

**Identifizierung und Untersuchung eines Magnesium-
Transportproteins in der Spaltheefe**
Schizosaccharomyces pombe

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen
Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte
Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin
Silke Hammelmann
aus Essen

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Klaus Wolf
Universitätsprofessor Dr. Ulrich Klinner

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.2005

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Meinen Eltern und Jens
in Liebe und
Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
1.1 Homöostase	1
1.2 Wirkung und Funktion von Metallen in der Zelle	3
1.3 Der Transport von Soluten durch biologischen Membranen	4
1.4 Zinkhomöostase bei <i>S. cerevisiae</i>	5
1.5 Magnesium	8
1.5.1 Die Funktion von Magnesium	8
1.5.2 Die intrazelluläre Magnesium-Konzentration	8
1.5.3 Die Magnesium-Homöostase	9
1.5.4 Magnesium-Transportsysteme	10
1.6 Die Vakuole	13
1.7 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> als Modellorganismus	14
1.8 Zielsetzung	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Chemikalien	17
2.1.2 Enzyme	17
2.1.3 Mikroorganismen	17
2.1.4 Plasmide	19
2.1.5 Synthetische Oligonukleotide	20
2.1.6 Datenbankadressen	23

2.1.7	Medien und Lösungen	23
2.2	Mikrobiologische Methoden	27
2.2.1	Stammhaltung	27
2.2.2	Bestimmung von Zelldichten	27
2.2.3	Wachstumsmessung in Flüssigkulturen	27
2.2.4	Herstellung diploider <i>S. pombe</i> -Zellen nach Hochstenbach (1997)	27
2.2.5	Tetradenanalyse	28
2.2.6	Bestimmung der Schwermetall-Toleranz auf Nährböden	29
2.2.7	Freisporenanalyse	29
2.2.8	Plasmidverlusttest	29
2.3	Molekularbiologische Methoden	30
2.3.1	Polymerasekettenreaktion	30
2.3.2	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	31
2.3.3	Isolation chromosomaler DNA aus <i>S. pombe</i>	32
2.3.4	Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren	33
2.3.5	Hydrolytische Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsendonukleasen	33
2.3.6	Ligation	33
2.3.7	Agarose-Gelelektrophorese	34
2.3.8	Transformation in <i>E. coli</i>	34
2.3.9	Transformation in <i>S. pombe</i>	35
2.3.10	Herstellung der DIG-markierten Sonde	36
2.3.11	Southernblot	36
2.3.12	DNA-Sequenzierung	37
2.3.13	RNA-Isolation	38

2.3.14	cDNA-Synthese und RT-PCR	38
2.4	Analytische Methoden	40
2.4.1	AAS-Analytik	40
2.5	Lokalisation des Proteins	40
2.5.1	GFP-Fusionen (Green fluorescent protein)	40
2.5.2	Immunchemische Färbung	41
2.5.3	Visualisierung der Lokalisation des Magnesiums innerhalb der Zelle	42
3	Ergebnisse	43
3.1	<i>vmu1</i> beinhaltet das stark konservierte Motiv GMN in <i>S. pombe</i>	43
3.2	Erstellung der Disruptionskassette für VMU1p	50
3.3	<i>vmu1</i> ist nicht essentiell	54
3.4	VMU1p ist wichtig für das Wachstum in Magnesium-Mangelmedium	61
3.5	Bei $\Delta vmu1$ -Disruptanten zeigt sich eine erhöhte Zinksensibilität	67
3.6	O13779 sorgt wahrscheinlich für die Bereitstellung von Magnesium	70
3.7	Calciummessung in EMM-Medium ohne Magnesium	72
3.8	Kein Unterschied in der intrazellulären Zink-Konzentration	74
3.9	Vergleich zwischen <i>S. pombe</i> VMU1p und <i>S. cerevisiae</i> ALR2p	75
3.10	Komplementation des Leserahmens O13779	79
3.11	VMU1p wird unter verschiedenen Magnesium-Konzentrationen im Medium exprimiert	86
3.12	Visualisierung der Lokalisation des Magnesiums innerhalb der Zelle	88
3.13	Lokalisationsstudien	90
3.14	Warum verliert die Zelle die Transformationskassette?	102

4	Diskussion	106
4.1	VMU1p ist ein Magnesium-Transportprotein	106
4.2	Vergleich von VMU1p mit anderen Magnesium-Transportproteinen	107
4.3	Keine Hemmung der Expression von <i>vmu1</i>	110
4.4	Kontrolle der intrazellulären Magnesium-Konzentration	111
4.5	VMU1p ist in der Membran von Vakuolen lokalisiert und ein wichtiger Bestandteil der Magnesium-Homöostase von <i>S. pombe</i>	112
4.6	Die Veränderung des ORF O13779 ist ein negatives Ereignis	113
4.7	Medizinische Bedeutung	115
4.8	Eine erfolgreiche Datenbank-Analyse	116
4.9	Ausblick	118
5	Zusammenfassung	120
6	Summary	122
7	Literatur	123

Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Abb.	Abbildung
A. dest	Aqua destillata
<i>ade</i>	Adenin
ampR	Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Bam</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
bp	Basenpaar
d	Tage
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EMM	Edinburgh Minimalmedium
ER	Endoplasmatisches Reticulum
<i>et al.</i>	et aliter
for	forward
g	Erdbeschleunigung
GFP	„green fluorescent protein“
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
h	Stunde
<i>his</i>	Histidin
Kb	Kilobasenpaare
<i>leu</i>	Leucin

min	Minute
NC-Membran	Nitrocellulosemembran
nmt	no message in thiamine
OD λ	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von λ nm
P	Ploidität
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
rpm	Umdrehungen pro Minute
rev	reverse
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
<i>Sac</i>	<i>Streptomyces achromogenes</i>
<i>Sal</i>	<i>Streptomyces albus</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Sma</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit
<i>ura</i>	Uracil
v/v	Volumenanteil pro Volumen
WT	Wildtyp
WTD	Wildtypdiplont
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
YD	Hefeextrakt-Glucose-Medium

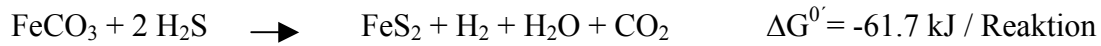
1 Einleitung

1.1 Homöostase

Der Begriff Homöostase ist vom griechischen Wort für „gleichartig, ähnlich“ abgeleitet und bedeutet in der deutschen Sprache „Aufrechterhaltung“. Ein Organismus ist bestrebt, alle Funktionen wie z.B. den Elektrolythaushalt und bei höheren Eukaryonten auch die Körpertemperatur und Blutzusammensetzung innerhalb sehr enger Grenzen konstant zu halten und etwaige Veränderungen sofort wieder auszugleichen. Dadurch wird die Anpassung an die Umwelt optimiert und der Kräfteaufwand zur Lebenserhaltung minimiert.

Auf Grund zu geringer Sauerstoff-Konzentration herrschten in der frühen Erdatmosphäre reduzierende Bedingungen. Neben Wasser existierten einige Gase, wie Methan, Kohlendioxid, Stickstoff und Ammoniak. Auch Kohlenmonoxid, Wasserstoff, Sulfide und Schwefelwasserstoff- und Eisensulfidgemische waren schon vorhanden. Durch den vorherrschenden Sauerstoffmangel mussten die ersten primitiven Organismen so etwas wie einen „anaeroben“ Metabolismus besitzen. Dabei wurde wahrscheinlich das sehr leicht lösliche Fe^{2+} als erster Kofaktor für biologische Redoxsysteme verwendet. Redox-Reaktionen, sind Reaktionen, in denen Elektronen von einem Reaktionspartner auf den anderen übertragen werden. Dabei nennt man die Abgabe von Elektronen Oxidation und die Verbindung, die oxidiert wird Elektronendonator. Die Aufnahme von Elektronen wird Reduktion und die Verbindung die reduziert wird Elektronenakzeptor genannt. Die Summe der Elektronen bleibt bei diesem Vorgang, der umkehrbar ist, erhalten. In welche Richtung die Redox-Reaktion verläuft, hängt von der Stärke der beiden Reaktionspartner ab. Auch in Zellen aller Organismen laufen Redox-Reaktionen ab. Dabei können sie an Membranen verlaufen, wobei die freiwerdende Energie zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten genutzt wird. An der Membran findet dabei eine Trennung der Ladungen statt, die der Speicherung von Energie dient. Der Energiegehalt ΔG eines sogenannten Protonengradienten ist die Summe aus der pH-Differenz ΔpH und des elektrischen Membranpotentials $\Delta \psi$ zwischen der inneren und äußeren Seite der Membran. Das Membranpotential ist direkt abhängig von der Differenz der Redoxpotentiale von Elektronendonator und –akzeptor. Aus den beiden Größen ΔpH und $\Delta \psi$ ergibt sich die protonenmotorische Kraft ΔP als Maß für die chemische Arbeit ΔG , die der

Gradient zu leisten vermag (nach Koolmann und Röhm, 1994). Mögliche potentielle chemolithotrophe Reaktionen könnten wie folgt abgelaufen sein:



Hierbei handelt es sich um eine exergone Reaktion, also eine Reaktion, die freiwillig abläuft und in der Energie frei wird. Dabei kann spekuliert werden, dass das H_2 , welches in diesen Reaktionen gebildet wurde, der Elektronendonator für die Reduktion von elementarem Schwefel zu Schwefelwasserstoff war. Auch kann angenommen werden, dass eine Energiegewinnung durch das Aufspalten von H_2 in seine Elektronen und Protonen erfolgte. Eine primitive membrangebundene ATPase könnte diesen Protonengradienten und dessen Energie zur ATP-Synthese genutzt haben (nach Madigan et al., 1997). Auch ein chemoorganotropher oder phototropher Metabolismus wird in der Literatur diskutiert, da aber wesentlich mehr Enzyme eingesetzt und komplexere Reaktionen ablaufen müssten, wird davon Abstand genommen. Der chemolithotrophe Metabolismus benötigt nur sehr wenige Enzyme, wahrscheinlich nur eine primitive Hydrogenase und ATPase, um Energie zu gewinnen (nach Madigan et al., 1997).

Die Evolution des Metabolismus ging wahrscheinlich weiter über die Bildung von Porphyrinen, dann von Cytochrom und anderen Tetrapyrol-Verbindungen bis hin zu ersten Elektronen-Transportketten. Auch wird angenommen, dass über Porphyrin lichtsensitives Magnesiumtetrapyrol gebildet wurde, welches auch Bakterienchlorophyll genannt wird und Photosynthese ermöglichte.

Wahrscheinlich waren Cyanobakterien die ersten Organismen, die Photosynthese betrieben. Mit der Photosynthese wuchs langsam die Sauerstoffkonzentration in der Lufthülle. Der damit verbundene Wechsel von reduzierenden zu oxidierenden Bedingungen führte dann möglicherweise dazu, dass sich die Löslichkeit von Metallen veränderte. Indem mehr Oxide statt Sulfidverbindungen gebildet wurden, stieg die Verfügbarkeit von anderen Elementen an. Nun konnten verschiedene Metalle als Kofaktoren für Enzyme verwendet werden. Es folgten spezifische Aufnahmesysteme und präzisere Homöostasefunktionen. Die Aufnahme von Metallen in die Zelle bedingte aber nicht nur die Möglichkeit neuer Kofaktoren, sondern auch

eine evolutionäre Selektion. Diese manifestierte sich durch die Güte der Detoxifikationssysteme (nach Williams und Fraústo Da Silva, 2003).

1.2 Wirkung und Funktion von Metallen in der Zelle

Viele Metalle, wie Fe, Co, Ni, Cu und Zn, vor allem aber auch die Alkalimetalle wie Mg, K, Ca und Na sind für jeden Organismus essentiell. Pflanzen, Pilze und Prokaryonten absorbieren sie direkt aus dem Boden oder dem Wasser. Tier und Mensch nehmen sie über die Nahrung auf. Metalle haben aufgrund ihrer starken Bindung an schwache Lewis-Basen in Form von Sulfhydryl- oder Imidazol-Gruppen wichtige biologische Funktionen als Kofaktoren in enzymatischen Reaktionen. Zum Beispiel sind zinkhaltige Carboxypeptidasen am Abbau von Proteinen beteiligt, und Kobalt sitzt im aktiven Zentrum des Coenzym Vitamin B₁₂ (nach Grill und Zenk, 1989).

