mutante getestet. Aus den Ergebnissen sollte sich zum einen der Grund für die synthetische Letalität von *sac1* mit *slt2* und zum anderen der funktionelle Zusammenhang der beiden Gene ableiten lassen.

#### 4.3.1 *sac1*Δ *slt2* Δ Zellen zeigen starken Wachstumsdefekt

Mit der Generation des *sac1*Δ *slt2*Δ Stammes sollte getestet werden, ob der synthetische letale Phänotyp von *sac1*Δ *slt2-153N* allelspezifisch ist. In (Martin *et al.*, 1993) ist beschrieben, daß *slt2* Mutanten bei 32°C einen ts Phänotyp zeigen. Daher wurden die *slt2*Δ, *sac1*Δ *slt2*Δ und *slt2-153N* Stämme bei 25°C, 37°C und 38.5°C getestet. Anders als in der Literatur beschrieben, zeigen die *slt2*Δ Zellen den ts Phänotyp erst bei 38.5°C, genauso wie die *slt2-153N* Zellen. Die *sac1*Δ *slt2*Δ Zellen zeigen, genau wie die *sac1*Δ *slt2-153N* Zellen (Abb. 19), bei den höheren Temperaturen kein Wachstum und bei 25°C sehr schwaches Wachstum (Abb. 19). Damit wurde gezeigt, daß der Wachstumsdefekt von *sac1*Δ *slt2*Δ und *sac1*Δ *slt2-153N* Stämme identisch und nicht allelspezifisch ist.

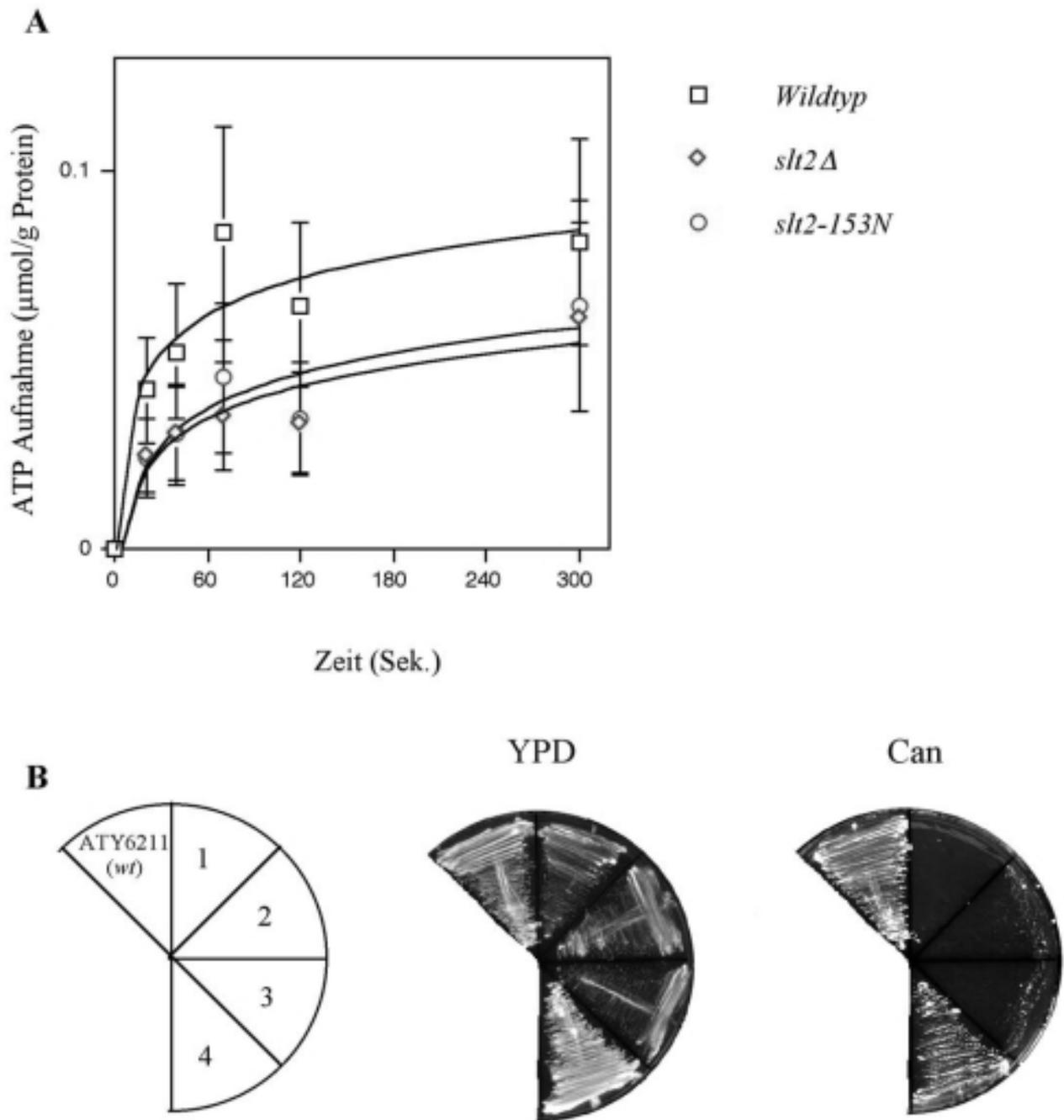
Außerdem läßt sich aus diesen Daten schließen, daß das *slt2-153N* Allel phänotypisch der Deletionsmutante entspricht.



**Abbildung 19:** *slt2Δ* und *slt2-153N* Zellen zeigen thermosensitives Verhalten bei 38.5°C. *sac1Δ slt2Δ* Zellen zeigen einen starken Wachstumsdefekt schon bei 25°C und sind ts bei 37°C. Die Zellen sind als Verdünnungsreihe aufgetragen.

#### 4.3.2 *slt2Δ* Zellen zeigen reduzierten ATP-Transport

Eine mögliche Grundlage für die synthetischen Interaktionen von *sac1Δ slt2<sup>ts</sup>* ist eine gemeinsame Funktion von Sac1p und Slt2p im ATP-Transport. Wie schon in Kapitel 4.2.3.1 beschrieben, ist der ATP-Transport im *slt2-153N* Stamm verlangsamt. Um zu entscheiden, ob der erniedrigte ATP-Transport allelspezifisch ist, oder auch in Deletionsmutanten von *SLT2* zu beobachten ist, wurde von zwei verschiedenen *slt2Δ* Stämmen (ATY331 und ATY338) Mikrosomen präpariert und der ATP Transport gemessen. Als Vergleich sind in Abb. 20A die Wildtyp-Kontrolle und *slt2-153N* aus Abb. 15 mit aufgetragen. Die Kinetik des ATP-Transports von *slt2Δ* entspricht der von *slt2-153N* Zellen und ist auf ~ 67% des Wildtyps erniedrigt. Diese Daten sind konsistent mit der Idee, daß Slt2p und Sac1p beide eine Funktion im ATP-Transport haben, wobei unklar bleibt, ob die Funktion von Slt2p in diesem Zusammenhang direkt oder indirekt ist. In Abb. 20B sind die Daten dazu auf YPD und Can Platte gezeigt. Da der ATP-Transport der *slt2* Mutanten erniedrigt ist, aber das *sac1-22* Allel nicht den synthetischen Wachstumsdefekt der *sac1Δ slt2<sup>ts</sup>* Zellen komplementiert, führte dies zu der Annahme, daß der synthetische Wachstumsdefekt nicht direkt auf dem Defekt im ATP Transport beruht, und daher kein genereller Effekt der verlangsamteten Sekretion ist.

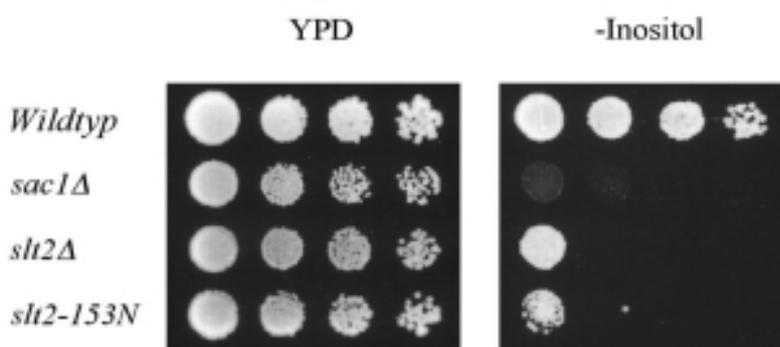


**Abbildung 20:** Zum einen wurde die Kapazität des ATP-Transports in *slt2 $\Delta$*  und *slt2-153N* Zellen gemessen. Zum anderen wurde untersucht, ob das *sac1-22* Allel den synthetischen Wachstumsdefekt von *sac1 $\Delta$  slt2-153N* Zellen komplementiert. **(A)** ATP-Transport Kinetik von Wildtyp (12 Messungen), *slt2 $\Delta$*  (12 Messungen) und *slt2-153N* (6 Messungen) Stämmen. Die Kapazität für *slt2 $\Delta$*  und *slt2-153N* Stämme ist um ~23% gegenüber dem Wildtyp erniedrigt. **(B)** Die jeweiligen Stämme wurden auf YPD und Can Platten ausgestrichen. Das Plasmid pAT2 (*SAC1*, *URA3*) komplementiert, während das Plasmid pAT3 (*sac1-22*, *TRP1*) nicht den synthetischen Wachstumsdefekt von *sac1 $\Delta$  slt2-153N* komplementiert. Gezeigt durch Wachstum, bzw. kein Wachstum auf der Can Platte. 1: *lsa3-1*, 2: *lsa3-1* YCp22, 3: *lsa3-1 psac1-22* und 4: *lsa3-1 pSAC1*.

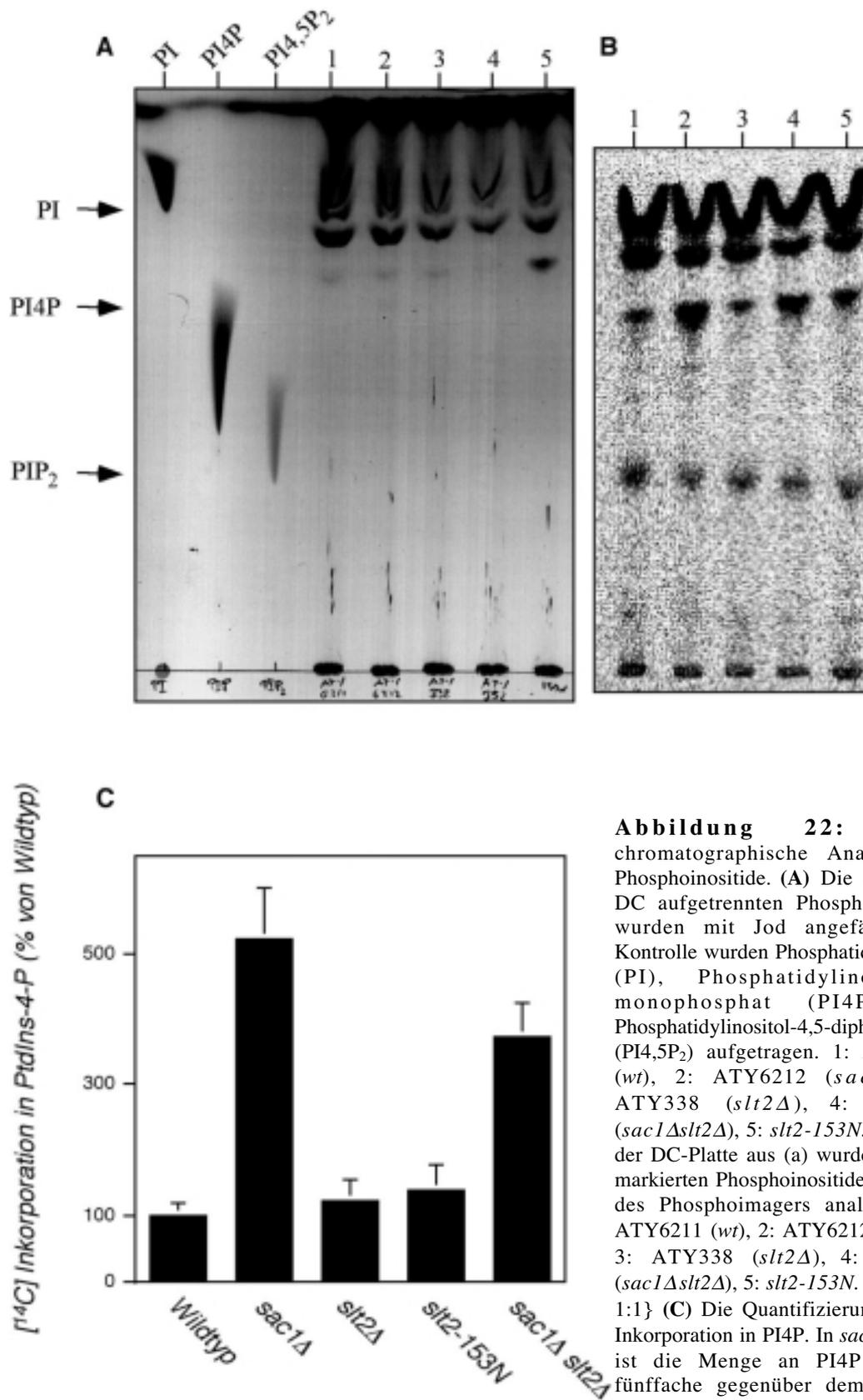
### 4.3.3 *slt2* $\Delta$ Zellen sind inositolauxotroph, zeigen aber keine veränderte Menge an Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI4P)

Eine weitere Möglichkeit gemeinsamer Funktionen von Sac1p und Slt2p könnte eine Rolle in Phosphoinositid Signalwegen sein. Wie schon in der Einleitung beschrieben, verursacht ein Defekt im Lipid Metabolismus die Inositolauxotrophie der *sac1* $\Delta$  Stämme (Rivas *et al.*, 1999). Daher wurden Verdünnungen von *sac1* $\Delta$ , *slt2* $\Delta$  und *slt2-153N* Zellen auf Inositol-freien Platten getestet. Wie in Abb. 21 zu sehen ist, sind *slt2* $\Delta$  und *slt2-153N* Mutanten ebenfalls inositolauxotroph, zeigen aber einen schwächeren Phänotyp als *sac1* Mutanten.

