

1 EINLEITUNG

Der ABC-Transporter Ste6 der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird für die Sekretion des Paarungspheromons **a**-Faktor benötigt. Die Familie der ABC-Transporter umfaßt viele Transportproteine, die sowohl in Prokaryonten als auch in Eukaryonten anzutreffen sind (Higgins, 1992). Typisch für ABC-Transporter ist eine hochkonservierte ATP-Bindungskassette. Bedeutende eukaryontische Vertreter sind die MDR- und CFTR-Proteine bei Säugern. MDR-Proteine sind verantwortlich für das Phänomen der „multidrug resistance“, einer breitgefächerten Resistenz gegen zytotoxische Substanzen, die weder eine ähnliche Struktur noch gleiche intrazelluläre Wirkorte aufweisen (Gottesman und Pastan, 1993). Dieses Phänomen bereitet große Probleme bei der Chemotherapie von Krebserkrankungen. Ein Defekt im humanen CFTR-Protein führt zu einer der häufigsten Erbkrankheiten, der Zystischen Fibrose (CF). Die häufigste Mutation ist eine Deletion von Phenylalanin 508 ($\Delta F508$), die zu einer temperaturbedingten Mißlokation des CFTR-Proteins und damit zum Funktionsverlust führt (Denning *et al.*, 1992). Das CFTR-Protein besitzt eine Chloridionen-Kanalfunktion. Außerdem gehören verschiedene prokaryontische Permeasen wie HlyB, OppD, HisP und MalK zur Familie der ABC-Transporter.

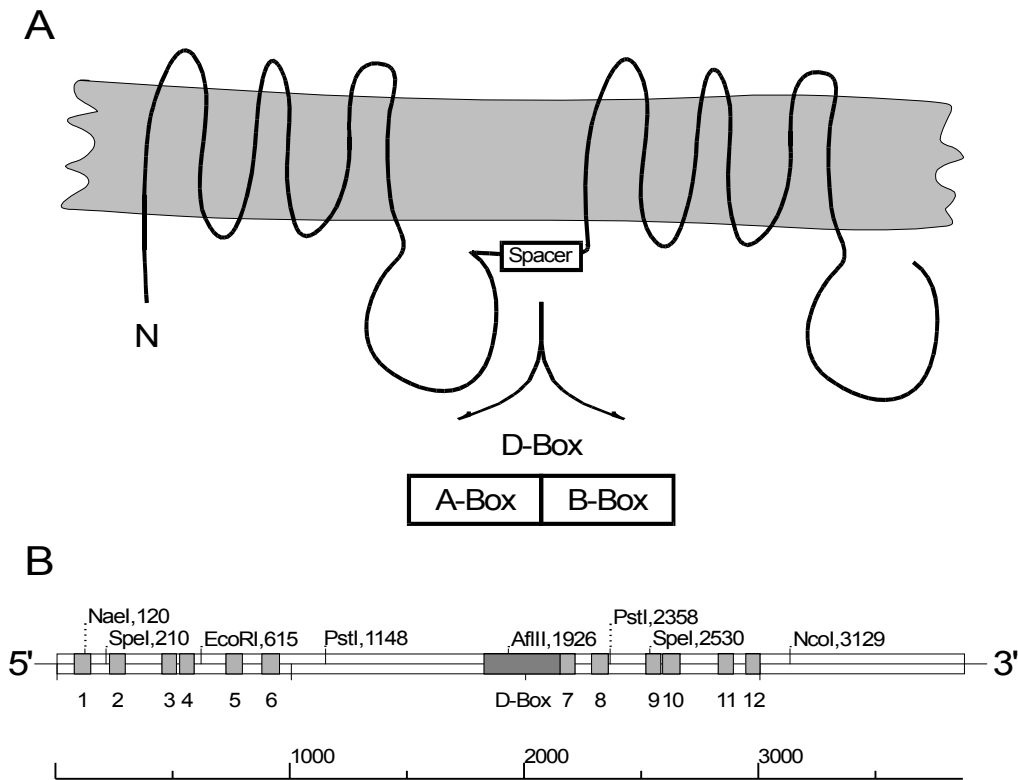
Der **a**-Faktor ist zusammen mit dem zweiten Paarungspheromon der Hefe, dem α -Faktor, verantwortlich für die Initiation des Paarungsprozesses. In diesem Konjugationsprozeß fusionieren die beiden haploiden Zelltypen *MATa* und *MAT α* der Hefe zu einem dritten Zelltyp, der diploiden *MATa/ α* -Zelle. Die Bildung dieser beiden Oligopeptidpheromone erfolgt zelltypspezifisch; die *MATa*-Zelle bildet den 12 Aminosäuren langen **a**-Faktor, die *MAT α* -Zelle sekretiert ein 13 Aminosäuren großes Peptid, den α -Faktor.