Ein Mangel an essentiellen Metallionen kann die Synthese und die Funktion vieler Proteine stark beeinträchtigen. Beim Menschen kann Zinkmangel z.B. zu Depressionen, vermehrter Infektanfälligkeit, Wachstumsstörungen, Haarausfall und verzögerter Wundheilung führen (Medicine World Wide, <http://www.m-ww.de>).

Neben den lebenswichtigen Metallen existieren auch Metalle ohne bekannte biologische Funktion, wie Cd, Pb und Hg, die ausschließlich giftig für die Zellen sind. Prinzipiell wirken sowohl essentielle als auch nichtessentielle Schwermetalle in Abhängigkeit von ihrer Konzentration als Zellgifte. Die Neigung zur Komplexbindung mit schwachen Lewis-Basen ist dabei einer der Gründe für die Toxizität der Elemente. Unkontrollierte Bindungen von Metallionen an Proteine führen zur Inhibition der Enzymaktivität und Zerstörung ihrer Struktur. Diese Inaktivierung wird häufig durch die hohe Affinität zu Thiol-, Amino- und Carboxylgruppen verursacht (Van Assche und Clijsters, 1986 a, b). Auch zeigten mehrere Studien, dass Metalle sogenannte Reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) bilden, welche biologische Makromoleküle wie DNA, Proteine oder Lipide durch Oxidationen zerstören können (nach Stohs und Bagchi, 1995). Wahrscheinlich sind verschiedene Mechanismen für die Bildung von ROS verantwortlich. Dabei werden die Reaktionen nach Fenton, die zur Entstehung von freien, hochtoxischen Radikalen führen, und phagocytierende Zellen diskutiert (nach Stohs und Bagchi, 1995, Fee und Valentine, 1977).

Beim Menschen können Symptome einer Zinkvergiftung Übelkeit, Erbrechen, Leibschmerzen und Kreislaufschwäche sein. Dies kann unter Umständen zum Koma führen. Die Zinkwerte können im Blut bestimmt werden. Dabei sollten sie beim erwachsenen Menschen zwischen 4,0-7,5 mg/l betragen. Niedrigere Werte führen zu den oben genannten Mangelercheinungen und höhere zu den Vergiftungssymptomen (Medicine World Wide, <http://www.m-ww.de>).

Die Metallhomöostase ist für Zellen immens wichtig. Häufig handelt es sich, wie das Beispiel Zinkhomöostase im Menschen zeigt, nur um sehr geringe Konzentrationsunterschiede, die den Mangel eines bestimmten Ions von toxischen Konzentrationen trennt. An der Aufrechterhaltung der Homöostase sind deswegen meist mehrere Transportsysteme beteiligt. Es existieren Transporter, die Ionen in die Zelle befördern, andere, die in der Zelle die Bereitstellung essentieller Ionen regulieren, und schließlich Proteine, die für die Detoxifikation hoher Ionenkonzentrationen sorgen. Das molekulare Verständnis der Transportsysteme und ihre Rolle in der Homöostase sind von wichtiger biotechnologischer Bedeutung. Es könnten zum Beispiel Pflanzen gezüchtet werden, die Metalle akkumulieren und so besser auf metallarmen Böden wachsen. Auch der umgekehrte Fall wäre möglich: Pflanzen, die eine hohe Resistenz aufweisen und so vielleicht imstande sind, verseuchte Böden zu nutzen und zu reinigen.

1.3 Der Transport von Soluten durch biologische Membranen

Metabolismus und Transport sind zwei wichtige Voraussetzungen für Leben. Das Eine kann ohne das Andere nicht existieren. Wichtig für den Stoffwechsel ist die Schaffung von wässrigen Reaktionsräumen. Alle lebenden Zellen müssen aber mit ihrer Umgebung kommunizieren und zum Stoffaustausch befähigt sein, damit die Homöostase der essentiellen Solute für die Zelle gewährleistet werden kann. Dabei ist die biologische Membran behilflich, welche eine hydrophobe, selektiv permeable Barriere für Solute darstellt. Viele hydrophile oder geladene Verbindungen können diese Schranke nicht ohne weiteres überwinden. Zu diesem Zweck sind spezielle Proteine in der Membran lokalisiert, die selektiv den Transport von Substraten ermöglichen. Sie kontrollieren den Ionenfluss in (Influx) und aus (Efflux) der Zelle und ihrer Kompartimente und sind meist spezifisch für bestimmte Ionen oder Moleküle.

Wie wichtig der Membrantransport ist, ist in allen Organismen durch die große Anzahl der Gene gekennzeichnet, die für Transportproteine kodieren. Transportproteine machen etwa 15 – 30% der Membranproteine einer Zelle aus (Alberts et al., 2004).

Zwei Typen von Membranproteinen wurden identifiziert. Zum einen existieren die Trägermoleküle, in der Literatur auch häufig Carrier-Proteine genannt. Sie besitzen bewegliche Bereiche, mit deren Hilfe sie spezifische Moleküle über die Membran transportieren. Dabei durchlaufen sie Konformationsänderungen und können an eine Energiequelle gekoppelt werden, um den aktiven Transport zu ermöglichen. Zum anderen gibt es die Kanalproteine oder auch Ionenkanäle genannt, welche enge hydrophile Poren bilden, die geöffnet oder geschlossen sein können. Sie ermöglichen den passiven Transport meist kleiner, anorganischer, spezifischer Ionen. Ionenkanäle lassen sich aufgrund des Reizes, der zum Öffnen und Schließen der Pore notwendig ist, in drei Arten unterteilen. Ein Typ ist der ligandenabhängige Kanal. Er beruht auf der Bindung von Neurotransmittern, Hormonen und anderen biologisch aktiven Molekülen. Weitere Reize können mechanischer Art sein (mechanisch kontrollierte Kanäle) oder hängen von der Änderung des Spannungspotenzials der Membran ab (spannungskontrollierte Kanäle) (Alberts et al., 2004).

Transportproteine besitzen meist ein zentrales Modul, welches die Membran, oft auch mehrmals, durchkreuzt, und somit einen Transmembrantunnel formt, durch den die verschiedenen Solute die hydrophobe Membran durchwandern können (Nikaido und Saier, 1992). Die meisten Kanäle sind Mitglieder einer Proteinsuperfamilie und ähneln sich in ihren Aminosäuresequenzen, der Struktur und ihrer Substratspezifität.

1.4 Zinkhomöostase bei *S. cerevisiae*

Anhand der Zinkhomöostase in *S. cerevisiae* soll ein Überblick über Transportsysteme gegeben werden und die Komplexität der Homöostasefunktion veranschaulicht werden. Dabei werden Mechanismen zum Transport von Zinkionen zu ihrem Einsatzort in bestimmten Organellen, zum Transport über die Zellmembran durch spezifische Transportproteine und zur Akkumulation in verschiedenen intrazellulären Kompartimenten beschrieben.

ZRT1p und ZRT2p gehören zur ZIP-Familie (ZRT, IRT-like protein) und sind stark und schwach affine Zinkaufnahmesysteme bei *S. cerevisiae* (Zhao und Eide, 1996, a, b). ZRT1p

wird induziert, wenn weniger und ZRT2p wenn mehr Zink extrazellulär vorhanden ist. Außerdem existiert ein weiterer Zink-Transporter, FET4p, der zusätzlich Eisen und Kupfer transportiert. FET4p ist ein schwach affiner Transporter, der bei Zinkmangel exprimiert wird (Waters und Eide, 2002). Bei den meisten Proteinen der ZIP-Familie handelt sich um integrale Membranproteine, die meist durch fünf bis acht Transmembrandomänen charakterisiert sind. Sie sind wahrscheinlich sehr spezifisch für Zink und werden meist dann induziert, wenn der Bedarf an Zink gedeckt sein muss (Grotz et al., 1998, Guerinot, 2000; Gaither und Eide, 2000,2001, Taylor et al., 2003).

ZRT1p, ZRT2p und FET4p werden durch die intrazelluläre Zink-Konzentration reguliert. Gesteuert werden diese Prozesse von ZAP1p (Zhao und Eide, 1997). ZAP1p ist ein hochaffines, spezifisches Aufnahmesystem. Dieses Protein reguliert die Transkription der Gene und hängt von der Verfügbarkeit von Zink ab. Sinkt die Zink-Konzentration im Zytosol, wird ZAP1p induziert, welches wiederum die Expression von anderen Proteinen für die Zinkaufnahme einleitet. Dabei bindet ZAP1 an eine 11bp große konservierte Sequenz im Promotor von Genen, die für Zink-Transportproteine kodieren. Diese Sequenz wird ZRE (zinc-responsive element) genannt (Zhao et al., 1998; Lyons et al., 2000). Auch kann es sein, dass ZAP1p einer positiven Autoregulation unterliegt, die ebenfalls von der Zinkkonzentration abhängt. In zinkhaltigem Medium wird die Aktivität von ZAP1p unterdrückt (Zhao und Eide, 1997).

Auch ZRT3p ist ein ZAP1p-Zielgen. ZRT3p reguliert den Efflux von Zink aus der Vakuole, wenn Zinkmangel im Zytosol herrscht (MacDiarmid et al., 2000). Es wird deutlich, dass bei intrazellulärem Zinkmangel sowohl Zinkaufnahme-Systeme der Plasmamembran, als auch Zinktransporter der Vakuolenmembran zur Bereitstellung von Zink im Zytosol durch ZAP1p aktiviert werden.

Der intrazelluläre Transport dient aber nicht nur dem Ausgleich von Mangelbedingungen, sondern wird auch zur Bereitstellung von Metallionen als Kofaktoren für Proteine genutzt. Dabei spielen die Proteine aus der CDF-Familie (cation diffusion facilitator) eine bedeutende Rolle (Paulsen und Saier, 1997). Zink ist wichtig für die Funktion des Endoplasmatischen Reticulums (ER). Damit ausreichend Zink im ER vorhanden ist, wird das Organell durch ein membrangebundenes Protein der CDF-Familie, MSC2p, versorgt (Li und Kaplan, 2001; Ellis

et al., 2004). Außerdem ist dieses Protein an der Verteilung von Zink in der Zelle, vor allem an den Zellkern, beteiligt (Li und Kaplan, 2001).

Aber auch für die Detoxifikation sind Proteine der CDF-Familie sehr wichtig. Werden Zellen erst Zinkmangel-Bedingungen und anschließend recht hohen Zinkkonzentrationen ausgesetzt, wird Zink sehr schnell in der Zelle angehäuft. Dies geschieht durch eine Überexpression des Plasmamembrantransporters ZRT1p und wird „Zink-Schock“ genannt. Die Zelle reagiert darauf, indem sie ZRT1p durch Endozytose entfernt (Gitan et al., 1998; Gitan und Eide, 2000). Weitere Möglichkeiten der Zinkkontrolle sind die Herunterregulierung der Aufnahmesysteme, ZRT1p, ZRT2p und FET4p (Zhao und Eide, 1996 a, b), die intrazelluläre Bindung des Metalls an Metallothioneine (Palmiter, 1998), der Efflux (Nies und Silver, 1995; nach Paulsen und Saier, 1997) und die Speicherung in der Vakuole (MacDiarmid et al., 2000). Dabei sind ZRC1p und COT1p verantwortlich für den Transport von Zink in die Vakuole, wenn die intrazelluläre Zinkkonzentration zu stark ansteigt, wie z.B. nach dem „Zink Schock“. Reguliert wird ZRC1p dabei ebenfalls von ZAP1p. COT1p hingegen nicht, so dass man annimmt, dass es weniger wichtig für den Zinktransport ist (MacDiarmid et al., 2003). ZRC1p ist in der Vakuolenmembran lokalisiert und besitzt sechs Transmembrandomänen (Kamizono et al., 1989). COT1p wurde erstmals als Cobalt-Resistenz- und –Detoxifikations-Protein in der mitochondrialen Membran identifiziert (Conklin et al., 1992). Später lokalisierte man COT1p vor allem in der Vakuolenmembran (Li und Kaplan, 1998; Myabe et al., 2001).

Zusätzlich zum Vakuolenspeicher wurden in *S. cerevisiae* kleine Kompartimente identifiziert, die angefüllt mit Zink waren und Zinkosomen im Säuger ähnelten. Sie traten vermehrt bei hohen Zinkkonzentrationen im Zytosol und bei ZRC1- und COT1-Mutanten auch in Mangelmedium auf. Es wird vermutet, dass zwischen diesen Vesikeln und der Vakuole eine dynamische Verbindung besteht (Devirgiliis et al., 2004).