Die erhöhte Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI4P) Menge in *sac1* Zellen (Rivas *et al.*, 1999), (Stock *et al.*, 1999) ist ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung von Sac1p an den Phosphoinositid Signalwegen. Es wurde untersucht, ob dies auch für *slt2* Mutanten zutrifft. Aus den Stämmen ATY6211 (*wt*), ATY6212 (*sac1* $\Delta$ ), ATY338 (*slt2* $\Delta$ ), ATY352 (*sac1* $\Delta$  *slt2* $\Delta$ ) und *slt2-153N* wurden die Lipide isoliert und mittels Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt. Als Kontrollen wurde Phosphatidylinositol (PI), PI4P und Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PI4,5P<sub>2</sub>) aufgetragen. Nach dem Trocknen wurden die aufgetrennten Phosphoinositide zuerst mit Jod angefärbt (Abb. 22A) und dann die <sup>14</sup>C markierten Phosphoinositide mit Hilfe eines Phosphoimagers analysiert (Abb. 22B). Die Quantifizierung ergab, daß in den *sac1* $\Delta$  Zellen gegenüber Wildtyp Zellen eine fünffach höhere Menge an radioaktiv markiertem PI4P vorliegt, entsprechend der Ergebnisse in (Rivas *et al.*, 1999), (Stock *et al.*, 1999), während bei den *slt2* $\Delta$  Zellen kein Effekt zu sehen ist (Abb. 22C). Daraus läßt sich schließen, daß Sac1p und Slt2p keine überlappende Funktion in der Phosphoinositid Signalübertragung haben.



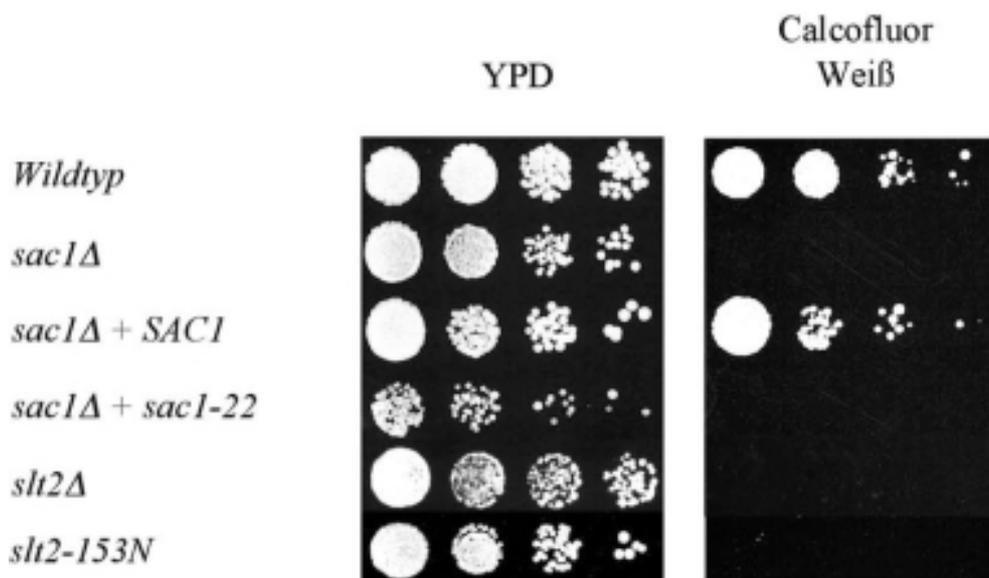
**Abbildung 21:** Verdünnungsreihen der *sac1* $\Delta$ , *slt2* $\Delta$  und *slt2-153N* Stämme wurden auf eine YPD und eine Inositol-freie Platte aufgetragen. Der *sac1* $\Delta$  Stamm zeigt kein Wachstum auf der Inositol freien Platte, während die *slt2* $\Delta$  und *slt2-153N* Stämme nur bei der höchsten Konzentration an Zellen Wachstum zeigen. Daher sind die *sac1* $\Delta$ , *slt2* $\Delta$  und *slt2-153N* Stämme inositolauxotroph.



**Abbildung 22:** Die chromatographische Analyse der Phosphoinositide. (A) Die durch die DC aufgetrennten Phosphoinositide wurden mit Jod angefärbt. Als Kontrolle wurden Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylinositol-4-monophosphat (PI4P) und Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PI4,5P<sub>2</sub>) aufgetragen. 1: ATY6211 (*wt*), 2: ATY6212 (*sac1Δ*), 3: ATY338 (*slt2Δ*), 4: ATY352 (*sac1Δslt2Δ*), 5: *slt2-153N*. (B) Auf der DC-Platte aus (a) wurden die <sup>14</sup>C markierten Phosphoinositide mit Hilfe des Phosphoimagers analysiert. 1: ATY6211 (*wt*), 2: ATY6212 (*sac1Δ*), 3: ATY338 (*slt2Δ*), 4: ATY352 (*sac1Δslt2Δ*), 5: *slt2-153N*. {(a):(b) = 1:1} (C) Die Quantifizierung der <sup>14</sup>C Inkomposition in PI4P. In *sac1Δ* Zellen ist die Menge an PI4P um das fünffache gegenüber dem Wildtyp erhöht, während bei den *slt2* Allelen kein Effekt zu sehen ist.

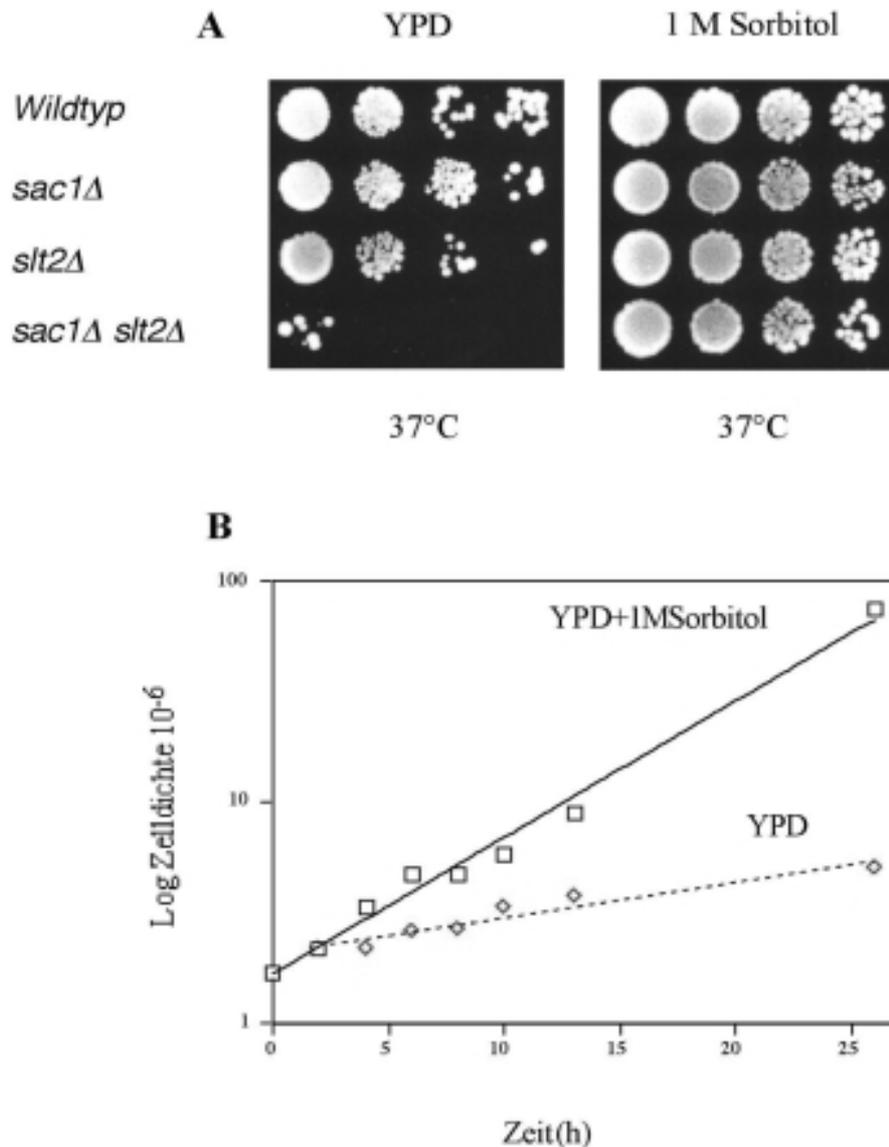
#### 4.3.4 *sac1* und *slt2* Mutanten haben einen Zellwanddefekt

Die synthetischen Interaktionen könnten auch durch eine gemeinsame Funktion von Sac1p und Sl2p in der Organisation der Zellwand verursacht werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die in Kapitel 4.2.4.3 beschriebene Calcofluor Weiß (CFW) Sensitivität des *slt2-153N* Stammes ausgenutzt, die ein Nachweis für Zellwanddefekte ist (Madden *et al.*, 1997), (Igual *et al.*, 1996), (Ram *et al.*, 1994). Der Zellwanddefekt von *slt2* Mutanten wurde schon in (Martin *et al.*, 1993) beschrieben. Auf YPD Platten mit und ohne 0.02 mg/ml CFW wurden Verdünnungsreihen der *sac1Δ*, *sac1-22*, *slt2Δ* und *slt2-153N* Stämme getestet. Wie in Abb. 23 zu sehen ist, zeigt keiner dieser Stämme Wachstum auf den CFW Platten. Aus dieser CFW Sensitivität läßt sich schließen, daß sowohl *slt2* als auch *sac1* Mutanten einen Zellwanddefekt haben. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Hypothese, daß Sl2p und Sac1p an der Organisation der Zellwand beteiligt sind.



**Abbildung 23:** Die *sac1* und *slt2* Mutanten wurden auf CFW Platten getestet, mit denen spezifisch ein Zellwanddefekt nachgewiesen werden kann. Verdünnungsreihen der Stämme wurden auf je eine YPD und YPD mit 0.02 mg/ml CFW Platte aufgetragen. Alle *sac1* und *slt2* Allele zeigen kein Wachstum auf der CFW Platte, was auf einen Zellwanddefekt deutet. Die Platten wurden zwei Tage bei 25°C inkubiert.

