

Aus dem Bereich: medizinische Biochemie und Molekularbiologie
Theoretische Medizin und Biowissenschaften der medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Funktionelle Charakterisierung des TRP-homologen Ionenkanals Yvc1 in *Saccharomyces cerevisiae*

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von: Julia Gartmann

geb. am: 15.01.1987 in Zelinograd/Kasachstan

In Liebe meiner Familie

Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent	ml	Milliliter
% (w/v)	Gewichtsprozent	mm	Millimeter
°C	Grad Celsius	MOPS	3-Morpholinopropan-1-sulfonsäure
µg	Mikrogramm	MW	Molekulargewicht
µl	Mikroliter	NEM	<i>N</i> -Ethylmaleinimid
µM	mikromolar	ng	Nanogramm
µm	Mikrometer	nM	nanomolar
ADP	Adenosindiphosphat	nm	Nanometer
AK	Antikörper	OD	optische Dichte
AS	Aminosäure	ORF	offener Leserahmen
ATP	Adenosintriphosphat	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
bp	Basenpaar	PCR	Polymerasekettenreaktion
BSA	Rinderserumalbumin	PEG	Polyethylenglykol
CBP	Calmodulin bindendes Peptid	PLAC	Protease-Inhibitor-Mix
CiP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>	PML	progressive multifokale Leukenzephalopathie
Co-IP	Co-Immunpräzipitation	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
DDM	n-Dodecyl β-D-Maltosid	POD	Peroxidase
dest	destilliert	PPI	Protein-Protein-Interaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure	pS	Pikosiemens
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	PTM	posttranslationale Modifikation
DTT	Dithiothreitol	PVDF	Polyvinylidendifluorid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	RLU	relative Lumineszenzeinheit
ECL	Elektrochemilumineszenz	RNA	Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RT	Raumtemperatur
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum	SD	synthetisch definiert
<i>et al</i>	<i>et altera</i>	SDS	Natriumdodecylsulfat
g	Gramm	Sek	Sekunde
<i>g</i>	Erdbeschleunigung	SGD	<i>Saccharomyces genome database</i>
GABA	γ-Aminobuttersäure	SIM	SUMO interagierendes Motiv
GFP	grün fluoreszierendes Protein	SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
Glc	Glukose	TAP	Tandemaffinitätsreinigung
GSH	Glutathion	TB	<i>terrific broth</i>
GST	Glutathion-S-Transferase	TCA	Trichloressigsäure
GTP	Guanosintriphosphat	TEV	<i>tobacco etch virus</i>
h	Stunde	TM	Transmembrandomäne
HOG	<i>high osmolarity glycerol</i>	TRP	<i>transient receptor potential</i>
IgG	Immunglobulin G	ün	Über Nacht
kb	Kilobase	UpM	Umdrehungen pro Minute
kDa	Kilodalton	UV	Ultraviolett
l	Liter	V	Volt
mg	Milligramm	WT	Wildtyp
min	Minute	YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>
mM	millimolar		

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	3
2.1.	Die Calcium-Homöostase in eukaryotischen Zellen	3
2.1.1.	Bedeutung und Funktion von Calcium	3
2.1.2.	Calcium-Homöostase in <i>S. cerevisiae</i>	3
2.2.	Die Proteinfamilie der TRP-Ionenkanäle	5
2.2.1.	Geschichte und Klassifizierung der TRP-Kanäle.....	5
2.2.2.	Mit TRP-Kanälen assoziierte Erkrankungen.....	7
2.3.	Der TRP-homologe Kanal Yvc1 in <i>S. cerevisiae</i>	8
2.3.1.	Lokalisation und Struktur von Yvc1	8
2.3.2.	Regulation und Funktionen von Yvc1	10
2.4.	Posttranslationale Modifikation von Proteinen	14
2.4.1.	Posttranslationale Modifikation durch SUMO (<i>small ubiquitin-like modifier</i>)	15
2.4.2.	SUMOylierung in <i>S. cerevisiae</i>	18
2.5.	Die Bedeutung von Protein-Protein-Interaktionen	20
2.6.	Zielsetzung dieser Arbeit	21
3.	Material und Methoden	22
3.1.	Material	22
3.1.1.	Geräte	22
3.1.2.	Verbrauchsmaterialien	23
3.1.3.	Enzyme	24
3.1.4.	Chemikalien und Biochemikalien	24
3.1.5.	Kits	25
3.1.6.	Software	25
3.2.	Medien	26
3.2.1.	Medien zur Kultivierung von <i>E. coli</i> und Antibiotika	26
3.2.2.	Medien zur Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	27
3.3.	Organismen	29

3.4.	Antikörper	30
3.5.	Plasmide	31
3.6.	Oligonukleotide	35
3.7.	Molekularbiologische Methoden	36
3.7.1.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	36
3.7.2.	Isolierung von DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	37
3.7.3.	Enzymatische Modifikation von Plasmid-DNA.....	38
3.7.4.	Quantifizierung und Sequenzierung von Plasmid-DNA	41
3.7.5.	Polymerasekettenreaktion	41
3.7.6.	Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	44
3.7.7.	Transformation von Plasmid-DNA.....	45
3.8.	Hefegenomische Methoden	48
3.9.	Proteinbiochemische Methoden	49
3.9.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	49
3.9.2.	Visualisierung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel	52
3.9.3.	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	56
3.9.4.	Synthese und Reinigung von rekombinanten Fusionsproteinen aus <i>E. coli</i>	57
3.9.5.	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen und -Modifikationen	60
3.10.	Zellbiologische Methoden	70
3.10.1.	Luminometrische Assays	70
3.10.2.	Fluoreszenzmikroskopie	72
3.10.3.	Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen unter Stressbedingungen.....	74
4.	Ergebnisse	75
4.1.	Posttranslationale Modifikation von Yvc1 durch SUMO	75
4.1.1.	SUMOylierung von Yvc1-Fragmenten <i>in vitro</i>	75
4.1.2.	SUMOylierung von Yvc1 <i>in vivo</i>	92
4.1.3.	Phänotypische Effekte im Zusammenhang mit der SUMOylierung von Yvc1	97
4.2.	Interaktionspartner von Yvc1	109
4.2.1.	Tandemaffinitätsreinigung (TAP-Reinigung)	109

4.2.2.	Co-Immünpräzipitation (Co-IP)	119
5.	Diskussion	127
1.1.	Yvc1 ist ein Substrat für die Modifikation durch Smt3	127
5.1.1.	SUMOylierung von Yvc1 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	127
5.1.2.	Funktionelle Untersuchungen der SUMOylierung von Yvc1	132
5.1.3.	Zusammenspiel posttranslationaler Modifikationen von Proteinen	139
5.2.	Interaktionspartner von Yvc1	143
5.2.1.	Co-Reinigung von Yvc1 und assoziierten Proteinen	146
5.2.2.	Interpretation der Massenspektrometrie-Daten für Yvc1	151
5.3.	Perspektiven.....	152
6.	Literaturverzeichnis.....	154
7.	Danksagung	169

Zusammenfassung

Die Regulation der Ionenhomöostase ist für jeden Organismus von großer Bedeutung und ermöglicht es auf Umwelteinflüsse adaptiv zu reagieren. Eine wichtige Rolle in diesem Zusammenhang spielen TRP (*transient receptor potential*)-Kanäle, die von Einzellern bis hin zu höheren Vertebraten hoch konserviert vorkommen. Es handelt sich dabei um eine große Proteinfamilie von nicht-selektiven, Kationen-permeablen Kanälen, die polymodal gesteuert werden und durch das breite Spektrum ihrer Funktionen mit einer Vielzahl an verschiedenen Krankheiten assoziiert sind. Im einzelligen Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* existiert ein einziger TRP-homologer Kanal, *yeast vacuolar conductance* (Yvc1), der in der Vakuolenmembran lokalisiert und funktionell an der Osmoregulation und Ca^{2+} -Homöostase der Zelle beteiligt ist. Da die Funktion und Wirkung eines Proteins meist durch das Zusammenspiel mit Interaktionspartnern und die Regulation durch posttranslationale Modifikationen zustande kommt, war das Ziel dieser Arbeit, Yvc1 hinsichtlich dieser Aspekte zu untersuchen.

Die posttranslationale Modifikation von Yvc1 durch SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) wurde *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen und die SUMO-Akzeptorlysine K212, K231, K547 und K599 wurden durch systematische Untersuchungen von Lys \rightarrow Arg (KR)-Mutanten identifiziert. Da die SUMOylierung die Lokalisation, die Stabilität und die Funktion von Proteinen beeinflussen kann, wurden die phänotypischen Effekte eines weniger oder nicht mehr SUMOylierbaren Kanals (Yvc1-KR-Mutanten) *in vivo* untersucht. Weder die Lokalisation noch die Stabilität von Yvc1 änderten sich durch die untersuchten Mutationen. Mithilfe des Ca^{2+} -Reporterproteins Aequorin wurde gezeigt, dass der Yvc1-vermittelte Ca^{2+} -Ausstrom nach einem hyperosmotischen Schock durch die SUMOylierung an den Lysinresten K212, K547 und K599 negativ reguliert wird. Die SUMOylierung des Lysinrests K231 hatte in diesem Kontext einen gegenteiligen Effekt. Somit scheint der SUMOylierungsstatus die Aktivität von Yvc1 zu modulieren. Eine Beteiligung des Kanals und seiner SUMOylierung an der Adaptation auf verschiedene Stressbedingungen wurde nicht beobachtet.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollten Proteine identifiziert werden, die mit Yvc1 *in vivo* im Komplex vorliegen. Die experimentelle Strategie dabei war die Co-Reinigung von Yvc1 zusammen mit seinen Interaktionspartnern mittels Tandemaffinitätsreinigung bzw. Co-Immunpräzipitation mit einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse der Proteine. Die Ergebnisse lieferten Hinweise auf die Regulation der korrekten Lokalisation des Kanals und eine Rolle von Yvc1 bei der Vakuolenfusion und der Degradation von Plasmamembranproteinen. Eine Beteiligung von Yvc1 an der Regulation der Zellwand-Integrität und

der Protonenhomöostase wäre ebenfalls möglich. Die potentiellen Interaktionspartner von Yvc1 müssen allerdings noch verifiziert werden, um eine Rolle des Kanals in Bezug auf die genannten Prozesse zu bestätigen und aufzuklären.

Summary

The regulation of ion homeostasis is fundamental to determine many physiological processes such as adaptation to environmental influences. Transient receptor potential (TRP) channels are highly conserved from lower to higher eukaryotes and play an important role in this context. They constitute a large and functionally versatile superfamily of non-selective cation channel proteins that are activated by polymodal stimuli and associated with a variety of different human diseases. In *Saccharomyces cerevisiae*, there is one single TRP homolog called yeast vacuolar conductance (Yvc1). Yvc1 is located in the vacuolar membrane and is functionally involved in osmoregulation and Ca^{2+} homeostasis of the cell. Since the function of a protein is often regulated by posttranslational modifications as well as interactions with other proteins, the aim of this study was to investigate Yvc1 with regard to these aspects.

In this study, the posttranslational modification of Yvc1 by small ubiquitin-like modifier (SUMO) was shown *in vitro* and *in vivo*. K212, K231, K547 and K599 were identified as SUMO modification sites by mass spectrometry and systematic investigations of Lys → Arg (KR) mutants. Since SUMOylation can influence the localization, stability, and function of proteins the phenotypic effects of a less or non-SUMOylatable channel (Yvc1-KR mutants) were investigated. Neither localization nor stability of Yvc1 changed due to the mutations. Luminometric aequorin assays demonstrated that Yvc1-mediated Ca^{2+} -efflux after hyperosmotic shock is negatively regulated by SUMOylation at the lysine residues K212, K547 and K599. SUMOylation of the lysine residue K231 had an opposite effect in this context. Thus, the SUMOylation state seems to modulate the activity of Yvc1. An involvement of the channel and its SUMOylation level on the adaptation to different stress conditions was not observed.

Furthermore, new interaction partners of Yvc1 should be identified. The experimental strategy consisted in the copurification of Yvc1 together with its interaction partners by tandem affinity purification (TAP) or co-immunoprecipitation and a subsequent mass spectrometry of the purified proteins. The results provided evidence for the regulation of the correct channel localization by its interaction partners and a role of Yvc1 in the degradation of plasma membrane proteins and vacuolar fusion. One could also imagine a participation of Yvc1 in the regulation of cell wall integrity and proton homeostasis. However, the potential interaction partners of Yvc1 should be verified in order to elucidate a role of the channel in these processes.

Einleitung

Die Calcium-Homöostase in eukaryotischen Zellen

201. Bedeutung und Funktion von Calcium

Calcium-Ionen (Ca^{2+}) spielen eine tragende Rolle in vielen wichtigen physiologischen Prozessen einer eukaryotischen Zelle. Vom Zellzyklus bis hin zum kontrollierten Zelltod, der Apoptose, ist Ca^{2+} als *second messenger* an Signaltransduktionswegen beteiligt. Sei es die Gentranskription, die Zelldifferenzierung, die Motilität cytoplasmatischer Strukturen bzw. der Zellen selbst oder verschiedene essentielle Stoffwechselwege, in all diesen Prozessen wird Ca^{2+} eine große Bedeutung zugeschrieben (Berridge *et al.*, 2000; Clapham, 2003; Brini *et al.*, 2013). Entsprechend der Relevanz von Ca^{2+} steht die Regulation der Ca^{2+} -Homöostase unter genauer Kontrolle. Durch das Aufrechterhalten eines Ca^{2+} -Gradienten zwischen dem Cytosol und dem extrazellulären Raum bzw. bestimmten Zellorganellen können transiente, lokale Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol stattfinden, welche wiederum ein breites Spektrum von Effekten verursachen. Um diesen Gradienten aufzubauen und die cytosolischen Ca^{2+} -Signale zu verarbeiten, gibt es in eukaryotischen Zellen eine Reihe von Proteinen und Molekülen, die Ca^{2+} binden oder über Membranen hinweg transportieren. Dazu gehören Rezeptoren, Kanäle, ATP-getriebene Pumpen, Signaltransduktoren und Ca^{2+} -bindende Proteine (Berridge *et al.*, 2003), welche zum großen Teil vom Einzeller bis hin zum Menschen hoch konserviert vorkommen (Palmgren und Axelsen, 1998; Case *et al.*, 2007).

202. Calcium-Homöostase in *S. cerevisiae*

Die Untersuchung von essentiellen zellphysiologischen Prozessen wie der Ca^{2+} -Homöostase und der damit verbundenen Signaltransduktionswege im einzelligen, eukaryotischen Modellorganismus *S. cerevisiae* erlaubt es, grundlegende und komplexe Mechanismen dieser Systeme besser zu verstehen. Das in *S. cerevisiae* hoch konservierte Ca^{2+} -Signaltransduktionsnetzwerk ist beispielsweise an der Reaktion der Zellen auf das alpha-Pheromon beteiligt (Iida *et al.*, 1990) und spielt eine große Rolle bei der Anpassung an viele Arten von Umwelteinflüssen. Von ER (endoplasmatisches Retikulum)-Stress (Bonilla und Cunningham, 2003) und hohen Konzentrationen an Ca^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} und Fe^{3+} über Ethanol- und Kälte-Stress (Miseta *et al.*, 1999; Peiter *et al.*, 2005; Courchesne *et al.*, 2011; Ruta *et al.*, 2014; Ruta *et al.*, 2016) bis hin zu oxidativem Stress (Popa *et al.*, 2010) sowie hypo- und hyperosmotischem Stress (Batiza *et al.*, 1996; Matsumoto *et al.*, 2002; Rigamonti *et al.*, 2015), all diese Stressfaktoren führen zu Ca^{2+} -Signalen in den Zellen, um Toleranzen

auszubilden oder die Apoptose einzuleiten. Die Zellen halten die Ca^{2+} -Konzentration im Cytoplasma normalerweise stabil niedrig zwischen 50 und 200 nM (Dunn *et al.*, 1994; Miseta *et al.*, 1999; Aiello *et al.*, 2002). Der Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration unter bestimmten Bedingungen kann sowohl durch den Ca^{2+} -Einstrom von außerhalb der Zelle als auch durch den Ca^{2+} -Ausstrom aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern verursacht werden. Der Einstrom aus dem extrazellulären Medium kann über verschiedene Systeme erfolgen, von denen der heteromere, aus Cch1 und Mid1 bestehende Komplex bisher am besten charakterisiert ist. Dabei handelt es sich um einen in der Plasmamembran lokalisierten Ca^{2+} -Kanal, der Ca^{2+} -Ionen mit einer hohen Affinität und geringen Kapazität aufnimmt und Homologien zu spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen des Menschen aufweist (Iida *et al.*, 1994; Fischer *et al.*, 1997). Weiterhin gibt es einen an der Pheromonantwort beteiligten Kanal, der Ca^{2+} mit geringer Affinität, aber hoher Kapazität ins Cytosol transportiert (Muller *et al.*, 2003), die noch nicht näher charakterisierten Transporter X und M (Cui *et al.*, 2009) sowie das durch Glukose aktivierte System GIC (Groppi *et al.*, 2011) (Abbildung 1).

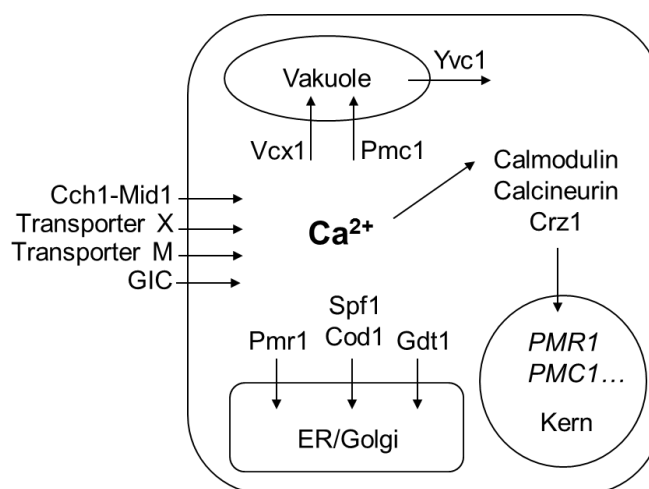


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ca^{2+} -Homöostase und Signaltransduktion in *S. cerevisiae* (angelehnt an Cui *et al.*, 2009). Der Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Medium erfolgt über verschiedene Systeme (Cch1/Mid1, X, M, Glukose-induzierter Calcium-Einstrom (GIC)). Über die Ca^{2+} -Calmodulin abhängige Aktivierung von Calcineurin wird Crz1 dephosphoryliert, gelangt in den Kern und reguliert die Genexpression auf transkriptioneller Ebene. Die niedrige, cytosolische Ca^{2+} -Konzentration wird durch Sequestrierung der Ca^{2+} -Ionen ins ER und in den Golgi-Apparat (Pmr1, Gdt1, Spf1/Cod1) sowie in die Vakuole (Pmc1, Vcx1) wiederhergestellt. Die Ca^{2+} -Freisetzung aus der Vakuole erfolgt über den TRP-homologen Kanal Yvc1.

Der cytosolische Ca^{2+} -Anstieg führt beispielsweise dazu, dass das Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin die Phosphatase Calcineurin aktiviert, was wiederum die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Crz1 durch Dephosphorylierung zur Folge hat. Crz1 wird daraufhin in

den Kern transportiert und reguliert die Stressantwort und die Ca^{2+} -Homöostase auf transkriptioneller Ebene (Cyert, 2003). Das Aufrechterhalten der niedrigen cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration erfolgt über Abpufferung der Ca^{2+} -Ionen durch Ca^{2+} -bindende Proteine und durch ihre Sequestrierung in ausgewählte Organellen. Ein Teil der Ca^{2+} -Ionen wird über die Ca^{2+} -ATPasen Pmr1 und Spf1/Cod1 sowie den Ca^{2+} -Transporter Gdt1 ins ER und den Golgi-Apparat transportiert (Cronin *et al.*, 2002; Demaegd *et al.*, 2013; Demaegd *et al.*, 2014; D'hooge *et al.*, 2015). Hauptsächlich jedoch dient die Vakuole als interner Ca^{2+} -Speicher und dementsprechend wird der größte Anteil an freiem Ca^{2+} in die Vakuole befördert. Hierzu dient neben der Ca^{2+} -ATPase Pmc1 auch der $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter Vcx1, der seinerseits durch die Azidifizierung der Vakuole über die Protonenpumpe Vma1 angetrieben wird (Miseta *et al.*, 1999). In der Vakuole sind die meisten Ca^{2+} -Ionen hauptsächlich an Polyphosphate gebunden, ein geringer Teil jedoch liegt als freies Ca^{2+} vor (etwa 30 μM), ist dadurch für die Verwendung als Signalmolekül verfügbar und wird unter bestimmten Voraussetzungen durch den TRP-homologen Kanal Yvc1 freigesetzt (Denis und Cyert, 2002; Cui *et al.*, 2009; Cunningham, 2011).

Die Proteinfamilie der TRP-Ionenkanäle

211. Geschichte und Klassifizierung der TRP-Kanäle

Zum ersten Mal wurde ein TRP-Kanal in der Fruchtfliege *D. melanogaster* beschrieben. Der Name *transient receptor potential* entstand dabei aufgrund des Phänotyps der Photorezeptoren, die eine Mutation im *trp*-Lokus trugen. Diese bildeten ein transientes Rezeptorpotential als Antwort auf ein anhaltendes Lichtsignal aus, wohingegen sich das Rezeptorpotential im Wildtyp solange fortsetzte, wie der Reiz andauerte (Minke, 1977; Montell *et al.*, 1985). Weitere Untersuchungen zeigten schließlich, dass es sich bei dem *trp*-Genprodukt um einen in der Membran der Photorezeptor-Zellen lokalisierten, Ca^{2+} -durchlässigen Kationen-Kanal handelt (Montell und Rubin, 1989; Hardie und Minke, 1992). Seitdem wurden in vielen Eukaryoten über 50 TRP-homologe Kanäle identifiziert, die von niederen Organismen (Hefen, Fliegen, Würmer, Fische) bis hin zum Menschen konserviert vorkommen. In Säugern wurden 28 TRP-Kanäle beschrieben, welche aufgrund ihrer Sequenzhomologie in sechs Unterfamilien eingeteilt werden (Abbildung 2). Die klassischen TRP-Kanäle (TRPC1-6) sind dem Kanal in *D. melanogaster* am ähnlichsten. TRPV1-6 (Vanilloid), TRPM1-6 (Melastatin), TRPP2, 3, 5 (Polycystin) und TRPML1-3 (Mucolipin) werden aufgrund ihrer Rezeptoreigenschaften voneinander unterschieden. TRPA1 gehört als einziges Mitglied der Ankyrin-Unterfamilie an. Die TRP-Kanäle der restlichen Organismen

kann man diesen sechs Unterfamilien zuordnen, wobei einige Kanäle in Fischen, Fliegen und Würmern die siebte Unterfamilie TRPN bilden (Pedersen *et al.*, 2005; Flockerzi, 2007; Gees *et al.*, 2010). In *S. cerevisiae* gibt es einen einzigen TRP-homologen Kanal, Yvc1, der der Mucolipin-Unterfamilie zuzuordnen ist (Palmer *et al.*, 2001; Christensen und Corey, 2007). In Pflanzen wurden bisher keine TRP-homologen Proteine identifiziert.

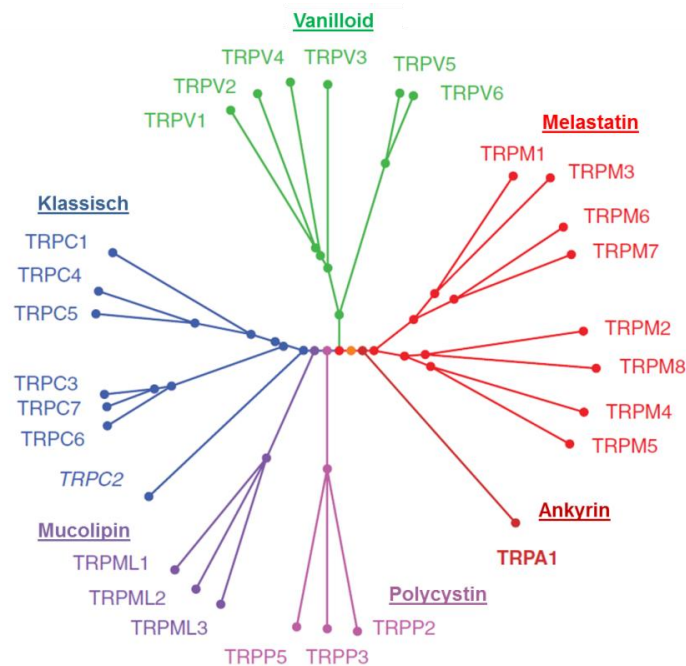


Abbildung 2: Phylogenetischer Stammbaum der Säuger-TRP-Kanal-Familie (modifiziert nach Gees *et al.*, 2010). Die TRP-Kanäle der Säuger werden in sechs Unterfamilien eingeteilt (TRPC1-6, TRPV1-6, TRPM1-8, TRPA1, TRPP2,3,4, TRPML1-3).

TRP-Kanäle werden polymodal über chemische und physikalische Stimuli aktiviert (Liganden, Temperatur, Änderungen der Osmolarität und Spannung, mechanische Scherkräfte, ...) und sind je nach Organismus, Organ oder Zelltyp an einer großen Vielfalt von Funktionen beteiligt. Meist üben sie sensorische Aufgaben aus, wobei es sich nicht nur um Prozesse handelt, in welchen ganze Organismen ihre Umwelt wahrnehmen, sondern auch einzelne Zellen auf ihr unmittelbares Umfeld reagieren (Venkatachalam *et al.*, 2014). Obwohl TRP-Kanäle in Bezug auf Sequenzen, Funktionen und Vorkommen eine große Diversität aufweisen, stimmen sie in ihrer meist nicht-selektiven Durchlässigkeit für Kationen überein und zeichnen sich außerdem durch ihre gleichartige Architektur aus. Die vorhergesagte Struktur einer TRP-Kanal-Untereinheit weist sechs Transmembrandomänen auf, wobei die Region zwischen der fünften und sechsten Transmembrandomäne die Pore des Kanals bildet. Ein vollständiger Kanal besteht aus vier homomeren oder heteromeren Untereinheiten (Owsianik *et al.*, 2006a; Owsianik *et al.*, 2006b).

212. Mit TRP-Kanälen assoziierte Erkrankungen

Die bedeutende Rolle der zellulären Ca^{2+} -Homöostase macht eine strikte Regulation der Ca^{2+} -Signale unentbehrlich. Sind die Regulationsmechanismen fehlerhaft, so wirkt sich dies auf essentielle physiologische Prozesse bis hin zur Apoptose aus.

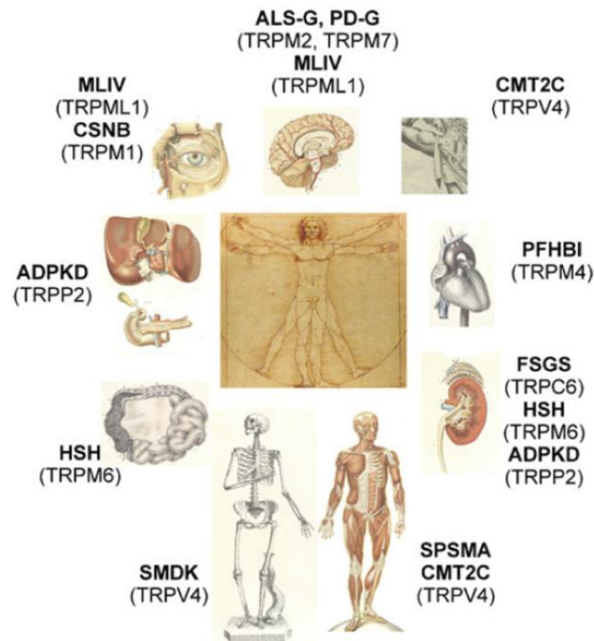


Abbildung 3: Mit TRP-Kanälen assoziierte Erkrankungen (Nilius und Owsianik, 2010). Eine Auswahl an Krankheiten mit den betroffenen Organen und die beteiligten TRP-Kanäle sind aufgeführt. ALS-G: Amyotrophe Lateralsklerose, PD-G: Parkinson-Demenz, MLIV: Mukolipidose Typ 4, CMT2C: Morbus Charcot-Marie-Tooth, PFHBI: Familiäre progressive kardiale Reizleitungsstörung, FSGS: fokale segmentale Glomerulosklerose, HSH: Hypomagnesiämie mit sekundärer Hypokalzämie, ADPKD: Autosomal-dominante polyzystische Nierenerkrankung, SPSMA: skapuloperoneale spinale Muskelatrophie, SMDK: Spondylometaphysäre Dysplasie Typ Koslowski, CSNB: Kongenitale stationäre Nachtblindheit.

TRP-Kanäle zeichnen sich durch ihre hohe Bandbreite an Funktionen in einer Vielfalt von Zelltypen und Organen aus und sind maßgeblich an der Ca^{2+} -vermittelten Signaltransduktion beteiligt. Dadurch sind die Effekte einer fehlenden, verminderten oder gesteigerten Kanalfunktion je nach TRP-Kanal und seiner Lokalisation sehr unterschiedlich und sind mit einer Fülle an Erkrankungen assoziiert. In Abbildung 3 sind einige Beispiele für die Diversität der sogenannten TRP-vermittelten Kanalopathien aufgeführt. Neben neurodegenerativen Erkrankungen wurden bereits mehrere auf TRP-Kanäle zurückzuführende Nierenerkrankungen beschrieben (Yamamoto *et al.*, 2007; Nilius und Szallasi, 2014; Venkatachalam *et al.*, 2014). Gastrointestinale Krankheitsbilder sowie verschiedene Arten

von kardialen Reizleitungsdefekten werden durch die Fehlfunktion oder -regulation unterschiedlicher TRP-Kanäle verursacht (Watanabe *et al.*, 2008; Kruse *et al.*, 2009; Venkatachalam *et al.*, 2014). Gestörte Funktionsweisen von TRP-Kanälen sind laut neuesten Studien mit der Ausbildung von Diabetes mellitus sowie verschiedenen Arten von Krebs verknüpft (Deliot und Constantin, 2015; Derbenev und Zsombok, 2016; Shapovalov *et al.*, 2016). Weitere Untersuchungen weisen außerdem auf Zusammenhänge zwischen TRP-Kanälen und Gelenk-Erkrankungen sowie Erkrankungen des bronchopulmonalen Systems wie Asthma und COPD hin (Jha *et al.*, 2015; McNulty *et al.*, 2015; De Logu *et al.*, 2016). Das breite Spektrum an Auswirkungen von defekten oder fehlregulierten TRP-Kanälen macht sie zu relevanten Objekten der biomedizinischen Forschung. Dabei ist es nicht nur wichtig, ihre Funktionsweise zu verstehen, sondern auch das Verständnis der zugrunde liegenden Regulationsmechanismen dieser Kanäle zu vertiefen.

Der TRP-homologe Kanal Yvc1 in *S. cerevisiae*

Für die Vakuolenmembran von *S. cerevisiae* wurde in mehreren Studien unter Verwendung elektrophysiologischer Methoden eine Kationen-Leitfähigkeit beschrieben (Wada *et al.*, 1987; Bertl und Slayman, 1990), woraufhin der dafür verantwortliche TRP-homologe Kanal TRPY1 identifiziert und seiner Eigenschaft entsprechend *yeast vacuolar conductance* (Yvc1) genannt wurde (Palmer *et al.*, 2001). Nähere Untersuchungen zeigten, dass es sich dabei um einen polymodal aktivierbaren, spannungsabhängigen Kanal mit einer Leitfähigkeit von etwa 320 pS handelt, welcher Ca^{2+} sowie monovalente Kationen (Na^+ , K^+ , Cs^+ , Li^+) mit einer hohen Selektivität gegenüber Anionen aus der Vakuole ins Cytosol freisetzen kann und dessen Aktivität durch cytosolisches Ca^{2+} verstärkt wird (Bertl und Slayman, 1990; Bertl *et al.*, 1992; Palmer *et al.*, 2001). Außer Yvc1 in *S. cerevisiae* wurden TRP-homologe Kanäle auch in anderen Pilzen wie *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus nidulans* und *Ustilago maydis* beschrieben (Denis und Cyert, 2002; Zhou *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2007).

221. Lokalisation und Struktur von Yvc1

Das Genom von *S. cerevisiae* ist seit 1996 vollständig sequenziert. Auf 16 Chromosomen befinden sich 5885 potentiell für Proteine kodierende Gene (Goffeau *et al.*, 1996) und Yvc1 ist der einzige TRP-homologe Kanal, der in diesem Organismus bisher identifiziert wurde. Der offene Leserahmen von *YVC1* kodiert für ein 675 Aminosäurereste langes Protein mit einer Molekularmasse von 78 kDa. Die Kopienzahl von Yvc1 liegt zwischen 760 und 1300 Molekülen pro Zelle in einer Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase und ist damit

relativ niedrig (Ghaemmaghami *et al.*, 2003; Kulak *et al.*, 2014). Patchclamp-Experimente sowie die Visualisierung von Yvc1 mittels GFP-Fusion zeigen, dass der Kanal ausschließlich in der Vakuolenmembran von *S. cerevisiae* lokalisiert ist (Palmer *et al.*, 2001; Denis und Cyert, 2002). Ausgehend von Hydrophobizitäts-Plots der Aminosäuresequenz von Yvc1 wurden für die Struktur des Kanals sechs potentielle Transmembrandomänen (TM) vorhergesagt (TM1: AS 237-256, TM2: AS 265-285, TM3: AS 299-320, TM4: AS 335-356, TM5: AS 377-395, TM6: AS 437-459) (Su *et al.*, 2007). Die langen N- (AS 1-236) und C-terminalen (AS 460-675) Domänen befinden sich dabei auf der cytoplasmatischen Seite. Im C-Terminus wurde ein Cluster von negativ geladenen Aminosäureresten (DDDD) gefunden, der einen möglichen Ca^{2+} -Sensor darstellt. An der Ca^{2+} -vermittelten Aktivierung sind außerdem zwei hydrophobe Abschnitte im C-Terminus beteiligt, die möglicherweise für die Übertragung des Ca^{2+} -Signals vom DDDD-Motiv auf den Kanal zuständig sein könnten (Schreiber und Salkoff, 1997; Palmer *et al.*, 2001; Su *et al.*, 2009b) (Abbildung 4).

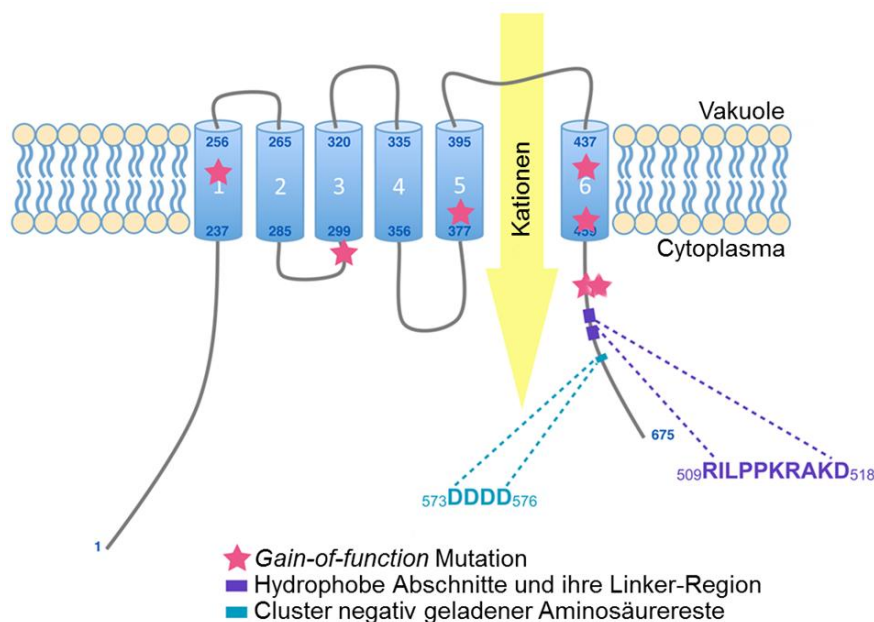


Abbildung 4: Vorhergesagte Struktur von Yvc1 (modifiziert nach Chang *et al.*, 2010). Die in der Vakuolenmembran lokalisierte Struktur der Transmembrandomänen (1-6) geht auf einen Hydrophobizitäts-Plot zurück. N- und C-Terminus befinden sich auf der cytoplasmatischen Seite. Die Zahlen geben die Nummern der Aminosäurereste der Primärsequenz an und die Sterne stehen für sieben identifizierte *Gain-of-function* Mutationen (F247L, S297W, F380L, Y442C, Y458H, Y473H, Y473C). Im C-Terminus befinden sich negativ geladene Aminosäurereste (türkis), die als Ca^{2+} -Sensor dienen könnten und zwei hydrophobe Abschnitte (lila), die funktional ebenfalls an der Ca^{2+} -vermittelten Aktivierung des Kanals beteiligt sind.

Aufgrund der Vorkenntnisse über die Proteinfamilie der TRP-Kanäle geht man von einer homotetrameren Topologie des Kanals aus, in welchem die Regionen zwischen den fünften und sechsten TM die für Kationen durchlässige Pore bilden. Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente, die intramolekulare Interaktionen zwischen den terminalen Domänen von Yvc1 aufzeigten, unterstützen diese Annahme (Chang, 2010).

Ein Mutanten-Screen von Yvc1 identifizierte zehn Mutationen, die zu einer starken Erhöhung der Kanalaktivität nach Applikation eines hyperosmotischen Schocks führen (*Gain-of-function*). Sieben dieser Mutationen (F247L, S297W, F380L, Y442C, Y458H, Y473H, Y473C) wurden anschließend näher charakterisiert (Su *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007). In sechs Fällen handelt es sich um Substitutionen von aromatischen Aminosäureresten und in einem Fall (S297W) wird Serin durch einen aromatischen Aminosäurerest ersetzt. Aufgrund ihrer Lokalisation innerhalb oder in der Nähe der vorhergesagten Transmembrandomänen (Abbildung 4) wird vermutet, dass aromatische Aminosäurereste für den Erhalt der Struktur von Yvc1 im offenen bzw. geschlossenen Zustand von Bedeutung sind. Die betroffenen Aminosäurereste in TM5 und TM6 sowie Y473 kommen in einigen tierischen TRP-Kanälen und in TRP-Kanälen anderer Pilze hoch konserviert vor, was die Funktion der aromatischen Aminosäurereste innerhalb der Porenregion zu einem allgemeingültigen Mechanismus machen könnte (Su *et al.*, 2007).

222. Regulation und Funktionen von Yvc1

Neben dem Proteinabbau und ihrer Speicherfunktion für basische Aminosäuren, Polyphosphate und verschiedene Kationen, werden der Vakuole in Hefen auch regulatorische Aufgaben zugeschrieben wie die Osmoregulation, die Regulation des zellulären pH-Werts und der Ionenkonzentration (Klionsky *et al.*, 1990). Physiologisch wichtiges Ca^{2+} wird in der Vakuole aktiv angereichert und zum größten Teil durch Polyphosphate abgepuffert. Als Reaktion auf bestimmte Signale wird nicht gebundenes Ca^{2+} über Yvc1 aus der Vakuole freigesetzt, welches anschließend seine Funktion als *second messenger* erfüllt (Abbildung 1).

Die Aktivierung des Kanals kann durch einige Aromaten (z.B. Indol) oder durch 1 mM cytosolisches Ca^{2+} erfolgen, wobei ein höherer pH-Wert oder die Anwesenheit von reduzierenden Agenzien die für die Aktivierung erforderliche Ca^{2+} -Konzentration auf einen mikromolaren Bereich senkt (Bertl und Slayman, 1990; Palmer *et al.*, 2001; John Haynes *et al.*, 2008). Diese Ca^{2+} -vermittelte Aktivierung wird funktional mit einer Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Freisetzung in Verbindung gebracht, einem *feedback*-Mechanismus, durch welchen ein

Signal sich selbst verstärkt. Hohe Ca^{2+} -Konzentrationen in der Vakuole sowie ein niedriger pH-Wert (Vakuole oder Cytoplasma) inhibieren dagegen den Kanal (Bonilla und Cunningham, 2002; Zhou *et al.*, 2003). Eine Studie zeigt außerdem, dass Yvc1 auch über reversible Glutathionylierung von Cysteinresten aktiviert werden kann. Die Modifikation erfolgt enzymatisch unter Beteiligung der Glutathion-S-Transferase Gtt1 und wird mittels Thioredoxin Trx2 abgespalten (Chandel *et al.*, 2016). Eine typische Eigenschaft vieler TRP-Kanäle ist ihre Mechanosensitivität, die auch für Yvc1 beschrieben wurde. In Patchclamp-Experimenten an isolierten Vakuolen führt Druck auf die Membran oder die Erhöhung der Osmolarität der Badlösung zur direkten Aktivierung des Kanals (Zhou *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2009a; Su *et al.*, 2009b). Von Denis und Cyert wurde 2002 zum ersten Mal eine biologische Relevanz von Yvc1 nachgewiesen. In intakten Hefezellen, die den intramolekularen Ca^{2+} -Sensor Aequorin plasmidkodiert synthetisieren, zeigten sie, dass Yvc1 für die Ca^{2+} -Freisetzung aus der Vakuole nach Applikation eines hyperosmotischen Schocks verantwortlich ist (Denis und Cyert, 2002). Der Mechanismus dieser Aktivierung wurde anschließend von Zhou und Kollegen (2003) beschrieben (Abbildung 5).

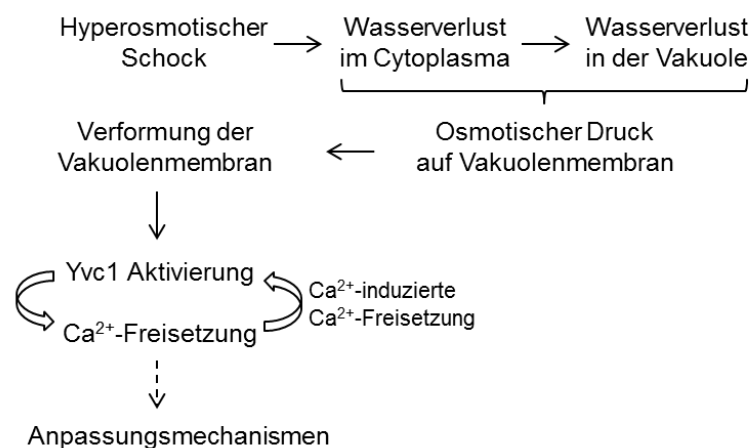


Abbildung 5: Mechanismus der Yvc1-Aktivierung nach hyperosmotischem Schock (angelehnt an Zhou *et al.*, 2003). Ein hyperosmotischer Schock führt zum Wasserverlust im Cytoplasma und anschließend in der Vakuole. Aufgrund des dadurch entstandenen Drucks auf die Vakuolenmembran verformt sich diese und der mechanosensitive Kanal Yvc1 wird aktiviert. Die daraus resultierende Ca^{2+} -Freisetzung führt zum einen zur verstärkten Aktivierung von Yvc1 (Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung), zum anderen zur Anpassung an hyperosmotischen Stress.

Durch den vom hyperosmotischen Schock verursachten Wasserverlust im Cytoplasma und in der Vakuole wird osmotischer Druck auf die Vakuolenmembran ausgeübt, was wiederum zu ihrer Verformung führt und aufgrund mechanischer Scherkräfte in der Ca^{2+} -unabhängigen Aktivierung von Yvc1 resultiert. Das freigesetzte Ca^{2+} verstärkt einerseits die Aktivierung des

Kanals und führt andererseits über noch unbekannte Mechanismen zur Anpassung an hyperosmotischen Stress (Zhou *et al.*, 2003). Eine negative Regulation des Kanals könnte über das Ca^{2+} -bindende Protein Calmodulin erfolgen, welches einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität des Kanals zeigt (Amini, 2013).

Neben der Rolle bei der Anpassung an hyperosmotischen Stress wird Yvc1 auch eine Beteiligung an der zellulären Reaktion auf weitere Umwelteinflüsse zugeschrieben. Die Untersuchung der Ca^{2+} -Antwort auf toxische Konzentrationen von Schwermetallen (Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+}) ergab, dass die Anwesenheit von Cd^{2+} (200 μM) und Cu^{2+} (200 μM) eine Erhöhung des cytosolischen Ca^{2+} bewirkt (Ruta *et al.*, 2014). Während der Ca^{2+} -Anstieg bei Cd^{2+} hauptsächlich auf extrazelluläres Ca^{2+} zurückzuführen ist, ist die durch Cu^{2+} verursachte Ca^{2+} -Antwort durch die Yvc1-Aktivität bedingt (Ruta *et al.*, 2014; Ruta *et al.*, 2016). Yvc1 spielt auch eine wesentliche Rolle bei der Reaktion auf oxidativen Stress. Bei subletalen Dosen von H_2O_2 (bis 3 mM H_2O_2) erhöht sich die cytosolische Ca^{2+} -Konzentration zum großen Teil aufgrund der Aktivität von Mid1/Cch1 in der Plasmamembran und geringfügig durch die Aktivität von Yvc1. Bei letalen H_2O_2 -Konzentrationen dagegen (ab 3 mM) ist die Ca^{2+} -Freisetzung ausschließlich auf Yvc1 zurückzuführen (Popa *et al.*, 2010). Die TRP-Kanal vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung bei oxidativem Stress wurde auch in *Candida albicans* beobachtet (Yu *et al.*, 2014). Die Deletion von YVC1 führt sowohl bei erhöhten Cu^{2+} -Konzentrationen als auch bei oxidativem Stress zu einer erhöhten Toleranz der Zellen und die Überexpression des Kanals resultiert in einer erhöhten Sensitivität gegenüber 4 mM H_2O_2 . Zellen, die YVC1 überexprimieren, zeigen außerdem eine erhöhte Sensitivität gegenüber hohen CaCl_2 -Konzentrationen (300 mM). Da gleiche Konzentrationen an MgCl_2 keine Effekte verursachen, kann man davon ausgehen, dass die Sensitivität Ca^{2+} -spezifisch ist. Die Phänotypen der Deletion und Überexpression von YVC1 lassen sich damit erklären, dass ein von Yvc1 verursachter, übermäßig erhöhter Ca^{2+} -Spiegel zur Apoptose führt (Denis und Cyert, 2002; Popa *et al.*, 2010; Ruta *et al.*, 2016). Andere Stressfaktoren, die auch eine Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration zur Folge haben, wurden hinsichtlich ihrer Ca^{2+} -Quellen untersucht. Es wurde festgestellt, dass der Ca^{2+} -Anstieg im Cytosol bei hypotonischem Schock oder Ethanol-Stress hauptsächlich auf extrazelluläres Ca^{2+} zurückzuführen ist (Batiza *et al.*, 1996; Courchesne *et al.*, 2011). Der Ca^{2+} -Einstrom bei Kälte-Stress und toxischen Fe^{3+} -Konzentrationen wird von Mid1/Cch1 verursacht (Peiter *et al.*, 2005) und die Beteiligung von Yvc1 an der Ca^{2+} -Freisetzung bei einer Erhöhung des pH-Werts konnte ebenfalls ausgeschlossen werden (Viladevall *et al.*, 2004).

Es ist bereits bekannt, dass ein Glukose-induzierter, cytosolischer Ca^{2+} -Anstieg von einem noch unbekanntem Transporter (GIC, Abbildung 1) in der Plasmamembran verursacht wird

und die Ca^{2+} -Quelle dafür dementsprechend der extrazelluläre Raum ist. Wenn im Medium allerdings nur eine geringe Ca^{2+} -Konzentration vorhanden ist, wird auf die Vakuole als interner Ca^{2+} -Speicher zurückgegriffen und die Ca^{2+} -Signalkaskade ist abhängig von der Yvc1-Aktivität (Bouillet *et al.*, 2012). Das von Glukose induzierte Ca^{2+} -Signal wird mit der Aktivierung der in der Plasmamembran lokalisierten H^+ -ATPase Pma1 in Verbindung gebracht. Pma1 ist eine hoch abundante Protonenpumpe mit 1.260.000 Molekülen pro Zelle (Ghaemmaghami *et al.*, 2003), die Protonen ATP-abhängig aus der Zelle transportiert, damit den pH-Wert der Zelle reguliert und außerdem für einen Protonengradienten sorgt, der wiederum wichtig für die Nährstoffaufnahme ist (Portillo, 2000; Eraso *et al.*, 2006). In *S. cerevisiae* Stämmen mit *YVC1*-Deletion bzw. der Deletion von *YVC1* und *PMC1*, wurde eine signifikante Reduktion des Glukose-induzierten Ca^{2+} -Signals sowie der Aktivität von Pma1 beobachtet, was für eine bedeutende Rolle von Yvc1 in diesem Zusammenhang spricht (Bouillet *et al.*, 2012).

Von Bouillet und Kollegen (2012) wurde im Kontext der Glukose-induzierten Ca^{2+} -Signalkaskade auch eine Korrelation zwischen dem zellulären Level an Inositol-1, 4, 5-triphosphat (IP_3) und der Aktivierung von Yvc1 hergestellt. Plc1 katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4, 5-Phosphat ($\text{PI}(4, 5)\text{P}_2$) zu Diacylglycerol und IP_3 , welches schon in vorherigen Studien als Signalmolekül mit dem Glukose-induzierten Ca^{2+} -Signal in Verbindung gebracht wurde (Tisi *et al.*, 2004; Tropia *et al.*, 2006). Die Kinase Arg82 phosphoryliert IP_3 zu IP_4 und IP_5 und ist damit für das Turnover von IP_3 verantwortlich. Die Deletion von *ARG82* führt zu einem erhöhten Level an IP_3 und dadurch zu einer erhöhten Ca^{2+} -Freisetzung und der damit verbundenen Pma1-Aktivierung. Die Deletion von *PLC1* hat diesbezüglich einen gegenteiligen Effekt aufgrund der gestörten IP_3 -Synthese. Eine Doppeldeletion von *ARG82* und *YVC1* führt trotz erhöhter IP_3 -Level zur Reduktion des Ca^{2+} -Signals und der Pma1-Aktivität und weist darauf hin, dass IP_3 als Signalmolekül und die Aktivierung von Yvc1 im Zusammenhang stehen (Tisi *et al.*, 2004; Tropia *et al.*, 2006; Bouillet *et al.*, 2012). Experimente an Vakuolenmembran-Vesikeln von *S. cerevisiae* deuteten bereits 1993 an, dass ein Ca^{2+} -Kanal in der Vakuolenmembran äquivalent zum endoplasmatischen und sarkoplasmatischen Retikulum in tierischen Zellen IP_3 -abhängig aktiviert wird (Belde *et al.*, 1993). Ein homologer IP_3 -Rezeptor wurde in *S. cerevisiae* bisher jedoch nicht identifiziert (Bouillet *et al.*, 2012) und eine direkte Bindung von IP_3 und Yvc1 wurde noch nicht nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung für eine indirekte Aktivierung wäre z. B. eine Komplexbildung von Yvc1 und einem Protein, das als Rezeptormolekül dient und das Signal auf Yvc1 überträgt. Weiterhin wurde gezeigt, dass nach Applikation eines hyperosmotischen Schocks die von Fab1 vermittelte Synthese von Phosphatidylinositol-3, 5-

Phosphat (PI(3, 5)P₂) ansteigt (Dove *et al.*, 1997). Die Deletion von *FAB1* führt dazu, dass keine Yvc1-vermittelte Ca²⁺-Freisetzung aus der Vakuole als Antwort auf hyperosmotischen Schock erfolgt und auch die Überexpression von *YVC1* kann diesen Effekt nicht aufheben. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aktivierung von Yvc1 von der PI(3, 5)P₂-Produktion abhängt (Duex *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2010b). PI(3, 5)P₂ interagiert mit dem C- und dem N-Terminus von Yvc1 *in vitro*, ein direkter Effekt dieses Moleküls auf die Aktivität des Kanals konnte *in vivo* jedoch nicht nachgewiesen werden (Amini, persönliche Mitteilung).

Posttranslationale Modifikation von Proteinen

Die Komplexität des Proteoms aller Organismen wird auf der Ebene der Transkription (alternatives Spleißen) (Black, 2003) und durch zahlreiche Modifikationen der Proteine nach ihrer Translation erreicht. Diese posttranslationalen Modifikationen können einerseits proteolytischer Natur sein, wobei Peptide (z. B. Signalpeptide) vom Amino- oder Carboxy-Ende des Proteins abgespalten werden. Andererseits kann es sich um chemische Modifikationen handeln, die an spezifischen Aminosäureresten der Proteine erfolgen. Verschiedene Moleküle (Zuckerreste, Phosphat-, Hydroxyl-, Methyl-, Acyl-Gruppen usw.) werden dabei dauerhaft oder reversibel in enzymatischen Reaktionen an die Proteine gebunden und können damit deren Struktur, Funktion, Stabilität und Lokalisation beeinflussen. Neben diesen Molekülen können auch kleine Proteine als posttranslationale Modifikationen dienen. Das bekannteste Protein dieser Art ist Ubiquitin, ein 9 kDa schweres Polypeptid, welches in einer enzymatisch katalysierten Reaktion kovalent an einen Lysinrest des Zielproteins gebunden wird (Melchior, 2000; Kerscher *et al.*, 2006). Neben der regulatorischen Rolle in der Endocytose, Signaltransduktion oder der DNA-Reparatur ist die zentrale und am besten untersuchte Funktion der Ubiquitinierung die Markierung des Zielproteins für den proteosomalen Abbau. Zu diesem Zweck werden Poly-Ubiquitin-Ketten ausgebildet, die direkt oder indirekt von Rezeptoren des Proteasoms erkannt werden (Elsasser *et al.*, 2002; Hochstrasser, 2009).

Im Laufe der Zeit wurden weitere Proteine identifiziert, die entweder Homologien zu Ubiquitin aufweisen oder über enzymatische Mechanismen, die der Ubiquitinierung sehr ähnlich sind, an ihre Substrate gebunden werden. Als Beispiele sind Apg8 und Apg12, Rub1 (oder Nedd8) sowie der *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) zu nennen. Nähere Untersuchungen zeigten, dass diese Ubiquitin-ähnlichen posttranslationalen Modifikationen über die Funktion der Markierung für den Proteinabbau hinausreichen und dass sie bedeutende Rollen in essentiellen physiologischen Prozessen wie Kerntransport, Signaltransduktion, Apoptose, Zellzyklus-Kontrolle usw. einnehmen (Melchior, 2000; Muller *et al.*, 2001; Kerscher *et al.*, 2006).

231st Posttranslationale Modifikation durch SUMO (*small ubiquitin-like modifier*)

SUMO-Proteine sind hoch konserviert in allen Eukaryoten zu finden und die SUMOylierung ist mit nur wenigen Ausnahmen ein essentieller Prozess. Weniger komplexe Organismen wie *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* oder *C. elegans* besitzen nur ein SUMO-Gen, Pflanzen und Vertebraten dagegen weisen mehrere SUMO-Proteine (SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3) auf. (Melchior, 2000; Johnson, 2004; Kerscher *et al.*, 2006). Trotz der relativ geringen Sequenzhomologie von 18 % zu Ubiquitin bilden Proteine der SUMO-Familie eine dreidimensionale Struktur aus, die der von Ubiquitin sehr ähnlich ist (Bayer *et al.*, 1998). Weitere Gemeinsamkeiten zur Ubiquitinierung zeigen sich im Mechanismus und den beteiligten Proteinen der enzymatischen Reaktion, in der ein proteolytisch prozessiertes SUMO-Protein an einen Lysinrest seines Substrats kovalent und reversibel gebunden wird. Dazu gehören das aktivierende Enzym E1, das konjugierende Enzym E2 und in den meisten Fällen auch eine E3-Ligase. Die Abspaltung der SUMO-Proteine vom Substrat erfolgt schließlich durch spezifische Proteasen. Die einzelnen Komponenten des SUMOylierungs-Zyklus werden im nächsten Abschnitt (232) für *S. cerevisiae* genauer beschrieben und erläutert.

Die SUMOylierung der Zielproteine erfolgt in den meisten Fällen an einem oder mehreren Lysinresten (K) eines Proteins in einem charakteristischen Peptidmotiv (Ψ KxE/D). Ψ steht dabei für eine große, aliphatische Aminosäure - Leucin, Isoleucin oder Valin. Nach dem modifizierten Akzeptorlysin und einer beliebigen Aminosäure folgt eine saure Aminosäure – Glutaminsäure (E) oder Asparaginsäure (D). Das Motiv wird von dem SUMO-konjugierenden Enzym E2 erkannt und gebunden, woraufhin die Bindung des SUMO an sein Substrat vermittelt wird. Eine Erweiterung dieses Motivs ist die phosphorylierungsabhängige SUMOylierungsstelle, in welcher nach dem eigentlichen Motiv ein phosphoryliertes Serin und Prolin folgen. In einer alternativen Erweiterung folgen nach dem Motiv negativ geladene Aminosäurereste. Beide Möglichkeiten dienen dazu, die Bindung von Substrat und E2 durch negative Ladungen zu verstärken und die SUMOylierung des Substrats damit zu regulieren (Hietakangas *et al.*, 2006; Anckar und Sistonen, 2007; Geiss-Friedlander und Melchior, 2007). Es wurde beschrieben, dass die kovalente Bindung eines einzelnen SUMO-Moleküls (~ 11 kDa) in einer SDS-PAGE zu einer Erhöhung der Molekularmasse um etwa 20 kDa führt (Johnson, 2004). In einem Substrat können Mono-SUMOylierungen von einem oder mehreren Lysinresten sowie PolySUMOylierungen eines einzelnen Lysinrests auftreten. Ähnlich wie bei Ubiquitin werden dabei PolySUMO-Ketten durch SUMOylierung von Lysinresten im SUMO-Protein gebildet (Bylebyl *et al.*, 2003; Ulrich, 2008).

Außer der kovalenten Bindung von SUMO an seine Substrate wurden auch nicht-kovalente Interaktionen an SUMO-interagierenden Motiven (SIM) beschrieben. Ein SIM besteht aus einem hydrophoben Kern, welcher C- oder N-terminal von sauren Aminosäureresten und/oder Serin begrenzt wird. Die Interaktion wird damit erklärt, dass das SIM eine β -Faltblattstruktur bildet, die parallel oder antiparallel zwischen die alpha-Helix und ein β -Faltblatt von SUMO bindet (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007; Kerscher, 2007). Eine mögliche Funktion von SIM könnte die Begünstigung von Interaktionen zwischen einem SUMOylierten Substrat und SIM-enthaltenden Proteinen sein (Minty *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2004).

Im Allgemeinen kann man vier mögliche Effekte der SUMOylierung eines Zielproteins beschreiben (Abbildung 6). Durch die Interaktion mit SUMO kann sich die Konformation des Substrats ändern, was wiederum seine Funktion und die Interaktion mit anderen Proteinen beeinflussen kann. Durch eine SUMO-vermittelte Rekrutierung von Interaktionspartnern oder die Maskierung von Bindungsstellen kann sich die SUMOylierung ebenfalls auf Protein-Protein-Interaktionen oder posttranslationale Modifikationen (z. B. Acetylierung, Phosphorylierung) seines Substrats auswirken und damit unter anderem auch seine subzelluläre Lokalisation verändern.

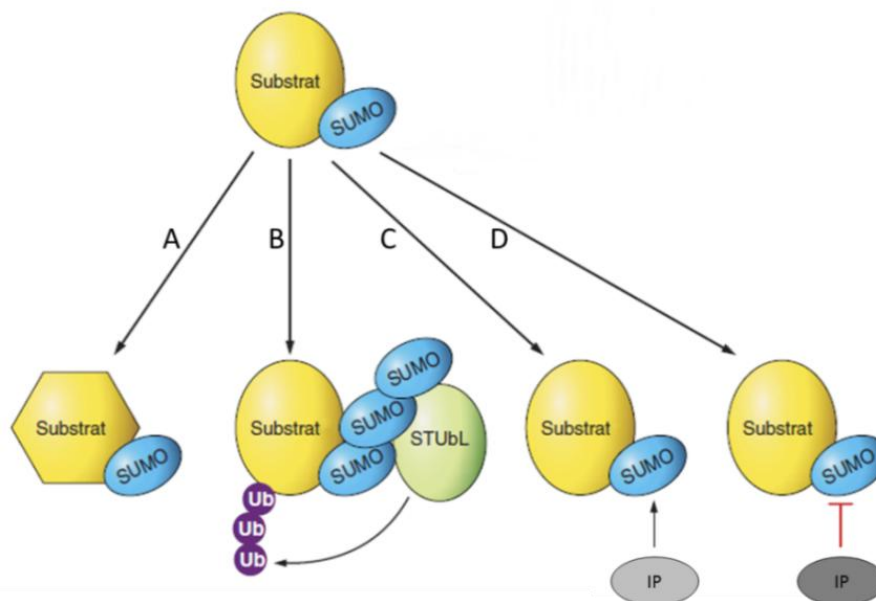


Abbildung 6: Mögliche Konsequenzen der SUMOylierung eines Zielproteins (modifiziert nach Henley *et al.*, 2014). **A:** Konformationsänderung des Zielproteins **B:** Destabilisierung durch Rekrutierung von Ubiquitin (Ub) über SUMO-gerichtete Ubiquitin-Ligasen (STUbL) **C:** Begünstigung der Bindung von Interaktionspartnern (IP) bzw. Modifikationen **D:** Verhinderung der Bindung von Interaktionspartnern (IP) bzw. Modifikationen

Alternativ kann SUMO auch einen Einfluss auf die Stabilität seines Zielproteins nehmen, einerseits positiv über die kompetitive Bindung an einen Lysinrest, welcher auch ubiquitiniert werden kann, andererseits negativ über die Rekrutierung von Ubiquitin mit Hilfe von SUMO-abhängigen Ubiquitin-Ligasen (STUbL) und die daraus resultierende Markierung für die Degradation (Muller *et al.*, 2001; Ulrich, 2005; Anckar und Sistonen, 2007; Geiss-Friedlander und Melchior, 2007; Henley *et al.*, 2014).

Die Konsequenzen der SUMOylierung für jedes einzelne Substrat sind sehr schwer vorherzusagen, da SUMOylierungs-Reaktionen innerhalb der ganzen Zelle mit einer Vielfalt von Proteinen vonstattengehen. In vielen nukleären Prozessen wie der Transkription, der DNA-Reparatur oder dem Kerntransport wird der SUMOylierung eine besonders große Rolle zugeschrieben. Aber auch im Cytoplasma, der Plasmamembran, in Mitochondrien sowie im ER befinden sich Proteine, die als SUMO-Substrate beschrieben wurden. Dabei reicht das Spektrum an SUMOylierten Proteinen von Transkriptionsfaktoren und Kernporenproteinen über Peptidasen, Kinasen und Phosphatasen bis hin zu Rezeptoren und Ionenkanälen (Geiss-Friedlander und Melchior, 2007; Wasik und Filipek, 2014).

Mehrere Studien demonstrieren, dass die SUMOylierung von Ionenkanälen verschiedene Aspekte neuronaler Aktivität wie die Erregbarkeit sowie die synaptische Transmission beeinflusst. Ein Beispiel dafür ist der in der Plasmamembran lokalisierte Kalium-selektive Leckkanal K2P1, der hauptsächlich im Gehirn, Herz und den Nieren exprimiert wird. Es wurde gezeigt, dass die SUMOylierung des Kanals am Lysinrest 274 diesen inhibiert und die Mutation dieses Lysinrests zu einem Glutamin-, Arginin-, Glutamat-, Aspartat-, Cystein- oder Alaninrest zu einem konstitutiv offenen Kanal führt (Rajan *et al.*, 2005; Plant *et al.*, 2010). Mehrere Mitglieder einer Proteinfamilie von spannungsgesteuerten Kaliumkanälen wurden ebenfalls als SUMO-Substrate beschrieben. Kv2.1 wird in erregbaren Zellen vieler Organe wie Gehirn, Muskeln und Herz exprimiert und die SUMOylierung sowie DeSUMOylierung dieses Kanals reguliert seine Spannungsabhängigkeit und damit die Erregbarkeit der entsprechenden Zellen (Plant *et al.*, 2011). Kv1.5 ist unter anderem in atrialen Herzmuskelzellen zu finden und ist der Haupt-Kaliumkanal, der hier für die Repolarisation nach einem Aktionspotential verantwortlich ist. Seine SUMOylierung führt zur Inaktivierung des Kanals, wodurch die Wiederherstellung des Membranpotentials verhindert wird, was zu einer Verminderung der Aktionspotential-Frequenz führt (Benson *et al.*, 2007). Ein Mausmodell zur Entwicklung von spontanen Krampfanfällen, kardialen Anomalien und SUDEP (*sudden unexpected death in epilepsy*) zeigte, dass die HyperSUMOylierung von Kv7-Kanälen (Kv7.2/Kv7.3) aufgrund einer fehlerhaften DeSUMOylierungs-Protease (SEN2) für diese Symptome verantwortlich ist (Qi *et al.*, 2014). Die SUMOylierung von TRPM4, einem Protein

aus der Familie der TRP-Ionenkanäle, wurde von Kruse und seinen Mitarbeitern mit der Entwicklung einer kardialen Reizleitungsstörung (*progressive familial heart block type I*, PFHBI) in Verbindung gebracht. TRPM4 ist ein spannungsgesteuerter, nicht-selektiver Kationen-Kanal, der impermeabel für Ca^{2+} -Ionen ist. Solange TRPM4 in SUMOylierter Form vorliegt, ist er in der Plasmamembran lokalisiert. Sobald der Kanal deSUMOyliert wird, wird er mittels Endozytose und anschließender proteasomaler Degradation abgebaut. Eine Mutation in TRPM4 (E7K) in PFHBI-Patienten führt zu einer konstitutiven SUMOylierung des Proteins, wodurch seine Internalisation und Degradation verhindert wird (Kruse *et al.*, 2009).