Diese Zusammenstellung von Transportproteinen umfasst lange nicht alle in der Literatur beschriebenen. Es sollte nur ein kurzer Einblick in die unterschiedlichen Funktionen einzelner Proteine und ihr Zusammenwirken in der Zinkhomöostase gegeben werden. Auch wurde dies hier nur für *S. cerevisiae* dargestellt. Angehörige der ZIP- und CDF-Familien kommen aber nahezu bei allen Eukaryonten vor (Dufner-Beattie, 2003, 2004; Palmiter und Findley, 1995;

Palmiter et al., 1996; Eng et al., 1998; Grotz et al., 1998; Gaither und Eide, 2000; Clemens et al., 2002; Eide und Guerinot, 1997).

1.5 Magnesium

1.5.1 Die Funktion von Magnesium

Magnesium ist nach Kalium das zweite wichtigste Kation in der Zelle. Es ist an der Aktivierung und Regulation von bislang 300 bekannten Enzymen beteiligt und spielt im gesamten Elektrolythaushalt eine zentrale Rolle. Dabei ist freies ionisiertes Magnesium die physiologisch aktive Form dieses Elements. Magnesium steuert beispielsweise die Phosphorylierung der Na^+ / K^+ -ATPase, beeinflusst dadurch die intrazelluläre Kaliumspeicherung und ist wichtig für den Energiestoffwechsel. Überhaupt kommt der Energieträger ATP meist als MgATP in der Zelle vor (nach Dufour et al., 1980). Magnesium stabilisiert die Plasmamembran, Ribosomen und Nukleinsäuren (nach Altura und Altura, 1996). Es wird für die DNA-Replikation, die Transkription und Translation benötigt (nach Vernon, 1988). Auch besitzt es wahrscheinlich regulierende Funktion bei der Zellteilung. In mehreren Organismen, wie zum Beispiel *S. pombe*, konnte kurz vor der Zellteilung eine kurzzeitige Mg-Aufnahme beobachtet werden (MacDairmid et al., 1998). Durch die vielen biochemischen zellulären Aufgaben, die Magnesium erfüllt, spielt es eine wichtige Rolle in der Kontrolle von neuronalen Aktivitäten, Muskelkontraktionen, Blutdruck und des peripheren Blutflusses (nach Altura und Altura, 1996).

1.5.2 Die intrazelluläre Magnesium-Konzentration

Eukaryotische Zellen halten eine zytosolische Magnesiumkonzentration an freien Magnesiumionen zwischen 0,1-1 mM aufrecht, wobei die Mechanismen noch weitgehend unbekannt sind (nach Romani und Maguire, 2002). Da es eine hohe chemische Reaktionsbereitschaft besitzt, liegt Magnesium allerdings meistens in Verbindungen und nur in sehr geringen Mengen in ionisierter Form in der Zelle vor. Es ist an negativ geladenen Liganden, wie z.B. Polyphosphaten, RNA, DNA und ATP, gebunden (nach Romani und Maguire, 2002).

In *S. pombe* wurden von Zhang et al. (1997) bei einer extrazellulären Magnesiumkonzentration ($[Mg^{2+}]_o$) von 1,97 mM eine intrazelluläre Magnesiumkonzentration ($[Mg^{2+}]_i$) von $2,18 \pm 0,11$ mM gemessen. Betrug $[Mg^{2+}]_o$ allerdings nur 0,44 mM war auch $[Mg^{2+}]_i$ geringer, nämlich nur $0,91 \pm 0,08$ mM. Dabei zeigten Färbungen mit dem spezifischen Farbstoff für Magnesium, mag-fura-2, dass das Magnesium, ob frei oder gebunden, vor allem in Kompartimenten und viel weniger im Zytoplasma oder im Zellkern lokalisiert werden konnte.

Die totale intrazelluläre Magnesium-Konzentration beträgt bei *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen, die in synthetischem Medium mit $[Mg^{2+}]_o = 1$ mM Magnesium wachsen, ungefähr 400 nmol/mg Protein (Beeler et al., 1997). 1 mM Magnesium liegt als MgATP vor, 117 nmol Mg^{2+} /mg Protein werden durch RNA gebunden und ca. 75% der gesamten Magnesiumkonzentration liegt als Mg^{2+} -Polyphosphatkomplex in der Vakuole vor (nach Beeler et al., 1997).

Das Gewebe des erwachsenen Menschen enthält zwischen 20-28 g Magnesium. Dabei sind 52% des Magnesiums in den Knochen, 46% in den Muskeln und 2% in extrazellulären Flüssigkeiten lokalisiert (nach Yago et al., 2000). In Säugerzellen allgemein liegt die zytosolische freie Magnesiumkonzentration zwischen 0,25-1 mM (nach Grubbs, 2002).

1.5.3 Die Magnesium-Homöostase

In *S. pombe* wurde eine Zunahme der intrazellulären freien Magnesiumkonzentration bei einer Zunahme der extrazellulären Konzentration innerhalb von fünf min beobachtet. Wurde die extrazelluläre Konzentration allerdings gesenkt, konnte für 30 min keine Veränderung der Magnesiumkonzentration in der Zelle beobachtet werden (Zhang et al., 1997).

Bei *S. cerevisiae* wird $[Mg^{2+}]_i$ im Medium, welches 1-100 mM enthält, relativ konstant gehalten. Fällt die intrazelluläre Magnesiumkonzentration allerdings unter einen bestimmten Schwellenwert, wird nach einiger Zeit erst das Wachstum eingestellt, und nach einer längeren Dauer führt der Mangel zum Zelltod. Die erste Zeit in Magnesium-Mangelmedium konnte allerdings durch in der Vakuole gespeichertes Magnesium überbrückt werden, so dass die Zellen mit normaler Teilungsrate weiter wachsen konnten (Beeler et al., 1997).

In der Säugerzelle ist die Konzentration an ionisiertem Magnesium konstant, auch wenn es starke Schwankungen in der gesamten zellulären Magnesiumkonzentration gibt.

Die Schwankungen konnten an isolierten Zellen verschiedener Organe durch physiologische, hormonelle und metabolische Reize verursacht werden (aus Fatholahi et al., 2000). Zur Aufrechterhaltung einer konstanten $[Mg^{2+}]_i$ auch in Stresssituationen, benötigt die Zelle ein gut funktionierendes Transportsystem.

1.5.4 Magnesium-Transportsysteme

Das erste Magnesium-Aufnahmesystem wurde über den *corA* (Co^{2+} -Resistenz) Locus identifiziert. Mutationen dieses Gens führten zu erhöhter Kobalt-Resistenz in *E. coli* (Silver, 1969; Nelson und Kennedy, 1971). Heute ist bekannt, dass in Bakterien drei sehr gut untersuchte Proteine CorA, MgtA und MgtB existieren. Die CorA-Familie ist dabei in vielen Eubakterien und einigen Archaeobakterien in Form eines primären konstitutiven Magnesium-Influx-Systems vertreten (Hmiel et al. 1986 und 1989). CorA wurde in *Salmonella enterica* serovar typhimurium als integratives 37 kDa-Membranprotein charakterisiert, das aus einer großen, sauren, N-terminalen, periplasmatischen Domäne und drei Transmembrandomänen am C-terminalen Ende besteht. Dabei befindet sich nach der ersten Domäne das stark konservierte Motiv, GMN (Smith et al., 1993; Snavely et al., 1989a; Kehres et al., 1998). Die meisten Transportproteine besitzen mindestens fünf Transmembrandomänen. Da kein weiteres Gen für die Magnesium-Aufnahme codiert, scheint CorA in der Membran als Homooligomer vorhanden zu sein. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um ein Pentamer (Szegedy und Maguire, 1999). CorA wird konstitutiv exprimiert (Chamnongpol und Groisman, 2002; Snavely et al., 1991b; Tao et al., 1998). Zusätzlich werden noch Kobalt und Nickel transportiert, allerdings nicht physiologisch, da die K_m -Werte (Michaelis-Konstante) für diese Ionen sehr hoch sind. Ein hoher K_m -Wert weist auf eine schwache Affinität des Enzyms zum Substrat hin. Auch muss die Substratkonzentration sehr hoch sein, damit das Enzym seine maximale Katalysegeschwindigkeit erreicht. Kobalt und Nickel werden bei hohen, toxischen extrazellulären Konzentrationen von CorA in die Zelle transportiert (Hmiel et al., 1986 und 1989; nach Alberts et al., 2004). Nicht nur am Influx ist CorA beteiligt, sondern auch den Efflux kontrolliert es. Dieser hängt von der externen Magnesiumkonzentration ab. Erst wenn kein Magnesium mehr im Medium vorhanden ist, stellte das CorA-Protein bei *S. enterica* serovar typhimurium den Efflux ein (Snavely et al., 1989a).

MgtA und MgtB wurden als erstes in *S. enterica* serovar typhimurium identifiziert (Hmiel et al., 1989, Snavely et al., 1989ab). Sie wurden als große Multi-Transmembranproteine, welche zu den P-Typ-ATPasen gehören, beschrieben (Maguire, 1992). MgtA und MgtB zeigen mehr Ähnlichkeit zu eukaryontischen Ca-ATPasen als zu prokaryontischen P-Typ-ATPasen (Maguire, 1992; Maguire et al., 1992). Die Synthese der beiden Proteine wurde in Zellen, welche in Medium mit normalem Magnesiumgehalt wuchsen, gehemmt. Sobald Magnesium-Mangelbedingungen eintraten, wurde ihre Synthese induziert (Hmiel et al., 1989). Beide Transporter transportieren neben Magnesium auch Nickel. Kobalt wird nicht transportiert und ist zudem noch ein kompetitiver Inhibitor (Moncrief und Maguire, 1999).

CorA ist der Haupt-Magnesiumtransporter bei Bakterien, der ohne zusätzlichen Energieaufwand Ionen transportiert. Außerdem wird er unter allen Wachstumsbedingungen exprimiert und nicht nur unter Magnesium-Mangel, wie es bei MgtA und MgtB der Fall ist. Da also CorA auch unter Mangelbedingungen exprimiert wird, ist Magnesium offensichtlich so wichtig, dass zusätzlich noch zwei weitere aktiv transportierende Systeme induziert werden müssen.

Einige eukaryontische Homologe zum CorA Magnesium-Transporter, ALR1p, ALR2p, MRS2p und LPE10p wurden in *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert. Diese Proteine sind entfernte Verwandte der CorA-Proteinfamilie und teilen strukturelle Eigenschaften mit CorA. Sie besitzen eine stark geladene N-terminale Domäne und zwei hydrophobe Regionen nahe dem C-terminalen Ende. Auch dort findet sich ein konserviertes Motiv. In diesem Fall heißt es (Y/F)GMN (MacDiarmid und Gardner, 1998, Bui et al., 1999). Bis auf dieses kurze Motiv besteht allerdings kaum Homologie zu den bakteriellen Magnesium-Transportern, die meist drei und nicht zwei Transmembrandomänen besitzen (Smith et al., 1993, Bui et al., 1999). MacDiarmid und Gardner (1998) identifizierten ALR1p und ALR2p im Zusammenhang mit einer erhöhten Aluminium-Resistenz in *S. cerevisiae*-Zellen. Des Weiteren vermuteten sie, dass es sich dabei um Magnesium-Transportproteine handeln musste. In normalem Standardmedium für *S. cerevisiae*, einem Hefeextrakt-Glukose-Pepton-Medium, konnten die beiden Mutanten *alr1* und *alr2* nur sehr schlecht wachsen, was erst durch Hinzugabe hoher Magnesiumkonzentrationen behoben werden konnte. In weiteren Versuchen wurde gezeigt, dass ALR1p ein Plasmamembranprotein ist, das durch Magnesium reguliert und wahrscheinlich unter Magnesium-Mangel exprimiert wird (Graschopf et al., 2001).