Das Paarungspheromon α -Faktor wird kodiert von den Genen *MF α 1* und *MF α 2* und als 18,5 kDa großes Vorläuferpeptid, dem präpro- α -Faktor (pp- α -F) synthetisiert. Der von *MF α 1* kodierte Vorläufer enthält vier, das *MF α 2*-kodierte Genprodukt zwei Kopien des reifen Pheromons (Bussey, 1988). Der α -Faktor folgt dem klassischen Sekretionsweg: Der Aminoterminus des α -Faktor-Vorläuferpeptids besitzt eine Signalsequenz, die den Eintritt ins ER vermittelt (Julius *et al.*, 1984). Nach Glykosylierung im ER erfolgt der weitere Transport in den Golgi-Komplex, wo die proteolytische Reifung durch die Serinprotease Kex2 erfolgt, die nach Abspaltung der Pro-Sequenz auch die Kopien des α -Faktors freisetzt (Fuller *et al.*,

1986). Weitere Prozessierungsschritte erfolgen durch die Proteasen Ste13 und Kex1, bis schließlich das reife Pheromon über sekretorische Vesikel freigesetzt wird.

Das Paarungspheromon **a**-Faktor, ein stark hydrophobes und farnesyliertes Dodekapeptid von 1,6 kDa, wird hingegen über einen nichtklassischen Sekretionsweg ausgeschleust. Die 36 bzw. 38 Aminosäuren langen Vorläufer werden durch die Gene *MFa1* und *MFa2* kodiert (Michaelis und Hershkowitz, 1988) und besitzen keine Signalsequenz für den ER-Import. Während der α -Faktor in ts-sekretionsdefekten (*sec*) Mutanten (Schekman, 1985) bei nichtpermissiver Temperatur nicht sekretiert wird, haben diese Mutationen keinen Einfluß auf die Ausschleusung des **a**-Faktors. *MATa ste6*-Deletionsmutanten produzieren zwar den reifen **a**-Faktor, können ihn aber nicht ausschleusen (McGrath und Varshavski, 1989; Kuchler *et al.*, 1989). Dies legt die Annahme nahe, daß der ABC-Transporter Ste6 den Transport des **a**-Faktors über die Plasmamembran vermittelt. Die enge Verwandtschaft des mutmaßlichen **a**-Faktor-Transporters Ste6 zu ABC-Transportern in Säugern wird belegt durch den Befund, daß der Paarungsdefekt in einem *ste6*-Deletionsstamm durch die Expression des *mdr3*-Gens der Maus komplementiert werden kann (Raymond *et al.*, 1992). Somit stellt Ste6 ein ideales Modell zur Untersuchung eukaryontischer ABC-Transporter dar.

Die aufgrund von Sequenzdaten vorhergesagte Sekundärstruktur und Membrantopologie von Ste6 ähnelt der Struktur anderer Vertreter der ABC-Transporterfamilie. Typisch ist die Struktur der beiden homologen Hälften des Proteins, die durch eine kurze Spacer-Region verbunden sind (Abb. 1). Jede dieser beiden Hälften besteht aus sechs Transmembrandomänen und einer hochkonservierten zytoplasmatischen ATP-Bindedomäne (Kuchler *et al.*, 1989; McGrath und Varshavski, 1989).



Ste6 (3873 bps)

Abb. 1: Der ABC-Transporter Ste6. (A) Vorhergesagte Membrantopologie des Ste6-Proteins. (B) Schematische Darstellung des *STE6*-Gens. Die für die Transmembrandomänen kodierenden Bereiche sind hellgrau dargestellt, die „D-Box“ ist dunkelgrau dargestellt.