232. SUMOylierung in *S. cerevisiae*

Als erstes Mitglied der SUMO-Proteinfamilie wurde Smt3 in *S. cerevisiae* beschrieben (Meluh und Koshland, 1995). Es handelt sich dabei um das einzige SUMO-Protein in *S. cerevisiae*, ein essentielles Protein mit einer Molekularmasse von etwa 11 kDa und einer Sequenzhomologie zu Ubiquitin von 17 %. Wie auch in anderen Organismen erfüllen Smt3 und der Prozess der SUMOylierung in *S. cerevisiae* wichtige Rollen bei einer Vielzahl von zellulären Vorgängen. Die Regulation des Zellzyklus, des Kerntransports und der Transkription sowie einige weitere Aufgaben der SUMOylierung wurden in *S. cerevisiae* bereits untersucht (Johnson und Blobel, 1999; Johnson, 2004). Hochdurchsatzstudien des SUMOylierten Proteoms in *S. cerevisiae* (Panse *et al.*, 2004; Hannich *et al.*, 2005) deuten jedoch auch auf weitere Prozesse hin, an welchen die SUMOylierung beteiligt ist. Weitere Untersuchungen weisen auf eine Mitwirkung der SUMOylierung an der Adaptation an Stressfaktoren hin. Es wurde gezeigt, dass die GesamtSUMOylierung oder die SUMOylierung bestimmter Proteine in den Zellen nach Applikation von hyperosmotischem Stress (Abu Irqeba *et al.*, 2014), Ethanol- oder oxidativem Stress (Zhou *et al.*, 2004; Sydorsky *et al.*, 2010) sowie bei DNA-Schäden (Cremona *et al.*, 2012) ansteigt.

Ähnlich der Ubiquitinierung und SUMOylierung in anderen Organismen wird Smt3 unter Beteiligung von E1-, E2- und E3-Enzymen in einer ATP-abhängigen Reaktion kovalent an seine Substrate gebunden. Die anschließende Abspaltung des Smt3 durch die Aktivität der spezifischen Proteasen macht die SUMOylierung und DeSUMOylierung zu einem dynamischen Prozess (Melchior, 2000; Johnson, 2004) (Abbildung 7).

Smt3 wird als Vorläuferprotein synthetisiert, das von der Protease Ulp1 prozessiert wird. Im Verlauf der Prozessierung wird C-terminal ein Peptid von Smt3 abgespalten, sodass ein G-G-Motiv exponiert ist. Für die nachfolgende ATP-abhängige Aktivierung des reifen Smt3 wird das heteromere E1-Enzym benötigt, welches aus Aos1 und Uba2 besteht. Während der

Aktivierung wird eine Thioester-Bindung zwischen dem aktiven Cysteinrest der Untereinheit Uba2 und dem C-terminalen Glycinrest von Smt3 ausgebildet (Johnson *et al.*, 1997). Das aktivierte Smt3 wird daraufhin auf das E2-Enzym Ubc9 transferiert, wodurch ein Smt3-Ubc9-Thioester-Intermediat entsteht (Johnson und Blobel, 1997). Im letzten Schritt der SUMOylierung vermittelt Ubc9 den Transfer von Smt3 auf einen Lysinrest eines Substrats. Obwohl die Anwesenheit einer E3-Ligase für diesen Schritt nicht zwingend notwendig ist, sind die meisten SUMOylierungsreaktionen in *S. cerevisiae* E3-abhängig (Johnson und Gupta, 2001).

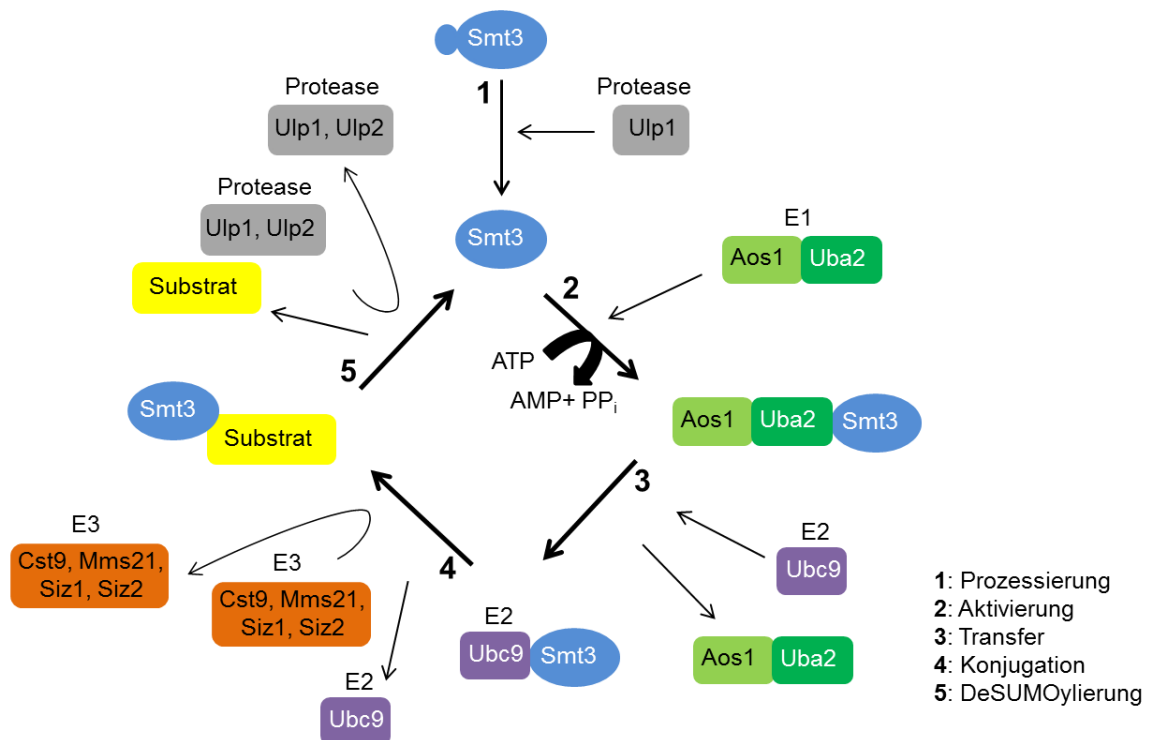


Abbildung 7: Der SUMO-Zyklus in *S. cerevisiae*. (1) Smt3 wird als Vorläuferprotein synthetisiert und an dem konservierten Gly-Gly-Motiv C-terminal prozessiert. (2) Das reife Protein wird in einem ATP-abhängigen Schritt aktiviert, indem zwischen dem E1-Heterodimer Aos1/Uba2 und dem C-terminalen Glycinrest von Smt3 ein Thioester ausgebildet wird. (3) Anschließend wird Smt3 durch erneute Ausbildung einer Thioester-Bindung auf das E2-Enzym Ubc9 transferiert. (4) Ubc9 vermittelt schließlich den Transfer von Smt3 auf einen Lysinrest des Substrats. Dieser Schritt läuft meist in Anwesenheit einer der vier E3-Ligasen ab. (5) Schließlich erfolgt die DeSUMOylierung des Substrats durch eine SUMO-spezifische Protease Ulp1 oder Ulp2.

Bisher wurden vier E3-Ligasen in *S. cerevisiae* identifiziert - Cst9, Mms21, Siz1 und Siz2 (Nfi1). Die drei letzteren gehören der PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*)-Proteinfamilie an. Sie zeichnen sich durch eine Adaptordomäne aus, die das E2-Enzym und das Substrat gleichzeitig bindet und damit den Transfer von Smt3 auf das Substrat begünstigt (Takahashi, 2003; Zhao und Blobel, 2005). Die DeSUMOylierung des Substrats erfolgt durch eine der

beiden in *S. cerevisiae* beschriebenen SUMO-spezifischen Proteasen – Ulp1 und Ulp2. Die beiden Proteasen unterscheiden sich nach bisherigen Kenntnissen in ihrer Funktion und Lokalisation. Während Ulp1 sowohl für die Prozessierung des Vorläufer-Smt3 als auch für seine Abspaltung vom Substrat verantwortlich ist, ist Ulp2 lediglich an der DeSUMOylierung beteiligt (Li und Hochstrasser, 2000; Bylebyl *et al.*, 2003). Es wurde gezeigt, dass Ulp1 mit dem Kernporenkomplex colokalisiert ist, wohingegen sich die Lokalisation von Ulp2 vorwiegend auf den Kern beschränkt (Johnson, 2004). Neben Smt3 selbst sind die meisten für den SUMO-Zyklus notwendigen Proteine essentiell – Aos1, Uba2, Ubc9, die E1- und E2-Enzyme (Johnson *et al.*, 1997), Mms21, eines der E3-Enzyme (Johnson und Gupta, 2001; Zhao und Blobel, 2005; Cheng *et al.*, 2006), sowie Ulp1, eine der beiden Proteasen (Johnson, 2004). Die oben bereits beschriebene Ausbildung von PolySUMO-Ketten erfolgt in *S. cerevisiae* an drei verschiedenen Lysinresten von Smt3 (K11, K15, K19) (Bylebyl *et al.*, 2003). Die Mutation dieser Lysinreste zu Argininresten führt dazu, dass die Bildung von PolySUMOylierungen ausbleibt.

Die Bedeutung von Protein-Protein-Interaktionen

Ein besseres Verständnis von Proteinfunktionen und der damit verbundenen zellulären Prozesse, ist ein Hauptziel der Biologie. Da Proteine ihre Funktion meistens in Komplexen oder durch transiente, physikalische Interaktionen mit anderen Proteinen ausüben, werden Protein-Protein-Interaktionen (PPI) und ihr Netzwerk (Interaktom) identifiziert und eingehend untersucht. Sei es z. B. das Spleißosom bei der Genexpression (Neubauer *et al.*, 1998), der Kernporenkomplex (Hoelz *et al.*, 2011) oder das Translokon im ER bei der Proteinsynthese (Erdmann *et al.*, 2010), in allen essentiellen Vorgängen der eukaryotischen Zelle erfüllt ein Zusammenspiel von Proteinen seine Funktion. Die Aufklärung des Interaktoms des Menschen und von Modellorganismen wie *D. melanogaster* oder *S. cerevisiae* sind aus diesem Grund im Fokus der Wissenschaft (Uetz *et al.*, 2000; Giot *et al.*, 2003; Pastrello *et al.*, 2014). Bioinformatische Analysen, die sich auf die phylogenetischen Profile, Proteinsequenzen usw. stützen, können PPI *in silico* vorhersagen (Kotlyar *et al.*, 2015). Weiterhin wurden zahlreiche Methoden entwickelt, um PPI *in vitro* und *in vivo* zu analysieren. Dazu gehören beispielsweise Zwei-Hybrid-Techniken, Proteinfragment-Komplementationen und direkte Detektionstechniken mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET). Außerdem können Methoden wie Protein-Array-Techniken, Tandemaffinitätsreinigungen und Co-Immunpräzipitationen mit einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse kombiniert und in Hochdurchsatzverfahren angewendet werden (Piehler, 2005; Lalonde *et al.*, 2008; Dunham *et al.*, 2012).

Die funktionelle Organisation des Proteoms in *S. cerevisiae* wurde schon in einigen Studien mittels verschiedener Techniken untersucht (Uetz *et al.*, 2000; Gavin *et al.*, 2002; Tarassov *et al.*, 2008). Die beschriebenen Netzwerke sind allerdings noch lange nicht vollständig und konzentrieren sich hauptsächlich auf PPI der löslichen Proteine der Zelle. Membranproteine sind mit ihren vielfältigen Aufgaben wie dem Transport von Ionen und Molekülen oder der inter- und intrazellulären Signaltransduktion essentielle Komponenten des Interaktoms und ihre Interaktionen müssen ebenfalls aufgeklärt werden. In *S. cerevisiae* wurden globale Untersuchungen der PPI von Membranproteinen unter Verwendung modifizierter Methoden wie des Split-Ubiquitin-Systems oder der Zugabe von Detergenzien während der Tandemaffinitätsreinigung bereits durchgeführt (Miller *et al.*, 2005; Babu *et al.*, 2009).

Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des TRP-homologen Kanals Yvc1 in *S. cerevisiae* hinsichtlich seiner intrazellulären Interaktionen und der daraus resultierenden Regulationsmechanismen. Bisherige Studien haben unter Verwendung verschiedener Methoden eine Verbindung zwischen Yvc1 und der posttranslationalen Modifikation durch SUMO hergestellt (Chang, 2010; Amini, 2013). In dieser Arbeit sollte die bereits beschriebene *in vitro* SUMOylierung der terminalen Domänen von Yvc1 bestätigt und optimiert werden. Durch eine massenspektrometrische Analyse der SUMOylierten Substrate sowie weitere *in vitro* Experimente mit mutierten Yvc1-Fragmenten sollten die SUMO-Akzeptorlysine identifiziert werden. Die SUMOylierung von Yvc1 und der Verlust der SUMOylierung nach der Mutation der identifizierten SUMO-Akzeptorlysine sollten anschließend auch *in vivo* nachgewiesen werden. Die phänotypischen Auswirkungen der fehlenden SUMOylierbarkeit von Yvc1 sollten *in vivo* im Hinblick auf die Lokalisation und Aktivität des Kanals sowie bezüglich der Toleranz der Zellen gegenüber unterschiedlichen Stressfaktoren untersucht werden. Da bisher wenig darüber bekannt ist, mit welchen Proteinen Yvc1 interagiert oder womöglich *in vivo* als Komplex vorliegt, wurde außerdem mittels Co-Reinigung des Zielproteins und seiner assoziierten Proteine (Tandemaffinitätsreinigung und Co-Immünpräzipitation) mit einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse nach Interaktionspartnern von Yvc1 gesucht.

Material und Methoden

Material

301. Geräte

Autoklav V-150, V-2540EL (Systec, Wetzlar)

Behälter für Flüssigstickstoff, Isotherm KGW (Pequannock, USA)

Brutschränke (Mettler, Schwabach)

DNA-Imager, Image Master (Pharmacia Biotech Amersham, München)

Eisbad (Neolab, Heidelberg)

Eismaschine (Ziegra, Hannover)

Feinwaage BP61 und Extend (Sartorius, Göttingen)

Gel-Gießschlitten und Elektrophorese-Kammern für Agarose-Gele (PEQLAB, Erlangen)

Gilson-Pipetten (Abimed, Düsseldorf)

Hamilton MICROLITER Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz)

Heizblock Thermomixer Compact, Thermomixer 5436, Thermomixer 5320 (Eppendorf, Hamburg)

Kühlschrank Liebherr Comfort (Liebherr, Ochsenhausen)

Kühlzentrifuge Centrifuge 5417R (Eppendorf, Hamburg)

Kühlzentrifuge GS-6KR Centrifuge und J2-M Centrifuge (Beckman Coulter, Fullerton, USA)

Leuchttisch Prolite Basic (KAISER, Buchen)

Lumi Fusion SL Advance Multi-Imagingssystem (PEQLAB, Karlsruhe)

Luminometer, microplate reader, Infinite M200 (TECAN, Männedorf, Schweiz)

Magnetrührer MR3002 und MR3000 (Heidolph, Schwabach)

Mikroskop Zeiss Axio Scope (Carl Zeiss, Göttingen)

Mikrowellenherd Panasonic (Panasonic, Kadoma, Japan)

Mini-PROTEAN tetra Electrophoresis Cell (Gießapparatur für SDS-Polyacrylamidgele, Glasplatten, Spacer, Kämme, Apparatur zum Lauf von SDS-Gelen) (Biorad, München)

Mini-Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Apparatur zum Blotting von SDS-Gelen) (Biorad, München)

Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer (PEQLAB, Karlsruhe)

pH-Meter Mikroprozessor pH-Meter pH 537 (WTW, Weilheim)

Photometer Ultraspec 3000 (Amersham Bioscience, München)

Planeten-Monmühle PULVERISETTE 6 classic line, Mahlbecher mit Dichtung (FRITSCH, Idar-Oberstein)

Precellys24 (PEQLAB, Karlsruhe)
Rotoren für Kühlzentrifuge JA10, JA25.50 (Beckman, Fullerton, USA)
Scanner Image Scanner III (GE Healthcare, Freiburg)
Spannungsgerät Power Pac 200 und Power Pac 300 (Biorad, München)
Sterilbank (Fröbel Laborgeräte, Lindau)
Thermocycler Primus 96 (PEQLAB, Karlsruhe)
Tiefkühlschrank Comfort (Liebherr, Ochsenhausen)
Tiefkühltruhe HeraFreeze (Heraeus, Hanau)
Tischzentrifuge Eppendorf 5415C (Eppendorf, Hamburg)
Typhoon Trio (GE Healthcare, Freiburg)
UV-Tisch (PEQLAB, Karlsruhe)
Vakuumkonzentrator CON-100, Vakuumpumpe CON-JET (LTF Labortechnik, Wasserburg)
Vortex-Mixer Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, USA)
Wasseraufbereitungsanlage Milli-QPlus 185 (Merck Millipore, Hessen)
Wasserbad Julabo V (Julabo, Seelbach)
Wipptisch Shaker Drs-12 (Elmi, Riga, Lettland)
XCell SureLock Mini-Cell, Apparatur zum Lauf von SDS-Gelen (Thermo Scientific, Waltham, USA)

302. Verbrauchsmaterialien

(Ultra-) Zentrifugenbecher aus Polycarbonat oder Polypropylen (Beckman, München)
Deckgläser Menzel Gläser (Gerhard Menzel, Braunschweig)
Einmalspitzen (Sarstedt, Nümbrecht)
Glaskügelchen (Sigma-Aldrich, München)
Glaswaren (Schott AG, Mainz)
Küvetten 10 mm (Sarstedt, Nümbrecht)
Mikroschraubröhren SafeSeal micro tube 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht)
Mikrotiter-Platten 96-well (Sarstedt, Nümbrecht)
NuPAGE Novex Bis-Tris Protein Gele, 10 % und 4-12 %, 1,0 mm, 10-well (Thermo Scientific, Waltham, USA)
Objektträger Menzel Gläser (Gerhard Menzel, Braunschweig)
Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA)
Pasteurpipetten (VWR, Darmstadt)
PCR-Reaktionsgefäße (Greiner Bio-One, Frickenhausen)
Petrischalen (Greiner Bio-One, Frickenhausen)

Polyprep Chromatographie-Säule 10 ml (Biorad, München)
PVDF-Membran Roti-PVDF 0,45 µM (Carl Roth, Karlsruhe)
Reaktionsgefäße: 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht) und 2 ml (Eppendorf, Hamburg)
Schraubröhrchen 15 ml und 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht)
Spritzenfilter 0,22 µm Rotilabo (Carl Roth, Karlsruhe)
Sterilfilter Nalgene Rapid-Flow (Thermo Scientific, Waltham, USA)
Transfermembran 0,45 µM Roti-PVDF (Carl Roth, Karlsruhe)
Whatman 3MM-Papier (Whatman, Kent, UK)
ZEBA Entsalzungssäulen (Thermo Scientific, Waltham, USA)

303. Enzyme

Alkalische Phosphatase (Roche, Mannheim)
Klenow-Polymerase (Thermo Scientific, Waltham, USA)
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB, Frankfurt)
Restriktionsenzyme (Thermo Scientific, Waltham, USA bzw. NEB, Frankfurt)
RNase A (Roche, Mannheim)
T4-DNA-Ligase (Thermo Scientific, Waltham, USA)
Taq-DNA-Polymerase (NEB, Frankfurt)
Zymolyase (ICN Biochemicals, Costa Mesa, USA)

304. Chemikalien und Biochemikalien

Biotool, München: Protein A/G-Sepharose
Carl Zeiss, Göttingen: Immersionsöl "Immersol" 518 F fluorescence free
Eurofins MWG Operon, Ebersberg: Oligonukleotide
Fluka, Taufkirchen: Agar, L-Cystein, N-Ethylmaleinimid,
GeneON, Ludwigshafen: GelRED Fluoreszenzfarbstoff
General Electric Healthcare, Freiburg: Adenosintriphosphat, GSH-Sepharose, IgG-Sepharose, Calmodulin-Sepharose
Merck, Darmstadt: Ammoniumacetat, Ammoniumsulfat, Di-Natriumhydrogenphosphat, Ethylendiamintetraessigsäure, Ethylenglycol-bisaminoethylether-tetraessigsäure, Glycerin, Kaliumchlorid, Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Trichloressigsäure, Tris, β-Mercaptoethanol, S-Protein-Agarose
Peptide Institute Inc., Osaka, Japan: Pepstatin A, Antipain, Chymostatin, Leupeptin
Qiagen, Hilden: Nickel-NTA-Agarose
Remel, Lenexa, USA: Bakto-Trypton, Hefe-Extrakt, Bakto-Agar, Yeast Nitrogen Base

Roche, Mannheim: dNTP-Mix (je 10 mM), Protease Inhibitor Cocktail Tabletten (EDTA-frei)

Serva Electrophoresis, Heidelberg: Ammoniumperoxodisulfat, Harnstoff, Saccharose, Natriumdodecylsulfat, Triton X-100

Sigma-Aldrich, München: Ampicillin, Kanamycin, β -Mercaptoethanol, Bis-Tris, Dextrose, Dimethylsulfoxid, Geneticin, Glutathion, Polyethylenglycol 3300, Lachssperma-DNA, Lithiumacetat, 1,4-Phenylendiamin, Raffinose, Tween 20, Uracil, alle Aminosäuren außer L-Cystein

Thermo Scientific, Waltham, USA: NuPAGE LDS Sample Buffer (4x), Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid, PageRuler Prestained Protein Ladder, PageRuler Unstained Protein Ladder, 1 kb DNA-Leiter

VWR International, Darmstadt: Aceton, Glycin, Methanol, Sorbitol

Die hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Roth aus Karlsruhe bezogen.

305. Kits

QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden)

QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Hilden)

QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Waldbronn)

Rapid DNA ligation kit (Thermo Scientific, Waltham, USA)

SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, Waltham, USA)

SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Waltham, USA)

SureClean DNA purification kit (Bioline, Luckenwalde)

306. Software

Axiovision, Mikroskop-Software (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena)

ImageQuant 5.1, Quantifizierung (General Electric Healthcare, Freiburg)

Lumi Fusion, Analyse- und Steuerungssoftware (PEQLAB, Karlsruhe)

Microplate reader software, i-control 1.7, (TECAN Männedorf, Schweiz)

Origin 9.1 Pro, Datenanalyse (Northampton, USA)

Scaffold 4, MS Datenanalyse (Oregon, USA)

Medien

311. Medien zur Kultivierung von *E. coli* und Antibiotika**LB-Medium**

LB-Medium	25 g
-----------	------

in 1 l H₂O_{dest.} unter Rühren lösen, autoklavieren

LB-Agarplatten

LB-Medium	25 g
-----------	------

Bakto-Agar	15 g
------------	------

in 1 l H₂O_{dest.} unter Rühren lösen, autoklavieren, auf 50 °C abkühlen lassen und in Petrischalen gießen

TB-Medium

TB-Medium	50 g
-----------	------

Glycerin	8 ml
----------	------

in 1 l H₂O_{dest.} unter Rühren lösen, autoklavieren

2YT-Medium

2YT-Medium	31 g
------------	------

in 1 l H₂O_{dest.} unter Rühren lösen, autoklavieren

NZY⁺-Medium

NZ Amine	10 g
----------	------

Bakto-Hefeextrakt	5 g
-------------------	-----

NaCl	5 g
------	-----

in 1 l H₂O_{dest.} lösen, autoklavieren, folgende sterilfiltrierte Komponenten hinzufügen

MgCl ₂ (1 M Stammlösung)	12,5 ml
-------------------------------------	---------

MgSO ₄ (1 M Stammlösung)	12,5 ml
-------------------------------------	---------

Glukose	2 % (w/v)
---------	-----------

Antibiotika

Die Stammlösungen werden in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt (Endkonz. 1 mM).

Ampicillin	100 mg
------------	--------

in 1 ml H₂O_{dest.} lösen, sterilfiltrieren, bei -20 °C lagern

Kanamycin	25 mg
-----------	-------

in 1 ml H₂O_{dest.} lösen, sterilfiltrieren, bei -20 °C lagern

312. Medien zur Kultivierung von *S. cerevisiae***Glukose-Lösung (20 %)**

Glukose	200 g
---------	-------

in 1 l H₂O_{dest.} lösen, autoklavieren

YPD_{Ade}-Medium

Pepton	20 g
--------	------

Hefeextrakt	10 g
-------------	------

Glukose	20 g
---------	------

Adenin (30 mM Stammlösung)	5,5 ml
----------------------------	--------

in 1 l H₂O_{dest.} lösen, autoklavieren

YPD_{Ade}-Agarplatten

Pepton	20 g
--------	------

Hefeextrakt	10 g
-------------	------

Glukose	20 g
---------	------

Bakto-Agar	20 g
------------	------

Adenin (30 mM Stammlösung)	5,5 ml
----------------------------	--------

in 1 l H₂O_{dest.} lösen, autoklavieren und in Petrischalen gießen

Zur Selektion über Kanamycin wird G418 (Geneticin) zugegeben (Endkonz. 200 µg/ml).

Synthetisch definiertes (SD)-Medium

Hefe-Stickstoffbase mit Ammoniumsulfat	6,7 g
--	-------

Aminosäuremischung (-2, -4)	2 g
-----------------------------	-----

Aminosäurelösung	10 ml/Aminosäure
------------------	------------------

in 900 ml H₂O_{dest.} lösen, autoklavieren

vor Gebrauch 100 ml 20 % Glukose zugeben

Synthetisch definierte (SD)-Agarplatten:

1. Hefe-Stickstoffbase mit Ammoniumsulfat 6,7 g

Aminosäuremischung (-2, -4)	2 g
-----------------------------	-----

Aminosäurelösung	10 ml/Aminosäure
------------------	------------------

in 150 ml H₂O_{dest.} lösen, autoklavieren

2. Agar 20 g

in 750 ml H₂O_{dest.} lösen, autoklavieren

1. und 2. vereinigen, 100 ml 20 % Glukose zugeben und in Petrischalen gießen

Aminosäuremischungen

Tabelle 1: Komponenten zur Herstellung der verschiedenen Aminosäuremischungen

Aminosäure	Menge	Aminosäure	Menge	Aminosäure	Menge
Adeninsulfat	5 g	Glycin	10 g	Serin	10 g
Alanin	10 g	Histidin	10 g	Threonin	10 g
Arginin	10 g	Isoleucin	10 g	Tryptophan	10 g
Asparagin	10 g	Leucin	50 g	Tyrosin	10 g
Asparaginsäure	10 g	Lysin	10 g	Valin	10 g
Cystein	10 g	Methionin	10 g	<i>myo</i> -Inositol	10 g
Glutamin	10 g	Phenylalanin	10 g	<i>para</i> -Aminobenzoesäure	1 g
Glutaminsäure	10 g	Prolin	10 g	Uracil	10 g

In der Aminosäuremischung -2 fehlen Leucin und Uracil. In der Aminosäuremischung -4 fehlen Histidin, Leucin, Tryptophan sowie Uracil.

Aminosäurelösungen

Tabelle 2: Komponenten zur Herstellung der Aminosäure-Stammlösungen

Aminosäure	Konzentration [g/200ml]	Konzentration [mM]
Adenin	1,1	30
Histidin	4,2	100
Leucin	2,63	100
Tryptophan	1,64	40
Uracil	0,45	20

Die Aminosäuren werden in 200 ml H₂O_{dest.} gelöst und anschließend steriltrifert.

Organismen

Bakterienstämme

Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Stämme

GSB	Name	Genotyp/Plasmid	Referenz
---	XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁺ <i>proAB laqI^q lacZΔM15 Tn10</i>] (Tet ^R)	Stratagene, Waldbronn
98	JM101	<i>supE thi-Δ (lac-proAB)</i> [F ⁺ <i>traD36 proAB laqI^q lacZΔM15</i>]	Stratagene, Waldbronn
105	BL21 (DE3)	<i>pLysS F- dcm ompT hsdSB (rB-mB-) gal λ(DE3)</i> [pLysS (CamR)]	NEB, Frankfurt
106	BL21 (DE3) pET28a-AOS1	<i>pLysS F- dcm ompT hsdSB (rB-mB-) gal λ(DE3)</i> [pET28a-AOS1 (KanR)] [pET11a-UBA2 (AmpR)]	K. Stade, Berlin

Hefestämme

Tabelle 4: Verwendete *S. cerevisiae*-Stämme

GSY	Genotyp	Referenz
170	MATa <i>trp1-1 ura3-1 leu2-3, 112 ade2-1 his3-11, 15 kan1-100</i> (W303)	G. Fink L4852
171	MATα <i>trp1Δ63 ura3-1 leu2-3, 112 ade2-1 his3-11, 15 kan1-100</i> (W303)	G. Fink L4884
1130	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63his3Δ200 YVC1-S-TEV-ZZ::HIS3 MX6</i>	Laborkollektion
1179	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 trp1Δ63 YVC1::TRP1</i>	Laborkollektion
1180	MATa <i>ura3-1 leu2-3,112 ade2-1 his3-11,15 kan1-100trp1-1 YVC1::TRP1</i>	Laborkollektion
1255	MATa <i>trp1Δ63 his3Δ200 leu2-3,112 lys2-810 ura3-52ulp2-1</i> [IS18-M2]	(Schwienhorst <i>et al.</i> , 2000)
1437	MATa <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0KAP114-TAP::HIS3</i>	Laborkollektion
1517	MATa <i>trp1-1 ura3-1 leu2-3, 112 ade2-1 his3-11, 15 kan1-100YVC1-TAP::KANMX3</i>	Laborkollektion

Antikörper

Primäre Antikörper**Tabelle 5: Verwendete primäre Antikörper**

Antigen	Tier	Verdünnung für Western Blot	Typ	Referenz
Aequorin	Kaninchen	1:1000	polyklonal	Abcam, Cambridge, UK
GFP	Kaninchen	1:1000	polyklonal	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA
GST	Kaninchen	1:1000	polyklonal	Laborkollektion
Nup2	Kaninchen	1:1000	polyklonal	Laborkollektion
Smt3	Kaninchen	1:1000	polyklonal	Laborkollektion
Yvc1	Ratte	1:500	monoklonal	Pharmakologie, Homburg
Yvc1	Kaninchen	---	polyklonal	Laborkollektion

Sekundäre Antikörper**Tabelle 6: Verwendete sekundäre Antikörper**

Antigen	Tier	Verdünnung für Western Blot	Referenz
Kaninchen IgG (Cy5)	Ziege	1:5000	GE Healthcare, Freiburg
Kaninchen IgG (POD)	Ziege	1:1000	Santa Cruz Biotech., Santa Cruz, USA
Ratte IgG (POD)	Ziege	1:1000	Sigma-Aldrich, München

Plasmide

Tabelle 7: Verwendete Plasmide

pGS	Selektion in <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	Bezeichnung	Referenz
36	<i>AMP^R HIS3</i>	pRS423 (2μ Plasmid)	(Christianson <i>et al.</i> , 1992)
38	<i>AMP^R LEU2</i>	pRS425 (2μ Plasmid)	(Christianson <i>et al.</i> , 1992)
39	<i>AMP^R URA3</i>	pRS426 (2μ Plasmid)	(Christianson <i>et al.</i> , 1992)
43	<i>AMP^R URA3</i>	pRS316 (CEN Plasmid)	(Sikorski und Hieter, 1989)
237	<i>AMP^R URA3</i>	pVT 103-U (2μ, <i>ADH1</i> -Promotor-Plasmid)	(Vernet <i>et al.</i> , 1987)
804	<i>AMP^R</i>	pGEX-4T-TEV	Laborkollektion
805	<i>AMP LEU2</i>	YE _p 351-pCUP1	Laborkollektion
1785	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-N	Laborkollektion
1786	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-C	Laborkollektion
1864	<i>AMP^R</i>	pRET3a- <i>His6-TEVS219V</i>	E. Conti, Martinsried
1975	<i>AMP^R</i>	pET21b- <i>UBC9-HIS6</i>	K. Stade, Berlin
2000	<i>AMP^R URA3</i>	pRS426-YVC1-GFP	Laborkollektion
2001	<i>AMP^R URA3</i>	pRS426-YVC1-HA	Laborkollektion
2004	<i>AMP^R</i>	pET-SMT3 K11, 15, 19R	E. Johnson, Regina, Kanada
2012	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-N ₀	Laborkollektion
2014	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-C ₀	Laborkollektion
2036	<i>AMP^R LEU2</i>	YE _p 181-pCUP1- <i>His7-SMT3</i>	H. Ulrich, London
2062	<i>AMP^R URA3</i>	pRS316-YVC1	Laborkollektion
2080	<i>AMP^R</i>	pMAL-C ₂ -YVC1-N ₀ K212R	Laborkollektion
2142	<i>AMP^R URA3</i>	pRS316-YVC1 K212R	Laborkollektion
2149	<i>AMP^R LEU2</i>	pEVPII-AEQ89 (<i>ADH1</i> -Aequorin)	A. Bertl, Darmstadt

2150	<i>AMP^RURA3</i>	pKC147-2 μ PMA1-Aequorin	A. Bertl, Darmstadt
2169	<i>AMP^R HIS3</i>	pRS423-UBC9	Laborkollektion
2184	<i>AMP^R URA3</i>	pRS426-YVC1-GFP K212R	Laborkollektion
2215	<i>AMP^R</i>	pQE30-NF1 1-422	Laborkollektion
2276	<i>AMP^R</i>	pFA6a-TAP-KAN (TAP-tag Integrationsvektor)	V. Panse, Zürich, Schweiz
2310	<i>AMP^RURA3</i>	pCUP1-His6-SMT3	B. Palancade, Paris
2311	<i>AMP^R LEU2</i>	pCUP1-His6-SMT3	B. Palancade, Paris
2340	<i>AMP^R</i>	pEX-A2-YVC1-N 5/13 KR	Gensynthese eurofins
2341	<i>AMP^R</i>	pEX-A2-YVC1-N 10/13 KR	Gensynthese eurofins
2342	<i>AMP^R</i>	pEX-A2-YVC1-C 4/18 KR	Gensynthese eurofins
2343	<i>AMP^R</i>	pEX-A2-YVC1-C 8/18 KR	Gensynthese eurofins
2344	<i>AMP^R</i>	pEX-A2-YVC1-C 10/18 KR	Gensynthese eurofins
2352	<i>AMP^R</i>	pEX-A2-YVC1-N KR Cluster +K212R	Gensynthese eurofins

Tabelle 8: In dieser Arbeit hergestellte Plasmide

pGS	Selektion in <i>E. coli</i> und <i>S. cerevisiae</i>	Bezeichnung	Vektor	Insert
2332	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-N ₀ K212R	pGS804 EcoRI/SalI	pGS2080 EcoRI/SalI
2333	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-N K73R	Mutagenese-PCR von pGS1785, Oligos 1109+1110	
2334	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-N ₀ K73,212R	Mutagenese-PCR von pGS2332, Oligos 1109+1110	
2335	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-C K547R	Mutagenese-PCR von pGS1786, Oligos 1113+1114	
2336	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-C K599R	Mutagenese-PCR von pGS1786, Oligos 1111+1112	
2337	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-C K547,599R	Mutagenese-PCR von pGS2336, Oligos 1113+1114	

2338	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-N K212R	pGS804 <i>EcoRI/XhoI</i>	PCR2332, Oligos 721+722 <i>EcoRI/XhoI</i>
2339	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-N K73,212R	pGS804 <i>EcoRI/XhoI</i>	PCR2334, Oligos 721+722 <i>EcoRI/XhoI</i>
2345	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-N 5/13 KR	pGS1785 <i>SphI/XhoI</i>	pGS2340 <i>SphI/XhoI</i>
2346	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-N 10/13 KR	pGS1785 <i>SphI/XhoI</i>	pGS2341 <i>SphI/XhoI</i>
2347	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-C 4/18 KR	pGS804 <i>BamHI/XhoI</i>	pGS2342 <i>BamHI/SalI</i>
2348	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-C 8/18 KR	pGS804 <i>BamHI/XhoI</i>	pGS2343 <i>BamHI/SalI</i>
2349	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-C 10/18 KR	pGS804 <i>BamHI/XhoI</i>	pGS2344 <i>BamHI/SalI</i>
2353	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-N KR Cluster + K212R	pGS1785 <i>SphI/XhoI</i>	pGS2352 <i>SphI/XhoI</i>
2354	<i>AMP^R</i>	pGEX-4TEV-YVC1-N KR Cluster	pGS1785 <i>SphI/BseRI</i>	pGS2353 <i>SphI/BseRI</i>
2359	<i>AMP^RURA3</i>	pRS316-YVC1 ohne <i>XhoI</i> - Restriktionsstelle	pGS2062 <i>XhoI</i> , Behandlung mit Klenow-Polymerase und Religation	
2360	<i>AMP^RURA3</i>	pRS316-YVC1- K212R	pGS2142 <i>HindIII/BsrGI</i>	pGS2363 <i>HindIII/BsrGI</i>
2361	<i>AMP^RURA3</i>	pRS316-YVC1- K547R	pGS2359 <i>AvaI/PacI/CiP</i>	PCR pGS2335, Oligos 623+1117 <i>XhoI/PacI</i>
2362	<i>AMP^RURA3</i>	pRS316-YVC1- K599R	pGS2359 <i>AvaI/PacI/CiP</i>	PCR pGS2336, Oligos 623+1117 <i>XhoI/PacI</i>
2363	<i>AMP^RURA3</i>	pRS316-YVC1- K547,599R	pGS2359 <i>AvaI/PacI/CiP</i>	PCR pGS2337, Oligos 623+1117 <i>XhoI/PacI</i>
2364	<i>AMP^RURA3</i>	pRS316-YVC1- K212,547,599R	pGS2360 <i>AvaI/PacI/CiP</i>	PCR pGS2336, Oligos 623+1117 <i>XhoI/PacI</i>
2372	<i>AMP^RURA3</i>	pRS426-YVC1-GFP K547R	pGS2000 <i>BamHI/CiP</i>	PCR pGS2361, Oligos 916+1016 <i>BamHI</i>
2373	<i>AMP^RURA3</i>	pRS426-YVC1-GFP K599R	pGS2000 <i>BamHI/CiP</i>	PCR pGS2362, Oligos 916+1016 <i>BamHI</i>
2398	<i>AMP^RURA3</i>	pRS426-YVC1-HA K212R	pGS2001 <i>SphI/PacI/CiP</i>	pGS2184 <i>SphI/PacI</i>

2399	<i>AMP^RURA3</i>	pRS426-YVC1-HA K212,547,599R	pGS2001 SphI/PacI/CiP	pGS2375 SphI/PacI
2403	<i>AMP^RURA3</i>	pVT100U-ADH1-YVC1	pGS237 BamHI/XhoI/CiP	PCR pGS2359, Oligos 1127+624BglI/SalI
2404	<i>AMP^RURA3</i>	pVT100U-ADH1-YVC1 K212R	pGS237 BamHI/XhoI/CiP	PCR pGS2360, Oligos 1127+624BglI/SalI
2405	<i>AMP^RURA3</i>	pVT100U-ADH1-YVC1 K212,547,599R	pGS237 BamHI/XhoI/CiP	PCR pGS2364, Oligos 1127+624BglI/SalI
2406	<i>AMP^RHIS3</i>	pRS423-pCUP-His6- SMT3	pGS36 Smal/Clal	pGS2310 BstZ17/Clal
2409	<i>AMP^RURA3</i>	pGEX-4TEV-YVC1-N ₀ K231R	Mutagenese-PCR von pGS2012, Oligos 1130+1131	
2410	<i>AMP^RURA3</i>	pGEX-4TEV-YVC1-N ₀ K212,231R	Mutagenese-PCR von pGS2332, Oligos 1130+1131	
2411	<i>AMP^RURA3</i>	pRS426-YVC1-GFP K231R	Mutagenese-PCR von pGS2000, Oligos 1130+1131	
2412	<i>AMP^RURA3</i>	pRS316-YVC1- K231R	Mutagenese-PCR von pGS2359, Oligos 1130+1131	
2413	<i>AMP^RURA3</i>	pRS316-YVC1- K212,231,547,599R	Mutagenese-PCR von pGS2364, Oligos 1130+1131	
2414	<i>AMP^RURA3</i>	pRS426-YVC1-HA K212,231R	Mutagenese-PCR von pGS2398, Oligos 1130+1131	
2415	<i>AMP^RURA3</i>	pRS426-YVC1-HA K212,231,547,599R	Mutagenese-PCR von pGS2399, Oligos 1130+1131	
2416	<i>AMP^RURA3</i>	pRS426-YVC1-GFP K212,231,547,599R	pGS2375 SphI/PacI/CiP	pGS2413 SphI/PacI

Oligonukleotide

Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide für Klonierungen und Sequenzierungen

Nr.	Name	Sequenz (5' →3')
420	GFP-Fusion Test (-)	CATAACCTTCGGGCATGGCACTC
503	Yvc1 (+)	GTAATTACCGATCTACTCGAAAAATTAGACATAAAGGATAA GAAAGAGTCCATGGAAAAGAGAAG
504	Yvc1 (-)	ATGGATTTCTGAGAAATTAATTAAGCAGTATTTGAACACAT GTCGTACGACTCACTATAGGG
505	Yvc1 Test (+)	GATGACACTGAAGATGATGCTG
518	pGEX 5' GST (+)	GCTGGCAAGCCACGTTTGG
534	Prot A-Integration Test (-)	CCGGAATTCGCTTATTTAGAAGTGGCGCGC
621	Yvc1 ATG-Nco (+)	CATGCCATGGTATCAGCCAACGGCGAC
623	Yvc1 539 Lys Bam (+)	CGCGGATCCAAAGAAACTCGGGAGGCTAG
624	Yvc1 Stop Sal (-)	GCGTGTGCGACTTACTCTTTCTTATCCTTTATG
721	Yvc1 no ATG EcoRI (+)	GCGAATTCGTATCAGCCAACGGCGACTTG
722	Yvc1-224 Xho (-)	CGCTCGAGCTAATGAGAGATCAATGACACTTC
897	Yvc1 3' BglII (-)	CGCAGATCTGCCGAAAATCGGGAGATGGATTAG
916	Yvc1-N1 5' EcoRI (+)	CGCGGAATTCGAGTGGTATTCCATATTGGCC
917	Yvc1-N4 3' Stop Sall (-)	CCGCGTTCGACCTAAATCTCAGAATGGTCACAAAC
920	Yvc1-C3 3' Stop Sall (-)	CCGCGTTCGACCTAGCCAGAATTTTCGGTTATCAGA
988	Yvc1-N K212R (+)	CCCACAACTTTTATCAGAGACGATTCACTGGCG
1016	Yvc1 no Stop BamHI (-)	GCGCGGATCCGCTCTTTCTTATCCTTTATGTC
1090	Smt3-GG Stop Xho (-)	CGCGCTCGAGCTAACCACCAATCTGTTCTCTG
1096	Smt3 Nde ATG (+)	GCGCCATATGTCGGACTCAGAAGTCAATC
1109	Yvc1-N K73R (+)	GATTTTATCTCCAAAAGTTGTGAGACTGGCTTATGAAGC
1110	Yvc1-N K73R (-)	GCTTCATAAGCCAGTCTCACAACTTTTGGAGATAAAATC
1111	Yvc1-C K599R (+)	GAATTCCTCGTTTCGCTAAGACTGCAAAGAACAGCAG
1112	Yvc1-C K599R (-)	CTGCTGTTCTTTGCAGTCTTAGCGAACGGGAATTC
1113	Yvc1-C K547R (+)	GAGGCTAGAAGGATAAGATATAACAGGATGAAAAGG

1114	Yvc1-C K547R (-)	CCTTTTCATCCTGTTATATCTTATCCTTCTAGCCTC
1117	Yvc1 Stop Pacl (-)	GAAATTAATTAAGCAGTATTTGAACACATGTCGTTTACTCT TTCTTATCCTTTATG
1127	Yvc1 BgIII-ATG (+)	GCGCAGATCTATGGTATCAGCCAACGGC
1130	Yvc1-N0 K231R (+)	CAACCCCGTAAGATTAAGAGCGCCTGTATACCAA
1131	Yvc1-N0 K231R (-)	TTGGTATACAGGCGCTCTTAATCTTACGGGGTTG

Molekularbiologische Methoden

361. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmide sind für die Klonierung und Expression von Genen von großer Bedeutung. Sie dienen dazu rekombinante Proteine in Bakterienzellen zu synthetisieren oder werden als Vektoren für die genetische Modifizierung von *S. cerevisiae* verwendet. In diesen Prozessen spielt die Isolierung von Plasmid-DNA eine wichtige Rolle.

In dieser Arbeit wurde das Verfahren der alkalischen Lyse verwendet. Hierfür wurden je 1,5-2 ml TB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer Kolonie von einer LB-Agar-platte (mit Antibiotikum) angeimpft und rollend bei 37°C für mindestens 8 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 15800 x g für 15 sek geerntet und der Überstand wurde verworfen. Zum Pellet wurden 100 µl GTE hinzugegeben und es wurde gemischt bis sich dieses gelöst hat. Zur Lyse der Bakterien wurden 200 µl einer frisch angesetzten 1 % SDS/0,2 M NaOH-Lösung dazugegeben und das Ganze wurde vorsichtig durch über Kopf-Schwenken gemischt. An dieser Stelle darf nicht zu heftig gemischt werden, um die chromosomale DNA durch die Scherkräfte nicht zu fragmentieren und somit eine Trennung von der Plasmid-DNA zu ermöglichen. Danach wurden 150 µl Natriumacetat (3 M) hinzugegeben, die chromosomale DNA und die Proteine bilden Komplexe mit SDS und Na⁺ und bleiben dadurch zum großen Teil an den Zelltrümmern gebunden. Es folgte die Zugabe einer Phenol/Chloroform-Mischung, durch die die DNA-Protein-Zelltrümmer-Komplexe präzipitiert und nach 30 sek kräftigem Schütteln durch einen Zentrifugationsschritt (15800 x g/2 min) von der Plasmid-DNA im Überstand getrennt wurden. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA mit 1 ml EtOH_{absolut} gefällt. Nach einer Inkubation für 1 min bei Raumtemperatur wurde die Plasmid-DNA pelletiert (15800 x g/2 min) und mit 70 %igem EtOH gewaschen. Das Pellet wurde für 5 min im Vakuumkonzentrator getrocknet und in 50 µl einer TE/RNase Mischung aufgenommen. Zum Lösen des Pellets wurde für 3 min bei 55 °C und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

GTE-Puffer

Glukose	50 mM
Tris pH 8,0	25 mM
EDTA	10 mM

in H₂O_{dest.} lösen, sterilfiltrieren

Tris-EDTA (TE, pH 8,0)

Tris pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

in H₂O_{dest.} lösen, pH 8,0 einstellen, autoklavieren

RNase A 10 mg/ml

RNase A	10 mg/ml
Tris pH 7,5	10 mM
NaCl	15 mM

in H₂O_{dest.} lösen, 15 min bei 100 °C im Wasserbad erhitzen

TE/ RNase pH 8,0

RNase A Lösung	5 µl
H ₂ O _{dest.}	95 µl

2 ml TE-Puffer zugeben

Natriumacetat (3 M)

NaOAc	49,22g
-------	--------

in 200 ml H₂O_{dest.} lösen, pH 5,2 einstellen, autoklavieren

362. Isolierung von DNA aus *S. cerevisiae*

Um genomische DNA aus *S. cerevisiae* zu isolieren, wurden 10 ml Hefekultur über Nacht bei 30 °C bis zur Wachstumsgrenze inkubiert. Die Zellen wurden in einer Kühlzentrifuge geerntet (15800 x g/2 min/4 °C) und mit 500 µl H₂O_{dest.} gewaschen. Während des Waschschrilles wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde abgegossen und die Zellen in der verbliebenen Flüssigkeit resuspendiert. Zur Lyse der Zellen gab man 200 µl „cracking“-Puffer, 200 µl einer Phenol/Chloroform-Mischung und 0,3 g Glaskugeln dazu. Es wurde für 3 - 4 min kräftig geschüttelt, anschließend wurden 200 µl TE-Puffer (pH 8) hinzugegeben und für 5 min bei 19314 g zentrifugiert. Die DNA befand sich nun im Überstand und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Fällung mit 1 ml EtOH_{absolut}, wobei vorsichtig durch über Kopf-Schwenken gemischt wurde. Nach einem

Zentrifugationsschritt (15800 x g/5 min/RT) wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 400 µl TE-Puffer (pH 8) resuspendiert. Nach Zugabe von 3 µl RNase A (10 mg/ml) inkubierte man für 5 min bei 37 °C und gab anschließend 4 µl Ammoniumacetat und 1 ml EtOH_{absolut} dazu. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (15800 x g/2 min/RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Vakuumkonzentrator getrocknet. Die genomische DNA wurde in 50 µl TE-Puffer (pH 8) resuspendiert.

“*cracking*”-Puffer

Triton X-100	2 % (v/v)
SDS	1 % (w/v)
NaCl	100 mM
Tris-HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM
in H ₂ O _{dest.} lösen, sterilfiltrieren	

Ammoniumacetat

Ammoniumacetat	10 M
in H ₂ O _{dest.} lösen, sterilfiltrieren	

363. Enzymatische Modifikation von Plasmid-DNA

Die Modifikation von DNA-Sequenzen sowie die Expression der entsprechenden Gene in prokaryotischen und eukaryotischen Organismen werden dazu verwendet, rekombinante oder mutierte Proteine zu synthetisieren und deren Funktionen zu untersuchen. Mit Hilfe von verschiedenen Plasmidvektoren ist es möglich, DNA-Fragmente in Organismen einzubringen und diese dort je nach Vektor (*high copy*, *low copy*) in unterschiedlicher Stärke zu vermehren. Minimalausstattung eines solchen Plasmidvektors sind Marker (meist Antibiotikaresistenz für *E. coli* und Aminosäuresynthese in *S. cerevisiae*), die die Selektion der Organismen mit rekombinanter DNA ermöglichen, der Replikationsursprung (*origin of replication*) und die Mehrfachklonierungsstelle (*multiple cloning site*), die sich durch mehrere Restriktionsstellen auszeichnet und für die Insertion von DNA-Fragmenten in den Vektor notwendig ist. Zusätzlich können Vektoren sogenannte *tags* für die Synthese von Fusionsproteinen sowie Promotoren für eine Genexpression enthalten.

Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen spalten DNA an spezifischen Nukleotidsequenzen, wobei einige Enzyme überhängende Enden (*sticky ends*, z. B. *EcoRI*) und einige Enzyme glatte Enden (*blunt ends*, z. B. *SmaI*) erzeugen. Sie kommen ursprünglich aus verschiedenen Organismen, die sich mit deren Hilfe vor dem Eindringen von Fremd-DNA durch Fragmentierung schützen. Zum Einbringen eines Inserts (PCR-Produkt oder DNA-Fragment aus einem weiteren Vektor) in einen Plasmidvektor wurden sowohl die zu integrierende Sequenz als auch der Vektor mit gleichen oder gleiche Überhänge produzierenden Restriktionsendonukleasen geschnitten, um zueinander passende Enden zu erzeugen. Die präparativen Ansätze sind Tabelle 10 zu entnehmen. Wenn zwei verschiedene Enzyme zum Schneiden des Vektors verwendet wurden, wurden zusätzlich zwei Kontrollansätze im analytischen Maßstab angesetzt, die jeweils nur eines der beiden Restriktionsenzyme und den Vektor enthielten (Tabelle 10). Damit konnte kontrolliert werden, ob beide Enzyme funktionsfähig sind.

Tabelle 10: Pipettierschema zur analytischen und präparativen Spaltung von DNA

Komponente	präparativer Ansatz für PCR-Produkte	präparativer Ansatz für Vektor bzw. Insert	analytischer Ansatz
DNA	40 µl	4 µg	1 µg
Puffer	5 µl	4 µl	1 µl
Enzym	jeweils 1 µl	jeweils 1 µl	0,2 µl
H ₂ O _{dest.}	ad 50 µl	ad 40 µl	ad 10 µl

Die Puffer und die Inkubationstemperaturen der Ansätze wurden den Herstellerangaben entnommen, wobei für die meisten Enzyme die Inkubation bei 37 °C für 1 h als optimal gilt. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel (366) wurden diese mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und mittels eines Kits (*QIAquick gel extraction kit*) gereinigt.

Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase

Um die Religation der kompatiblen Enden eines geschnittenen Vektors zu unterbinden, wurde die alkalische Phosphatase verwendet. Dabei handelt es sich um ein Enzym, das die Phosphatreste von freien 5'-Enden der DNA spaltet und somit die Selbstligation der Vektor-DNA nahezu unmöglich macht. 0,5 µl der alkalischen Phosphatase wurden hierfür nach der Restriktion des Vektors zum Ansatz gegeben und dieser wurde für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von 6x DNA-Probenpuffer wurde die Reaktion gestoppt.

DNA-Probenpuffer (6x)

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)
Saccharose	40 % (w/v)
in H ₂ O _{dest.} lösen	

Klenow-Polymerase-Behandlung

Das *Klenow*-Fragment ist das große Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli* und wird dazu verwendet 5'-Überhänge von doppelsträngiger DNA aufzufüllen. Dabei fügt es neue komplementäre dNTPs an das freie 3'-Ende geschnittener DNA an, wodurch glatte Enden für eine Ligation entstehen. Die Behandlung erfolgte, indem man zur geschnittenen DNA die *Klenow*-Polymerase (1 U/µl), dNTPs (Endkonzentration 1 µM pro dNTP) und Puffer nach Herstellerangaben hinzufügte und für 10 min bei 37 °C inkubierte. Gestoppt wurde die Reaktion durch Inkubation bei 75 °C für 10 min.

DNA-Ligation

Um einen neuen Plasmidvektor mit integriertem DNA-Fragment zu erhalten, müssen Vektor und Insert ligiert werden. Das Enzym T4-Ligase wird dabei eingesetzt, um eine Esterbindung zwischen komplementären 3'-und 5'-Enden in einer ATP-abhängigen Reaktion auszubilden. In dieser Arbeit wurde das *DNA Rapid Ligation*-Kit verwendet und ungefähr die dreifache Menge an Insert im Vergleich zum Vektor eingesetzt, um die Effizienz der gewünschten Ligation zu steigern. Der Ligationsansatz (Tabelle 11) wurde für 1 h bei RT inkubiert, bevor 5 µl davon zur Vermehrung und Selektion in *E. coli* transformiert (367) wurden.

Tabelle 11: Pipettierschema zur Ligation von Vektor und Insert

Komponente	Ansatz	Kontrolle
Vektor	1x	1x
Insert	3x	---
Puffer	2 µl	2 µl
T4-Ligase	0,5 µl	0,5 µl
H ₂ O _{dest.}	ad 10 µl	ad 10 µl

364. Quantifizierung und Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Richtigkeit der gewünschten Gensequenz in einem Plasmidvektor kann durch Sequenzierung bestätigt werden. Dafür muss die DNA in besonders reiner Form vorliegen, was durch Anwendung des *SureClean DNA purification*-Kits nach Herstellerangaben erzielt wurde. Die Quantifizierung von gereinigter DNA wurde am Spektrophotometer Nanodrop ND-1000 durchgeführt, wofür 1 µl Volumen eingesetzt wurde. Für die Sequenzierung, die von der Firma LGC Genomics (Berlin) durchgeführt wurde, wurde die DNA mit einem Oligonukleotid im folgenden Ansatz (Tabelle 12) gemischt.

Tabelle 12: Pipettierschema zur Vorbereitung von Plasmid-DNA für die Sequenzierung

Komponente	Menge
DNA	1 µg
Oligonukleotid (50 µM)	0,4 µl
H ₂ O _{dest.}	ad 14 µl

365. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird dazu verwendet, einen genau definierten DNA-Abschnitt auf genomischer DNA oder Plasmid-DNA *in vitro* exponentiell zu vervielfältigen. Diese Methode findet unter anderem Anwendung in der Klonierung und Mutagenese von Plasmidvektoren sowie in der Integration und Deletion von bestimmten Genabschnitten im Genom von *S. cerevisiae*. Im ersten Schritt wird die Template-DNA, die das zu amplifizierende DNA-Fragment enthält, bei 95 °C denaturiert, um einzelsträngige DNA zu erhalten. Anschließend erfolgt die Primerhybridisierung. Die künstlich synthetisierten Oligonukleotide, die den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt begrenzen, lagern sich dabei

komplementär an die Template-DNA an. Im letzten Schritt, der Elongation, verlängert eine DNA-Polymerase diese angelagerten Oligonukleotide von 5'- nach 3'-Richtung, so dass wieder doppelsträngige DNA entsteht. Die drei Schritte der PCR werden in mehreren Zyklen (30-35) im Thermocycler wiederholt, wobei die Menge an amplifizierter DNA mit jedem Zyklus exponentiell ansteigt. Die Schlüsselenzyme dieser Reaktion sind die hitzestabilen DNA-Polymerasen, die aus verschiedenen Organismen gewonnen werden. In dieser Arbeit wurde zum einen die klassische *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* verwendet. Zum anderen wurde eine fusionierte Polymerase (Phusion High Fidelity DNA-Polymerase) verwendet, die ein *proofreading*-Enzym aus *Pyrococcus furiosus* mit einer DNA-bindenden Domäne kombiniert und dadurch die Fehlerquote erheblich vermindert und die Prozessivität der Polymerase steigert. Tabelle 13 zeigt das Pipettierschema für die beiden verwendeten Polymerasen und Tabelle 14 die jeweiligen Thermocycler-Einstellungen.

Wenn es sich bei der Template-DNA um Plasmid-DNA handelte, wurde diese vor der Zugabe zur PCR-Mischung in einem Verhältnis von 1:20 verdünnt. Genomische DNA als Template wurde unverdünnt eingesetzt. Die Schritte 1-3 der PCR wurden 30- bis 35-mal wiederholt.

Tabelle 13: Pipettierschema zur Amplifikation von DNA-Fragmenten bei Anwendung der *Taq*- bzw. der *Phusion*-Polymerase

Komponente	<i>Taq</i>-Polymerase	<i>Phusion</i>-Polymerase
Template-DNA	0,5 µl	0,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl	1 µl
Puffer	5 µl	10 µl
Oligonukleotide (50 µM)	1 µl (pro Oligo)	2 µl (pro Oligo)
Polymerase	0,5 µl	0,5 µl
H ₂ O _{dest.}	ad 50 µl	ad 50 µl

Tabelle 14: Thermocycler-Bedingungen zur Amplifikation von DNA-Fragmenten bei Anwendung der *Taq*- bzw. der *Phusion*-Polymerase

Reaktionsschritt	<i>Taq</i> -Polymerase		<i>Phusion</i> -Polymerase	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Anfangsdenaturierung	95 °C	30 sek	98°C	30 sek
1) Denaturierung	95 °C	30 sek	98°C	10 sek
2) Hybridisierung	52 °C	30 sek	52°C	30 sek
3) Elongation	68 °C	1 min/kb	72°C	30 sek/kb
abschließende Elongation	68 °C	5 min	72°C	7 min
Lagerung	8 °C	unendlich	8 °C	unendlich

Die PCR wurde außerdem zur stellenspezifischen Mutagenese von Genen eingesetzt. Dabei wurden Basenpaare im kodierenden Bereich der DNA gezielt ausgetauscht, woraus Punktmutationen (z. B. K→R) in der Aminosäuresequenz des kodierten Proteins resultierten. Dafür wurden Oligonukleotide verwendet, die die entsprechenden Änderungen in ihrer Sequenz haben und somit nicht vollständig komplementär zur Template-DNA sind. Dadurch wurde während der Amplifikation die Mutation in die DNA eingeführt. Für eine Mutagenese-PCR war die Reinigung und Quantifizierung der DNA (364) notwendig, welche anschließend auf eine Konzentration von 25 ng/µl eingestellt wurde. In diesem Fall wurde die *PfuTurbo*-Polymerase aus dem *QuikChange site-directed mutagenesis*-Kit verwendet, da sie DNA-Fragmente bis zu einer Größe von 8000 bp vervielfältigen kann. Pipettierschema und Thermocycler-Einstellungen können Tabelle 15 und Tabelle 16 entnommen werden.

Tabelle 15: Pipettierschema für die Mutagenese von Plasmid-DNA

Komponente	Menge
Template-DNA (25 ng/µl)	0,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µl
Puffer	2,5 µl
Oligonukleotide (1 µg/µl)	0,6 µl (pro Oligo)
Polymerase	0,5 µl
H ₂ O _{dest.}	ad 25 µl

Tabelle 16: Thermocycler-Einstellungen für die Mutagenese von Plasmid-DNA

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Anfangsdenaturierung	95 °C	30 sek
1) Denaturierung	95 °C	30 sek
2) Hybridisierung	55 °C	1 min
3) Elongation	68 °C	1 min/kb
abschließende Elongation	68 °C	10 min
Lagerung	8 °C	unendlich

Die Schritte 1-3 der PCR wurden 30-mal wiederholt. Nach der Reaktion wurde das Produkt mit dem Enzym *DpnI* (1 h bei 37 °C) behandelt. Es verdaut nur methylierte DNA-Stränge, somit wurde die nicht mutierte Template-DNA abgebaut und das mutierte PCR-Produkt verblieb in der Lösung. Bevor die amplifizierten PCR-Produkte in *E. coli* oder *S. cerevisiae* transformiert (367) wurden, wurden sie mit dem *QIAquick PCR purification*-Kit gereinigt, um die überflüssigen PCR-Komponenten zu entfernen.

366. Elektrophoretische Auftrennung von DNA

DNA-Fragmente können aufgrund der negativen Ladung ihres Phosphatrückgrates durch Anlegen eines elektrischen Feldes in einem Agarosegel ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden. Die negative Ladung führt dazu, dass die DNA in der Gelmatrix von der Kathode zur Anode wandert, wobei kleinere Fragmente eine weitere Strecke als größere Fragmente in gleicher Zeit zurücklegen, da sie schneller durch die Poren des Agarosegels gelangen. Zur Herstellung eines 1 %igen Agarosegels wurden 1,2 g Agarosepulver mit 120 ml 1x TAE-Puffer gemischt und durch Erhitzen in einer Mikrowelle gelöst. Zusätzlich gab man einen Farbstoff dazu, der sich zwischen die Basenpaare der DNA anlagert und diese dadurch bei Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar macht (GelRED). Die Agaroselösung wurde in einen Schlitten gegossen und mit einem Kamm zum Erzeugen von Taschen versehen. Nach Abkühlen der Lösung wurde das Gel fest und der Kamm konnte entfernt werden. Das Gel wurde in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophorese-Kammer gelegt und die Taschen wurden mit den DNA-Proben gefüllt. Um die Größe der DNA-Fragmente zu bestimmen wurde ein DNA-Standard verwendet, der Fragmente bekannter Größe enthält. Die Auftrennung erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 130 V für eine Stunde.

DNA-Längenstandard

DNA	45 µl
TE-Puffer pH 8,0	485 µl
DNA-Probenpuffer 6x	170 µl

TAE-Puffer (50x)

Tris	0,5 M
Essigsäure	55 % (v/v)
EDTA	50 mM

in H₂O_{dest.} lösen

367. Transformation von Plasmid-DNA

Aufgrund der Fähigkeit von Bakterien nach einer speziellen Behandlung Plasmid-DNA aufzunehmen, ist es möglich Plasmidvektoren in *E. coli*-Zellen zu vervielfältigen bzw. dadurch Fusionsproteine zu synthetisieren und anschließend zu reinigen (364). Die Transformation von Plasmid-DNA in *S. cerevisiae* bietet die Möglichkeit auch in diesem Organismus (Fusions)proteine zu synthetisieren und die Funktion dieser modifizierten bzw. mutierten Proteine *in vivo* zu untersuchen.

Transformation von Plasmid-DNA in E. coli

Die Herstellung kompetenter Zellen von *E. coli* erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Hanahan (Hanahan, 1983). Eine *E. coli*-Kolonie wurde dafür von einer LB-Agarplatte in 10 ml LB-Medium überimpft und bei 37 °C unter Rollen über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen wurden 2 ml Kultur in 200 ml LB-Medium überführt und bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 0,5 und 0,7 bei 37 °C schüttelnd kultiviert. Die Zellen wurden dann in einen kalten Zentrifugenbecher überführt, für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (6370 x g/5 min/4 °C) geerntet. Das Pellet wurde in 80 ml kaltem Puffer 1 resuspendiert, für 5 min auf Eis inkubiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das Pellet in 8 ml kaltem Puffer 2 resuspendiert und in gekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden die kompetenten Zellen bei -80 °C gelagert.

Puffer 1

KOAc	30 mM
CaCl ₂	100 mM
MnCl ₂	50 mM
Glycerin	15 % (v/v)

in 800 ml H₂O_{dest.} lösen, mit Essigsäure pH 5,8 einstellen, sterilfiltrieren

Puffer 2

MOPS	10 mM
CaCl ₂	75 mM
RbCl ₂	10 mM
Glycerin	15 % (v/v)

in 100 ml H₂O_{dest.} lösen, mit verdünnter KOH pH 6,5 einstellen, sterilfiltrieren

Für die Transformation wurden die kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut, wobei 100 µl Zellen pro Transformationsansatz verwendet wurden. Diese wurden mit 5 µl Ligationsansatz bzw. mit 1 µl Plasmid-DNA versetzt und für 45 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 90 sek bei 42 °C im Wasserbad. Durch diesen Schritt wird die Permeabilität der Zellmembran erhöht, wodurch die DNA in die Zellen aufgenommen werden kann. Der Hitzeschock wurde gestoppt, indem die Zellen für 1 min auf Eis inkubiert wurden. Zur Regeneration wurden 500 µl LB- oder NZY⁺-Medium hinzugegeben und für 1 h rollend bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Selektivplatten ausplattiert, welche über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Am nächsten Morgen wurden Einzelkolonien in 2 ml TB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum zur Isolation der Plasmid-DNA (361) überimpft.

Die Transformation des Mutagenese-PCR-Produktes erfolgte in *E. coli* XL1 Blue-Zellen, da diese eine erhöhte Transformationseffizienz aufweisen. Es wurden 50 µl Zellen verwendet, die mit 5 µl PCR-Produkt versetzt und in ein 15 ml-Röhrchen überführt wurden. Diese wurden für 30 min auf Eis inkubiert, der Hitzeschock erfolgte für 90 sek bei 42 °C im Wasserbad und es folgte eine Inkubation auf Eis für 2 min. Nach der Regeneration für 1 h in 500 µl NZY⁺-Medium wurden die Zellen auf Selektivplatten ausplattiert, die über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden.