ALR2p ist ein Paralog von ALR1p. ALR2p kann, wenn es überexprimiert wird, *alr1*-Mutanten kompensieren. Eine Überexpression von ALR1p führt zu einer verstärkten Al-, Ni, Zn, Mn- und Co-Resistenz. Mutationen in *alr1* resultierten in erhöhten Sensitivitäten gegen die gleichen Metalle (MacDiarmid und Gardner, 1998). Wie CorA regelt ALR1p den Influx, wie auch den Efflux von Magnesium. Dabei wird vermutet, dass es sich nicht um eine einfache Austauschreaktion handelt, sondern bei beiden um Ionenkanäle, die wahrscheinlich vom extrazellulären Magnesium reguliert werden (Snively et al., 1989a; MacDiarmid und Gardner, 1998; Liu et al., 2002). Auch in der mitochondrialen Membran von *S. cerevisiae* wurden zwei Magnesium-Transportproteine lokalisiert. Von MRS2p wird angenommen, dass es ein Transportprotein in der inneren mitochondrialen Membran ist (Bui et al., 1999). Neben CorA (Bui et al., 1999), konnten andere *MRS2*-Orthologe identifiziert werden, die eine *MRS2*-Disruptante komplementieren, wie zum Beispiel das humane Ortholog, hsaMrs2p, (Zsurka et al., 2001) und AtMRS2-1 aus *A. thaliana* (Schock et al., 2000). Im Gegensatz zum CorA-Protein weisen diese Proteine eine größere Homologie zum MRS2p auf. Es handelt sich dabei um eine Sequenzkonservierung über den gesamten Proteinbereich von 49,5 % für AtMRS2-1 und 27 % für hsaMrs2p. Der zweite mitochondriale Magnesiumtransporter, welcher ebenfalls in der inneren Membran lokalisiert wurde, ist LPE10p. LPE10p ist zu 32% identisch mit MRS2p und sie gleichen sich stark in Struktur und Funktion. Trotz allem können sie nicht einfach gegeneinander ausgetauscht werden, denn fehlt eines dieser Proteine, sinkt der Magnesiumspiegel in den Mitochondrien (Gegan et al., 2001).

Bei Pflanzen konnten ebenfalls Magnesium-Transporter identifiziert werden. Der Mg^{2+}/H^{+} -Austauscher in *Arabidopsis thaliana*, AtMHX wurde im Tonoplasten lokalisiert. Er transportiert, vom Protonengradienten abhängig, Magnesium in die Vakuole (Shaul, et al., 1999). Dort konnte das stark konservierte Motiv GMN, was wichtig für den Magnesium-Transport ist, identifiziert werden.

Bei Säugern wurden Mg^{2+}/Na^{+} -Antiporter in der Plasmamembran lokalisiert. Es wurden drei verschiedene Antiporter in den Leberzellen der Ratte identifiziert. Es handelt sich dabei um Na^{+} - oder Ca^{2+} -Austauscher, wobei wahrscheinlich nur der erst genannte für Influx und Efflux zuständig ist. Der Ca^{2+} -Austauscher regelt nur den Efflux (Cefaratti et al., 1998 und 2000). Dieses Ergebnis wurde durch Experimente mit isolierten Epithelzellen aus dem Pansen von Wiederkäuern gestützt. Auch dort wurde ein Na^{+}/Mg^{2+} -Austauschmechanismus

identifiziert, wobei meist der nach innen gerichtete Na^+ -Gradient den Magnesium-Efflux bedingt. Dieser Effekt kann auch umgekehrt werden (Schweigel et al., 2000).

1.6 Die Vakuole

Die Vakuole ist ein Kompartiment, das meist einen großen Teil des Zellvolumens von Pflanzen- und Pilzzellen ausmacht. In tierischen Zellen entsprechen die Lysosomen den Vakuolen. *Saccharomyces cerevisiae* besitzt meist eine große Vakuole, welche fast das gesamte Volumen der Zelle einnimmt. Die *S. cerevisiae*-Zelle kann aber auch zwei bis drei Vakuolen besitzen (Pringle et al., 1989; Vida und Emr, 1995). *Schizosaccharomyces pombe* weist mehrere kleine Vakuolen auf (nach Takegawa et al., 2003). Während des Zellzyklus werden bei *S. cerevisiae* die Vakuolen gleichmäßig auf die Mutter- und Tochterzellen verteilt, wohingegen bei *S. pombe* auch neue Vakuolen gebildet werden können (nach Takegawa et al., 2003). Deswegen können hier größere neben kleinen Vakuolen erscheinen.

In Stresssituationen, z.B. in hypotonischem Medium, kann *S. pombe* innerhalb von zehn Minuten aus vielen kleinen eine große Vakuole bilden (Bone et al., 1998). Vakuolen enthalten viele verschiedene Enzyme, die je nach Organismusart sehr unterschiedliche Aufgaben erfüllen. Selbst Vakuolen einer Zelle variieren in ihren Funktionen. In Pflanzen dienen Vakuolen als Speicher für Nährstoffe und Abbaustoffe, der Vergrößerung des Zellvolumens und der Regulierung des Turgordrucks. Damit werden sie zum homöostatischen Hilfsmittel wenn eine Änderung der Ionenkonzentration eintritt, indem sie den Abbau und die Re-synthese von Polymeren, wie z.B. Polyphosphaten, kontrollieren (Alberts et al., 2004). Auch in Hefen sind Vakuolen wichtige Speicher für Aminosäuren, kleine Ionen und Polyphosphate. Wie in Pflanzen sind sie bedeutend für die Osmoregulation und Ionenhomöostase (Jones et al., 1997). Wichtig sind Vakuolen auch für die Regulation der zytosolischen Metallionen-Konzentration, sowohl als Speicher für essentielle Metaboliten, als auch als Detoxifikationssystem. Schon bei geringen Cadmium-Konzentrationen im Zytosol werden bei Pflanzen und einigen Hefen Phytochelatine gebildet (Grill et al., 1985; Rauser, 1995). Diese bilden mit Cadmium einen Phytochelat-in-Komplex, welcher zum Schutz der Zelle in die Vakuole transportiert wird (Ortiz et al., 1992). Ramsay und Gadd (1997) haben durch Versuche mit vakuolären Mutanten-Stämmen die Vakuole als Detoxifikations-System für Zn, Mn, Co, Ni, Cu und Cd bestätigt.

Außerdem wird auch vermutet, dass die Vakuolen als Hauptspeicher für divalente Kationen dienen (Klionsky et al., 1990). Bei *Arabidopsis thaliana* werden die Magnesiumkonzentrationen über die Chloroplasten- und Vakuolenmembranen reguliert. Die Vakuole scheint dabei eine Schlüsselrolle in der Magnesium-Homöostase einzunehmen (Shaul et al., 1999).

1.7 *Schizosaccharomyces pombe* als Modellorganismus

Seit 1893 erstmalig in der „Wochenschrift für Brauerei“ über *Schizosaccharomyces pombe* berichtet wurde, ist viel an dieser Spaltheefe geforscht worden. Dies liegt daran, dass die Hefe ein attraktiver, einzelliger Organismus ist, der sich ausgezeichnet für zellbiologische, physiologische, wie auch molekularbiologische Studien heranziehen lässt. Da *Schizosaccharomyces pombe* als Einzeller einem Lebenszyklus von ca. ein bis zwei Stunden folgt und ein eukaryotischer Organismus ist, eignet sich diese Hefe bestens als Modellorganismus für Untersuchungen zellulärer Funktionen, wie die Identifizierung von Transport- und Regulationproteinen für die Magnesium-Homöostase. Auf dem Gebiet der Molekular- und Zellbiologie sind *S. pombe* und *Saccharomyces cerevisiae* die am meisten untersuchten und charakterisierten Hefearten (Beach and Nurse, 1981). Der Zellzyklus, die Signaltransduktion, das RNA-Splicing und die Chromosomenstruktur ähneln stark denen der Säugerzellen. (Sipiczki, 1989; Russell, 1989). Unter Stresseinwirkung zeigt *S. pombe* eine analoge Signaltransduktion wie der Mensch (Shiozaki and Russel, 1996; Wilkinson et al., 1996). Des Weiteren ist das gesamte Genom von *S. pombe* sequenziert und im Internet verfügbar (Wood et al. 2002). Dies bildete die Grundlage für diese Arbeit.

1.8 Zielsetzung

Der Grundgedanke dieser Arbeit war, ein Transportsystem zu identifizieren und zu untersuchen, welches an der Metall-Homöostase in *S. pombe* beteiligt ist.

Den ersten Schritt bildete eine ausgiebige Suche in der SWISS PROT-Datenbank. Dabei sollten vor allem Transportproteine der Plasmamembran und Schwermetall-Resistenz-Proteine berücksichtigt werden, deren Struktur und Funktion noch nicht untersucht wurden.

Zur Untersuchung der Funktion des ausgewählten Proteins sollte eine gezielte Disruption durchgeführt werden. Dazu sollte eine Disruptionskassette erstellt werden, durch welche der Leserahmen des ausgewählten Proteins zu mindestens 90% zerstört würde.

Es sollte untersucht werden, ob es Unterschiede zwischen dem resultierenden Phänotyp und dem Wildtyp bezüglich der Toleranz von Cd, Zn, Cu, Co, Ni, Mn, Al und Mg gibt. Sodann sollten zur näheren Charakterisierung des Phänotyps Wachstumsversuche in Gegenwart der Metallionen durchgeführt werden, bei denen ein Unterschied zwischen Disruptanten- und Wildtyp-Stämmen beobachtet wurde. AAS-Studien sollten anschließend über die intrazelluläre Metall-Konzentration Aufschluss geben.

Um zu beweisen, dass der Phänotyp auf die Disruption zurückzuführen war, sollte eine Komplementation des Leserahmens erfolgen. Dafür sollte der Leserahmen des Proteins in einen Shuttle-Expressionsvektor kloniert und in *S. pombe*-Disruptions-Stämme transformiert werden. Die resultierenden Transformanten sollten durch Plasmidverlusttests und Wachstumsversuche in Medien, die mit den Metallen supplementiert wurden, bei denen ein Unterschied zwischen Disruptanten- und Wildtyp-Stämmen festgestellt wurde, kontrolliert werden.

Für die Lokalisation von Magnesium in der Zelle von *S. pombe* sollten die Ionen mit dem Farbstoff Magensium Green^{TR} gefärbt und unter dem konfokalen Mikroskop analysiert werden. Dabei sollte ein Vergleich zwischen dem Stamm, in dem der Leserahmen des Magnesiumtransporters disruptiert wurde mit dem Wildtyp-Stamm erstellt werden. Beide Stämme sollten unter Magnesium-Mangelbedingungen und im Magnesium-Überschuss untersucht und verglichen werden.

Abschließend sollte eine Lokalisationsstudie des Proteins erfolgen. Dafür sollte ein GFP-Fusionsprotein konstruiert und in *S. pombe* transformiert werden. Die Transformanten sollten unter dem konfokalen und Fluoreszenzmikroskop untersucht werden. Eine Kolokalisation sollte durch Farbstoffe, die bestimmte Kompartimente anfärben, erreicht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Es wurden Chemikalien der folgenden Firmen verwendet: Difco (Augsburg), Fluka (Ulm), Gibco BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen).

Die Chemikalien besitzen jeweils den Reinheitsgrad p.a. Die Herstellung verschiedener Puffer und Lösungen wird bei den jeweiligen Methoden angeführt. Die Zugabe der verschiedenen Medienbestandteile erfolgte jeweils in w/v bei festen und v/v bei flüssigen Substanzen.

2.1.2 Enzyme

Die Enzyme für die molekularbiologischen Arbeitstechniken stammten, wenn nicht anders vermerkt, von der Firma Roche (Mannheim). Die Alkalische Phosphatase wurde von New England Biolabs geliefert. Alle Enzyme wurden nach Herstellervorschrift eingesetzt.

2.1.3 Mikroorganismen

Es wurden folgende *Schizosaccharomyces pombe*-Stämme verwendet:

Tabelle 2.1: Die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme; P bezeichnet die Ploidie der Stämme.