Der gemeinsame Zellwanddefekt der *slt2* und *sac1* Mutanten könnte der Grund für den synthetischen Wachstumsdefekt sein. Für verschiedene Zellwandmutanten kann die Lyse der Zellen bei höheren Temperaturen durch osmotische Stabilisierung mit 1 M Sorbitol verhindert werden (Levin and Bartlett-Heubusch, 1992), (Watanabe *et al.*, 1995). Daher wurde untersucht, ob dies ebenfalls für den Wachstumsdefekt der *sac1Δ slt2Δ*



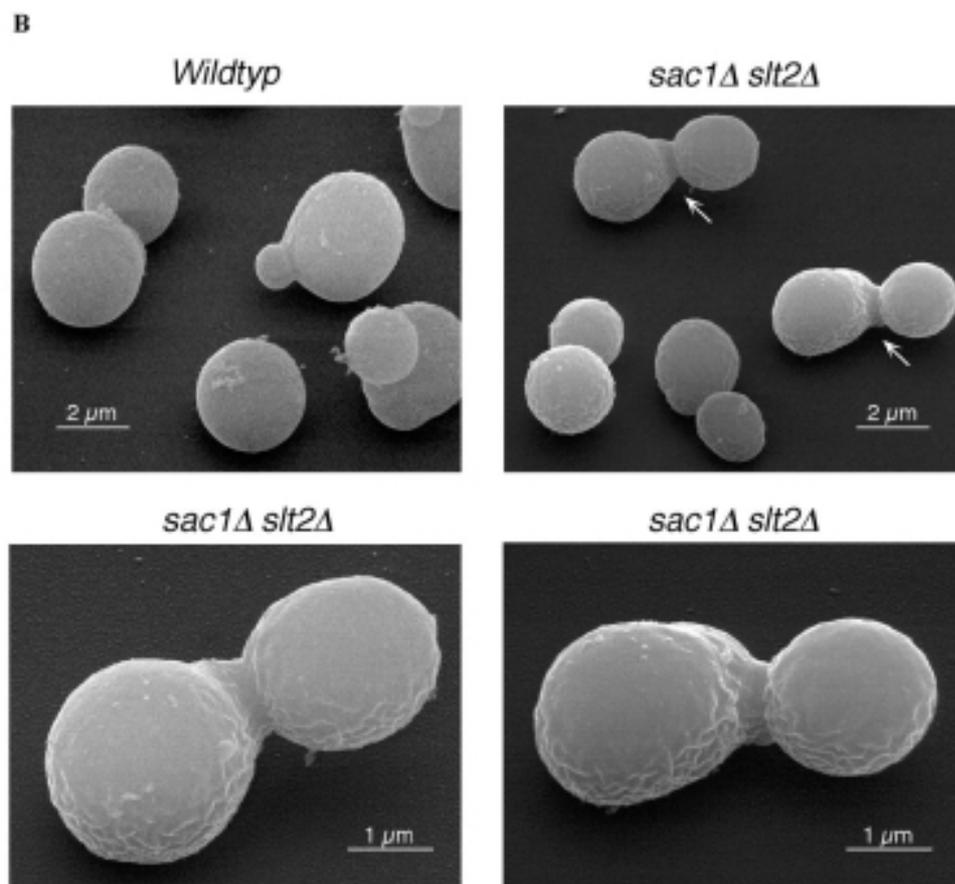
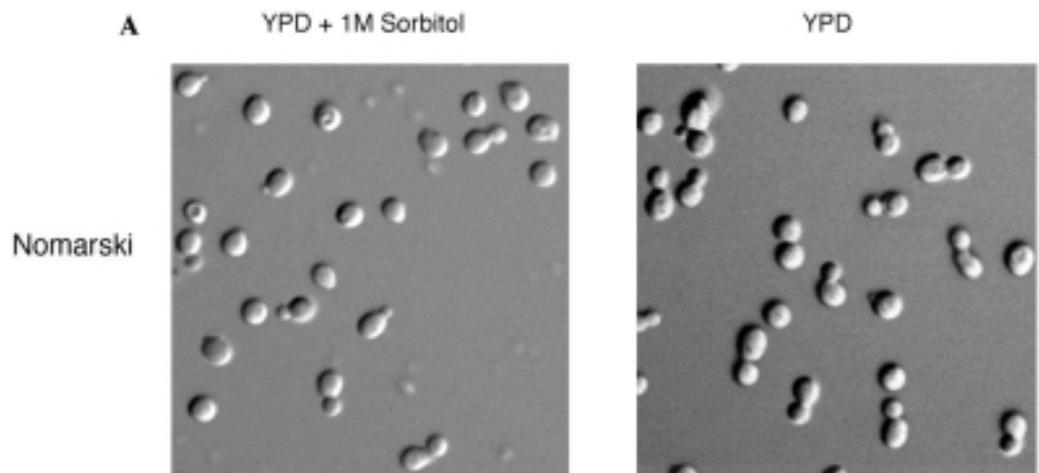
**Abbildung 24:** Es wurde untersucht, ob durch osmotische Stabilisierung mit 1 M Sorbitol der synthetische Wachstumsdefekt der *sac1Δ slt2Δ* Zellen supprimiert werden kann. **(A)** Der thermosensitive Phänotyp bei 37°C kann durch Sorbitol verhindert werden. Die Zellen sind als Verdünnungsreihe aufgetragen. **(B)** In Flüssigkultur kann der starke Wachstumsdefekt der *sac1Δ slt2Δ* Zellen durch die Zugabe von Sorbitol verhindert werden. Die Kontrollkultur wurde in YPD mit 1 M Sorbitol hochgezogen. Aus dieser Kultur wurde ein Aliquot entnommen, und die Zellen wurden in YPD überführt. Die Zelldichte wurde durch Messen der OD<sub>600</sub> und Auszählen bestimmt.

Doppelmutante zutrifft. Die *slt2Δ* und *sac1Δ slt2Δ* Stämme wurden bei 37°C auf YPD mit 1 M Sorbitol getestet. Wie in Abb. 24A gezeigt, können *sac1Δ slt2Δ* Zellen auf dem osmotisch stabilisierenden Medium wachsen. Die *slt2Δ* Zellen zeigen auf den Sorbitol Platten verbessertes Wachstum, was bei den niedrigeren Konzentrationen in der Verdünnungsreihe zu erkennen ist (Abb. 24A). Zur Quantifizierung dieses Ergebnisses wurde die Wachstumsgeschwindigkeit dieser Zellen in Flüssigkultur mit und ohne 1 M Sorbitol bei 30°C gemessen. Dazu wurden die *sac1Δ slt2Δ* Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.01 in YPD mit 1 M Sorbitol hochgezogen, dann wurde ein Aliquot der Zellen

entnommen und in YPD Medium überführt. Die Kulturen wurden weiter bei 30°C inkubiert, alle zwei Stunden wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt. Wie in Abb. 24B zu sehen ist, können die *sac1Δ slt2Δ* Zellen in Sorbitol Medium wachsen, während ohne Sorbitol das Wachstum stagniert. Wurden die Zellen nach ~ 8 h Inkubation in YPD Medium wieder in YPD mit Sorbitol überführt, so zeigten sie für ~ 5 h weiterhin sehr wenig Wachstum, hatten aber nach insgesamt ~ 18 h annähernd die Zelldichte der Kontrollkultur erreicht (Daten nicht gezeigt). Die Überlebensrate nach 8 h Inkubation in YPD Medium wurde auf YPD Platten mit 1 M Sorbitol zu ~ 36% im Vergleich zu ~ 33% der Kontrollkultur bestimmt. Als Standard wurde ein Wildtyp Stamm verwendet. Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß der Zellwanddefekt, den *sac1* und *slt2* Mutanten zeigen, für den synthetisch letalen Phänotyp der Doppelmutante verantwortlich ist, da dieser Phänotyp nicht in osmotisch stabilisierendem Medium zu beobachten ist.

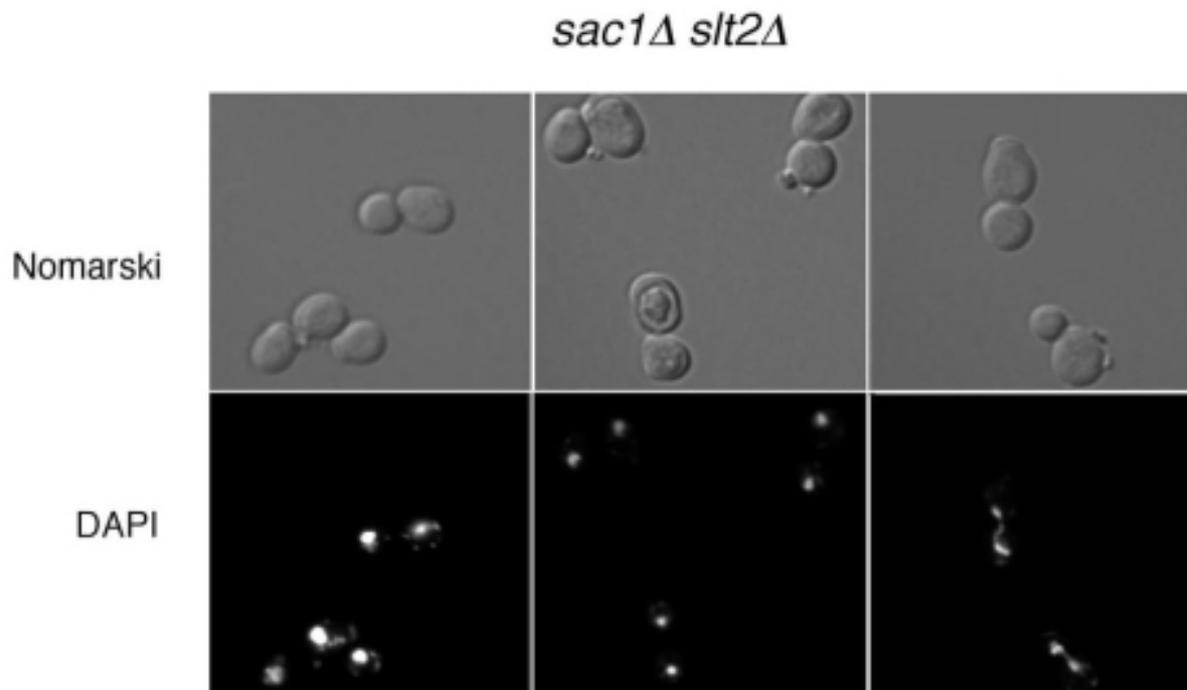
#### **4.3.5 Fehlerhafte Anreicherung von Chitin zwischen Mutter- und Tochterzelle in *sac1Δ slt2Δ* Zellen führen zu einem Separationsdefekt**

Da ein Zellwanddefekt offensichtlich für den synthetischen Wachstumsdefekt verantwortlich ist, wurden die anschließenden Experimente auf die Untersuchung der Morphologie der Zellen ausgerichtet. Von *slt2* Mutanten ist bekannt, daß sie bei 37°C zu 71 % als einzelne Zellen vorliegen, bevor sie lysieren (Mazzoni *et al.*, 1993). Da dieser Phänotyp unter dem Lichtmikroskop zu sehen ist, wurden die *sac1Δ slt2Δ* Zellen ebenfalls so betrachtet. Dazu wurden Übernachtkulturen der *sac1Δ slt2Δ* Zellen in YPD mit oder ohne 1 M Sorbitol bei 30°C hochgezogen. Wurden diese Zellen nach 15 h unter dem Mikroskop verglichen, zeigte sich eine Akkumulation an großen geknospten Zellen in der Kultur ohne Sorbitol, während die Zellen in der Kultur mit Sorbitol in allen Stadien des Zellzyklus zu sehen sind (Abb. 25A). Der synthetische Wachstumsdefekt könnte somit auf einem Zellteilungsdefekt beruhen. Um davon ein genaueres Bild zu bekommen, wurden *sac1Δ slt2Δ* Zellen in YPD ebenfalls unter dem Laser Scanning Elektronen Mikroskop näher betrachtet. In Abb. 25B sind zwei repräsentative Beispiele zu sehen. Der Bereich zwischen Mutter- und Tochterzelle (Pfeile) ist in diesen Zellen jeweils stark verlängert.



**Abbildung 25: (vorherige Seite)** Morphologie der *sac1Δ slt2Δ* Zellen. (A) Wurden diese Zellen in YPD hochgezogen, so lag die Mehrzahl der Zellen als große geknospte Zellen vor (rechte Abbildung). In mit 1 M Sorbitol supplementiertem YPD lagen die Zellen in allen Stadien des Zellzyklus vor (linke Abbildung). (B) Die Region zwischen Mutter- und Tochterzelle ist in *sac1Δ slt2Δ* Zellen, die in YPD hochgezogen wurden, stark elongiert. Als Kontrolle ist links oben Wildtyp abgebildet. Rechts oben sind *sac1Δ slt2Δ* Zellen abgebildet, die Pfeil zeigen auf die elongierte Region. Die beiden unteren Abbildungen sind Vergrößerungen der mit Pfeil markierten Zellen aus der oberen rechten Abbildung. Die Aufnahmen wurden mit einem Laser Scanning Elektronen Mikroskop gemacht.

In Wildtyp Hefezellen spaltet sich die Tochter- von der Mutterzelle ab, sobald die Tochterzelle annähernd die Größe der Mutterzelle erreicht hat. Dazu muß zuerst die Kernteilung und dann die Cytokinese stattfinden. Anschließend kommt es zur Separation der Zellen. Ein möglicher Grund für die in YPD vorliegenden großen geknospten *sac1Δ slt2Δ* Zellen könnte ein Defekt in der Kernteilung sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die genomische DNA der *sac1Δ slt2Δ* Zellen in YPD mit DAPI angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht (Abb. 26). Die Normarski Aufnahmen zeigen drei Ausschnitte mit großen geknospten Zellen aus einer Übernachtkultur, darunter ist das jeweilige Fluoreszenzbild abgebildet. Jede Zelle besitzt einen Kern, der keinerlei Besonderheiten aufweist. Die *sac1Δ slt2Δ* Zellen zeigen also keinen Defekt in der Kernteilung.