Transformation von Plasmid-DNA in S. cerevisiae

Die Transformation der Hefezellen erfolgte über die LiOAc/Einzelstrang-Träger DNA/PEG-Methode, bei der die Effizienz über zusätzliche einzelsträngige DNA, welche als Träger für Plasmide oder DNA-Abschnitte verwendet wird, gesteigert wird.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde der zu transformierende *S. cerevisiae*-Stamm auf einer YPD_{Ade}-Platte oder einer SD-Agarplatte ausgestrichen und nach Inkubation bei 30 °C in entsprechendes Medium überimpft, das schließlich über Nacht bei 30 °C rollend oder schüttelnd inkubiert wurde. Nach Bestimmen der optischen Dichte der Kultur bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) wurden die Zellen auf eine OD₆₀₀ von etwa 0,4 verdünnt und für weitere zwei bis drei Stunden bei 30 °C unter Schütteln inkubiert, bis sich die OD₆₀₀ einmal verdoppelt hat. Die Zellen wurden in 15 ml- bzw. 50 ml-Röhrchen überführt und durch Zentrifugieren (1535 x g/5 min/4 °C) geerntet. Dabei wurden pro Transformationsansatz 5 ml Kultur verwendet. Das Zellpellet wurde nach Entfernen des Überstandes in ½ Volumen 0,1 M LiOAc/TE pH 7,5 resuspendiert und wieder unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet in 1/100 des Volumens der Ursprungkultur aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die kompetenten Zellen konnten bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert werden.

Pro Transformationsansatz wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß 2,5 µl Lachssperma-DNA (10 mg/ml) vorgelegt, die zur Denaturierung zunächst für 3 min bei 95 °C und anschließend für 1 min auf Eis inkubiert wurde. Anschließend wurden 1 µl Plasmid-DNA oder 5 µl PCR-Produkt sowie 50 µl kompetente Zellen hinzugefügt. Für jeden transformierten Stamm wurde eine Kontrolle ohne DNA mitgeführt. Es folgte die Zugabe von 350 µl 40 % PEG/LiOAc/TE pH 7,5 und nach kräftigem Schütteln wurde der Ansatz für 30 min rollend bei 30 °C inkubiert. Die Hitzeschockbehandlung erfolgte nach Zugabe von 35 µl Dimethylsulfoxid (DMSO), welches die Membranpermeabilität zusätzlich steigert, für 15 min bei 42 °C im Wasserbad. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen durch Zentrifugation (3385 x g/3 min/RT) sedimentiert, zur Regeneration von Zellwand und Zellmembran in 500 µl YPD_{Ade}-Medium resuspendiert und für 1 h rollend bei 30 °C inkubiert. Zum vollständigen Entfernen des Vollmediums wurden die Zellen mit 500 µl TE-Puffer pH 7,5 gewaschen und anschließend auf Selektivplatten ausplattiert, welche für zwei bis drei Tage bei 30 °C inkubiert wurden. Einzelkolonien wurden dann erneut auf Selektivplatten ausgestrichen und für weitere zwei Tage unter gleichen Bedingungen inkubiert.

Zur Präparation von Glycerinstämmen wurden 500 µl 50 %iges Glycerin in 2 ml-Schraubdeckelgefäße pipettiert und die Zellen von den Platten mit Hilfe eines Holzstäbchens in diese überführt. Glycerinstämme wurden zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

0,1 M LiOAc/TE

Lithiumacetat	10,2 g
Tris	10 mM
EDTA	1 mM

in 1 l H₂O_{dest.} lösen, pH 7,5 einstellen, sterilfiltrieren

40 % Polyethylenglykol (PEG)/LiOAc

PEG	80 g
Lithiumacetat	0,1 M
Tris	10 mM
EDTA	1 mM

in 200 ml H₂O_{dest.} lösen, pH 7,5 einstellen, sterilfiltrieren

TE (1 M, pH 7,5):

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

in 1 l H₂O_{dest.} lösen, pH 7,5 einstellen, sterilfiltrieren

Hefegenomische Methoden

Integration von Modifikationen ins Genom von S. cerevisiae

Einen Vorteil bietet die Arbeit mit *S. cerevisiae* in der biologischen Forschung dadurch, dass es möglich ist, schnell und einfach genomische Modifikationen in diesen Organismus einzufügen. Gene können durch die Integration von Genkassetten deletiert und genetisch kodierte Fusionsproteine können durch Einfügen von *tags* am N- oder C-Terminus erzeugt werden. Der Einbau der DNA-Fragmente erfolgt nach Angaben von Longtine (Longtine *et al.*, 1998) über homologe Rekombination zwischen komplementären Sequenzen von genomischer DNA und dem zu integrierenden DNA-Fragment.

In dieser Arbeit wurde die Integration eines *tags* an den C-Terminus eines Proteins durchgeführt. Die schematische Darstellung der Methode kann Abbildung 8 entnommen werden. Ausgehend von einem Plasmid, das für den *tag* und zusätzlich einen Selektionsmarker kodiert, wurde eine PCR durchgeführt, durch welche die Integrationskassette

amplifiziert wurde. Dabei wurden Oligonukleotide (O1 und O2) gewählt, die einerseits für die Amplifikation des Fragments komplementär zur Plasmid-DNA waren, die andererseits aber auch komplementär zum 5'-Ende des ORFs waren, um eine homologe Rekombination des PCR-Produktes und der genomischen DNA zu ermöglichen.

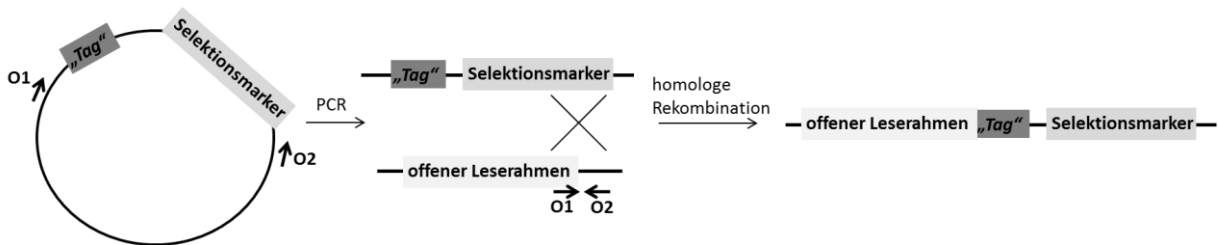


Abbildung 8: Schematische Darstellung zur genomischen Integration von DNA-Fragmenten infolge homologer Rekombination. Integration eines *tags* am C-Terminus des zu untersuchenden Proteins zur Synthese eines genetisch kodierten Fusionsproteins. Unter Verwendung der Oligonukleotide O1 und O2 wird eine PCR durchgeführt, deren Produkt durch homologe Rekombination in das Genom integriert wird.

Nach Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments wurde dieses gereinigt (365). Gleichzeitig wurden kompetente Zellen des Stamms, der genetisch modifiziert werden soll, hergestellt. 5 µl des PCR-Produktes wurden in diesen Stamm transformiert und aufgrund des integrierten Markers selektiert (367). Schließlich wurde aus den Klonen genomische DNA isoliert (362), die zur Kontrolle einer erfolgreichen Integration der Kassette als Template für eine PCR verwendet wurde. Die Synthese des Fusionsproteins wurde außerdem kontrolliert, indem TCA-Proben (383) für eine Westernblot-Analyse und anschließende immunologische Detektion mit spezifischem Antikörper (382) hergestellt wurden.

Proteinbiochemische Methoden

381. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird zur Auftrennung von Proteinen durchgeführt. Proteine binden SDS, wodurch negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit konstantem Ladungs- zu Masseverhältnis entstehen. Durch das zusätzliche Aufkochen bei 95 °C und die Reduktion durch Thiole (z.B. β-Mercaptoethanol, DTT) werden Wechselwirkungen der denaturierten Proteine unterbunden und die einzelnen Proteine können in einer Polyacrylamid-Matrix nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt werden. Die Porengröße der Matrix wird dabei durch die Konzentration des Acrylamids im Gel bestimmt. Die Trennung der Proteine im Gel erfolgt durch das Anlegen einer elektrischen Spannung, die

dazu führt, dass die negativ geladenen Proteine zur Anode migrieren. In dieser Arbeit wurden denaturierende, diskontinuierliche Elektrophoresen durchgeführt, das heißt die Proteine wurden zunächst in einem niedrigprozentigen Sammelgel mit neutralem pH-Wert konzentriert und anschließend in einem basischen, höherprozentigen Gel getrennt.

Gelsystem der Firma Biorad

Zur Herstellung der Polyacrylamid-Gele wurden die Komponenten miteinander gemischt (Tabelle 17). Dabei wurden der Katalysator Tetramethylethyldiamin (TEMED) und der Aktivator Ammoniumperoxodisulfat (AMPS) als letztes hinzugefügt, da diese beiden Komponenten die Polymerisation des Gels starten. Die Lösung des Trenngels wurde als erstes in die nach Herstellerangaben zusammengebaute Gießapparatur gefüllt und mit Isopropanol überschichtet, um eine ebene Oberfläche zu erhalten. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt und die Lösung des Sammelgels auf das Trenngel gegeben. Zum Ausbilden von Taschen wurde je nach Anzahl der Proben ein 10-er oder ein 15-er Kamm in das Sammelgel eingesetzt.

Tabelle 17: Pipettierschema zur Herstellung von Trenn- und Sammelgel für eine SDS-Gelelektrophorese

Komponente	8 %	11 %	15 %	4 %
	Trenngel			Sammelgel
H ₂ O _{dest.}	2,33 ml	1,82 ml	1,15 ml	1,52 ml
Rotiphorese Gel 30	1,32 ml	1,83 ml	2,5 ml	0,325 ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,25 ml			-
0,5 M Tris pH 6,8	-			0,625 ml
10 % SDS (w/v)	50 µl			25 µl
10 % AMPS (w/v)	25 µl			12,5 µl
TEMED	2,5 µl			5 µl

Die Proben wurden vor dem Einfüllen in die Taschen mit SDS-Probenpuffer versetzt und im Heizblock für 15 min bei 60 °C inkubiert. Währenddessen wurde der Kamm aus dem Polyacrylamid-Gel entfernt und es wurde entsprechend der Herstellerangaben in die Gelkammer gespannt, welche mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt wurde. Die Proben wurden mit

einer Glasspritze (Hamilton) in die Taschen des Gels gefüllt, wobei auch ein Proteinmarker mit Proteinen bekannter molarer Masse aufgetragen wurde, um später die molare Masse der analysierten Proteine abschätzen zu können. An die Kammer wurde eine Spannung von 200 V für etwa 55 min gelegt, bis die untere Front des SDS-Probenpuffers aus dem Gel gelaufen war. Nachdem das Gel aus der Kammer genommen wurde, wurden die darin aufgetrennten Proteine durch eine Coomassie-Färbung visualisiert oder zur immunologischen Detektion mittels Westernblot auf eine PVDF-Membran transferiert (382).

SDS-Laufpuffer (5x)

Tris	125 mM
Glycin	960 mM
SDS	17 mM
in H ₂ O _{dest.} lösen	

SDS-Probenpuffer (2x)

Tris	125 mM
SDS	140 mM
Bromphenolblau	40 mM
β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)
in H ₂ O _{dest.} lösen	

Gelsystem der Firma Thermo Scientific

Sollte die Auftrennung der Proteine einer anschließenden massenspektrometrischen Untersuchung dienen, so wurden das Gelsystem von Thermo Scientific und die zur Apparatur passenden NuPAGE-Fertiggele (10 % und 4-12 %) verwendet. Diese besitzen eine pH-neutrale Umgebung, die Proteinmodifikationen verringert und sie somit besser geeignet für eine massenspektrometrische Untersuchung macht. Weiterhin ist es wichtig, dass alle Lösungen und verwendeten Apparaturen möglichst frei von Verunreinigungen und Proteinen sind. Aus diesem Grund wurde die komplette Gelapparatur sowie die verwendeten Glaswaren kurz vor der Elektrophorese mit 1 M NaOH-Lösung gespült und der Laufpuffer sterilfiltriert. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1x LDS-Probenpuffer (NuPAGE) versetzt und die Gelelektrophorese wurde nach Herstellerangaben unter Verwendung des MOPS-SDS-Laufpuffers durchgeführt. Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Proteine im Gel mit kolloidalem Coomassie gefärbt (382).

MOPS-SDS-Laufpuffer (20x)

MOPS	210 g
Tris	121 g
SDS	20 g
EDTA	7,4 g

in 1 l H₂O_{dest.} lösen, sterilfiltrieren, im Dunkeln lagern

382. Visualisierung von Proteinen im Polyacrylamid-Gel

Nach der Auftrennung von Proteinen mittels SDS-PAGE (381) wurden diese je nach Experiment unter Anwendung verschiedener Methoden visualisiert. Die Färbung mit dem Coomassie Brilliant Blau-Farbstoff erfolgte, wenn alle Proteine in der Gelmatrix gefärbt werden sollen, da sich dieser unspezifisch an die basischen Seitenketten der Proteine anlagert. Sollten die Proteine nach der Färbung massenspektrometrisch analysiert werden, wurde ein modifiziertes Coomassie-Färbungs-Protokoll (kolloidale Coomassie-Färbung) angewandt. Wenn man ein spezifisches Protein in der Gelmatrix detektieren wollte, wurden alle Proteine zunächst auf eine PVDF-Membran mittels Westernblot transferiert und das Zielprotein anschließend immunologisch mit spezifischem Antikörper visualisiert.

Coomassie Brilliant Blau-Färbung

Nachdem die Auftrennung der Proteine erfolgt war, wurde das SDS-Gel aus der Gelapparatur entnommen und in ein Plastikgefäß überführt. Dann wurde es mit der Coomassie-Brilliant-Blau-Lösung vollständig bedeckt und für 10 bis 20 min gefärbt. Zum Entfärben der Gelmatrix wurde das Gel im Entfärber I inkubiert, bis der Gelhintergrund vollständig entfärbt war. Dabei wurde die Lösung alle 15 min gewechselt. Schließlich wurde das Gel in Entfärber II gelegt und das Ergebnis der Färbung durch Scannen dokumentiert.

Coomassie Brilliant Blau-Lösung

Coomassie Brilliant Blau R-250	0,2 %
Coomassie Brilliant Blau G-250	0,005 %
Methanol	50 %
Essigsäure	10 %

Die beiden Farbstoffe werden zunächst in Methanol für 30 min gerührt, Essigsäure und H₂O_{dest.} werden hinzugefügt und das Ganze über Nacht unter Rühren gelöst. Anschließend wird die Lösung sterilfiltriert.

Entfärber I

Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	40 % (v/v)
Glycerin	2 % (v/v)
mit H ₂ O _{dest.} auffüllen	

Entfärber II

Essigsäure	5 % (v/v)
Methanol	10 % (v/v)
Glycerin	2 % (v/v)
mit H ₂ O _{dest.} auffüllen	

kolloidale Coomassie-Färbung

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel aus der Gelapparatur genommen und in ein mit 1 M NaOH gespültes Glasgefäß gegeben. Es wurde schüttelnd für 30 min bei Raumtemperatur in frisch angesetzter Fixierlösung inkubiert und anschließend 3 Mal für 10 min mit etwa 100 ml H₂O_{dest.} gewaschen. Die Färbung erfolgte unter Schütteln über Nacht in der Färbelösung. Am nächsten Tag wurde der Hintergrund der Gelmatrix mit H₂O_{dest.} entfärbt und das Gel wurde bei 4 °C bis zum Ausschneiden der Banden für die massenspektrometrische Analyse gelagert.

Fixierlösung

Ethanol	40 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)
mit H ₂ O _{dest.} auffüllen	

Färbelösung

Coomassie Brilliant Blau G-250	0,12 % (w/v)
Ammoniumsulfat	10 % (w/v)
Phosphorsäure	10 % (v/v)
Methanol	20 % (v/v)
mit H ₂ O _{dest.} auffüllen	

Den Farbstoff zunächst in Phosphorsäure lösen, die restlichen Komponenten hinzugeben und anschließend sterilfiltrieren.

*Westernblot und anschließende immunologische Detektion**A) Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran*

Mittels Westernblot wurden die zuvor durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine spannungsabhängig auf eine PVDF-Membran transferiert. Die PVDF-Membran wurde dafür durch kurzes Benetzen mit Methanol aktiviert und bis zur Verwendung in Transferpuffer inkubiert. Für den Transfer benötigte man eine aktivierte PVDF-Membran, ein SDS-Gel mit den aufgetrennten Proteinen, jeweils zwei in Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere und Schwämme sowie die Blotapparatur. Die Komponenten wurden wie in Abbildung 9 gezeigt in der Apparatur aufgeschichtet und eingeklemmt. Auf den zur Kathode gerichteten Teil wurden ein Schwamm und dann ein Whatman-Papier gelegt. Das SDS-Gel wurde möglichst luftblasenfrei auf das Whatman-Papier gelegt, woraufhin die aktivierte Membran folgte. Als das zweite Whatman-Papier auf der Membran lag, wurde zur vollständigen Entfernung von Luftblasen eine Glaspipette über den Aufbau gerollt. Zum Schluss wurde alles mit dem zweiten Schwamm bedeckt, eingeklemmt und in die Blotkammer eingebaut. Zur ständigen Kühlung wurden zusätzlich ein Behälter mit Eis und ein Rührstäbchen in der Blotkammer benötigt. Nach Auffüllen der Kammer mit Transferpuffer wurde sie auf einen Magnetrührer gestellt und eine Spannung von 100 V wurde angelegt, wobei darauf geachtet werden musste, dass die Anschlüsse so ausgerichtet waren, dass die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode auf die PVDF-Membran transferiert wurden. Je nach Molekularmasse des Zielproteins erfolgte der Transfer für 30-60 min, da kleinere Proteine schneller transferiert werden als große.

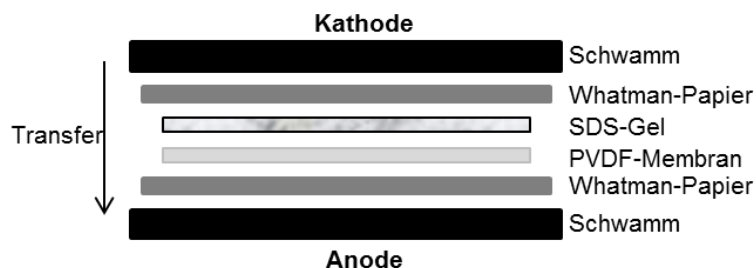


Abbildung 9: Schematischer Aufbau zum spannungsabhängigen Transfer von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine PVDF-Membran.

Transferpuffer

Glycin	0,1 M
Tris	12,5 mM
in H ₂ O _{dest.} lösen, bei 4 °C lagern	

B) Immunologische Detektion der Proteine

Nach dem Transfer von Proteinen vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran mittels Westernblot können spezifische Proteine auf dieser Membran gezielt durch immunologische Detektion nachgewiesen werden. Die Membran wurde dazu aus der Blotkammer genommen und in ein Plastikgefäß überführt. Um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen, wurde sie zunächst für 1 h schüttelnd in Blockierlösung inkubiert. Es folgte die Inkubation bei 4 °C über Nacht in Anwesenheit des primären Antikörpers, der zuvor in 10 ml Blockierlösung nach den Angaben in Tabelle 5 verdünnt wurde. Am nächsten Tag wurde der primäre Antikörper entfernt und die Membran mit 1x PBS und 1x PBST nach folgenden Angaben unter Schütteln gewaschen.

2 min in 1x PBS, 5 min in 1x PBST, 5 min in 1x PBST, 2 min in 1x PBS

Es folgte die Inkubation bei RT für 1 h in Anwesenheit des sekundären Antikörpers, der ebenfalls zuvor in 10 ml Blockierlösung verdünnt wurde. Die verwendeten sekundären Antikörper sind gegen Epitope der primären Antikörper gerichtet und entweder mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (POD) oder dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekoppelt (Tabelle 6). Schließlich wurde auch der sekundäre Antikörper entfernt und die Membran wie oben beschrieben mit 1x PBS und 1x PBST gewaschen. War der sekundäre Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 gekoppelt, so wurde die Membran getrocknet und die Detektion erfolgte am Typhoon mittels fluorometrischer Messung. Bei Verwendung von POD-gekoppelten sekundären Antikörpern wurde die Membran zunächst etwa für 1 min mit ECL-Detektionssubstrat benetzt und die Detektion der dabei entstehenden Chemolumineszenz erfolgte mit einem Lumi Fusion-Imagingsystem.

Blockierlösung

Milchpulver	5 % (w/v)
in PBS lösen	

PBS

NaCl	155 mM
NaH ₂ PO ₄	2,5 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
in H ₂ O _{dest.} lösen, pH 7,3 einstellen, sterilfiltrieren	

PBST

NaCl	155 mM
NaH ₂ PO ₄	2,5 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
Tween 20	0,25 % (v/v)

in H₂O_{dest.} lösen, pH 7,3 einstellen, sterilfiltrieren

383. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Zum Nachweis der Synthese bestimmter Proteine in Hefezellen wurde eine Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Hefezellen wurden in SD- oder YPD_{Ade}-Medium kultiviert und 4 OD₆₀₀-Einheiten wurden durch Zentrifugieren (677 x g/3 min/4°C) im 15 ml-Röhrchen geerntet. Der Überstand wurde vollständig verworfen und das Pellet in 500 µl 0,25 M NaOH/1 % β-Mercaptoethanol resuspendiert. Nach Überführen des Lysats in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde es für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend gab man 80 µl einer 50 %igen TCA-Lösung dazu und inkubierte für weitere 10 min auf Eis. Da TCA den Zellen Wasser entzieht, wird die Löslichkeit der Proteine vermindert und sie fallen aus. Diese wurden in einem weiteren Zentrifugationsschritt (11885 x g/10 min/4 °C) pelettiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet durch Resuspendieren in 1 ml eiskaltem Aceton und darauffolgende Zentrifugation (11885 x g/10 min/4 °C) gewaschen. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet bei 37 °C im Heizblock getrocknet. Das Pellet wurde in 95 µl 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert, mit 5 µl Tris-Base neutralisiert und für 15 min bei 60 °C im Heizblock inkubiert. 5-10 µl der TCA-Probe wurden für die anschließende Proteintrennung mittels SDS-PAGE (381) und die immunologische Detektion nach einem Westernblot (382) eingesetzt.

NaOH/β-Mercaptoethanol

NaOH	0,25 mM
β-Mercaptoethanol	1 % (v/v)

in 1 ml H₂O_{dest.} lösen

SDS-Probenpuffer (1x)

Tris	62,5 mM
SDS	70 mM
Bromphenolblau	20 mM
β-Mercaptoethanol	10 % (v/v)

in H₂O_{dest.} lösen, sterilfiltrieren

Modifizierte TCA-Fällung für den in vivo-Bindungsversuch SUMOylierter Substrate

Die bei der Herstellung von Zellpellets für den *in vivo*-Bindungsversuch SUMOylierter Proteine geernteten 2 OD-Einheiten (385) wurden zunächst in 500 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ aufgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 75 μl 2 M NaOH/ β -Mercaptoethanol zum Lysieren der Zellen versetzt. Nach kräftigem Mischen inkubierte man die Suspension für 15 min auf Eis und gab anschließend 75 μl 55 %ige TCA-Lösung dazu. Die Fällung erfolgte während der Inkubation auf Eis für mindestens 10 min. Nach Zentrifugation der Proben (11885 x g/10 min/4 °C) wurde der Überstand vollständig entfernt und das Pellet in 30 μl HU-Puffer (385) aufgenommen. Zum Neutralisieren wurden 3 μl Tris-Base hinzugefügt und die Proteine schließlich durch Inkubation bei 60 °C für 15 min auf dem Heizblock denaturiert.

NaOH/ β -Mercaptoethanol

NaOH	2 M
β -Mercaptoethanol	5,7 mM

in 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ mischen

384. *Synthese und Reinigung von rekombinanten Fusionsproteinen aus E. coli*

Rekombinante Proteine aus Hefe können für *in vitro*-Untersuchungen in *E. coli*-Stämmen synthetisiert und in einer anschließenden Reinigung effektiv konzentriert und von bakteriellen Proteinverunreinigungen befreit werden.

Proteinsynthese in E. coli-Zellen

Bei der Proteinsynthese können die Bedingungen für die Expression der Gene in Bezug auf die Verwendung verschiedener *E. coli*-Stämme, die Temperatur für die Kultivierung sowie die Induktionszeit individuell optimiert werden. Im Folgenden werden die Standardbedingungen beschrieben, die von Protein zu Protein variieren können.

Zur Proteinsynthese wurden *E. coli* BL21-Zellen mit einem Expressionsplasmid transformiert (367) und in eine Vorkultur aus LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum überführt. Die Zellen wurden schüttelnd über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Morgen in einer Hauptkultur aus LB- bzw. 2YT-Medium mit gleichem Antibiotikum auf eine OD_{600} von 0,2 verdünnt. Nach der Inkubation bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD_{600} von 1 wurde die Proteinsynthese durch Zugabe von 0,3 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Der Induktion liegt das Prinzip der Repression des im Plasmid enthaltenen *lac*-Promotors zu Grunde. Nach einer Induktionszeit von 3 h bei 15 °C wurden die Zellen durch

Zentrifugation geerntet ($8983 \times g/10 \text{ min}/4 \text{ }^\circ\text{C}$) und in 20 ml des zur Reinigung benötigten Puffers resuspendiert. Durch Zugabe von 20 μl (bei GST-Fusionsproteinen) oder 10 μl (bei 6His-Fusionsproteinen) 1 M DTT und 20 μl PLAC wurde zum einen die Funktion/Struktur der Proteine konserviert und zum anderen ihre Degradation sowie die Ausbildung von Aggregaten verhindert. Die Zelllyse erfolgte durch Lagerung für 10 min in flüssigem Stickstoff, eine weitere Inkubation für 10 min auf Eis und schnelles Auftauen der Zellsuspension. Diese wurde schließlich in ein Ultrazentrifugen-röhrchen überführt und die Zelltrümmer durch Zentrifugation ($183960 \times g/30 \text{ min}/4 \text{ }^\circ\text{C}$) pelletiert.

DTT (1 M)

DTT 3,08 g

in 20 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ lösen, sterilfiltrieren, aliquotieren, bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ lagern

PLAC

Pepstatin A 12 mg

Leupeptin 12 mg

Antipain 12 mg

Chymostatin 12 mg

einzelne Komponenten in je 1 ml DMSO lösen, vereinigen und aliquotieren, bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ lagern

Reinigung von 6His-Fusionsproteinen aus E. coli-Lysat

Für die Reinigung von 6His-Fusionsproteinen wurden die *E. coli*-Zellen nach dem Ernten in 20 ml 6His-Lysepuffer resuspendiert und wie oben beschrieben mit DTT und PLAC versetzt. 2 ml Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Agarose-Suspension wurden zum Äquilibrieren dreimal mit 6His-Lysepuffer gewaschen und anschließend mit dem Gesamtzelllysat in einem 50 ml-Röhrchen für 1 h unter Rollen bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Schließlich wurde die Lysat-suspension in eine Chromatographie-Säule gefüllt, wobei der Durchfluss aufgefangen wurde. Das Säulenmaterial wurde anschließend mit einer Fritte luftblasenfrei abgeschlossen um ein Austrocknen der Ni-NTA-Agarose zu verhindern. Anschließend wurde die Säule mit Waschpuffer überschichtet, wobei die Waschfraktionen aufgefangen und der Proteingehalt über die Absorption am NanoDrop bestimmt wurde. Sobald die Absorption A_{280} unter den Wert 0,05 gefallen war, wurde 8-10 Mal mit jeweils 1 ml Elutionspuffer eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden dabei aufgefangen und die Konzentrationen ebenfalls am NanoDrop bestimmt, um anschließend die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration zu vereinigen und mittels Gelfiltration in TEFP*-Puffer umzupuffern.

6His-Lysepuffer

Tris	50 mM
NaCl	200 mM
Imidazol	10 mM
β -Mercaptoethanol	1 mM
in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ lösen, pH 8,0 einstellen, sterilfiltrieren	

6His-Waschpuffer

Tris	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	20 mM
β -Mercaptoethanol	1 mM
in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ lösen, pH 8,0 einstellen, sterilfiltrieren	

6His-Elutionspuffer

Tris	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	250 mM
β -Mercaptoethanol	1 mM
in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ lösen, pH 8,0 einstellen, sterilfiltrieren	

Reinigung von GST-Fusionsproteinen aus E. coli-Lysat

Für die Reinigung von GST-Fusionsproteinen wurden die *E. coli*-Zellen nach dem Ernten in 20 ml PBSKMT resuspendiert und wie oben beschrieben mit DTT und PLAC versetzt. 2 ml GSH-Sepharose-Suspension wurden zum Äquilibrieren dreimal mit PBSKMT gewaschen und anschließend mit dem Gesamtzelllysat in einem 50 ml-Röhrchen für 1 h unter Rollen bei 4 °C inkubiert. Die Lysatsuspension wurde dann in eine Chromatographie-Säule gefüllt und der Durchlauf wurde aufgefangen. Das Säulenmaterial wurde anschließend mit einer Fritte luftblasenfrei abgeschlossen um ein Austrocknen der GSH-Sepharose zu verhindern. Anschließend wurde die Säule zum Waschen mit PBSKMT überschichtet, wobei die Waschfraktionen aufgefangen und der Proteingehalt über die Absorption am NanoDrop bestimmt wurde. Sobald die Absorption A_{280} unter den Wert 0,05 gefallen war, wurde 8-10 Mal mit jeweils 1 ml GSH-Elutionspuffer eluiert. Die einzelnen Fraktionen wurden dabei aufgefangen und die Konzentrationen ebenfalls am NanoDrop bestimmt, um anschließend die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration zu vereinigen und mittels Gelfiltration in TEFP*-Puffer umzupuffern.

GSH-Elutionspuffer

Tris-HCl pH 8	50 mM
Glutathion	10 mM
in H ₂ O _{dest.} lösen	

PBSKMT

NaCl	155 mM
KCl	3 mM
MgCl ₂	1 mM
NaH ₂ PO ₄	2,5 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
Tween 20	0,1 % (v/v)
in H ₂ O _{dest.} lösen, pH 7,3 einstellen, sterilfiltrieren	

Umpuffern gereinigter Proteine mittels Gelfiltration

Zur weiteren Lagerung und zur Optimierung der *in vitro* Experimente wurden die gereinigten Proteine über eine ZEBA-Gelfiltrationssäule aus dem jeweiligen Elutionspuffer in TEFP*-Puffer überführt. Dabei macht man sich zu Nutze, dass Proteine eine größere Molekülgröße als Ionen aufweisen. Die Gelmatrix ist so konzipiert, dass Proteine die Matrix schnell passieren und die Salze und Ionen des Puffers in die Matrix diffundieren und dort verbleiben. Zunächst wurde der Alkohol aus der ZEBA-Säule durch Zentrifugieren entfernt (1000 x g/2 min/4 °C) und diese anschließend durch Waschen mit TEFP*-Puffer äquilibriert. Die vereinigten Fraktionen aus der Proteinreinigung wurden auf das Säulenmaterial gegeben und anschließend unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Konzentration der Proteinlösung im gewünschten Puffer wurde am NanoDrop gemessen, die Lösung wurde aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

385. Analyse von Protein-Protein-Interaktionen und -Modifikationen

SUMOylierung von Fusionsproteinen in vitro

Der *in vitro* SUMOylierungsassay wurde mit aus *E. coli* gereinigten Fusionsproteinen (6His-tag an SUMOzyklus-Komponenten, GST-tag an Substraten) nach einem modifizierten Protokoll aus dem Buch „SUMO Protokolle“ (Yunus und Lima, 2009) durchgeführt.

Dabei wurde die prozessierte Form einer Lysinmutante von Smt3 (K11, 15, 19R) verwendet, um die Ausbildung von Smt3-Ketten zu vermindern (Bylebyl *et al.*, 2003). Die SUMOzyklus-Komponenten sowie das Substrat wurden in einem Totalvolumen von 30 μ l mit TEFP*-Puffer gemischt und 0,1 mM DTT wurde als reduzierendes Reagenz hinzugefügt (Tabelle 18).

Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 mM ATP gestartet, je nach Experiment wurde der Ansatz zwischen 0 und 90 min bei 30 °C inkubiert und anschließend für 1 min auf Eis gestellt, um die Reaktion zu stoppen. Um unspezifische SUMOylierung auszuschließen, wurde immer eine Kontrolle ohne Zugabe von ATP mitgeführt. Zur Denaturierung der Proteine wurden schlussendlich 17 μ l 3x SDS-Probenpuffer und 5 μ l 1 M DTT hinzugegeben und der Ansatz für 20 min bei 60 °C inkubiert. Wenn die SUMOylierung durch kollektive Coomassie-Färbung (382) analysiert werden sollte, wurde vor der Zugabe von SDS-Puffer und DTT eine Bindung an GSH-Sepharose durchgeführt, um die (SUMOylierten) GST-Fusionsproteine von den 6His-Fusionsproteinen des SUMOzyklus zu trennen. Dazu wurden 30 μ l GSH-Sepharose (äquilibriert in PBSKMT) mit 30 μ l SUMOylierungs-Ansatz und 300 μ l PBSKMT für 1 h bei 4 °C inkubiert und danach drei Mal mit 1 ml PBSKMT gewaschen. Für die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (381) und ihre anschließende Visualisierung mit kollektivem Coomassie oder mit GST-Antikörper nach einem Westernblot (382) wurden jeweils 10 μ l des SUMOylierungsansatzes verwendet.

Tabelle 18: Komponenten zur *in vitro* SUMOylierung von Proteinen

Komponente	mit ATP	ohne ATP
6His-Smt3 K11,15,19R	7,5 μ g	7,5 μ g
6His-Aos1/6His-Uba2(coexprimiert, E1-Heterodimer)	4 μ g	4 μ g
Ubc9-6His (E2-Enzym)	1,5 μ g	1,5 μ g
6His-Nfi1 1-422 (E3-Enzym, N-Terminus)	3,7 μ g	3,7 μ g
Substrat	3 μ g	3 μ g
DTT	0,1 mM	0,1 mM
ATP	5 mM	---
TEFP*-Puffer	ad 30 μ l	ad 30 μ l

TEFP*-Puffer

Bis-Tris	50 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	10 mM

in H₂O_{dest.} lösen, pH 6,5 einstellen, sterilfiltrieren

ATP-Stammlösung

ATP	50 mM
-----	-------

in TEFP*-Puffer lösen, pH 6,5 einstellen, bei -20 °C lagern

SDS-Probenpuffer (3x)

Tris	188 mM
SDS	210 mM
Bromphenolblau	60 mM
Glycerin	30 % (v/v)

in H₂O_{dest.} lösen

SUMOylierung von Proteinen in vivo

Die SUMOylierung von Proteinen *in vivo* wurde durch einen denaturierenden Ni-NTA-Bindungsversuch (Vitaliano-Prunier *et al.*, 2008) gezeigt. Dafür wurden *S. cerevisiae*-Zellen mit einem Plasmid transformiert (367), das *7HIS-SMT3* kodiert, wobei das Gen durch einen Kupfer-abhängigen Promotor überexprimiert wird. Die Induktion der *SMT3*-Expression erfolgte dabei durch Zugabe von 100 µM CuSO₄. Im Bindungsversuch wurden 7His-Smt3 sowie die SUMOylierten Substrate aus dem Zelllysate angereichert und das Substratprotein nach Auftrennung durch SDS-PAGE (381) und Westernblot immunologisch detektiert (382).

A) Kultivierung und Ernten der Zellen

Für den Bindungsversuch zum Nachweis der SUMOylierung von Substraten wurden zunächst Zellpellets der verwendeten Stämme hergestellt. Dafür wurden Einzelkolonien der Stämme von Selektivplatten in etwa 30 ml Selektivmedium mit CuSO₄ (Endkonzentration 100 µM) überführt und über Nacht schüttelnd bei 30 °C kultiviert. Am nächsten Morgen wurde die OD₆₀₀ der Vorkulturen gemessen, sie wurden in 300 ml Selektivmedium mit CuSO₄ auf eine OD₆₀₀ von 0,4 verdünnt und weiter schüttelnd bei 30 °C inkubiert. In der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,8 und 1 wurden 50 OD-Einheiten durch Zentrifugation (1300 x g/5 min/4 °C) und Waschen mit kaltem H₂O_{dest.} in 15 ml-Röhrchen geerntet. Nach vollständigem Entfernen des Überstandes wurden die

Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Während des ganzen Ernteprozesses wurde darauf geachtet, die Zellen kühl zu lagern, um die Aktivität der DeSUMOylierungs-Proteasen möglichst gering zu halten. Zusätzlich wurden 2 OD-Einheiten zur Herstellung von TCA-Proben (383) geerntet, um die Proteinsynthese in den jeweiligen Stämmen zu kontrollieren. Diese wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

B) Herstellen des Zelllysates

Zur denaturierenden Lyse der Zellen wurde das zuvor hergestellte Zellpellet in 1 ml kaltem Lysepuffer aufgenommen und in ein vorgekühltes 2 ml-Schraubdeckelreaktionsgefäß mit 250 µl Glaskügelchen überführt. Die Fragmentierung der Zellen erfolgte anschließend im Precellys 24, indem sie 15 Mal für 30 sek bei 6500 UpM geschüttelt wurden. Zwischen den einzelnen Lysezyklen wurden die Zellen für 5 min auf Eis gelagert, um einen Abbau der Proteine zu verhindern. Anschließend wurde das komplette Zelllysate von den Glaskügelchen getrennt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Auftrennung des Zelllysates in Überstand und Pellet durch Zentrifugation (19314 x g/20 min/4 °C), da der Bindungsversuch mit den solubilisierten Proteinen im Überstand erfolgt. Für die Lysekontrolle wurden 25 µl des Überstands und eine entsprechende Menge des Pellets (Pellet in 1 ml Lysepuffer resuspendieren und 25 µl entnehmen) entnommen und mit 25 µl HU-Puffer versetzt. Schließlich wurden die mit HU-Puffer versetzten Proben schüttelnd bei 60 °C für 15 min auf dem Heizblock inkubiert, um die Proteine zu denaturieren.

C) Bindungsversuch

Für den Bindungsversuch wurden zunächst 30 µl Ni-NTA-Agarose-Suspension durch dreimaliges Waschen mit jeweils 1 ml Lysepuffer äquilibriert. Der Überstand des Zelllysates wurde zu der Ni-NTA-Agarose gegeben und über Nacht bei 4 °C rollend inkubiert. Am nächsten Tag wurden vom Überstand 25 µl abgenommen und mit 25 µl HU-Puffer versetzt, um die Bindung von 7His-Smt3 an die Ni-NTA-Agarose überprüfen zu können. Diese Durchfluss-Probe wurde ebenfalls unter oben genannten Bedingungen denaturiert. Der Überstand wurde möglichst restlos abgenommen und die Ni-NTA-Agarose wurde dreimal mit jeweils 1 ml kaltem Waschpuffer gewaschen. Zum Eluieren und Denaturieren der gebundenen Proteine versetzte man die Ni-NTA-Agarose mit 30 µl HU-Puffer und inkubierte für 15 min bei 60 °C schüttelnd auf dem Heizblock.

Die Detektion der Proteine erfolgte nach ihrer Auftrennung mittels SDS-PAGE (381) und anschließendem Transfer auf eine PVDF-Membran mittels Westernblot immunologisch unter Anwendung spezifischer Antikörper (382).

Lysepuffer

NaH ₂ PO ₄	100 mM
Tris	10 mM
Harnstoff	8 M

in H₂O_{dest.} lösen, pH 8 einstellen, sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern

pro 10 ml Lysepuffer frisch dazugeben:

β-Mercaptoethanol	7 µl
NEM (2,5 mg/ml)	1 µl
PLAC	66 µl
Triton X-100 (10 %)	100 µl
Protease Inhibitor Cocktail	½ Tablette

Waschpuffer

NaH ₂ PO ₄	100 mM
Tris	10 mM
Harnstoff	8 M

in H₂O_{dest.} lösen, pH 6,3 einstellen, sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern

pro 10 ml Waschpuffer frisch dazugeben:

β-Mercaptoethanol	2,5 µl
Triton X-100 (10 %)	100 µl

HU-Puffer

Harnstoff	8 M
Tris	200 mM
EDTA	1 mM
SDS	5 %
Bromphenolblau	0,1 %
DTT	97 mM

in H₂O_{dest.} lösen, pH 6,8 einstellen, bei -20 °C lagern

Tandemaffinitätsreinigung (TAP-Reinigung)

Die TAP-Reinigung erlaubt es schnell und effizient Proteinkomplexe unbekannter Komposition, Aktivität und Funktion unter nativen Bedingungen aus Zellen zu reinigen (Rigaut *et al.*, 1999). Dabei wird der TAP-*tag* an das Zielprotein fusioniert, dessen assoziierte Proteine in einer anschließenden Analyse identifiziert werden sollen. Die TAP-Reinigung kombiniert zwei Affinitätsreinigungsschritte im nativen Puffer und erlaubt daher eine effiziente und spezifische Reinigung des Zielproteins und seiner assoziierten Proteine. Da die Überexpression von Genen zu nicht physiologischen Proteinkomplexen führen kann, wird ein möglichst natürliches Syntheseelevel des Zielproteins angestrebt, indem der *tag* N- oder C-terminal durch homologe Rekombination am endogenen Locus integriert wird (0) (Rigaut *et al.*, 1999). Der TAP-*tag* besteht zum einen aus zwei IgG-Bindungsdomänen von Protein A aus *Staphylococcus aureus* (ProtA(ZZ)) und zum anderen aus dem Calmodulin-bindenden-Peptid (CBP). Die beiden *tags* sind durch die Spaltsequenz für die *tobacco etch virus* Protease (TEV-Protease) miteinander verbunden (Abbildung 10).

Calmodulin-bindendes Peptid (CBP) TEV-Protease Spaltstelle
 NH₂-SMEKRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGALDYDIPTTASENLYFQGELKTAALAQHDEA

IgG-Bindungsdomäne von Protein A (Z)
VDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSANLLAEAKKLNDQAQPK

IgG-Bindungsdomäne von Protein A (Z)
VDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSANLLAEAKKLNDQAQPKVDANSAGKST-COOH

Abbildung 10: Aminosäuresequenz des TAP-tags. Die Sequenz des *tags* ist vom N-terminalen Bereich aus dargestellt und ist für C-terminale Fusionen geeignet. Das CBP und die beiden (Z)-Interaktionsdomänen von Protein A sind fett hervorgehoben und die Sequenz der TEV-Protease Spaltstelle ist fett und unterstrichen dargestellt.

Im ersten Schritt der Reinigung werden die Proteinkomplexe aus dem Zelllysat über den Protein A-*tag* (ProtA(ZZ)) an IgG-Sepharose gebunden (Abbildung 11 A). Um eine denaturierende Elution von der IgG-Sepharose unter sauren Bedingungen zu vermeiden, wird die TEV-Protease hinzugegeben und die gebundenen Proteinkomplexe werden somit nativ eluiert (Abbildung 11 B). In einem weiteren Reinigungsschritt werden das Zielprotein und seine assoziierten Proteine über die reversible, Ca²⁺-abhängige Bindung des CBP an Calmodulin-Sepharose gebunden (Abbildung 11 C). Dabei werden die TEV-Protease und weitere Verunreinigungen gewaschen. Die Verwendung von Komplexbildnern (EGTA) erlaubt schließlich eine schonende, milde Elution der Proteinkomplexe (Abbildung 11 D), welche dann analysiert werden können.

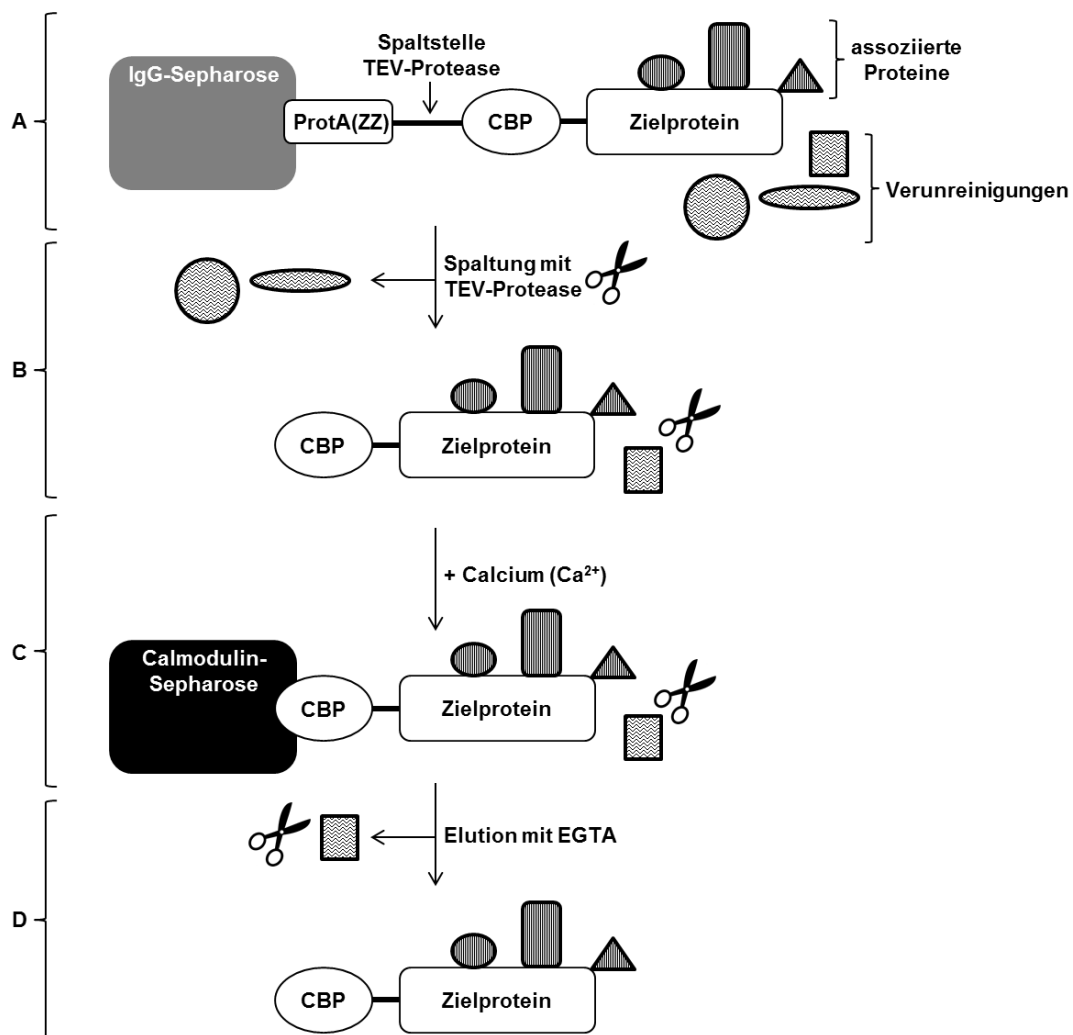


Abbildung 11: Schema der Tandemaffinitätsreinigung. **A:** Bindung des TAP-Fusionsproteins an IgG-Sepharose. Der TAP-tag besteht aus zwei IgG-Bindungsdomänen von Protein A (ProtA(ZZ)), der Spaltstelle für die TEV-Protease und dem Calmodulin-bindenden Peptid (CBP). **B:** Elution durch TEV-Protease-Spaltung. Verunreinigungen werden gewaschen. **C:** Bindung der Proteinkomplexe an Calmodulin-Sepharose in Anwesenheit von Ca^{2+} . **D:** Verunreinigungen und TEV-Protease werden gewaschen. Elution unter Verwendung von EGTA.

A) Herstellung der Zellpellets

Zur Durchführung der TAP-Reinigung wurden zunächst Zellpellets des Stammes hergestellt, der das TAP-Fusionsprotein synthetisiert, und des entsprechenden Wildtyp-Stammes als Kontrolle. Dazu wurden Einzelkolonien von einer YPD_{Ade} -Agarplatte in 300 ml überführt und schüttelnd über Nacht bei 30 °C inkubiert. Zusätzlich wurden 2 l Medium über Nacht bei 30 °C vorgewärmt. Am nächsten Morgen wurde die OD_{600} der Vorkultur bestimmt, welche

dann in 2 l vorgewärmten Medium auf eine OD_{600} zwischen 0,3 und 0,4 verdünnt wurde. Es folgte eine Inkubation der Zellen schüttelnd bei 30 °C bis zu einer OD_{600} zwischen 3,0 und 3,5. Geerntet wurde die komplette Kultur durch Zentrifugation (4226 x g/15 min/4 °C). Nach dem Waschen der Zellpellets mit kaltem H₂O wurden diese in einem 50 ml-Röhrchen vereinigt und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach der vollständigen Abnahme des Überstandes wurden die Pellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

B) Mechanisches Aufschließen der Zellen

Vor der Reinigung wurde das Zelllysate hergestellt. Während die Zellen in H₂O auftauten, wurden Zentrifugen und 50 ml-Röhrchen sowie Zentrifugenröhrchen vorgekühlt. Das Zellpellet wurde im 50 ml-Röhrchen bis auf 25 ml mit TAP-Puffer aufgefüllt und resuspendiert. Zur Suspension wurden ½ Tablette „Protease Inhibitor Cocktail“ (Roche), 200 µl PMSF und 25 µl DTT (1 M) gegeben und durch über Kopf Schwenken gemischt. Das Ganze wurde in einen *Pulverisette*-Mahlbecher gefüllt und das Röhrchen mit weiteren 5 ml TAP-Puffer ausgespült, die ebenfalls in den Becher gefüllt wurden. Nach Zugabe von 25 ml Glaskügelchen erfolgte die Lyse in der Planeten-Monomühle (500 UpM/20 min/4 °C). Während der Lyse wurde eine 50 ml-Spritze ohne Kolben an einem Stativständer eingeklemmt, ein 50 ml-Trichter wurde darauf platziert und ein 50 ml-Röhrchen zum Auffangen des Lysats darunter gestellt. Das Lysat wurde durch den Trichter in die Spritze gefüllt, mit Hilfe des Kolbens in das 50 ml-Röhrchen gedrückt und damit von den Glaskügelchen getrennt. Die groben Zelltrümmer wurden durch einen Zentrifugationsschritt pelletiert (4226 x g/20 min/4 °C) und der Überstand in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt. Es folgten zwei Zentrifugationsschritte (39554 x g/20 min/ 4 °C), wobei der Überstand nach der ersten Zentrifugation in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Der Überstand nach der zweiten Zentrifugation wurde in ein 50 ml-Röhrchen mit 150 µl vorgelegter IgG-Sepharose überführt, die zuvor mit TAP-Puffer äquilibriert wurde.

C) Affinitätsreinigung an IgG-Sepharose

Die Bindung der Proteinkomplexe aus dem Lysat an die IgG-Sepharose erfolgte während einer Inkubation durch Rollen bei 4 °C für 1,5 h. Für die Elution durch TEV-Protease-Spaltung wurde die IgG-Sepharose in 10 ml Chromatographie-Säulen gesammelt, indem der Durchfluss verworfen und anschließend zweimal mit 5 ml TAP-Puffer (+ 0,5 mM DTT) gewaschen wurde. Dabei wurde das 50 ml-Röhrchen beide Male mit den 5 ml Lysepuffer (+ 0,5 mM DTT) ausgespült, um so viel IgG-Sepharose wie möglich in der Säule zu

sammeln. Die Säule wurde zunächst unten verschlossen, mit TAP-Puffer (+ 0,5 mM DTT) auf 5 ml aufgefüllt und nach Zugabe von 30 µl gereinigter TEV-Protease auch oben mit einem Deckel dicht verschlossen. Die Spaltung erfolgte durch Inkubation bei 4 °C rollend über Nacht.

D) Affinitätsreinigung an Calmodulin-Sepharose

Nach der Spaltung mit der TEV-Protease wurde das Eluat in einer neuen 10 ml Chromatographie-Säule aufgefangen. Die erste Säule wurde viermal mit 1 ml TAP-Puffer gespült und der Durchfluss ebenfalls in der neuen Säule gesammelt. Es folgte die Zugabe von 20 µl CaCl₂ (1 M), 10 µl DTT (1 M) und 150 µl mit TAP-Puffer äquilibrierter Calmodulin-Sepharose. Die Bindung erfolgte für 1,5 h unter Rollen bei 4 °C. Schließlich wurde der Durchfluss verworfen und die Calmodulin-Sepharose in der Säule zweimal mit 5 ml TAP-Puffer (+1 mM DTT) gewaschen. Im Anschluss daran eluierte man die Proteinkomplexe, indem man 300 µl Elutionspuffer auf die Calmodulin-Sepharose gab, die Säule für 10 min bei 35 °C im Wasserbad inkubierte und den Durchfluss in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auffing. Die Elution wurde weitere drei Mal wiederholt.

E) TCA-Fällung der Proteine im Eluat

Zum Eluat wurden 130 µl 100 % TCA gegeben, durch kräftiges Schütteln gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (11885 x g/10 min/4 °C) wurden die gefällten Proteine pelletiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml kaltem Aceton gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 15 µl NuPAGE LDS-Probenpuffer (1x) aufgenommen und die gereinigten Proteine durch Inkubation bei 60 °C für 15 min denaturiert. 5 µl des Eluates wurden für eine SDS-PAGE (381) und eine anschließende Westernblot-Analyse, in der das Zielprotein immunologisch detektiert wurde, verwendet (382). Die Proteine in den restlichen 10 µl des Eluates wurden nach kurzer Auftrennung (SDS-PAGE, System von Thermo Scientific) mittels kolloidaler Coomassie-Färbung visualisiert (382) und massenspektrometrisch analysiert.

TAP-Puffer

Tris pH 7,5	50 mM
NaCl	200 mM
MgCl ₂	1,5 mM
NP40	1,5 % (v/v)
DDM	1 % (w/v)

in H₂O_{dest.} lösen, sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern

Elutionspuffer

Tris pH 7,5	50 mM
NaCl	50 mM
EGTA	5 mM

in H₂O_{dest.} lösen, sterilfiltrieren

PMSF

PMSF	200 mM
------	--------

in EtOH_{absolut} lösen

Modifizierte TAP-Reinigung bei Verwendung des S-TAP-Tags

Da das relativ große Molekulargewicht des originalen TAP-tags (21 kDa) in manchen Fällen die Assoziation der Proteinkomplexe beeinflussen kann und bei der Verwendung des Calmodulin-bindenden Peptids im zweiten Reinigungsschritt die Effizienz von Protein zu Protein variieren kann, gibt es modifizierte TAP-tags, die verschiedene tags miteinander kombinieren. In dieser Arbeit wurde der S-TAP-tag verwendet, der sich vom Original dadurch unterscheidet, dass das CBP durch ein Oligopeptid aus der RNase A, den sogenannten S-tag, ersetzt wird. Der S-tag besteht aus 15 Aminosäuren (KETAAAKFERQHMDS) und die Affinitätsreinigung beruht auf der starken Wechselwirkung zwischen diesem Peptid und dem S-Protein, welches ebenfalls ein Teil der RNase A ist. Dementsprechend wurden die nach dem ersten Reinigungsschritt eluierten Proteinkomplexe an S-Protein-Sepharose gebunden und die Elution erfolgte durch Zugabe von 150 µl verdünntem SDS-Probenpuffer (1:3 in H₂O) und eine Inkubation bei 60 °C für 15 min schüttelnd auf dem Heizblock. Das Eluat wurde anschließend von der S-Protein-Sepharose entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Im letzten Schritt wurde das Volumen des Eluates im Vakuumkonzentrator auf etwa 21 µl reduziert, so dass 1/3 für die Westernblot-Analyse und 2/3 für die Massenspektrometrie verwendet werden konnten.

Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Die Co-Immunpräzipitation ist ein weit verbreitetes Verfahren zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen, bei dem die Bindung von Antikörpern an ihre Antigene genutzt wird. Im ersten Schritt der Co-IP wurden Antikörper gegen das Zielprotein, dessen Interaktionspartner bestimmt werden sollten, an Protein A/G-Sepharose gekoppelt. Protein A sowie Protein G besitzen die Fähigkeit durch Interaktion mit den schweren Ketten an die Fc-Region von Immunglobulinen (IgG) zu binden. Dafür wurden 25 µl Protein A/G-Sepharose mit IP-Puffer äquilibriert und mit 300 µl IP-Puffer sowie 3 µg des entsprechenden Antikörpers für 1,5 h schüttelnd bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt wurde Zelllysat in Anwesenheit der mit Antikörpern gekoppelten Protein A/G-Sepharose im nativen Puffer inkubiert und somit das Zielprotein mit seinen Interaktionspartnern angereichert. Das Zelllysat von *S. cerevisiae* wurde wie für die Detektion von SUMOylierten Substraten hergestellt (s. o.), wobei jedoch der native IP-Puffer verwendet wurde. Die Anreicherung erfolgte durch Inkubation des Zelllysates mit der Protein A/G-Sepharose rollend bei 4 °C über Nacht. Nach drei Waschschritten mit jeweils 1 ml IP-Puffer wurden die gebundenen Proteine mit 25 µl SDS-Probenpuffer eluiert. 1/3 des Eluates wurde für die Westernblot-Analyse und 2/3 wurden für die Massenspektrometrie verwendet.

IP-Puffer

HEPES pH 7,4	100 mM
NaCl	125 mM
CaCl ₂	1 mM
Triton X-100	1 % (v/v)
DDM	1 % (w/v)
pro 10 ml IP-Puffer frisch dazugeben:	
NEM (2,5 mg/ml)	1 µl
PLAC	66 µl
Protease Inhibitor Cocktail	½ Tablette

Zellbiologische Methoden

391. Luminometrische Assays

Zur Messung von freiem cytosolischem Ca²⁺ in *S. cerevisiae*-Zellen wurde in dieser Arbeit ein Verfahren angewandt, das sich die Eigenschaften des Photoproteins Aequorin zu Nutze macht. Dabei handelt es sich um ein Apoprotein aus der Qualle *Aequorea victoria*, welches

sich in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff mit dem Luziferin Coelenterazin zu einem Holoenzym zusammensetzt und aufgrund von drei EF-Hand-Motiven freies Ca^{2+} binden kann. Die Bindung von Ca^{2+} an Aequorin führt zu dessen Konformationsänderung, wodurch es die Umwandlung des Coelenterazins zu angeregtem Coelenteramid und CO_2 katalysiert. Beim Übergang des Coelenteramids zum Grundzustand wird blaues Licht (469 nm) emittiert, welches mit einem Luminometer detektiert werden kann (Abbildung 12). Diese Methode bietet den Vorteil, dass sie sehr sensitiv und frei von Hintergrund ist sowie eine breite Detektionsspannweite besitzt, so dass Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen $0,1 \mu\text{M}$ und $100 \mu\text{M}$ gemessen werden können.

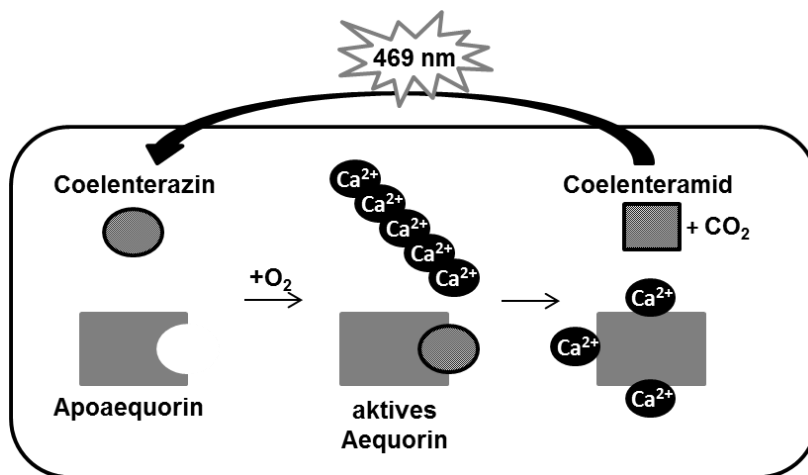


Abbildung 12: Prinzip der Ca^{2+} -Messung in luminometrischen Assays. Das Photoprotein Aequorin und das Luziferin Coelenterazin setzen sich in Anwesenheit von Sauerstoff zum aktiven Aequorin zusammen. Aequorin bindet freies Ca^{2+} und wandelt Coelenterazin zu Coelenteramid und Kohlenstoffdioxid um. Beim Übergang des Coelenteramids zum Grundzustand wird Licht von 469 nm Wellenlänge emittiert.

*Vorbereiten der *S. cerevisiae*-Zellen für luminometrische Assays*

Mit einem Apoaequorin-kodierenden Plasmid transformierte *S. cerevisiae*-Zellen wurden in 5 ml entsprechendem Selektivmedium über Nacht bei 30 °C rollend kultiviert. Am nächsten Morgen wurde eine OD₆₀₀ von 0,4 in 20 ml Medium eingestellt und die Kultur bis zur späten logarithmischen Phase weiter bei 30 °C inkubiert. 4 OD-Einheiten zur Herstellung von TCA-Proben (383) und Kontrolle der Proteinsynthese sowie 10 ml der Kultur für die luminometrischen Assays wurden durch Zentrifugation (500 x g/1 min/RT) in 15 ml-Röhrchen geerntet. Die Zellen wurden im selben Medium resuspendiert, wobei eine OD₆₀₀ von 10 eingestellt wurde, und in ein Reagenzglas überführt. Nach Zugabe von Coelenterazin (Endkonzentration von 60 μM) inkubierte man rollend bei 30 °C für 20 min. Zum Entfernen

des überschüssigen Coelenterazins wurden die Zellen mit frischem Medium gewaschen und anschließend zur Regeneration für weitere 45-90 min bei 30 °C rollend inkubiert. Bis zur Messung wurden die Zellen lichtgeschützt im Becherglas in 30 °C warmem Wasser aufbewahrt und kurz vor der Messung wurde ihre OD₆₀₀ bestimmt.

Coelenterazin

Coelenterazin 6 mM
in EtOH_{absolut} lösen, bei -20 °C lagern

Luminometrische Messung nach Applikation eines hyperosmotischen Schocks

Das Luminometer wurde etwa 30 min vor der Messung angeschaltet und auf 30 °C aufgewärmt. Für jede Probe wurden jeweils drei Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit 200 µl Kultur befüllt, so dass in einem Experiment jeder Stamm drei Mal unabhängig voneinander gemessen werden konnte. Die Messung der Grundlumineszenz der Zellen erfolgte für 30 sek. Anschließend wurden mittels eines Injektors 200 µl einer 3 M NaCl-Lösung (gelöst im selben Medium) injiziert und somit ein hyperosmotischer Schock mit einer Endkonzentration von 1,5 M NaCl auf die Zellen appliziert. Die von den Zellen emittierte Lumineszenz wurde für 3 min bei 469 nm detektiert und in der anschließenden Auswertung als relative Lumineszenzeinheit (RLU) gegen die Zeit aufgetragen.

392. Fluoreszenzmikroskopie

In vivo-Fluoreszenzmikroskopie intakter Hefezellen

Mittels Fluoreszenzmikroskopie lässt sich die subzelluläre Lokalisation von Proteinen bestimmen. Dafür wurde ein aus der Qualle *Aequorea victoria* stammendes Fluorochrom als *tag* an das Zielprotein fusioniert, mit Licht von 475 nm Wellenlänge angeregt und seine Fluoreszenz mikroskopisch detektiert. Die Lokalisation dieses grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) ließ auf die Lokalisation des Zielproteins schließen. Zur Analyse der Lokalisation eines GFP-Fusionsproteins wurde ein Plasmid, das für dieses Protein kodiert, in *S. cerevisiae*-Zellen transformiert (367). Einzelkolonien der Transformanten wurden von Selektivplatten in 2 ml entsprechendes Medium überführt und über Nacht rollend bei 30 °C inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 10 ml Selektivmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,4 verdünnt und bis zum Erreichen der späten logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ zwischen 1,5 und 2,5) rollend bei 30 °C inkubiert. 4 OD-Einheiten wurden für die Herstellung von TCA-Proben (383) entnommen und 10 µl der Kultur für die mikroskopische Analyse eingesetzt, indem sie auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas verschlossen wurden.

Fluoreszenzmikroskopie von Hefe-Sphäroplasten

Als Sphäroplasten werden Zellen bezeichnet, deren Zellwand durch enzymatischen Abbau vollständig entfernt wurde. In dieser Arbeit wurde die Herstellung von Hefe-Sphäroplasten dafür verwendet, die Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen in der Vakuolenmembran mikroskopisch zu detektieren. Sphäroplasten haben in diesem Fall den Vorteil, dass die Vakuole auf ein Maximum vergrößert und somit besser sichtbar ist als in intakten *S. cerevisiae*-Zellen. Zur Analyse der Lokalisation eines GFP-Fusionsproteins wurde ein Plasmid, das für dieses Protein kodiert, in *S. cerevisiae*-Zellen transformiert. Einzelkolonien der Transformanten wurden von Selektivplatten in 5 ml entsprechendes Medium überführt und über Nacht rollend bei 30 °C inkubiert. Nach Bestimmen der OD₆₀₀ der Vorkultur wurde diese in 20 ml Selektivmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,4 verdünnt und bis zum Erreichen der späten logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ zwischen 1,5 und 2,5) weiter schüttelnd bei 30 °C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (500 x g/4 min/RT) geerntet, wobei zusätzlich 4 OD-Einheiten für die Herstellung von TCA-Proben (383) entnommen wurden. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 3 ml Inkubationspuffer resuspendiert und die Zellsuspension dann für 30 min bei 30 °C rollend inkubiert. Es folgte die Zugabe von 150 mg Rinderserumalbumin (BSA), 4 ml Protoplastenpuffer und 7 µl Zymolyase (Stammlösung: 10 mg/ml) für den enzymatischen Abbau der Zellwand. Nach einer weiteren Inkubation bei 30 °C für 45 min wurden die Zellen durch erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen pelletiert und schließlich in 7 ml Stabilisierungspuffer resuspendiert. Nach einer Regeneration der Zellen für 1-2 Tage bei 30 °C im Stabilisierungspuffer wurden die Sphäroplasten wie intakte Zellen (s.o.) für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet.

Inkubationspuffer

KH ₂ PO ₄	50 mM
β-Mercaptoethanol	0,2 % (v/v)
in H ₂ O _{dest.} lösen, pH 7,2 mit KOH einstellen, sterilfiltrieren	

Protoplastenpuffer

KH ₂ PO ₄	50 mM
β-Mercaptoethanol	0,2 % (v/v)
Sorbitol	2,4 M
in H ₂ O _{dest.} lösen, pH 7,2 mit KOH einstellen, sterilfiltrieren	

Stabilisierungspuffer

KCl	220 mM
CaCl ₂	10 mM
MgCl ₂	5 mM
MES	5 mM
Glukose	1 % (w/v)

in H₂O_{dest.} lösen, pH 7,2 mit KOH einstellen, sterilfiltrieren

393. Wachstum von *S. cerevisiae*-Zellen unter Stressbedingungen

Wachstumstests von Hefestämmen unter verschiedenen Stressbedingungen wurden auf SD-Agarplatten mit entsprechenden Zusätzen durchgeführt. In Tabelle 19 sind die jeweiligen Komponenten, die verwendeten Endkonzentrationen sowie der Zeitpunkt der Zugabe aufgeführt. Der Wachstumstest unter Hitze- bzw. Kältestress erfolgte bei 37 °C bzw. 15 °C.