Stamm	Genotypbezeichnung	P	Quelle
D18h ⁻	<i>ura4</i> -D18, h ⁻	1n	U. Leupold, Bern
972h ⁻	h ⁻	1n	U. Leupold, Bern
130	<i>his3</i> Δ, <i>leu1</i> -32, <i>ura4</i> -D18, <i>ade6</i> -M210, h ⁺	1 n	K. Gould, Vanderbilt
131	<i>his3</i> Δ, <i>leu1</i> -32, <i>ura4</i> -D18, <i>ade6</i> -M216, h ⁻	1 n	K. Gould, Vanderbilt

130x131	<i>his3Δ/his3Δ, leu-32/leu-32, ura4-D18/ura4-D18, ade6-M210/ade6-M216, hrf1/hrf1</i>	2 n	diese Arbeit
SD5	<i>his3Δ/his3Δ, leu-32/leu-32, ura4-D18/ura4-D18, ade6-M210/ade6-M216, hrf1/hrf1:his3</i>	2 n	diese Arbeit
13-1	<i>his3Δ, leu1-32, ura4-D18, ade6-M216, h⁻</i>	1n	diese Arbeit
13-2	<i>his3Δ, leu1-32, ura4-D18, ade6-M216, h⁻, O13779: his3</i>	1n	diese Arbeit
13-3	<i>his3Δ, leu1-32, ura4-D18, ade6-M210, h⁺</i>	1n	diese Arbeit
13-4	<i>his3Δ, leu1-32, ura4-D18, ade6-M210, h⁺, O13779: his3</i>	1n	diese Arbeit
<i>vmu1::kan-1</i>	<i>ura4-D18, h⁻, O13779: kan</i>	1n	diese Arbeit
<i>vmu1::kan-2</i>	<i>ura4-D18, h⁻, O13779: kan</i>	1n	diese Arbeit
13-2:pSLF173	<i>his3Δ, leu-32, ura4-D18, ade6-M216, h⁻, O13779: ura4</i>	1n	diese Arbeit
13-2:pTG9	<i>his3Δ, leu-32, ura4-D18, ade6-M216, hrf1, O13779: ura4-D18</i>	1n	diese Arbeit
D18 h ⁻ : pFA6aGFP(S65T)KanMX6	<i>ura4-D18, h⁻, O13779: kan</i>	1n	diese Arbeit
D18 h ⁻ : pFA6a3HAKanMX6	<i>ura4-D18, h⁻, O13779: kan</i>	1n	diese Arbeit
D18h ⁻ : pFA6akanMX6 - P3nmt1GFP	<i>ura4-D18, h⁻, O13779: kan</i>	1n	diese Arbeit
D18h ⁻ : pFA6akanMX6 – P41nmt1GFP	<i>ura4-D18, h⁻, O13779: kan</i>	1n	diese Arbeit
D18h ⁻ : pFA6akanMX6 – P81nmt1GFP	<i>ura4-D18, h⁻, O13779: kan</i>	1n	diese Arbeit

Es wurde folgender *Escherichia coli* – Stamm eingesetzt:

Tabelle 2.2: Der in dieser Arbeit verwendete Bakterienstamm

Stamm	Genotypbezeichnung	Quelle
Dh5 α	F' / endA1, hsdR17 (R _k ⁻ m _k ⁺), supE44, thi-1, recA1, gyrA, (Nal ^r)RelA1, Δ (lacZYA-argF) _{U169} , (Φ 80lacZ Δ M15), amp ^S , tet ^S	D. Hanahan (1983)

2.1.4 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in der folgenden Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Plasmide

Bezeichnung	Hefemarker	Merkmale	Herkunft
pUC19		amp ^R , Polycloning site im <i>lacZ</i> -Gen	Yanisch-Perron et al. (1985)
pAF1	<i>his3</i> ⁺	Derivat aus pBG1 und pBluescript II SK (+)	Ohi et al. (1995)
pFA6a-kanMX6	kanMX6	Derivat des Vektors pFA, Hefe/ <i>E.coli</i> -Shuttle-Vektor, wird als PCR-Template für Transformationen verwendet	Wach et al. (1997)
pREP1	<i>leu1</i> ⁺	Hefe/ <i>E.coli</i> -Shuttle-Vektor, <i>nmtI</i> ⁺ -Promotor und Terminator, amp ^R	Maundrell (1990) Maundrell (1993)
pREP2	<i>ura4</i> ⁺	Hefe/ <i>E.coli</i> -Shuttle-Vektor, <i>nmtI</i> ⁺ -Promotor und Terminator, amp ^R	Maundrell (1990) Maundrell (1993)
pTG9	<i>ura4</i> ⁺	Derivat des Vektors pUC19, amp ^R , GFP Expressionsvektor mit <i>nmtI</i> ⁺ -Promotor für GFP, Hefe/ <i>E.coli</i> -Shuttle-Vektor	T. Groß, Braunschweig
pFA6a-3HA-kanMX6	kanMX6	C-terminales tagging von Proteinen	Longtine et al. (1998)
pFA6a-GFP(S65T)-	kanMX6	C-terminales tagging	Wach et al. (1997)

kanMX6		von Proteinen	
pFA6a-kanMX6-P3nmt1GFP	kanMX6	Dient der Expression von Proteinen unter Einfluss des nmt1-Promotors und zum N-terminalen tagging von Proteinen	Bähler et al. (1998)
pFA6a-kanMX6-P41nmt1-GFP	kanMX6	Dient der Expression von Proteinen unter Einfluss des nmt1-Promotors und zum N-terminalen tagging von Proteinen	Bähler et al. (1998)
pFA6a-kanMX6-P81nmt1-GFP	kanMX6	Dient der Expression von Proteinen unter Einfluss des nmt1-Promotors und zum N-terminalen tagging von Proteinen	Bähler et al. (1998)
pSLF173	<i>ura4+</i>	nmt-Expressions-Vektor für einen N-terminalen triple HA Epitope tag. Beinhaltet ein ATG-Codon, aber kein Stopcodon.	Forsburg, S.L. and Sherman, D.A. (1997)

2.1.5 Synthetische Oligonukleotide

Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden Primer der folgenden Firmen verwendet: Metabion, Thermo Hybaid, Invitrogen, Sigma-ARK GmbH, Amersham Pharmacia Biotech. Die Sequenzen der in der Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4: Namen, Sequenzen und Restriktionsschnittstellen (wenn vorhanden) der in der Arbeit verwendeten Primer

Name	Sequenz (5' - 3')	Restriktions-Schnittstelle
Primer für die Disruption des Leserahmens O13779		
SHP 1	AAA GTC GAC CTG GTT CAA TAT GTG TAG GC	<i>SalI</i>
SHP 2	AAA GGA TCC GCT TCG TCT GGT TGC AA	<i>BamHI</i>
SHP 3	AAA GAG CTC CAG GGT TAC CTT GTA GCT C	<i>EcoRI</i>
SHP 4	AAA GAA TTC ACC AAG ACG TCG AGT GTG TT	<i>SacI</i>
SHP 5	ACT TGA TTG CGC GGT AAT AC	
SHP 6	GCATGGTTTCCGCTACGTGT	
SHP 7	AAATTAGAACCACCGTCTGAGCA	
SHP 8	AAA AGG ATA GTA GAA GGA AGC TC	
Kan2R	CCA TCC AGT TTA AAC GAG CT	
SPHIS3-1	CAC AGC GAT AAG GCT GAA GTT C	
SPHIS3-2	GCG TAT CAC TGT TGG CAC AG	
Primer für die Komplementation		
SPAC-1	AAA GGA TCC ATG CCA TCC AAT ACA TCC CG	<i>BamHI</i>
SPAC17.2	AAA CCC GGG CTA ATG ATG ATG ATG ATG AAT AAC TTT GTA CCA TTT ACA	<i>SmaI</i>
O13779-GFP-for	AAA GAG CTC AAA TGC CAT CCA ATA CAT CCCG	<i>EcoRI</i>
O13779-GFP-rev	AAA GAA TTC GAA ATA ACT TTG TAC CAT TTA CA	<i>BamHI</i>
O13779LR-Fwd	AAA GGA TCC ATG CCA TCC AAT ACA TCC G	<i>BamHI</i>
pSLFO13 fw	ATA TAT AGC GGC CGC ATG CCA TCC AAT ACA TCC CGG TCA G	
pSLFO13 rev	AAA CCC GGG CTA AAT AAC TTT GTA CCA TTT ACA AAG A	<i>SmaI</i>
Primer für das GFP-tagging		
Promotor-1	AAA CCC GGG ACA ATC TGG TGG GGA TAA GAT TTT TTA TAA GTC GCG GTA CTT ATT TTG	<i>SmaI</i>
Promotor-2	TTT TTA TAA GTC GCG GTA CTT ATT TTG TCT AGT AAA CAA GAA TTC GAG CTC GTT TAA AC	

ORFO13-1	AAA GAT ATC ATT GAT ATG GAA GGC AAT TTT TTA AAG ACC CCC AAA TCA ATA TAC CAG ACA A	<i>EcoRV</i>
ORFO13-2	CCA AAT CAT ATA CCA GAC AAA ATA CAG TAT CTT TAA GCA TTT TGT ATA GTT CAT CCA TG	
Kan-GFP for (c-terminal)	CTT GGT TCT TTA GTA TTC TTG GTA GTC TGA TGA TTT TTG CGA TTT CAT CTT TCA TTC TTT GTA AAT GGT ACA AAG TTA TTC GGA TCC CCG GGT TAA TTAA	
Kan-GFP rev (c-terminal)	AAA ACG GTC TAA TAC ATT AAT TTT AAA ACT GAG ATA AAG TCA CGA CTC AAG CAA TAA AGG ACA GAA ACG AGA AAA TAC AGG AAT TCG AGC TCG TTT AAAC	
GFPO13779fw (n-terminal)	CTC TTT GGC ATT ATA ACT ATT TTG ATA AAC CAA GAA TAA TAC ATT CAT TGC TAT ACA ACC TGT CAA TTC TTA GCA TCC ATA ATC CTG TTT GAA TTG AAT TCG AGC TCG TTT AAA C	
GFPO13779rv (n-terminal)	ACG ATC AGA AAA TCT AGG CCT GTT CTG CAT CCT AGC ATT TTG TTT GTA ATA AAA CCC GCC CGT AGG CAC TGA CCG GGA TGT ATT GGA RGG CAT TTT GTA TAG TTC ATC CAT GC	
GFP-control-2- for	ATG CAT TGC TGG ACG ATA CT	
GFP-control-2- rev	AAA GGA TCC TGT ACA TAA CCT TCG GGC	
O13-link-fwd	ATG CAA CGA GTC ATG GCA AG	
O13-link-rev	AGC GCC GGC GCC AGC GCC GGC ACC AGC ACC AAT AAC TTT GTA CCA TTT AC	
PFA-link fwd	GGT GCT GGT GCC GGC GCT GGC GCC GGC GCT CGG ATC CCC GGG TTA ATT AA	
Primer für His3-Sonde		
His3-1	ATA TTC ATT GAC AAG AGT TA	
His3-2	ATA GAG GTG TCC TTC TTG AT	
Primer für RNA-Sonden		
ACTF	TCG CAG CGT TGG TTA TTG AT	
ACTR	TAG AAG CAC TTA CGG TAA ACG ATA	
O13-1	GAGCTTCCTTCTACTATCCA	
O13-2	TGAATGAACGGAAGGTAACA	
Primer für die RT-PCR		
RT-O13-1fw	GGT GAA TGC CGC AAG CTG AT	

RT-O13-2fw	TAG CTC CTA GAG GTG AAA TT	
RT-O13-1rev	TAG TGA CTA TGT GAT CCT GC	
RT-O13-2rev	CAA CAA AGT CCT GGT ACG TC	

2.1.6 Datenbankadressen

TREBML-Datenbank: <http://us.expasy.org/sprot>

Domänen-Struktur von Proteinen: <http://www.sanger.ac.uk./Software/Pfam/>

Dialign-Programm: <http://www.genomatix.de/cgi-bin/dialign/dialign.pl>

Methoden speziell für *S. pombe*: <http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/index.html>

http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/S_pombe/docs/nurse_lab_manual.pdf

2.1.7 Medien und Lösungen

Alle verwendeten Medien wurden im Autoklaven bei 121°C 20 min sterilisiert. Zur Herstellung von Nährböden wurden dem jeweiligen Medium 2 % Agar vor dem Autoklavieren hinzu gegeben. Stammlösungen, die nicht autoklavierbar waren, wurden durch einen Filter von 0,2 µm Porengröße (Roth, Darmstadt) sterilfiltriert.

Nährmedien zur Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *Escherichia coli* erfolgte bei 37°C in folgenden Medien:

Luria-Bertani-Medium

LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

Pepton	1,0 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	1,0 %

Zur Selektion auf die entsprechende Resistenz, wurde dem Medium sterilfiltriertes Ampicillin (125 mg/l) oder Kanamycin (250 mg/l) nach dem Autoklavieren zugegeben.

Für die Blau-Weiß-Selektion durch Insertionsinaktivierung des LacZ- α -Gens in pUC19 wurde den LBA-Platten zusätzlich 5 ml/l X-Gal-Stammlösung (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) und 2 ml/l IPTG-Stammlösung (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) beigelegt.