**Abbildung 26:** Fluoreszenzmarkierte Zellkerne der *sac1Δ slt2Δ* Zellen. Die obere Reihe zeigt drei Nomarski Ausschnitte, die untere Reihe die dazugehörigen Fluoreszenzbilder. Jede dieser Zellen hat einen eigenen Zellkern, in dem rechten Ausschnitt findet gerade die Kernteilung statt.

Da die *sac1Δ slt2Δ* Zellen in YPD als große geknospte Zellen arretierten und keinen Defekt in der Kernteilung aufweisen, wurde untersucht, ob die Zellen die Cytokinese vollendet hatten. Haben die beiden Zellen jeweils eine eigene Plasmamembran und damit die Cytokinese abgeschlossen, aber eine gemeinsame Zellwand, so lassen sich die beiden Zellen durch Abbau der Zellwand voneinander trennen. Daher wurde mit 1 mg/ml Zymolyase aus den *sac1Δ slt2Δ* Zellen Spheroblasten hergestellt. Anschließend wurde unter dem Mikroskop die Anzahl verschiedener Zelltypen (ungeknospt, mit kleiner oder großer Knospe, Zellhaufen) in einem Ausschnitt bestimmt. Wie in Abb. 27 dargestellt ist, lagen vor der Zymolyase Behandlung 2/3 der Zellen mit großen Tochterzellen oder als Zellhaufen vor, während nach der Behandlung 2/3 der Zellen als einzelne Zellen ohne Knospe vorlagen. Aus der stark gestiegenen Anzahl an einzelnen Zellen nach der Zymolyasebehandlung wurde geschlossen, daß die *sac1Δ slt2Δ* Zellen keinen Defekt in der Cytokinese haben.

cell type (%)	- zymolyase	+ zymolyase
	31	72
	3	3
	37	13
	29	12

15h in YPD

**Abbildung 27:** Analyse der verschiedenen *sac1Δ slt2Δ* Zelltypen in YPD Medium. Die in YPD hochgezogenen Zellen wurden mit Zymolyase behandelt und die Anzahl der verschiedenen Zelltypen (ungeknospt, mit kleiner oder großer Knospe, Zellhaufen) bestimmt und mit der Anzahl dieser Zelltypen vor der Zymolyase Behandlung verglichen.

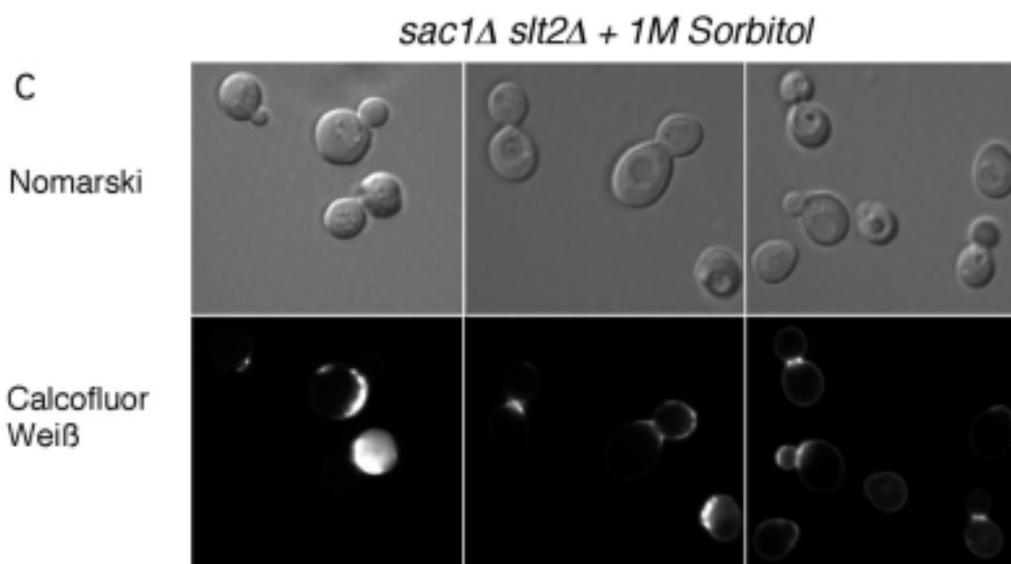
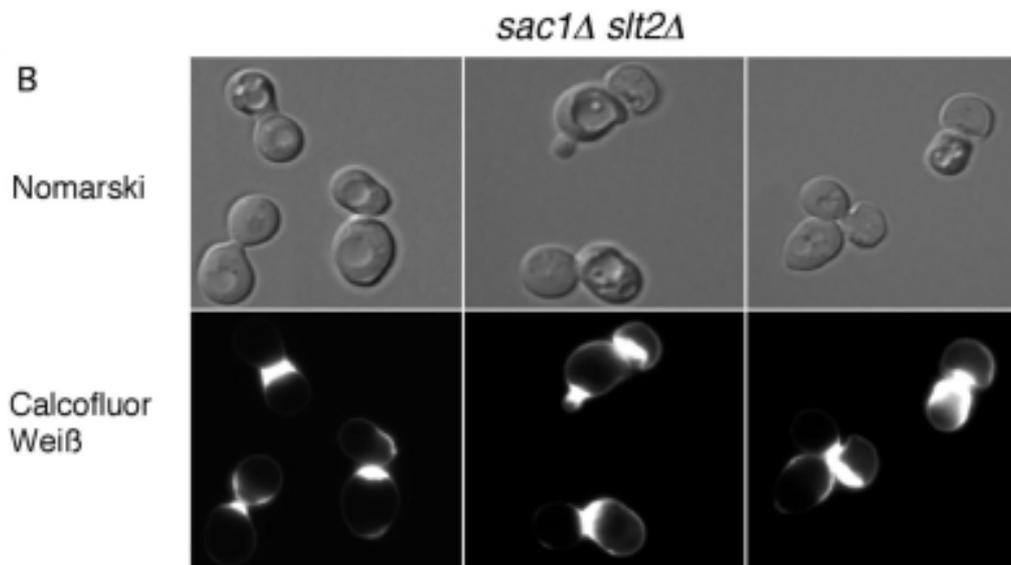
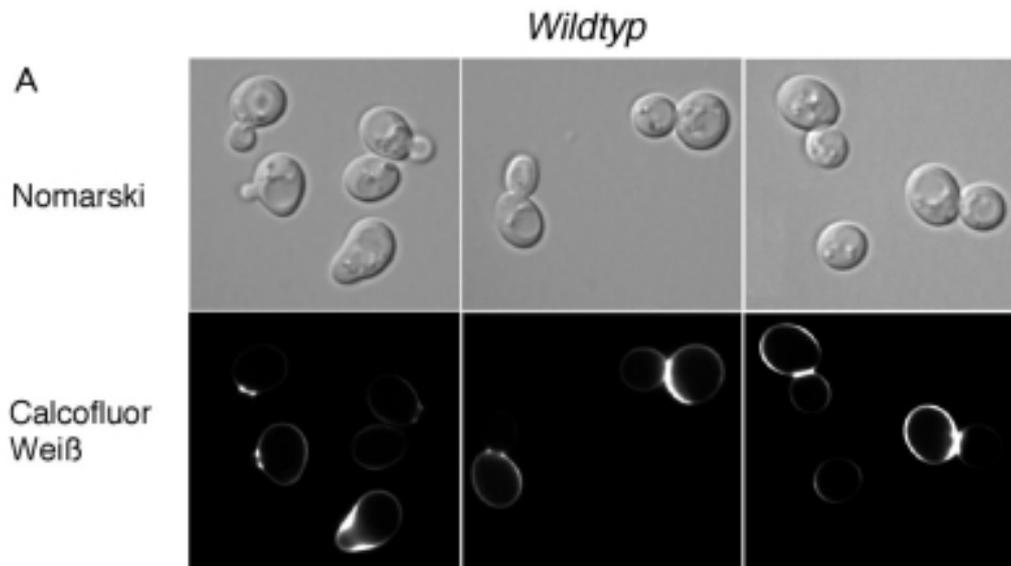
Der Zellteilungsdefekt der *sac1Δ slt2Δ* Zellen könnte mit der Zusammensetzung der Zellwand zusammenhängen. Ein wichtiger Bestandteil, der für die korrekte Teilung der Zellen benötigt wird, ist das Chitin. Beginnt eine Zelle zu knospen, so bildet sich als erstes ein Chitinring zwischen Mutter- und entstehender Tochterzelle. Die Anlagerung von Chitin wird fortgesetzt, bis die Tochterzelle annähernd die Größe der Mutterzelle erreicht hat. Mit Beginn der Cytokinese „wächst“ das Chitin mit der Plasmamembran nach innen, um das Primäre Septum zu formen. Das Sekundäre Septum wird anschließend beidseitig von  $\beta$ -Glukan und Mannan gebildet. Hat sich die Tochterzelle von der Mutterzelle getrennt, so bleibt eine Narbe in der Zellwand der Mutterzelle übrig, die reich an Chitin ist (Cid *et al.*, 1995). Chitin kann unter dem Fluoreszenzmikroskop mit CFW sichtbar gemacht werden

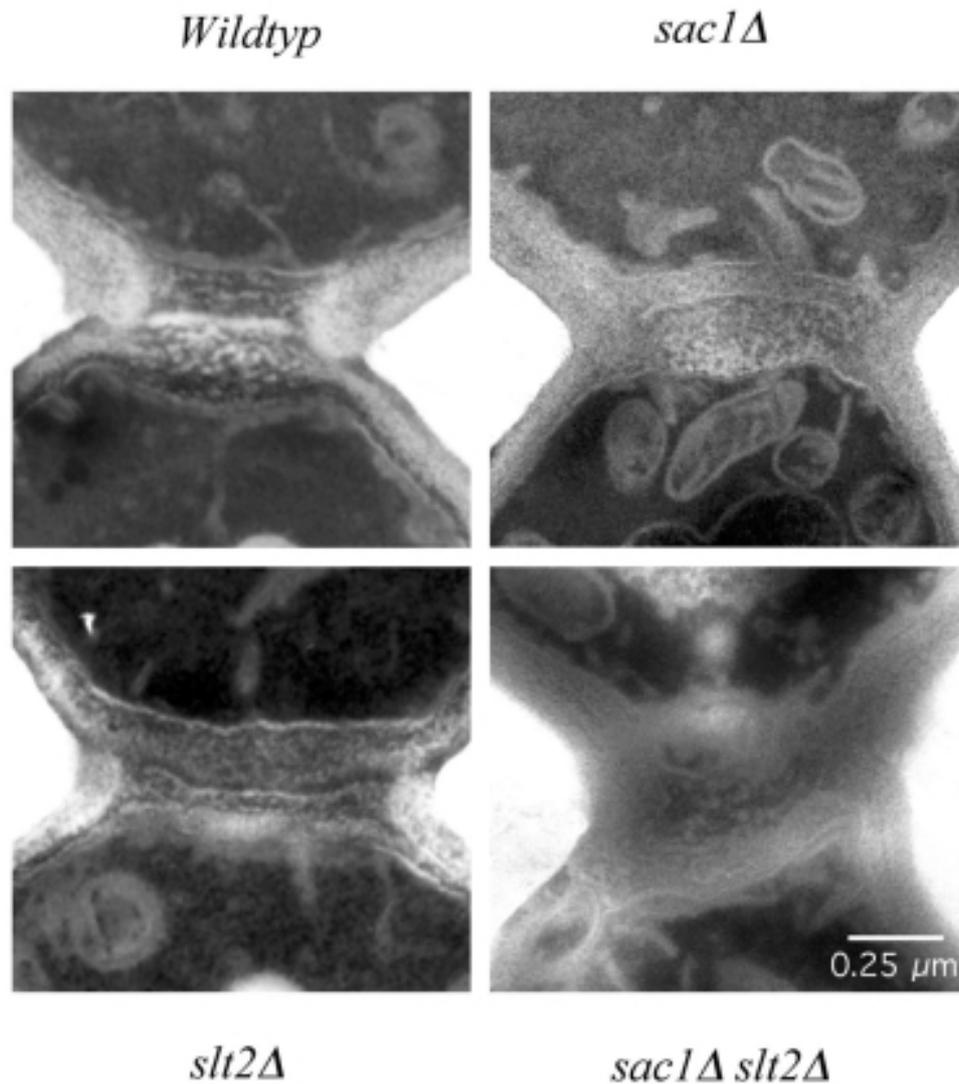
(Adams *et al.*, 1997). Es wurde also untersucht, wie die Verteilung des Chitins in den *sac1Δ slt2Δ* Zellen im Vergleich zu Wildtyp Zellen aussieht. In Wildtyp Zellen sind der Chitinring zwischen Mutter- und Tochterzelle und die Narben auf der Zelloberfläche gut zu erkennen, während die Tochterzellen erst kurz vor der Separation Chitinfärbung zeigen (Abb. 28). In den *sac1Δ slt2Δ* Zellen ist der Chitinring zwischen Mutter- und Tochterzelle viel breiter und teilweise ist Chitin in den Tochterzellen sichtbar. Die in Sorbitol hochgezogenen Zellen zeigen eine Delokalisierung von Chitin, aber nicht die starke Anreicherung von Chitin. *slt2Δ* Zellen zeigen in dieser Hinsicht bei der permissiven Temperatur keinen Phänotyp, während bei 37°C ebenfalls eine Delokalisation von Chitin beobachtet wurde (Mazzoni *et al.*, 1993).