Tabelle 19: Zusätze zu SD-Agarplatten für Wachstumstests unter Stressbedingungen

Komponente	Endkonzentration	Zeitpunkt der Zugabe
NaCl	1 M/ 1,5 M	vor dem Autoklavieren
Sorbitol	0,5 M/ 1 M/ 1,5 M	vor dem Autoklavieren
EtOH	5 %/ 7,5%/ 10%	nach dem Autoklavieren
CaCl ₂	1 mM/ 50 mM/ 100 mM/ 300 mM	nach dem Autoklavieren
MgCl ₂	300 mM	nach dem Autoklavieren
CuCl ₂	1 mM/ 2 mM	nach dem Autoklavieren

Übernacht-Kulturen wurden in 10 ml Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,4 verdünnt und für 3-4 Stunden schüttelnd bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde die gleiche Zellzahl geerntet und eine OD₆₀₀ zwischen 0,8 und 0,9 eingestellt. Für die Untersuchung des Wachstums unter oxidativem Stress wurde eine OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt, H₂O₂ zum Medium zugegeben (Endkonz: 3 mM und 5 mM) und für eine weitere Stunde bei 30 °C inkubiert. In einer Mikrotiter-Platte wurden die Zellen in jeweils 200 µl H₂O seriell verdünnt und schließlich mit einem Replikationsstempel auf SD-Agarplatten mit entsprechenden Zusätzen übertragen (oxidativer Stress: SD-Agarplatten ohne Zusatz). Nach einer Inkubation der Platten für 2-3 Tage bei 30 °C wurde das Wachstum der Hefezellen mit einem Scanner dokumentiert. Zusätzlich wurden vor dem Verdünnen 4 OD-Einheiten zur Herstellung von TCA-Proben (383) und Kontrolle der Proteinsynthese (381, 382) entnommen.

Ergebnisse

Posttranslationale Modifikation von Yvc1 durch SUMO

Untersuchungen mit einem Hefe-Zwei-Hybrid-System sowie diverse Bindungsversuche (Chang, 2010) haben gezeigt, dass Yvc1 mit Komponenten des SUMO-Zyklus interagiert, insbesondere mit Smt3, der E3-Ligase Nfi1 und dem E2-Enzym Ubc9. Daraus erschließt sich die Hypothese, dass Yvc1 durch Smt3 posttranslational modifiziert wird. Um diese Annahme zu bestätigen, sollte diese posttranslationale Modifikation *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen und die Lysinreste, an welchen die Modifikation erfolgt, identifiziert werden. Im weiteren Verlauf sollten schließlich die phänotypischen Auswirkungen der SUMOylierung von Yvc1 aufgeklärt und näher untersucht werden.

401. SUMOylierung von Yvc1-Fragmenten *in vitro*

Smt3 wird in einer ATP-abhängigen Enzymkaskade bestehend aus E1-, E2- und E3-Enzymen (Abbildung 7) kovalent an das Substratprotein gebunden. Die Modifikation lässt sich *in vitro* nachweisen, indem die natürlichen SUMOylierungsbedingungen nachgestellt werden und das SUMOylierte Substrat immunologisch detektiert wird. Da es sich bei Yvc1 um ein Membranprotein handelt, welches aus einer N-terminalen Domäne, dem hydrophoben Bereich mit 6 Transmembrandomänen und der C-terminalen Domäne besteht (Abbildung 13), wurden in den folgenden *in vitro* SUMOylierungsassays rekombinant hergestellte GST-Fusionsproteine der hydrophilen terminalen Domänen Yvc1-N bzw. -N₀ und Yvc1-C bzw. -C₀ als Substrate verwendet.

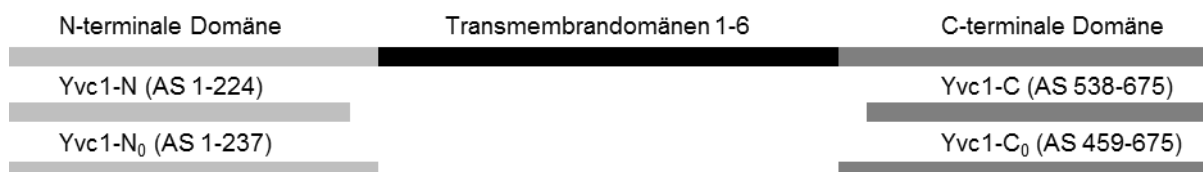


Abbildung 13: Domänenstruktur von Yvc1 und verwendete Yvc1-Fragmente für *in vitro*-SUMOylierungsassays. Die Vorhersage der Struktur stützt sich auf *in silico* Untersuchungen von Su *et al.* (2007).

Sowohl der C-Terminus als auch der N-Terminus von Yvc1 wird *in vitro* durch Smt3 modifiziert

In den *in vitro* SUMOylierungsassays wurden aus *E. coli* gereinigte 6His-Fusionsproteine des SUMO-Zyklus verwendet. Die Verwendung einer KR-Mutante von Smt3 (6His-Smt3 K11, 15, 19R) sollte dabei die Ausbildung von SUMO-Ketten vermindern (Bylebyl *et al.*, 2003). Das heterodimere E1-Enzym Aos1/Uba2 wurde im *E. coli* Stamm BL21 (DE3) pET28a-AOS1 pET11a-UBA2 coexprimiert und synthetisiert. Neben dem E2-Enzym Ubc9 wurde außerdem der N-Terminus des E3-Enzyms Nfi1 (Nfi1¹⁻⁴²²) für die *in vitro* Experimente gebraucht, um die SUMOylierungseffizienz zu steigern. GST-fusionierte Substratproteine wurden mit den SUMO-Zyklus Komponenten nach Zugabe von ATP für 90 min bei 30 °C in TEFP*-Puffer inkubiert und die SUMOylierungsreaktion anschließend durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer gestoppt. Eine Negativkontrolle ohne ATP wurde für jedes Substrat mitgeführt. Die Proteine der SUMOylierungsansätze wurden mittels SDS-PAGE getrennt und die nicht SUMOylierten und SUMOylierten Substrate nach einem Westernblot unter Verwendung von GST-spezifischem Antikörper immunologisch detektiert (Abbildung 14).

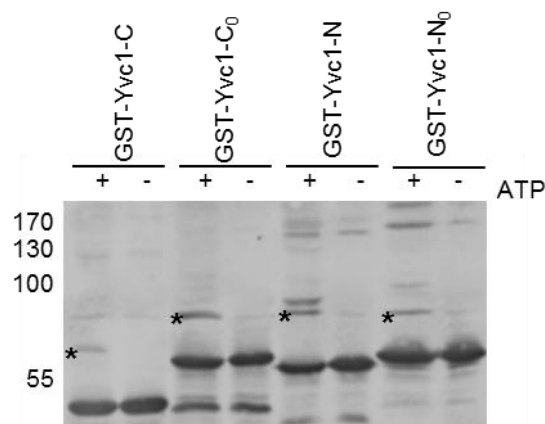


Abbildung 14: *In vitro* SUMOylierung von GST-Yvc1-N und -N₀ sowie GST-Yvc1-C und -C₀ unter Standardbedingungen. Je 3 µg gereinigtes GST-Yvc1-N und -N₀ sowie GST-Yvc1-C und -C₀ wurden in einem SUMOylierungsansatz (Endvolumen 30 µl) mit 7,5 µg Smt3, 4 µg E1 (Aos1/Uba2), 1,5 µg E2 (Ubc9), 3,7 µg E3 (Nfi1¹⁻⁴²²) und 0,1 mM DTT in Anwesenheit und in Abwesenheit von 5 mM ATP für 90 min bei 30 °C in TEFP*-Puffer inkubiert. Die Ansätze wurden mit SDS-Probenpuffer und 0,2 M DTT versetzt und für 20 min bei 60°C erhitzt. Nach einer SDS-PAGE und dem anschließenden Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion der SUMOylierten (*) und nicht SUMOylierten Substrate unter Verwendung eines GST-spezifischen primären Antikörpers und eines Cy5-gekoppelten sekundären Antikörpers. Die Molekularmassen der Markerproteine sind links in kDa angegeben.

Die kovalente Bindung des Smt3 an ein Substratprotein führt zu einer Molekularmassen-Zunahme von etwa 20 kDa. Alle vier verwendeten Substrate weisen SUMOylierungsprodukte höherer Molekularmasse auf, die in den Negativkontrollen ohne ATP-Zugabe nicht auftauchen. Daraus lässt sich schließen, dass sowohl im N-Terminus als auch im C-Terminus mindestens eine SUMOylierungsstelle vorhanden ist.

Abhängigkeit der Yvc1-N SUMOylierung von der Inkubationszeit und der E1- bzw. E2-Menge

Am Beispiel von Yvc1-N wurde die Abhängigkeit der *in vitro* SUMOylierung von der Inkubationszeit untersucht. Ein SUMOylierungsansatz mit dem Endvolumen von 300 µl und Yvc1-N als Substrat wurde angefertigt, welcher bei 30 °C inkubiert wurde. Direkt nach der Zugabe von ATP (0 min) und nach 1, 2, 4, 8, 16, 30, 60 und 90 min wurden jeweils 30 µl entnommen und zum Stoppen mit SDS-Probenpuffer und 0,2 M DTT versetzt. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese auf eine PVDF-Membran transferiert und mit GST-spezifischem Antikörper detektiert (Abbildung 15).

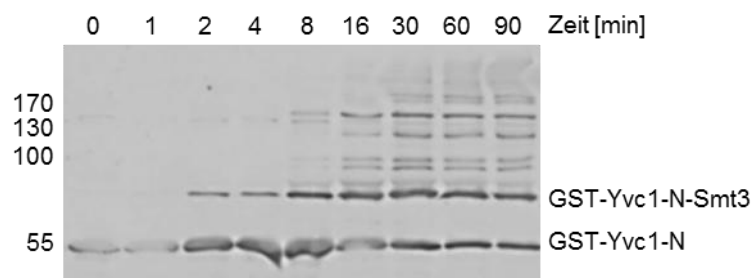


Abbildung 15: Kinetik der SUMOylierung von GST-Yvc1-N. 30 µg gereinigtes GST-Yvc1-N wurden in einem SUMOylierungsansatz (Endvolumen 300 µl) mit 75 µg Smt3, 40 µg E1 (Aos1/Uba2), 15 µg E2 (Ubc9), 37 µg E3 (Nfi1¹⁻⁴²²) und 0,1 mM DTT in Anwesenheit von 5 mM ATP bei 30 °C in TEFP*-Puffer inkubiert. Nach 0, 1, 2, 4, 8, 16, 30, 60 und 90 min wurden jeweils 30 µl entnommen, mit SDS-Probenpuffer und 0,2 M DTT versetzt und für 20 min bei 60 °C erhitzt. Nach einer SDS-PAGE und dem anschließenden Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion des SUMOylierten Substrates unter Verwendung eines GST-spezifischen primären Antikörpers und eines Cy5-gekoppelten sekundären Antikörpers. Die Molekularmassen der Markerproteine sind links in kDa angegeben.

Nach einer Inkubationszeit von zwei Minuten ist ein SUMOylierungsprodukt von Yvc1-N zu erkennen, dessen Menge bis zur Inkubationszeit von 16 min zunimmt. Eine längere Inkubationszeit führt zu mehrfach SUMOylierten Substraten, die zusätzlich zur Einfach-SUMOylierung von Yvc1-N zu erkennen sind. Ob die MehrfachSUMOylierung auf die Ausbildung von Smt3-Ketten an einem oder mehreren Lysinresten zurückzuführen ist, kann

diesen Daten nicht entnommen werden. Eine Inkubationszeit von 15 min reicht somit für das Maximum an EinfachSUMOylierung mit einem Minimum an MehrfachSUMOylierung aus.

Desweiteren wurde untersucht, ob sich die Menge an E1- und E2-Enzym auf die SUMOylierungseffizienz von Yvc1-N auswirkt. Für beide Enzyme wurde jeweils die Hälfte (1/2) und das Doppelte (x2) der Standardmenge (x1) getestet sowie in einem Ansatz die doppelte Menge an E2 und gleichzeitig die halbe Menge an E1 verwendet. Für jede Bedingung wurde außerdem eine Negativkontrolle ohne ATP mitgeführt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte für 15 min bei 30 °C. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese auf eine PVDF-Membran transferiert und mit GST-spezifischem Antikörper detektiert (Abbildung 16). Es konnten keine Unterschiede zwischen den untersuchten Bedingungen festgestellt werden. Sowohl die Menge an einfach SUMOyliertem Yvc1-N als auch die Ausbildung von MehrfachSUMOylierungen waren in den verschiedenen Ansätzen vergleichbar. Somit stellt weder das E1-Enzym noch das E2-Enzym eine limitierende Komponente in den verwendeten SUMOylierungsansätzen dar.

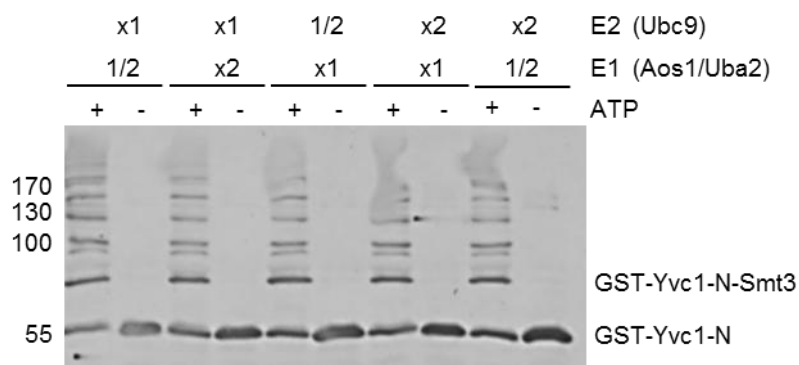


Abbildung 16: Titration von E1 (Aos1/Uba2) und E2 (Ubc9) im SUMOylierungsansatz von GST-Yvc1-N. 3 µg gereinigtes GST-Yvc1-N wurden in einem SUMOylierungsansatz (Endvolumen 30 µl) mit 7,5 µg Smt3, E1 (Aos1/Uba2), E2 (Ubc9), 3,7 µg E3 (Nfi1¹⁻⁴²²) und 0,1 mM DTT in Anwesenheit und in Abwesenheit von 5 mM ATP für 15 min bei 30 °C in TEFP*-Puffer inkubiert. Die Menge von E1 und E2 variierte dabei wie angegeben. E1: 4 µg (x1), 2 µg (1/2), 8 µg (x2). E2: 1,5 µg (x1), 0,75 µg (1/2), 3 µg (x2). Die Ansätze wurden nach der Inkubation mit SDS-Probenpuffer und 0,2 M DTT versetzt und für 20 min bei 60 °C erhitzt. Nach einer SDS-PAGE und dem anschließenden Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion der SUMOylierten Substrate unter Verwendung eines GST-spezifischen primären Antikörpers und eines Cy5-gekoppelten sekundären Antikörpers. Die Molekularmassen der Markerproteine sind links in kDa angegeben.

Abhängigkeit der Yvc1-C SUMOylierung vom pH-Wert

Da die SUMOylierungseffizienz von Yvc1-C im Vergleich zu Yvc1-N geringer ausfällt (Abbildung 14), sollte sie für dieses Fragment durch die Erhöhung des pH-Wertes des Puffers optimiert werden (persönliche Mitteilung, Hanne Folz). Dazu wurden zwei SUMOylierungsansätze angefertigt, wobei der eine zusätzlich mit Tris-Base versetzt wurde, um eine pH-Wert-Änderung von 6,5 auf 7,5 zu erhalten. Direkt nach der Zugabe von ATP (0 min) und nach 8, 16, und 30 min wurden jeweils 30 µl entnommen. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese auf eine PVDF-Membran transferiert und mit GST-spezifischem Antikörper detektiert (Abbildung 17). Im Ansatz mit einem pH-Wert von 6,5 erkennt man eine schwache SUMOylierung von Yvc1-C nach einer 8-minütigen Inkubationszeit, die bis zu der Inkubationszeit von 30 min an Intensität zunimmt. Im Ansatz mit einem pH-Wert von 7,5 erfolgt die SUMOylierung schneller, schon nach einer 8-minütigen Inkubationszeit ist die SUMOylierung von Yvc1-C deutlich zu erkennen und erreicht nach 16 min das Maximum. Nach einer Inkubationszeit von 30 min ist keine Veränderung im Vergleich zur 16 min Probe zu erkennen. Die SUMOylierungseffizienz des C-Terminus von Yvc1 kann somit durch leichte Erhöhung des pH-Wertes *in vitro* positiv beeinflusst werden.

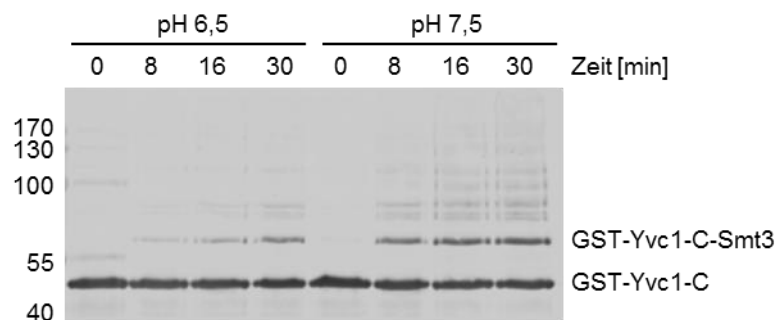


Abbildung 17: SUMOylierung von Yvc1-C in Abhängigkeit des pH-Wertes. 15 µg gereinigtes GST-Yvc1-C wurden in zwei SUMOylierungsansätzen (Endvolumen jeweils 150 µl) mit 37,5 µg Smt3, 20 µg E1 (Aos1/Uba2), 7,5 µg E2 (Ubc9), 18,5 µg E3 (Nfi1¹⁻⁴²²) und 0,1 mM DTT in Anwesenheit von 5 mM ATP bei 30 °C in TEFP*-Puffer inkubiert. Ein Ansatz wurde mit 5 µl Tris-Base versetzt, um den pH-Wert auf 7,5 zu erhöhen. Nach 0, 8, 16 und 30 min wurde jeweils ein Aliquot von 30 µl entnommen, mit SDS-Probenpuffer und 0,2 M DTT versetzt und für 20 min bei 60 °C erhitzt. Nach einer SDS-PAGE und dem anschließenden Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion des SUMOylierten Substrates unter Verwendung eines GST-spezifischen primären Antikörpers und eines Cy5-gekoppelten sekundären Antikörpers. Die Molekularmassen der Markerproteine sind links in kDa angegeben.

Eine massenspektrometrische Analyse der in vitro SUMOylierten Yvc1-Fragmente liefert sieben potentielle SUMOylierungsstellen

Nach der Optimierung der Bedingungen für die *in vitro* SUMOylierung der terminalen Domänen von Yvc1 sollten die SUMO-Akzeptorlysine in diesen Fragmenten anhand einer massenspektrometrischen Analyse identifiziert werden. Ein SUMOylierungsansatz mit einem Endvolumen von 60 µl wurde für jedes Substrat (Yvc1-N und -N₀, Yvc1-C und -C₀) angefertigt und für 15 min bei 30 °C inkubiert. Eine Negativkontrolle ohne Zugabe von ATP wurde für jedes Substrat mitgeführt. Vor dem Stoppen der Reaktion wurde ein Bindungsversuch an GSH-Sepharose durchgeführt, um die 6His-markierten SUMO-Zyklus-Enzyme aus den Ansätzen zu entfernen und somit die (SUMOylierten) Substrate zu reinigen.

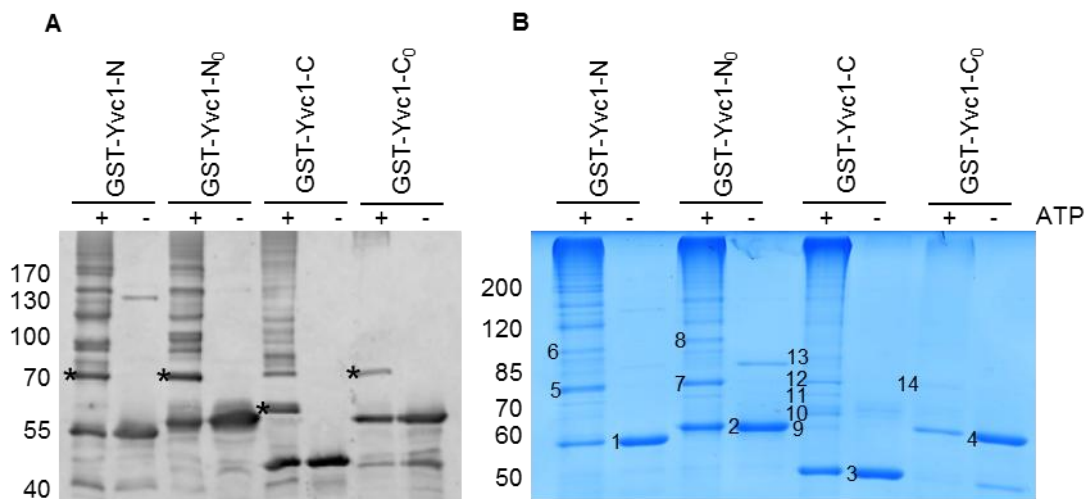


Abbildung 18: *In vitro* SUMOylierung von GST-Yvc1-N und -N₀ sowie GST-Yvc1-C und -C₀ unter optimierten Bedingungen für die massenspektrometrische Analyse. Je 6 µg gereinigtes GST-Yvc1-N und -N₀ sowie GST-Yvc1-C und -C₀ wurden in einem SUMOylierungsansatz (Endvolumen 60 µl) mit 15 µg Smt3, 8 µg E1 (Aos1/Uba2), 3 µg E2 (Ubc9), 7,4 µg E3 (Nfi1¹⁻⁴²²) und 0,1 mM DTT in Anwesenheit und in Abwesenheit von 5 mM ATP für 15 min bei 30 °C in TEFP*-Puffer inkubiert. Nach einem Bindungsversuch an GSH-Sepharose wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer und 0,2 M DTT versetzt, für 20 min bei 60 °C erhitzt und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Molekulargewichte der Markerproteine sind links in kDa angegeben. **A:** Detektion der SUMOylierten Substrate (*) unter Verwendung eines GST-spezifischen primären Antikörpers und eines Cy5-gekoppelten sekundären Antikörpers. **B:** Visualisierung der Proteine mittels kolloidaler Coomassie-Färbung. Die Zahlen geben die Banden an, welche massenspektrometrisch analysiert wurden.

Zum einen wurden die Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE und dem Transfer auf eine PVDF-Membran mit GST-spezifischem Antikörper detektiert (Abbildung 18, A), zum anderen wurden sie mittels kolloidaler Coomassie-Färbung visualisiert (Abbildung 18, B) und das Gel schließlich zur Analyse zum Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie an der Universität in Göttingen geschickt. In Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Henning Urlaub wurden dort der Trypsin-Verdau, die Massenspektrometrie sowie die Datenanalyse durchgeführt. Die Zahlen in Abbildung 6, B geben die Banden an, welche massenspektrometrisch untersucht wurden. Einerseits handelte es sich dabei um die nicht SUMOylierten Substrate in den Negativkontrollen ohne ATP (1-4), andererseits um die vermuteten SUMOylierungsprodukte der verwendeten Substrate (Yvc1-N und -N₀: 5-8, Yvc1-C und -C₀: 9-14).

In der massenspektrometrischen Analyse wurden drei SUMOylierte Lysinreste im N-Terminus von Yvc1 und vier SUMOylierte Lysinreste in seiner C-terminalen Domäne identifiziert. Für diese Peptide wurde während der in Göttingen durchgeführten Datenanalyse ein Peptid-Score berechnet, welcher die relative Wahrscheinlichkeit für die Richtigkeit des Ergebnisses angibt (Tabelle 20).

Tabelle 20: SUMOylierte Lysinreste im N-Terminus und im C-Terminus von Yvc1

AS		Motiv	Bande(n)	Peptid-Score
K73	N-Terminus	VKLA	5	21
K212		IKDD	5, 7, 8	35, 42, 48
K231		LKAP	7, 8	38, 64
K547	C-Terminus	IKYN	13	35
K599		LKLQ	10, 11, 13	31, 69, 23
K634		DKDE	13	25
K671		DKKE	11	15

In welcher Bande die SUMOylierten Peptide gefunden wurden sowie das dem Akzeptorlysin entsprechende SUMOylierungsmotiv sind ebenfalls Tabelle 20 zu entnehmen. In den Negativkontrollen ohne ATP (Bande 1-4) wurden keine SUMOylierten Peptide gefunden. Während der Lysinrest K212 komplett mit dem SUMOylierungsmotiv übereinstimmt, fehlt den anderen Motiven entweder der große hydrophobe Rest vor dem Lysinrest (K634, K671) oder sie enden nicht mit einem Aspartat- oder Glutamatrest (K73, K231, K547, K599). Der

SUMOylierte Lysinreste K73 wurde lediglich in Bande 5 gefunden, wohingegen K212 in den Banden 5, 7 und 8 vertreten war. Da der Lysinrest K231 nur im längeren Yvc1-N₀-Fragment vorhanden ist, wurde dieser nur in den Banden 7 und 8 gefunden. Im C-terminalen Teil war der SUMOylierte Lysinrest K599 in drei Banden vorhanden (10, 11, 13), die restlichen drei SUMOylierten Lysinreste des C-Terminus waren in jeweils einer Bande vertreten. Die höchsten Peptid-Scores der massenspektrometrischen Analyse lassen sich den Lysinresten K212 und K231 im N-Terminus sowie K547 und K599 im C-Terminus zuordnen.

Im weiteren Verlauf sollten die identifizierten SUMOylierungsstellen experimentell bestätigt werden. Dazu wurden Yvc1-Fragmente konstruiert, in welchen die entsprechenden Lysinreste zu Argininresten mutiert sind. Diese Mutation wurde deshalb gewählt, weil ein Argininrest ebenfalls eine basische, polare Seitenkette mit freier NH₂-Gruppe besitzt, jedoch nicht durch SUMO modifiziert wird. Außer den Einzelmutationen wurden auch weitere Mutationskombinationen im N-Terminus sowie im C-Terminus hergestellt und in *in vitro* SUMOylierungsassays untersucht.

Die Lysinreste K212 und K231 im N-Terminus von Yvc1 werden in vitro SUMOyliert

Um die SUMOylierungsstellen im N-Terminus von Yvc1 zu identifizieren, wurden mutierte Konstrukte von Yvc1-N und -N₀ hergestellt, als GST-Fusionsproteine aus *E. coli*-Zellen gereinigt und anschließend in *in vitro* SUMOylierungsassays als Substrate verwendet. Abbildung 19 zeigt die schematische Darstellung der verwendeten Yvc1-Fragmente. Alle in Yvc1-N und Yvc1-N₀ vorhandenen Lysinreste sind als schwarze Striche dargestellt und die zu Argininresten mutierten Lysinreste als weiße Striche aufgeführt. Die in der Massenspektrometrie identifizierten SUMOylierten Lysinreste sind unten angegeben. Durch Einfügen von Punktmutationen in die Basensequenz von Yvc1-N und Yvc1-N₀ wurden die Lysinreste K73, K212 und K231 zu Argininresten mutiert. Durch Umklonierung der Einzelmutanten wurden Doppelmutanten der Yvc1-Fragmente erzeugt und zusätzlich wurden per Gensynthese (Firma eurofins) und anschließende Klonierung Konstrukte hergestellt, die mehrere mutierte Lysinreste enthalten. Die Korrektheit der hergestellten Konstrukte wurde mittels Sequenzierung kontrolliert.

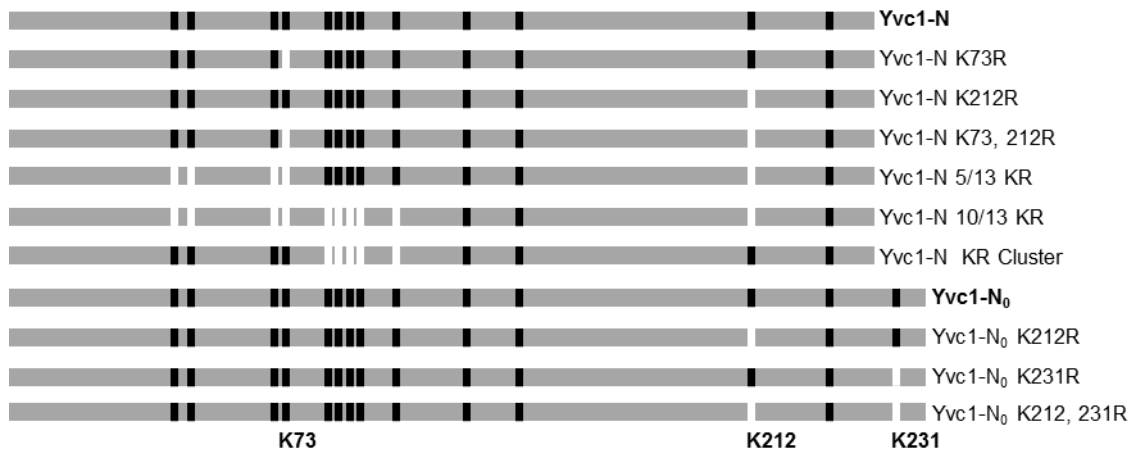


Abbildung 19: Schematische Darstellung der KR-Konstrukte von Yvc1-N und Yvc1-N₀ zur Identifizierung von SUMOylierungsstellen in *in vitro* SUMOylierungsassays. Die im jeweiligen Fragment vorhandenen Lysinreste sind als schwarze Striche dargestellt. Die Mutation eines Lysinrests zu einem Argininrest ist als weißer Strich angegeben. Die in der Massenspektrometrie identifizierten SUMOylierten Lysinreste sind unten aufgeführt.

Es folgte der Vergleich der mutierten Konstrukte mit dem jeweiligen Wildtyp-Fragment in *in vitro* SUMOylierungsassays. Ein SUMOylierungsansatz mit dem jeweiligen Yvc1-Fragment als Substrat wurde angefertigt und bei 30 °C inkubiert. Direkt nach der Zugabe von ATP (0 min) und nach 2, 4, 8, 16 und 30 min wurden Proben entnommen und die Reaktion gestoppt. Für jedes Substrat wurde eine Kontrolle ohne Zugabe von ATP mitgeführt. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese auf eine PVDF-Membran transferiert und mit GST-spezifischem Antikörper detektiert.

Die Untersuchung der potentiellen SUMOylierungsstellen K73 und K212 erfolgte mittels mutierter Yvc1-N-Fragmente, in welchen der Lysinrest K231 nicht vorhanden ist (Abbildung 19). Für den Wildtyp Yvc1-N, die Einzelmutanten und die Doppelmutante von K73 und K212 sowie für die Fragmente mit mehreren mutierten Lysinresten wurden *in vitro* SUMOylierungs-Kinetiken erstellt (Abbildung 20). Nach einer zweiminütigen Inkubation von Yvc1-N im SUMOylierungsansatz erkennt man eine SUMOylierung, die mit steigender Inkubationszeit deutlicher wird. Während die Mutation des Lysinrests K73 keinen Einfluss auf die SUMOylierungseffizienz von Yvc1-N hat, führt die Mutation des Lysinrests K212 zu einer drastischen Reduktion der SUMOylierung. Der Effekt der K212R-Mutation spiegelt sich auch in der Doppelmutante Yvc1-N K73, 212R wieder. Sind zusätzlich zur K212R-Mutation die ersten vier Lysinreste des N-Terminus mutiert (Yvc1-N 5/13 KR), so wird das Fragment effizienter SUMOyliert als die K212R-Mutante. Ab einer Inkubationszeit von 4 min erkennt man eine SUMOylierung, die mit der Inkubationszeit ansteigt. Das Konstrukt, in welchem

außer der K212R-Mutation die ersten neun Lysinreste zu Argininresten mutiert sind (Yvc1-N 10/13 KR), zeigt *in vitro* keine SUMOylierung, wodurch die drei verbliebenen Lysinreste als alternative SUMOylierungsstellen ausgeschlossen werden können. Im zweiten Drittel des N-Terminus befindet sich ein Cluster von fünf Lysinresten, das Konstrukt mit der Mutation dieser Lysinreste (Yvc1-N KR Cluster) verhält sich wie der Wildtyp, wobei die SUMOylierung in diesem Fall etwas schwächer erscheint. Die Mutation des Lysinrests K212 zusätzlich zum Lysin-Cluster verhält sich genauso wie die Einzelmutteration K212R (Daten nicht gezeigt).

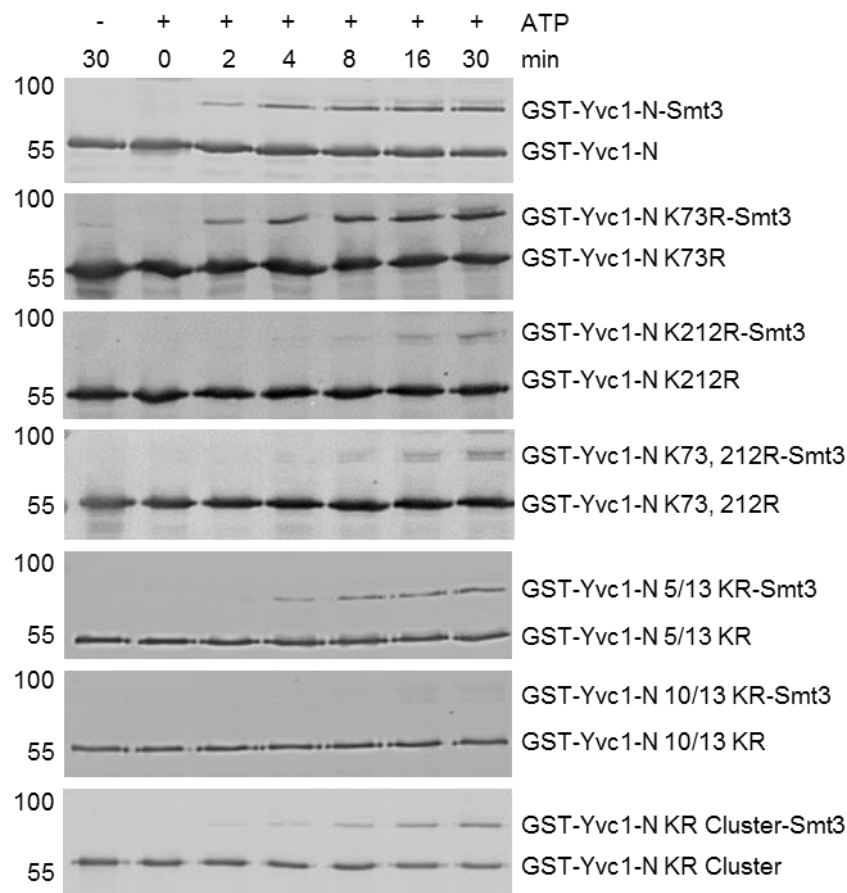


Abbildung 20: *In vitro* SUMOylierungs-Kinetik von GST-Yvc1-N WT im Vergleich mit den KR-Mutanten. 21 µg gereinigtes Substrat (GST-Yvc1-N und GST-Yvc1-N KR-Konstrukte) wurden in einem SUMOylierungsansatz (Endvolumen 210 µl) mit 52,5 µg Smt3, 28 µg E1 (Aos1/Uba2), 10,5 µg E2 (Ubc9), 25,9 µg E3 (Nfi1¹⁻⁴²²) und 0,1 mM DTT in Anwesenheit von 5 mM ATP bei 30 °C in TEFP*-Puffer inkubiert. Nach 0, 2, 4, 8, 16 und 30 min wurden jeweils 30 µl entnommen, mit SDS-Probenpuffer und 0,2 M DTT versetzt und für 20 min bei 65°C erhitzt. Pro Substrat wurde jeweils eine Negativkontrolle ohne Zugabe von ATP mitgeführt. Nach einer SDS-PAGE und dem anschließenden Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion der SUMOylierten Substrate unter Verwendung eines GST-spezifischen primären Antikörpers und eines Cy5-gekoppelten sekundären Antikörpers. Die Molekularmassen der Markerproteine sind links in kDa angegeben.

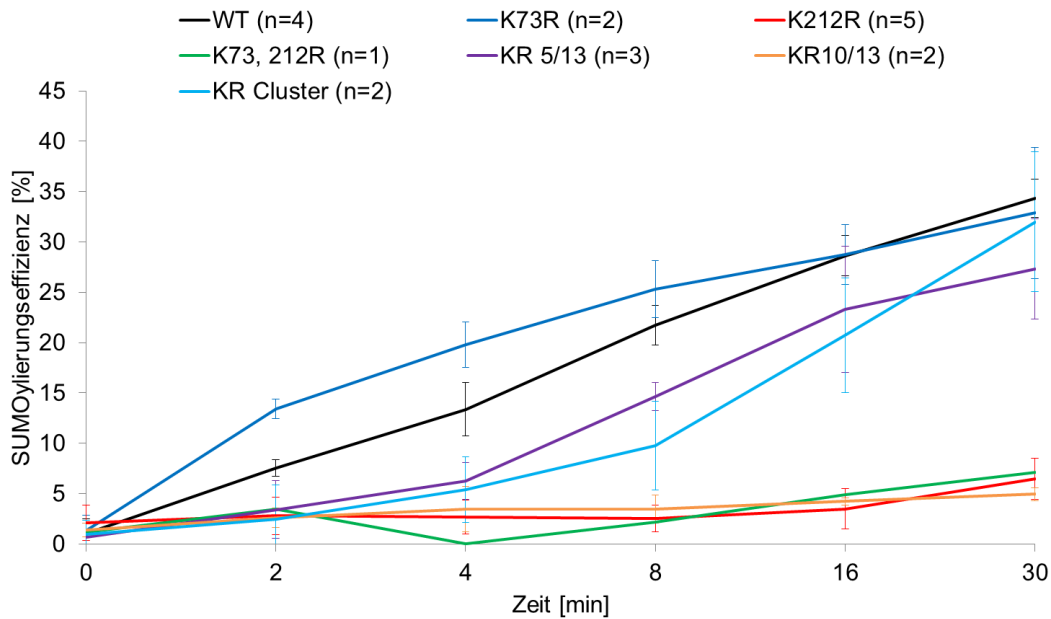


Abbildung 21: Quantitativer Vergleich der *in vitro* SUMOylierungs-Kinetik von GST-Yvc1-N WT und den KR-Mutanten. *In vitro* SUMOylierungs-Kinetiken wurden für die angegebenen GST-Yvc1-N Konstrukte (GST-Yvc1-N WT sowie KR-Mutanten) durchgeführt. Die Gesamtmenge an eingesetztem Substrat (SUMOyliert und nicht SUMOyliert) wurde densitometrisch bestimmt und daraus der prozentuale Anteil an SUMOyliertem Substrat für jeden Zeitpunkt berechnet. Die Mittelwerte aus mehreren, voneinander unabhängigen Experimenten wurden gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Standardabweichungen und die Anzahl (n) der Experimente sind angegeben.

Zum quantitativen Vergleich der SUMOylierung von Yvc1-N und den mutierten Yvc1-N-Fragmenten wurde die Gesamtmenge des eingesetzten Substrates densitometrisch bestimmt und anschließend der prozentuale Anteil an SUMOyliertem Protein zu jedem Zeitpunkt berechnet. Die Mittelwerte aus mehreren, voneinander unabhängigen Experimenten wurden schließlich gegen die Zeit aufgetragen. Die Standardabweichungen sowie die Anzahl (n) der Experimente sind ebenfalls angegeben (Abbildung 21). Wie in Abbildung 8 schon zu erkennen war, verhält sich die K73R-Mutante in der SUMOylierungs-Kinetik wie das Wildtyp-Fragment. Bereits nach einer Inkubationszeit von 2 min liegen 8 % bzw. 13 % des eingesetzten Proteins in SUMOylierter Form vor und die Menge steigt in beiden Fällen auf etwa 34 % an. Im Gegensatz dazu ist die Menge an SUMOyliertem Substrat in den Fällen von Yvc1-N K212R, Yvc1-N K73, 212R und Yvc1-N 10/13 KR auch nach 30-minütiger Inkubationszeit auf maximal 5 % limitiert. Die Konstrukte Yvc1-N 5/13 KR und Yvc1-N KR Cluster verhalten sich ähnlich wie der Wildtyp, wobei die SUMOylierung jedoch langsamer erfolgt und der prozentuale Anteil an modifiziertem Protein nach einer Inkubationszeit von 30 min etwas geringer ausfällt (27 % bzw. 33 %).

Insgesamt zeigen die Daten aus Abbildung 20 und Abbildung 21, dass die Einzelmutation K212R in Yvc1-N den maximalen Effekt mit der geringsten Veränderung des Substrats verursacht.

Die Verifizierung der potentiellen SUMOylierung am Lysinrest K231 wurde mit dem verlängerten Fragment Yvc1-N₀ durchgeführt (Abbildung 19). Einzelmutanten der Lysinreste K212 und K231 sowie eine Doppelmutante dieser zwei Lysinreste wurden hergestellt und in *in vitro* SUMOylierungs-Kinetiken mit dem Wildtyp-Fragment verglichen (Abbildung 22).

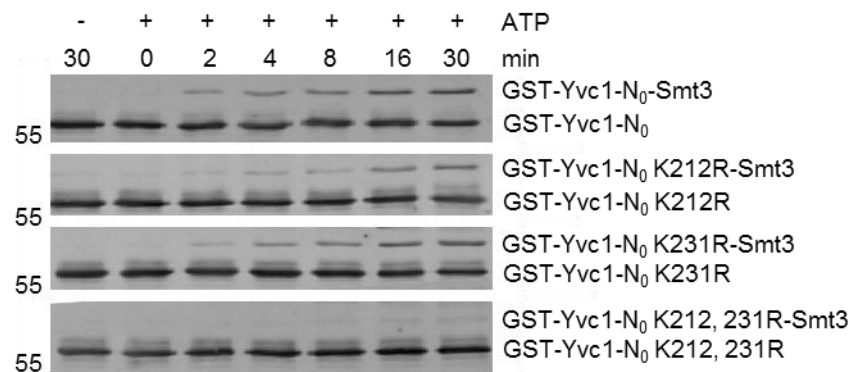


Abbildung 22: *In vitro* SUMOylierungs-Kinetik von GST-Yvc1-N₀ WT im Vergleich mit den KR-Mutanten. 21 µg gereinigtes Substrat (GST-Yvc1-N₀ und GST-Yvc1-N₀ KR-Konstrukte) wurden in einem SUMOylierungsansatz (Endvolumen 210 µl) mit 52,5 µg Smt3, 28 µg E1 (Aos1/Uba2), 10,5 µg E2 (Ubc9), 25,9 µg E3 (Nfi1¹⁻⁴²²) und 0,1 mM DTT in Anwesenheit von 5 mM ATP bei 30 °C in TEFP*-Puffer inkubiert. Nach 0, 2, 4, 8, 16 und 30 min wurden jeweils 30 µl entnommen, mit SDS-Probenpuffer und 0,2 M DTT versetzt und für 20 min bei 65°C erhitzt. Pro Substrat wurde jeweils eine Negativkontrolle ohne Zugabe von ATP mitgeführt. Nach einer SDS-PAGE und dem anschließenden Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion der SUMOylierten Substrate unter Verwendung eines GST-spezifischen, primären Antikörpers und eines Cy5-gekoppelten sekundären Antikörpers. Die Molekularmassen der Markerproteine sind links in kDa angegeben.

Bereits nach einer zweiminütigen Inkubationszeit ist eine SUMOylierung von Yvc1-N₀ zu erkennen, die mit steigender Inkubationszeit zunimmt. Während die Mutation des Lysinrests K212 im kürzeren Fragment Yvc1-N einen fast vollständigen Verlust der SUMOylierung zur Folge hat (Abbildung 9), lässt sich in diesem Fall eine RestSUMOylierung deutlich erkennen. Die Mutation des Lysinrests K231 führt zu einer leichten Verringerung der SUMOylierungseffizienz, die RestSUMOylierung erfolgt sehr wahrscheinlich am Lysinrest K212. Die gleichzeitige Mutation der beiden Lysinreste K212 und K231 führt hingegen zu einer vollständigen Hemmung der SUMOylierung von Yvc1-N₀.

Zum quantitativen Vergleich der SUMOylierung von Yvc1-N₀ und den mutierten Yvc1-N₀-Fragmenten wurde die Gesamtmenge des eingesetzten Substrates densitometrisch bestimmt und anschließend der prozentuale Anteil an SUMOyliertem Protein zu jedem Zeitpunkt berechnet. Die Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten wurden schließlich gegen die Zeit aufgetragen. Die mittleren Abweichungen weichen in der Regel maximal um 7 % vom Mittelwert ab (Abbildung 23). Die SUMOylierungseffizienz des Wildtyp-Fragments Yvc1-N₀ steigt mit zunehmender Inkubationszeit bis auf 38 % (30 min). Die Einzelmutationen der Lysinreste K212 bzw. K231 führen dazu, dass die entsprechenden Fragmente langsamer SUMOyliert werden, wobei die Menge an SUMOyliertem Substrat nach einer Inkubationszeit von 30 min geringer ist als im Wildtyp (K212R: 25 %, K231R: 27 %). Sind beide Lysinreste zu Argininresten mutiert, so ist die Menge an SUMOyliertem Substrat auch nach 30-minütiger Inkubationszeit auf höchstens 5 % limitiert.

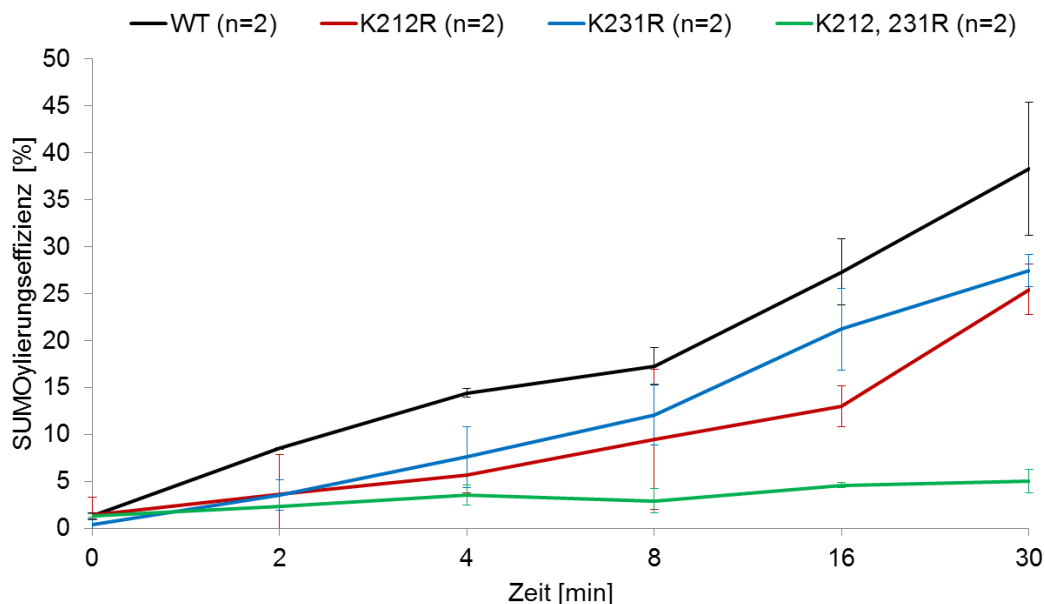


Abbildung 23: Quantitativer Vergleich der *in vitro* SUMOylierungs-Kinetik von GST-Yvc1-N₀ WT und den KR-Mutanten. *In vitro* SUMOylierungs-Kinetiken wurden für die angegebenen Yvc1-N₀ Konstrukte (GST-Yvc1-N₀ WT sowie KR-Mutanten) durchgeführt. Die Gesamtmenge an eingesetztem Substrat (SUMOyliert und nicht SUMOyliert) wurde densitometrisch bestimmt und daraus der prozentuale Anteil an SUMOyliertem Substrat für jeden Zeitpunkt berechnet. Die Mittelwerte aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten wurden gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die mittlere Abweichung und die Anzahl (n) der Experimente sind angegeben.

Aus Abbildung 22 und Abbildung 23 wird ersichtlich, dass nur die gleichzeitige Mutation der Lysinreste K212 und K231 zu einem Verlust der SUMOylierung von Yvc1-N₀ führt.

Für die Identifizierung der SUMO-Akzeptorlysine in der N-terminalen Domäne von Yvc1 (Abbildung 20 - Abbildung 23) lässt sich somit zusammenfassend festhalten, dass die Lysinreste K212 und K231 mit hoher Wahrscheinlichkeit die einzigen SUMOylierungsstellen repräsentieren.

Die Lysinreste K547 und K599 im C-Terminus von Yvc1 werden in vitro SUMOyliert

Die Untersuchung der potentiellen SUMOylierungsstellen in der C-terminalen Domäne von Yvc1 erfolgte mit dem Yvc1-C-Fragment sowie den entsprechenden KR-Mutanten als Fusionen mit GST.

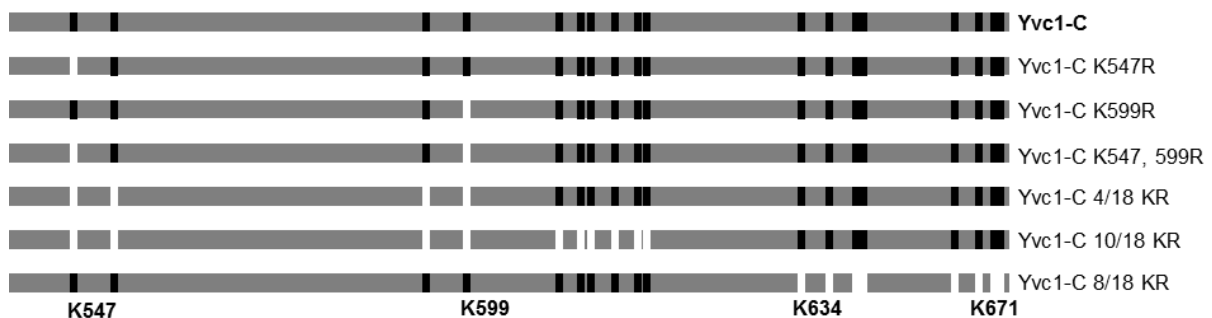


Abbildung 24: Schematische Darstellung der KR-Konstrukte von Yvc1-C zur Identifizierung von SUMOylierungsstellen in *in vitro* SUMOylierungsassays. Die im jeweiligen Fragment vorhandenen Lysinreste sind als schwarze Striche dargestellt. Die Mutation eines Lysinrests zu einem Argininrest ist als weißer Strich angegeben. Die in der Massenspektrometrie identifizierten SUMOylierten Lysinreste sind unten aufgeführt.

Einzelmutanten und eine Doppelmutante der Lysinreste K547 und K599 wurden konstruiert, da ihnen der höchste Peptid-Score in der Auswertung der massenspektrometrischen Analyse zugeordnet wurde (Tabelle 20). Um die restlichen Lysinreste im Yvc1-C-Fragment als SUMOylierungsstellen zu identifizieren oder auszuschließen, wurden außerdem mittels Gensynthese und anschließender Klonierung Konstrukte hergestellt, in welchen die ersten vier, die ersten zehn und die letzten acht Lysinreste zu Argininresten mutiert sind (Abbildung 24).

Für jedes Substrat (WT-Fragment und KR-Mutanten) wurde ein SUMOylierungsansatz angefertigt und bei 30 °C inkubiert. Direkt nach der Zugabe von ATP (0 min) und nach 2, 4, 8, 16, und 30 min wurden Proben entnommen und die Reaktion gestoppt. Für jedes Substrat wurde eine Negativkontrolle ohne Zugabe von ATP mitgeführt, die für 30 min inkubiert wurde. Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden diese auf eine PVDF-Membran transferiert und mit GST-spezifischem Antikörper detektiert (Abbildung 25).

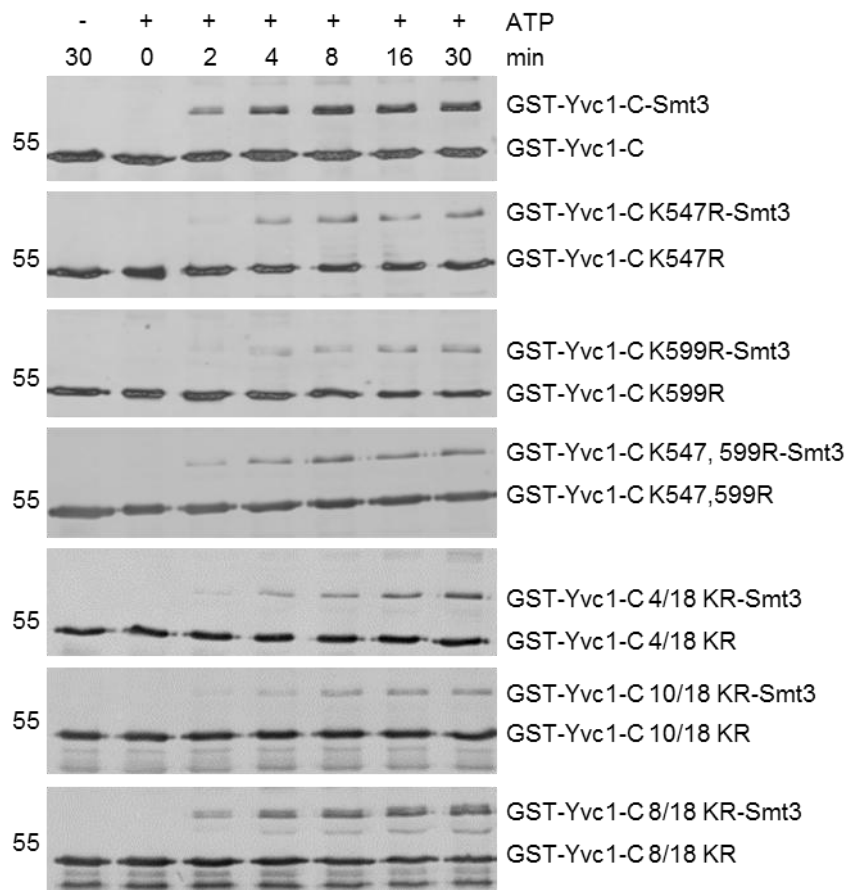


Abbildung 25: *In vitro* SUMOylierungs-Kinetik von GST-Yvc1-C WT im Vergleich mit den KR-Mutanten. 21 µg gereinigtes Substrat (GST-Yvc1-C und GST-Yvc1-C KR-Konstrukte) wurden in einem SUMOylierungsansatz (Endvolumen 210 µl) mit 52,5 µg Smt3, 28 µg E1 (Aos1/Uba2), 10,5 µg E2 (Ubc9), 25,9 µg E3 (Nfi1¹⁻⁴²²) und 0,1 mM DTT in Anwesenheit von 5 mM ATP bei 30 °C in TEFP*-Puffer inkubiert. Nach 0, 2, 4, 8, 16 und 30 min wurden jeweils 30 µl entnommen, mit SDS-Probenpuffer und 0,2 M DTT versetzt und für 20 min bei 65°C erhitzt. Pro Substrat wurde jeweils eine Negativkontrolle ohne Zugabe von ATP mitgeführt. Nach einer SDS-PAGE und dem anschließenden Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion der SUMOylierten Substrate unter Verwendung eines GST-spezifischen, primären Antikörpers und eines Cy5-gekoppelten sekundären Antikörpers. Die Molekularmassen der Markerproteine sind links in kDa angegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 2 min liegt ein geringer Teil von Yvc1-C in SUMOylierter Form vor und die Menge an SUMOyliertem Protein nimmt mit zunehmender Inkubationszeit zu. Die Einzelmutation der Lysinreste K547 bzw. K599 (Yvc1-C K547R, Yvc1-C K599R) führt zu einer Reduktion der SUMOylierungseffizienz, die auch nach einer Inkubationszeit von 30 min nicht auf das Niveau des Wildtyp-Substrates kommt. Die Doppelmutation der beiden Lysinreste (Yvc1-C K547, 599R) zeigt jedoch keinen additiven Effekt. Ab einer Inkubationszeit von 2 min ist eine SUMOylierung zu erkennen, die verglichen mit dem Wildtyp-Fragment jedoch auch nach einer Inkubationszeit von 30 min schwächer ausfällt. Die zusätzliche

Mutation der beiden Lysinreste zwischen K547 und K599 (Yvc1-C 4/18 KR) oder die Mutation der ersten zehn Lysinreste im C-Terminus (Yvc1-C 10/18 KR) hat keine zusätzlichen Auswirkungen auf die SUMOylierungseffizienz. Die Konstrukte verhalten sich in etwa wie die Doppelmutante Yvc1-C K547, 599R. Sind die letzten acht Lysinreste im C-Terminus von Yvc1-C zu Argininresten mutiert (Yvc1-C 8/18 KR), wird das Konstrukt genauso effizient SUMOyliert wie der Wildtyp.

Zum quantitativen Vergleich der SUMOylierung von Yvc1-C und den Yvc1-C KR-Mutanten wurde auch in diesem Fall die Gesamtmenge des eingesetzten Substrates densitometrisch bestimmt und anschließend der prozentuale Anteil an SUMOyliertem Protein zu jedem Zeitpunkt berechnet. Für das Wildtyp-Fragment, die Einzel- sowie die Doppelmutanten wurden die Mittelwerte aus mehreren, voneinander unabhängigen Experimenten gegen die Zeit aufgetragen. Die Standardabweichungen sowie die Anzahl (n) der Experimente sind ebenfalls angegeben. Für die durch Gensynthese entstandenen Fragmente wurde das Experiment jeweils nur einmal durchgeführt (Abbildung 26).

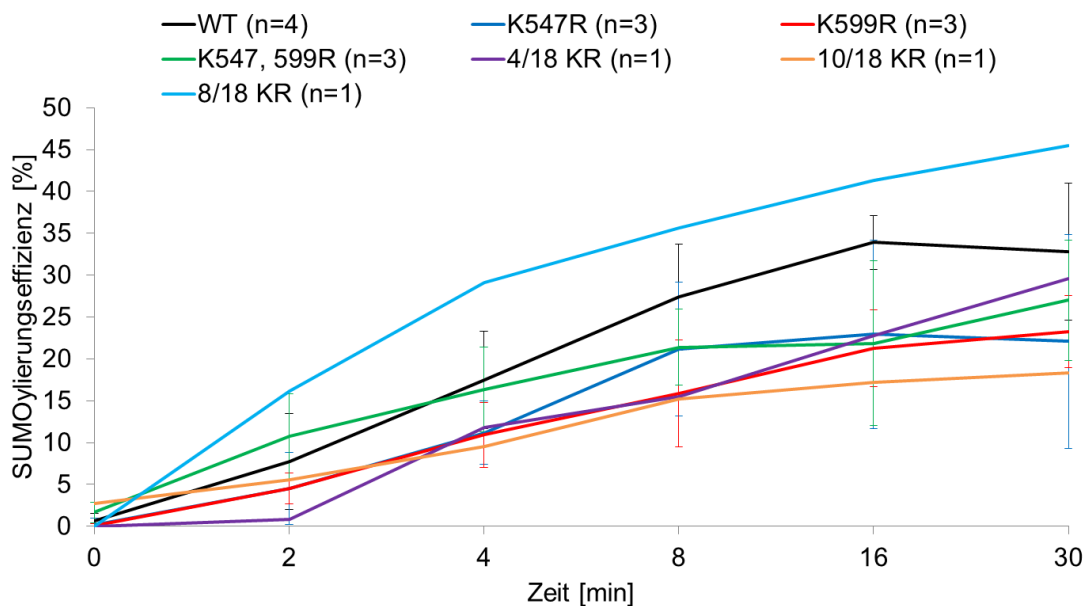


Abbildung 26: Quantitativer Vergleich der *in vitro* SUMOylierungs-Kinetik von GST-Yvc1-C WT und den KR-Mutanten. *In vitro* SUMOylierungs-Kinetiken wurden für die angegebenen GST-Yvc1-C Konstrukte (GST-Yvc1-C WT sowie KR-Mutanten) durchgeführt. Die Gesamtmenge an eingesetztem Substrat wurde densitometrisch bestimmt, daraus der prozentuale Anteil an SUMOyliertem Substrat für jeden Zeitpunkt berechnet und gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die Standardabweichungen und die Anzahl (n) der Experimente sind angegeben.

Abbildung 26 zeigt, dass Yvc1-C nach 2 min zu 7 % in SUMOylierter Form vorliegt, die Menge des SUMOylierten Substrates steigt bis 16 min bis auf 33 % an und stagniert schließlich bis zur Inkubationszeit von 30 min. Alle untersuchten KR-Mutanten außer Yvc1-C 8/18 KR verhalten sich in etwa gleich. Die SUMOylierung dieser Fragmente erfolgt im Vergleich zum Wildtyp langsamer und auch nach einer Inkubationszeit von 30 min wird das SUMOylierungsniveau des Wildtyps nicht erreicht (Yvc1-C K547R: 22%, Yvc1-C K599R: 23 %, Yvc1-C K547, 599R: 26 %, Yvc1-C 4/18 KR: 29 %, Yvc1-C 10/18 KR: 18 %). Das Fragment, in welchem die letzten 8 Lysinreste des C-Terminus mutiert sind, wurde *in vitro* schneller und effizienter SUMOyliert als der Wildtyp, der Anteil an SUMOyliertem Substrat erreichte nach der maximalen Inkubationszeit 45 %.

Die Untersuchung der C-terminalen Domäne von Yvc1 bezüglich der Identifizierung seiner SUMO-Akzeptorlysine ergab keine eindeutigen Ergebnisse. Da die Einzelmutanten der Lysinreste K547 bzw. K599 eine verringerte SUMOylierungseffizienz im Vergleich zum Wildtyp-Fragment aufweisen und das Fragment, in welchem die beiden Lysinreste nicht mutiert sind (Yvc1-C 8/18 KR) keine Minderung der SUMOylierungseffizienz aufweist, kann man davon ausgehen, dass diese als primäre SUMOylierungsstellen fungieren. Das Ausbleiben eines additiven Effekts im Fall der Doppelmutante Yvc1-C K547, 599R sowie die RestSUMOylierung des Fragments, in dem die ersten zehn Lysinreste mutiert sind (Yvc1-C 10/18) lässt vermuten, dass in den durchgeführten *in vitro* SUMOylierungsassays auch weitere Lysinreste als alternative SUMOylierungsstellen dienen können. Des Weiteren lassen sich sterische Effekte durch das Setzen der Mutationen nicht ausschließen.

GST wird unter den verwendeten Bedingungen nicht SUMOyliert

Die Möglichkeit, dass der verwendete GST-tag und nicht das jeweilige Yvc1-Fragment SUMOyliert wird, wurde im Folgenden ausgeschlossen. Aus *E. coli* gereinigtes GST wurde im *in vitro* SUMOylierungsassay als Substrat verwendet, wobei unter denselben Bedingungen wie zuvor eine Kinetik erstellt wurde (Abbildung 27). Bei etwa 40 kDa und 45 kDa wurden jeweils zwei schwache Banden detektiert, die jedoch auch im Ansatz ohne ATP und zum Zeitpunkt von 0 min vorhanden sind und somit unabhängig von einer SUMOylierung von GST erscheinen.

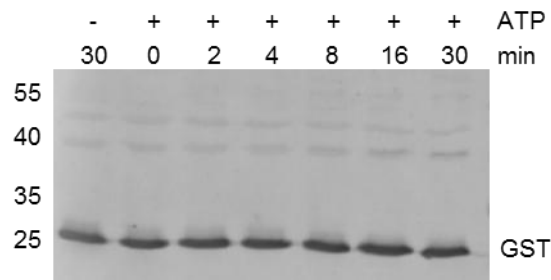


Abbildung 27: GST wird nicht SUMOyliert. 21 µg gereinigtes GST wurden in einem SUMOylierungsansatz (Endvolumen 210 µl) mit 52,5 µg Smt3, 28 µg E1 (Aos1/Uba2), 10,5 µg E2 (Ubc9), 25,9 µg E3 (Nfi1¹⁻⁴²²) und 0,1 mM DTT in Anwesenheit von 5 mM ATP bei 30 °C in TEFP*-Puffer inkubiert. Nach 0, 2, 4, 8, 16 und 30 min wurden jeweils 30 µl entnommen, mit SDS-Probenpuffer und 0,2 M DTT versetzt und für 20 min bei 65°C erhitzt. Eine Negativkontrolle ohne Zugabe von ATP wurde mitgeführt. Nach einer SDS-PAGE und dem anschließenden Transfer auf eine PVDF-Membran erfolgte die Detektion des Substrates unter Verwendung eines GST-spezifischen primären Antikörpers und eines Cy5-gekoppelten sekundären Antikörpers. Die Molekularmassen der Markerproteine sind links in kDa angegeben.

402. SUMOylierung von Yvc1 *in vivo*

Ob die Modifikation von Yvc1 durch SUMO *in vivo* nachweisbar ist, wurde in einem denaturierenden Ni-NTA-Agarose-Bindungsversuch untersucht. Denaturierende Bedingungen dienen dazu, die Abspaltung von Smt3 von allen Substraten durch die SUMO-spezifischen Proteasen (Johnson, 2004) so weit wie möglich zu unterbinden. Da Yvc1 im Wildtyp von *S. cerevisiae* in einer sehr geringen Molekülzahl und nur ein Bruchteil davon in modifizierter Form vorliegt, wurde ein *S. cerevisiae*-Stamm konstruiert, in welchem SUMOyliertes Yvc1 in maximaler Menge vorhanden sein sollte. Ein für *YVC1-HA* kodierendes 2µ-Plasmid wurde in einen *ulp2*-defizienten Stamm transformiert, um zum einen die Substratmenge zu erhöhen und zum anderen der DeSUMOylierung entgegenzuwirken. Die Überexpression von Plasmid-kodiertem *UBC9* sollte zusätzlich die Effizienz der SUMOylierung erhöhen. Um im Bindungsversuch SUMOylierte Proteine aus der Zelle an Ni-NTA-Agarose anreichern zu können, wurde zudem Plasmid-kodiertes *7HIS-SMT3* in den Zellen überexprimiert.