X-Gal-Stammlösung: 20 mg X-Gal/ml Dimethylformamid

IPTG-Stammlösung: 23 mg IPTG/ml

Nährmedium zur Kultivierung von *Schizosaccharomyces pombe*

Die nichtselektive Kultivierung der Hefen erfolgte bei 28 °C in Hefeextrakt-Medium ohne weiteren Zusatz.

Hefeextrakt-Glukose-Medium (YE)

Glukose	3,0 %
Hefeextrakt	0,5 %

Zur Identifikation diploider Zellen wurde dem YE-Medium 20 mg/ml Phloxin und für die Selektion auf Geneticin (G 418 Sulfat; Promega, USA) 100 mg/l nach dem Autoklavieren hinzugefügt.

Für vegetatives Wachstum und für die Anzucht auxotropher Hefestämme wurde Edinburgh-Minimalmedium (EMM, Alfa et al., 1993) verwendet.

Edinburgh-Minimalmedium :

Die folgenden Mengen beziehen sich auf einen Liter:

		Endkonzentration
Kaliumhydrogenphthalat	3 g	14,7 mM
NaH ₂ PO ₄	2,2 g	15,5 mM
NH ₄ Cl	5 g	93,5 mM
Glucose Monohydrat	20 g	101 mM
Salzstammlösung (50x)	10 ml	
Mineralstammlösung (10000x)	0,5 ml	
Vitaminstammlösung (1000x)	1 ml	

Sterilfiltrierte Salz-, Mineral- und Vitaminstammlösung wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Lösung hinzugefügt.

Salzstammlösung (50x):

MgCl ₂ + 6 H ₂ O	5,2 mM
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,1 mM
KCl	13,4 mM
Na ₂ SO ₄	0,24 mM
ad. 1l A. dest.	

Mineralstammlösung (10000x):

H ₃ BO ₃	8,1 µM
MnSO ₄	2,37 µM
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	1,39 µM
FeCl ₃ * 6 H ₂ O	0,74 µM
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,25 µM
KJ	0,6 µM
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,16 µM
Zitronensäure	4,76 µM
ad. 1l A. dest.	

Vitaminstammlösung (1000x):

Nikotinsäure	81,2 µM
Inositol	55,5 µM
Biotin	40,8 µM
Pantothensäure	4,2 µM
ad. 100 ml A. dest.	

In die Selektionsmedien kamen nach dem Autoklavieren die entsprechenden Supplemente:

Adenin	0,375 g
Histidin	0,750 g
Leucin	1,250 g
Uracil	0,375 g

Die Mengenangaben beziehen sich auf eine 50 x Stammlösung mit einer Gesamtmenge von 100 ml / Lösung. Die Metalltoleranz der einzelnen Hefestämme wurde auf EMM-Platten mit definierten Konzentrationen der Metalle durchgeführt. Für die metallhaltigen Medien wurden 0,1 M Stammlösungen der Metallsalze $\text{CdCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ und $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ kurz vor Gebrauch hergestellt, steril filtriert und vor dem Gießen des Mediums zugefügt. Mit dieser Lösung wurden die Testmedien entsprechend eingestellt.

Für die MgCl_2 -Mangel-Medien wurde das Magnesium in der Salzstammlösung fortgelassen. Auch wurde kein Agar zum Binden der Nährböden eingesetzt, da er Magnesiumanteile enthält, sondern 1 % Agarose.

Als Sporulationsmedium wurde Malzextraktmedium verwendet.

Malzextraktmedium

Malzextrakt	3 %
-------------	-----

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Stammhaltung

Für eine lange Lagerung in Dauerkulturen wurden die jeweiligen Stämme in Flüssigkultur herangezogen, anschließend in glycerinhaltiges Medium überführt und bei -70°C eingefroren. Dabei wurde für Hefen 30 % Glycerin und für Bakterien 15 % Glycerin verwendet.

2.2.2 Bestimmung von Zelldichten

Die Zelldichte von *S. pombe*-Kulturen wurde durch Messung der OD bei 595 nm und von *E. coli*-Kulturen bei 578 nm im Photometer (Pharmacia LKB Ultrospec III) bestimmt. Eine Hefekultur mit einer OD₅₉₅ von 0,1 enthält nach Literaturangaben etwa $2 \cdot 10^6$ Hefezellen pro ml (Fission Yeast Handbook) und eine OD₅₇₈ von 1 entspricht ca. einer Zellzahl von $1 \cdot 10^9$ Bakterienzellen pro ml.

2.2.3 Wachstumsmessung in Flüssigkulturen

Zur Ermittlung der Wachstumsgeschwindigkeit von Hefeflüssigkulturen wurde in regelmäßigen Abständen Proben entnommen und, wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben, bestimmt. Die Daten wurden in einer Wachstumskurve dargestellt. Mit den Datenpunkten aus dem exponentiellen Teil der Kurve wurde die Geschwindigkeit ermittelt. Dabei hatte die Wachstumsfunktion die Form $y = ae^{\mu x}$ (y in OD-Einheiten, x in h). Die Wachstumsrate μ (h⁻¹) wurde zur einfacheren Handhabung in die Verdopplungszeit t_D umgerechnet: $t_D = \ln(2)/\mu$. t_D ist die Verdopplungszeit der Zellzahl einer exponentiell wachsenden Hefekultur.

2.2.4 Herstellung diploider *S. pombe* Zellen nach Hochstenbach (1997)

Zur Herstellung von diploiden *S. pombe* Zellen wurden zwei haploide Stämme mit verschiedenen Paarungstypen und den auxotrophen Markern *ade6*-M210 und *ade6*-M216 miteinander gekreuzt. Das *ade6*-Gen kodiert für ein Enzym im Adeninstoffwechsel und eine Mutation in diesem führt zur Anhäufung eines Zwischenprodukts. Dies färbt die Zellen im

haploiden Zustand rot. Dabei bilden haploide Zellen, die das *ade6*-M210 Allel tragen, dunkelrote Kolonien und die, die das *ade6*-M216 tragen, rosa gefärbte. Diploide Zellen, die durch Kreuzung heterozygot für beide *ade6*-Allele sind, bilden durch intragene Komplementation weiße Hefekolonien. Dieser Phänotyp wurde genutzt, um diploide Zellen wie folgt zu selektionieren. Kolonien der beiden Kreuzungspartner 130 und 131 wurden auf YE-Platten ausplattiert und fünf Tage bei 28°C inkubiert. Nachdem die Zellen gewachsen waren, wurde mit frischen Kolonien je eines Kreuzungspartners 10 ml YE – Schüttelkultur beimpft und bis zur stationären Phase bei 28°C inkubiert. Je 2 ml jeder Kultur wurden dann in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und vermischt. Nachdem die Mischkultur mit 0,85% NaCl gewaschen wurde, dekantierte man den Überstand ab und resuspendierte das Pellet in der restlichen Flüssigkeit. Eine Menge von 500 µl wurde in einem großen Tropfen auf die Mitte einer Malzextrakt-Agar-Platte pipettiert und bei 28°C inkubiert. Nach 8, 12 und 24 h wurde etwas Material von der Platte entnommen, im Quadrantenausstrich auf eine EMM-Platte ohne Adenin ausplattiert und bei 28°C für drei Tage inkubiert. Weiße Kolonien (WTD) wurden erneut auf EMM-Platten ausgestrichen.

2.2.5 Tetradenanalyse

Der zu untersuchende diploide Stamm wurde auf Malzextrakt-Medium ausplattiert und bei 28°C bebrütet. Jeden Tag wurde überprüft, ob sich Asci bildeten und der Stamm sporulierte. Sobald dies der Fall war, wurde etwas Zellmaterial abgenommen und am Rand einer YE-Platte dünn ausgestrichen. Diese Platte wurde dann für vier Stunden bei 28°C inkubiert. In dieser Zeit sollten sich die Asci öffnen. Die Sporen eines Ascus wurden dann mit dem Mikromanipulator (Nikon Eclipse E400) auf der YE-Platte ausgelegt. Hierzu befindet sich am Gerät eine hauchdünne Nadel, mit der die Sporen einzeln aufgenommen wurden und mit Hilfe des Geräts nebeneinander in einer Reihe ausgelegt wurden. Die YE-Platten wurden dann für mehrere Tage bei 28°C inkubiert bis die Sporen zu Kolonien herangewachsen waren. Nach dem Auskeimen der Sporen und dem Wachstum zu Kolonien, wurden die Segreganten auf Histidin- und Adenin-Auxotrophie überprüft. Histidin-Prototrophe und Adenin-Auxotrophe Stämme wurden dann auf Kopplungsgruppen mit verschiedenen Schwermetallen getestet.

2.2.6 Bestimmung der Schwermetall-Toleranz auf Nährböden

Die Schwermetalltoleranz der einzelnen Hefestämme wurde auf YE- und EMM-Platten mit definierten Konzentrationen der Schwermetalle ZnCl_2 , CdCl_2 , CuCl_2 , MnCl_2 , FeCl_3 , CoCl_2 und MgCl_2 überprüft. Die zu untersuchenden Hefestämme wurden hierzu in Flüssigkulturen angezogen. Am Ende der logarithmischen Wachstumsphase wurden die Zellen geerntet, zweimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen und in Wasser resuspendiert. Dann wurde mit der Zellsuspension eine Verdünnungsreihe hergestellt und die einzelnen Verdünnungsstufen auf die verschiedenen Nährböden getropft. Als Positivkontrolle wurden Zellen auf dem entsprechenden Medium ohne Schwermetall ausplattiert. Die Auswertung erfolgte nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen bei einer Temperatur von 28°C.

2.2.7 Freisporenanalyse

Haploide und diploide Stämme können leicht durch den Farbstoff Phloxin unterschieden werden. Durch den Farbstoff können tote Hefezellen spezifisch angefärbt werden, und da diploide Stämme davon mehr aufweisen, werden ihre Kolonien dunkelrot gefärbt. Die Kolonien haploider Stämme weisen nur eine ganz schwache Färbung auf und können somit recht gut von den diploiden Stämmen unterschieden werden.

2.2.8 Plasmidverlusttest

Um zu überprüfen, ob eine spezifische phänotypische Eigenschaft wirklich auf einem Plasmid codiert und die Veränderung im Organismus darauf zurückzuführen ist, wird ein Plasmidverlusttest durchgeführt. Da mit Plasmiden transformierte Zellen ihre neu erworbenen Eigenschaften nur dann behalten, wenn sie unter Selektionsdruck wachsen, kann ein großer Teil der Kultur das Plasmid verlieren, wenn der Druck wegfällt. Dafür wurde eine Kolonie des zu untersuchenden Stammes in VM-Schüttelkulturen angeimpft. Durch viermaliges Überimpfen in frische Schüttelkulturen und anschließendes Ausplattieren auf VM-Platten sollte das Plasmid zum größten Teil verloren gehen. Die auf den VM-Platten gewachsenen Kolonien wurden abgepickt und durch Überstempeln auf verschiedenen Selektionsmedien wurden sie auf das Vorhandensein der jeweiligen Eigenschaft überprüft.

2.3 Molekularbiologische Methoden

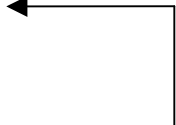
2.3.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur *in vitro*-Amplifizierung eines DNA-Abschnittes, der von zwei bekannten Sequenzen flankiert wird (Saiki *et al.*, 1985). Die Methode wurde in dieser Arbeit zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für Klonierungen und zum Nachweis von Gensequenzen in Transformanten angewendet. Für Kontrolluntersuchungen wurde die *Taq*-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Promega) und für Klonierungen mit Fragmenten bis 2 kB wurde die *Pwo*-Polymerase (Boehringer, Mannheim) verwendet. Sie wird aus *Pyrococcus woesei* gewonnen und besitzt eine Proofreading-Aktivität. Diese führt zu einer geringeren Fehlerrate während des PCR-Vorgangs und wurde gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Für Amplifikationen von Fragmenten größer als 2 kB wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein Gemisch aus *Taq*- und *Pwo*-Polymerase. Auch hier wurde nach Hersteller-Anweisung gearbeitet.