Das Chitin, das das primäre Septum bildet, ist elektronentransparent und hebt sich daher hell von den elektronendichteren dunklen sekundären Septa in elektronenmikroskopischen Aufnahmen ab (Shaw *et al.*, 1991). Die Septa der *sac1Δ slt2Δ* Zellen zeigen im Vergleich zum Wildtyp mehrere Schichten von Chitin. Außerdem sieht der Aufbau der Septa gegenüber dem Wildtyp stark verändert aus (Abb. 29).

Zusammengefaßt zeigen die *sac1Δ slt2Δ* Zellen weder einen Defekt in der Kernteilung noch in der Cytokinese. Dagegen zeigt die Region zwischen Mutter- und Tochterzelle eine starke Anreicherung an Chitin, und die Zusammensetzung des Septums ist gestört. In (Igual *et al.*, 1996) wurde gezeigt, daß die Expression verschiedener Gene, die für die Zellwandbiosynthese benötigt werden (*GLS1*, *FKS2*, *MNN1* und *CHS3*) von Slt2p abhängig ist. Außerdem kann die Aktivierung des Pkc1 Weges bei hohen Temperaturen durch osmotische Stabilisierung verhindert werden (Kamada *et al.*, 1995). Parallel dazu zeigt sich der synthetische Wachstumsdefekt der *sac1 slt2* Zellen nicht in osmotisch stabilisierendem Medium. Daraus läßt sich schließen, daß in *sac1Δ slt2Δ* Zellen die falsche Zusammensetzung der Zellwand, wahrscheinlich ausgelöst durch fehlende Regulation, der Grund für den Teilungsdefekt ist.

**Abbildung 28: (nächste Seite)** Das Chitin der *sac1Δ slt2Δ* Zellwand wurde untersucht. Die Zellen wurden mit CFW angefärbt und mit dem UV-Filter betrachtet. Die oberen Reihen sind Nomarski Aufnahmen, die unteren Reihen die dazugehörigen Fluoreszenzbilder, die die Chitinfärbung zeigen. (A) Wildtyp Kontrolle. Das Chitin ist als schmaler Ring zwischen Mutter- und Tochterzelle sichtbar. (B) *sac1Δ slt2Δ* Zellen, die in YPD hochgezogen wurden. Das Chitin ist als sehr breiter Ring zwischen Mutter- und Tochterzelle und teilweise auch in der Tochterzelle sichtbar. (C) *sac1Δ slt2Δ* Zellen, die in YPD mit 1 M Sorbitol hochgezogen wurden. Die Intensität der Chitinfärbung entspricht der Wildtyp Kontrolle, aber eine Delokalisation ist sichtbar.





**Abbildung 29:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Schnitten der Septa von Wildtyp (links oben), *sac1Δ* (rechts oben), *slt2Δ* (links unten) und *sac1Δ slt2Δ* (rechts unten) Zellen. In den Wildtyp, *sac1Δ* und *slt2Δ* Zellen ist das primäre Septum als helle Bande zwischen den dunklen sekundären Septa zu erkennen. Dagegen zeigt das Septum der *sac1Δ slt2Δ* Zellen eine stark veränderte Struktur.

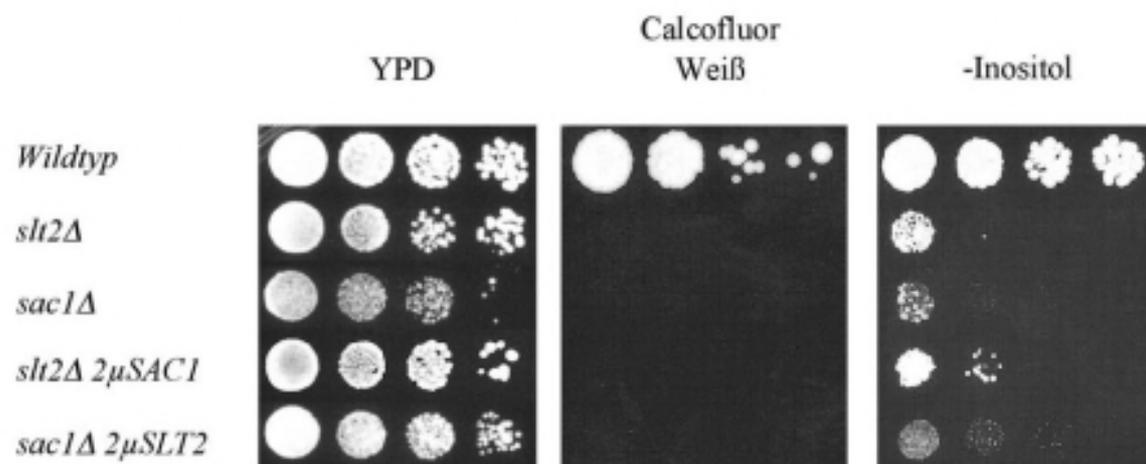
#### 4.4 EPISTATISCHE ANALYSE

Slt2p und Sac1p zeigen eine gemeinsame Funktion bei der Regulation des Zellwandaufbaus, speziell in der Koordination der Zellseparierung. Verschiedene Möglichkeiten bieten sich an, wie die beiden Proteine an dieser Regulation beteiligt sind.

Entweder sind beide Proteine im selben Signalweg oder parallel zueinander aktiv. Sind sie an der selben Signalkette beteiligt, so ist Sac1p entweder oberhalb oder unterhalb von Slt2p aktiv.

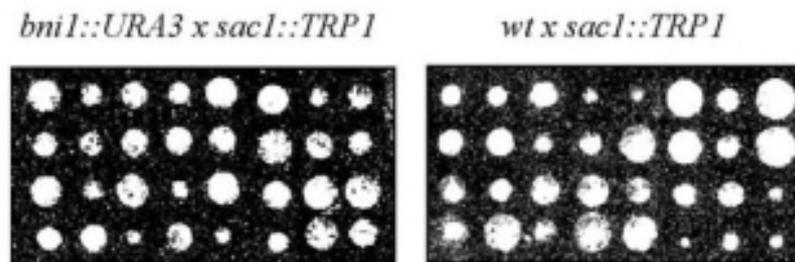
#### 4.4.1 *SAC1* und *SLT2* sind parallel zueinander aktiv

Um nun herauszufinden, ob die beiden Gene im gleichen Weg oder in verschiedenen Wegen parallel zueinander aktiv sind, wurde versucht, ob die Überexpression von *SAC1* in *slt2Δ* Zellen, bzw. *SLT2* in *sac1Δ* Zellen, den CFW sensitiven Phänotyp und die Inositolauxotrophie suppressieren kann. Wie schon in Kapitel 4.2.5.2 beschrieben, kann solch ein Experiment über das Verhältnis der beiden Gene zueinander Auskunft geben. Dazu wurden die jeweiligen Stämme auf YPD Platten mit und ohne CFW bzw. Inositol gestempelt. Wie in Abb. 30 zu sehen ist, findet in beiden Fällen keine Suppression statt. Zusammen mit dem synthetischen Wachstumsdefekt wurde daraus geschlossen, daß die Funktion beider Gene parallel zueinander sein muß.



**Abbildung 30:** Es wurde untersucht, ob Sac1p und Slt2p in der selben Signalkaskade aktiv sind. Die jeweiligen Stämme sind als Verdünnungsreihe auf je eine YPD, CFW und Inositol-freie Platte aufgetragen. Die Überexpression von *SAC1* im *slt2Δ* Stamm und die Überexpression von *SLT2* im *sac1Δ* Stamm zeigt keinen Effekt auf das fehlende Wachstum auf der CFW und Inositol-freien Platte. Daher üben Sac1p und Slt2p parallel zueinander ihre Funktion aus.

Parallel zu der Slf2p MAPK Kaskade werden noch weitere Proteine (Gls1p<sup>4</sup>, Bni1p<sup>5</sup> und Skn7p<sup>6</sup>) von Rho1p reguliert (Helliwell *et al.*, 1998). Die Doppeldeletionen von *SLT2* mit *GLS1* (Garrett-Engele *et al.*, 1995) oder *BNI1* (Fujiwara *et al.*, 1998) sind synthetisch letal. Um nun zu testen, ob *SAC1* ebenfalls parallel zu diesen Genen agiert, wurde die Doppeldeletion von *SAC1* und *BNI1* untersucht. Die Stämme ATY358 (*bni1::URA3*) und ATY6212 (*sac1::TRP1*) und als Kontrolle ATY355 (*wt*) und ATY6212 (*sac1::TRP1*) wurden gekreuzt und die resultierenden Diploiden sporuliert. Anschließend wurden 20 Tetraden der Doppelmutante und 13 Tetraden der Kontrolle dissektiert und die hochgewachsenen Sporen analysiert. In Abb. 31 sind die hochgewachsenen Sporen von je acht Tetraden zu sehen. Da alle vier Sporen lebensfähig sind, wurden synthetische Interaktionen zwischen *BNI1* und *SAC1* ausgeschlossen, das heißt *SAC1* agiert nicht direkt parallel zu *BNI1*.



**Abbildung 31:** Um zu Aufschluß zu erhalten, ob *SAC1*, wie *SLT2* und *BNI1* durch *PKC1* reguliert wird, wurde untersucht ob sich genetische Interaktionen von *SAC1* mit *BNI1* nachweisen lassen. Die Tetradenanalyse der aus der Kreuzung von *bni1::URA3* mit *sac1::TRP1* (links) resultierenden Sporen zeigt keinen Unterschied gegenüber der Kontrolle (rechts). Die Sporen einer Tetrade wurden untereinander abgelegt. Daher findet keine synthetische Interaktion zwischen *SAC1* und *BNI1* statt und *SAC1* ist vermutlich nicht direkt parallel zu *BNI1*.

<sup>4</sup> Komponente der Glucan Synthase

<sup>5</sup> Beteiligt an der Organisation des Aktin Cytoskeletts

<sup>6</sup> Transkriptionsfaktor

## 5 DISKUSSION

### 5.1 ATP-TRANSPORT UND TRANSLOKATION IN DAS ER

Die präsentierten Daten bestätigen, daß Sac1p direkt in den mikrosomalen ATP-Transport in Hefe involviert ist. *In vitro* war bereits gezeigt worden, daß in Mikrosomen aus *sac1* Deletionsmutanten die ATP-Transportrate drastisch reduziert ist (Mayinger *et al.*, 1995). Außerdem zeigten *sac1Δ* Stämme verlangsamte Sekretion (Kochendorfer *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von genetischen Interaktionen die biochemischen Daten *in vivo* bestätigt. Bei der posttranslationalen Translokation ist die Präsenz von ATP für die korrekte Funktion von Sec63p und Sec61p essentiell (Lyman and Schekman, 1997). Erwartungsgemäß konnten synthetisch letale Interaktionen zwischen *sac1Δ* und *sec61<sup>ts</sup>*, bzw. *sec63<sup>ts</sup>* gezeigt werden. Die Funktion von Sec62p ist nicht ATP-abhängig und sein Gen zeigt auch keine genetische Interaktion mit *SAC1*. Durch den Einsatz des *sac1-22* Allels konnte ausgeschlossen werden, daß die synthetische Letalität von *sac1Δ sec61<sup>ts</sup>* und *sac1Δ sec63<sup>ts</sup>* durch den Defekt im Lipidmetabolismus verursacht wird, da *sac1-22* Zellen zwar den Defekt im Phospholipid Metabolismus zeigen, aber wie Wildtyp ATP transportieren (Kearns *et al.*, 1997). Daraus wurde geschlossen, daß die synthetisch letalen Interaktionen auf einem Mangel an ATP im ER Lumen beruhen und damit *in vivo* die Proteintranslokation direkt von dem ATP-Transport in das ER abhängt. Die Ergebnisse entsprechen dem Modell der Proteintranslokation, wobei Sec61p und Sec63p Komponenten eines funktionellen Komplexes sind, für den ATP essentiell ist, um Vorläuferproteine durch die ER Membran zu translozieren. Die Rekrutierung der Vorläuferproteine an das ER Translokation durch Sec62p ist unabhängig von luminalem ATP (Lyman and Schekman, 1997).

Zusammengenommen deuten die biochemischen und genetischen Daten auf eine wichtige Funktion von Sac1p im mikrosomalen ATP-Transport und beweisen, daß diese Funktion sich von der Rolle im Golgi Phospholipid Metabolismus unterscheidet. Es gilt noch aufzuklären, wie Sac1p im ATP-Transport in das ER und im Golgi Phospholipid Metabolismus involviert ist. Dieses Ergebnisse könnten über eine mögliche Verbindung zwischen metabolischer Energieversorgung im ER und Golgi Funktion Aufschluß geben. Möglicherweise könnte Sac1p über Phosphoinositide in Kompartiment-spezifischen Signalwegen involviert sein, da Sac1p in ER und Golgi Membranen lokalisiert ist.