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|----------|----------|----------|----------|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1780 | CCG | ACC | ACT | ACA | TTT | AGC | ACA | TGG | TAT | CAC | CTA | CAG | AAT | GAC |
| 1822 | TAC | TCT | GAT | GCG | AAA | ACT | ATT | GTA | GAT | ACA | GAG | ACT | GAA | GAA |
| | | S | <u>D</u> | <u>A</u> | <u>K</u> | <u>T</u> | <u>I</u> | V | D | T | E | T | E | E |
| 1864 | AAA | TCT | ATA | CAC | ACT | GTG | GAA | AGT | TTT | AAC | TCT | CAA | TTG | GAA |
| | K | S | I | H | T | V | E | S | F | N | S | Q | L | E |
| 1906 | ACA | CCA | AAA | CTT | GGA | TCA | TGC | TTA | AGT | AAT | CTG | GGA | TAT | GAT |
| | T | P | K | L | G | S | C | L | S | N | L | G | Y | D |
| 1948 | GAG | ACA | GAT | CAG | TTG | TCC | TTT | TAC | GAA | GCA | ATC | TAT | CAA | AAA |
| | E | T | D | Q | L | S | F | Y | E | A | I | Y | Q | K |
| 1990 | AGA | TCG | AAC | GTT | AGA | ACA | AGA | AGG | GTT | AAA | GTT | GAA | GAG | GAA |
| | R | S | N | V | R | T | R | R | V | K | V | E | E | E |
| 2032 | AAT | ATT | GGG | TAT | GCA | CTA | AAA | CAA | CAA | AAG | AAC | ACC | GAA | AGT |
| | N | I | G | Y | A | L | K | Q | Q | K | N | T | E | S |
| 2074 | TCA | ACA | GGG | CCA | CAA | CTT | CTG | AGC | ATT | ATT | CAG | ATT | ATC | AAA |
| | S | T | G | P | Q | L | L | S | I | I | Q | I | I | K |
| 2116 | AGA | ATG | ATT | AAA | AGC | ATA | AGA | TAC | AAA | AAA | ATT | CTA | ATC | TTG |
| | R | M | I | K | S | I | R | Y | K | K | I | | | |

Abb. 2: Nukleotid- und abgeleitete Proteinsequenz der D-Box. Saure Aminosäuren sind rot dargestellt, basische Aminosäuren sind grün dargestellt. Die „DAKTI“-Sequenz ist doppelt unterstrichen.

Die etwa 100 Aminosäuren lange Spacer-Region von Ste6 wurde „Degradation-Box“ oder kurz „D-Box“ genannt, da sowohl eine komplette Deletion als auch ein Austausch dieser Region gegen die entsprechende Domäne des prokaryontischen ABC-Transporters HlyB zu einer Stabilisierung des kurzlebigen Ste6 führt (R. Kölling, persönliche Mitteilung). Die D-Box kann unterteilt werden in einen ersten Abschnitt, in dem sich gehäuft saure Aminosäuren befinden, kurz „A-Box“ genannt, und einen Teil, „B-Box“ genannt, in dem vorwiegend basische Aminosäuren in zwei Blöcken anzutreffen sind. (Abb. 2).

Mit einer Halbwertszeit von rund 13 min ist Ste6 ein sehr kurzlebiges Protein. Es konnte gezeigt werden, daß das Ste6-Protein hauptsächlich in der den Lysosomen der Säugerzellen analogen Vakuole abgebaut wird. In *pep4*-Mutanten, die einen Defekt in der vakuolären Proteinase A aufweisen, die von zentraler Bedeutung für die proteolytische Funktion der Vakuole ist (Ammerer *et al.*, 1986), steigt die Halbwertszeit von Ste6 stark an. Außerdem konnte durch Immunofluoreszenz in *pep4*-Mutanten eine Akkumulation von Ste6 in der Vakuole nachgewiesen werden (Kölling und Hollenberg, 1994).

Aufgrund der vermuteten Rolle von Ste6 als α -Faktor-Transporter wurde eine Lokalisation in der Plasmamembran postuliert. Tatsächlich ist Ste6 hauptsächlich mit internen Membranen assoziiert (Kölling und Hollenberg, 1994). Die geringe Menge von Ste6 in der Plasmamembran kann durch eine effiziente Endozytose des Proteins erklärt werden. In der Endozytosemutante *end4*, die einen Defekt in der Internalisation des α -Faktors aufweist (Raths *et al.*, 1993), häuft sich Ste6 in der Plasmamembran in einer ubiquitinierten Form an (Kölling und Hollenberg, 1994).