Yvc1 wird in vivo durch Smt3 modifiziert

Die oben genannten Plasmide wurden in verschiedenen Kombinationen in den Wildtyp, einen *ulp2*- und einen *yvc1*-defizienten Stamm transformiert und zur Kontrolle der Proteinsynthese wurden TCA-Proben (T) der einzelnen Stämme hergestellt. Um die

Löslichkeit der Proteine zu überprüfen, wurden nach der denaturierenden Lyse der Zellen und Abtrennen der Zellfragmente Aliquots von Überstand (Ü) und Pellet (P) entnommen. Nach der Inkubation des Überstandes mit der Ni-NTA-Agarose wurde eine weitere Probe des Überstandes (Durchfluss, D) entnommen, um die Immobilisierung von 7His-Smt3 an der Ni-NTA-Agarose zu kontrollieren. Die an der Agarose angereicherten SUMOylierten Proteine, wurden schließlich mittels HU-Puffer eluiert und das SUMOylierte Yvc1 im Eluat nach Auftrennen der Proteine mittels SDS-PAGE und ihrem Transfer auf eine PVDF-Membran immunologisch detektiert (Abbildung 28).

Abbildung 28 A zeigt die Überexpression des Plasmid-kodierten *YVC1-HA* im Vergleich zum endogenen Yvc1, im $\Delta yvc1$ -Stamm ist kein Yvc1 zu detektieren (obere Reihe, (T)). Außerdem ist zu erkennen, dass Yvc1 nach der Zellyse in löslicher Form im Überstand und zu einem geringen Teil im Pellet vorliegt (obere Reihe, (Ü) und (P)). Ob es sich im Pellet um Yvc1-Aggregate oder um Proteine aus nicht aufgeschlossenen Zellen handelt, ist den Daten nicht zu entnehmen. Weiterhin wird die Überexpression von *7HIS-SMT3* in den mit dem entsprechenden Plasmid transformierten Zellen gezeigt (untere Reihe, (T)). Die Detektion des löslichen Smt3 im Überstand, welche im Durchfluss ausbleibt, bestätigt eine erfolgreiche Immobilisierung von Smt3 an der Ni-NTA-Agarose (untere Reihe, (Ü) und (D)).

In Abbildung 28 B ist zu erkennen, dass nach der Inkubation mit der Ni-NTA-Agarose ein Teil des nicht modifizierten Yvc1 im Eluat aggregiert bzw. unspezifisch mit der Agarose interagiert. In den Negativkontrollen, in welchen entweder das 7His-Smt3 oder das Substrat ($\Delta yvc1$) fehlt, ist keine SUMOylierung zu ermitteln. Auch die Synthese von 7His-Smt3 allein oder in Kombination mit Ubc9 reicht im *ulp2*-defizienten Stamm ohne die Überexpression des Substrates für eine effiziente SUMOylierung nicht aus. Ohne die Deletion von *ULP2* (WT) kann trotz Transformation aller drei Plasmide kein SUMOyliertes Yvc1 detektiert werden. Erst die Verbindung der Überexpression von *YVC1-HA*, *7HIS-SMT3* und *UBC9* mit der Deletion von *ULP2* macht es möglich, ein SUMOylierungsprodukt von Yvc1 mit einer Zunahme der Molekularmasse um etwa 40 kDa zu detektieren. Da die Modifikation durch Smt3 typischerweise in einer Zunahme der Molekularmasse von etwa 20 kDa resultiert, deutet die Zunahme um 40 kDa auf eine mögliche zweifache SUMOylierung hin. Ob es sich hierbei um eine DoppelSUMOylierung eines einzelnen Lysinrests oder um eine Einfach-SUMOylierung zweier Lysinreste handelt, lässt sich aus diesen Daten nicht ableiten.

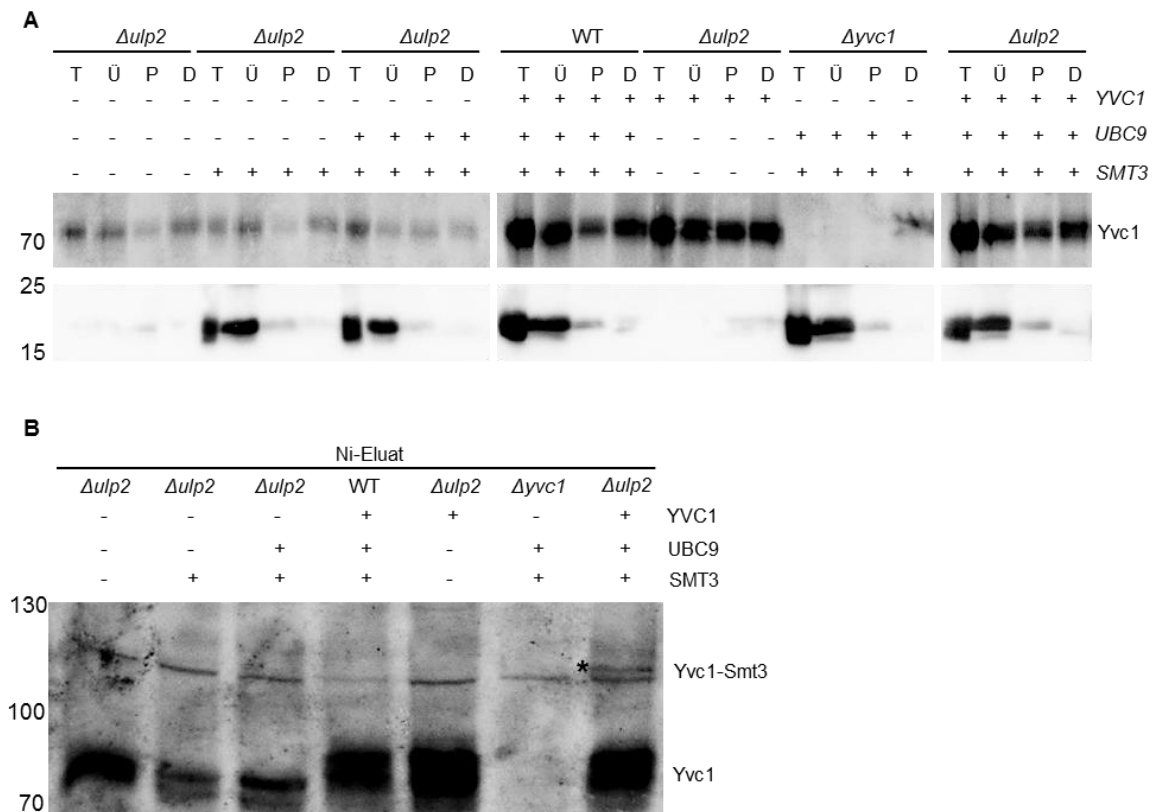


Abbildung 28: *In vivo* SUMOylierung von Yvc1. Nach Transformation von *YVC1-HA*-, *UBC9*- und *7HIS-SMT3*-kodierenden 2μ -Plasmiden (pGS2001, pGS2169, pGS2036) in verschiedene *S. cerevisiae* Stämme (GSY170: WT, GSY1255: $\Delta ulp2$, GSY1180: $\Delta yvc1$) wurden die Zellen in SD-Medium unter Zugabe von $100\ \mu\text{M}$ CuSO_4 bei $30\ ^\circ\text{C}$ bis zum Erreichen einer OD_{600} zwischen 0,8 und 1,0 kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde zur Herstellung von TCA-Proben (T) verwendet. Der Rest wurde unter denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen. Nach Abtrennen der Zellfragmente wurden Aliquots von Pellet (P) und Überstand (Ü) entnommen und der Überstand über Nacht bei $4\ ^\circ\text{C}$ mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Nach Entnahme der Durchflussprobe (D) wurde die Ni-NTA-Agarose gewaschen, in HU-Puffer aufgenommen und für 15 min bei $60\ ^\circ\text{C}$ inkubiert. Die Analyse der Proteine erfolgte nach Auftrennen mittels SDS-PAGE (A: 11 %iges und 15 %iges Gel, B: 8 %iges Gel) und Transfer auf eine PVDF-Membran mit Yvc1- bzw. Smt3-spezifischem, primärem Antikörper und entsprechendem (anti-Ratte bzw. anti-Kaninchen) POD-gekoppeltem, sekundärem Antikörper. Die Molekularmassen der Markerproteine sind links in kDa angegeben. **A:** Synthese und Löslichkeit von Yvc1 (obere Reihe), Synthese und Immobilisierung von 7His-Smt3 (untere Reihe) **B:** SUMOyliertes Yvc1 im Eluat (*).

Die SUMOylierung von Yvc1 lässt sich in vivo nach der Mutation von mindestens drei SUMO-Akzeptorlysinen nicht mehr detektieren

Die zuvor *in vitro* identifizierten SUMOylierungsstellen von Yvc1 sollten im Folgenden auch *in vivo* bestätigt werden. Im *ulp2*-defizienten Stamm wurden das Plasmid-kodierte 7HIS-SMT3 sowie UBC9 überexprimiert. Einerseits wurde außerdem das für YVC1-HA kodierende 2 μ -Plasmid, andererseits für die entsprechenden KR-Mutanten (YVC1-HA K212R, YVC1-HA K212, 231R, YVC1-HA K212, 547, 599R, YVC1-HA K212, 231, 547, 599R) kodierende 2 μ -Plasmide transformiert.

Die Synthese der verschiedenen Yvc1-Proteine sowie von 7His-Smt3 in den verwendeten Stämmen wurde erfolgreich nachgewiesen (Abbildung 29, A (T)). Nach der denaturierenden Lyse der Zellen liegen sowohl Yvc1 als auch 7His-Smt3 zum größten Teil löslich im Überstand vor, nur ein geringer Teil der Proteine befindet sich im Pellet (Abbildung 17, A, (Ü) und (P)). Die effiziente Immobilisierung von 7His-Smt3 an der Ni-NTA-Agarose zeigt sich im Vergleich von Überstand und Durchfluss (Abbildung 17, A, untere Reihe (Ü) und (D)). Ein Teil der Yvc1-Proteine hatte unspezifisch an Ni-NTA-Agarose gebunden (Abbildung 29, B).

Abbildung 17 B zeigt das SUMOylierungsprodukt des WT-Yvc1 mit einer um etwa 40 kDa erhöhten Molekularmasse. Die SUMOylierung ist auch im Eluat der Einzelmutante Yvc1 K212R sowie der Doppelmutante Yvc1 K212, 231R vorhanden. Sind die Lysinreste K547 und K599 im C-Terminus von Yvc1 zusätzlich zur K212R-Mutation zu Argininresten verändert, kann das SUMOylierungsprodukt nicht mehr detektiert werden. Dieser Effekt zeigt sich auch in der Vierfachmutante Yvc1 K212, 231, 547, 599R. Für die Detektion der SUMOylierung von Yvc1 *in vivo* müssen somit mindestens zwei der vier identifizierten SUMO-Akzeptorlysine vorhanden sein.

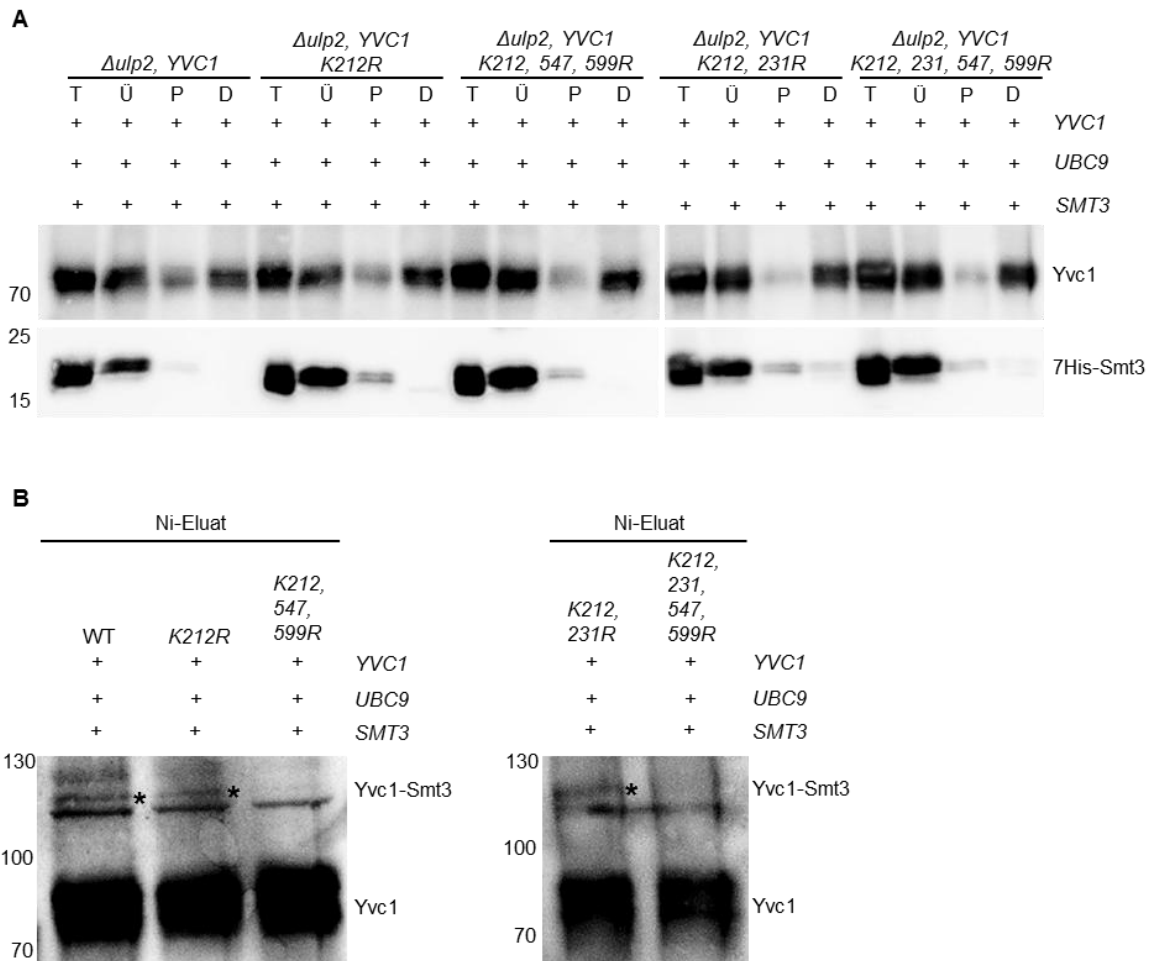


Abbildung 29: *In vivo* SUMOylierung von Yvc1 WT im Vergleich mit Yvc1 KR-Mutanten. Nach Transformation der für das jeweilige Substrat kodierenden 2 μ -Plasmide (pGS2001: pRS426-YVC1-HA, pGS2398: pRS426-YVC1-HA *K212R*, pGS2414: pRS426-YVC1-HA *K212, 231R*, pGS2399: pRS426-YVC1-HA *K212, 547, 599R*, pGS2415: pRS426-YVC1-HA *K212, 231, 547, 599R*) und der für *UBC9* sowie *7HIS-SMT3* kodierenden 2 μ -Plasmide (pGS2169, pGS2036) in den *S. cerevisiae* Stamm $\Deltaulp2$ (GSY1255) wurden die Zellen in SD-Medium unter Zugabe von 100 μ M CuSO₄ bei 30 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ zwischen 0,8 und 1,0 kultiviert. Ein Teil der Zellen wurde zur Herstellung von TCA-Proben (T) verwendet. Der Rest wurde unter denaturierenden Bedingungen aufgeschlossen. Nach Abtrennen der Zellfragmente wurden Aliquots von Pellet (P) und Überstand (Ü) entnommen und der Überstand über Nacht bei 4 °C mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Nach Entnahme der Durchflussprobe (D) wurde die Ni-NTA-Agarose gewaschen, in HU-Puffer aufgenommen und für 15 min bei 60 °C inkubiert. Die Analyse der Proteine erfolgte nach Auftrennen mittels einer SDS-PAGE (A: 11 %iges und 15 %iges Gel, B: 8 %iges Gel) und Transfer auf eine PVDF-Membran mit Yvc1- bzw. Smt3-spezifischem, primärem Antikörper und entsprechendem (anti-Ratte bzw. anti-Kaninchen) POD-gekoppeltem, sekundärem Antikörper. Die Molekularmassen der Markerproteine sind links in kDa angegeben. **A:** Synthese und Löslichkeit von Yvc1 (obere Reihe), Synthese und Immobilisierung von 7His-Smt3 (untere Reihe) **B:** SUMOyliertes Yvc1 im Eluat (*).

403. Phänotypische Effekte im Zusammenhang mit der SUMOylierung von Yvc1

Da die SUMOylierung von Proteinen deren Lokalisation, Stabilität, Aktivität oder Funktion beeinflussen kann (Muller *et al.*, 2001; Ulrich, 2005; Anckar und Sistonen, 2007; Geiss-Friedlander und Melchior, 2007; Henley *et al.*, 2014), wurde im Folgenden untersucht, ob sich die Mutation der für die SUMOylierung von Yvc1 verantwortlichen Lysinreste (K212, K231, K547, K599) zu Argininresten phänotypisch auswirkt.

Die Lokalisation von Yvc1 wird durch die Mutation der Lysinreste K212, K231, K547 und K599 nicht beeinflusst

Für Yvc1 wurde eine subzelluläre Lokalisation in der Vakuolenmembran von *S. cerevisiae* beschrieben (Palmer *et al.*, 2001; Denis und Cyert, 2002). Ob sich der Verlust der SUMOylierbarkeit an den Lysinresten K212, K231, K547 und K599 auf die Lokalisation von Yvc1 auswirkt, wurde im Folgenden mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Plasmid-kodierte GFP-Fusionsproteine wurden im $\Delta yvc1$ -Stamm überexprimiert und synthetisiert, wobei der Wildtyp von YVC1, Einzelmutanten (K212R, K231R, K547R, K599R) sowie eine Vierfachmutante der entsprechenden Lysinreste analysiert wurden. Die korrekte Sequenz der jeweiligen Plasmide wurde mittels Sequenzierung überprüft. Zur Kontrolle der Proteinsynthese wurden TCA-Proben der Stämme hergestellt und mittels SDS-PAGE, Westernblot und anschließender immunologischer Detektion mit dem endogen synthetisierten Yvc1 im Wildtyp von *S. cerevisiae* verglichen (Abbildung 30, B). Die stärkere Synthese aufgrund der Überexpression ist im Vergleich zum endogenen Yvc1 im Wildtyp deutlich zu erkennen, wobei die Syntheserate der Fusionsproteine untereinander vergleichbar ist. Die erfolgreiche Fusion der Proteine mit GFP wurde durch die erhöhte Molekularmasse bestätigt. Die GFP-vermittelte Fluoreszenz wurde sowohl in intakten Zellen als auch in Sphäroplasten ermittelt (Abbildung 30, A). Bei Sphäroplasten handelt es sich um Zellen, in welchen die Zellwand enzymatisch verdaut wurde. Ohne die strukturegebende Zellwand zeichnen sie sich durch eine runde Form aus und bieten den Vorteil, dass die Vakuole auf ein Maximum vergrößert und die Lokalisation der Proteine in der Vakuolenmembran deutlicher zu erkennen ist. In allen untersuchten Stämmen ist eindeutig zu sehen, dass sich die physiologische Lokalisation von Yvc1 trotz KR-Mutationen nicht verändert. Im Vergleich der GFP-Fluoreszenz mit den Zellen bzw. den Sphäroplasten unter Differentialinterferenzkontrast ist die Vakuole als leuchtende Ringstruktur zu erkennen.

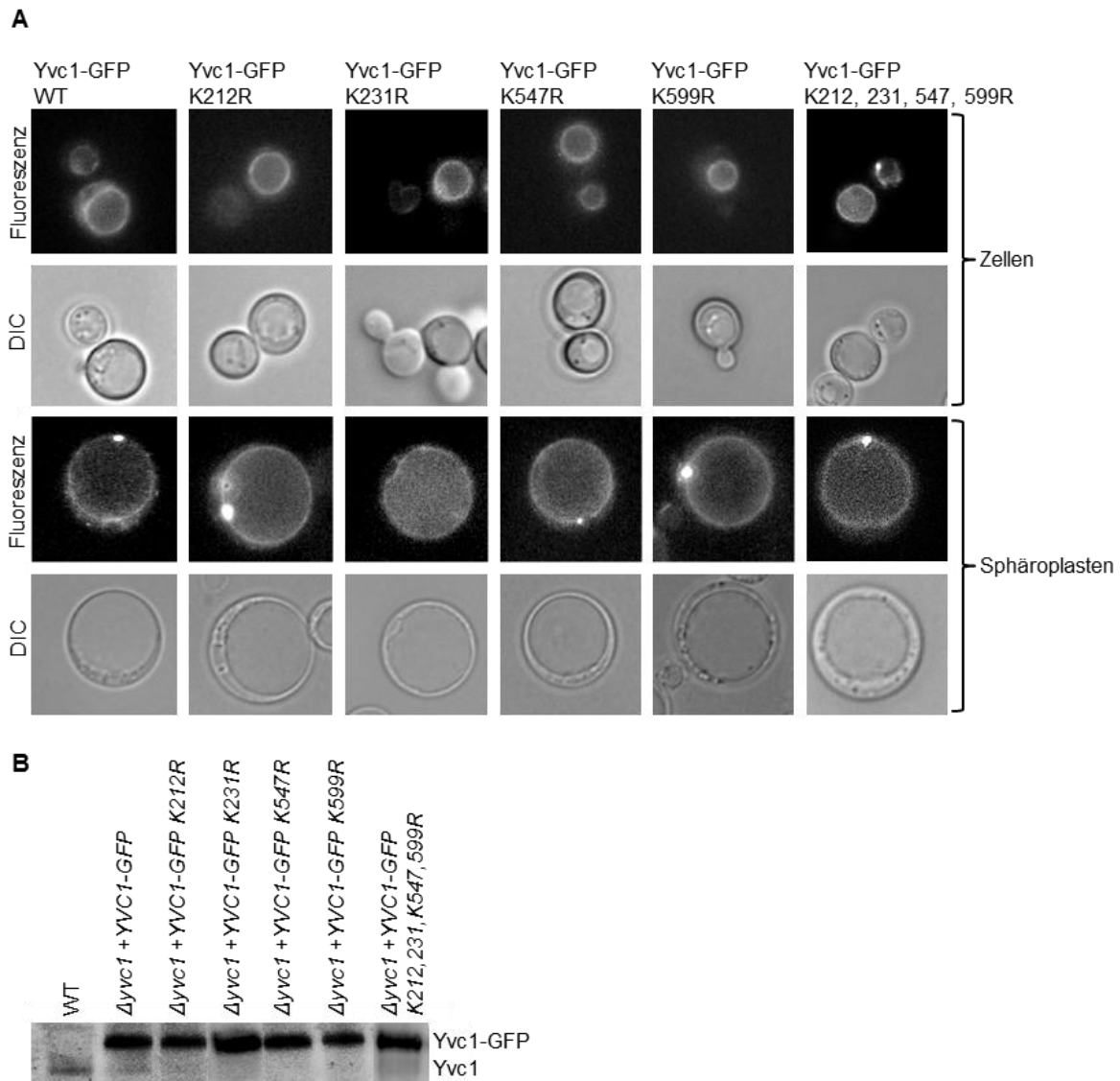


Abbildung 30: Die Lokalisation von GFP-Yvc1 WT im Vergleich mit den KR-Mutanten. Ein $\Delta yvc1$ -Stamm (GSY1180) wurde mit den (*high copy*) 2μ -Plasmiden pRS426-YVC1-GFP (pGS2000), pRS426-YVC1-GFP K212R (pGS2184), pRS426-YVC1-GFP K547R (pGS2372), pRS426-YVC1-GFP K599R (pGS2373) und pRS426-YVC1-GFP K212, 231, 547, 599R (pGS2411) transformiert. **A:** Die Lokalisation von Yvc1-GFP wurde in intakten Zellen sowie in Sphäroplasten mittels direkter Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. Zum Vergleich der Zellstrukturen mit der Fluoreszenz wurden die entsprechenden Zellen sowie Sphäroplasten auch im Differentialinterferenzkontrast (DIC) fotografiert. **B:** TCA-Proben der verwendeten Stämme und des Wildtyps mit endogenem Yvc1 (GSY170) wurden hergestellt. Nach Auftrennen der Proteine mittels SDS-PAGE und dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde die Proteinsynthese mit Yvc1-spezifischem, primärem Antikörper und POD-gekoppeltem, sekundärem Antikörper analysiert.

Mutationen der Lysinreste K212, K547 und K599 und die Mutation des Lysinrests K231 haben gegensätzliche Effekte auf die Yvc1-vermittelte Calcium-Freisetzung nach einem hyperosmotischen Schock

In luminometrischen Assays lassen sich cytosolische Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentration in *S. cerevisiae* detektieren. Dabei wird in Hefezellen Plasmid-kodiertes Apoaequorin exprimiert und synthetisiert, welches sich bei Zugabe von Coelenterazin mit diesem zu einem Holoenzym verbindet und dadurch in der Lage ist Ca^{2+} zu binden. Während des Anstiegs von cytosolischem Ca^{2+} wird es gebunden und Coelenterazin zum aktiven Coelenteramid umgewandelt. Beim Übergang des Coelenteramids in seinen Grundzustand wird Licht mit einer Wellenlänge von 495 nm emittiert, welches mit Hilfe eines Luminometers detektiert werden kann. Die Menge des emittierten Lichts entspricht dabei proportional der Menge an cytosolischem Ca^{2+} . Ein $\Delta yvc1$ -Stamm wurde mit CEN-Plasmiden, die für das Wildtyp-YVC1 sowie für KR-Mutanten von YVC1 kodieren, mit dem entsprechenden Leervektor und einem Plasmid, das für Apoaequorin kodiert, transformiert. Während der Durchführung der luminometrischen Assays wurde jeder Stamm drei Mal gemessen. Dabei wurde die Grundlumineszenz für 30 sek ermittelt, woraufhin ein hyperosmotischer Schock auf die Zellen appliziert und die daraus resultierende, durch Änderung des Ca^{2+} -Gehaltes im Cytosol verursachte Leuchtintensität für weitere 3 min aufgezeichnet wurde. Die Mittelwerte der drei Messungen und ihre Standardabweichungen wurden anschließend in relativen Lumineszenzeinheiten (RLU) gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 31, A). Einzelmutationen der Lysinreste K212 (rot), K547 (blau) und K599 (grün) führen zu einem schnelleren und höheren Ca^{2+} -Ausstrom aus der Vakuole im Vergleich zum Wildtyp (schwarz), die gleichzeitige Mutation aller drei angegebenen Lysinreste verstärkt diesen Effekt zusätzlich (orange). Die Einzelmutation des Lysinrests K231 (türkis) dagegen führt verglichen mit dem Wildtyp sowie den anderen KR-Mutanten zu einer langsameren und niedrigeren Ca^{2+} -Freisetzung. Die KR-Mutante, in der alle vier Lysinreste durch Argininreste ersetzt wurden, verhält sich in luminometrischen Assays wie der Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Der Stamm, der kein Yvc1 synthetisiert, zeigt keine Antwort auf einen hyperosmotischen Schock (lila), somit ist die Ca^{2+} -Erhöhung im Cytosol ausschließlich von Yvc1 vermittelt.

Die Kontrolle der Proteinsynthese von Yvc1 und Aequorin erfolgte durch Westernblot-Analyse und anschließende immunologische Detektion (Abbildung 31, B). Aequorin wird in allen Stämmen in vergleichbarer Menge synthetisiert und Yvc1 kann ebenfalls in den entsprechenden Stämmen detektiert werden.

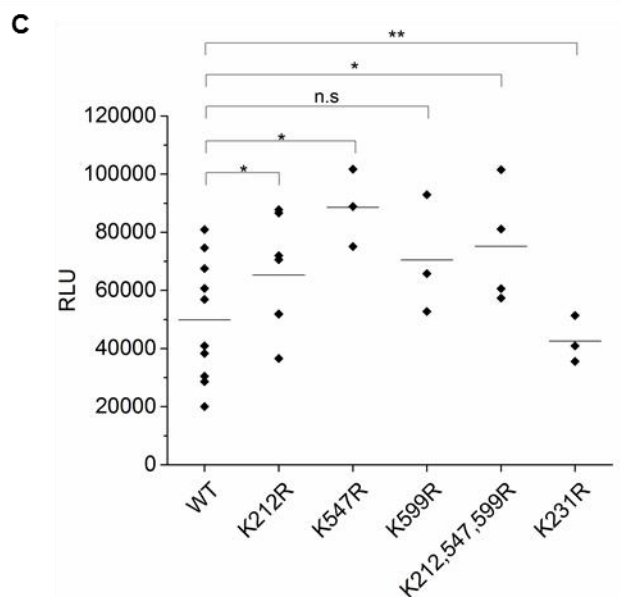
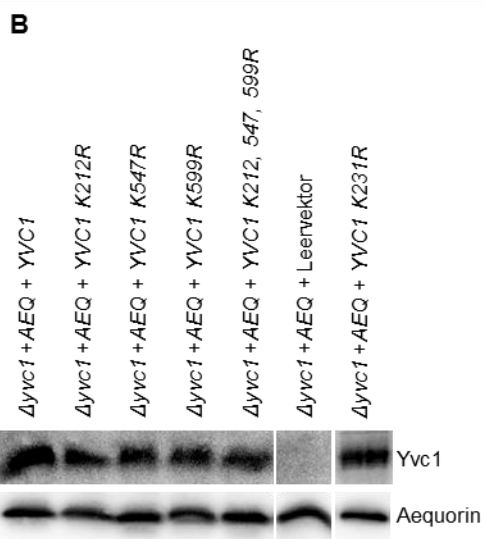
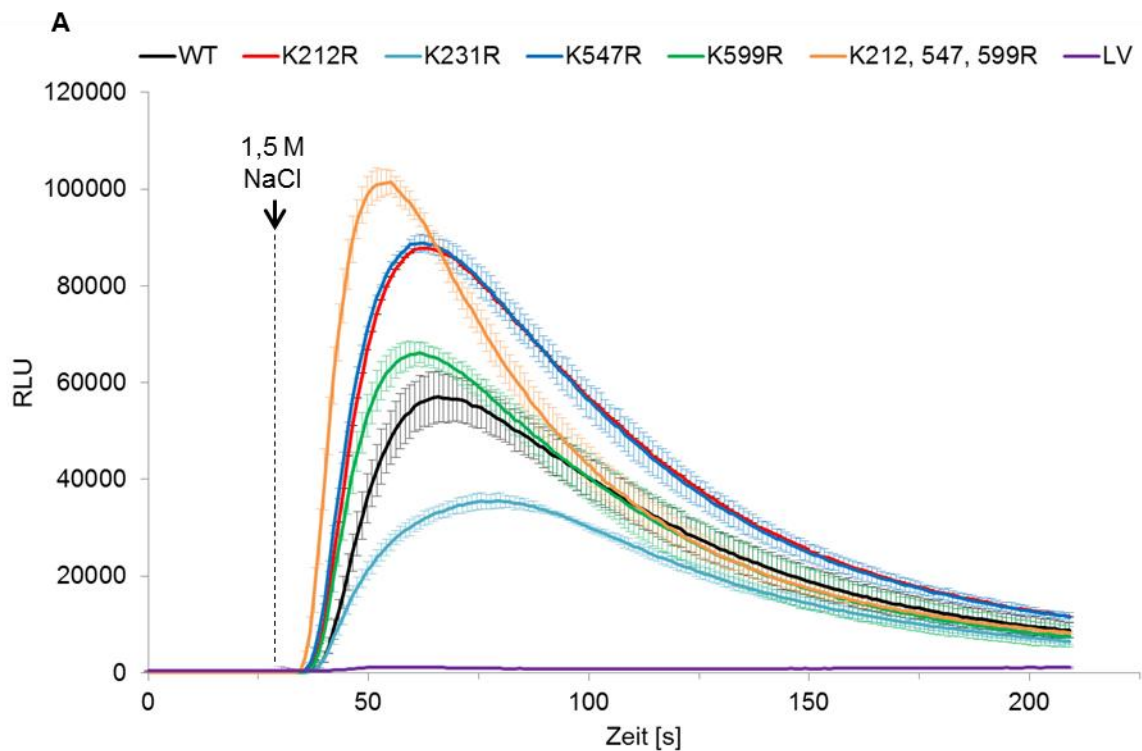


Abbildung 31: Effekte der KR-Mutationen auf die Yvc1-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung nach hyperosmotischem Schock. Ein $\Delta yvc1$ -Stamm wurde mit einem für Aequorin (AEQ)-kodierenden Plasmid (pGS2149) sowie mit jeweils einem der für YVC1 kodierenden CEN-Plasmide oder dem entsprechenden Leervektor (LV) transformiert (pGS2359: pRS316-YVC1, pGS2360: pRS316-YVC1 K212R, pGS2412: pRS316-YVC1 K231R, pGS2361: pRS316-YVC1 K547R, pGS2362: pRS316-YVC1 K599R, pGS2364: pRS316-YVC1 K212, 547, 599R, pGS43: pRS316).

A: Übernacht-Kulturen wurden in frischem Medium verdünnt und bis zum Erreichen einer OD_{600} zwischen 1,5 und 2,0 bei 30 °C inkubiert. Eine OD_{600} von 10 wurde eingestellt und nach Zugabe von Coelenterazin (Endkonzentration: 60 μM) wurden die Zellen für 20 min bei 30 °C inkubiert, mit frischem Medium

gewaschen und für luminometrische Assays verwendet. Die Grundlumineszenz (angegeben in relativen Lumineszenzeinheiten, RLU) wurde für 30 sek ermittelt, woraufhin ein hyperosmotischer Schock durch NaCl (Endkonzentration: 1,5 M) appliziert wurde. Die Lumineszenz wurde für weitere 3 min aufgezeichnet und die Mittelwerte aus drei Messungen gegen die Zeit aufgetragen. Die Standardabweichungen der drei Messungen sind angegeben. **B:** TCA-Proben der verwendeten Stämme wurden hergestellt und die Synthese von Yvc1 und Aequorin mittels SDS-PAGE und Westernblot mit anschließender immunologischer Detektion kontrolliert. Die Detektion erfolgte mit einem Yvc1-spezifischen primären Antikörper (Ratte), einem Aequorin-spezifischen primären Antikörper (Kaninchen) und den entsprechenden sekundären Antikörpern. **C:** Die maximalen Lumineszenzwerte aus mehreren, voneinander unabhängigen Experimenten (n=3-5) sowie ihre Mittelwerte sind für den Yvc1 Wildtyp und die KR-Mutanten angegeben. Die Signifikanz wurde anhand des t-Tests ermittelt und das Signifikanzniveau auf 5 % ($p=0,05$) festgelegt.

Abbildung 31 C zeigt die Zusammenfassung aus mehreren Experimenten. Die Maximalwerte der Lumineszenz aus 3 bis 5 Experimenten wurden für jeden Stamm aufgetragen und die Mittelwerte ermittelt. Die Signifikanz der erhöhten Antwort der KR-Mutanten gegenüber dem Wildtyp wurde mittels t-Test ermittelt, wobei das Signifikanzniveau auf 5 % ($p=0,05$) festgelegt wurde. Die Einzelmutationen der Lysinreste K212 ($p=0,02$) und K547 ($p=0,02$) sowie die Dreifachmutation der Lysinreste K212, K547 und K599 ($p=0,03$) führen zu einer signifikanten Erhöhung der Ca^{2+} -Antwort auf einen hyperosmotischen Schock. Die K599R Mutation resultiert ebenfalls in einer erhöhten Yvc1-Aktivität, der Effekt ist mit einem p-Wert von 0,28 jedoch nicht signifikant. Die Mutation des Lysinrests K231 zeigt einen gegenteiligen Effekt, die Ca^{2+} -Freisetzung ist im Vergleich zum Wildtyp signifikant reduziert ($p=0,007$).

Die Überexpression von SMT3 führt zur Erniedrigung der Calcium-Freisetzung nach einem hyperosmotischen Schock

In den folgenden luminometrischen Assays wurde untersucht, ob die Überexpression von SMT3 einen Einfluss auf die Ca^{2+} -Antwort auf einen hyperosmotischen Schock in Wildtypzellen von *S. cerevisiae* hat. Ein für SMT3 kodierendes 2 μ -Plasmid sowie der entsprechende Leervektor wurden in Wildtyp-Zellen transformiert und die Stämme anschließend in luminometrischen Assays verwendet. Die Grundlumineszenz wurde für 30 sek gemessen, ein hyperosmotischer Schock wurde durch Zugabe von NaCl (Endkonzentration 1,5 M) appliziert und die Lumineszenz für weitere 3 min aufgezeichnet.

Pro Stamm wurden drei Messungen durchgeführt, deren Mittelwerte mit Standardabweichungen gegen die Zeit aufgetragen wurden (Abbildung 32, A).

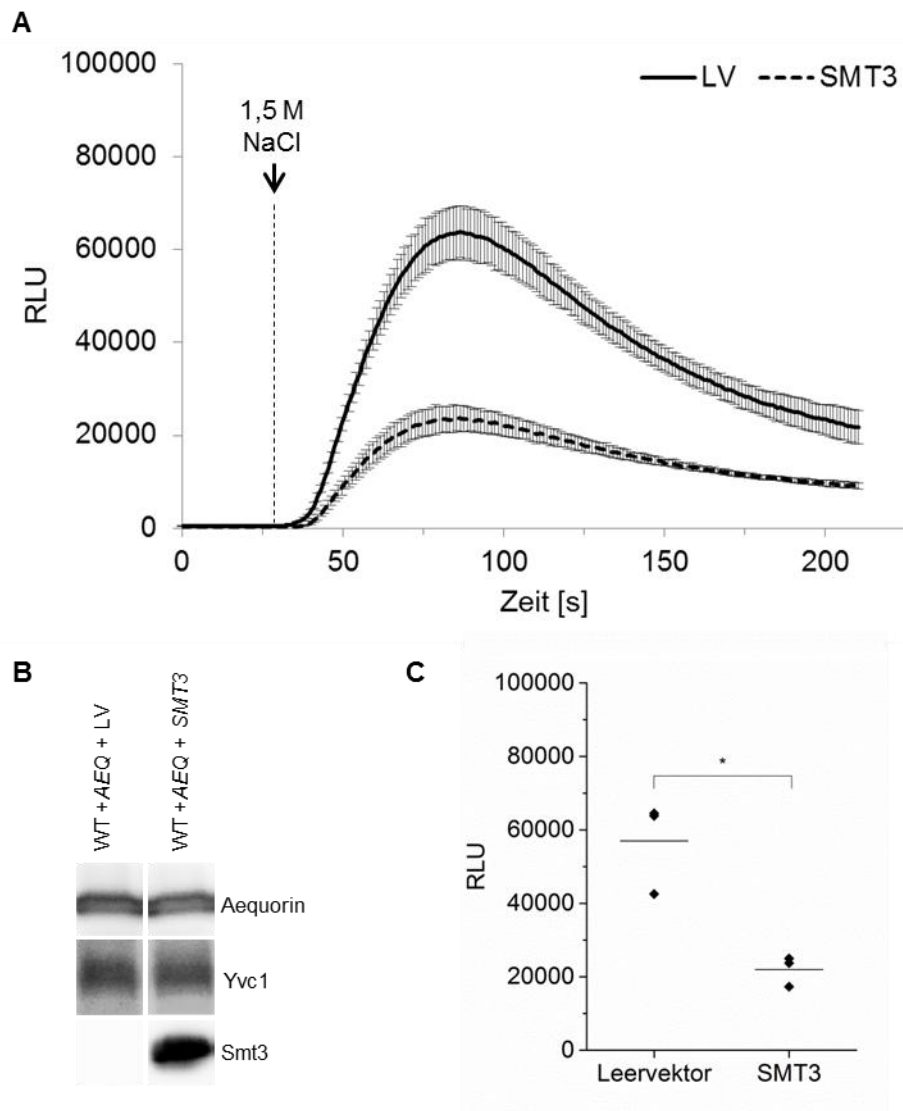


Abbildung 32: Effekt der *SMT3*-Überexpression auf die *Yvc1*-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung nach hyperosmotischem Schock. *S. cerevisiae*-Zellen (WT, GSY170) wurden mit einem für Aequorin (AEQ)-kodierenden (pGS2150) sowie mit einem für *7HIS-SMT3* kodierenden (pGS2036) 2 μ -Plasmid oder dem entsprechenden Leervektor (LV, pGS805) transformiert. **A:** Übernacht-Kulturen wurden in frischem Medium verdünnt und bis zum Erreichen einer OD_{600} zwischen 1,5 und 2,0 bei 30 °C inkubiert. Eine OD_{600} von 10 wurde eingestellt und nach Zugabe von Coelenterazin (Endkonzentration: 60 μM) wurden die Zellen für 20 min bei 30 °C inkubiert, mit frischem Medium gewaschen und für luminometrische Assays verwendet. Die Grundlumineszenz (angegeben in relativen Lumineszenzeinheiten, RLU) wurde für 30 sek ermittelt, woraufhin ein hyperosmotischer Schock durch NaCl (Endkonzentration: 1,5 M) appliziert wurde. Die Lumineszenz wurde für weitere 3 min aufgezeichnet und die Mittelwerte aus drei Messungen gegen die Zeit aufgetragen. Die Standardabweichungen der drei Messungen sind angegeben. **B:** TCA-Proben der verwendeten Stämme wurden hergestellt und die Synthese von Smt3, Yvc1 und Aequorin mittels SDS-PAGE und Westernblot mit anschließender immunologischer Detektion kontrolliert. Die Detektion erfolgte mit

einem Yvc1-spezifischen primären Antikörper (Ratte), einem Aequorin-spezifischen primären Antikörper (Kaninchen), einem Smt3-spezifischen primären Antikörper (Kaninchen) und den entsprechenden sekundären Antikörpern. **C:** Die maximalen Lumineszenzwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten sowie ihre Mittelwerte sind für den Wildtyp und die *SMT3*-Überexpression angegeben. Die Signifikanz wurde anhand des t-Tests ermittelt und das Signifikanzniveau auf 5 % ($p=0,05$) festgelegt.

Die Proteinsynthese von Yvc1, Aequorin und Smt3 wurde durch Herstellung von TCA-Proben mittels Westernblot-Analyse und immunologischer Detektion kontrolliert (Abbildung 32, B). Sowohl Yvc1 als auch Aequorin werden in beiden Stämmen in vergleichbaren Mengen synthetisiert, die starke Synthese von Smt3 aufgrund der Überexpression ist ebenfalls zu erkennen.

Die Ergebnisse aus drei voneinander unabhängigen Experimenten sind in Abbildung 32 C zusammengefasst. Die maximalen Lumineszenzwerte und ihre Mittelwerte sind für die beiden Stämme aufgetragen. Die Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt und das Signifikanzniveau auf 5 % ($p=0,05$) festgelegt. Der Vergleich der zwei Stämme ergab, dass die Calcium-Freisetzung in Zellen, welche *SMT3* überexprimieren, langsamer erfolgt und außerdem signifikant reduziert ist.

Weder die Proteinmenge von Yvc1 noch KR-Mutationen haben einen Einfluss auf das Wachstum von S. cerevisiae unter verschiedenen Stressbedingungen

Hefezellen können in der Natur unterschiedlichen Stressfaktoren ausgesetzt sein, auf welche sie reagieren müssen. Da Yvc1 grundlegend an der Calcium-Homöostase von *S. cerevisiae* beteiligt ist und Calcium-Signale eine entscheidende Rolle bei der Anpassung der Zellen an diese verschiedenen Stressbedingungen spielen (Miseta *et al.*, 1999; Peiter *et al.*, 2005; Popa *et al.*, 2010; Courchesne *et al.*, 2011; Rigamonti *et al.*, 2015; Ruta *et al.*, 2016), wurde als nächstes untersucht, ob sich eine Deletion oder Überexpression von *YVC1* auf das Wachstum von *S. cerevisiae* unter diversen Stressbedingungen auswirkt. Außerdem wurde überprüft, ob KR-Mutationen der Lysinreste K212, K231, K547 und K599 bzw. der Verlust der SUMOylierbarkeit an diesen Stellen Auswirkungen auf die Stressresistenz der *S. cerevisiae*-Zellen haben.

Osmotischer Stress, Temperatur-Stress, Ethanol-Stress, oxidativer Stress

Die Folgen einer Deletion von *YVC1* sowie der Mutation der Lysinreste K212, K547 und K599 in verschiedenen Kombinationen wurden für das Wachstum unter osmotischem Stress, ausgelöst durch NaCl oder Sorbitol, unter Ethanol-Stress sowie bei Kälte- oder Hitze-Stress untersucht (Abbildung 33).

Ein $\Delta yvc1$ -Stamm (Stammhintergrund: W303) wurde mit *YVC1*-kodierenden CEN-Plasmiden oder dem entsprechenden Leervektor transformiert. Der Wildtyp, Einzelmutationen der Lysinreste K212, K547 und K599, die Doppelmutante *YVC1 K547, 599R* sowie die Dreifachmutante *YVC1 K212, 547, 599R* wurden in diesem Fall verwendet. Übernacht-Kulturen der Stämme wurden in frisches Medium überführt und bis zur exponentiellen Wachstumsphase bei 30 °C inkubiert. Die OD₆₀₀ der Kulturen wurde zwischen 0,8 und 0,9 eingestellt und die Zellen schließlich in einer seriellen Verdünnung (1:10) durch Stempeln auf Agarplatten mit und ohne Zusätze überführt. Jede Stressbedingung wurde dabei in dreifacher Ausführung getestet, um die durch das Stempeln entstandenen Schwankungen einschätzen zu können. Nach einer Inkubation der Agarplatten bei 30 °C bzw. bei 15 °C (Kälte-Stress) oder 37 °C (Hitze-Stress) für zwei (Kontrolle, Sorbitol, Ethanol) oder drei (NaCl, 15 °C, 37 °C) Tage wurde das Wachstum der Zellen durch Scannen dokumentiert.

Alle getesteten Stressfaktoren führten zu einem langsameren Wachstum der Zellen im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusätze. Die Stämme untereinander wiesen hingegen keine Unterschiede bezüglich ihrer Stresstoleranz auf (Abbildung 33, A).

Zur Kontrolle der Proteinsynthese in den verwendeten Stämmen wurde eine Westernblot-Analyse mit *Yvc1*-spezifischen Antikörpern durchgeführt (Abbildung 33, B). Außer im Stamm, der mit dem Leervektor transformiert wurde, ist *Yvc1* in allen verwendeten Stämmen in vergleichbarer Menge vorhanden.

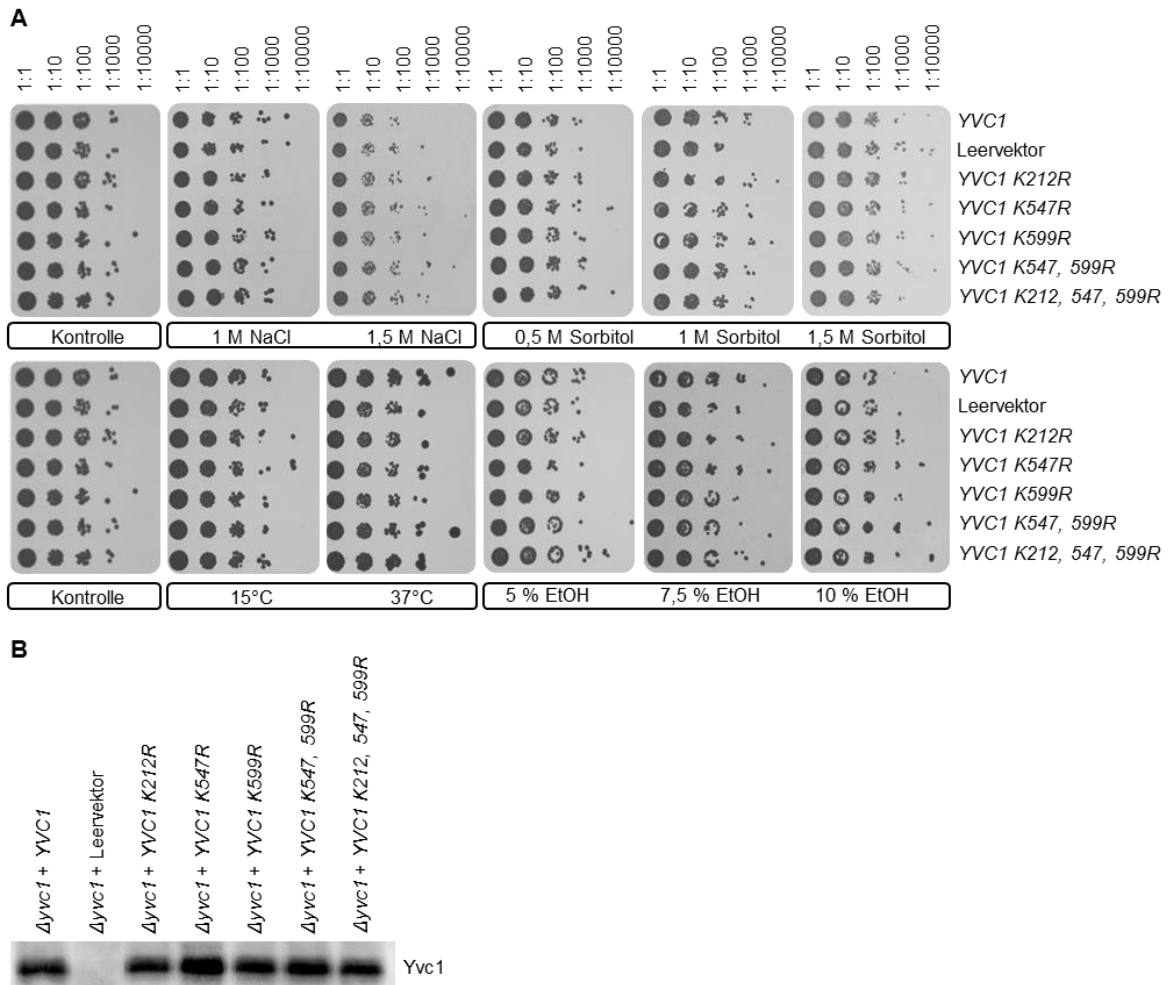


Abbildung 33: Einfluss der YVC1-Deletion sowie der Mutation der Lysinreste K212, K547 und K599 auf das Wachstum von *S. cerevisiae* unter osmotischem Stress (NaCl, Sorbitol), Temperatur-Stress (15 °C, 37 °C) und Ethanol-Stress. YVC1-kodierende CEN-Plasmide sowie der entsprechende Leervektor (pGS2359: pRS316-YVC1, pGS2360: pRS316-YVC1 K212R, pGS2361: pRS316-YVC1 K547R, pGS2362: pRS316-YVC1 K599R, pGS2364: pRS316-YVC1 K212, 547, 599R, pGS43: pRS316) wurden in $\Delta yvc1$ -Zellen (GSY1180) transformiert. Übernacht-Kulturen der Stämme wurden in frisches Medium überführt, wobei eine OD_{600} von etwa 0,4 eingestellt wurde. Nach einer Inkubation bei 30 °C für 3-4 h wurden die Zellen auf eine OD_{600} zwischen 0,8 und 0,9 angeglichen. **A:** Die Zellen wurden in einer seriellen Verdünnung (1:10 - 1:10000) durch Stempeln auf Uracil-defiziente Agarplatten mit den angegebenen Zusätzen (NaCl, Sorbitol, EtOH) überführt. Das Wachstum bei 15 °C und 37 °C wurde untersucht und eine Kontrollplatte ohne Zusätze bei 30 °C wurde mitgeführt. Die Dokumentation des Wachstums erfolgte durch Scannen der Agarplatten nach zwei (Kontrolle, Sorbitol, EtOH) oder drei (NaCl, 15 °C, 37 °C) Tagen. **B:** TCA-Proben der untersuchten Stämme wurden hergestellt. Nach Auftrennen der Proteine und ihrem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde die Proteinsynthese mit Yvc1-spezifischem, primärem Antikörper und POD-gekoppeltem, sekundärem Antikörper analysiert.

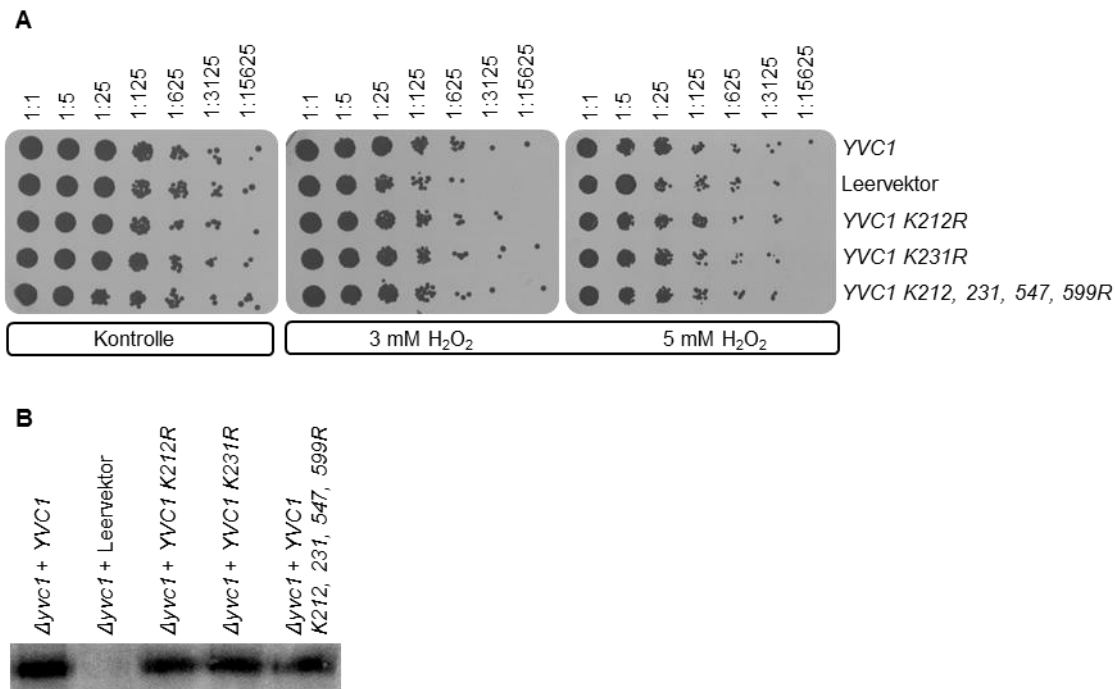


Abbildung 34: Einfluss der YVC1-Deletion sowie der Mutation der Lysinreste K212, K231, K547 und K599 auf das Wachstum von *S. cerevisiae* unter oxidativem Stress. YVC1-kodierende CEN-Plasmide sowie der entsprechende Leervektor (pGS2359: pRS316-YVC1, pGS2360: pRS316-YVC1 K212R, pGS2412: pRS316-YVC1 K231R, pGS2413: pRS316-YVC1 K212, 231, 547, 599R, pGS43: pRS316) wurden in $\Delta yvc1$ -Zellen (GSY1180) transformiert. Übernacht-Kulturen der Stämme wurden in frisches Medium überführt, wobei die OD₆₀₀ auf 0,4 angeglichen wurde. Nach einer Inkubation bei 30 °C für 3-4 h wurde die gleiche Zellzahl geerntet und die OD₆₀₀ von 1,0 eingestellt. Es folgte die Zugabe von 3 mM bzw. 5 mM H₂O₂ und eine weitere Inkubation für 1 h bei 30 °C. Eine Kontrolle ohne die Zugabe von H₂O₂ wurde mitgeführt. **A:** Die Zellen wurden mit frischem Medium gewaschen und in einer seriellen Verdünnung (1:5 - 1:15625) durch Stempeln auf Uracil-defiziente Agarplatten überführt. Die Dokumentation des Wachstums erfolgte durch Scannen der Agarplatten nach zwei Tagen. **B:** TCA-Proben der untersuchten Stämme wurden hergestellt. Nach Auftrennen der Proteine und ihrem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde die Proteinsynthese mit Yvc1-spezifischem, primärem Antikörper und POD-gekoppeltem, sekundärem Antikörper analysiert.

Die Bedeutung der Yvc1-vermittelten Calcium-Freisetzung bei oxidativem Stress wurde durch eine Behandlung der Zellen mit H₂O₂ untersucht. Ein $\Delta yvc1$ -Stamm (Stammhintergrund: W303) wurde mit YVC1-kodierenden CEN-Plasmiden oder dem entsprechenden Leervektor transformiert. In diesem Experiment wurde der Wildtyp von YVC1, Einzelmutanten der Lysinreste K212 und K231 sowie die Vierfachmutante YVC1 K212, 231, 547, 599R verwendet.

Übernacht-Kulturen wurden in frisches Medium überführt und bis zur exponentiellen Wachstumsphase bei 30 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 3 mM bzw. 5 mM H₂O₂ wurden die Kulturen für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Schließlich wurden die Zellen mit frischem Medium gewaschen und in einer seriellen Verdünnung (1:5) durch Stempeln auf Agarplatten überführt. Um während der Durchführung verursachte Schwankungen auszuschließen, wurden die Kontrolle und beide H₂O₂-Konzentrationen in dreifacher Ausführung getestet.

Die Dokumentation erfolgte durch Scannen der Agarplatten nach zwei Tagen (Abbildung 22, A). Die H₂O₂-Behandlung führte mit steigender Konzentration zu einem langsameren Wachstum, im Vergleich untereinander zeigten die Stämme jedoch keine bedeutenden Unterschiede.

Zur Kontrolle der Proteinsynthese in den verwendeten Stämmen wurde eine Westernblot-Analyse mit Yvc1-spezifischen Antikörpern durchgeführt (Abbildung 22, B). Außer im Stamm, der mit dem Leervektor transformiert wurde, ist Yvc1 in allen verwendeten Stämmen in vergleichbarer Menge vorhanden.

Hohe Konzentrationen an bivalenten Kationen

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde überprüft, ob eine Deletion oder Überexpression von YVC1 sowie die Mutation der Lysinreste K212, K547 und K599 einen Effekt auf das Wachstum der *S. cerevisiae*-Zellen in Anwesenheit von höheren Konzentrationen an zweiwertigen Kationen (Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺) hat. Ein $\Delta yvc1$ -Stamm (Stammhintergrund: S288C) wurde mit einem für YVC1 kodierenden CEN-Plasmid transformiert. Für die Überexpression von YVC1 wurde ein 2 μ -Plasmid mit einem ADH1-Promotor verwendet. Der ADH1-Promotor führt zu einer sehr starken Expression von YVC1 und wurde in einer früheren Studie im Jahr 2002 von Denis und Cyert im selben Zusammenhang verwendet (Denis und Cyert, 2002). Die Einzelmutante YVC1 K212R sowie die Dreifachmutante YVC1 K212, 547, 599R wurden ebenfalls überexprimiert und in diesem Kontext untersucht. Zur Kontrolle wurden auch die entsprechenden Leervektoren in die Zellen transformiert. Nach Kultivierung der Zellen bis zur exponentiellen Wachstumsphase wurden sie in einer seriellen Verdünnung (1:10) durch Stempeln auf Agarplatten mit den angegebenen Zusätzen überführt. Dabei wurde jede Bedingung sowie Konzentration in dreifacher Ausführung getestet. Nach einer Inkubation der Agarplatten für zwei Tage bei 30 °C wurde das Wachstum der Zellen durch Scannen dokumentiert (Abbildung 35, A). Zur Kontrolle der Proteinsynthese wurde eine Westernblot-Analyse mit immunologischer Detektion von Yvc1 durchgeführt (Abbildung 35, B).

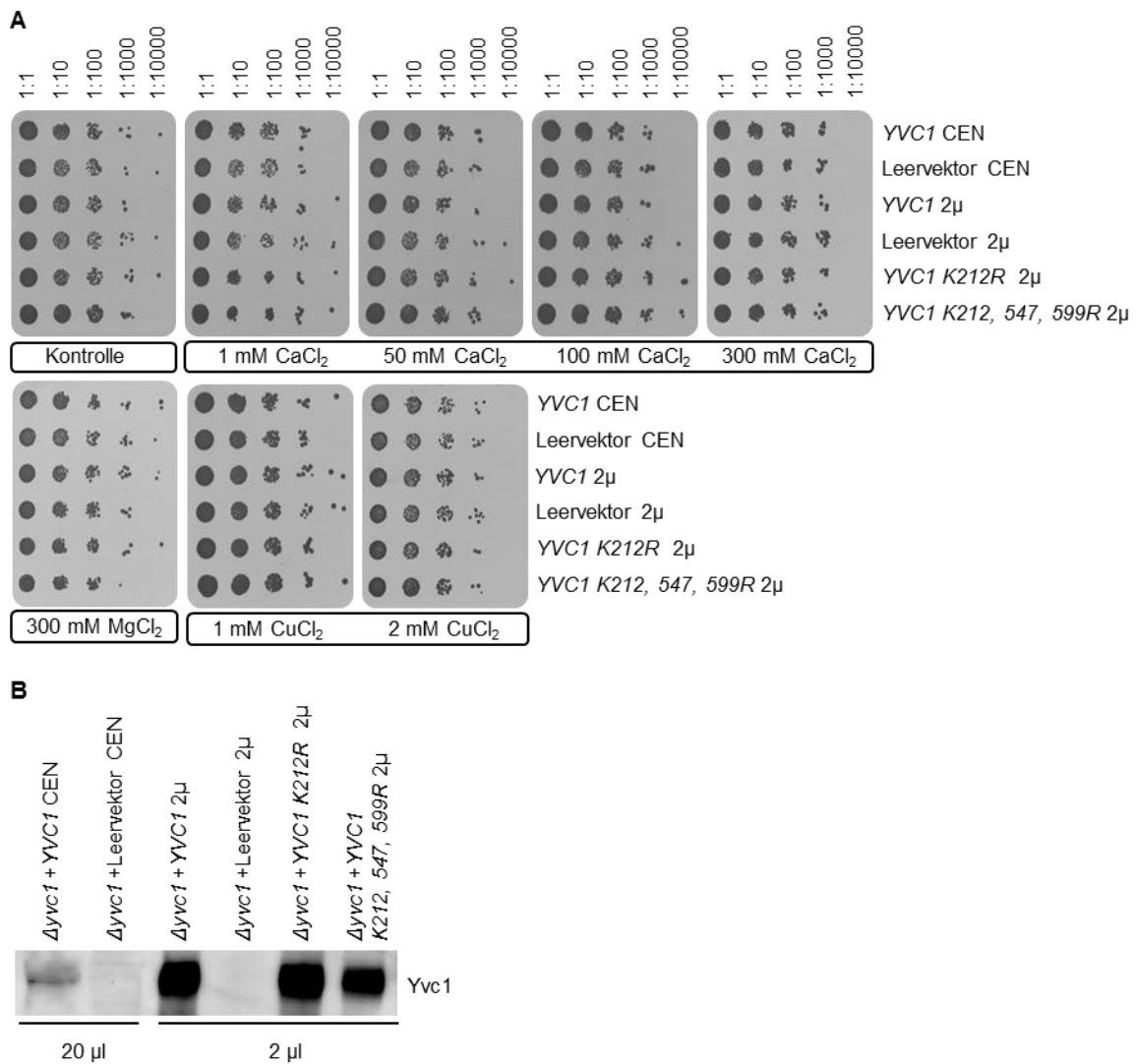


Abbildung 35: Einfluss der Deletion und Überexpression von YVC1 sowie der Mutation der Lysinreste K212, K547 und K599 auf das Wachstum von *S. cerevisiae* (S288C) in Anwesenheit von Ca²⁺-, Cu²⁺- oder Mg²⁺-Ionen. YVC1-kodierende CEN- und 2µ-Plasmide sowie die entsprechenden Leervektoren (pGS2359: pRS316-YVC1, pGS43: pRS316, pGS2403: pVT100U-ADH1-YVC1, pGS2404: pVT100U-ADH1-YVC1 K212R, pGS2405: pVT100U-ADH1-YVC1 K212, 547, 599R, pGS237: pVT100U) wurden in Δyvc1-Zellen (GSY1179) transformiert. Übernacht-Kulturen der Stämme wurden in frisches Medium überführt, wobei eine OD₆₀₀ von 0,4 eingestellt wurde. Nach einer Inkubation bei 30 °C für 3-4 h wurden die Zellen auf eine OD₆₀₀ zwischen 0,8 und 0,9 angeglichen. **A:** Die Zellen wurden in einer seriellen Verdünnung (1:10 - 1:10000) durch Stempeln auf Uracil-defiziente Agarplatten mit den angegebenen Zusätzen (CaCl₂, CuCl₂, MgCl₂) überführt. Eine Kontrollplatte ohne Zusätze wurde mitgeführt und die Dokumentation des Wachstums erfolgte durch Scannen der Agarplatten nach zwei Tagen. **B:** TCA-Proben der untersuchten Stämme wurden hergestellt. Nach Auftrennen der Proteine und ihrem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde die Proteinsynthese mit Yvc1-spezifischem, primärem Antikörper und POD-gekoppeltem, sekundärem Antikörper analysiert.

Die mit den Leervektoren transformierten Stämme synthetisieren wie erwartet kein Yvc1 und die enorme Überexpression von YVC1 ist deutlich zu erkennen. Weder die Deletion (Leervektoren) noch die Überexpression (YVC1 2 μ) von YVC1 hatte einen Einfluss auf die Toleranz der *S. cerevisiae*-Zellen gegenüber hohen Konzentrationen an Calcium-, Kupfer- oder Magnesium-Ionen. Auch die Mutation der Lysinreste K212, K547 und K599 hat keine Auswirkungen auf das Wachstum der Zellen unter den getesteten Stressbedingungen. Das Wachstum bei hohen Calcium-Konzentrationen wurde mit denselben Plasmiden in einem weiteren Stammhintergrund (W303) untersucht, wobei auch in diesem Fall keine Unterschiede zwischen den Stämmen festgestellt werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Interaktionspartner von Yvc1

Protein-Protein-Interaktionen spielen eine wichtige Rolle in nahezu allen zellphysiologischen Prozessen, da Wechselwirkungen zwischen einzelnen Proteinen Einfluss auf ihre Struktur, Stabilität und somit auf ihre Funktion nehmen können. Für einen genauen Einblick in die Funktionsweise eines Proteins ist daher die Ermittlung und Analyse seiner Interaktionen mit anderen Proteinen von großer Bedeutung (Alberts, 1998; Gavin *et al.*, 2002; Babu *et al.*, 2009). Aus diesem Grund war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Identifizierung von neuen Interaktionspartnern von Yvc1. Zu diesem Zweck wurden zwei Methoden durchgeführt (TAP-Reinigung, Immunpräzipitation), welchen das Prinzip der Co-Reinigung des Zielproteins mit seinen Interaktionspartnern zugrunde liegt. Eine anschließende massenspektrometrische Analyse der mitgereinigten Proteine sollte darüber Aufschluss geben, mit welchen Interaktionspartnern Yvc1 *in vivo* möglicherweise als Komplex vorliegt.