## 5.2 DER SYNTHETISCH LETALE SCREEN

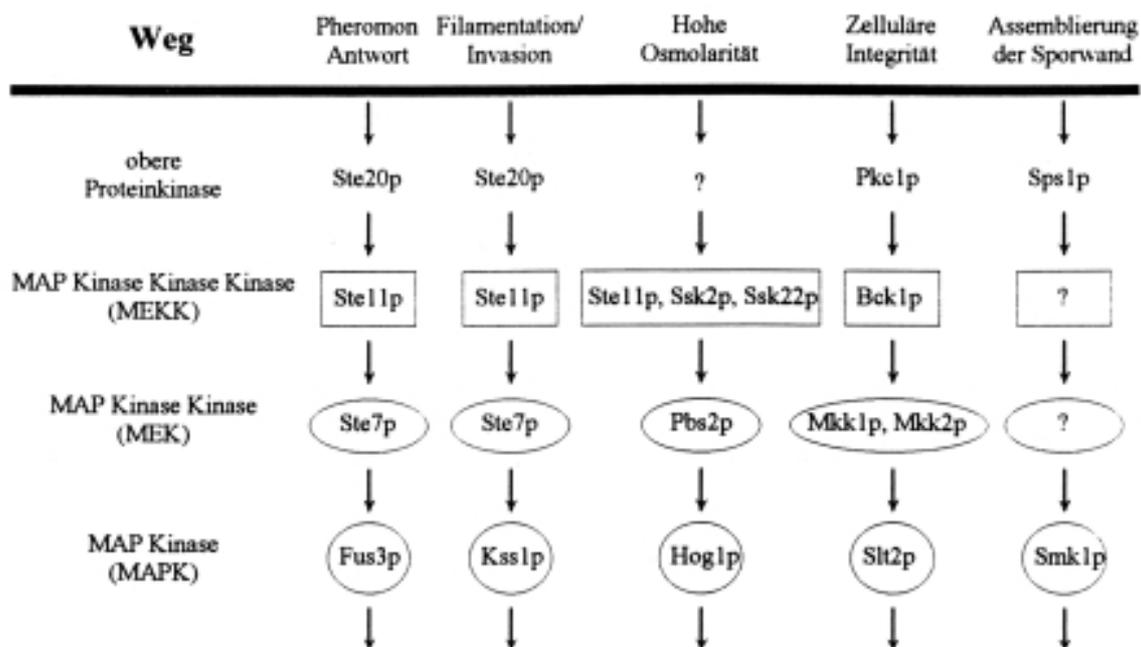
Ziel des synthetisch letalen Screens war es, Faktoren zu identifizieren, deren Funktion in *sac1Δ* Zellen essentiell ist. Da Sac1p an verschiedenen zellulären Funktionen beteiligt ist, wurde erwartet, daß die isolierten Gene an dem ATP-Transport in das ER, dem Phospholipid Metabolismus oder der Organisation des Aktin Cytoskeletts beteiligt sind.

Aus den ATP-Transport Daten läßt sich noch nicht schließen, ob der ATP-Transporter des ERs einer der Mutanten ist. Ist nur ein Protein dafür zuständig, so ist vermutlich eine Punktmutation im aktiven Zentrum letal, zeigt aber vielleicht an einer anderen Position im Protein nur einen milden Phänotyp, wie z. B. eine leicht reduzierte ATP-Transportrate. Besteht der ATP-Transporter aus einem Komplex von Proteinen, so könnte eine Mutation in einer Komponente ebenfalls nur zu einem leichten Phänotyp führen. Daher kommen vier Mutanten in die engere Auswahl zur weiteren Charakterisierung, bei denen die ATP-Transportrate verlangsamt ist und der synthetisch letale Phänotyp durch das *sac1-22* Allel supprimiert wird. Eine weitere Gruppe von Mutanten, bei denen das *sac1-22* Allel den synthetisch letalen Phänotyp komplementiert und die ATP-Transportrate dem Wildtyp entspricht, könnte Faktoren enthalten, die für ihre korrekte Funktion ATP benötigen. Dagegen deutet die Gruppe der Mutanten, die Wildtyp ATP-Transportrate zeigen und das *sac1-22* Allel nicht den synthetisch letalen Phänotyp komplementiert, auf Faktoren, die mit oder parallel zu *SAC1* an Signalübertragungen beteiligt sind.

Die isolierten Mutanten wurden auch auf einen Zellwanddefekt hin untersucht und konnten daraufhin in zwei Gruppen bezüglich der CFW Sensitivität eingeteilt werden. Auch in den *sac1* Mutanten wurde ein Zellwanddefekt nachgewiesen. Hier läßt sich argumentieren, daß eine spezielle Funktion von Sac1p, die nicht ausschließlich ATP-abhängig ist, an der Zellwandorganisation beteiligt ist. Interessant wäre es, zu untersuchen, ob Sekretionsmutanten einen Zellwanddefekt haben, da die Enzyme für die Biosynthese von Chitin sekretorische Proteine sind. Die CFW Sensitivität der einzelnen Mutanten könnte auf einem Defekt in der Sekretion der Chitin Synthese Enzyme beruhen. Ein Defekt im Transport zu den Chitosomen oder defekte Regulation der Expression oder des Abbaus sind ebenfalls nicht auszuschließen. Die Identifizierung der mutierten Gene wird darüber weiter Aufschluß geben.

Die große Anzahl der Komplementationsgruppen, nur zwei Gruppen weisen mehr als ein Allel auf, und die fehlende Isolierung der *SEC61* und *SEC63* Gene, deutet daraufhin, daß der Screen nicht gesättigt ist. Die Anzahl der synthetisch letalen Gene mit *SAC1* könnte sich also durch weitere Suchen noch erhöhen.

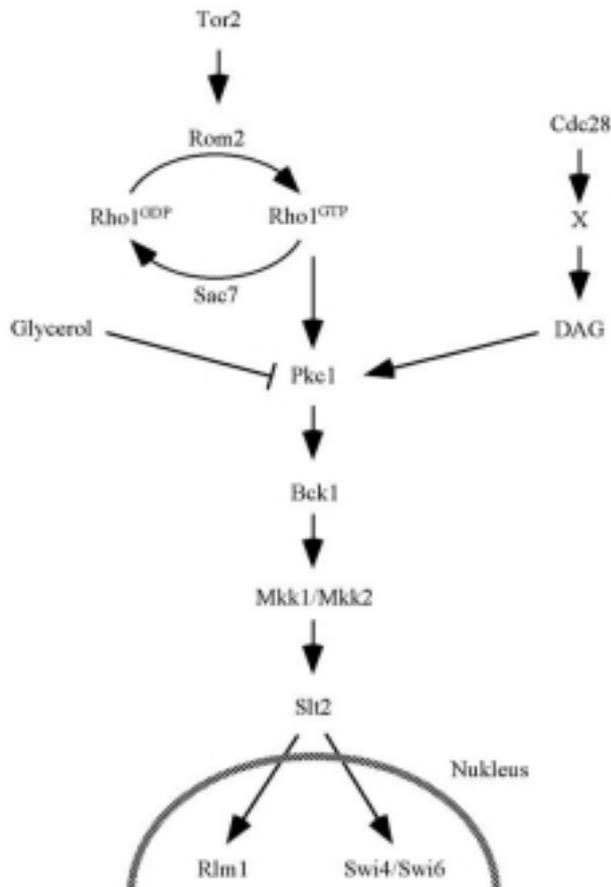
### 5.3 Die MAP Kinase Slt2p interagiert genetisch mit Sac1p



**Abbildung 32:** MAPK Kaskaden von *S. cerevisiae*. Es gibt vier MAPK Wege in vegetativ wachsenden Hefen und einen, den Sporulations Weg, der nur in sporulierender Hefe exprimiert wird. Die Fragezeichen indizieren, daß die Protein Kinase für diesen Schritt in der Kaskade noch nicht identifiziert wurde. Jede Kaskade hat eine einzige MAPK. Zusätzlich sind einige Protein Kinasen in mehr als einem Weg aktiv: Die MEK Ste7p (zwei Wege), die MEKK Ste11p (drei Wege) und die obere MAPK Kaskade aktivierende Kinase Ste20p (zwei Wege). Die Pfeile repräsentieren bekannte oder postulierte Schritte in der Signaltransduktion. Angepaßt aus (Gustin *et al.*, 1998).

In eukaryotischen Zellen nehmen die mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) Kaskaden eine Schlüsselfunktion im Weiterleiten von Signalen von der Zelloberfläche zum Kern ein (MAPKKK (MAPK Kinase Kinase, MEKK), MAPKK (MAPK Kinase, MEK), MAPK). Das Signal, das zur Aktivierung der MAPK Kaskade führt, wird durch eine Vielzahl von Rezeptoren wahrgenommen: G-Protein-gekoppelte 7-Trans-Membran (TM) Rezeptoren, His-Asp-Phosphorelay Sensoren, Rezeptor-Tyrosin Kinasen und Integrale Membran Proteine. Das Ziel der Aktivierung der MAPK Kaskade ist meist ein Transkriptionsfaktor, wobei auch andere Ziele modifiziert werden können. Die spezifische Regulation der hochkonservierten MAPK wird durch den Einsatz von „Gerüst-“ oder Ankerproteinen erreicht, die die MAPK Module organisieren. Durch die Bindung dieser Proteine an ihre Substrate werden die jeweiligen Wege aktiviert oder inaktiviert, und die Spezifität des Signals wird dadurch sichergestellt (Whitmarsh and Davis, 1998). Bis jetzt wurden fünf MAP Kinase Wege (Abb. 32) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert, die die Paarung (Fus3p) (Farley *et al.*,

1999), die Antwort auf hohe Osmolarität im Medium (Hog1p) (O'Rourke and Herskowitz, 1998), das invasive Wachstum diploider Zellen (Kss1p) (Cherkasova *et al.*, 1999), die Sporulation diploider Zellen (Smk1p) (Ufano *et al.*, 1999) und die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität bei Stress und niedriger Osmolarität (Slp2p) (Heinisch *et al.*, 1999) regulieren (Gustin *et al.*, 1998).



**Abbildung 33:** Schematische Darstellung der Hauptkomponenten des Hefe Pkc1p-Weges. Komponente „X“ zeigt, daß die Verbindung zwischen Zellzyklus Regulation und DAG Konzentration noch aufgeklärt werden muß. Der zentrale Komplex der MAPK Kaskade enthält zum einen dimeres Bck1p und zum anderen beide Proteine, Mkk1p und Mkk2p. Dieses Modell basiert alleine auf „two-hybrid“ Daten. Im aktivierten Status wird der Komplex wahrscheinlich durch die Interaktion mit Rho1p an die Membran rekrutiert. Angepaßt aus (Heinisch *et al.*, 1999) und (Helliwell *et al.*, 1998).

Die MAPK Slt2p wird spezifisch in den Phasen stark polarisierten Zellwachstums während des Zellzyklus bei der Bildung einer Tochterzelle (Martin *et al.*, 1993), oder durch Pheromon induzierte Formation einer Projektion (Buehrer and Errede, 1997), auch Shmoo genannt, aktiviert. Zusätzlich wird Slt2p durch Hitze und hypo-osmotische Konditionen phosphoryliert und damit aktiviert (Zarsov *et al.*, 1996). Die Slt2p MAPK Kaskade wird von der Protein Kinase C (Pkc1p) aktiviert (Heinisch *et al.*, 1999). Pkc1p (Abb. 33) wird durch das kleine GTP-bindende Protein Rho1p kontrolliert, das ebenfalls die Glucan Synthase, Gls1p und Gls2p, die an der Synthese eines Hauptbestandteils der Hefezellwand beteiligt ist und auch Bni1p<sup>7</sup>, das an der Organisation des Aktin Cytoskeletts beteiligt ist, und Skn7p<sup>8</sup>, ein

<sup>7</sup> Hefedatenbank: <http://quest7.proteom.com/YPD/BNI1.html>

nicht weiter charakterisierter Transkriptionsfaktor, reguliert (Helliwell *et al.*, 1998). Es wird vermutet, daß Pkc1p noch weitere Proteine aktiviert, die parallel zu der Slt2p-Kaskade aktiv sind (Gray *et al.*, 1997).