Ubiquitin, ein kleines Molekül von 76 Aminosäuren und 8,5 kDa, ist in allen eukaryontischen Zellen vorhanden und spielt eine wichtige Rolle beim kontrollierten Abbau von Proteinen. Hierbei wird das carboxyterminale Glycin des Ubiquitins kovalent mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysins verknüpft. Hierzu wird das Ubiquitin zunächst von einem E1 genannten Enzym durch Ausbildung einer energiereichen Thioester-Bindung aktiviert. Das aktivierte Ubiquitin wird dann auf eine Sulfhydrylgruppe eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) übertragen, das entweder allein oder in Verbindung mit einer Ubiquitin-Ligase (E3) die Übertragung auf das Zielprotein katalysiert. Schließlich werden weitere Ubiquitinmoleküle gebunden. Auf diese Weise wird das Substrat für den Abbau durch den 26S-Proteasomkomplex markiert (Jentsch, 1992). Die Beobachtung, daß Ste6 in *ubc4 ubc5*

Doppelmutanten (Seufert und Jentsch, 1990), die defekt sind in den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen Ubc4 und Ubc5 (E2-Enzyme), um das dreifache stabilisiert ist (Kölling und Hollenberg, 1994), liefert einen Hinweis auf die Beteiligung des Ubiquitinsystems am Abbau von Ste6.

Der genaue Zusammenhang zwischen Ubiquitinierung und dem Abbau in der Vakuole konnte noch nicht näher geklärt werden. Die Proteolyse von Ste6 scheint jedoch trotz Ubiquitinierung nicht vom Proteasom abhängig zu sein, da Proteasom-Mutanten (*pre*) keinen Einfluß auf die Stabilität von Ste6 haben (R. Kölling, persönliche Mitteilung). Möglicherweise wird die schnelle Endozytose durch die Ubiquitinierung ausgelöst, und führt letztlich zum Abbau in der Vakuole. Ein solcher Mechanismus wurde beschrieben für Ste2, ein G-Protein gekoppeltes Rezeptorprotein in der Plasmamembran (Hicke und Riezman, 1996). Die Bindung des α -Faktors an Ste2 aktiviert einen Signaltransduktionsweg und führt zur Ubiquitinierung des Proteins. Diese Ubiquitinierung leitet die Endocytose des Rezeptor-Ligandenkomplexes ein. Die Internalisation wird erleichtert durch Clathrin (Tan *et al.*, 1993) und benötigt außerdem Actin, Fimbrin und Calmodulin (Riezmann, 1993; Munn und Riezmann, 1994). Calmodulin, ein regulatorisches Protein, das an vielen calciumabhängigen Signalwegen beteiligt ist, moduliert die Aktivität anderer Proteine, darunter Proteinkinasen, Phosphodiesterasen und Calciumpumpen, bindet Ca^{2+} spezifisch und erfährt dabei eine Konformationsänderung. Calmodulin bindet mit hoher Affinität an basische, amphipathische α -Helices (O'Neil und DeGrado, 1990). Eine solche Helix besitzt in ihrer räumlichen Orientierung die geladenen und hydrophilen Aminosäuren auf der einen und die hydrophoben Aminosäuren auf der anderen Seite.

Ziel der α -Faktor stimulierten Ubiquitinierung von Ste2 ist die Aminosäuresequenz „SINNDAKSS“ im zytoplasmatischen Teil des Proteins; ein Austausch des Lysins zu Arginin, wodurch die positive Ladung erhalten bleibt, verhindert die Ubiquitinierung eines C-terminal verkürzten Rezeptors (Hicke und Riezmann, 1996). Die A-Box von Ste6 weist eine ähnliche Aminosäuresequenz auf, die „DAKTI“-Sequenz (Abb. 2). Tatsächlich ist die A-Box Ziel der Ubiquitinierung, und eine Deletion der A-Box führt zu einer Stabilisierung des Proteins bei Erhalt der Funktion von Ste6 (Ralf Kölling, persönliche Mitteilung).

Es ist unklar, ob Ste6 ausschließlich über den Umweg zur Plasmamembran in die Vakuole gelangt. Einen Hinweis auf die Beteiligung mehrerer Transportwege lieferte die Beobachtung