Pro PCR-Ansatz wurde dabei folgendes Protokoll verwendet:

	<i>Taq</i>	<i>Pwo</i>	High Fidelity
MgCl ₂	3	3	1,5 mM
Template	1	1	1 µg
Primer (je)	250	250	250 µM
10x Puffer ohne Mg	5	-	- µl
dNTP-Gemisch	200	200	200 µM
Polymerase	2,5	1,25	2,6 units
ad. H ₂ O dest.			50 µl

Die PCR wurde in PCR-Reaktionsgefäßen, meist nach folgendem Protokoll, durchgeführt:

Prädenaturierung	5 min 94°C	
Denaturierung	1 min 92°C	
Annealing	1 min X°C	
Extension	X min 72°C	
	7 min 72°C	

Nach Beendigung der Reaktion wurde die DNA bei Bedarf mit Hilfe des PCR-Purification-Kits der Firma Qiagen gereinigt und über ein Agarosegel kontrolliert.

2.3.2 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Plasmidpräparation wurden zwei verschiedene Methoden angewendet. Bei beiden Methoden wurde anfangs 5 ml LBA-Flüssigmedium mit einer Kolonie des transformierten DH5 α -Stammes angeimpft und ÜN bei 37°C inkubiert. Zur präparativen Isolation (20 μ g) hochreiner Plasmid-DNA wurde das Plasmid Mini Kit der Firma Qiagen (1997) nach Herstellervorschrift benutzt. Die DNA ist für anschließende Transformations-, Sequenzierungs- und Klonierungsexperimente sowie für Restriktionsanalysen geeignet.

Zum Überprüfen einer großen Zahl von Transformanten wurde die etwas günstigere Plasmidpräparation durch Boiling (Holmes und Quigley, 1981) gewählt.

STETL-Lösung

Natriumchlorid	100	mM
Tris-HCl (pH 8,0)	10	mM
EDTA	1	mM
Triton X-100	5	%
Lysozym	0,5	mg/ml

TE – Puffer

Tris-HCl	10	mM
EDTA (pH 8)	1	mM

Die Kulturlösung wurde in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben, 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet löste man in 350 µl STETL-Lösung, ließ es 10 min bei Raumtemperatur stehen und kochte es 45 sec im Wasserbad. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm. Diesmal wurde das Pellet verworfen. Die Präzipitation der im Überstand befindlichen Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von 40 µl einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und 420 µl Isopropanol für 5 min bei RT. Man zentrifugierte die so gefällten Nukleinsäuren für 30 min bei 15000 rpm ab und wusch das Sediment mit 500 µl 70 % Ethanol. Nach erneuter Zentrifugation wurde die isolierte DNA unter Vakuum getrocknet und abschließend in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.3.3 Isolation chromosomaler DNA aus *S. pombe* nach Hoffmann und Winston (1987)

Sotrisca

Sorbitol	1,2	M
CaCl ₂ x 2H ₂ O	10	mM
Tris-HCl (pH 7,5)	100	mM

Lysierungspuffer

Triton X-100	2	%
SDS	1	%
NaCl	100	mM
Tris-HCl (pH 8)	10	mM
EDTA	1	mM

Chromosomale DNA wurde durch mechanischen Aufschluss von Hefezellen mit Hilfe von Glasperlen isoliert. Die Kultivierung der Hefekulturen erfolgte in 20 ml EMM-Medium bis zur stationären Phase. Die Zellen wurden geerntet, mit bidestilliertem Wasser gewaschen und 1h bei 28°C in einem Gemisch aus 300 µl Sotrisca und 1,5 mg Zymolyase unter leichtem

Schütteln, inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation bei 400 g wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 200 µl Lysierungspuffer resuspendiert und die DNA nach dem Protokoll von Hoffmann und Winston (1987) isoliert. Bis zu ihrem Einsatz wurde die DNA bei -20°C gelagert.

2.3.4 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren nach Sambrook et al. (1989)

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren wurde photometrisch in wässriger Lösung durchgeführt. Die Messung der Absorption erfolgte zwischen 260 und 280 nm. Aus den erhaltenen Absorptionswerten wurde die Konzentration der Nukleinsäure berechnet und ihre Reinheit abgeschätzt. Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Bei einem Quotienten E_{260} / E_{280} von 1,8–2,0 beträgt die Reinheit der DNA 70 -95 %. $Abs_{260} = 1,0$ wurde einer dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml gleichgesetzt.

2.3.5 Hydrolytische Spaltung von Nukleinsäuren mit Restriktionsendonukleasen

Die DNA-Restriktion erfolgte gemäß den Angaben des Enzymherstellers (Roche, Mannheim). Die Restriktionen wurden entsprechend folgendem Ansatz durchgeführt:

DNA	0,2-1 µg (in x µl)
Restriktionsenzym	1 µl (4-5 U)
10 x Restriktionspuffer	1 µl
A. dest.	ad. 10 µl

Die Berechnung der notwendigen Enzymmengen erfolgte in der Regel nach der Formel: 1 U spaltet 1 µg DNA pro h. Nach dem Verdau wurde die DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion (Hochstenbach, 1997) gereinigt.

2.3.6 Ligation

Es wurde auf verschiedene Art und Weise ligiert, um Insert-DNA mit Vektor-DNA zu verknüpfen. Die Ligationseffizienz ist dabei abhängig von den molaren Verhältnissen

zwischen Fragment und Vektor und wurde in der Regel in einem Verhältnis von 3:1 eingesetzt, wobei die Gesamtmenge an Vektor-DNA ca. 0,1 µg betrug. Hierzu wurde die DNA im entsprechenden Verhältnis auf 8 µl mit bidestilliertem Wasser aufgefüllt, 5 min auf 45°C erhitzt und umgehend auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden je 1 µl T4-DNA-Ligase (0,5 U) und 1 µl 10 x Ligationspuffer zugegeben. Dieser Ansatz wurde ÜN bei 18°C inkubiert.

Bei Blunt end-Ligationen wurde der Vektor vorher mit SAP (shrimp alkaline phosphatase) dephosphoryliert. Dazu wurden dem linearisierten Vektor 3,5 Units SAP zugesetzt und nach 30 min Inkubationsdauer bei 37°C die SAP durch 15 min Erhitzen auf 65°C vollständig inaktiviert.

2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde nach der Methode nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Als Längenstandard wurde *EcoRI/HindIII* verdaute λ-DNA (30 µg/ml) eingesetzt.

Bei präparativen Gelen wurde die interessierende Bande mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die Extraktion von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) nach Anweisung des Herstellers.

2.3.8 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* Zellen erfolgte durch die Methode von Sambrook *et al.* (1989). Kompetente Zellen die nicht verwendet wurden, wurden in Aliquots von 200 µl bei -70°C eingefroren und, innerhalb einer kurzen Zeitspanne, für die nächste Transformation eingesetzt.

Die resultierenden Transformanten wurden erneut unter Selektionsbedingungen angezogen und, nach einer Plasmidpräparation (2.3.2), über eine Restriktionsanalyse (2.3.5) kontrolliert.

2.3.9 Transformation in *S. pombe*

Lithiumacetat-Puffer

Lithiumacetat x 2 H ₂ O	1,02	g
Tris-HCl (1M, pH 7,6)	5	ml
EDTA (0,5 M)	1	ml
A. dest.	ad. 100	ml

PEG-Lithiumacetat-TE-Puffer

PEG4000	40	g
Lithiumacetat x 2 H ₂ O	1,02	g
Tris-HCl (1M, pH 7,6)	1	ml
EDTA (0,5 M)	0,2	ml
A. dest.	ad. 100	ml

Die Transformation von *S. pombe* erfolgte durch die Lithiumacetatmethode, leicht modifiziert, nach Okazaki et al. (1990) durchgeführt. 500 ml YE-Medium wurden mit 1% Vorkultur des jeweiligen Hefestammes beimpft und ÜN bis zu einer optischen Dichte von ca. 0,2 (600 nm) inkubiert. Wichtig für eine ausreichende Anzahl Transformanten ist die Wachstumsphase von *S. pombe*. Die Zellen sollten sich in der logarithmischen Phase befinden und zum Zeitpunkt der Ernte min. 80% Teilungsstriche aufweisen. Nach der Zellernte wurden die Kulturen mit bidestilliertem Wasser gewaschen und dann im folgenden Verfahren kompetent gemacht. Die Zellen wurden in 1 ml Lithiumacetatpuffer resuspendiert, in Aliquots von 100 µl auf Eppendorfgefäße verteilt und 1 h bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Transformation und die verschiedenen Ansätze wurden wie folgt gewählt:

Kompetente Zellen	100 µl
Denaturierte Heringssperma-DNA (10 µg/ µl in TE)	10 µl
Linearisierte DNA (1-5 µg)	x µl
PEG-Lithiumacetat-TE-Puffer	285 µl

Die Ansätze wurden gemischt und 60 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte ein zwanzigminütiger Hitzeschock bei 42°C. Die Zellen wurden bei 3500 U/min für 5 min zentrifugiert, gewaschen und zur Regeneration 1 h bei 28°C in YE-Medium inkubiert. Wiederum wurden die Zellen zentrifugiert, mit bidestilliertem Wasser gewaschen und in Aliquots von 100 µl auf den entsprechenden Selektionsmedien ausgestrichen.

2.3.10 Herstellung der DIG-markierten Sonde

Zur Identifikation von DNA-Sequenzen im Southernblot wurden Sonden mit DIG (Digoxigenin) markierten Nukleotiden hergestellt. Die Sonde wurde komplementär zur untersuchenden Sequenz mit der PCR (siehe Punkt 2.3.1) amplifiziert. Es wurden statt des normalen dNTP-Mixes, DIG markierte (Roche, Mannheim) in der gleichen Konzentration verwendet. An diese Nukleotide binden spezifische Antikörper, welche ihrerseits eine chemische Reaktion mit dem Röntgenfilm eingehen.

2.3.11 Southernblot

Die von Southern (1975) entwickelte Southernblot-Technik wird zur Übertragung von DNA aus einem Agarosegel auf einen Membranfilter und deren nachfolgender Detektion mit einer Sonde genutzt.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA wurde das Agarosegel in einem Ethidiumbromidbad gefärbt und anschließend fotografiert. Das Gel wurde kurz in Wasser gewaschen und zur Depurinierung der DNA für 10 min in 0,25 M HCl geschwenkt. Danach erfolgte die Denaturierung der DNA für 2 x 20 min in 1,5 M NaCl- und 0,5 M NaOH-Lösung. Nach anschließender Neutralisation (2 x 15 min in 1,5 M NaCl; 1 mM EDTA

und 0,5 M Tris/HCl; pH 7,2) wurde die DNA mittels der Kapillarblot-Technik nach Sambrook et al. (1989) auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham) übertragen. Der Transfer erfolgte über Nacht in 20 x SSC (3 M NaCl; 300 mM tri-Natriumcitrat-Dihydrat). Die Nylonmembran wurde zunächst zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen für mindestens 2 h in 20 ml DIG Easy Hyb (Roche, Mannheim) bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur prähybridisiert. Anschließend wurde die mit Digoxigenin markierte Sonde 10 min bei einer Temperatur von 95°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der DNA zu vermeiden. Sie wurde in 10 ml frisches, vorgewärmtes DIG Easy Hyb aufgenommen und zur Membran in die Hybridisierungsröhre zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte für mindestens 16 h. Die verwendeten Hybridisierungstemperaturen (42–68 °C) richteten sich nach der erforderlichen Stringenz. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Membran 2 x 5 min mit je 50 ml 2 x SSC/0,1 % SDS bei RT und 2 x 15 min mit je 50 ml 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei der entsprechend zuvor benutzten Hybridisierungstemperatur gewaschen. Die Membran wurde 1 min in Puffer 1 (100 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5) und anschließend für 30 min in Puffer 1 mit 10 % Blocking-Reagenz (Roche, Mannheim) inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in Puffer 1 erfolgte eine Inkubation mit Anti-DIG-Antikörper-AP-Konjugat (Roche, Mannheim) für 30 min. Nachfolgend wurde die Membran 2 x 15 min in Puffer 1 gewaschen und 3 min in Puffer 3 (100 mM Tris/HCl; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂ x 6 H₂O; pH 9,5) äquilibriert. Zum Schluss erfolgte eine Inkubation mit 10 ml CDP-Star-Lösung (Roche, Mannheim) für 5 min. Die Detektion der Signale erfolgte mittels der Chemolumineszenzreaktion auf Röntgenfilmen nach Angaben des Herstellers (Roche, Mannheim).

2.3.12 DNA Sequenzierung

Alle im Ergebnisteil dargestellten Plasmide wurden vor ihrer Transformation in *Schizosaccharomyces pombe* zur Kontrolle sequenziert. Die Sequenzierungsarbeiten wurden von der Firma Sequiserve, Vaterstetten durchgeführt.