411. Tandemaffinitätsreinigung (TAP-Reinigung)

Die TAP-Reinigung ist eine etablierte Methode, um Proteinkomplexe unter nativen Bedingungen aus Zelllysaten zu isolieren und zu analysieren (Rigaut *et al.*, 1999). Durch die C- oder N-terminale Fusion des TAP-tags an ein Zielprotein kann dieses mit seinen Interaktionspartnern in zwei aufeinanderfolgenden Affinitätsreinigungen angereichert werden. Der ursprüngliche TAP-tag besteht zum einen aus zwei IgG-bindenden Domänen des Protein A aus *Staphylococcus aureus* (ZZ-Domäne), zum anderen aus dem Calmodulin-bindenden Peptid (CBP), welches in Anwesenheit von 0,2 mM CaCl₂ Calmodulin mit hoher Affinität bindet. Die zwei tags sind durch die Spaltstelle für die TEV-Protease miteinander verbunden, wodurch eine schonende, proteolytische Elution der Proteinkomplexe nach der ersten Affinitätsreinigung an IgG-Sepharose ermöglicht wird. Die starke Bindung von CBP und Calmodulin erlaubt mehrere Waschschriffe, um die gewünschten Proteinkomplexe von

Kontaminationen zu befreien. Durch Ca^{2+} -Komplexbildung mittels EGTA werden die immobilisierten Proteinkomplexe von der Calmodulin-Sepharose eluiert. Diese Methode zeichnet sich dadurch aus, dass das Zielprotein aufgrund der hohen Affinität der verwendeten *tags* effektiv angereichert und die Menge an falsch positiven Ergebnissen durch die zwei Reinigungsschritte minimiert wird.

Bekannte Interaktionspartner von Kap114 lassen sich anhand einer TAP-Reinigung spezifisch anreichern

Zunächst wurde die Spezifität und Effizienz der Methode am Beispiel des Karyopherins Kap114 kontrolliert. Dazu wurde ein *S. cerevisiae*-Stamm verwendet (GSY1437), der eine genomisch kodierte TAP-getaggte Version von *KAP114* exprimiert. Nach mechanischem Aufschluss der Zellen wurde eine TAP-Reinigung durchgeführt und die eluierten Proteine mit TCA gefällt. Zusätzlich wurde zur Analyse der Proteinsynthese eine TCA-Probe des verwendeten Stammes hergestellt. Nach Auftrennen der Proteine der TCA- sowie der Eluat-Probe durch SDS-PAGE und ihrem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden sowohl das Zielprotein (Kap114) als auch drei seiner bereits beschriebenen Interaktionspartner Rpf1, Gsp1 und Hta1 (Greiner *et al.*, 2004; Pemberton und Paschal, 2005; Caesar *et al.*, 2006) mit spezifischen Antikörpern detektiert (Abbildung 36).

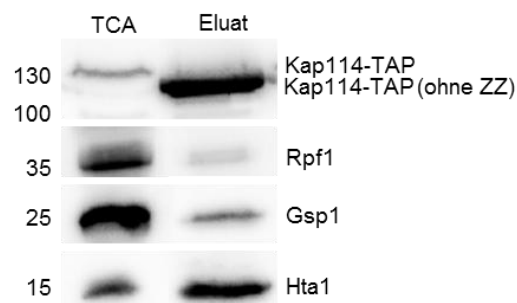


Abbildung 36: Effizienztest der TAP-Reinigung am Beispiel von Kap114. Zellen des Hefestammes GSY1437 wurden kultiviert, geerntet und mechanisch aufgeschlossen. Nach Abtrennen der Zelltrümmer durch Zentrifugation wurde der Überstand mit IgG-Sepharose inkubiert (4 °C, 1,5 h). Es folgte die Abspaltung der immobilisierten Proteinkomplexe unter Verwendung von 30 µl affinitätsgereinigter TEV-Protease (4 °C, üN). Nach Inkubation der abgespalteten Proteinkomplexe mit Calmodulin-Sepharose (4 °C, 1,5 h) wurden die nun immobilisierten Proteine durch Ca^{2+} -Komplexbildung mit 5 mM EGTA eluiert und mit TCA gefällt. Zur Kontrolle der Proteinsynthese im verwendeten Hefestamm, wurde eine TCA-Probe hergestellt. Nach Auftrennen der Proteine mittels SDS-PAGE und anschließendem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die Proteine Kap114, Rpf1, Gsp1 und Hta1 mit spezifischen primären Antikörpern und POD-gekoppelten sekundären Antikörpern immunologisch detektiert. Die Molekularmassen sind links in kDa angegeben.

Das Zielprotein Kap114 wurde im Eluat erfolgreich angereichert. Die Verminderung der Molekularmasse im Vergleich zum Signal in der TCA-Probe resultiert aus der Abspaltung des Protein A-tags während der Reinigung. Weiterhin konnten Rpf1 (35 kDa), die Ran GTPase Gsp1 (24 kDa) und das Histon Hta1 (14 kDa) im Eluat nachgewiesen und ihrer Molekularmasse entsprechend zugeordnet werden. Das Ergebnis zeigt, dass diese Methode effektiv für die Identifikation von Interaktionspartnern eines Proteins angewendet werden kann.

Yvc1-TAP sowie Yvc1-(S-)TAP lassen sich mittels TAP-Reinigung effizient anreichern

Die Analyse des Zielproteins Yvc1 wurde unter Verwendung des oben beschriebenen, ursprünglichen TAP-tags sowie einer modifizierten Variante dieses tags durchgeführt. In der modifizierten Variante ist das CBP gegen den S-tag ausgetauscht, ein 15 Aminosäurereste langes Peptid, welches sich durch die starke Affinität zum Protein S aus der RNase A auszeichnet. Die Elution der Proteine nach ihrer Immobilisierung an Protein S-Sepharose erfolgte durch Denaturierung im SDS-Probenpuffer. Der Vorteil, der sich aus dieser Modifikation im Vergleich zu dem ursprünglichen TAP-tag ergibt, ist die Möglichkeit, Ca²⁺-abhängige Interaktionspartner zu identifizieren.

Durch homologe Rekombination wurden die jeweiligen tags in das Genom von *S. cerevisiae* integriert, wodurch eine Synthese der Proteine in physiologischen Mengen gewährleistet wurde. Die erfolgreiche Integration des TAP-tags wurde durch PCR-Analyse der genomischen DNA sowie durch Detektion des Fusionsproteins im Zelllysats mit spezifischem Antikörper bestätigt (Daten nicht gezeigt). Trotz der relativ hohen Molekularmasse der C-terminal fusionierten tags (TAP-tag: 19 kDa, S-TAP-tag: 17 kDa) kann man von einer physiologischen Lokalisation von Yvc1 in der Vakuolenmembran ausgehen, da auch die C-terminale Fusion mit GFP (31 kDa) eine korrekte Lokalisation aufweist (Abbildung 30).

Drei unabhängig voneinander hergestellte Zellpellets (biologische Replikate) des *S. cerevisiae*-Stammes, der Yvc1-TAP synthetisiert, sowie ein Zellpellet des Wildtyps als Negativ-Kontrolle wurden für eine TAP-Reinigung nach dem Standardprotokoll verwendet, wobei die eluierten, mit TCA gefällten Proteine in 15 µl LDS-Probenpuffer aufgenommen wurden. Ein Drittel des Eluates (5 µl) wurde für die Westernblot-Kontrolle des Zielproteins verwendet (Abbildung 37 A, oben), die restlichen zwei Drittel (10 µl) wurden etwa 5 min in ein 10 %iges NuPAGE-Fertiggel einlaufen gelassen (Gelsystem der Firma Thermo Fisher Scientific) und die im Eluat enthaltenen Proteine mit kolloidalem Coomassie visualisiert (Abbildung 37 A, unten). Im Westernblot erkennt man die nicht *getaggte* (TCA WT) und

getaggte (TCA Yvc1-TAP) Form von Yvc1. Die Bande des *getaggten* Proteins erscheint stärker, da die zwei IgG-bindenden Domänen des *tags* das Signal verstärken. Im Eluat des Wildtyps kann wie erwartet kein Yvc1 detektiert werden, in den drei Eluaten der TAP-Reinigungen dagegen erkennt man die Anreicherung des Zielproteins deutlich. Die Verringerung der Molekularmasse wird durch die Abspaltung der zwei Z-Domänen nach der ersten Affinitätsreinigung verursacht.

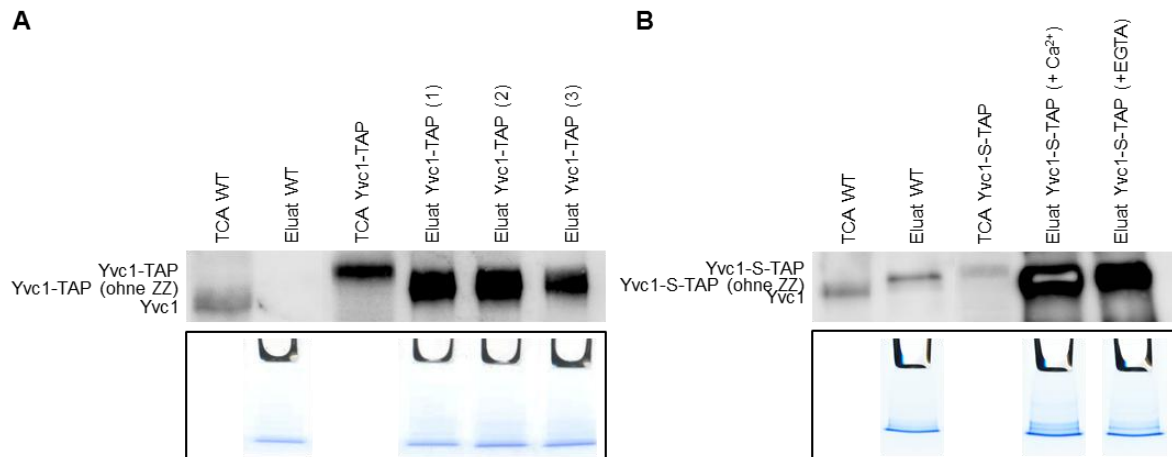


Abbildung 37: TAP-Reinigungen von Yvc1-TAP und Yvc1-S-TAP. 2 l-Kulturen der Stämme GSY1517 (*YVC1-TAP*) und GSY1130 (*YVC1-S-TAP*) wurden bis zum Erreichen einer OD_{600} zwischen 3,0 und 3,5 bei 30 °C inkubiert, geerntet und die Zellen mechanisch aufgeschlossen. Nach Abtrennen der Zelltrümmer durch Zentrifugation, wurde der Überstand mit IgG-Sepharose inkubiert (4 °C, 1,5 h). Es folgte die Abspaltung der immobilisierten Proteinkomplexe unter Verwendung der TEV-Protease (4 °C, 1 h). Im zweiten Reinigungsschritt wurden die abgespaltenen Proteinkomplexe mit Calmodulin-Sepharose (*YVC1-TAP*) bzw. Protein-S-Sepharose (*YVC1-S-TAP*) inkubiert (4 °C, 1,5 h). Die Elution erfolgte durch Ca^{2+} -Komplexbildung mit 5 mM EGTA (*YVC1-TAP*) bzw. durch Denaturierung der Proteine im verdünnten SDS-Probenpuffer für 20 min bei 60 °C und anschließender Aufkonzentrierung im Vakuumkonzentrator (*YVC1-S-TAP*). Zur Kontrolle der Effizienz wurden die Proteine in den Eluaten und in TCA-Proben der verwendeten Stämme mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Yvc1-spezifischem primärem und entsprechendem sekundärem Antikörper detektiert (oben). Nach kurzem Einlaufen in ein SDS-Gel (10 %, NuPAGE) wurden die in den Eluaten enthaltenen Proteine mit kolloidalem Coomassie gefärbt (unten). **A.** TAP-Reinigung von drei biologischen Replikaten des *YVC1-TAP*- sowie des WT-Stammes. **B.** TAP-Reinigung von zwei technischen Replikaten des *YVC1-S-TAP*- sowie des WT-Stammes. Die Reinigung erfolgte in Anwesenheit von 1 mM $CaCl_2$ (*YVC1-S-TAP*, WT) oder in Anwesenheit von 5 mM EDTA (*YVC1-S-TAP*).

Für die Reinigung von Yvc1-S-TAP wurden in zwei voneinander unabhängigen Experimenten je zwei technische Replikate von Zellpellets verwendet. Dabei wurde die Reinigung zum einen in Anwesenheit von 1 mM CaCl_2 und zum anderen in Anwesenheit von 5 mM EGTA durchgeführt, um Ca^{2+} -abhängige von Ca^{2+} -unabhängigen Interaktionspartnern unterscheiden zu können. In beiden Experimenten wurde eine Wildtyp-Kontrolle in Anwesenheit von 1 mM CaCl_2 mitgeführt. Abbildung 37 B zeigt die Ergebnisse für eines der beiden Experimente. Auch in diesem Fall wurde jeweils ein Drittel des Eluates für die Westernblot-Kontrolle (Abbildung 37 B, oben) und zwei Drittel für die Färbung mit kolloidalem Coomassie (Abbildung 37 B, unten) verwendet. Sowohl das nicht *getaggte* als auch das *getaggte* Protein sind in den Zellysaten der verwendeten Stämme zu erkennen (TCA WT, TCA Yvc1-S-TAP). Im Eluat der Wildtyp-Kontrolle erscheint eine unspezifische Bande, die keiner hier erwarteten Form von Yvc1 zugeordnet werden kann. In den Eluaten der S-TAP-Reinigungen (+ Ca^{2+} , + EGTA) erscheinen starke Signale, die auf die Anreicherung des Yvc1-S-TAP ohne die beiden Z-Domänen zurückzuführen sind.

Die massenspektrometrische Analyse bestätigt die spezifische Reinigung von Yvc1 und identifiziert mitgereinigte Proteine

Die mit kolloidalem Coomassie gefärbten Gelstücke wurden mit Hilfe eines Skalpell vollständig aus dem Gel geschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Der Trypsin-Verdau, die Massenspektrometrie sowie die Peptidanalyse wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Claudia Fecher-Trost am Universitätsklinikum des Saarlandes im Bereich der „Experimentellen und Klinischen Pharmakologie und Toxikologie“ durchgeführt.

Bei der Identifizierung von Proteinen wurden nur diejenigen Peptide berücksichtigt, deren Zuordnung mit einer Wahrscheinlichkeit von über 95 % korrekt ist. In den folgenden Tabellen ist die Gesamtanzahl aller gefundenen Peptide für die jeweiligen Proteine angegeben, wobei nur Proteine, welchen mindestens zwei Peptide zugeordnet werden konnten, aufgeführt sind. Die den Proteinen zugehörigen Informationen (Funktion/biologischer Prozess, Lokalisation, Molekularmasse (MW)) wurden der SGD-Datenbank entnommen.

In der massenspektrometrischen Analyse der drei TAP-Reinigungen sowie der Wildtyp-Kontrolle wurden die identifizierten Peptide insgesamt 69 Proteinen zugeordnet. Diejenigen Proteine, die ausschließlich in der Wildtyp-Kontrolle vorkamen, wurden aus der Liste entfernt. In allen drei TAP-Reinigungen wurden Peptide des Zielproteins Yvc1 gefunden (TAP 1: 34 Peptide, TAP 2: 37 Peptide, TAP 3: 29 Peptide). Diese Peptide führten dabei zu einer Sequenzabdeckung von 20 % (TAP 1), 18 % (TAP 2) und 13 % (TAP 3). In der

Wildtyp-Kontrolle waren keine Peptide des Zielproteins vorhanden. Neben ribosomalen Proteinen und diversen Hitzeschockproteinen, die als unspezifischer Hintergrund betrachtet werden können, wurden in den drei TAP-Reinigungen 18 Proteine identifiziert, die in Tabelle 21 aufgelistet sind. Proteine, die am Zuckerstoffwechsel sowie am Aminosäurestoffwechsel beteiligt sind, konnten identifiziert werden. Weiterhin tauchten Proteine auf, die beim Prozess der Translation und der Zellwand- sowie der Ribosomen-Biogenese eine Rolle spielen. Die in der Plasmamembran lokalisierte und an der Regulation des intrazellulären pH-Wertes beteiligte Protonenpumpe Pma1 wurde identifiziert. Außerdem wurden zwei Proteine gefunden, die beim Proteintransport des intrazellulären Membransystems bzw. bei der Vakuolenfusion eine Rolle spielen (Arf1, Eno2).

Tabelle 21: Mit Yvc1-TAP cogereinigte Proteine

Protein	Funktion/biologischer Prozess	Lokalisation	MW [kDa]	Anzahl der Peptide			
				TAP 1	TAP 2	TAP 3	WT
Adh1	Alkoholdehydrogenase	Cytoplasma	37	7	8	14	4
Arf1	Vesikel-vermittelter Proteintransport	Golgi-Apparat	21	0	0	2	0
Asc1	Ribosomen-Biogenese	Cytoplasma	35	3	2	6	3
Bmh2	Posttranskriptionelle Proteom-Kontrolle	Cytoplasma, Kern	31	5	4	2	2
Cdc19	Glykolyse, Pyruvat-Metabolismus	Cytoplasma	55	3	11	12	0
Eft1	Translationselongation	Cytoplasma	93	5	7	17	0
Eno2	Glykolyse, Glukoneogenese, Regulation der Vakuolenfusion	Cytoplasma (teilw. an Vakuole gebunden)	47	6	8	19	3
Gpm1	Glykolyse, Glukoneogenese	Cytoplasma	28	0	3	3	0
Pdc1	Aminosäure-Katabolismus, Glukose-Fermentation	Cytoplasma, Kern	61	2	7	15	0
Pgk1	Glykolyse, Glukoneogenese	Cytoplasma, Plasmamembran, Mitochondrium	45	7	6	9	0
Pma1	Regulation des intrazellulären pH-Wertes	Plasmamembran	100	4	0	2	2
Psa1	Zellwand-Biogenese	Cytoplasma	40	0	0	2	0

Sam1	Adenosylmethionin-Biogenese	Cytoplasma	42	0	0	2	0
Tdh3	Glykolyse, Glukoneogenese	Cytoplasma	36	26	25	34	12
Tef1	Translationselongation	Cytoplasma	50	11	16	22	7
Tif1	Translationsinitiation	Cytoplasma	45	0	0	2	0
Tpi1	Glykolyse	Cytoplasma, Mitochondrium	27	0	2	0	0
Yef3	Translationselongation	Cytoplasma	116	0	4	0	2

Die Affinitätsreinigung mit dem modifizierten TAP-tag (*S-TAP-YVC1*) wurde in zwei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dabei fand die Reinigung für ein Replikat des *S-TAP-YVC1*-Stammes sowie für die Wildtyp-Kontrolle in Anwesenheit von 1 mM CaCl_2 , für ein weiteres Replikat in Anwesenheit von 5 mM EGTA statt. In der massenspektrometrischen Analyse der beiden Experimente wurden Peptide gefunden, die 135 Proteinen zugeordnet werden konnten. Ribosomale Proteine, Hitzeschockproteine und Proteine, die nur in den Wildtyp-Kontrollen zu finden waren, wurden ausgeschlossen. Die spezifische Anreicherung des Zielproteins Yvc1 konnte auch in diesem Fall bestätigt werden. In den zwei *S-TAP*-Reinigungen in Anwesenheit von 1 mM CaCl_2 wurden 169 bzw. 53 Peptide gefunden, die eine Sequenzabdeckung des Proteins von 48 % bzw. 36 % ausmachten. In den Ansätzen mit 5 mM EGTA wurden 115 bzw. 33 Peptide identifiziert, die zu einer Sequenzabdeckung von 34 % bzw. 20 % führten. In der Negativkontrolle des Wildtyps waren keine Peptide zu finden, die Yvc1 zugeordnet werden können. Die 61 mit dem Zielprotein cogereinigten Proteine sind in Tabelle 22 aufgeführt. Hier ist die Anzahl der Peptide für jedes angegebene Protein aus den zwei Experimenten zusammengefasst. Entsprechend der Menge der identifizierten Zielprotein-Peptide wurden in den Reinigungen in Anwesenheit von CaCl_2 (+ Ca^{2+}) mehr Peptide gefunden als in den Reinigungen in Anwesenheit von EGTA (- Ca^{2+}).

Kernproteine (z.B. Histone) sowie mitochondrial lokalisierte Proteine tauchten in beiden Experimenten auf. Außerdem wurden Proteine identifiziert, die verschiedenen Stoffwechselprozessen zugeordnet werden (Zucker, Aminosäuren, Fettsäuren). Proteine, die bei der Transkriptions- und Translationsregulation eine Rolle spielen, waren ebenfalls vorhanden. Außerdem konnten Transporter für Phosphat (Mir1), organische Säuren (Pdr12) und ATP/ADP (Pet9) identifiziert werden. Weiterhin wurden Peptide von drei Aminosäure-tRNA-Ligasen (Gus1, Ils1, Tys1) in den Eluaten der beiden Experimente gefunden. Zwei an der

Zellwand-Synthese beteiligte Proteine (Fks1, Psa1) wurden identifiziert. Pma1, eine in der Plasmamembran lokalisierte Protonenpumpe, sowie Vma2, eine Untereinheit der vakuolären Protonenpumpe, tauchten in den Eluaten ebenfalls auf. Außerdem wurde die an der Vakuolenfusion und am intrazellulären Proteintransport beteiligte Enolase 2 (Eno2) identifiziert.

Tabelle 22: Mit Yvc1-S-TAP cogereinigte Proteine

Protein	Funktion/biologischer Prozess	Lokalisation	MW [kDa]	Gesamtzahl der Peptide		
				S-TAP +Ca ²⁺ (1)+(2)	S-TAP -Ca ²⁺ (1)+(2)	WT +Ca ²⁺ (1)+(2)
Abf2	Replikation und Rekombination mitochondrialer DNA	Mitochondrium	22	2	0	0
Adh1	Alkoholdehydrogenase	Cytoplasma	37	19	14	21
Ald6	Acetat-Biosynthese, NADPH-Regeneration	Cytoplasma, Mitochondrium	54	3	0	3
Arp8	Transkriptionsregulation	Kern	100	2	0	0
Cdc19	Glykolyse, Pyruvat-Metabolismus	Cytoplasma	55	13	6	17
Clu1	Translationsinitiation	Cytoplasma	145	7	0	3
Dbp2	ATP-abhängige RNA-Helikase	Kern	61	3	9	2
Ded1	Translationsinitiation	Cytoplasma	66	3	0	2
Eft1	Translationselongation	Cytoplasma	93	23	11	19
Elo3	Fettsäure-Biosynthese	ER	39	2	0	0
Eno2	Glykolyse, Glukoneogenese, Regulation der Vakuolenfusion	Cytoplasma (teilw. an Vakuole gebunden)	47	16	3	25
Fba1	Glykolyse, Glukoneogenese	Cytoplasma, Mitochondrium	40	4	0	8
Fks1	Zellwand-Synthese	Plasmamembran	215	7	3	0
Fun12	Translationsinitiation	Cytoplasma	112	5	0	0
Gpm1	Glykolyse, Glukoneogenese, Glukose-Fermentation	Cytoplasma, Mitochondrium	28	6	0	7
Gus1	Glutamat-tRNA-Ligation	Cytoplasma	81	0	5	2

Hhf1			11	36	12	9
Hho1	Histone	Kern	28	4	0	0
Htb2			14	27	2	3
Htz1			14	4	0	0
Idh2			TCA-Zyklus	Mitochondrium	40	2
Ils1	Isoleucin-tRNA-Ligation	Cytoplasma	123	7	4	3
Isw1	Transkriptionsregulation	Kern	131	3	0	0
Kap123	Kerntransport	Kern (Kernpore)	123	3	0	0
Mir1	Phosphat-Transporter	Mitochondrium (Membran)	33	0	2	0
Nop1	Histon Glutamin- Methylierung, rRNA-Methylierung	Kern (Nukleolus)	34	14	4	2
Nop56	rRNA-Modifizierung	Kern	57	4	4	0
Nop58			57	3	0	0
Npl3	mRNA-Transport, mRNA-Prozessierung, Transkriptionsregulation, Translationsregulation	Cytoplasma, Kern	45	12	12	10
Pdc1	Aminosäure-Katabolismus, Glukose-Fermentation	Cytoplasma, Kern	61	12	7	17
Pdr12	Transporter für organische Säuren	Plasmamembran	171	2	0	0
Pet9	ATP/ADP-Antiporter	Mitochondrium (innere Membran)	34	12	6	8
Pfk1	Glykolyse	Mitochondrium	108	2	0	0
Pfk2		Cytoplasma, Mitochondrium	105	2	0	0
Pgi1	Glykolyse, Glukoneogenese	Mitochondrium	61	3	0	4
Pgk1	Glykolyse, Glukoneogenese	Cytoplasma, Mitochondrium	45	5	0	17
Pma1	Regulation des intrazellulären pH-Wertes	Plasmamembran	100	94	30	6
Prt1	Translationsinitiation	Cytoplasma	88	2	0	0
Psa1	Zellwand-Synthese	Cytoplasma	40	2	0	3

Rfa1	DNA Replikation, DNA-Reparatur, Rekombination	Kern	70	16	15	15
Rim1	Replikation mitochondrialer DNA	Mitochondrium	15	4	0	0
Rpa135	Transkription	Kern	136	2	0	0
Rpb2			139	11	0	0
Rpg1	Translationsinitiation	Cytoplasma	110	2	0	0
Rpo21	Transkription	Kern	192	14	0	0
Rrp5	Ribosomen-Biosynthese	Kern	193	2	0	0
Sam1	Adenosylmethionin-Biogenese	Cytoplasma	42	4	4	0
Sas3	Histon-Acetyltransferase-Aktivität	Kern	98	2	0	0
Stm1	Translationsregulation	Cytoplasma	30	4	4	4
Tdh3	Glykolyse, Glukoneogenese	Cytoplasma	36	42	21	44
Tef1	Translationselongation	Cytoplasma	50	33	18	21
Tef4			47	4	3	4
Top2	DNA-Replikation	Kern	164	42	0	0
Tpi1	Glykolyse	Cytoplasma, Mitochondrium	27	2	0	7
Tys1	Tyrosin-tRNA-Ligation	Cytoplasma	44	2	2	0
Ura2	Pyrimidin Biosynthese	Cytoplasma	245	64	19	26
Vma2	Azidifizierung der Vakuole, Calcium-Homöostase	Vakuole (Membran)	58	10	5	4
Xrn1	Transkriptionsregulation	Cytoplasma, Kern	175	23	0	6
Yef3	Translationselongation	Cytoplasma	116	27	24	29
Yra1	mRNA-Export	Cytoplasma, Kern	25	2	4	0
Yta7	Transkriptionsregulation	Kern	157	5	0	0

412. Co-Immunpräzipitation (Co-IP)

Die IP ist eine einfache und schnelle Methode, ein nicht *getaggt*es Zielprotein aus einem Zelllysate anzureichern und durch die Analyse der mitgereinigten Proteine mögliche Interaktionspartner des Zielproteins zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit Zielprotein-spezifische Antikörper an magnetische Protein A/G-Sepharose gekoppelt und anschließend mit Zelllysate des Wildtyps von *S. cerevisiae* inkubiert. Die Sepharose wurde schließlich gewaschen, um möglichst alle nicht gebundenen Proteine aus dem Ansatz zu entfernen und die immobilisierten Proteinkomplexe durch Denaturieren mit SDS-Probenpuffer eluiert.

Zur Herstellung des Lysates wurden Zellen des Wildtyps von *S. cerevisiae* in einem nativen Lysepuffer mechanisch aufgeschlossen und die Zelltrümmer entfernt. Die Co-IP von Yvc1 erfolgte mit zwei unterschiedlichen Yvc1-spezifischen Antikörpern, einem monoklonalen Antikörper aus der Ratte sowie einem polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen. Zur Kontrolle wurden ein Ansatz mit einem Antikörper, welcher spezifisch das Kernporen-Protein Nup2 bindet und ein Ansatz ohne Antikörper mitgeführt, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen. Ein Drittel des jeweiligen IP-Eluates wurde für eine Westernblot-Analyse verwendet (Abbildung 38, oben und Mitte). Die beiden Zielproteine Yvc1 und Nup2 wurden in den Eluaten sowie im Zelllysate des Wildtyps (TCA) detektiert. Yvc1 konnte in beiden Co-IPs angereichert werden, wobei das Signal im Eluat der Co-IP mit dem polyklonalen Kaninchen-Antikörper sehr viel stärker ist. Dieser Antikörper scheint im Vergleich mit dem monoklonalen Ratte-Antikörper besser für eine Co-IP geeignet zu sein. Im Co-IP-Eluat mit dem Nup2-spezifischen Antikörper und der Negativkontrolle ohne Antikörper wurde kein Yvc1 detektiert. Das Zielprotein Nup2 wurde ausschließlich in der Co-IP, in welcher der Nup2-spezifische Antikörper verwendet wurde, angereichert. Zwei Drittel der Co-IP-Eluate wurden für etwa 5 min in ein 10 %iges NuPAGE-Fertiggel einlaufen gelassen (Gelsystem der Firma Thermo Fisher Scientific) und die in den Eluaten enthaltenen Proteine mit kolloidalem Coomassie visualisiert (Abbildung 38, unten).

Die mit kolloidalem Coomassie gefärbten Gelstücke wurden mit Hilfe eines Skalpell vollständig aus dem Gel geschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Der Trypsin-Verdau, die Massenspektrometrie sowie die Peptidanalyse wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Claudia Fecher-Trost am Universitätsklinikum des Saarlandes im Bereich der „Experimentellen und Klinischen Pharmakologie und Toxikologie“ durchgeführt.

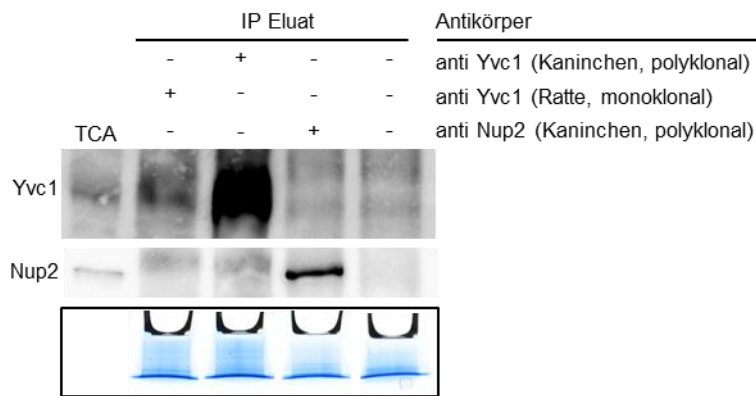


Abbildung 38: Co-IPs von Yvc1 und Nup2. Zellen des Wildtyps von *S. cerevisiae* (GSY170) wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase in YPD_{Ade}-Medium kultiviert, durch Zentrifugation geerntet und in nativem Puffer mechanisch aufgeschlossen. Zellrümmer wurden durch Zentrifugation entfernt und der Überstand (Lysat) für IPs verwendet. Durch Inkubation (1,5 h, RT) von jeweils 25 µl Protein A/G-Sepharose mit zwei unterschiedlichen Yvc1-spezifischen Antikörpern (Kaninchen/polyklonal, Ratte/monoklonal) und einem Nup2-spezifischen Antikörper (je 3 µg), wurden diese an die Sepharose gekoppelt. Eine Negativkontrolle ohne Antikörper wurde mitgeführt. Nach Inkubation der Protein A/G-Sepharose (mit und ohne gekoppelte Antikörper) mit dem Zelllysat über Nacht bei 4 °C wurden die nicht gebundenen Proteine gewaschen und die immobilisierten Proteinkomplexe durch Zugabe von 25 µl SDS-Probenpuffer und Inkubation für 20 min bei 60 °C eluiert. Ein Drittel der Eluat-Proben sowie eine TCA-Probe des verwendeten Stammes wurden für eine Westernblot-Analyse verwendet. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und die Zielproteine Yvc1 (oben) und Nup2 (Mitte) immunologisch detektiert. Nach kurzem Einlaufen in ein SDS-Gel (10 %, NuPAGE) wurden die im Rest der Eluate enthaltenen Proteine mit kolloidalem Coomassie gefärbt (unten).

Bei der Identifizierung von Proteinen wurden nur diejenigen Peptide berücksichtigt, deren Zuordnung mit einer Wahrscheinlichkeit von über 95 % korrekt ist. In den folgenden Tabellen ist die Gesamtanzahl aller gefundenen Peptide für die jeweiligen Proteine angegeben, wobei nur Proteine, welchen mindestens zwei Peptide zugeordnet werden konnten, aufgeführt sind. Die den Proteinen zugehörigen Informationen (Funktion/biologischer Prozess, Lokalisation, Molekularmasse (MW)) wurden der SGD-Datenbank entnommen.

In den vier durchgeführten Co-IPs wurden insgesamt 637 Proteine identifiziert. Hitzeschockproteine und ribosomale Proteine wurden als unspezifisch betrachtet und aus der Liste entfernt. Außerdem wurden diejenigen Proteine, die in der Negativkontrolle verglichen mit den Yvc1- bzw. Nup2-Co-IPs mit gleich vielen oder mehr Peptiden identifiziert wurden, als falsch positive Ergebnisse interpretiert.

Tabelle 23: In der Co-IP von Nup2 gereinigte Proteine

Protein	Funktion/biologischer Prozess	Lokalisation	MW [kDa]	Anzahl der Peptide	
				Nup2	-AK
Adh3	Alkoholdehydrogenase	Mitochondrium (Matrix)	40	4	0
Akl1	Proteinkinase	Cytoplasma	124	81	65
Cdc21	Pyrimidin-Biosynthese	Kern	35	3	2
Cdc33	Translationsinitiation	Cytoplasma, Kern	24	7	6
Cdc48	ATPase	Cytoplasma, Kern	92	16	15
Fmp10	unbekannt	Mitochondrium	28	9	8
Fus3	MAP-Kinase	Cytoplasma, Kern	41	5	4
Gdh2	Glutamat-Dehydrogenase	Mitochondrium	124	7	6
Hta1	Histon	Kern	14	4	2
Mic26	Cristae-Bildung	Mitochondrium	27	7	6
Mot1	Transkriptionsregulation	Kern	210	2	0
Nup133	Untereinheit des Kernporenkomplexes	Kern (Pore)	133	2	0
Sef1	Putativer Transkriptionsfaktor	unbekannt	128	5	3
Sla1	Zelluläre Morphogenese	Cytoplasma, Kern	136	5	4
Sla2			109	12	9
Srp1	Kerntransport	Cytoplasma, Kern	60	54	0
Ufd2	Ubiquitin-Ubiquitin-Ligase	Cytoplasma, Kern	110	2	0

In der Co-IP von Nup2 wurden 157 Peptide des Zielproteins gefunden, die zu einer Sequenzabdeckung von 76 % führten. In der Negativkontrolle ohne Antikörper (-AK) sowie in den Co-IPs von Yvc1 wurden keine Nup2-Peptide identifiziert. Zusammen mit Nup2 wurden 17 weitere Proteine gereinigt, die in Tabelle 23 aufgeführt sind. Neben verschiedenen Kernproteinen, zwei mitochondrialen Proteinen, der Alkoholdehydrogenase Adh3 und der Proteinkinase Akl1 fand man die Untereinheit des Kernporenkomplexes Nup133 (grau). Außerdem wurde das am Kerntransport beteiligte Srp1 (grau), welches als Interaktionspartner von Nup2 bereits beschrieben wurde (Solsbacher *et al.*, 2000), mit 54 Peptiden eindeutig identifiziert.

In den zwei Co-IPs von Yvc1 wurden ebenfalls Peptide des Zielproteins identifiziert. Die Massenspektrometrie bestätigte dabei die durch die Westernblot-Analyse (Abbildung 38) vermutete, unterschiedliche Effizienz der beiden Antikörper (monoklonaler Ratte-Antikörper (1): 16 Peptide, polyklonaler Kaninchen-Antikörper (2): 65 Peptide). Die identifizierten Peptide führten zu einer Sequenzabdeckung von 13 % (1) und 39 % (2). In der Negativkontrolle ohne Antikörper (-AK) und in der Co-IP mit dem Nup2-spezifischen Antikörper wurde kein Yvc1 gefunden. Die mit Yvc1 gereinigten Proteine sind Tabelle 24 zu entnehmen, wobei Proteine, die aufgrund ihrer Lokalisation im Kern, in Mitochondrien oder im ER als Interaktionspartner ausgeschlossen werden können, nicht aufgeführt sind. Unter den 87 Proteinen befinden sich Proteine, die am Zucker- und Aminosäurestoffwechsel sowie der Translationsregulation beteiligt sind. Verschiedene Proteinkinasen (Cdc28, Hom3, Kin2, Sch9) und die Phosphatase Oca1 wurden identifiziert. Drei Aminosäure-tRNA-Ligasen (Gus1, Mes1, Tys1) sowie an verschiedenen Signaltransduktionswegen beteiligte GTPasen (Bms1, Rho1, Rsr1) und die ATPase Cdc48 waren in den Eluaten der Co-IPs vorhanden. Proteine, die bei der Zellwand-Synthese und der Kontrolle der Zellwand-Integrität (Chs1, Emw1, Fks1, Gas1, Psa1) sowie der zellulären Morphogenese (Bni1, Sla1, Sla1) eine Rolle spielen, wurden gefunden. Peptide konnten unterschiedlichen Transportern (Hxt2, Hxt3, Hxt7, Pdr5, Pho88, Snq2), einem spannungsgesteuerten Chloridkanal (Gef1) und zwei Untereinheiten der vakuolären Protonenpumpe (Vma1, Vma8) zugeordnet werden. Am Nukleosid-Katabolismus (Apa1), der tRNA-Methylierung (Trm732), der Ergosterol- (Erg26, Erg3), Fettsäure- (Fas1, Fas2) sowie der Desoxyribonukleotid- (Rnr1) Biosynthese beteiligte Proteine wurden ebenfalls identifiziert. Peptide des alpha-Faktor-Pheromonrezeptors Ste2 und die putative Metalloendopeptidase Yil108w wurden gefunden. Auffällig oft treten Proteine auf, die an der Ubiquitinierung von Proteinen und dem damit verbundenen Proteinabbau beteiligt sind (Pre8, Rpn1, Rpn2, Rpt3, Rpt6, Rsp5, Rtt101, Ubp3, Ufd4), sowie Proteine, die an Prozessen des Proteintransports im intrazellulären Membransystem teilhaben (Cop1, Eno2, Lsp1, Pil1, Ret2, Sec21, Sec27, Sec28, Vps1, Vps35).

Tabelle 24: In der Co-IP von Yvc1 gereinigte Proteine

Protein	Funktion/biologischer Prozess	Lokalisation	MW [kDa]	Anzahl der Peptide		
				Yvc1 (1)	Yvc1 (2)	-AK
Ald6	Aldehyd-Dehydrogenase	Cytoplasma, Mitochondrium	54	3	0	2
Apa1	Nukleosid-Katabolismus	Cytoplasma, Kern	36	5	8	7
Bms1	GTPase, Ribosomen-Biogenese	Cytoplasma, Kern	136	2	4	0
Bni1	Profilin-Bindung	Plasmamembran	220	0	2	0
Cdc19	Glykolyse, Pyruvat-Metabolismus	Cytoplasma	55	102	107	101
Cdc28	Ser/Thr-Proteinkinase	Cytoplasma	34	7	5	5
Cdc48	ATPase	Cytoplasma, Kern	92	19	22	15
Chs1	Chitin-Synthase	Plasmamembran	130	0	3	0
Cop1	retrograder Vesikel-vermittelter Transport	Vesikel	136	16	42	20
Cys4	Cystein-Biosynthese	Cytoplasma	56	3	2	2
Eft1	Translationselongation	Cytoplasma	93	82	95	89
Emw1	Kontrolle der Zellwand-Integrität	Cytoplasma, Kern	102	6	8	0
Eno2	Glykolyse, Glukoneogenese, Regulation der Vakuolenfusion	Cytoplasma (teilw. an Vakuole gebunden)	47	21	10	15
Erg26	Ergosterol-Biosynthese	ER-Membran	39	7	3	6
Erg3			43	4	8	6
Fas1	Fettsäure-Biosynthese	Cytoplasma, Mitochondrium	229	33	46	40
Fas2			207	18	23	17
Fba1	Glykolyse, Glukoneogenese	Cytoplasma, Mitochondrium	40	7	3	5
Fks1	Zellwand-Synthase	Plasmamembran	215	36	59	44
Fre1	Kupfer- und Eisenreduktase	Plasmamembran	79	7	12	7
Fun12	Translationsinitiation	Cytoplasma	112	0	8	4

Gas1	Glukanosyltransferase	Plasmamembran, Mitochondrium	60	2	2	0
Gcd7	Translationsinitiation	Cytoplasma, Mitochondrium	43	2	3	2
Gcn1	Translationsregulation	Cytoplasma	297	9	24	10
Gcn20	ATPase, Translationselongation	Cytoplasma	85	3	2	2
Gef1	spannungsgesteuerter Chloridkanal	Plasmamembran, Golgi, ER	88	0	2	0
Gus1	Glutamat-tRNA-Ligation	Cytoplasma	81	11	6	8
Hgh1	unbekannt	Cytoplasma	45	0	2	0
Hom3	Aspartatkinase	Cytoplasma	58	0	2	0
Hxt2			60	0	6	0
Hxt3	Hexose-Transporter	Plasmamembran	63	6	11	7
Hxt7			63	10	15	9
Hyp2	Translationsinitiation, Translationselongation	Cytoplasma	17	6	5	4
Kin2	Ser/Thr-Proteinkinase	Plasmamembran	128	0	2	0
Lsp1	Endozytose	Eisosom	38	11	12	4
Mes1	Methionin-tRNA-Ligation	Cytoplasma	86	10	7	4
Nip1	Translationsinitiation	Cytoplasma	93	4	2	0
Npa3	Kerntransport	Cytoplasma	43	0	2	0
Oca1	Protein-Tyrosin-Phosphatase	Cytoplasma	27	2	0	0
Pbp1	Translationsregulation	Cytoplasma, Kern, Mitochondrium	79	0	2	0
Pby1	unbekannt	Cytoplasma	86	2	0	0
Pdr5	ABC-Transporter	Plasmamembran	170	7	16	12
Pfk1	Glykolyse	Cytoplasma, Mitochondrium	105	36	46	45
Pho88	Phosphat-Transporter	unbekannt	21	9	11	8
Pil1	Lipid-Bindung, Endozytose	Cytoplasma, Plasmamembran	38	17	17	13
Pre8	Untereinheit des Proteasoms	Cytoplasma	27	0	2	0

Prs4	Histidin-, Purin-, Pyrimidin-Biosynthese	Cytoplasma	36	3	0	0
Prt1	Translationsinitiation	Cytoplasma	88	3	0	0
Psa1	Zellwand-Biosynthese	Cytoplasma	39	11	0	0
Ret2	retrograder Proteintransport	Vesikel	61	0	2	0
Rho3	GTPase-Aktivität	Cytoplasma	25	2	4	2
Rnr1	Desoxyribonukleotid-Biosynthese	Cytoplasma	100	16	14	13
Rpg1	Translationsinitiation	Cytoplasma	110	17	10	4
Rpn1	Ubiquitin-abhängiger Proteinabbau	Cytoplasma, Kern,	109	9	16	13
Rpn2			104	10	14	2
Rpt3			48	0	4	3
Rpt6			45	4	2	2
Rsp5	Ubiquitin-Protein-Ligase	Cytoplasma, Kern	92	13	12	8
Rsr1	GTPase, Signaltransduktion	Plasmamembran	30	3	3	0
Rtt101	Ubiquitin-Protein-Transferase	Cytoplasma, Kern	99	0	2	0
Sch9	Ser/Thr-Proteinkinase	Cytoplasma, Kern, Vakuolenmembran	92	8	3	7
Sec21	Vesikel-vermittelter Proteintransport	Vesikel	105	6	19	7
Sec27			99	5	15	4
Sec28			34	2	3	2
Sla1	zelluläre Morphogenese	Cytoplasma, Kern	136	2	7	4
Sla2			109	9	12	9
Snq2	ABC-Transporter	Plasmamembran	169	24	40	34
Ste2	alpha-Faktor-Pheromonrezeptor	Plasmamembran	48	0	2	0
Sup35	Translationstermination	Cytoplasma	77	6	3	2
Tcb1	ER-Plasmamembran-Verbindung, PI4P-Level-Kontrolle	ER-Membran	134	4	6	4
Tcb2			133	0	3	0
Tcb3			171	6	16	5
Tdh3	Glykolyse, Glukoneogenese	Cytoplasma	36	38	36	34

Ths1	Threonin-tRNA-Ligation	Cytoplasma	85	2	4	3
Tif34	Translationsinitiation	Cytoplasma	39	4	2	3
Tif4631			107	10	19	9
Tpi1	Glykolyse	Cytoplasma, Mitochondrium	27	7	0	6
Trm732	tRNA-Methylierung	Cytoplasma	164	0	3	0
Trp3	Tryptophan-Biosynthese	Cytoplasma	53	14	15	13
Tys1	Tyrosin-tRNA-Ligation	Cytoplasma	44	2	0	0
Ubp3	Ubiquitin-spezifische Protease	Cytoplasma	102	11	9	5
Ufd4			168	3	4	2
Vma1	Azidifizierung der Vakuole, Calcium-Homöostase	Vakuole (Membran)	119	35	37	36
Vma8			29	5	7	6
Vps1	retrograder Proteintransport, Proteintransport zur Vakuole	Vakuolenmembran, Endosom, Peroxisom	79	6	6	0
Vps35			109	0	2	0
Yil108w	putative Metalloendopeptidase	Cytoplasma	77	0	2	0

5. Diskussion

TRP-Kanäle dienen als zelluläre Sensoren in einer Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen, Geweben und Organismen. Außer in Pflanzen kommen sie in Eukaryoten hoch konserviert vor und erfüllen ein breites Spektrum an Aufgaben im Zusammenhang mit der Erfassung von Umweltfaktoren, wobei es sich um die Umwelt des ganzen Organismus oder die direkte Umgebung einer einzelnen Zelle handeln kann (Clapham, 2003; Venkatachalam *et al.*, 2014). Mutationen in TRP-Kanälen des Menschen sowie ihre Fehlregulation sind mit einer Vielfalt an Erkrankungen assoziiert (Nilius und Szallasi, 2014), wodurch ihre Erforschung immer mehr in den Fokus der Wissenschaft rückt. Im Modellorganismus *S. cerevisiae* wurde bisher ein einziger TRP-homologer Kanal identifiziert (Palmer *et al.*, 2001). Die nähere Untersuchung seiner Funktion und Regulation war das Ziel dieser Arbeit.

1.1. Yvc1 ist ein Substrat für die Modifikation durch Smt3

Die SUMOylierung ist eine posttranslationale Modifikation von Proteinen, bei der SUMO, ähnlich der Ubiquitinierung, ATP-abhängig über eine Enzymkaskade (Abbildung 7) kovalent und reversibel an einen Lysinrest des Substrats gebunden wird. Die Suche nach Interaktionspartnern von Yvc1 mit einem Hefe-Zwei-Hybrid-System in einer vorangegangenen Studie hatte ergeben, dass der Kanal mit der E3-Ligase Nfi1 interagiert. Weitere Untersuchungen zeigten außerdem Interaktionen zwischen den terminalen Domänen von Yvc1 und weiteren SUMO-Zyklus-Komponenten, unter anderem Smt3 (SUMO) und Ubc9 (E2-Enzym). Diese identifizierten Interaktionspartner deuteten darauf hin, dass Yvc1 als Substrat der SUMOylierung fungieren könnte, was zu der Hypothese führte, die Regulierung des Kanals könne über die SUMOylierung erfolgen. *In vitro* SUMOylierungsassays mit terminalen Yvc1-Fragmenten als Substrate unterstützten diese Annahme (Chang, 2010). Eine *in silico* Untersuchung der Aminosäuresequenz von Yvc1 mit dem *SUMOplot Analysis* Programm von Abgent (<http://www.abgent.com/sumoplot>) lieferte vier potentielle SUMOylierungsstellen in diesem Protein (K212, K231, K403, K612).

5.1.1. SUMOylierung von Yvc1 *in vitro* und *in vivo*

In dieser Arbeit wurde die bereits beschriebene *in vitro* SUMOylierung von Yvc1-N (AS 1-224) und Yvc1-N₀ (AS 1-237) sowie von Yvc1-C (AS 538-675) und Yvc1-C₀ (AS 459-675) bestätigt. Alle verwendeten Substrate führten zu SUMOylierungsprodukten mit erhöhter Molekularmasse (Abbildung 14). Aus der Optimierung des Assays ging hervor, dass

bei einer Inkubationszeit von 16 min die maximale Menge an EinfachSUMOylierung bei gleichzeitig niedriger Menge an MehrfachSUMOylierung zu detektieren ist und dass die eingesetzte Menge an E1- und E2-Enzym keinen limitierenden Faktor in den SUMOylierungsansätzen darstellt (Abbildung 15, Abbildung 16). Weiterhin wurde die SUMOylierung des C-Terminus von Yvc1 durch eine Erhöhung des pH-Werts optimiert (Abbildung 17). Aufgrund der verbesserten Durchführung der *in vitro* SUMOylierung war es möglich, die SUMOylierungsprodukte mit kolloidalem Coomassie zu visualisieren und diese in Zusammenarbeit mit dem MPI in Göttingen massenspektrometrisch zu analysieren (Abbildung 18). Die vor der Massenspektrometrie durchgeführte tryptische Spaltung erfolgt spezifisch am Carboxyende der Aminosäuren Arginin und Lysin. Die SUMOylierung eines Lysinrests führt zum einen dazu, dass keine Spaltung an dem modifizierten Lysinrest erfolgt, und zum anderen zu einer Massenerhöhung aufgrund des vom Smt3 stammenden Peptids (EQIGG). Durch diese charakteristischen Merkmale wurden die modifizierten Peptide des Substrats gefunden und die SUMO-Akzeptorlysine identifiziert (Tabelle 20). Die nachfolgende systematische Untersuchung von KR-Mutanten erlaubte es schließlich diese SUMOylierungsstellen zu verifizieren. Von drei in der massenspektrometrischen Analyse identifizierten SUMO-Akzeptorlysinen im N-Terminus von Yvc1 (K73, K212, K231) wurden K212 und K231 als SUMOylierungsstellen eindeutig bestätigt (Abbildung 20 - Abbildung 23). Diese Lysinreste decken sich auch mit der *in silico* Vorhersage des *SUMOplot Analysis* Programms. Im C-Terminus von Yvc1 wurden vier modifizierte Lysinreste identifiziert (K547, K599, K634, K671). K547 und K599 könnten laut den Daten der *in vitro* SUMOylierungsassays (Abbildung 25, Abbildung 26) als bevorzugt verwendete SUMOylierungsstellen dienen. Da jedoch ein additiver Effekt der Doppelmutante von K547 und K599 ausbleibt und kein Yvc1-C-KR-Konstrukt dieser Arbeit zu einem vollständigen Verlust der SUMOylierung führte, kann man davon ausgehen, dass es in Yvc1-C je nach Verfügbarkeit alternative SUMOylierungsstellen gibt. Durch das Setzen der Mutationen sind sterische Effekte nicht auszuschließen, die sich auf die Konformation des Fragments und damit auf die Exposition der verschiedenen Lysinreste auswirken. Von den vier in dieser Arbeit identifizierten SUMO-Akzeptorlysinen entspricht nur IK²¹²DD genau dem charakteristischen SUMOylierungsmotiv $\Psi KxE/D$, in dem Ψ für eine große, aliphatische Aminosäure und x für eine beliebige Aminosäure steht. Den restlichen drei SUMOylierungsstellen (LK²³¹AP, IK⁵⁴⁷YN, LK⁵⁹⁹LQ) fehlt die saure Aminosäure am C-terminalen Ende des Motivs. Die SUMOylierung von humanen Proteinen und Hefeproteinen an Lysinresten, die nicht dem klassischen Motiv entsprechen, wurde schon mehrmals beschrieben. In *S. cerevisiae* werden beispielsweise Proteine wie Pol30 und Sod1 an zwei Lysinresten SUMOyliert, von denen eine Stelle dem Konsensusmotiv entspricht und eine nicht (Rangasamy *et al.*, 2000; Hoege *et al.*, 2002;

Chung *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004). Damit wird deutlich, dass trotz des häufigen Gebrauchs des Konsensusmotivs für die SUMOylierung auch Lysinreste in einem anderen Sequenzkontext als SUMO-Akzeptorlysine dienen können.

Es fällt immer häufiger auf, dass Proteine, die schon seit Jahren charakterisiert werden, erst sehr spät als SUMO-Substrate identifiziert werden (Johnson, 2004). Der Grund dafür ist der problematische Nachweis der SUMOylierung von Proteinen *in vivo*. Zum einen ist die Modifikation durch SUMO ein dynamischer Prozess und somit nicht stabil. Während der Zelllyse kommt es zur schnellen DeSUMOylierung der Proteine durch die Proteasen Ulp1 und Ulp2, was nur durch die Verwendung von denaturierenden Puffern und Proteaseinhibitoren unterbunden werden kann (Lewicki *et al.*, 2015; Xiao *et al.*, 2015; Oeser *et al.*, 2016). Zum anderen erfolgt die SUMOylierung eines Substrats in einigen Fällen nur unter bestimmten Bedingungen. Cyc8 und Tup1 in *S. cerevisiae* sind als Komplex für die Transkriptionsrepression von Hunderten von Genen verantwortlich und beide Proteine werden transient nach einem hyperosmotischen Schock SUMOyliert (Lewicki *et al.*, 2015; Oeser *et al.*, 2016). Pol30 liegt nur während der S-Phase des Zellzyklus in SUMOylierter Form vor (Hoegge *et al.*, 2002). Die strikte Regulation der SUMOylierung macht auch Sinn, da die Effekte der Modifikation auf das jeweilige Substrat nicht durchgehend notwendig sind und deshalb während der restlichen Zeit unterbunden werden. Des Weiteren ist meist nur ein geringer Bruchteil eines Zielproteins zum selben Zeitpunkt modifiziert, was den Nachweis von nicht abundanten Proteinen als SUMO-Substrate sehr schwierig macht (Johnson, 2004; Xiao *et al.*, 2015).

Yvc1 liegt in einer *S. cerevisiae*-Zelle mit einer Kopienzahl zwischen 760 und 1300 Molekülen in sehr geringer Menge vor (Ghaemmaghami *et al.*, 2003), weshalb die Überexpression von *YVC1* für die Detektion der SUMOylierung *in vivo* (Abbildung 28) erforderlich war. Die Überexpression von *6HIS-SMT3* und *UBC9* wurde benötigt um zum einen die Smt3-Konjugate aus dem Hefelysat an Ni-NTA-Agarose zu immobilisieren und zum anderen die SUMOylierungsrate der Substrate zu erhöhen. Da sich ein SUMOylierungsprodukt von Yvc1 *in vivo* nur in einem Ulp2-defizienten Stamm detektieren lässt, spielt diese Protease vermutlich für die DeSUMOylierung von Yvc1 eine Rolle, auch wenn für sie bisher nur eine Lokalisation im Kern beschrieben wurde (Johnson, 2004). Die Modifikation erfolgt *in vivo* sehr wahrscheinlich durch die kovalente Bindung von zwei Smt3-Molekülen an Yvc1, was sich durch die Erhöhung der Molekularmasse um etwa 40 kDa bemerkbar macht (Abbildung 28). Die Analyse der KR-Mutanten deutet darauf hin, dass die SUMOylierung an zwei verschiedenen Lysinresten erfolgt. Sobald mehr als zwei Lysinreste mutiert sind (Yvc1 K212, 547, 599R und Yvc1 K212, 231, 547, 599R) lässt sich das SUMOylierungsprodukt

nicht mehr detektieren (Abbildung 29). Ist nur der Lysinrest K212 mutiert oder im Fall der Doppelmutante Yvc1 K212, 231R sind immer noch mindestens zwei Lysinreste vorhanden, die modifiziert werden können. Eine eindeutige Aussage darüber, welche Lysinreste modifiziert sind und ob es sich um EinfachSUMOylierungen zweier Lysinreste oder die ZweifachSUMOylierung eines einzelnen Lysinrests handelt, kann man anhand dieser Daten jedoch nicht treffen. Des Weiteren ist nicht auszuschließen, dass zwei dieser Lysinreste bevorzugt SUMOyliert werden und die anderen zwei als alternative SUMO-Akzeptorlysine fungieren.

TRP-Kanal-Orthologe sind in Genomen von 18 Pilzarten vorhanden. Neben Yvc1-Proteinen in verschiedenen Arten der Gattung *Saccharomyces* sind TRP-Kanäle auch in *Kluyveromyces lactis* (TRPY2) und *Candida albicans* (TRPY3) vorhanden. TRPY2 und TRPY3 können in *S. cerevisiae* heterolog exprimiert und synthetisiert werden und ersetzen *in vitro* und *in vivo* die Funktion von Yvc1 (Zhou *et al.*, 2005). *Saccharomyces castellii* ausgenommen, weisen die Arten der Gattung *Saccharomyces* fast identische AS-Sequenzen auf, andere Gattungen dagegen haben weniger als 50 % Sequenzidentität zu Yvc1 (Chang, 2010). Die Anwesenheit der TRP-Kanal-Orthologe in Pilzen weist auf einen evolutionären Selektionsvorteil und damit auf eine wichtige physiologische Bedeutung hin (Zhou *et al.*, 2005).

Abbildung 39 A zeigt den phylogenetischen Baum der TRP-Kanal-Sequenz aus drei nah verwandten Arten (*sensu stricto*, *S. cerevisiae*, *S. mikatae*, *S. bayanus*) und einer weiter entfernten Art (*sensu lato*, *S. castellii*) der Gattung *Saccharomyces* sowie des TRPY2 aus *Kluyveromyces lactis* und TRPY3 aus *Candida albicans*. In Abbildung 39 B ist der Vergleich der Sequenzen des N- und C-Terminus dieser TRP-Kanäle dargestellt. Die identifizierten Smt3-Akzeptorlysine K212, K231 und K547 sind in den Pilzen der Gattung *Saccharomyces* konserviert, K231 ist sogar in *Candida albicans* vorhanden. Der Lysinrest K599 ist nur in den drei näher verwandten Arten konserviert und ist in *S. castellii* durch einen Glutaminrest ersetzt.

Von Zhao und Kollegen wurde 2014 die Software "GPS-SUMO 1.0 Prediction of SUMOylation sites & SUMO-interaction motifs" entwickelt, die es möglich macht, neben der kovalenten Modifikation durch SUMO auch die nicht-kovalenten Interaktionen eines Proteins mit SUMO an SUMO-interagierenden Motiven (SIM) vorherzusagen (Zhao *et al.*, 2014). Ein SIM besteht im Allgemeinen aus einem hydrophoben Kern, welcher C- oder N-terminal von sauren Aminosäureresten und/oder Serin begrenzt wird (Minty *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2004). Für die Proteinsequenz von Yvc1 werden drei SIMs vorhergesagt (Abbildung 41).

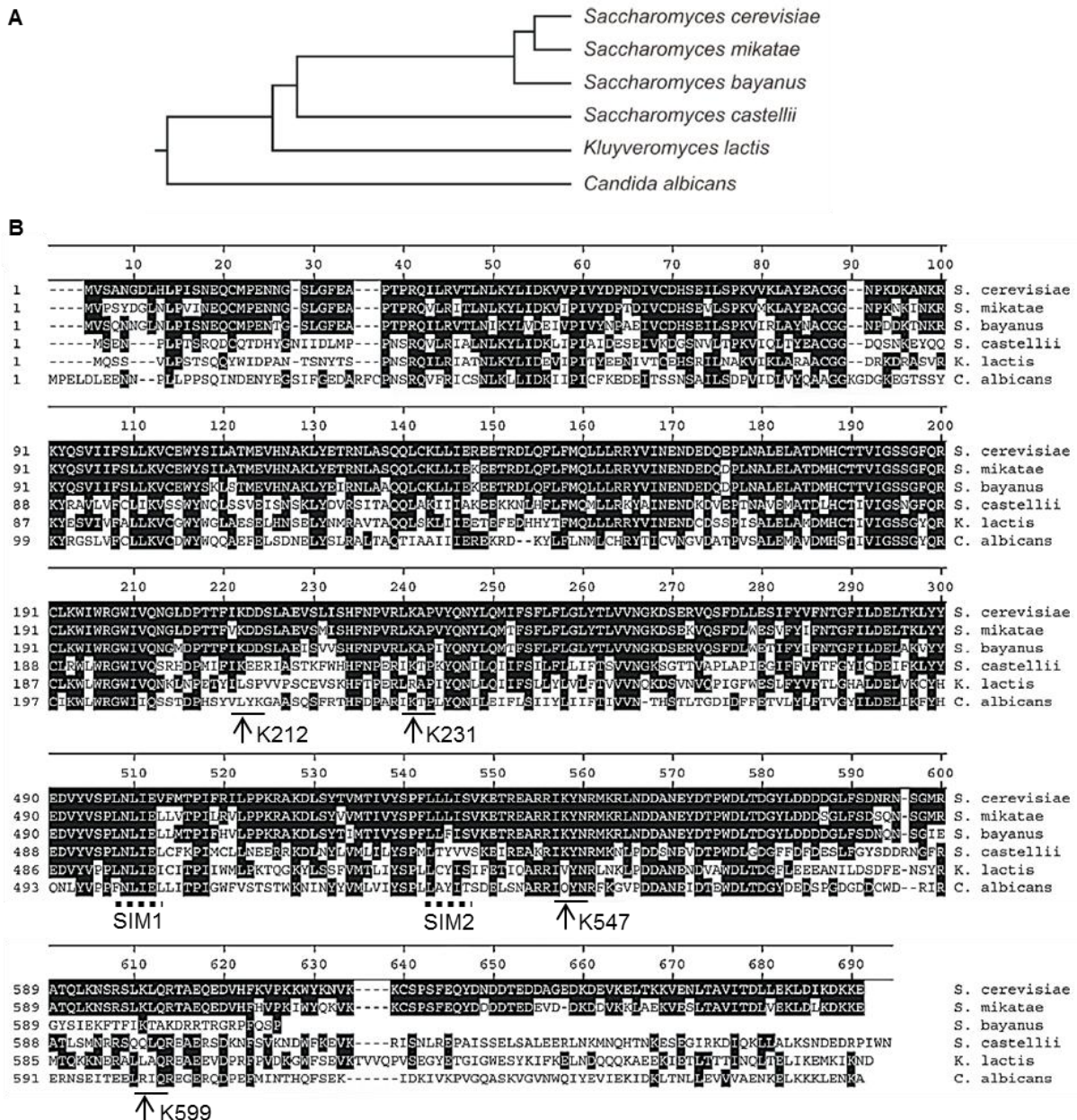


Abbildung 39: Sequenzvergleich der TRP-Kanal-Familie in Pilzen (modifiziert nach Chang, 2010). **A.** Der phylogenetische Baum zeigt die Sequenzähnlichkeit der Yvc1-homologen Kanäle in verschiedenen Pilzarten. **B.** Sequenzabgleich der terminalen Domänen der Yvc1-homologen Kanäle in verschiedenen Pilzarten. Identische Aminosäurereste sind schwarz dargestellt. Die in dieser Arbeit identifizierten Smt3-Akzeptorlysine sind durch Pfeile angegeben und die entsprechenden Motive sind unterstrichen. Die mit dem Programm GPS-SUMO 1.0 vorhergesagten SIMs im C-Terminus sind anhand der gestrichelten Linie zu erkennen.

Ein potentielles SIM befindet sich unmittelbar vor der fünften Transmembrandomäne (AS 366-370, LVILK) und zwei SIMs werden in der C-terminalen Domäne prognostiziert (SIM1 und SIM2, Abbildung 39 B). SIM1 (AS 497-501, LNLIE) ist in allen hier aufgeführten

Pilzarten konserviert, wobei der erste Leucinrest (L) des Motivs in *C. albicans* durch den ebenfalls hydrophoben Phenylalaninrest (F) ersetzt ist. SIM2 (AS 532-536, LLLIS) ist in den *sensu stricto*-Arten von *Saccharomyces* vorhanden und auch hier ist in *S. bayanus* ein Leucinrest durch einen Phenylalaninrest ersetzt. Auffällig ist, dass sich die potentiellen SIMs in der Nähe der Porenregion befinden (Abbildung 41). Die Funktion der SIMs könnte darin liegen, die SUMOylierung des C-Terminus an den Lysinresten K547 und K599 zu vermitteln. Im Fall der Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) ist die nicht-kovalente Bindung von SUMO an ein SIM für eine erfolgreiche SUMOylierung des Proteins sogar notwendig (Takahashi *et al.*, 2005). Die Interaktion eines kovalent gebundenen Smt3-Moleküls mit einem SIM könnte außerdem zu einer Konformationsänderung von Yvc1 führen und dadurch seine Funktion beeinflussen. Eine solche Regulation wurde ebenfalls für TDG beschrieben (Baba *et al.*, 2006; Kerscher, 2007). Eine weitere naheliegende Funktion der SIMs wäre die Rekrutierung von anderen SUMOylierten Proteinen und die Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen (Kerscher, 2007). Ein bekanntes Beispiel für eine solche Funktion ist die Bildung von PML-Körperchen im Kern. Dabei handelt es sich um Proteinkomplexe, die an der Transkriptionsregulation, DNA-Reparatur, Apoptose und einigen weiteren essentiellen Zellprozessen beteiligt sind. PML-Proteine bilden dabei das Grundgerüst der PML-Körperchen, sie werden an mehreren Stellen SUMOyliert und besitzen zudem mehrere SIMs. Durch Interaktionen der an PML kovalent gebundenen SUMO-Proteine mit SIM-enthaltenden Proteinen und der SIMs mit SUMOylierten Proteinen entstehen große Proteinkomplexe, die mehr als 40 Proteine enthalten können (Shen *et al.*, 2006).