der Ste6-Stabilität in Sekretionsmutanten. In einer *sec1*-Mutante (Novick und Schekman, 1979), die einen Defekt im Transport der sekretorischen Vesikel zur Plasmamembran aufweist, ist Ste6 zwar stabilisiert, aber bei weitem nicht so stark wie im *pep4*-Hintergrund (R. Kölling, persönliche Mitteilung). Dies ist ein Hinweis auf zwei alternative Transportwege für Ste6, die beide in der Vakuole enden. Zwei mögliche Wege, über die Membranproteine zur Vakuole gelangen können, sind zum einen der Transport von Membranproteinen nach Integration in die ER-Membran zum Golgi-Apparat, von dem sie über ein Endosomen-Kompartiment, auch prävakuoläres Kompartiment genannt, zur Vakuole gelangt. Diesem vakuolären Transportweg folgt z.B. die Dipeptidylaminopeptidase B, kurz DPAP B. (Roberts *et al.*, 1992; Review von Conibear und Stevens, 1995). Ein anderer Weg weicht nach dem Golgi-Apparat von dem eben beschriebenen ab. Hier erfolgt der Transport des Proteins zur Plasmamembran und von dort durch Endozytose über mehrere endosomale Kompartimente (Singer-Kruger *et al.*, 1993) zur Vakuole. Im Gegensatz zu Säugerzellen scheinen in *S. cerevisiae* Membranproteine, die nicht über spezifische Sorting-Signale verfügen, mit deren Hilfe die zelluläre Sortierung erfolgt, über das Endosom unter Umgehung der Plasmamembran in die Vakuole transportiert zu werden (Roberts *et al.*, 1992).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte mit Hilfe des Two Hybrid-Systems untersucht werden, ob und mit welchen Proteinen die D-Box und Teile der D-Box interagieren. Beim Two Hybrid-System handelt es sich um ein genetisches System zur Detektion von Proteinwechselwirkungen *in vivo*, welches gleichzeitig eine schnelle Identifizierung der positiv beurteilten Klone erlaubt (Fields und Song, 1989). Das Prinzip beruht auf dem modularen Charakter vieler eukaryontischer Transkriptionsfaktoren, wie dem hier verwendeten Gal4 (Ma und Ptashne, 1987), das beteiligt ist an der positiven Regulation von Genen zur Galaktoseverwertung in *S. cerevisiae*. Die Gal4-DNA-Bindedomäne (BD) bindet sequenzspezifisch an eine cis-regulatorische, palindromische Sequenz in der Nähe der Promotorregionen der *GAL*-Gene, die als *UAS* (upstream activating sequence) bezeichnet wird. Die Gal4-Aktivierungsdomäne (AD) interagiert mit anderen für die Transkriptionsinitiation benötigten Faktoren und bewirkt so die Transkription des stromabwärts liegenden Gens (Johnston, 1987). Die verwendeten Hefestämme besitzen Cassetten mit Reportergenen (*HIS3* und *E. coli lacZ*), die von Promotoren exprimiert werden, die unter Kontrolle des *GAL1-UAS*-Elements stehen. Auf Plasmiden werden zwei Gene kloniert, die Hybridproteine kodieren: Eines ist eine Fusion aus der *GAL4*-Bindedomäne und

einem Protein „X“, das andere ist eine Fusion aus der *GAL4*-Aktivierungsdomäne und einem Protein „Y“. Durch eine physikalische Interaktion der beiden Proteine X und Y kann die Gal4-Aktivität wiederhergestellt werden (Abb. 3); die getrennten Gal4-Domänen allein sind dazu nicht in der Lage (Fields und Song, 1989). Die Expression des *HIS3*-Reportergens bewirkt Wachstum der Zellen auf Medium ohne Histidin, die Expression der β -Galaktosidase kann mit einem Filtertest nachgewiesen werden (Blaufärbung durch die enzymatische Spaltung von X-Gal).