Die in dieser Arbeit mit dem EMS eingeführte chromosomale Mutation an Position 457 der codierenden Region von *SLT2* führt zu einem Austausch von Asparaginsäure (Asp) zu Asparagin (Asn) in Slt2p und zu einem Verlust der Aktivität des Proteins. Diese Asp liegt in einer in allen Proteinkinasen hochkonservierten Domäne und ist die essentielle katalytische Base der Phosphat-Transfer-Reaktion (Taylor *et al.*, 1993). Die katalytische Domäne ist 250 – 300 Aminosäuren lang und katalysiert den Transfer zweier Gamma Phosphate von ATP auf zwei Hydroxygruppe eines Serins und Threonins oder Threonins und Tyrosins (jeweils durch eine Aminosäure getrennt). Außerdem enthält die katalytische Domäne aller Kinasen 12 invariante oder hochkonservierte Aminosäuren, die kritisch für die Aktivität der jeweiligen Kinase sind (Banuett, 1998). Damit ist der Verlust des aktiven Zentrums der Grund für den offensichtlichen Nullphänotyp des *slt2-153N* Allels.

Die Basis für die synthetisch letalen Interaktionen zwischen *sac1* und *slt2* ist eine gemeinsame Funktion der beiden Proteine in der Organisation der Zellwand. Durch die fehlende Komplementation des *sac1-22* Allels konnte ausgeschlossen werden, daß ein Defekt im ATP-Transport für den synthetisch letalen Phänotyp verantwortlich ist. Die leicht erniedrigte ATP-Transportrate der *slt2* Mutanten könnte ein direkter oder indirekter Effekt sein. Da Slt2p Transkriptionsfaktoren reguliert, könnte z. B. ein bis jetzt noch nicht identifizierter Transkriptionsfaktor am ATP-Transport oder dessen Regulation beteiligt sein.

Ebenfalls ausgeschlossen wurde eine überlappende Funktion von Sac1p und Slt2p im Phosphoinositid Metabolismus. Die Inositolauxotrophie der *slt2* Mutanten sprach zwar für diese Hypothese, aber die Analyse der relativen Mengen an Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PI4P) zeigte in den *slt2* Mutanten, im Gegensatz zu den *sac1* Mutanten, keine Erhöhung. Dies bedeutet, daß Slt2p nicht an der selben Phosphoinositid Signalübertragung beteiligt ist, wie Sac1p.

Die Untersuchungen der Zellwand zeigten, daß Sac1p und Slt2p in der Zellwandorganisation involviert sind, und daß ein Zellwanddefekt den synthetisch letalen Phänotyp von *sac1 slt2* Zellen verursacht. Für *slt2* Mutanten, als auch *sac1* Mutanten (*sac1Δ* und *sac1-22*), konnte CFW Sensitivität nachgewiesen werden, die spezifisch auf einen Zellwanddefekt deutet (Madden *et al.*, 1997), (Igual *et al.*, 1996), (Ram *et al.*, 1994). Die Suppression des synthetischen Wachstumsdefekts der *sac1 slt2* Zellen durch osmotische

---

<sup>8</sup> Hefedatenbank: <http://quest7.proteom.com/YPD/SKN7.html>

Stabilisierung lieferte den entscheidenden Hinweis, daß ein Zellwanddefekt für den letalen Phänotyp verantwortlich ist. Durch die licht- und elektronenmikroskopischen Analysen wurde diese These bekräftigt.

Die Kernteilung und die Cytokinese in den *sac1 slt2* Zellen zeigen keinen Phänotyp. Da aber die Zellen kurz vor der Teilung arretieren, scheint die Koordination der Zellseparierung defekt zu sein. Chitin ist erst als Ring um den Hals der entstehenden Tochterzelle zu sehen und wird anschließend für die Bildung des primären Septums bei der Cytokinese eingebaut (Cid *et al.*, 1995). In dem Septum der *sac1 slt2* Zellen ist das Chitin, wenn sie in YPD kultiviert wurden, stark angereichert, und der Aufbau des Septums ist im Vergleich zum Wildtyp gestört. Bei osmotischer Stabilisierung wird dieser Phänotyp supprimiert, aber das Chitin ist, wie in *slt2* Mutanten, delokalisiert (Mazzoni *et al.*, 1993). Aus diesen Daten ist nicht ersichtlich, wodurch die Akkumulation von Chitin ausgelöst wird und wie das Medium die Zellseparierung beeinflussen kann.

In Hefe existieren drei Chitin Synthase Komplexe (CSI, CSII und CSIII). Chs1p (CSI) ist verantwortlich für die Reparatur der Zellwand nach der Separation der Tochter- von der Mutterzelle. Das Primäre Septum wird durch Chs2p (CSII) gebildet, und Chs3p, als katalytische Komponente des CSIII, bildet den Ring, durch den die neue Knospe entsteht. Ein allgemeiner Regulationsmechanismus der Chitin Biosynthese ist die Lagerung der Enzyme in einer intrazellulären Membranfraktion, den Chitosomen. Chs1p und Chs3p werden von der Plasmamembran zu den Chitosomen und zurück transportiert, während Chs2p weiter zu der Vakuole transportiert und abgebaut wird (Chuang and Schekman, 1996), (Cid *et al.*, 1995). Die Regulation der Expression von *CHS3* und weiteren an der Zellwandbiosynthese beteiligten Genen hängt von Slt2p ab, das für die zelluläre Integrität verantwortlich ist (Heinisch *et al.*, 1999). Die in *slt2* Mutanten angereicherten sekretorische Vesikel (Mazzoni *et al.*, 1993) könnten Proteine enthalten, die für die Zellwand bestimmt sind, was den Zellwanddefekt erklären würde. Außerdem könnte Slt2p nicht nur an der Expression von Zellwandproteinen, sondern auch an deren korrekter Lokalisation beteiligt sein, ähnlich wie die MAP Kinase Hog1p für die korrekte Lokalisation von Mnn1p<sup>9</sup> im Golgi benötigt wird (Reynolds *et al.*, 1998). Es ist daher wahrscheinlich, daß in den *sac1 slt2* Zellen die fehlende Koordination der Phosphoinositidsignale zu fehlerhafter Regulation und Lokalisation der biosynthetischen Enzyme der Zellwand führt, was der Grund für die Anreicherung an Chitin ist.

---

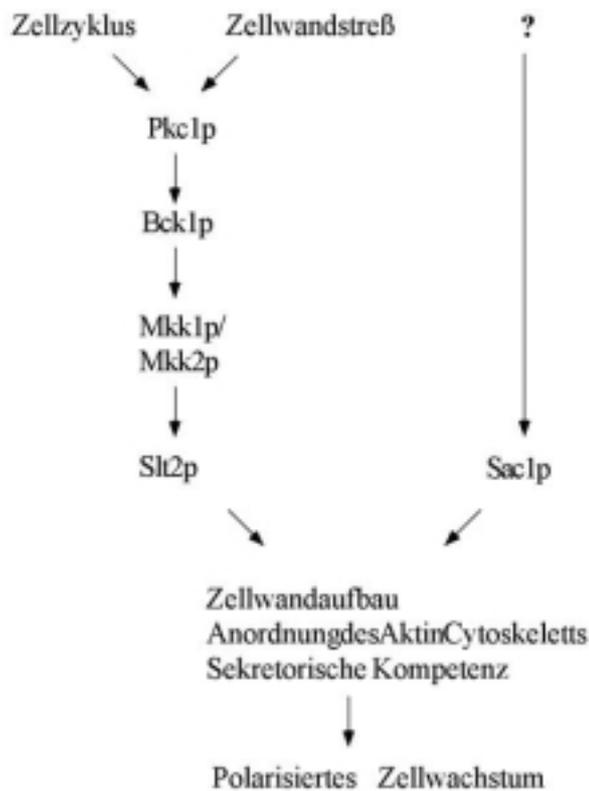
<sup>9</sup> Alpha-1,3-Mannosyltransferase

## 5.4 DER Sac1p SIGNALWEG IST PARALLEL ZU DER Slt2p MAPK KASKADE

Sac1p agiert parallel zu der Pkc1p abhängigen Slt2p MAPK Kaskade (Abb. 34). Daß Sac1p und Slt2p im selben Weg aktiv sind, wurde durch die Überexpression von *SAC1* in *slt2Δ* Zellen, bzw. *SLT2* in *sac1Δ* Zellen ausgeschlossen. Als weitere Möglichkeit wurde in Betracht gezogen, daß Sac1p von Pkc1p reguliert wird und damit ein noch fehlendes Glied in der Kette gefunden wurde. Mehrere Gründe sprechen gegen diese Hypothese. Der Phänotyp der Deletion von *PKC1* ist stärker, als der der *sac1Δ slt2Δ* Zellen. Ohne osmotische Stabilisierung arretieren die *pkc1* Nullmutanten als Zellen mit kleiner Knospe und lysieren (Levin and Bartlett-Heubusch, 1992), während die *sac1Δ slt2Δ* Zellen kurz vor der Zellteilung arretieren und nach Zugabe von Sorbitol zum Medium wieder wachsen können. Die *pkc1Δ* Zellen zeigen einen Zellzyklus spezifischen Arrest, während die *sac1 slt2* Zellen einen Zellwand spezifischen Defekt bei der Trennung der Tochter- von der Mutterzelle nach vollendeter Cytokinese zeigen. Pkc1p wird parallel zu Bni1p<sup>10</sup>, das an der Organisation des Cytoskeletts beteiligt ist, von Rho1p aktiviert, aber die Doppeldeletion von *sac1* und *bni1* zeigte keinen synthetisch letalen Phänotyp. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, daß Sac1p in einem noch unbekanntem Weg aktiv ist, der mit dem Pkc1p Weg verbunden und parallel dazu, aber nicht parallel zu Bni1p ist.

---

<sup>10</sup> Hefedatenbank: <http://quest7.proteom.com/YPD/BNI1.html>



**Abbildung 34:** Sac1p agiert parallel zu dem Pkc1p Weg. Es ist noch nicht bekannt, wie Sac1p aktiviert wird und an welche Faktoren Sac1p die Signale weiterleitet.

Eine Parallele zwischen der Regulation von Pkc1p und Sac1p könnte die Aktivierung und/oder Phosphorylierung durch Cdc28p, das Hefehomolog des Säugetier Cdc2p, sein. Die Sequenz von Sac1p enthält zwei potentielle Motive<sup>11</sup> (Ser<sub>514</sub> und Ser<sub>611</sub>), die allerdings stark von der Consensussequenz abweichen. Cdc28p ist die essentielle und zentrale Komponente eines komplexen Mechanismus zur Regulation der einzelnen Schritte im Zellzyklus (Mendenhall and Hodge, 1998). Eine Phosphorylierung von Sac1p durch Cdc28p ist daher nicht auszuschließen.

Beide Proteine, Sac1p und Slf2p, sind am polarisierten Zellwachstum beteiligt. Die in dieser Arbeit dargestellten Daten lassen den Schluß zu, daß Sac1p und Slf2p in verschiedene Aspekte des polarisierten Zellwachstums involviert sind und eine gemeinsame Funktion in der Koordination desselben haben. Grundlage für diese Hypothese sind die beschriebenen gemeinsamen Phänotypen der *sac1* und *slt2* Mutanten in der Organisation des Aktin Cytoskeletts, der Lokalisation des Chitins, der reduzierten ATP-Transportrate und die Ansammlung von Vesikeln im Cytosol der *slt2* Mutanten. Außerdem sprechen die Phänotypen der *sac1 slt2* Mutanten für diese Annahme. Diese gemeinsame Funktion von Sac1p und Slf2p ist nicht ATP-abhängig.

<sup>11</sup>Datenbank: [http://genome-www.stanford.edu/cgi-bin/dbrun/SacchDB?find+Protein\\_Info+%22SAC1%22](http://genome-www.stanford.edu/cgi-bin/dbrun/SacchDB?find+Protein_Info+%22SAC1%22)

## 6 LITERATUR

Adams, A., Gottschling, D. and Stearns, T. (1997) In *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, .

Ausubel, F.M.R.B., Robert E. Kingston, David D. Moore, J. G. Seidman, John A. Smith and Kevin Struhl (1993) Green Publishing Associates and Wiley-Interscience.

Banuet, F. (1998) Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 249-74.

Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F. and Cullin, C. (1993) A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **21**, 3329-30.

Bender, A. and Pringle, J.R. (1991) Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressor mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **11**, 1295-305.

Bossemeyer, D., Engh, R.A., Kinzel, V., Ponstingl, H. and Huber, R. (1993) Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP- dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å structure of the complex with Mn<sup>2+</sup> adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI(5-24). *Embo J*, **12**, 849-59.

Buehrer, B.M. and Errede, B. (1997) Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **17**, 6517-25.

Carman, G.M. and Zeimet, G.M. (1996) Regulation of phospholipid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **271**, 13293-6.

Cherkasova, V., Lyons, D.M. and Elion, E.A. (1999) Fus3p and Kss1p control G1 arrest in *Saccharomyces cerevisiae* through a balance of distinct arrest and proliferative functions that operate in parallel with Far1p. *Genetics*, **151**, 989-1004.

Chuang, J.S. and Schekman, R.W. (1996) Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p [published erratum appears in *J Cell Biol* 1996 Dec;135(6 Pt 2):1925]. *J Cell Biol*, **135**, 597-610.