5.1.2. Funktionelle Untersuchungen der SUMOylierung von Yvc1

Im Rahmen dieser Arbeit wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass Yvc1 ein Substrat für Smt3 darstellt und durch systematische Untersuchungen von KR-Mutanten wurden die Smt3-Akzeptorlysine K212 und K231 im N-Terminus sowie K547 und K599 im C-Terminus identifiziert (Abbildung 41). Da durch eine Modifikation durch SUMO die Funktion, Stabilität und subzelluläre Lokalisation eines Proteins beeinflusst werden kann (Melchior, 2000), wurde untersucht, welche funktionellen Effekte die SUMOylierung von Yvc1 hat.

Einfluss der SUMOylierung auf die Lokalisation von Yvc1

Es wurde schon mehrmals beschrieben, dass sich durch SUMOylierung die subzelluläre Lokalisation der Substrate verändert. Das erste entdeckte SUMO-Substrat RanGAP ist in nicht-SUMOylierter Form im Cytoplasma verteilt, während das modifizierte Protein mit den Kernporen kolokalisiert (Matunis *et al.*, 1998). Daneben wurde sowohl für Säuger (Finkbeiner

et al., 2011) als auch für Hefe beschrieben, dass die SUMOylierung am Transport von Proteinen zwischen Kern und Cytoplasma beteiligt ist (Stade *et al.*, 2002; Panse *et al.*, 2006; Rothenbusch *et al.*, 2012). Die SUMO-Modifikation von membranständigen Kanälen und Rezeptoren kann außerdem deren Verbleib in der Plasmamembran beeinflussen. Die SUMOylierung der Untereinheit GluK2 von Kainatrezeptoren führt zur Internalisierung des Rezeptors mittels Endozytose (Konopacki *et al.*, 2011) während die SUMOylierung des Kanals TRPM4 eine Internalisierung unterbindet und diese erst bei DeSUMOylierung des Kanals stattfindet (Kruse *et al.*, 2009). Yvc1 ist im Wildtyp von *S. cerevisiae* in der Vakuolenmembran lokalisiert. GFP-Fusionsproteine von Einzelmutanten und einer Vierfachmutante der zuvor identifizierten Smt3-Akzeptorlysine (K212, K231, K547, K599) wurden *in vivo* mittels Fluoreszenzmikroskopie auf ihre Lokalisation hin untersucht und mit dem Wildtyp verglichen. Keine der Mutationen führte zu einer Fehllokalisierung des Kanals (Abbildung 30), woraus sich schließen lässt, dass die SUMOylierung an diesen vier Lysinresten die Lokalisation des Proteins nicht beeinflusst und dass die eingebrachten KR-Mutationen nicht zu solch dramatischen Änderungen des Kanals führen, die seinen fehlerhaften Einbau zur Folge haben.

Aktivierung von Yvc1 nach einem hyperosmotischen Schock

Als Reaktion auf einen hyperosmotischen Schock wird in *S. cerevisiae*-Zellen Ca^{2+} ins Cytosol freigesetzt. Als interner Speicher des freien Ca^{2+} dient dabei die Vakuole (Dunn *et al.*, 1994) und früheren Studien zufolge ist Yvc1 der einzige Kanal, der diese Freisetzung vermittelt (Bertl und Slayman, 1990; Palmer *et al.*, 2001; Denis und Cyert, 2002). Unter Verwendung des transgenen Photoproteins Aequorin in luminometrischen Assays kann die Änderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in *S. cerevisiae*-Zellen *in vivo* gemessen werden (Denis und Cyert, 2002). Die ausbleibende Ca^{2+} -Antwort auf einen hyperosmotischen Schock in einem $\Delta yvc1$ -Stamm bestätigt die beschriebene Abhängigkeit der Reaktion von diesem TRP-homologen Kanal (Abbildung 31 A). Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Mutation der SUMO-Akzeptorlysine K212, K547 und K599 zu Argininresten zu einer erhöhten Ca^{2+} -Freisetzung im Vergleich zum Wildtyp führt, sei es als Einzelmutationen oder als Dreifachmutation (Abbildung 31 A und C). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass eine SUMOylierung an diesen drei Lysinresten die Aktivität des Kanals hemmt. Die Mechanismen für diesen Effekt können vielfältiger Natur sein. Zum einen kann die SUMOylierung zu Konformationsänderungen, möglicherweise auch im Zusammenspiel mit den vorhergesagten SIMs, des Kanals führen, die in einer Verminderung seiner Aktivität resultieren. Die SUMOylierung an den Lysinresten K547 und K599 könnte das potentielle Ca^{2+} -Sensormotiv $^{573}\text{DDDD}^{576}$ (Schreiber und Salkoff, 1997; Palmer *et al.*, 2001;

Su *et al.*, 2009b) maskieren und somit den positiven *feedback*-Mechanismus der Ca^{2+} -abhängigen Ca^{2+} -Aktivierung unterbinden. Des Weiteren wäre eine von SUMO vermittelte Rekrutierung von Interaktionspartnern, die sich auf die Aktivität des Kanals auswirken, denkbar. Interessanterweise zeigt die Mutation des SUMO-Akzeptorlysins K231 einen gegensätzlichen Effekt, die Ca^{2+} -Freisetzung als Reaktion auf einen hyperosmotischen Schock fällt im Vergleich mit dem Wildtyp geringer aus (Abbildung 31 A und C). Eine mögliche Erklärung wäre eine sterische Auswirkung der Mutation, die die Aktivität des Kanals verringert. Eine entgegengesetzte Regulation durch dieselbe Modifikation an verschiedenen Stellen des Proteins ist jedoch auch nicht auszuschließen. Je nachdem wodurch der hemmende Effekt der SUMOylierung an den Lysinresten K212, K547 und K599 verursacht wird, könnte die SUMOylierung am Lysinrest K231 das Gegenteil bewirken. Dabei müssen auch Wechselwirkungen mit anderen posttranslationalen Modifikationen berücksichtigt werden (siehe 5.1.3).

Die Überexpression von *SMT3* im Wildtyp von *S. cerevisiae* führt in luminometrischen Assays zu einer langsameren und niedrigeren Ca^{2+} -Freisetzung als Reaktion auf einen hyperosmotischen Schock (Abbildung 32 A und C). Die höhere Proteinmenge an Smt3 könnte zu vermehrten SUMOylierungszyklen an den Lysinresten K212, K547, K599 führen, deren SUMOylierung wie zuvor gezeigt die Aktivität des Kanals hemmt. Allerdings könnte auch eine durch die gesteigerte SUMOylierung erhöhte Aktivität eines Kanals oder Transporters, der Ca^{2+} aus dem Cytosol befördert, ein Grund dafür sein. Die in der Vakuole lokalisierte Ca^{2+} -ATPase Pmc1, die neben anderen Transportern für die Abreicherung des cytosolischen Ca^{2+} verantwortlich ist, besitzt zum Beispiel in ihrer N-terminalen, cytoplasmatischen Domäne ein SUMOylierungsmotiv (LK⁶⁸TD), das laut *SUMOplot Analysis* Programm mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit SUMOyliert wird. Außerdem dienen auch diverse Proteinkinasen und Phosphatasen als SUMO-Substrate (Wilkinson und Henley, 2010; Wilkinson *et al.*, 2010), deren gesteigerte SUMOylierung zur Regulation von Yvc1 über Phosphorylierung oder zu weiteren Effekten führen könnte, die in einer schnelleren Beseitigung des cytosolischen Ca^{2+} resultieren.

Einfluss der SUMOylierung auf die Stabilität von Yvc1

Es ist bekannt, dass sich die SUMOylierung eines Proteins positiv oder negativ auf seine Stabilität auswirken kann. Da die zum Proteinabbau führende Ubiquitinierung genauso wie die SUMOylierung an Lysinresten stattfindet, kann die SUMOylierung einen Lysinrest maskieren, dadurch den Ubiquitin-abhängigen Proteinabbau verhindern und das Protein damit stabilisieren. Andererseits können durch die SUMOylierung SUMO-abhängige

Ubiquitin-Ligasen rekrutiert werden, die zur Ubiquitinierung des Proteins und zu seiner Degradation führen (Prudden *et al.*, 2007; Perry *et al.*, 2008). Da sich im Fall von Yvc1 und seinen KR-Mutanten keine auffälligen Veränderungen der Proteinmenge in Westernblots (Abbildung 31 B, Abbildung 33 B, Abbildung 34 B) zeigte, kann man davon ausgehen, dass die SUMOylierung keinen Einfluss auf die Stabilität des Kanals hat.

Auswirkungen von Yvc1 auf die Stresstoleranz von S. cerevisiae-Zellen

Die SUMOylierung spielt in allen Eukaryoten eine wichtige Rolle für die Reaktion auf Stress. Bei verschiedenen Arten von zellulärem Stress wurde schon oftmals ein Anstieg der SUMO-Konjugate beobachtet. In Säugerzellen kommt es beispielsweise bei oxidativem Stress, Hyper- und Hypothermie zu einer gesteigerten SUMOylierung verschiedener Proteingruppen (Manza *et al.*, 2004; Golebiowski *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2012a). In Pflanzen ist diese SUMO-Stressantwort unter anderem mit der Reaktion auf Ethanol, extreme Temperaturen und Trockenheit sowie mit der Salztoleranz und oxidativem Stress assoziiert (Kurepa *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2015). Im einzelligen Organismus *S. cerevisiae* wurde die Beteiligung von Smt3 an der Stressantwort schon mehrmals beschrieben. Durch Sorbitol oder Salze verursachter osmotischer Stress, Hitze- sowie Ethanolstress, oxidativer und genotoxischer Stress führen zur schnellen Akkumulation von SUMO-Konjugaten (Zhou *et al.*, 2004; Tempe *et al.*, 2008; Lewicki *et al.*, 2015). Offensichtlich wird die betroffene Zelle durch die vermehrte SUMOylierung bestimmter Proteine vor größeren Schäden geschützt, die genauen Zielproteine der einzelnen SUMO-Stressantworten sind jedoch nur zum Teil bekannt und die Mechanismen dahinter noch nicht aufgeklärt.

Eine weitere wichtige Komponente der zellulären Stressantwort bildet das Ca^{2+} -Signal-Netzwerk von Eukaryoten. Ca^{2+} dient dabei als Signalmolekül, das an Ca^{2+} -bindende Komponenten von Signalwegen bindet, was entweder zur Anpassung oder zum Zelltod führt (Bootman, 2012). Dabei ist die Intensität, die Lokalisation und die Dauer der Ca^{2+} -Signale entscheidend dafür, welche Anpassungsmechanismen in einer Zelle erfolgen. Ein Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration als Reaktion auf verschiedene Bedingungen wurde in *S. cerevisiae* bereits beschrieben und näher untersucht. Ca^{2+} kann dabei entweder durch den Transporter Cch1/Mid1 von außerhalb der Zelle ins Cytosol gelangen oder aus dem intrazellulären Speicher, der Vakuole, über Yvc1 freigesetzt werden.

Im Fall von osmotischem Stress werden zwei unterschiedliche Mechanismen verwendet, je nachdem ob es sich um einen hypo- oder hypertonen Schock handelt. Rigamonti und Kollegen zeigten 2015, dass die Ca^{2+} -Antwort bei hypoosmotischem Stress Yvc1-unabhängig abläuft (Batiza *et al.*, 1996; Rigamonti *et al.*, 2015), wohingegen der

cytoplasmatische Ca^{2+} -Anstieg nach einem hyperosmotischen Schock hauptsächlich von Yvc1 und nur zu einem geringen Teil von Cch1/Mid1 vermittelt wird. Die geringfügige Beteiligung von Cch1/Mid1 wird dabei als Aktivierungsmechanismus von Yvc1 über Ca^{2+} erklärt (Denis und Cyert, 2002; Matsumoto *et al.*, 2002). Denis und Cyert konnten außerdem zeigen, dass die Überexpression von *YVC1* zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Ca^{2+} aber nicht Mg^{2+} führt und damit den Zusammenhang des Proteins mit der Ca^{2+} -Homöostase belegen (Denis und Cyert, 2002). Der Effekt der *YVC1*-Überexpression konnte in diesem Zusammenhang in dieser Arbeit jedoch nicht bestätigt werden. Trotz der Verwendung derselben Bedingungen wie in der Literatur hinsichtlich des Überexpressionsvektors, der getesteten Ca^{2+} -Konzentrationen und desselben Stammhintergrundes eines S288C-Derivates, wurden keine Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der *YVC1*-Deletionsmutante beobachtet (Abbildung 35). Aufgrund dieser Tatsache lässt sich auch keine Aussage darüber treffen, ob die SUMOylierungs-Mutanten einen Einfluss auf das Wachstum in Anwesenheit hoher Ca^{2+} -Konzentrationen haben. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit auch die Anpassung von *S. cerevisiae*-Zellen an osmotischen Stress in Abhängigkeit von der Proteinmenge an Yvc1 und der SUMOylierbarkeit des Kanals untersucht. Nach Applikation von hyperosmotischem Stress durch NaCl oder Sorbitol erfolgt eine Yvc1-vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus der Vakuole. Das Ca^{2+} -Signal hat sehr wahrscheinlich die Funktion über Calmodulin und die Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin Anpassungsmechanismen zu aktivieren, die bisher jedoch nicht bekannt sind. Die fehlende Ca^{2+} -Antwort im Fall der *YVC1*-Deletion oder eine erhöhte Ca^{2+} -Antwort der KR-Mutanten (Abbildung 31) hat jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen in Anwesenheit von NaCl oder Sorbitol (Abbildung 33). Zu den Anpassungsmechanismen auf hyperosmotischen Stress gehört ein temporäres Anhalten des Zellzyklus, eine den Bedingungen entsprechende Regulation der Transkription und Translation und eine verstärkte Synthese und Speicherung des Osmolyts Glycerin. Diese Mechanismen werden hauptsächlich über den *high osmolarity glycerol* (HOG)-Signalweg in Gang gesetzt, der bereits im Detail untersucht wurde und weitgehend aufgeklärt ist (Hohmann, 2002; Westfall *et al.*, 2004; Maayan und Engelberg, 2009; Saito und Posas, 2012). Die erhöhte Osmolarität wird dabei von den Sensoren Sln1 oder Sho1 erkannt, die das Signal anschließend über zwei verschiedene MAP (*mitogen activated protein*)-Kinase-Kaskaden weiterleiten. Die beiden Signalwege laufen an der MAPKK Pbs2 zusammen, die wiederum Hog1, das Schlüsselenzym dieser Stressantwort, aktiviert. Hog1 ist eine MAP-Kinase, die nach Aktivierung einerseits in den Kern transportiert wird, um die Transkription und den Zellzyklus zu regulieren, andererseits aber auch cytoplasmatische Zielproteine hat und somit auf verschiedenen Wegen zur Anpassung der Zellen beiträgt. Der intakte HOG-Signalweg könnte die Defizite der Ca^{2+} -Antwort

kompensieren und eine Erklärung dafür sein, dass keine Abhängigkeit des Wachstums von der Aktivität von Yvc1 beobachtet werden konnte.

Während der Fermentation sind *S. cerevisiae*-Zellen erhöhten Ethanol-Konzentrationen ausgesetzt und man konnte beobachten, dass die Zugabe von Ca^{2+} zum Medium die Toleranz gegenüber Ethanolstress erhöht (Nabais *et al.*, 1988; Ciesarova *et al.*, 1996). Ein durch Ethanol verursachter, cytosolischer Ca^{2+} -Anstieg wurde beobachtet und wird ausschließlich durch die Aktivität von Cch1/Mid1 vermittelt (Courchesne *et al.*, 2011). Weitere Stressbedingungen, die zur Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration führen, wurden in früheren Studien auf ihre Ca^{2+} -Quelle hin untersucht. Im Fall von ER-Stress (Bonilla und Cunningham, 2003), während der Anpassung an Kälte oder Eisenüberschuss (Peiter *et al.*, 2005) sowie beim Anstieg des pH-Wertes im Medium (Viladevall *et al.*, 2004) wird extrazelluläres Ca^{2+} durch Cch1/Mid1 ins Cytosol transportiert und intrazelluläre Speicher sind nicht beteiligt. Zwei der Bedingungen, die in der Literatur als Yvc1-unabhängig beschrieben sind (Peiter *et al.*, 2005; Courchesne *et al.*, 2011), wurden in dieser Arbeit untersucht. Die Ergebnisse bestätigen, dass für die Adaptation an Ethanolstress und Kältestress weder die Proteinmenge noch die SUMO-abhängige Aktivität von Yvc1 eine Rolle spielt (Abbildung 33). Da auch das Wachstum der untersuchten Stämme bei hohen Temperaturen keine Unterschiede zeigt (Abbildung 33), kann man davon ausgehen, dass Yvc1 an der Anpassung an extreme Temperaturen nicht beteiligt ist.

Reaktive Sauerstoffspezies führen bei oxidativem Stress zu Störungen physiologischer Stoffwechselwege bis hin zur Apoptose und Ca^{2+} -Signalwege sind an der Ausprägung dieser Reaktion wesentlich beteiligt (Ermak und Davies, 2002). Die Intensität von oxidativem Stress in Bezug auf die zugesetzte H_2O_2 -Konzentration entscheidet darüber, wie die Ca^{2+} -Antwort der *S. cerevisiae*-Zelle abläuft. Bei toxischen, aber subletalen Konzentrationen (bis 3 mM H_2O_2) wird Ca^{2+} aus dem extrazellulären Medium und aus der Vakuole verwendet während eine höhere, letale Konzentration ab 3 mM H_2O_2 dazu führt, dass ausschließlich Ca^{2+} aus der Vakuole freigesetzt wird. Im Zusammenhang mit oxidativem Stress wurde gezeigt, dass die Deletion von *YVC1* zu erhöhter Toleranz gegenüber 3 mM bzw. 4 mM H_2O_2 führt (Popa *et al.*, 2010; Chandel *et al.*, 2016) und eine Überexpression des Kanals in einer Erniedrigung der Toleranz gegenüber 4 mM H_2O_2 resultiert (Popa *et al.*, 2010). Die Erklärung dafür ist die durch oxidativen Stress und die damit verbundenen Ca^{2+} -Signale eingeleitete Apoptose, die bei einer Fehlregulation bzw. einem Überschuss an Ca^{2+} im Cytosol stattfindet (Mcconkey und Orrenius, 1997; Madeo *et al.*, 1999; Frohlich und Madeo, 2000; Zhivotovsky und Orrenius, 2011). Die Toleranztests zum Vergleich des Wildtyps und der *YVC1*-Deletionsmutante wurden auf zwei verschiedene Arten durchgeführt. Zum einen erfolgte eine

Inkubation der Zellen in Flüssigmedium, das H_2O_2 enthielt, und eine anschließende Verdünnungsreihe auf Agarplatten ohne Zusätze (Chandel *et al.*, 2016). Zum anderen wurden unbehandelte Zellen auf Agarplatten inkubiert, die mit entsprechenden Konzentrationen an H_2O_2 versetzt waren (Popa *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurden beide Methoden angewendet, die Ergebnisse der Literatur konnten jedoch nicht bestätigt werden (Abbildung 34 und nicht gezeigte Daten). Als Unterschied wäre zunächst die erhöhte Toleranz der Stämme gegenüber H_2O_2 zu nennen. Während in der Literatur eine Konzentration von 4 mM ausreicht, um das Wachstum von Wildtyp-Zellen fast vollständig zu hemmen, erkennt man in dieser Arbeit sogar bei 5 mM H_2O_2 nur einen moderaten Effekt. Es wurde beobachtet, dass *S. cerevisiae*-Zellen die Fähigkeit zur erlernten H_2O_2 -Resistenz entwickeln können, indem sie unter milden osmotischen Stressbedingungen wachsen und anschließend auch nach Generationen eine erhöhte H_2O_2 -Toleranz im Vergleich mit unbehandelten Zellen aufweisen (Guan *et al.*, 2012). Während dieser Arbeit gab es Hinweise darauf, dass das Wachstum im synthetischen Medium zu einem ständig phosphorylierten Hog1 führt, was auf leichten osmotischen Stress hindeutet (Daten nicht gezeigt) und den Effekt der erlernten H_2O_2 -Toleranz erklären könnte. Die Unabhängigkeit der Stressresistenz von der Anwesenheit des TRP-Kanals ist ein weiterer Unterschied zur Literatur, trotz der Deletion von *YVC1* konnte keine erhöhte Toleranz gegenüber H_2O_2 ermittelt werden (Abbildung 34). In dieser Arbeit wurde für dieses Experiment ein anderer Stammhintergrund verwendet (W303) als in der entsprechenden Literatur (S288C), was als Erklärung für die unterschiedlichen Verhaltensweisen dienen könnte. Trotz der hohen Verwandtschaft der beiden Stämme mit einer Sequenzhomologie von 84,5 % (Ralser *et al.*, 2012) gibt es Unterschiede, die sich womöglich phänotypisch auf Stressresistenzen auswirken.

Einige Schwermetalle sind für Organismen lebensnotwendig, wirken bei einem Überschuss jedoch toxisch. Ob die Ca^{2+} -vermittelte Stressantwort bei der Anpassung an zu hohe Konzentrationen an Metallionen erfolgt, wurde von Ruta und seinen Mitarbeitern für Cu^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} und Hg^{2+} untersucht. Lediglich in Anwesenheit von Cd^{2+} und Cu^{2+} konnte ein cytosolischer Ca^{2+} -Anstieg detektiert werden. Der Cd^{2+} -vermittelte Ca^{2+} -Anstieg ist dabei hauptsächlich auf die Aktivität von Cch1/Mid1 zurückzuführen und eine geringfügige Beteiligung von Yvc1 dient als Verstärkungsmechanismus der Antwort. Cu^{2+} führt zur Ca^{2+} -Freisetzung aus der Vakuole durch Yvc1. Der Effekt von Cu^{2+} wird durch einen sekundär verursachten oxidativen Stress erklärt, der wiederum Yvc1 aktiviert (Ruta *et al.*, 2014; Ruta *et al.*, 2016). Die Deletion von *YVC1* führte zu einer erhöhten Toleranz gegenüber 1 mM und 2 mM Cu^{2+} und entspricht dem Effekt, der auch bei Applikation von oxidativem Stress beobachtet wurde (Popa *et al.*, 2010). Die Untersuchung der Deletionsmutante und der KR-

Mutanten von *YVC1* in Bezug auf die Toleranz gegenüber Cu^{2+} konnte die Literaturangaben jedoch nicht bestätigen. Weder die Deletion noch die Überexpression des Kanals führten zu Effekten im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 35). Die Anwesenheit von 2 mM Cu^{2+} hatte außerdem nur eine moderate Auswirkung auf das Wachstum der Zellen, während dieselbe Konzentration laut Literatur das Wachstum von Wildtyp-Zellen fast vollständig hemmt (Ruta *et al.*, 2016). Da der toxische Effekt von Cu^{2+} sehr wahrscheinlich auf einen sekundären oxidativen Stress zurückzuführen ist, könnte man die erniedrigte Sensitivität der Zellen ebenfalls mit einer erlernten Toleranz (Guan *et al.*, 2012) erklären. Das unterschiedliche Verhalten der Deletionsmutante kann jedoch nicht auf einen unterschiedlichen Stammhintergrund zurückgeführt werden, da in dieser Arbeit wie in der Literatur ein Derivat von S288C verwendet wurde.

5.1.3. Zusammenspiel posttranslationaler Modifikationen von Proteinen

Die physiologische Funktion einer einzelnen posttranslationalen Modifikation aufzuklären kann sich als schwierig erweisen, da sie in vielen Fällen in ein Zusammen- oder Wechselspiel von mehreren PTMs unter verschiedenen Bedingungen integriert ist. Lysinreste können nicht nur durch SUMO modifiziert werden, sondern sind auch Akzeptoren für Ubiquitinierung und Acetylierung. Somit könnten beobachtete Effekte nach Mutation der SUMO-Akzeptorlysine auch auf eine andere fehlende Modifikation zurückgeführt werden. Die eigentliche Funktion der SUMOylierung würde in solchen Fällen auf der direkten Konkurrenz mit anderen PTMs beruhen (Ulrich, 2005; Anckar und Sistonen, 2007). Der Transkriptionsfaktor NF κ B zum Beispiel wird aktiviert und in den Kern transportiert, indem sein Inhibitor I κ B α phosphorylierungsabhängig ubiquitiniert und daraufhin degradiert wird. Es wurde gezeigt, dass der ubiquitinierte Lysinrest auch ein SUMO-Akzeptorlysine darstellt und die SUMOylierung an dieser Stelle die Ubiquitinierung verhindert. Die Phosphorylierung von I κ B α dient in diesem Fall dazu, die SUMOylierung negativ zu regulieren und die Ubiquitinierung damit zu begünstigen. In diesem Zusammenhang wird deutlich, wie drei posttranslationale Modifikationen miteinander interagieren, um die Lokalisation und damit die Funktion eines Proteins zu regulieren (Desterro *et al.*, 1998; Gareau und Lima, 2010). Die kompetitive SUMOylierung und Acetylierung eines Lysinrests des Transkriptionsfaktors MEF2A entscheidet darüber, ob die Transkription bestimmter Gene inhibiert wird (SUMOylierung) und die Synapsenreifung in Neuronen dadurch stattfindet oder ob die Transkription der Gene verstärkt wird (Acetylierung) und Synapsen dadurch abgebaut werden. Die SUMOylierung wird in diesem Fall über Phosphorylierung positiv reguliert (Shalizi *et al.*, 2006). Je nach Substrat wurde eine positive oder negative Regulation der SUMO-Modifizierung über die Phosphorylierung bereits mehrmals beschrieben. Die positive

Regulation wird durch die phosphorylierungsabhängige Rekrutierung der SUMOylierungsmaschinerie oder durch eine Konformationsänderung des Substrates, durch die SUMOylierungsstellen präsentiert werden, erklärt (Gareau und Lima, 2010; Wilkinson und Henley, 2010; Konopacki *et al.*, 2011). Als weiteres Beispiel für das Zusammenspiel von SUMOylierung und Ubiquitinierung kann der prozessivitätssteigernde Faktor für DNA-Polymerasen (PCNA) Pol30 in *S. cerevisiae* genannt werden. Pol30 wird am Lys164 sowohl ubiquitiniert als auch SUMOyliert. In diesem Fall regulieren die beiden posttranslationalen Modifikationen die Rekrutierung von verschiedenen Interaktionspartnern, die wiederum für unterschiedliche Funktionen des Proteins zuständig sind (Hoege *et al.*, 2002; Pfander *et al.*, 2005). An der Verankerung von GABA-Rezeptoren in der postsynaptischen Membran ist das Gerüstprotein Gephyrin wesentlich beteiligt und es wurde kürzlich gezeigt, dass die Funktion dieses Gerüstproteins vom Zusammenspiel der posttranslationalen Modifikationen SUMOylierung, Acetylierung und Phosphorylierung abhängig ist (Ghosh *et al.*, 2016).

Hinsichtlich der Tatsache, dass die meisten Proteine nicht nur über eine einzige PTM reguliert werden, wäre es wichtig aufzuklären, welche weiteren PTMs die Funktion von Yvc1 beeinflussen und auf welche Art und Weise die SUMOylierung des Kanals in ein solches Zusammenspiel integriert ist. Die Phosphorylierung ist eine häufig verwendete PTM von Proteinen, die für die Regulation wichtiger zellulärer Vorgänge eine große Rolle spielt. Proteinkinasen, die aufgrund ihrer Struktur und Funktion in acht Familien unterteilt werden, katalysieren dabei die Bindung einer Phosphorylgruppe an die Hydroxylgruppe von Serin-, Threonin- und Tyrosinresten. Phosphatasen katalysieren anschließend die Hydrolyse der Phosphorylgruppen und machen diese PTM damit reversibel. Während Proteinkinasen ihre Zielproteine bevorzugt an Aminosäureresten in bestimmten Sequenzmotiven phosphorylieren, agieren Phosphatasen eher unspezifisch. Die Regulation von TRP-Kanälen über Phosphorylierung wurde bereits für einige Mitglieder der TRPC- und TRPV-Unterfamilien sowie für TRP-Kanäle aus *D. melanogaster* beschrieben (Voolstra und Huber, 2014). Die Effekte der Phosphorylierung von TRPC3 unterscheiden sich dabei, je nachdem welche Kinase beteiligt ist und welche Aminosäurereste phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung durch die Proteinkinasen C (PKC) und G (PKG) führt zu einem inhibitorischen Effekt, wohingegen die Phosphorylierung durch die Src-Kinase für die Aktivierung des Kanals durch Diacylglycerol notwendig ist (Kwan *et al.*, 2004; Vazquez *et al.*, 2004; Trebak *et al.*, 2005). Die Interaktion von TRPV4 mit STIM1 wird über die Phosphorylierung des Kanals reguliert (Shin *et al.*, 2015) und die Aktivität des hitze- und schmerz sensitiven Kanals TRPV1 wird von zwei PKC-Isoformen durch zwei voneinander unabhängige Mechanismen beeinflusst (Li *et al.*, 2014).

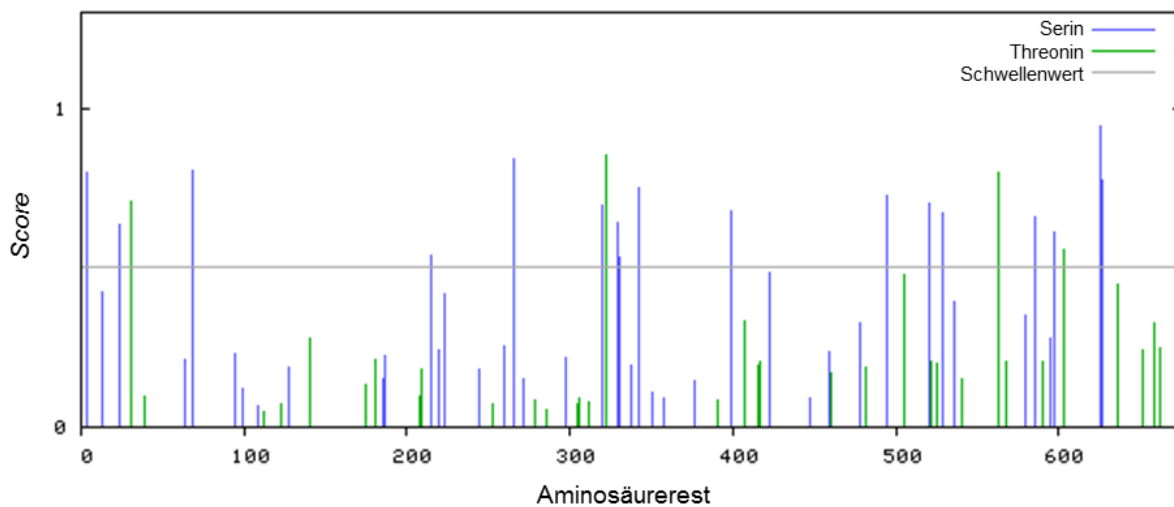


Abbildung 40: Vorhergesagte/potentielle Phosphorylierungsstellen in Yvc1 (NetPhosYeast 1.0a). Die Wahrscheinlichkeit (Score), mit der die Serinreste (blau) oder Threoninreste (grün) in der Proteinsequenz von Yvc1 phosphoryliert werden, ist gegen die Position der jeweiligen Aminosäure aufgetragen. Ein Schwellenwert von 0,5 ist durch die graue Linie angegeben.

Die Proteinsequenzanalyse von Yvc1 mit dem Programm *NetPhosYeast 1.0a* (Ingrell *et al.*, 2007) ergibt eine Vorhersage für 17 Serin- und vier Threoninreste als potentielle Phosphorylierungsstellen (Abbildung 40). Darunter befindet sich ein Serinrest (S²¹⁵) direkt C-terminal des SUMOylierungsmotivs IK²¹²DD und ein potentiell phosphorylierbarer Serinrest (S⁵⁹⁷) ist direkt N-terminal des SUMOylierungsmotivs LK⁵⁹⁹LQ zu finden. Für eine Regulation der SUMOylierung über die Phosphorylierung muss sich die Phosphorylierungsstelle jedoch auch nicht unbedingt in unmittelbarer Nähe der SUMOylierungsstelle befinden (Gareau und Lima, 2010). Eine Verifizierung der Yvc1-Phosphorylierung könnte somit sinnvoll sein, um einen Zusammenhang zwischen SUMOylierung und Phosphorylierung von Yvc1 aufzudecken oder zu widerlegen.

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie das Hyperoxid-Anion (O₂^{•-}), Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder das Hydroxyl-Radikal (HO[•]) entstehen in allen aeroben Organismen durch die Verwertung von Sauerstoff. Bei einer geringen Konzentration können ROS als Signalmoleküle fungieren, während eine höhere Konzentration toxisch ist und zu oxidativem Stress und Apoptose führt (Ghezzi, 2005). Die Regulation des Redox-Potentials einer Zelle ist aus diesem Grund von großer Bedeutung und das Tripeptid Glutathion (γ-Glutamyl-cysteinylglycin, GSH) spielt dabei mit einer hohen Konzentration (~10 mM) eine wichtige Rolle als Antioxidans. GSH ist in der Lage ROS zu neutralisieren, indem es als Elektronen-

donator oxidiert wird und anschließend als Glutathion-Disulfid (GSSG) vorliegt. Außerdem kann es als reversible PTM (Glutathionylierung) unter Ausbildung von Disulfidbrücken an Sulfhydryl-Gruppen von Cysteinen binden, wodurch die Oxidation dieser Aminosäurereste verhindert wird und die Proteine vor irreversiblen Schäden geschützt werden. Die Reversibilität der Modifikation wird von spezifischen Disulfid-Reduktasen wie Thioredoxin oder Glutaredoxin (Grant, 2001) vermittelt. Neben der Schutzfunktion bei oxidativem Stress kann die Glutathionylierung von Proteinen auch regulatorische Funktionen erfüllen. In diesem Zusammenhang wurde die Rolle der Glutathionylierung von Phosphatasen, Transkriptionsfaktoren, E1- und E2-Enzymen der Ubiquitinierung sowie von Ionenkanälen und der Ca^{2+} -Pumpe SERCA bereits näher untersucht und beschrieben (Klatt und Lamas, 2000; Ghezzi, 2005; Dalle-Donne *et al.*, 2007).

Kürzlich wurde von Chandel und Kollegen (Chandel *et al.*, 2016) der Zusammenhang von Apoptose, die durch oxidativen Stress verursacht wird, mit der Ca^{2+} -Homöostase in *S. cerevisiae* untersucht. Es wurde gezeigt, dass als Reaktion auf oxidativen Stress und die darauffolgende Depletion von GSH Yvc1 über die Glutathionylierung der Cysteinreste C17, C79 und C191 im N-Terminus (Abbildung 41) aktiviert wird. Die Modifikation wird dabei von der Glutathion-S-transferase Gtt1 vermittelt und die Deglutathionylierung erfolgt über das Thioredoxin Trx2. Die durch die Aktivität von Yvc1 entstandene, erhöhte Ca^{2+} -Konzentration im Cytosol führt schließlich zur Apoptose, was die erhöhte Toleranz von $\Delta yvc1$ -Zellen gegenüber oxidativem Stress erklärt (Popa *et al.*, 2010). Je nachdem welche sterischen Auswirkungen die Glutathionylierung der einzelnen Cysteinreste zur Folge hat, könnte eine Wechselwirkung mit der SUMOylierung des Proteins eine Erklärung für die unterschiedlichen Effekte der SUMOylierung von K212 und K231 (Abbildung 41) sein.

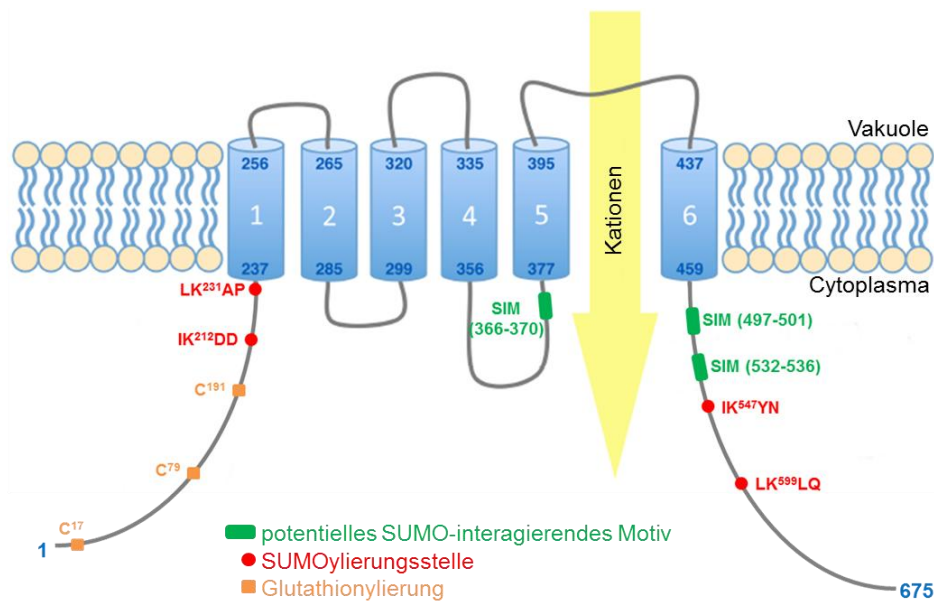


Abbildung 41: Posttranslationale Modifikationen des N- und C-Terminus von Yvc1 (modifiziert nach Chang *et al.*, 2010). Potentielle SUMO-interagierende Motive (SIM, grün) wurden mit dem Programm GPS-SUMO 1.0 vorhergesagt. Die in dieser Arbeit identifizierten SUMO-Akzeptorlysine und die entsprechenden Motive sind rot dargestellt. Die Modifikation der Cysteinreste im N-Terminus durch Glutathionylierung (orange) wurde von Chandel und Kollegen gezeigt (Chandel *et al.*, 2016).

5.2. Interaktionspartner von Yvc1

Alle essentiellen, physiologischen Prozesse einer Zelle werden nicht von einem einzigen Protein sondern vielmehr von einem Zusammenspiel verschiedener Proteinkomplexe vermittelt. Das Prinzip beruht dabei nicht auf einer freien Diffusion und zufälligen Kollision verschiedener Proteine, sondern beinhaltet ein hoch organisiertes und reguliertes Netzwerk. Die Bildung von Komplexen erhöht die Vielfältigkeit biochemischer Reaktionen und PPIs stellen außerdem sicher, dass sich Proteine, die für eine Signalweiterleitung notwendig sind, in räumlicher Nähe befinden. Zum Verständnis von biologischen Vorgängen und Signalkaskaden sowie zur Aufklärung der Funktionen einzelner Proteine ist es deshalb von großer Bedeutung die Struktur und Dynamik dieses Netzwerks in seinem zellulären Kontext zu entschlüsseln und zu vervollständigen (Alberts, 1998; Gavin und Superti-Furga, 2003; Tarassov *et al.*, 2008; Kotlyar *et al.*, 2015).

Über die Interaktionspartner von Yvc1 ist wenig bekannt und die meisten vorhandenen Daten stammen aus Hochdurchsatzstudien, in welchen die Reinigung nicht speziell für Yvc1 optimiert war. Die Suche nach Interaktionspartnern von Yvc1 mit einem Hefe-Zwei-Hybrid-System und anschließenden Bindungsversuchen ergab, dass Yvc1 mit den SUMO-Zyklus-Komponenten Nfi1, Smt3 und Ubc9 interagiert (Chang, 2010). Es ist außerdem bekannt,

dass Yvc1 an Yvc1 bindet (Tarassov *et al.*, 2008; Chang, 2010; Schlecht *et al.*, 2012), was für die Ausbildung eines tetrameren Komplexes notwendig ist und für die typische Struktur eines TRP-Kanals spricht. Drei Proteine tauchten als potentielle physische Partner von Yvc1 in verschiedenen Interaktionsstudien auf. Darunter befindet sich Vam6, das am Membran- und Proteintransport beteiligt ist und eine Komponente der Kontakte zwischen Mitochondrien und der Vakuole darstellt (Elbaz-Alon *et al.*, 2014). Srv2 ist ein Zyklase-assoziiertes Protein und spielt bei der Signalweiterleitung eine Rolle (Tarassov *et al.*, 2008) und Smy1 wirkt am Transport sekretorischer Vesikel mit (Wang *et al.*, 2012b). Diese möglichen Interaktionen mit Yvc1 erscheinen jedoch lediglich in einer Masse von Daten der jeweiligen Studie und wurden nicht mit weiteren Methoden verifiziert. Neben den Interaktionen auf molekularer Ebene wurden auch noch 28 genetische Interaktionen ermittelt (Loukin *et al.*, 2008; Costanzo *et al.*, 2010; Bouillet *et al.*, 2012; Sharifpoor *et al.*, 2012).

Ein Ziel dieser Arbeit war es Yvc1 als Köderprotein mit seinen assoziierten Proteinen unter optimalen Bedingungen zu reinigen und in einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse diejenigen Proteine zu identifizieren, mit denen Yvc1 *in vivo* als Komplex vorliegt. Dazu wurden zwei Methoden, die TAP-Reinigung und die Co-IP, verwendet. Durch die Fusion des Proteins mit einem TAP-*tag* ist es möglich, dieses mit seinen potentiellen Interaktionspartnern in zwei aufeinander folgenden Schritten effizient zu reinigen. Durch diese zwei Affinitätsschritte wird ein hoher Reinheitsgrad der Komplexe erreicht, wodurch die Fehlerrate von falsch-positiven Ergebnissen minimiert wird. Die Integration des Fusionsproteins in den endogenen Locus stellt dabei sicher, dass es auf seinem natürlichen Level synthetisiert wird, um artifizielle Interaktionen, die durch eine Überexpression entstehen können, zu unterbinden. Die Verwendung von unterschiedlichen *tags* (TAP-*tag* und S-TAP-*tag*) macht es möglich, Ca²⁺-abhängige von Ca²⁺-unabhängigen Interaktionspartnern zu unterscheiden, was bei einem Protein wie Yvc1, das wesentlich an der Ca²⁺-Homöostase beteiligt ist, einen Vorteil darstellt. Ein möglicher Nachteil der TAP-Reinigung ist, dass sich die Fusion mit einem relativ großen *tag* auf die Funktion des Proteins und seine Interaktionen mit anderen Proteinen auswirken könnte (Puig *et al.*, 2001; Gavin *et al.*, 2002). Im Fall von Yvc1 kann man trotz TAP-*tag* zumindest von einer physiologischen Lokalisation des Kanals ausgehen, da die C-terminale Fusion mit GFP auch eine Lokalisation in der Vakuolenmembran aufweist (Abbildung 30). Der Vorteil der Co-IP in diesem Zusammenhang ist, dass sich das Köderprotein in seinem physiologischen Zustand befindet, das heißt mit keinem *tag* fusioniert ist, der es womöglich auf irgendeine Art und Weise beeinflusst. Stehen ein oder sogar mehrere Zielprotein-spezifische Antikörper zur Verfügung, ist die Co-IP mit einer anschließenden massenspektrometrischen Analyse eine einfache und schnelle Methode,

einen umfangreichen Datensatz an potentiellen Interaktionspartnern zu erhalten. Falsch-positive Ergebnisse treten bei einer Co-IP häufiger auf, da es sich nur um einen einzigen Affinitätsschritt handelt und unspezifische Bindungen sowohl an dem verwendeten Antikörper als auch an der Matrix auftreten können. Durch Negativkontrollen mit reiner Sepharose oder mit einem Antikörper, der gegen ein anderes Protein gerichtet ist, können diese falsch-positiven Ergebnisse gut eingeschätzt werden. Sowohl die TAP-Reinigung als auch die Co-IP werden unter Verwendung eines nativen Puffers durchgeführt, wodurch die natürlichen *in vivo*-Bedingungen so weit wie möglich aufrechterhalten werden und die gereinigten Komplexe eine hohe Glaubwürdigkeit aufweisen. Die Reinigung von intakten Komplexen führt außerdem dazu, dass nicht nur direkte Interaktionspartner identifiziert werden, sondern auch weitere Proteine, die am Komplex beteiligt sind, auftauchen.

TAP-Reinigung und Co-IP eignen sich zur Co-Reinigung von bekannten Interaktionspartnern von Kap114 und Nup2

Die Spezifität und Effizienz der beiden verwendeten Methoden wurde anhand von zwei Zielproteinen untersucht und beurteilt, deren Interaktionspartner zum großen Teil bereits bekannt sind: Kap114 für die TAP-Reinigung und Nup2 für die Co-IP.

Kap114 ist eines von zehn Importinen, das am Transport von Proteinen aus dem Cytoplasma in den Kern verantwortlich ist. Nach erfolgreichem Transport in den Kern wird die Bindung des Importins und seines Transportsubstrates durch die Bindung der RanGTPase Gsp1 aufgelöst. Die Proteine Rpf1 und Hta1 sind als Transportsubstrate von Kap114 bekannt und eine physische Interaktion zwischen Kap114 und Gsp1 wurde ebenfalls beschrieben (Greiner *et al.*, 2004; Pemberton und Paschal, 2005; Caesar *et al.*, 2006; Rothenbusch *et al.*, 2012). Im Eluat der TAP-Reinigung wurden sowohl das Köderprotein Kap114 als auch seine Interaktionspartner erfolgreich angereichert (Abbildung 36), woraus sich schließen lässt, dass die Methode für die Untersuchung von Interaktionspartnern sehr gut geeignet ist. Da nur eine Westernblot-Analyse mit spezifischen Antikörpern für diese drei Interaktionspartner durchgeführt wurde, kann man keine Aussage darüber treffen, wie hoch die Rate der falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisse ist. Eine massenspektrometrische Analyse des Eluates hätte Aufschluss darüber gegeben.

Der Molekülaustausch zwischen dem Kern und dem Cytoplasma erfolgt über den Kernporenkomplex, der aus verschiedenen Proteinen, den Nukleoporinen, besteht. Nup2 ist eines der etwa 30 verschiedenen Nukleoporine in *S. cerevisiae*. Es ist über Nup60 an die Kernpore gebunden und am klassischen NLS-Transport beteiligt (Denning *et al.*, 2001; Allen *et al.*, 2002). Neben anderen Interaktionspartnern wurden Interaktionen von Nup2 mit

verschieden Nukleoporinen bereits auf molekularer Ebene (Nup100, Nup116, Nup192, Nup42, Nup49), auf genetischer Ebene (Nup133, Nup120, Nup188) oder beiden Ebenen (Nup1, Nup60, Nup57) gezeigt (Allen *et al.*, 2002; Dilworth *et al.*, 2005; Tarasov *et al.*, 2008; Costanzo *et al.*, 2010). Interaktionen von Nup2 mit Importin α (Srp1, genetisch und physisch) und Importin β (Kap95, physisch) wurden ebenfalls beschrieben und charakterisiert (Solsbacher *et al.*, 2000; Allen *et al.*, 2002). Eine erfolgreiche und spezifische Anreicherung des Köderproteins Nup2 im Eluat der Co-IP wurde sowohl durch die Westernblot-Analyse (Abbildung 38) als auch durch die Massenspektrometrie bestätigt. Importin α wurde als Interaktionspartner von Nup2 mit einem Peptidverhältnis von 54 (IP) zu 0 (Negativkontrolle) eindeutig verifiziert (Tabelle 23). Das Nukleoporin Nup133 wurde im Eluat der Co-IP mit zwei Peptiden identifiziert (Tabelle 23). Aufgrund der Tatsache dass es sich sowohl bei Nup2 als auch bei Nup133 um Bestandteile des Kernporenkomplexes handelt, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um ein richtig-positives Ergebnis handelt. Die Abwesenheit von weiteren bekannten Interaktionspartnern von Nup2 deutet auf eine hohe Rate an falsch-negativen Ergebnissen hin. Importin β und weitere Nukleoporine, vor allem Nup60, wären zu erwarten gewesen. Ein Grund dafür könnte eine hohe Affinität des verwendeten Antikörpers und die daraus resultierende Maskierung der Bindungsstelle für bestimmte Interaktionspartner durch das Epitop sein. Die Co-IP eignet sich somit für einen Überblick über die potentiellen Interaktionspartner eines Köderproteins, sollte jedoch aufgrund ihrer Fehlerrate keineswegs die einzige Methode für diesen Zweck sein.

5.2.1. Co-Reinigung von Yvc1 und assoziierten Proteinen

Die Reinigung des Köderproteins Yvc1 war sowohl im Fall der TAP-Reinigung bzw. der S-TAP-Reinigung (in Anwesenheit und in Abwesenheit von Ca^{2+}) als auch in der Co-IP erfolgreich (Abbildung 37, Abbildung 38). Die Westernblot-Analysen bestätigen eine spezifische und effiziente Anreicherung des Proteins und die Massenspektrometrie unterstützt die Spezifität der Experimente zusätzlich, da keine Peptide von Yvc1 in den Negativkontrollen auftauchen. Der polyklonale Antikörper eignet sich offensichtlich besser für die Co-IP, weil er an mehrere Epitope bindet. Ein monoklonaler Antikörper erkennt nur ein Epitop und ist somit eingeschränkter in seiner Bindung, wenn dieses Epitop beispielsweise durch einen Interaktionspartner maskiert ist.

Die größten Herausforderungen aller Methoden, die auf dem Prinzip der Co-Reinigung eines Proteins mit seinen Interaktionspartnern beruhen, sind die Kontaminationen (falsch-positive Ergebnisse) und die Beurteilung, ob es sich um einen endogenen Partner oder eine artifizielle Interaktion handelt. Artefakte entstehen durch hoch abundante Proteine, wie

Proteine des Zytoskeletts, Translationsfaktoren und ribosomale Proteine sowie molekulare Chaperone bzw. Hitzeschockproteine. Während der Zellyse kommen Proteine in Kontakt miteinander, die normalerweise nicht in denselben Zellkompartimenten vorkommen, was ebenfalls zu unnatürlichen Interaktionen führen kann und bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. (Gavin *et al.*, 2002; Dziembowski und Seraphin, 2004). Hitzeschockproteine und ribosomale Proteine wurden deshalb aus den Ergebnissen der Massenspektrometrie entfernt (Tabelle 21, Tabelle 22). Zur Übersichtlichkeit des großen Datensatzes der Co-IP wurden die Proteine, die ausschließlich im Kern oder in den Mitochondrien lokalisiert sind bzw. durch die Negativkontrolle ausgeschlossen werden konnten, nicht aufgeführt (Tabelle 24).

Hinweise auf posttranslationale Modifikationen

In den TAP-Reinigungen wurden keine Proteine identifiziert, die an posttranslationalen Modifikationen von Yvc1 mitwirken könnten. Im Eluat der Co-IP dagegen wurden Peptide drei Kinasen (Cdc28, Kin2, Sch9) und einer Phosphatase (Oca1) zugeordnet (Tabelle 24). Für die Kinase Sch9 wurde im Zusammenhang mit „*nutrient sensing*“ eine PI(3, 5)P₂ abhängige Lokalisierung an der Vakuolenmembran beschrieben (Jin *et al.*, 2014). PI(3, 5)P₂ interagiert *in vitro* mit dem C- und dem N-Terminus von Yvc1 (Mahnaz Amini, persönliche Mitteilung) und Studien weisen darauf hin, dass die Aktivierung von Yvc1 von der PI(3, 5)P₂-Produktion abhängt (Duex *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2010a), was auch auf eine Sch9-vermittelte Regulation hindeuten könnte. Da es sich jedoch nur um zwei Peptide (Kin2, Oca1) handelte oder entsprechende Peptide (Cdc28, Sch9) auch in der Negativkontrolle zu finden waren, kann man hier nicht eindeutig auf endogene Interaktionen schließen.

In den Eluaten der Co-IP wurden außerdem an der Ubiquitinierung und der Ubiquitin-abhängigen Proteindegradation beteiligte Proteine (Ubiquitin-Protein-Ligase: Rsp5, Ubiquitin-Protein-Transferase: Rtt101, Ubiquitin-spezifische-Proteasen: Ubp3 und Ufd4) gefunden. Der korrekte Einbau des vakuolären Membranproteins Sna2 ist abhängig von seiner Bindung an Rsp5 und seiner Ubiquitinierung (Stawiecka-Mirota *et al.*, 2007), was ein Hinweis darauf sein könnte, dass Yvc1 über denselben Mechanismus zur Vakuolenmembran gelangt. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass die Rsp5-vermittelte Ubiquitinierung von Plasmamembranproteinen zu deren Internalisierung und einer anschließenden Degradation in der Vakuole führt (Hicke, 1997; Dunn und Hicke, 2001; Lauwers *et al.*, 2010). Eine solche Regulation des Proteinumsatzes wurde für drei Proteine beschrieben, die im Eluat der Co-IP (Tabelle 24) auftauchen. Darunter befinden sich die Hexose-Transporter Hxt3 und Hxt7 (Snowdon und Van Der Merwe, 2012; O'donnell *et al.*, 2015) sowie der α -Pheromon-Rezeptor Ste2 (Hicke,

1997; Alvaro *et al.*, 2014). Eine Rsp5-vermittelte Ubiquitinierung der Zytoskelett-Proteine Sla1 und Sla2 (Tabelle 24), die an der Endozytose beteiligt sind, ist ebenfalls bekannt (Jarmoszewicz *et al.*, 2012; Feyder *et al.*, 2015). Ob es sich im Fall von Yvc1 um eine Ubiquitinierung als Sortierungssignal, um eine Beteiligung von Yvc1 am Degradationsprozess von Plasmamembranproteinen oder um artifizielle Proteinkomplexe durch räumliche Nähe und Zerstörung der Vakuole während der Lyse handelt, kann man anhand der MS-Daten nicht feststellen.

Entgegen den Erwartungen wurden Proteine des SUMO-Zyklus weder in den Eluatzen der TAP-Reinigungen noch der Co-IP gefunden.

Vesikel-vermittelter Proteintransport

Aufgrund der Kompartimentierung einer eukaryotischen Zelle ist der Transport von Proteinen in einem über Vesikel verbundenen Endomembransystem notwendig. Dafür bilden sich membranumschlossene, mit dem entsprechenden Transportsubstrat beladene Vesikel an der Donormembran aus, die zur Zielmembran transportiert werden, mit der sie schließlich fusionieren. Diese Transportprozesse zwischen den beteiligten Organellen sowie der Plasmamembran erfolgen anterograd sowie retrograd und werden von zahlreichen cytosolischen, integralen und membranständigen Proteinen reguliert und kontrolliert (Bowers und Stevens, 2005; Decker und Wickner, 2006; Feyder *et al.*, 2015). Einige Proteine, die an verschiedenen Prozessen dieses Proteintransports beteiligt sind, wurden bei der Suche nach Interaktionspartnern von Yvc1 identifiziert.

Arf1 (Tabelle 21), Cop1, Ret2, Sec28, Sec 21 und Sec27 (Tabelle 24) wurden bereits untereinander als Interaktionspartner und als Komponenten von COPI-Vesikeln beschrieben (Gavin *et al.*, 2006; Jarmoszewicz *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012). Sec28 und Ret2 sind außerdem am Aufbau von Vid (*vacuole import and degradation*)-Vesikeln beteiligt, die für den Abbau von cytosolischen Proteinen in der Vakuole verantwortlich sind (Brown *et al.*, 2008). Aufgrund der Peptide in den Negativkontrollen müsste untersucht werden, ob es sich bei diesen Vesikel-Komponenten um tatsächliche Interaktionspartner von Yvc1 oder um Artefakte handelt.

Vakuoläre Membranproteine können durch retrograden Transport zum Golgi-Apparat wiederverwertet werden. An diesem Prozess sind Vps1 (Tabelle 24) und Retromere, deren Hauptkomponente Vps35 (Tabelle 24) ist (Trousdale und Kim, 2015), wesentlich beteiligt (Arlt *et al.*, 2015). Inwiefern Yvc1 in diesen Vorgang der Vakuolenmembran-Homöostase integriert ist, lässt sich allein aus diesen Daten jedoch nicht schlussfolgern. Für Vps1 wurden

außerdem Funktionen bei der Vakuolenfusion und als Sortiersignal zur Vakuole beschrieben (Ekena *et al.*, 1993; Hayden *et al.*, 2013). Eno2 ist ein abundantes Protein, das unabhängig von seiner Aufgabe im Cytoplasma bei der Glykolyse teilweise an die Vakuolenmembran gebunden vorliegt und eine regulatorische Rolle für die Vakuolenfusion erfüllt sowie am Proteintransport zur Vakuole beteiligt ist (Decker und Wickner, 2006). Es wurde in den Eluaten aller Reinigungen gefunden (Tabelle 21, Tabelle 22, Tabelle 24), wobei jedoch auch in den Negativkontrollen Peptide vorhanden waren. Ob es sich um ein falsch-positives Ergebnis aufgrund der Abundanz des Proteins oder um einen endogenen Interaktionspartner von Yvc1 handelt, müsste mit weiteren Methoden geklärt werden. Neben einer möglichen Rolle von Vps1 und Eno2 für die korrekte Lokalisierung von Yvc1 wäre eine Funktion von Yvc1 für die Vakuolenfusion in Zusammenarbeit mit diesen zwei Proteinen denkbar.

Zellwand-Synthese und -Integrität

Während der Suche nach Deletionsmutanten, die in einer erhöhten, Yvc1-vermittelten Ca^{2+} -Antwort auf einen hyperosmotischen Schock resultieren, wurde ein Zusammenhang zwischen dem Ca^{2+} -Signal und der Zellwand-Integrität beschrieben. Dabei wurden hauptsächlich Gene identifiziert, deren Deletion zu Beeinträchtigungen der Zellwand führt (Loukin *et al.*, 2008). Zwei Proteine, die in den Ergebnissen der Studie auftauchen, wurden in den Eluaten der Co-IP (Gas1, Fks1) und der S-TAP-Reinigung (Fks1) identifiziert (Tabelle 22, Tabelle 24). Beide Proteine spielen eine Rolle im Metabolismus von 1,3- β -Glukan, einer Hauptkomponente der Zellwand von Hefepilzen (Lesage *et al.*, 2004). Der von Loukin und seiner Arbeitsgruppe beobachtete Effekt (Loukin *et al.*, 2008) wird zwar auf eine erhöhte vakuoläre Ca^{2+} -Sequestrierung bei Zellwand-Stress zurückgeführt, da die elektrophysiologischen Eigenschaften von Yvc1 durch die Deletion nicht verändert werden, die nähere Untersuchung von Yvc1 erfolgte jedoch nur für Gas1 und essentielle Gene wurden in der ganzen Studie nicht berücksichtigt. Das essentielle Protein Emw1 ist für die Regulation der Zellwand-Integrität verantwortlich (Sipling *et al.*, 2011) und wurde in beiden Eluaten der Co-IP, aber nicht in der Negativkontrolle identifiziert (Tabelle 24). Psa1 ist an der Synthese von Glykoproteinen, die ebenfalls zu den Bauelementen der Zellwand gehören, beteiligt (Zhang *et al.*, 1999) und taucht in Eluaten aller drei Reinigungs-Methoden auf (Tabelle 21, Tabelle 22, Tabelle 24). Interessanterweise ist die Aktivität eines TRP-Kanals in *Schizosaccharomyces pombe* ebenfalls mit der Zellwand-Integrität assoziiert. Laut einer Studie gibt es eine Korrelation der Proteinsynthese des Kanals mit Zellwand-Defekten, da er durch die Interaktion mit einer Rho-GTPase an der Zellwand-Synthese beteiligt ist (Palmer *et al.*, 2005). Eine Rho-GTPase wurde im Eluat der Co-IP identifiziert (Rho3, Tabelle 24), wobei die Peptidzahl in diesem Fall vergleichbar mit der Negativkontrolle ist. Eine weitere GTPase,

Rsr1, taucht ebenfalls in den Eluaten der Yvc1-Co-IPs, jedoch nicht in der Negativkontrolle, auf. Aufgrund der Verbindung der Ca^{2+} -Signale mit der Zellwand-Homöostase und der Beteiligung des TRP-Kanals an der Zellwand-Integrität in *Schizosaccharomyces pombe* wäre auch eine Funktion von Yvc1 und potentiellen Interaktionspartnern in diesem Kontext möglich und könnte näher untersucht werden.

Ionenhomöostase

Der intrazelluläre pH-Wert beeinflusst wichtige physiologische Vorgänge einer Zelle und bedarf einer strikten Regulation. Dabei wird der cytosolische pH-Wert hauptsächlich von der Aktivität zweier Protonenpumpen bestimmt, einerseits von der in der Plasmamembran lokalisierten Pma1 und andererseits von einem großen Proteinkomplex, der V-ATPase, der für die Azidifizierung des Endomembransystems verantwortlich ist (Cyert und Philpott, 2013). Drei Untereinheiten der V-ATPase wurden auf der Suche nach Interaktionspartnern von Yvc1 identifiziert: Vma2 in den S-TAP-Reinigungen (Tabelle 22), Vma1 und Vma8 in den Co-IPs (Tabelle 24). Aufgrund der jeweiligen Peptide in der Negativkontrolle könnte es sich hierbei jedoch um falsch-positive Ergebnisse handeln. In allen Reinigungen wurden Peptide der Protonenpumpe Pma1 zugeordnet (Tabelle 21, Tabelle 22), wobei das Protein in Tabelle 24 (Co-IP) wegen der Überzahl an Peptiden in der Negativkontrolle (AK1: 234 Peptide, AK2: 215 Peptide, Negativkontrolle: 317 Peptide) nicht aufgeführt ist. Aufgrund der hohen Abundanz der Protonenpumpe ist es in diesem Fall schwer zu beurteilen, ob es sich um einen endogenen Partner von Yvc1 handelt oder nicht. Das Verhältnis der Peptide in den S-TAP-Reinigungen ($+\text{Ca}^{2+}$: 96 Peptide, $-\text{Ca}^{2+}$: 30 Peptide, Negativkontrolle: 6 Peptide) spricht dafür, die Anzahl der Peptide in der Negativkontrolle der Co-IPs spricht dagegen. Ein Zusammenhang von Ca^{2+} -Signalen und der Aktivität von Pma1 ist bereits bekannt. Ein Glukose-induzierter, cytosolischer Ca^{2+} -Anstieg, der bei geringer Ca^{2+} -Konzentration im Medium Yvc1-abhängig ist, wird mit der Aktivierung der Protonenpumpe in Verbindung gebracht. Die Deletion von *YVC1* führt zu einer signifikanten Reduktion dieser Pma1-Aktivität, was mit dem Ausbleiben des Ca^{2+} -Signals begründet wird (Bouillet *et al.*, 2012). Eine Interaktion von Yvc1 mit Pma1 auf molekularer Ebene und ob Yvc1 im Zusammenspiel mit Pma1 bzw. der V-ATPase eine Funktion in der Regulation der Protonenhomöostase hat, bleibt somit zu klären.

Weitere Proteine, die mit der Ionenhomöostase in Verbindung gebracht werden, wurden in den Eluaten der Co-IP identifiziert (Tabelle 24): zum einen Fre1, das in der Plasmamembran lokalisiert ist und Kupfer und Eisen reduziert, bevor die Ionen in die Zelle aufgenommen werden (Cyert und Philpott, 2013), zum anderen Gef1, ein Chloridkanal in der Vakuolen-

membran (Bonilla und Cunningham, 2002). Auf eine eindeutige Interaktion von Yvc1 mit diesen Proteinen lässt sich allein aus den Massenspektrometrie-Daten jedoch nicht schließen

5.2.2. Interpretation der Massenspektrometrie-Daten für Yvc1

Trotz effizienter und spezifischer Anreicherung des Zielproteins Yvc1 durch die TAP-Reinigungen und die Co-IPs, konnten keine eindeutig spezifischen Interaktionspartner von Yvc1 identifiziert werden. Bisherige Daten, die zu den Interaktionspartnern von Yvc1 vorliegen (Tarassov *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012b; Elbaz-Alon *et al.*, 2014), wurden nicht bestätigt. Wie oben erwähnt, stammen die Literaturdaten jedoch aus Hochdurchsatzstudien, deren Bedingungen nicht für Yvc1 optimiert waren. Es wären Komponenten des SUMO-Zyklus oder das Calcium-bindende Protein Calmodulin aufgrund der Ergebnisse bisheriger Studien (Chang, 2010; Amini, 2013) und dieser Arbeit als Interaktionspartner von Yvc1 zu erwarten gewesen. Hohe Salzkonzentrationen und die Anwesenheit von Detergenzien im Lysepuffer wirken sich negativ auf die Stabilität von Proteinkomplexen aus, weshalb für die Analyse von nativen Proteinkomplexen eher milde Bedingungen gewählt werden sollten. Für die Solubilisierung von Yvc1 als integrales Membranprotein ist die Verwendung von Detergenzien allerdings unvermeidbar. Für die Reinigung von Yvc1 mit seinen Interaktionspartnern war es also notwendig, eine Balance zwischen stringenten Bedingungen für die Solubilisierung des Zielproteins und milden Bedingungen für die Erhaltung der natürlichen Proteinkomplexe zu finden. Da nichtionische Detergenzien weniger mit PPIs interferieren und weniger denaturierend wirken als ionische Detergenzien, wurden in den Lysepuffern dieser Arbeit die Kombinationen von Triton X-100 und DDM (IP) sowie NP40 und DDM (TAP-Reinigungen) in Verbindung mit einer mäßigen NaCl-Konzentration (125 mM und 200 mM) verwendet. Eine Beeinträchtigung der PPIs von Yvc1 ist unter diesen Bedingungen jedoch nicht ausgeschlossen und könnte zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Eine weitere Schwierigkeit bei der Analyse von PPIs eines Zielproteins ist die Erfassung von niedrig affinen und/oder transienten Bindungen. Die Interaktionen mit regulatorischen Proteinen treten unter Umständen nur in bestimmten physiologischen Zuständen auf und sind aus diesem Grund nur schwer zu detektieren. Eine Lösung hierfür könnten chemische Quervernetzungen mit anschließenden Co-Reinigungen sein. Die Verwendung des S-TAP-tags sollte den Vorteil bieten Ca^{2+} -abhängige von Ca^{2+} -unabhängigen Interaktionspartnern von Yvc1 zu unterscheiden. Da die Reinigung in Anwesenheit von Ca^{2+} in Bezug auf das Köderprotein generell effizienter war, lässt sich aus der höheren Peptidzahl in diesem Eluat (Tabelle 22) keine Ca^{2+} -Abhängigkeit ableiten.