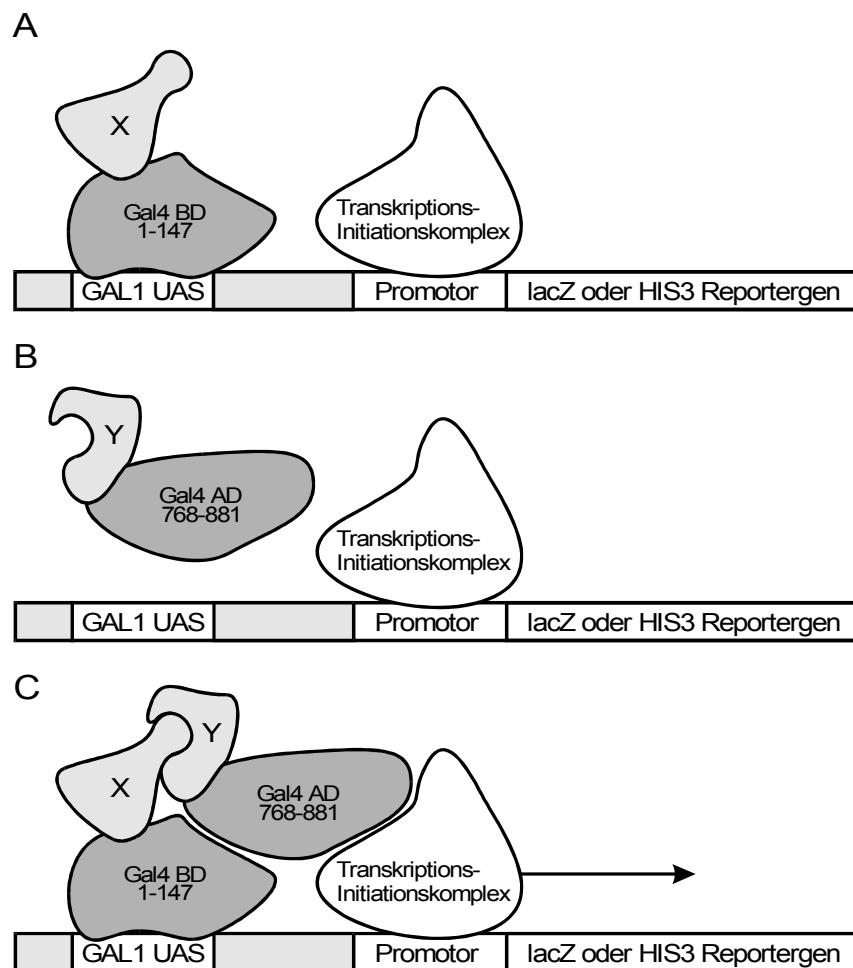


Abb. 3: Das Two Hybrid-System. (A) Ein Hybridprotein aus der Gal4-BD und einem Protein X bindet an die *GAL1-UAS*, kann die Transkription aber nicht initiieren. (B) Ein Hybridprotein aus der Gal4-AD und einem Protein kann die Transkription ebenfalls nicht initiieren, da es nicht an den Promotor binden kann. (C) Sind beide Fusionsproteine präsent, und das Protein X interagiert mit Y, so werden die beiden Gal4-Domänen zusammengebracht, und es erfolgt die Transkription der Reportergene.

Das Two Hybrid-System erlaubt nicht nur die Untersuchung spezifischer Hybridproteine. Um diese Methode für eine Suche nach bislang unbekanntem Interaktionspartnern einzusetzen,

kann eine Hybridprotein-Bank hergestellt werden, indem die gesamte genomische DNA oder cDNA an die kodierende Sequenz der Gal4-AD fusioniert wird. Diese Bank kann in eine Hefe transformiert werden, die bereits ein Plasmid enthält, das ein spezifisches Gal4-BD-Fusionsprotein kodiert (Bartel, 1993). Sollte bei einer solchen Suche ein Interaktionspartner gefunden werden, genügt zur Identifizierung des Proteins die Sequenzierung des GAL4-AD-Fusionsgens.

Geplant war die Suche nach unbekanntem Faktoren, die mit der D-Box interagieren. Außerdem sollten mögliche Wechselwirkungen gezielt untersucht werden: Die basischen Bereiche der B-Box können als amphipathische α -Helix dargestellt werden und stellen somit eine mögliche Bindungsstelle für Calmodulin dar (O'Neil und DeGrado, 1990). Außerdem sollte untersucht werden, ob die B-Box, deren Aminosäuresequenz eine Ähnlichkeit zum **a**-Faktor-Rezeptor Ste3 aufweist, eine **a**-Faktor-Bindungsstelle besitzt.

In einem weiteren Projekt sollten Mutanten isoliert werden, die zu einer Stabilisierung des Ste6-Proteins führen. Solche Mutanten könnten hilfreich sein bei der Aufklärung der Abbauege von Ste6. Zu erwarten wären Mutanten des sekretorischen Transportwegs und auch solche mit Einfluß auf die proteolytische Funktion der Vakuole. Auch ubiquitinkonjugierende Proteine oder Komponenten des vakuolären Transportwegs könnten so identifiziert werden.

Ein verminderter Abbau von Ste6 in solchen Mutanten sollte zu einer höheren intrazellulären Ste6-Konzentration führen. Da sich die Ste6-Aktivität im Rahmen eines genetischen Screens nicht ohne weiteres quantifizieren läßt, sollte ein Ste6-lacZ-Fusionsprotein benutzt werden. Über die β -Galaktosidaseaktivität des Fusionsproteins sollten sich so mit Hilfe eines Filtertests Mutanten isolieren lassen, die eine erhöhte Ste6-Stabilität aufweisen. Zuvor muß jedoch geklärt werden, ob sich das Fusionsprotein wie Ste6 verhält.