- Cid, V.J., Duran, A., del Rey, F., Snyder, M.P., Nombela, C. and Sanchez, M. (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*, **59**, 345-86.
- Cleves, A.E., Novick, P.J. and Bankaitis, V.A. (1989) Mutations in the SAC1 gene suppress defects in yeast Golgi and yeast actin function. *J. Cell Biol.*, **109**, 2939-2950.
- Costigan, C., Gehrung, S. and Snyder, M. (1992) A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Mol Cell Biol*, **12**, 1162-78.
- De Camilli, P., Emr, S.D., McPherson, P.S. and Novick, P. (1996) Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science*, **271**, 1533-9.
- Doye, V. and Hurt, E.C. (1995) Genetic approaches to nuclear pore structure and function [published erratum appears in Trends Genet 1995 Jul;11(7):293]. *Trends Genet*, **11**, 235-41.
- Farley, F.W., Satterberg, B., Goldsmith, E.J. and Elion, E.A. (1999) Relative dependence of different outputs of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway on the MAP kinase Fus3p. *Genetics*, **151**, 1425-44.
- Fruman, D.A., Rameh, L.E. and Cantley, L.C. (1999) Phosphoinositide binding domains: embracing 3-phosphate. *Cell*, **97**, 817-20.
- Fujiwara, T., Tanaka, K., Mino, A., Kikyo, M., Takahashi, K., Shimizu, K. and Takai, Y. (1998) Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, **9**, 1221-33.
- Garrett-Engle, P., Moilanen, B. and Cyert, M.S. (1995) Calcineurin, the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H(+)-ATPase. *Mol Cell Biol*, **15**, 4103-14.
- Gietz, R.D. and Sugino, A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**, 527-34.
- Gray, J.V., Ogas, J.P., Kamada, Y., Stone, M., Levin, D.E. and Herskowitz, I. (1997) A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *Embo J*, **16**, 4924-37.

- Guo, S., Stolz, L.E., Lemrow, S.M. and York, J.D. (1999) SAC1-like domains of yeast SAC1, INP52, and INP53 and of human synaptojanin encode polyphosphoinositide phosphatases. *J Biol Chem*, **274**, 12990-5.
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M. and Davenport, K. (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 1264-300.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. and Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241**, 42-52.
- Heinisch, J.J., Lorberg, A., Schmitz, H.P. and Jacoby, J.J. (1999) The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, **32**, 671-80.
- Helliwell, S.B., Schmidt, A., Ohya, Y. and Hall, M.N. (1998) The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Curr Biol*, **8**, 1211-4.
- Hoffman, C.S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**, 267-72.
- Holtzman, D.A., Yang, S. and Drubin, D.G. (1993) Synthetic-lethal interactions identify two novel genes, SLA1 and SLA2, that control membrane cytoskeleton assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **122**, 635-44.
- Hong, E., Davidson, A.R. and Kaiser, C.A. (1996) A pathway for targeting soluble misfolded proteins to the yeast vacuole. *J Cell Biol*, **135**, 623-33.
- Hovland, P., Flick, J., Johnston, M. and Sclafani, R.A. (1989) Galactose as gratuitous inducer of *GAL* gene expression in yeasts growing on glucose. *Gene*, **83**, 57-64.
- Igual, J.C., Johnson, A.L. and Johnston, L.H. (1996) Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *Embo J*, **15**, 5001-13.
- Kamada, Y., Jung, U.S., Piotrowski, J. and Levin, D.E. (1995) The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev*, **9**, 1559-71.
- Kearns, B.G., Alb, J.G., Jr. and Bankaitis, V. (1998) Phosphatidylinositol transfer proteins: the long and winding road to physiological function. *Trends Cell Biol*, **8**, 276-82.

Kearns, B.G., McGee, T.P., Mayinger, P., Gedvilaite, A., Phillips, S.E., Kagiwada, S. and Bankaitis, V.A. (1997) Essential role for diacylglycerol in protein-transport from the yeast Golgi complex. *Nature*, **387**, 101-105.

Klig, L.S., Homann, M.J., Carman, G.M. and Henry, S.A. (1985) Coordinate regulation of phospholipid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: pleiotropically constitutive *opi1* mutant. *J Bacteriol*, **162**, 1135-41.

Kochendorfer, K.U., Then, A.R., Kearns, B.G., Bankaitis, V.A. and Mayinger, P. (1999) *Sac1p* plays a crucial role in microsomal ATP transport, which is distinct from its function in Golgi phospholipid metabolism. *Embo J*, **18**, 1506-15.

Kramer, R. and Klingenberg, M. (1977) Reconstitution of adenine nucleotide transport with purified ADP, ATP- carrier protein. *FEBS Lett*, **82**, 363-7.

Leevers, S.J., Vanhaesebroeck, B. and Waterfield, M.D. (1999) Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 219-25.

Levin, D.E. and Bartlett-Heubusch, E. (1992) Mutants in the *S. cerevisiae* PKC1 gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J Cell Biol*, **116**, 1221-9.

Lorenz, M.C., Muir, R.S., Lim, E., McElver, J., Weber, S.C. and Heitman, J. (1995) Gene disruption with PCR products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **158**, 113-7.

Lyman, S.K. and Schekman, R. (1995) Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **131**, 1163-71.

Lyman, S.K. and Schekman, R. (1997) Binding of secretory precursor polypeptides to a translocon subcomplex regulated by BiP. *Cell*, **88**, 85-96.

Ma, H., Kunes, S., Schatz, P.J. and Botstein, D. (1987) Plasmid construction by homologous recombination in yeast. *Gene*, **58**, 201-16.

Madden, K., Sheu, Y.J., Baetz, K., Andrews, B. and Snyder, M. (1997) SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science*, **275**, 1781-4.

Majerus, P.W. (1996) Inositols do it all. *Genes Dev*, **10**, 1051-3.

Martin, H., Arroyo, J., Sanchez, M., Molina, M. and Nombela, C. (1993) Activity of the yeast MAP kinase homologue Slt2 is critically required for cell integrity at 37 degrees C. *Mol Gen Genet*, **241**, 177-84.

Martin, T.F. (1998) Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 231-64.

Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S.Y., Hamamoto, S., Schekman, R. and Yeung, T. (1998) COPII-Coated Vesicle Formation Reconstituted with Purified Coat Proteins and Chemically Defined Liposomes. *Cell*, **93**, 263-275.

Mayinger, P., Bankaitis, V.A. and Meyer, D.I. (1995) Sac1p mediates the adenosine-triphosphate transport into yeast endoplasmic-reticulum that is required for protein translocation. *J. Cell Biol.*, **131**, 1377-1386.

Mazzoni, C., Zarov, P., Rambourg, A. and Mann, C. (1993) The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **123**, 1821-33.

McPherson, P.S., Garcia, E.P., Slepnev, V.I., David, C., Zhang, X., Grabs, D., Sossin, W.S., Bauerfeind, R., Nemoto, Y. and De-Camilli, P. (1996) A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature*, **379**, 353-357.

Mendenhall, M.D. and Hodge, A.E. (1998) Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 1191-243.

Newman, A.P., Shim, J. and Ferro-Novick, S. (1990) BET1, BOS1, and SEC22 are members of a group of interacting yeast genes required for transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 3405 - 3414.

Nothwehr, S.F., Conibear, E. and Stevens, T.H. (1995) Golgi and vacuolar membrane proteins reach the vacuole in vps1 mutant yeast cells via the plasma membrane. *J. Cell Biol.*, **129**, 35-46.

Novick, P., Field, C. and Schekman, R. (1980) Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, **21**, 205-15.

Novick, P., Osmond, B.C. and Botstein, D. (1989) Suppressors of yeast actin mutations. *Genetics*, **121**, 659-674.

O'Rourke, S.M. and Herskowitz, I. (1998) The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, **12**, 2874-86.

Phillips, S.E., Sha, B., Topalof, L., Xie, Z., Alb, J.G., Klenchin, V.A., Swigart, P., Cockcroft, S., Martin, T.F., Luo, M. and Bankaitis, V.A. (1999) Yeast Sec14p deficient in phosphatidylinositol transfer activity is functional in vivo. *Mol Cell*, **4**, 187-97.

Ram, A.F., Wolters, A., Ten Hoopen, R. and Klis, F.M. (1994) A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast*, **10**, 1019-30.

Reynolds, T.B., Hopkins, B.D., Lyons, M.R. and Graham, T.R. (1998) The high osmolarity glycerol response (HOG) MAP kinase pathway controls localization of a yeast golgi glycosyltransferase. *J Cell Biol*, **143**, 935-46.

Rivas, M.P., Kearns, B.G., Xie, Z., Guo, S., Sekar, M.C., Hosaka, K., Kagiwada, S., York, J.D. and Bankaitis, V.A. (1999) Pleiotropic Alterations in Lipid Metabolism in Yeast *sac1* Mutants: Relationship to "Bypass Sec14p" and Inositol Auxotrophy. *Mol Biol Cell*, **10**, 2235-2250.

Roberts, C.J., Pohlig, G., Rothman, J.H. and Stevens, T.H. (1989) Structure, biosynthesis, and localization of dipeptidyl aminopeptidase B, an integral membrane glycoprotein of the yeast vacuole. *J Cell Biol*, **108**, 1363-73.

Rose, M.D., Novick, P., Thomas, J.H., Botstein, D. and Fink, G.R. (1987) A *Saccharomyces cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere- containing shuttle vector. *Gene*, **60**, 237-43.

Russell, D.W., Jensen, R., Zoller, M.J., Burke, J., Errede, B., Smith, M. and Herskowitz, I. (1986) Structure of the *Saccharomyces cerevisiae* HO gene and analysis of its upstream regulatory region. *Mol Cell Biol*, **6**, 4281-94.

Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T. (1989) In Nolan, C. (eds.), *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, , Vol. 1-3.

Schneider, B.L., Seufert, W., Steiner, B., Yang, Q.H. and Futcher, A.B. (1995) Use of polymerase chain reaction epitope tagging for protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **11**, 1265-74.

Schneider, B.L., Steiner, B., Seufert, W. and Futcher, A.B. (1996) pMPY-ZAP: a reusable polymerase chain reaction-directed gene disruption cassette for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **12**, 129-34.

Shaw, J.A., Mol, P.C., Bowers, B., Silverman, S.J., Valdivieso, M.H., Duran, A. and Cabib, E. (1991) The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol*, **114**, 111-23.

Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.

Stock, S.D., Hama, H., DeWald, D.B. and Takemoto, J.Y. (1999) SEC14-dependent secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. Nondependence on sphingolipid synthesis-coupled diacylglycerol production. *J Biol Chem*, **274**, 12979-83.

Taylor, S.S., Knighton, D.R., Zheng, J., Sowadski, J.M., Gibbs, C.S. and Zoller, M.J. (1993) A template for the protein kinase family. *Trends Biochem Sci*, **18**, 84-9.

te, H.S. and Aebi, M. (1994) The genetic interaction of *kar2* and *wbp1* mutations. Distinct functions of binding protein BiP and N-linked glycosylation in the processing pathway of secreted proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, **222**, 631-7.

Ufano, S., San-Segundo, P., del Rey, F. and Vazquez de Aldana, C.R. (1999) SWM1, a developmentally regulated gene, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 2118-29.

Wang, T. and Bretscher, A. (1995) The rho-GAP encoded by BEM2 regulates cytoskeletal structure in budding yeast. *Mol Biol Cell*, **6**, 1011-24.

Watanabe, Y., Irie, K. and Matsumoto, K. (1995) Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slk2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol*, **15**, 5740-9.

Whitmarsh, A.J. and Davis, R.J. (1998) Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem Sci*, **23**, 481-5.

Whitters, E.A., Cleves, A.E., McGee, T.P., Skinner, H.B. and Bankaitis, V.A. (1993) SAC1p is an integral membrane protein that influences the cellular requirement for phospholipid transfer protein function and inositol in yeast. *J. Cell Biol.*, **122**, 79-94.

Wurmser, A.E., Gary, J.D. and Emr, S.D. (1999) Phosphoinositide 3-kinases and their FYVE domain-containing effectors as regulators of vacuolar/lysosomal membrane trafficking pathways. *J Biol Chem*, **274**, 9129-32.

Zaret, K.S. and Sherman, F. (1985) alpha-Aminoadipate as a primary nitrogen source for *Saccharomyces cerevisiae* mutants. *J Bacteriol*, **162**, 579-83.

Zarzov, P., Mazzone, C. and Mann, C. (1996) The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *Embo J*, **15**, 83-91.

# DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dobberstein möchte ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Peter Mayinger, der mich während meiner Doktorarbeit betreute und immer mit Rat zur Seite stand.

Ferner gilt mein besonderer Dank Yves Cully für die Unterstützung bei den Abbildungen.

Nicht unerwähnt bleiben sollen die anderen Mitarbeiter und vor allem ehemalige Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, bei denen ich mich für ihre stete Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima bedanken möchte.

Meinen Eltern für Ihre jahrelange Unterstützung.