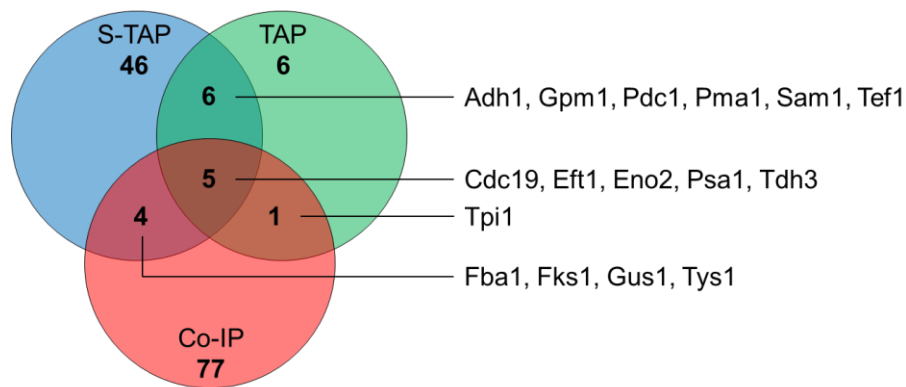


Abbildung 42: Überschneidungen der Ergebnisse mehrerer Co-Reinigungen von Yvc1 und seinen potentiellen Interaktionspartnern. Die Zahlen geben die Anzahl der Proteine in den einzelnen Schnittmengen an. Bekannte Funktion der Proteine: Fermentation: Adh1; Protonen-Homöostase: Pma1; Glykolyse: Cdc19, Eno2 (auch Beteiligung an Vakuolenfusion), Fba1, Tdh3, Tpi1, Gpm1; Zellwand-Synthese: Fks1, Psa1; Translationselongation: Tef1, Eft1; Aminosäurestoffwechsel: Pdc1, Sam1; Aminosäure-tRNA-Ligase: Gus1, Tys1

Schaut man sich die Massenspektrometrie-Daten unabhängig von der Funktion der Proteine an, so gibt es einige Überschneidungen zwischen den Ergebnissen der einzelnen Reinigungen (Abbildung 42). Neben hoch abundanten Proteinen wie der Alkoholdehydrogenase Adh1 und der Protonenpumpe Pma1 tauchen immer wieder Proteine auf, denen eine Funktion bei der Translationselongation (Tef1, Eft1), der Zellwand-Synthese (Fks1, Psa1) und der Glykolyse (Cdc19, Eno2, Fba1, Tdh3, Tpi1, Gpm1) zugeschrieben wird. Eno2 ist außerdem an der Regulation der Vakuolenfusion beteiligt. Weiterhin wurden Proteine des Aminosäurestoffwechsels (Pdc1, Sam1) und zwei Aminosäure-tRNA-Ligasen mehrmals identifiziert. Das gehäufte Auftreten dieser Stoffwechsel-Proteine kann einerseits auf ihre Abundanz zurückgeführt werden, andererseits wäre die Interaktion von Yvc1 auch mit einem abundanten Protein möglich. Auch wenn für ein Protein bereits eine bestimmte Funktion beschrieben wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieses Protein auch weitere Aufgaben in einem anderen Kontext erfüllt.

5.3. Perspektiven

Im Rahmen dieser Arbeit wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass der TRP-homologe Kanal Yvc1 in *S. cerevisiae* an den Lysinresten K212, K231, K547 und K599 durch die post-translationale Modifikation SUMO modifiziert wird. Die Modifikation erfolgt wahrscheinlich gleichzeitig an zwei Lysinresten, wobei noch zu klären ist, welche SUMOylierungsstellen bevorzugt verwendet werden. Eine systematische Untersuchung von KR-Mutanten im *in vivo* SUMOylierungsexperiment könnte darüber Auskunft geben. Die Verwendung von Yvc1-KR-

Mutanten und die Überexpression von *SMT3* in luminometrischen Assays deuten darauf hin, dass der SUMOylierungsstatus des Kanals seine Aktivität moduliert. Eine physiologische Funktion des Kanals im Zusammenhang mit verschiedenen Stressbedingungen und besonders die Funktion der SUMO-Modifikation wurde bisher nicht ermittelt und könnte in Zukunft weiter untersucht und aufgeklärt werden. Wechselwirkungen der SUMOylierung mit anderen bekannten (Glutathionylierung) und unbekanntem (z. B. Phosphorylierung) post-translationalen Modifikationen von Yvc1 sollten analysiert und die Auswirkungen dieser Regulationsmechanismen im biologischen Kontext ermittelt werden. Eine regulatorische Abhängigkeit der PPIs des Kanals von seiner SUMOylierung wäre denkbar und könnte näher untersucht werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen in Bezug darauf, wie sich Yvc1 in das Interaktom von *S. cerevisiae* einfügt, lieferten Hinweise auf die Regulation der korrekten Lokalisation des Kanals. Außerdem könnte Yvc1 eine Rolle bei der Degradation von Plasmamembranproteinen und der Vakuolenfusion spielen und an der Regulation der Zellwand-Integrität und der Protonenhomöostase beteiligt sein. Potentielle Interaktionen des Kanals mit Proteinen wie Rsp5, Vps1, Eno2, Psa1 und Pma1 müssen allerdings zunächst mit weiteren Methoden verifiziert werden, um eine mögliche Beteiligung von Yvc1 an den genannten Prozessen weiter aufklären zu können.

Literaturverzeichnis

- Abu Irqeba A., Li Y., Panahi M., Zhu M. und Wang Y. (2014). Regulating Global Sumoylation by a MAP Kinase Hog1 and Its Potential Role in Osmo-Tolerance in Yeast. *PLoS One* 9(2): e87306.
- Aiello D. P., Fu L., Miseta A. und Bedwell D. M. (2002). Intracellular Glucose 1-Phosphate and Glucose 6-Phosphate Levels Modulate Ca²⁺ Homeostasis in *Saccharomyces Cerevisiae*. *J Biol Chem* 277(48): 45751-45758.
- Alberts B. (1998). The Cell as a Collection of Protein Machines: Preparing the Next Generation of Molecular Biologists. *Cell* 92(3): 291-294.
- Allen N. P., Patel S. S., Huang L., Chalkley R. J., Burlingame A., Lutzmann M., Hurt E. C. und Rexach M. (2002). Deciphering Networks of Protein Interactions at the Nuclear Pore Complex. *Mol Cell Proteomics* 1(12): 930-946.
- Alvaro C. G., O'donnell A. F., Prosser D. C., Augustine A. A., Goldman A., Brodsky J. L., Cyert M. S., Wendland B. und Thorner J. (2014). Specific Alpha-Arrestins Negatively Regulate *Saccharomyces Cerevisiae* Pheromone Response by Down-Modulating the G-Protein-Coupled Receptor Ste2. *Mol Cell Biol* 34(14): 2660-2681.
- Amini M. (2013). Functional Investigation on the *Saccharomyces Cerevisiae* Cation Channel Protein Yvc1. Dissertation. Universität des Saarlandes.
- Anckar J. und Sistonen L. (2007). SUMO: Getting It On. *Biochem Soc Trans* 35(Pt 6): 1409-1413.
- Arlt H., Reggiori F. und Ungermann C. (2015). Retromer and the Dynamin Vps1 Cooperate in the Retrieval of Transmembrane Proteins from Vacuoles. *J Cell Sci* 128(4): 645-655.
- Baba D., Maita N., Jee J. G., Uchimura Y., Saitoh H., Sugasawa K., Hanaoka F., Tochio H., Hiroaki H. und Shirakawa M. (2006). Crystal Structure of SUMO-3-Modified Thymine-DNA Glycosylase. *J Mol Biol* 359(1): 137-147.
- Babu M., Krogan N. J., Awrey D. E., Emili A. und Greenblatt J. F. (2009). Systematic Characterization of the Protein Interaction Network and Protein Complexes in *Saccharomyces Cerevisiae* Using Tandem Affinity Purification and Mass Spectrometry. *Methods Mol Biol* 548: 187-207.
- Batiza A. F., Schulz T. und Masson P. H. (1996). Yeast Respond to Hypotonic Shock with a Calcium Pulse. *J Biol Chem* 271(38): 23357-23362.
- Bayer P., Arndt A., Metzger S., Mahajan R., Melchior F., Jaenicke R. und Becker J. (1998). Structure Determination of the Small Ubiquitin-Related Modifier SUMO-1. *J Mol Biol* 280(2): 275-286.
- Belde P. J. M., Vossen J. H., Borst-Pauwels G. W. F. H. und Theuvsen A. P. R. (1993). Inositol 1,4,5-Trisphosphate Releases Ca²⁺ from Vacuolar Membrane Vesicles of *Saccharomyces Cerevisiae*. *FEBS Letters* 323(1-2): 113-118.
- Benson M. D., Li Q. J., Kieckhafer K., Dudek D., Whorton M. R., Sunahara R. K., Iniguez-Lluhi J. A. und Martens J. R. (2007). SUMO Modification Regulates Inactivation of the Voltage-Gated Potassium Channel Kv1.5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(6): 1805-1810.
- Berridge M. J., Bootman M. D. und Roderick H. L. (2003). Calcium Signalling: Dynamics, Homeostasis and Remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(7): 517-529.
- Berridge M. J., Lipp P. und Bootman M. D. (2000). The Versatility and Universality of Calcium Signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 11-21.

- Bertl A., Blumwald E., Coronado R., Eisenberg R., Findlay G., Gradmann D., Hille B., Kohler K., Kolb H. A., Macrobbe E. und Et Al. (1992). Electrical Measurements on Endomembranes. *Science* 258(5084): 873-874.
- Bertl A. und Slayman C. L. (1990). Cation-Selective Channels in the Vacuolar Membrane of *Saccharomyces*: Dependence on Calcium, Redox State, and Voltage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(20): 7824-7828.
- Black D. L. (2003). Mechanisms of Alternative Pre-Messenger Rna Splicing. *Annu Rev Biochem* 72: 291-336.
- Bonilla M. und Cunningham K. W. (2002). Calcium Release and Influx in Yeast: TRPC and Vgccc Rule Another Kingdom. *Sci STKE* 2002(127): pe17.
- Bonilla M. und Cunningham K. W. (2003). Mitogen-Activated Protein Kinase Stimulation of Ca²⁺ Signaling Is Required for Survival of Endoplasmic Reticulum Stress in Yeast. *Mol Biol Cell* 14(10): 4296-4305.
- Bootman M. D. (2012). Calcium Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(7): a011171.
- Bouillet L. E., Cardoso A. S., Perovano E., Pereira R. R., Ribeiro E. M., Tropia M. J., Fietto L. G., Tisi R., Martegani E., Castro I. M. und Brandao R. L. (2012). The Involvement of Calcium Carriers and of the Vacuole in the Glucose-Induced Calcium Signaling and Activation of the Plasma Membrane H⁺-ATPase in *Saccharomyces Cerevisiae* Cells. *Cell Calcium* 51(1): 72-81.
- Bowers K. und Stevens T. H. (2005). Protein Transport from the Late Golgi to the Vacuole in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1744(3): 438-454.
- Brini M., Cali T., Ottolini D. und Carafoli E. (2013). Intracellular Calcium Homeostasis and Signaling. *Met Ions Life Sci* 12: 119-168.
- Brown C. R., Wolfe A. B., Cui D. und Chiang H. L. (2008). The Vacuolar Import and Degradation Pathway Merges with the Endocytic Pathway to Deliver Fructose-1,6-Bisphosphatase to the Vacuole for Degradation. *J Biol Chem* 283(38): 26116-26127.
- Bylebyl G. R., Belichenko I. und Johnson E. S. (2003). The SUMO Isopeptidase Ulp2 Prevents Accumulation of SUMO Chains in Yeast. *J Biol Chem* 278(45): 44113-44120.
- Caesar S., Greiner M. und Schlenstedt G. (2006). Kap120 Functions as a Nuclear Import Receptor for Ribosome Assembly Factor Rpf1 in Yeast. *Mol Cell Biol* 26(8): 3170-3180.
- Case R. M., Eisner D., Gurney A., Jones O., Muallem S. und Verkhatsky A. (2007). Evolution of Calcium Homeostasis: From Birth of the First Cell to an Omnipresent Signalling System. *Cell Calcium* 42(4-5): 345-350.
- Castro P. H., Tavares R. M., Bejarano E. R. und Azevedo H. (2012). SUMO, a Heavyweight Player in Plant Abiotic Stress Responses. *Cell Mol Life Sci* 69(19): 3269-3283.
- Castro P. H., Verde N., Lourenco T., Magalhaes A. P., Tavares R. M., Bejarano E. R. und Azevedo H. (2015). Siz1-Dependent Post-Translational Modification by SUMO Modulates Sugar Signaling and Metabolism in *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Cell Physiol* 56(12): 2297-2311.
- Chandel A., Das K. K. und Bachhawat A. K. (2016). Glutathione Depletion Activates the Yeast Vacuolar TRP Channel, Yvc1p by Reversible Glutathionylation of Specific Cysteines. *Mol Biol Cell*.
- Chang Y. (2010). Characterization of the Vacuolar Ion Channel Yvc1 in *Saccharomyces Cerevisiae*. Dissertation. Universität des Saarlandes.
- Cheng C. H., Lo Y. H., Liang S. S., Ti S. C., Lin F. M., Yeh C. H., Huang H. Y. und Wang T. F. (2006). SUMO Modifications Control Assembly of Synaptonemal Complex and Polycomplex in Meiosis of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genes Dev* 20(15): 2067-2081.

- Christensen A. P. und Corey D. P. (2007). TRP Channels in Mechanosensation: Direct or Indirect Activation? *Nat Rev Neurosci* 8(7): 510-521.
- Christianson T. W., Sikorski R. S., Dante M., Shero J. H. und Hieter P. (1992). Multifunctional Yeast High-Copy-Number Shuttle Vectors. *Gene* 110(1): 119-122.
- Chung T. L., Hsiao H. H., Yeh Y. Y., Shia H. L., Chen Y. L., Liang P. H., Wang A. H., Khoo K. H. und Shoei-Lung Li S. (2004). In Vitro Modification of Human Centromere Protein Cenp-C Fragments by Small Ubiquitin-Like Modifier (SUMO) Protein: Definitive Identification of the Modification Sites by Tandem Mass Spectrometry Analysis of the Isopeptides. *J Biol Chem* 279(38): 39653-39662.
- Ciesarova Z., Smogrovicova D. und Domyeny Z. (1996). Enhancement of Yeast Ethanol Tolerance by Calcium and Magnesium. *Folia Microbiol (Praha)* 41(6): 485-488.
- Clapham D. E. (2003). TRP Channels as Cellular Sensors. *Nature* 426(6966): 517-524.
- Costanzo M., Baryshnikova A., Bellay J., Kim Y., Spear E. D., Sevier C. S., Ding H., Koh J. L., Toufighi K., Mostafavi S., Prinz J., St Onge R. P., Vandersluis B., Makhnevych T., Vizeacoumar F. J., Alizadeh S., Bahr S., Brost R. L., Chen Y., Cokol M., Deshpande R., Li Z., Lin Z. Y., Liang W., Marback M., Paw J., San Luis B. J., Shuteriqi E., Tong A. H., Van Dyk N., Wallace I. M., Whitney J. A., Weirauch M. T., Zhong G., Zhu H., Houry W. A., Brudno M., Ragibzadeh S., Papp B., Pal C., Roth F. P., Giaever G., Nislow C., Troyanskaya O. G., Bussey H., Bader G. D., Gingras A. C., Morris Q. D., Kim P. M., Kaiser C. A., Myers C. L., Andrews B. J. und Boone C. (2010). The Genetic Landscape of a Cell. *Science* 327(5964): 425-431.
- Courchesne W. E., Vlasek C., Klukovich R. und Coffee S. (2011). Ethanol Induces Calcium Influx Via the Cch1-Mid1 Transporter in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Arch Microbiol* 193(5): 323-334.
- Cremona C. A., Sarangi P., Yang Y., Hang L. E., Rahman S. und Zhao X. (2012). Extensive DNA Damage-Induced Sumoylation Contributes to Replication and Repair and Acts in Addition to the Mec1 Checkpoint. *Mol Cell* 45(3): 422-432.
- Cronin S. R., Rao R. und Hampton R. Y. (2002). Cod1p/Spf1p Is a P-Type ATPase Involved in ER Function and Ca²⁺ Homeostasis. *J Cell Biol* 157(6): 1017-1028.
- Cui J., Kaandorp J. A., Ositelu O. O., Beaudry V., Knight A., Nanfack Y. F. und Cunningham K. W. (2009). Simulating Calcium Influx and Free Calcium Concentrations in Yeast. *Cell Calcium* 45(2): 123-132.
- Cunningham K. W. (2011). Acidic Calcium Stores of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Cell Calcium* 50(2): 129-138.
- Cyert M. S. (2003). Calcineurin Signaling in *Saccharomyces Cerevisiae*: How Yeast Go Crazy in Response to Stress. *Biochem Biophys Res Commun* 311(4): 1143-1150.
- Cyert M. S. und Philpott C. C. (2013). Regulation of Cation Balance in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics* 193(3): 677-713.
- D'hooge P., Coun C., Van Eyck V., Faes L., Ghillebert R., Marien L., Winderickx J. und Callewaert G. (2015). Ca²⁺ Homeostasis in the Budding Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*: Impact of Er/Golgi Ca²⁺ Storage. *Cell Calcium* 58(2): 226-235.
- Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Colombo R. und Milzani A. (2007). S-Glutathionylation in Protein Redox Regulation. *Free Radic Biol Med* 43(6): 883-898.
- De Logu F., Patacchini R., Fontana G. und Geppetti P. (2016). TRP Functions in the Broncho-Pulmonary System. *Semin Immunopathol* 38(3): 321-329.

- Decker B. L. und Wickner W. T. (2006). Enolase Activates Homotypic Vacuole Fusion and Protein Transport to the Vacuole in Yeast. *J Biol Chem* 281(20): 14523-14528.
- Deliot N. und Constantin B. (2015). Plasma Membrane Calcium Channels in Cancer: Alterations and Consequences for Cell Proliferation and Migration. *Biochim Biophys Acta* 1848(10 Pt B): 2512-2522.
- Demaegd D., Colinet A. S., Deschamps A. und Morsomme P. (2014). Molecular Evolution of a Novel Family of Putative Calcium Transporters. *PLoS One* 9(6): e100851.
- Demaegd D., Foulquier F., Colinet A. S., Gremillon L., Legrand D., Mariot P., Peiter E., Van Schaftingen E., Matthijs G. und Morsomme P. (2013). Newly Characterized Golgi-Localized Family of Proteins Is Involved in Calcium and pH Homeostasis in Yeast and Human Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(17): 6859-6864.
- Denis V. und Cyert M. S. (2002). Internal Ca²⁺ Release in Yeast Is Triggered by Hypertonic Shock and Mediated by a TRP Channel Homologue. *J Cell Biol* 156(1): 29-34.
- Denning D., Mykytko B., Allen N. P., Huang L., Al B. und Rexach M. (2001). The Nucleoporin Nup60p Functions as a Gsp1p-GTP-Sensitive Tether for Nup2p at the Nuclear Pore Complex. *J Cell Biol* 154(5): 937-950.
- Derbenev A. V. und Zsombok A. (2016). Potential Therapeutic Value of TRPV1 and TRPA1 in Diabetes Mellitus and Obesity. *Semin Immunopathol* 38(3): 397-406.
- Desterro J. M., Rodriguez M. S. und Hay R. T. (1998). SUMO-1 Modification of IκBα Inhibits NF-κB Activation. *Mol Cell* 2(2): 233-239.
- Dilworth D. J., Tackett A. J., Rogers R. S., Yi E. C., Christmas R. H., Smith J. J., Siegel A. F., Chait B. T., Wozniak R. W. und Aitchison J. D. (2005). The Mobile Nucleoporin Nup2p and Chromatin-Bound Prp20p Function in Endogenous NPC-Mediated Transcriptional Control. *J Cell Biol* 171(6): 955-965.
- Dong X. P., Shen D., Wang X., Dawson T., Li X., Zhang Q., Cheng X., Zhang Y., Weisman L. S., Delling M. und Xu H. (2010a). Pi(3,5)P₂ Controls Membrane Trafficking by Direct Activation of Mucolipin Ca²⁺ Release Channels in the Endolysosome. *Nat Commun* 1: 38.
- Dong X. P., Wang X. und Xu H. (2010b). TRP Channels of Intracellular Membranes. *J Neurochem* 113(2): 313-328.
- Dove S. K., Cooke F. T., Douglas M. R., Sayers L. G., Parker P. J. und Michell R. H. (1997). Osmotic Stress Activates Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphate Synthesis. *Nature* 390(6656): 187-192.
- Duex J. E., Nau J. J., Kauffman E. J. und Weisman L. S. (2006). Phosphoinositide 5-Phosphatase Fig 4p Is Required for Both Acute Rise and Subsequent Fall in Stress-Induced Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate Levels. *Eukaryot Cell* 5(4): 723-731.
- Dunham W. H., Mullin M. und Gingras A. C. (2012). Affinity-Purification Coupled to Mass Spectrometry: Basic Principles and Strategies. *Proteomics* 12(10): 1576-1590.
- Dunn R. und Hicke L. (2001). Multiple Roles for Rsp5p-Dependent Ubiquitination at the Internalization Step of Endocytosis. *J Biol Chem* 276(28): 25974-25981.
- Dunn T., Gable K. und Beeler T. (1994). Regulation of Cellular Ca²⁺ by Yeast Vacuoles. *J Biol Chem* 269(10): 7273-7278.
- Dziembowski A. und Seraphin B. (2004). Recent Developments in the Analysis of Protein Complexes. *FEBS Lett* 556(1-3): 1-6.

- Ekena K., Vater C. A., Raymond C. K. und Stevens T. H. (1993). The Vps1 Protein Is a Dynamin-Like GTPase Required for Sorting Proteins to the Yeast Vacuole. *Ciba Found Symp* 176: 198-211; discussion 211-194.
- Elbaz-Alon Y., Rosenfeld-Gur E., Shinder V., Futerman A. H., Geiger T. und Schuldiner M. (2014). A Dynamic Interface between Vacuoles and Mitochondria in Yeast. *Dev Cell* 30(1): 95-102.
- Elsasser S., Gali R. R., Schwickart M., Larsen C. N., Leggett D. S., Muller B., Feng M. T., Tubing F., Dittmar G. A. und Finley D. (2002). Proteasome Subunit Rpn1 Binds Ubiquitin-Like Protein Domains. *Nat Cell Biol* 4(9): 725-730.
- Eraso P., Mazon M. J. und Portillo F. (2006). Yeast Protein Kinase Ptk2 Localizes at the Plasma Membrane and Phosphorylates in Vitro the C-Terminal Peptide of the H⁺-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1758(2): 164-170.
- Erdmann F., Jung M., Maurer P., Harsman A., Zimmermann R. und Wagner R. (2010). The Mammalian and Yeast Translocon Complexes Comprise a Characteristic Sec61 Channel. *Biochem Biophys Res Commun* 396(3): 714-720.
- Ermak G. und Davies K. J. (2002). Calcium and Oxidative Stress: From Cell Signaling to Cell Death. *Mol Immunol* 38(10): 713-721.
- Feyder S., De Craene J. O., Bar S., Bertazzi D. L. und Friant S. (2015). Membrane Trafficking in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* Model. *Int J Mol Sci* 16(1): 1509-1525.
- Finkbeiner E., Haindl M. und Muller S. (2011). The SUMO System Controls Nucleolar Partitioning of a Novel Mammalian Ribosome Biogenesis Complex. *EMBO J* 30(6): 1067-1078.
- Fischer M., Schnell N., Chattaway J., Davies P., Dixon G. und Sanders D. (1997). The *Saccharomyces Cerevisiae* Cch1 Gene Is Involved in Calcium Influx and Mating. *FEBS Lett* 419(2-3): 259-262.
- Flockerzi V. (2007). An Introduction on TRP Channels. *Handb Exp Pharmacol*(179): 1-19.
- Frohlich K. U. und Madeo F. (2000). Apoptosis in Yeast--a Monocellular Organism Exhibits Altruistic Behaviour. *FEBS Lett* 473(1): 6-9.
- Gareau J. R. und Lima C. D. (2010). The SUMO Pathway: Emerging Mechanisms That Shape Specificity, Conjugation and Recognition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(12): 861-871.
- Gavin A. C., Aloy P., Grandi P., Krause R., Boesche M., Marzioch M., Rau C., Jensen L. J., Bastuck S., Dumpelfeld B., Edelmann A., Heurtier M. A., Hoffman V., Hoefert C., Klein K., Hudak M., Michon A. M., Schelder M., Schirle M., Remor M., Rudi T., Hooper S., Bauer A., Bouwmeester T., Casari G., Drewes G., Neubauer G., Rick J. M., Kuster B., Bork P., Russell R. B. und Superti-Furga G. (2006). Proteome Survey Reveals Modularity of the Yeast Cell Machinery. *Nature* 440(7084): 631-636.
- Gavin A. C., Bosche M., Krause R., Grandi P., Marzioch M., Bauer A., Schultz J., Rick J. M., Michon A. M., Cruciat C. M., Remor M., Hofert C., Schelder M., Brajenovic M., Ruffner H., Merino A., Klein K., Hudak M., Dickson D., Rudi T., Gnau V., Bauch A., Bastuck S., Huhse B., Leutwein C., Heurtier M. A., Copley R. R., Edelmann A., Querfurth E., Rybin V., Drewes G., Ráda M., Bouwmeester T., Bork P., Seraphin B., Kuster B., Neubauer G. und Superti-Furga G. (2002). Functional Organization of the Yeast Proteome by Systematic Analysis of Protein Complexes. *Nature* 415(6868): 141-147.
- Gavin A. C. und Superti-Furga G. (2003). Protein Complexes and Proteome Organization from Yeast to Man. *Curr Opin Chem Biol* 7(1): 21-27.
- Gees M., Colsoul B. und Nilius B. (2010). The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca²⁺ Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(10): a003962.

- Geiss-Friedlander R. und Melchior F. (2007). Concepts in Sumoylation: A Decade On. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(12): 947-956.
- Ghaemmaghami S., Huh W. K., Bower K., Howson R. W., Belle A., Dephoure N., O'shea E. K. und Weissman J. S. (2003). Global Analysis of Protein Expression in Yeast. *Nature* 425(6959): 737-741.
- Ghezzi P. (2005). Regulation of Protein Function by Glutathionylation. *Free Radic Res* 39(6): 573-580.
- Ghosh H., Auguadri L., Battaglia S., Simone Thirouin Z., Zemoura K., Messner S., Acuna M. A., Wildner H., Yevenes G. E., Dieter A., Kawasaki H., M O. H., Zeilhofer H. U., Fritschy J. M. und Tyagarajan S. K. (2016). Several Posttranslational Modifications Act in Concert to Regulate Gephyrin Scaffolding and GABAergic Transmission. *Nat Commun* 7: 13365.
- Giot L., Bader J. S., Brouwer C., Chaudhuri A., Kuang B., Li Y., Hao Y. L., Ooi C. E., Godwin B., Vitols E., Vijayadamar G., Pochart P., Machineni H., Welsh M., Kong Y., Zerhusen B., Malcolm R., Varrone Z., Collis A., Minto M., Burgess S., Mcdaniel L., Stimpson E., Spriggs F., Williams J., Neurath K., Ioime N., Agee M., Voss E., Furtak K., Renzulli R., Aanensen N., Carrola S., Bickelhaupt E., Lazovatsky Y., Dasilva A., Zhong J., Stanyon C. A., Finley R. L., Jr., White K. P., Braverman M., Jarvie T., Gold S., Leach M., Knight J., Shimkets R. A., Mckenna M. P., Chant J. und Rothberg J. M. (2003). A Protein Interaction Map of *Drosophila Melanogaster*. *Science* 302(5651): 1727-1736.
- Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H. und Oliver S. G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science* 274(5287): 546-567.
- Golebiowski F., Matic I., Tatham M. H., Cole C., Yin Y., Nakamura A., Cox J., Barton G. J., Mann M. und Hay R. T. (2009). System-Wide Changes to SUMO Modifications in Response to Heat Shock. *Sci Signal* 2(72): ra24.
- Grant C. M. (2001). Role of the Glutathione/Glutaredoxin and Thioredoxin Systems in Yeast Growth and Response to Stress Conditions. *Mol Microbiol* 39(3): 533-541.
- Greiner M., Caesar S. und Schlenstedt G. (2004). The Histones H2a/H2b and H3/H4 Are Imported into the Yeast Nucleus by Different Mechanisms. *Eur J Cell Biol* 83(10): 511-520.
- Groppi S., Belotti F., Brandao R. L., Martegani E. und Tisi R. (2011). Glucose-Induced Calcium Influx in Budding Yeast Involves a Novel Calcium Transport System and Can Activate Calcineurin. *Cell Calcium* 49(6): 376-386.
- Guan Q., Haroon S., Bravo D. G., Will J. L. und Gasch A. P. (2012). Cellular Memory of Acquired Stress Resistance in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics* 192(2): 495-505.
- Hanahan D. (1983). Studies on Transformation of *Escherichia Coli* with Plasmids. *J Mol Biol* 166(4): 557-580.
- Hannich J. T., Lewis A., Kroetz M. B., Li S. J., Heide H., Emili A. und Hochstrasser M. (2005). Defining the SUMO-Modified Proteome by Multiple Approaches in *Saccharomyces Cerevisiae*. *J Biol Chem* 280(6): 4102-4110.
- Hardie R. C. und Minke B. (1992). The TRP Gene Is Essential for a Light-Activated Ca²⁺ Channel in *Drosophila* Photoreceptors. *Neuron* 8(4): 643-651.
- Hayden J., Williams M., Granich A., Ahn H., Tenay B., Lukehart J., Highfill C., Dobard S. und Kim K. (2013). Vps1 in the Late Endosome-to-Vacuole Traffic. *J Biosci* 38(1): 73-83.
- Henley J. M., Craig T. J. und Wilkinson K. A. (2014). Neuronal Sumoylation: Mechanisms, Physiology, and Roles in Neuronal Dysfunction. *Physiol Rev* 94(4): 1249-1285.
- Hicke L. (1997). Ubiquitin-Dependent Internalization and Down-Regulation of Plasma Membrane Proteins. *FASEB J* 11(14): 1215-1226.

- Hietakangas V., Anckar J., Blomster H. A., Fujimoto M., Palvimo J. J., Nakai A. und Sistonen L. (2006). PDSM, a Motif for Phosphorylation-Dependent SUMO Modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(1): 45-50.
- Hochstrasser M. (2009). Origin and Function of Ubiquitin-Like Proteins. *Nature* 458(7237): 422-429.
- Hoegel C., Pfander B., Moldovan G. L., Pyrowolakis G. und Jentsch S. (2002). Rad6-Dependent DNA Repair Is Linked to Modification of PCNA by Ubiquitin and SUMO. *Nature* 419(6903): 135-141.
- Hoelz A., Debler E. W. und Blobel G. (2011). The Structure of the Nuclear Pore Complex. *Annu Rev Biochem* 80: 613-643.
- Hohmann S. (2002). Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(2): 300-372.
- Iida H., Nakamura H., Ono T., Okumura M. S. und Anraku Y. (1994). Mid1, a Novel *Saccharomyces Cerevisiae* Gene Encoding a Plasma Membrane Protein, Is Required for Ca²⁺ Influx and Mating. *Mol Cell Biol* 14(12): 8259-8271.
- Iida H., Yagawa Y. und Anraku Y. (1990). Essential Role for Induced Ca²⁺ Influx Followed by [Ca²⁺]_i Rise in Maintaining Viability of Yeast Cells Late in the Mating Pheromone Response Pathway. A Study of [Ca²⁺]_i in Single *Saccharomyces Cerevisiae* Cells with Imaging of Fura-2. *J Biol Chem* 265(22): 13391-13399.
- Ingrell C. R., Miller M. L., Jensen O. N. und Blom N. (2007). Netphosyeast: Prediction of Protein Phosphorylation Sites in Yeast. *Bioinformatics* 23(7): 895-897.
- Jarmoszewicz K., Lukasiak K., Riezman H. und Kaminska J. (2012). Rsp5 Ubiquitin Ligase Is Required for Protein Trafficking in *Saccharomyces Cerevisiae* COPI Mutants. *PLoS One* 7(6): e39582.
- Jha A., Sharma P., Anaparti V., Ryu M. H. und Halayko A. J. (2015). A Role for Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Cation Channel (TRPA1) in Airway Hyper-Responsiveness? *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 93(3): 171-176.
- Jin N., Mao K., Jin Y., Tevzadze G., Kauffman E. J., Park S., Bridges D., Loewith R., Saltiel A. R., Klionsky D. J. und Weisman L. S. (2014). Roles for Pi(3,5)P₂ in Nutrient Sensing through Torc1. *Mol Biol Cell* 25(7): 1171-1185.
- John Haynes W., Zhou X. L., Su Z. W., Loukin S. H., Saimi Y. und Kung C. (2008). Indole and Other Aromatic Compounds Activate the Yeast TRPY1 Channel. *FEBS Lett* 582(10): 1514-1518.
- Johnson E. S. (2004). Protein Modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73: 355-382.
- Johnson E. S. und Blobel G. (1997). Ubc9p Is the Conjugating Enzyme for the Ubiquitin-Like Protein Smt3p. *J Biol Chem* 272(43): 26799-26802.
- Johnson E. S. und Blobel G. (1999). Cell Cycle-Regulated Attachment of the Ubiquitin-Related Protein SUMO to the Yeast Septins. *J Cell Biol* 147(5): 981-994.
- Johnson E. S. und Gupta A. A. (2001). An E3-Like Factor That Promotes SUMO Conjugation to the Yeast Septins. *Cell* 106(6): 735-744.
- Johnson E. S., Schwienhorst I., Dohmen R. J. und Blobel G. (1997). The Ubiquitin-Like Protein Smt3p Is Activated for Conjugation to Other Proteins by an Aos1p/Uba2p Heterodimer. *EMBO J* 16(18): 5509-5519.
- Kerscher O. (2007). SUMO Junction-What's Your Function? New Insights through SUMO-Interacting Motifs. *EMBO Rep* 8(6): 550-555.

- Kerscher O., Felberbaum R. und Hochstrasser M. (2006). Modification of Proteins by Ubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22: 159-180.
- Klatt P. und Lamas S. (2000). Regulation of Protein Function by S-Glutathiolation in Response to Oxidative and Nitrosative Stress. *Eur J Biochem* 267(16): 4928-4944.
- Klionsky D. J., Herman P. K. und Emr S. D. (1990). The Fungal Vacuole: Composition, Function, and Biogenesis. *Microbiol Rev* 54(3): 266-292.
- Konopacki F. A., Jaafari N., Rocca D. L., Wilkinson K. A., Chamberlain S., Rubin P., Kantamneni S., Mellor J. R. und Henley J. M. (2011). Agonist-Induced PKC Phosphorylation Regulates Gluk2 Sumoylation and Kainate Receptor Endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(49): 19772-19777.
- Kotlyar M., Pastrello C., Pivetta F., Lo Sardo A., Cumbaa C., Li H., Naranian T., Niu Y., Ding Z., Vafaei F., Broackes-Carter F., Petschnigg J., Mills G. B., Jurisicova A., Stagljar I., Maestro R. und Jurisica I. (2015). In Silico Prediction of Physical Protein Interactions and Characterization of Interactome Orphans. *Nat Methods* 12(1): 79-84.
- Kruse M., Schulze-Bahr E., Corfield V., Beckmann A., Stallmeyer B., Kurtbay G., Xfc, Ven, Ohmert I., Schulze-Bahr E., Brink P. und Pongs O. (2009). Impaired Endocytosis of the Ion Channel TRPM4 Is Associated with Human Progressive Familial Heart Block Type I. *The Journal of Clinical Investigation* 119(9): 2737-2744.
- Kulak N. A., Pichler G., Paron I., Nagaraj N. und Mann M. (2014). Minimal, Encapsulated Proteomic-Sample Processing Applied to Copy-Number Estimation in Eukaryotic Cells. *Nat Meth* 11(3): 319-324.
- Kurepa J., Walker J. M., Smalle J., Gosink M. M., Davis S. J., Durham T. L., Sung D. Y. und Vierstra R. D. (2003). The Small Ubiquitin-Like Modifier (SUMO) Protein Modification System in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 Conjugates Is Increased by Stress. *J Biol Chem* 278(9): 6862-6872.
- Kwan H. Y., Huang Y. und Yao X. (2004). Regulation of Canonical Transient Receptor Potential Isoform 3 (TRPC3) Channel by Protein Kinase G. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(8): 2625-2630.
- Lalonde S., Ehrhardt D. W., Loque D., Chen J., Rhee S. Y. und Frommer W. B. (2008). Molecular and Cellular Approaches for the Detection of Protein-Protein Interactions: Latest Techniques and Current Limitations. *Plant J* 53(4): 610-635.
- Lauwers E., Erpapazoglou Z., Haguenaer-Tsapis R. und Andre B. (2010). The Ubiquitin Code of Yeast Permease Trafficking. *Trends Cell Biol* 20(4): 196-204.
- Lesage G., Sdicu A. M., Menard P., Shapiro J., Hussein S. und Bussey H. (2004). Analysis of Beta-1,3-Glucan Assembly in *Saccharomyces Cerevisiae* Using a Synthetic Interaction Network and Altered Sensitivity to Caspofungin. *Genetics* 167(1): 35-49.
- Lewicki M. C., Srikumar T., Johnson E. und Raught B. (2015). The *S. Cerevisiae* SUMO Stress Response Is a Conjugation-Deconjugation Cycle That Targets the Transcription Machinery. *J Proteomics* 118: 39-48.
- Li L., Hasan R. und Zhang X. (2014). The Basal Thermal Sensitivity of the TRPV1 Ion Channel Is Determined by PKC β 1. *J Neurosci* 34(24): 8246-8258.
- Li S. J. und Hochstrasser M. (2000). The Yeast Ulp2 (Smt4) Gene Encodes a Novel Protease Specific for the Ubiquitin-Like Smt3 Protein. *Mol Cell Biol* 20(7): 2367-2377.
- Longtine M. S., Mckenzie A., 3rd, Demarini D. J., Shah N. G., Wach A., Brachat A., Philippsen P. und Pringle J. R. (1998). Additional Modules for Versatile and Economical Pcr-Based Gene Deletion and Modification in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Yeast* 14(10): 953-961.

- Loukin S., Zhou X., Kung C. und Saimi Y. (2008). A Genome-Wide Survey Suggests an Osmoprotective Role for Vacuolar Ca²⁺ Release in Cell Wall-Compromised Yeast. *FASEB J* 22(7): 2405-2415.
- Maayan I. und Engelberg D. (2009). The Yeast MAPK Hog1 Is Not Essential for Immediate Survival under Osmostress. *FEBS Lett* 583(12): 2015-2020.
- Madeo F., Frohlich E., Ligr M., Grey M., Sigrist S. J., Wolf D. H. und Frohlich K. U. (1999). Oxygen Stress: A Regulator of Apoptosis in Yeast. *J Cell Biol* 145(4): 757-767.
- Manza L. L., Codreanu S. G., Stamer S. L., Smith D. L., Wells K. S., Roberts R. L. und Liebler D. C. (2004). Global Shifts in Protein Sumoylation in Response to Electrophile and Oxidative Stress. *Chem Res Toxicol* 17(12): 1706-1715.
- Matsumoto T. K., Ellsmore A. J., Cessna S. G., Low P. S., Pardo J. M., Bressan R. A. und Hasegawa P. M. (2002). An Osmotically Induced Cytosolic Ca²⁺ Transient Activates Calcineurin Signaling to Mediate Ion Homeostasis and Salt Tolerance of *Saccharomyces Cerevisiae*. *J Biol Chem* 277(36): 33075-33080.
- Matunis M. J., Wu J. und Blobel G. (1998). SUMO-1 Modification and Its Role in Targeting the Ran GTPase-Activating Protein, RanGAP1, to the Nuclear Pore Complex. *J Cell Biol* 140(3): 499-509.
- Mcconkey D. J. und Orrenius S. (1997). The Role of Calcium in the Regulation of Apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 239(2): 357-366.
- McNulty A. L., Leddy H. A., Liedtke W. und Guilak F. (2015). TRPV4 as a Therapeutic Target for Joint Diseases. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 388(4): 437-450.
- Melchior F. (2000). SUMO--Nonclassical Ubiquitin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 591-626.
- Meluh P. B. und Koshland D. (1995). Evidence That the Mif2 Gene of *Saccharomyces Cerevisiae* Encodes a Centromere Protein with Homology to the Mammalian Centromere Protein Cenp-C. *Mol Biol Cell* 6(7): 793-807.
- Miller J. P., Lo R. S., Ben-Hur A., Desmarais C., Stagljar I., Noble W. S. und Fields S. (2005). Large-Scale Identification of Yeast Integral Membrane Protein Interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(34): 12123-12128.
- Minke B. (1977). *Drosophila* Mutant with a Transducer Defect. *Biophys Struct Mech* 3(1): 59-64.
- Minty A., Dumont X., Kaghad M. und Caput D. (2000). Covalent Modification of P73alpha by SUMO-1. Two-Hybrid Screening with P73 Identifies Novel SUMO-1-Interacting Proteins and a SUMO-1 Interaction Motif. *J Biol Chem* 275(46): 36316-36323.
- Miseta A., Kellermayer R., Aiello D. P., Fu L. und Bedwell D. M. (1999). The Vacuolar Ca²⁺/H⁺ Exchanger Vcx1p/Hum1p Tightly Controls Cytosolic Ca²⁺ Levels in *S. Cerevisiae*. *FEBS Lett* 451(2): 132-136.
- Montell C., Jones K., Hafen E. und Rubin G. (1985). Rescue of the *Drosophila* Phototransduction Mutation Trp by Germline Transformation. *Science* 230(4729): 1040-1043.
- Montell C. und Rubin G. M. (1989). Molecular Characterization of the *Drosophila* Trp Locus: A Putative Integral Membrane Protein Required for Phototransduction. *Neuron* 2(4): 1313-1323.
- Muller E. M., Mackin N. A., Erdman S. E. und Cunningham K. W. (2003). Fig1p Facilitates Ca²⁺ Influx and Cell Fusion During Mating of *Saccharomyces Cerevisiae*. *J Biol Chem* 278(40): 38461-38469.
- Muller S., Hoegge C., Pyrowolakis G. und Jentsch S. (2001). SUMO, Ubiquitin's Mysterious Cousin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3): 202-210.

- Nabais R. C., Sá-Correia I., Viegas C. A. und Novais J. M. (1988). Influence of Calcium Ion on Ethanol Tolerance of *Saccharomyces Bayanus* and Alcoholic Fermentation by Yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 54(10): 2439-2446.
- Neubauer G., King A., Rappsilber J., Calvio C., Watson M., Ajuh P., Sleeman J., Lamond A. und Mann M. (1998). Mass Spectrometry and Est-Database Searching Allows Characterization of the Multi-Protein Spliceosome Complex. *Nat Genet* 20(1): 46-50.
- Nilius B. und Owsianik G. (2010). Transient Receptor Potential Channelopathies. *Pflugers Arch* 460(2): 437-450.
- Nilius B. und Szallasi A. (2014). Transient Receptor Potential Channels as Drug Targets: From the Science of Basic Research to the Art of Medicine. *Pharmacol Rev* 66(3): 676-814.
- O'donnell A. F., Mccartney R. R., Chandrashekarappa D. G., Zhang B. B., Thorner J. und Schmidt M. C. (2015). 2-Deoxyglucose Impairs *Saccharomyces Cerevisiae* Growth by Stimulating Snf1-Regulated and Alpha-Arrestin-Mediated Trafficking of Hexose Transporters 1 and 3. *Mol Cell Biol* 35(6): 939-955.
- Oeser M. L., Amen T., Nadel C. M., Bradley A. I., Reed B. J., Jones R. D., Gopalan J., Kaganovich D. und Gardner R. G. (2016). Dynamic Sumoylation of a Conserved Transcription Corepressor Prevents Persistent Inclusion Formation During Hyperosmotic Stress. *PLoS Genet* 12(1): e1005809.
- Owsianik G., D'hoedt D., Voets T. und Nilius B. (2006a). Structure-Function Relationship of the TRP Channel Superfamily. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 156: 61-90.
- Owsianik G., Talavera K., Voets T. und Nilius B. (2006b). Permeation and Selectivity of TRP Channels. *Annu Rev Physiol* 68: 685-717.
- Palmer C. P., Aydar E. und Djamgoz M. B. (2005). A Microbial TRP-Like Polycystic-Kidney-Disease-Related Ion Channel Gene. *Biochem J* 387(Pt 1): 211-219.
- Palmer C. P., Zhou X. L., Lin J., Loukin S. H., Kung C. und Saimi Y. (2001). A TRP Homolog in *Saccharomyces Cerevisiae* Forms an Intracellular Ca²⁺-Permeable Channel in the Yeast Vacuolar Membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(14): 7801-7805.
- Palmgren M. G. und Axelsen K. B. (1998). Evolution of P-Type ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1365(1-2): 37-45.
- Panse V. G., Hardeland U., Werner T., Kuster B. und Hurt E. (2004). A Proteome-Wide Approach Identifies Sumoylated Substrate Proteins in Yeast. *J Biol Chem* 279(40): 41346-41351.
- Panse V. G., Kressler D., Pauli A., Petfalski E., Gnadig M., Tollervey D. und Hurt E. (2006). Formation and Nuclear Export of Preribosomes Are Functionally Linked to the Small-Ubiquitin-Related Modifier Pathway. *Traffic* 7(10): 1311-1321.
- Pastrello C., Pasini E., Kotlyar M., Otasek D., Wong S., Sangrar W., Rahmati S. und Jurisica I. (2014). Integration, Visualization and Analysis of Human Interactome. *Biochem Biophys Res Commun* 445(4): 757-773.
- Pedersen S. F., Owsianik G. und Nilius B. (2005). TRP Channels: An Overview. *Cell Calcium* 38(3-4): 233-252.
- Peiter E., Fischer M., Sidaway K., Roberts S. K. und Sanders D. (2005). The *Saccharomyces Cerevisiae* Ca²⁺ Channel Cch1pMid1p Is Essential for Tolerance to Cold Stress and Iron Toxicity. *FEBS Lett* 579(25): 5697-5703.
- Pemberton L. F. und Paschal B. M. (2005). Mechanisms of Receptor-Mediated Nuclear Import and Nuclear Export. *Traffic* 6(3): 187-198.
- Perry J. J., Tainer J. A. und Boddy M. N. (2008). A SIM-Ultaneous Role for SUMO and Ubiquitin. *Trends Biochem Sci* 33(5): 201-208.

- Pfander B., Moldovan G. L., Sacher M., Hoege C. und Jentsch S. (2005). SUMO-Modified PCNA Recruits Srs2 to Prevent Recombination During S Phase. *Nature* 436(7049): 428-433.
- Piebler J. (2005). New Methodologies for Measuring Protein Interactions in Vivo and in Vitro. *Curr Opin Struct Biol* 15(1): 4-14.
- Plant L. D., Dementieva I. S., Kollwe A., Olikara S., Marks J. D. und Goldstein S. A. (2010). One SUMO Is Sufficient to Silence the Dimeric Potassium Channel K2p1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(23): 10743-10748.
- Plant L. D., Dowdell E. J., Dementieva I. S., Marks J. D. und Goldstein S. A. (2011). SUMO Modification of Cell Surface Kv2.1 Potassium Channels Regulates the Activity of Rat Hippocampal Neurons. *J Gen Physiol* 137(5): 441-454.
- Popa C. V., Dumitru I., Ruta L. L., Danet A. F. und Farcasanu I. C. (2010). Exogenous Oxidative Stress Induces Ca²⁺ Release in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *FEBS J* 277(19): 4027-4038.
- Portillo F. (2000). Regulation of Plasma Membrane H(+)-ATPase in Fungi and Plants. *Biochim Biophys Acta* 1469(1): 31-42.
- Prudden J., Pebernard S., Raffa G., Slavin D. A., Perry J. J., Tainer J. A., McGowan C. H. und Boddy M. N. (2007). SUMO-Targeted Ubiquitin Ligases in Genome Stability. *EMBO J* 26(18): 4089-4101.
- Puig O., Caspary F., Rigaut G., Rutz B., Bouveret E., Bragado-Nilsson E., Wilm M. und Seraphin B. (2001). The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *Methods* 24(3): 218-229.
- Qi Y., Wang J., Bomben V. C., Li D. P., Chen S. R., Sun H., Xi Y., Reed J. G., Cheng J., Pan H. L., Noebels J. L. und Yeh E. T. (2014). Hyper-Sumoylation of the Kv7 Potassium Channel Diminishes the M-Current Leading to Seizures and Sudden Death. *Neuron* 83(5): 1159-1171.
- Rajan S., Plant L. D., Rabin M. L., Butler M. H. und Goldstein S. A. (2005). Sumoylation Silences the Plasma Membrane Leak K⁺ Channel K2p1. *Cell* 121(1): 37-47.
- Ralsler M., Kuhl H., Werber M., Lehrach H., Breitenbach M. und Timmermann B. (2012). The *Saccharomyces Cerevisiae* W303-K6001 Cross-Platform Genome Sequence: Insights into Ancestry and Physiology of a Laboratory Mutt. *Open Biol* 2(8): 120093.
- Rangasamy D., Woytek K., Khan S. A. und Wilson V. G. (2000). SUMO-1 Modification of Bovine Papillomavirus E1 Protein Is Required for Intracellular Accumulation. *J Biol Chem* 275(48): 37999-38004.
- Rigamonti M., Groppi S., Belotti F., Ambrosini R., Filippi G., Martegani E. und Tisi R. (2015). Hypotonic Stress-Induced Calcium Signaling in *Saccharomyces Cerevisiae* Involves TRP-Like Transporters on the Endoplasmic Reticulum Membrane. *Cell Calcium* 57(2): 57-68.
- Rigaut G., Shevchenko A., Rutz B., Wilm M., Mann M. und Seraphin B. (1999). A Generic Protein Purification Method for Protein Complex Characterization and Proteome Exploration. *Nat Biotechnol* 17(10): 1030-1032.
- Rothenbusch U., Sawatzki M., Chang Y., Caesar S. und Schlenstedt G. (2012). Sumoylation Regulates Kap114-Mediated Nuclear Transport. *EMBO J* 31(11): 2461-2472.
- Ruta L. L., Popa C. V., Nicolau I. und Farcasanu I. C. (2016). Calcium Signaling and Copper Toxicity in *Saccharomyces Cerevisiae* Cells. *Environ Sci Pollut Res Int* 23(24): 24514-24526.
- Ruta L. L., Popa V. C., Nicolau I., Danet A. F., Iordache V., Neagoe A. D. und Farcasanu I. C. (2014). Calcium Signaling Mediates the Response to Cadmium Toxicity in *Saccharomyces Cerevisiae* Cells. *FEBS Lett* 588(17): 3202-3212.

- Saito H. und Posas F. (2012). Response to Hyperosmotic Stress. *Genetics* 192(2): 289-318.
- Schlecht U., Miranda M., Suresh S., Davis R. W. und St Onge R. P. (2012). Multiplex Assay for Condition-Dependent Changes in Protein-Protein Interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(23): 9213-9218.
- Schreiber M. und Salkoff L. (1997). A Novel Calcium-Sensing Domain in the Bk Channel. *Biophysical Journal* 73(3): 1355-1363.
- Schwienhorst I., Johnson E. S. und Dohmen R. J. (2000). SUMO Conjugation and Deconjugation. *Mol Gen Genet* 263(5): 771-786.
- Shalizi A., Gaudilliere B., Yuan Z., Stegmuller J., Shirogane T., Ge Q., Tan Y., Schulman B., Harper J. W. und Bonni A. (2006). A Calcium-Regulated Mef2 Sumoylation Switch Controls Postsynaptic Differentiation. *Science* 311(5763): 1012-1017.
- Shapovalov G., Ritaine A., Skryma R. und Prevarskaya N. (2016). Role of TRP Ion Channels in Cancer and Tumorigenesis. *Semin Immunopathol* 38(3): 357-369.
- Sharifpoor S., Van Dyk D., Costanzo M., Baryshnikova A., Friesen H., Douglas A. C., Youn J. Y., Vandersluis B., Myers C. L., Papp B., Boone C. und Andrews B. J. (2012). Functional Wiring of the Yeast Kinome Revealed by Global Analysis of Genetic Network Motifs. *Genome Res* 22(4): 791-801.
- Shen T. H., Lin H. K., Scaglioni P. P., Yung T. M. und Pandolfi P. P. (2006). The Mechanisms of PML-Nuclear Body Formation. *Mol Cell* 24(3): 331-339.
- Shin S. H., Lee E. J., Chun J., Hyun S. und Kang S. S. (2015). Phosphorylation on TRPV4 Serine 824 Regulates Interaction with STIM1. *Open Biochem J* 9: 24-33.
- Sikorski R. S. und Hieter P. (1989). A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Genetics* 122(1): 19-27.
- Sipling T., Zhai C. und Panaretou B. (2011). *Emw1p/Ynl313cp* Is Essential for Maintenance of the Cell Wall in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiology* 157(Pt 4): 1032-1041.
- Snowdon C. und Van Der Merwe G. (2012). Regulation of Hxt3 and Hxt7 Turnover Converges on the Vid30 Complex and Requires Inactivation of the Ras/cAmp/PKA Pathway in *Saccharomyces Cerevisiae*. *PLoS One* 7(12): e50458.
- Solsbacher J., Maurer P., Vogel F. und Schlenstedt G. (2000). Nup2p, a Yeast Nucleoporin, Functions in Bidirectional Transport of Importin Alpha. *Mol Cell Biol* 20(22): 8468-8479.
- Song J., Durrin L. K., Wilkinson T. A., Krontiris T. G. und Chen Y. (2004). Identification of a SUMO-Binding Motif That Recognizes SUMO-Modified Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(40): 14373-14378.
- Stade K., Vogel F., Schwienhorst I., Meusser B., Volkwein C., Nentwig B., Dohmen R. J. und Sommer T. (2002). A Lack of SUMO Conjugation Affects cNLS-Dependent Nuclear Protein Import in Yeast. *J Biol Chem* 277(51): 49554-49561.
- Stawiecka-Mirota M., Pokrzywa W., Morvan J., Zoladek T., Haguenaer-Tsapis R., Urban-Grimal D. und Morsomme P. (2007). Targeting of Sna3p to the Endosomal Pathway Depends on Its Interaction with Rsp5p and Multivesicular Body Sorting on Its Ubiquitylation. *Traffic* 8(9): 1280-1296.
- Su Z., Zhou X., Haynes W. J., Loukin S. H., Anishkin A., Saimi Y. und Kung C. (2007). Yeast Gain-of-Function Mutations Reveal Structure-Function Relationships Conserved among Different Subfamilies of Transient Receptor Potential Channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(49): 19607-19612.

- Su Z., Zhou X., Loukin S. H., Haynes W. J., Saimi Y. und Kung C. (2009a). The Use of Yeast to Understand TRP-Channel Mechanosensitivity. *Pflugers Arch* 458(5): 861-867.
- Su Z., Zhou X., Loukin S. H., Saimi Y. und Kung C. (2009b). Mechanical Force and Cytoplasmic Ca²⁺ Activate Yeast TRPY1 in Parallel. *J Membr Biol* 227(3): 141-150.
- Sydorsky Y., Srikumar T., Jeram S. M., Wheaton S., Vizeacoumar F. J., Makhnevych T., Chong Y. T., Gingras A. C. und Raught B. (2010). A Novel Mechanism for SUMO System Control: Regulated Ulp1 Nucleolar Sequestration. *Mol Cell Biol* 30(18): 4452-4462.
- Takahashi H., Hatakeyama S., Saitoh H. und Nakayama K. I. (2005). Noncovalent SUMO-1 Binding Activity of Thymine DNA Glycosylase (TDG) Is Required for Its SUMO-1 Modification and Colocalization with the Promyelocytic Leukemia Protein. *J Biol Chem* 280(7): 5611-5621.
- Takahashi Y. (2003). Comparative Analysis of Yeast PIAS-Type SUMO Ligases in Vivo and in Vitro. *Journal of Biochemistry* 133(4): 415-422.
- Tarassov K., Messier V., Landry C. R., Radinovic S., Serna Molina M. M., Shames I., Malitskaya Y., Vogel J., Bussey H. und Michnick S. W. (2008). An in Vivo Map of the Yeast Protein Interactome. *Science* 320(5882): 1465-1470.
- Tempe D., Piechaczyk M. und Bossis G. (2008). SUMO under Stress. *Biochem Soc Trans* 36(Pt 5): 874-878.
- Tisi R., Belotti F., Wera S., Winderickx J., Thevelein J. M. und Martegani E. (2004). Evidence for Inositol Triphosphate as a Second Messenger for Glucose-Induced Calcium Signalling in Budding Yeast. *Curr Genet* 45(2): 83-89.
- Trebak M., Hempel N., Wedel B. J., Smyth J. T., Bird G. S. und Putney J. W., Jr. (2005). Negative Regulation of TRPC3 Channels by Protein Kinase C-Mediated Phosphorylation of Serine 712. *Mol Pharmacol* 67(2): 558-563.
- Tropia M. J., Cardoso A. S., Tisi R., Fietto L. G., Fietto J. L., Martegani E., Castro I. M. und Brandao R. L. (2006). Calcium Signaling and Sugar-Induced Activation of Plasma Membrane H⁺-ATPase in *Saccharomyces Cerevisiae* Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 343(4): 1234-1243.
- Trousdale C. und Kim K. (2015). Retromer: Structure, Function, and Roles in Mammalian Disease. *Eur J Cell Biol* 94(11): 513-521.
- Uetz P., Giot L., Cagney G., Mansfield T. A., Judson R. S., Knight J. R., Lockshon D., Narayan V., Srinivasan M., Pochart P., Qureshi-Emili A., Li Y., Godwin B., Conover D., Kalbfleisch T., Vijayadamar G., Yang M., Johnston M., Fields S. und Rothberg J. M. (2000). A Comprehensive Analysis of Protein-Protein Interactions in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Nature* 403(6770): 623-627.
- Ulrich H. D. (2005). Mutual Interactions between the SUMO and Ubiquitin Systems: A Plea of No Contest. *Trends Cell Biol* 15(10): 525-532.
- Ulrich H. D. (2008). The Fast-Growing Business of SUMO Chains. *Mol Cell* 32(3): 301-305.
- Vazquez G., Wedel B. J., Kawasaki B. T., Bird G. S. und Putney J. W., Jr. (2004). Obligatory Role of Src Kinase in the Signaling Mechanism for TRPC3 Cation Channels. *J Biol Chem* 279(39): 40521-40528.
- Venkatachalam K., Luo J. und Montell C. (2014). Evolutionarily Conserved, Multitasking TRP Channels: Lessons from Worms and Flies. *Handb Exp Pharmacol* 223: 937-962.
- Vernet T., Dignard D. und Thomas D. Y. (1987). A Family of Yeast Expression Vectors Containing the Phage F1 Intergenic Region. *Gene* 52(2-3): 225-233.

- Viladevall L., Serrano R., Ruiz A., Domenech G., Giraldo J., Barcelo A. und Arino J. (2004). Characterization of the Calcium-Mediated Response to Alkaline Stress in *Saccharomyces Cerevisiae*. *J Biol Chem* 279(42): 43614-43624.
- Vitaliano-Prunier A., Menant A., Hobeika M., Geli V., Gwizdek C. und Dargemont C. (2008). Ubiquitylation of the Compass Component Swd2 Links H2b Ubiquitylation to H3k4 Trimethylation. *Nat Cell Biol* 10(11): 1365-1371.
- Voolstra O. und Huber A. (2014). Post-Translational Modifications of TRP Channels. *Cells* 3(2): 258-287.
- Wada Y., Ohsumi Y., Tanifuji M., Kasai M. und Anraku Y. (1987). Vacuolar Ion Channel of the Yeast, *Saccharomyces Cerevisiae*. *J Biol Chem* 262(36): 17260-17263.
- Wang L., Ma Q., Yang W., Mackensen G. B. und Paschen W. (2012a). Moderate Hypothermia Induces Marked Increase in Levels and Nuclear Accumulation of SUMO2/3-Conjugated Proteins in Neurons. *J Neurochem* 123(3): 349-359.
- Wang Y., Zhang X., Zhang H., Lu Y., Huang H., Dong X., Chen J., Dong J., Yang X., Hang H. und Jiang T. (2012b). Coiled-Coil Networking Shapes Cell Molecular Machinery. *Mol Biol Cell* 23(19): 3911-3922.
- Wasik U. und Filipek A. (2014). Non-Nuclear Function of Sumoylated Proteins. *Biochim Biophys Acta* 1843(12): 2878-2885.
- Watanabe H., Murakami M., Ohba T., Takahashi Y. und Ito H. (2008). TRP Channel and Cardiovascular Disease. *Pharmacol Ther* 118(3): 337-351.
- Westfall P. J., Ballou D. R. und Thorner J. (2004). When the Stress of Your Environment Makes You Go Hog Wild. *Science* 306(5701): 1511-1512.
- Wilkinson K. A. und Henley J. M. (2010). Mechanisms, Regulation and Consequences of Protein Sumoylation. *Biochem J* 428(2): 133-145.
- Wilkinson K. A., Nakamura Y. und Henley J. M. (2010). Targets and Consequences of Protein Sumoylation in Neurons. *Brain Res Rev* 64(1): 195-212.
- Xiao Y., Pollack D., Nieves E., Winchell A., Callaway M. und Vigodner M. (2015). Can Your Protein Be Sumoylated? A Quick Summary and Important Tips to Study SUMO-Modified Proteins. *Anal Biochem* 477: 95-97.
- Yamamoto S., Wajima T., Hara Y., Nishida M. und Mori Y. (2007). Transient Receptor Potential Channels in Alzheimer's Disease. *Biochim Biophys Acta* 1772(8): 958-967.
- Yu Q., Zhang B., Yang B., Chen J., Wang H., Jia C., Ding X., Xu N., Dong Y., Xing L. und Li M. (2014). Interaction among the Vacuole, the Mitochondria, and the Oxidative Stress Response Is Governed by the Transient Receptor Potential Channel in *Candida Albicans*. *Free Radic Biol Med* 77: 152-167.
- Yu X., Breitman M. und Goldberg J. (2012). A Structure-Based Mechanism for Arf1-Dependent Recruitment of Coatamer to Membranes. *Cell* 148(3): 530-542.
- Yunus A. A. und Lima C. D. (2009). Purification of SUMO Conjugating Enzymes and Kinetic Analysis of Substrate Conjugation. *Methods Mol Biol* 497: 167-186.
- Zhang N., Gardner D. C., Oliver S. G. und Stateva L. I. (1999). Down-Regulation of the Expression of PKC1 and *Srb1/Psa1/Vig9*, Two Genes Involved in Cell Wall Integrity in *Saccharomyces Cerevisiae*, Causes Flocculation. *Microbiology* 145 (Pt 2): 309-316.

- Zhao Q., Xie Y., Zheng Y., Jiang S., Liu W., Mu W., Liu Z., Zhao Y., Xue Y. und Ren J. (2014). GPS-SUMO: A Tool for the Prediction of Sumoylation Sites and SUMO-Interaction Motifs. *Nucleic Acids Res* 42(Web Server issue): W325-330.
- Zhao X. und Blobel G. (2005). A SUMO Ligase Is Part of a Nuclear Multiprotein Complex That Affects DNA Repair and Chromosomal Organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(13): 4777-4782.
- Zhivotovsky B. und Orrenius S. (2011). Calcium and Cell Death Mechanisms: A Perspective from the Cell Death Community. *Cell Calcium* 50(3): 211-221.
- Zhou W., Ryan J. J. und Zhou H. (2004). Global Analyses of Sumoylated Proteins in *Saccharomyces Cerevisiae*. Induction of Protein Sumoylation by Cellular Stresses. *J Biol Chem* 279(31): 32262-32268.
- Zhou X., Su Z., Anishkin A., Haynes W. J., Friske E. M., Loukin S. H., Kung C. und Saimi Y. (2007). Yeast Screens Show Aromatic Residues at the End of the Sixth Helix Anchor Transient Receptor Potential Channel Gate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(39): 15555-15559.
- Zhou X. L., Batiza A. F., Loukin S. H., Palmer C. P., Kung C. und Saimi Y. (2003). The Transient Receptor Potential Channel on the Yeast Vacuole Is Mechanosensitive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12): 7105-7110.
- Zhou X. L., Loukin S. H., Coria R., Kung C. und Saimi Y. (2005). Heterologously Expressed Fungal Transient Receptor Potential Channels Retain Mechanosensitivity in Vitro and Osmotic Response in Vivo. *Eur Biophys J* 34(5): 413-422.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Gabriel Schlenstedt und Prof. Dr. Veit Flockerzi, die mir die Promotion durch die Übergabe des interessanten Themas und die freundliche Aufnahme in ihren Arbeitsgruppen ermöglicht und mich sowohl auf persönlicher als auch auf fachlicher Ebene sehr kompetent betreut haben.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Richard Zimmermann und seiner gesamten Arbeitsgruppe für die hilfreichen Fragen und Ratschläge während der Seminare und vor allem für die sehr gute Arbeitsatmosphäre sowie die ständige Hilfsbereitschaft.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Stefanie Caesar für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft, die inspirierenden Ratschläge und die fortwährende Betreuung bis hin zum Korrekturlesen meiner Arbeit.

Hanne Folz und Sarah Haßdenteufel, euch danke ich sowohl für die motivierenden, fachlichen Diskussionen als auch für die gemeinsame Zeit außerhalb des Labors und die persönliche Unterstützung.

Bei Mahnaz Amini möchte ich mich für die kompetente Einführung in das Thema dieser Arbeit und die Einweisung in die Durchführung der luminometrischen Assays bedanken.

Silke Guthörl danke ich für die technische Unterstützung während meiner Laborarbeit.

Prof. Dr. Vikram Panse und Dr. Ute Fischer danke ich für den lehrreichen Aufenthalt an der ETH Zürich und die Möglichkeit, die Durchführung der TAP-Reinigung zu erlernen.

Ich danke der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Henning Urlaub am Max-Planck-Institut in Göttingen und ganz besonders der Arbeitsgruppe von Dr. Claudia Fecher-Trost an der Universitätsklinik in Homburg für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen, die zu einem Großteil der Ergebnisse dieser Arbeit beigetragen haben.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Promotionsarbeit geht ein Dankeschön an das Graduiertenkolleg (GK 1326) und die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). Weiterhin danke ich allen Professoren des Graduiertenkollegs für die kritischen Fragen und Ratschläge während der *progress reports* und Seminare.

Darüber hinaus möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern und Großeltern danken, die mir meinen Werdegang nicht nur durch finanziellen Halt sondern auch durch ihre großartige, moralische Unterstützung in jeder Lebenslage ermöglicht haben.