2.3.13 RNA-Isolation

Eine 20 ml YE-Schüttelkultur wurde 24 h bei 28°C inkubiert und komplett in eine 100 ml YE-Schüttelkultur überimpft. Nach erneuter Inkubation für 24 h wurde die Kultur auf folgende Medien zu je 30 ml aufgeteilt:

- 200 ml EMM-Medium ohne MgCl_2
- 200 ml EMM-Medium + 100 mM MgCl_2
- 200 ml EMM-Medium normale $[\text{Mg}^{2+}]$

Die Kulturen wurden bei 28°C geschüttelt. Nach 16 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet, gewaschen und 10^8 Zellen in 1% PBS resuspendiert. Mit dieser Zellmenge wurde anschließend mit dem High Pure RNA-Isolation Kit (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -70°C in der 2,5 fachen Menge 100 % Ethanol gelagert. Zur Kontrolle der RNA wurde ein 1% Agarosegel geladen und wie unter Punkt 2.3.7 beschrieben gearbeitet. Es sollten dabei die zwei ribosomalen Banden bei 3,5 und 1,8 kb im Ethidiumbromid gefärbten Gel sauber getrennt sichtbar werden. Nur dann wurde die RNA für die RT-PCR verwendet.

2.3.14 cDNA-Synthese und RT-PCR

Für die cDNA-Synthese wurde als erstes ein DNase-Verdau durchgeführt um DNA-Verunreinigungen zu entfernen.

DNase 1 U	0,2 μl
RNA-Template	1,0 μg
A. dest.	ad. 10,0 μl

Die Inkubation dauerte 15 min bei 37°C und das Enzym wurde anschließend bei 70°C 15 min inaktiviert. Dieser Ansatz wurde komplett für die folgende cDNA-Synthese, durch M-MuLV Reverse Transkriptase (Promega), eingesetzt.

RNA – Template	10	µl
M-MuLV- Puffer	8	µl
dNTP – Gemisch	0,2 mM	jeder Base
Revers – Primer	50	pmol
Rev. Tr. M-MuLV	1	µl
A. dest.	ad. 20	µl

Die Übersetzung der RNA in cDNA erfolgte 60 min bei 37°C . Zur Kontrolle der RNA-Präparation auf DNA-Verunreinigung, wurde ein identischer Ansatz ohne Reverse Transkriptase und einer ohne RNA-Template durchgeführt. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase durch 10 min Inkubation bei 70°C inaktiviert.

Um diesen Versuch zu überprüfen und die cDNA-Konzentration zu bestimmen, wurde folgende PCR durchgeführt.

cDNA	0,5	µl
dNTPs	100	µM
je Primer	10	pmol
Puffer 10x	5	µl
Taq-Polymerase	1	U
Aqua dest.	ad. 50	µl

Ablauf:	2,5 min	94°C	
	1,0 min	60°C	
	1,0 min	72°C	
	1,0 min	94°C	} 28x
	1,0 min	60°C	
	1,0 min	72°C	
	5,0 min	72°C	

Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 AAS-Analytik

Die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) ist ein Verfahren zur quantitativen Elementbestimmung. Die Methode eignet sich, um den Gehalt verschiedener Schwermetalle und hierbei insbesondere von Magnesium in Hefezellen zu detektieren. Hierzu wurden *S. pombe*-Kulturen in den verschiedenen Medien bis zur log-Phase angezogen und nach Induktion der Magnesium- und Zinkgehalt in Medium und Zellen bestimmt. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, mit bidestilliertem Wasser gewaschen und das Trockengewicht bestimmt. Die gleiche Menge an Zellen wurde mit bidestilliertem Wasser gewaschen und in 6 N HNO₃ aufgeschlossen. Die Messung von Medium und Zellen erfolgte in 0,5 N HNO₃ mit einem Perkin Elmer Atomic Absorption Spectrometer 1100 B. Dabei wurden folgende Messparameter verwendet:

Flamme	oxidierend
Brenngas	Acetylen (0,6 bar)
Oxidans	Luft (1,3 bar)
Lichtquelle (für Mg)	285,2 nm
Untergrundkompensation	keine
Messintervall	1 sec
Messwiederholungen	3 mal

Es wurde eine Kalibrierungskurve mit Metallstandardlösungen aufgenommen und vom Gerät gespeichert, so dass die unbekannten Konzentrationen direkt abgelesen werden konnten.

2.5 Lokalisation des Proteins

2.5.1 GFP-Fusionen (Green fluorescent protein)

Um die Lokalisation eines Proteins *in vivo*, d.h. innerhalb ganzer, lebender Zellen zu bestimmen, bediente man sich eines Fusionsproteins aus dem zu untersuchenden Protein und

dem grün fluoreszierenden Protein aus der Tiefsee-Qualle *Aequorea victoria*. Die Fluoreszenz dieses Proteins erfolgt ohne Zugabe jeglicher Co-Faktoren. Es wurden Fusionen hergestellt, die den GFP-Anteil am N-Terminus oder C-Terminus des zu untersuchenden Proteins trugen. Dazu bediente man sich der Plasmide pTG9, pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6 (Wach et al., 1997), pFA6a-kanMX6-P3nmt1GFP pFA6a-kanMX6-P81nmt1-GFP, pFA6a-kanMX6-P41nmt1-GFP (Bähler et al., 1998). Nach Anzucht der transformierten Zellen im Selektivmedium wurden die Zellen zur Betrachtung direkt auf einen Objektträger gegeben. Für die Analyse des Transportes bzw. der Lokalisation des zytosolischen GFP und der GFP-Fusionsproteine wurde ein Laser Scanning Mikroskop (LSM 410 Zeiss/Deutschland) genutzt. Die maximale Anregungswellenlänge dieser Variante des grün fluoreszierenden Proteins liegt bei 488 nm, das Emissionsmaximum bei 511 nm, und die Fluoreszenz wurde mit einem Krypton-Argon-Laser FT488/543 erzeugt. Das emittierte Licht wurde mit einem Breitbandfilter BP510-525 nm detektiert, welcher spezifisch die GFP-abhängige Fluoreszenz durchlässt. Um die Rotfluoreszenz des Vakuolen-Farbstoffs FM4-64 zu zeigen, wurde ebenfalls bei 488 nm angeregt, das emittierte Licht diesmal aber durch einen BP575-640 nm Filter geleitet. Mit Hilfe eines UV-Lasers wurde bei 364 nm der Farbstoff DAPI angeregt und seine Fluoreszenz mit Hilfe eines BP450-490 nm Filters analysiert.

Für die Kolokalisation wurden die Zellkerne mit DAPI nach der, von Shaw et al. (1997) beschriebenen Methode, gefärbt. Die Vakuolenmembran wurde mit FM4-64 (Molecular Probes/USA) gefärbt. Die für diese Färbung eingesetzten Zellen wurden bei 3500 U/min zentrifugiert und für 30 min bei 30°C mit dem Farbstoff inkubiert. Danach wurde wieder zentrifugiert, 2 x mit frischem EMM-Medium gewaschen und für weitere 30 min bei 30°C inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 3500 U/min wurden die Zellen in frisches Medium resuspendiert und für die Mikroskopie verwendet.

2.5.2 Immunchemische Färbung

Für die Lokalisation wurde das Protein VMU1p mit einem HA-Tag versehen. Durch Antikörperfärbung sollte das Fusionsprotein in der Zelle im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Dies ermöglicht die Fluorescein Konjugation des Antikörpers, der gebunden an die HA-Bindungsstelle des Fusionsproteins, unter dem Mikroskop bei einer Wellenlänge von

490 nm angeregt und somit sichtbar gemacht werden kann. Gearbeitet wurde mit den Vektoren pSLF173 (Forsburg, S.F.) und pFA6a-3HA-kanMX6 (Longtine et al., 1998). Positive Transformanten wurden in der log-Phase geerntet und auf APES (3-Aminopropyl-Triethoxy-Silane) beschichteten Objektträgern verteilt. Die Zellen wurden in kaltem Aceton fixiert, in TBST und TBS je 5 min und in TBS + 3 % BSA 10 min inkubiert. Sodann wurde der Fluorescein konjugierte monoklonale Antikörper HA-Tag 262K (Cell Signaling Technology) aufgetragen und nach 5 h Inkubation, im Dunklen, wurden die Zellen mit TBST und TBS gewaschen. Nachdem sie noch mit Kaisers Glyceringelatine beschichtet wurden konnten sie unter dem konfokalen Mikroskop, Leica DM IRBE, angeschaut und fotografiert werden.

2.5.3 Visualisierung der Lokalisation des Magnesiums innerhalb der Zelle

Der Farbstoff Magnesium GreenTM der Firma Molecular Probes dient dem Anfärben und Nachweis von Magnesium.

Eine 20 ml YE-Vorkultur wurde bis zur Sättigung wachsen gelassen. Daraus wurde eine 200 ml EMM + 100 mM Magnesium Hauptkultur mit 2% angeimpft und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in EMM ohne Magnesium und frischem EMM + 100 mM Magnesium überführt und ÜN inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Färbung mit dem Farbstoff Magnesium GreenTM. Dieser wurde nach Herstellerangaben verwendet und 5mM in DMSO gelöst eingesetzt. Die entsprechende Menge wurde zu den einzelnen Proben pipettiert und für 4 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit A. dest. gewaschen und unter dem konfokalen Lasermikroskop TCS-SP der Firma Leica (Heidelberg) bei der Wellenlänge 506 nm analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 *vmu1* beinhaltet das stark konservierte Motiv GMN in *S. pombe*

In dieser Arbeit soll der Transportmechanismus von Metallionen in Hinblick auf Homöostase-Eigenschaften und Schwermetall-Resistenz der Zelle untersucht werden. Da das gesamte Genom von *Schizosaccharomyces pombe* im Internet veröffentlicht ist, wurde in der SWISS-PROT Datenbank (<http://us.expasy.org/sprot>) explizit nach Metall-Transportproteinen gesucht. Das Protein, für das der offene Leserahmen, ORF (Open Reading Frame), O13779 codiert, besitzt Homologie zum CorA-Protein aus *E. coli* und einigen Magnesium-Transportproteinen aus *S. cerevisiae*. Außerdem zeigt es große Ähnlichkeit zu Schwermetall-Resistenzproteinen der Hefe (Wood et al., 2002). Es wurde in der Datenbank als hypothetisches Membranprotein, welches 71,2 kDa groß und dessen Gensequenz auf dem Chromosom I kodiert ist, beschrieben. Bei dem Genprodukt von O13779 handelt es sich tatsächlich um ein Magnesium-Transportprotein, welches wahrscheinlich in der vakuolären Membran lokalisiert ist. Dementsprechend wurde das *S. pombe*-Gen VMU1+ (von: vacuolar magnesium utilization) und das korrespondierende Protein VMU1p genannt. Die gesamte Domänen-Struktur wird in Abb. 3.1 gezeigt und wurde durch Pfam (Protein families database of alignments and HMMs) erstellt (Bateman et al., 2002, <http://www.sanger.ac.uk./Software/Pfam/>).



Abb.3.1: Schematische Darstellung der Domänen-Struktur von VMU1p. Die hellblauen Quadrate stellen eine Region von noch nicht gut untersuchten Aminosäureabschnitten dar; der grüne Balken zeigt eine Domäne mit Homologie und Zugehörigkeit zur CorA-Proteinfamilie an und die rot-schwarzen Quadrate sollen Transmembrandomänen darstellen.

Die CorA ähnliche Domäne reicht von Aminosäure 136-451, die Transmembrandomäne I von 555-577 und Transmembrandomäne II von 592-614 (in Abb.3.2 durch schwarze Balken gekennzeichnet).

Um zu überprüfen, wie groß die Homologie zu anderen Proteinen ist, wurden die Sequenzen der wichtigsten Proteine in einer Übersicht in Abb. 3.2 zusammengestellt. Die Zusammenstellung erfolgte mit dem Dialign-Programm (<http://www.genomatix.de/cgi-bin/dialign/dialign.pl>; Morgenstern, 1999).

VMU1p	1	mpsntsrsvp	tgfykqnar	mqrprfsdr	khsskskhrrf	pvdpslqpde
CorA	1	m.....
ALR1p	1	m.....
ALR2p	1	m.....
MRS2p	1	m.....
VMU1p	51	adegtrllgn	sdsdllepps	EHSSNGEDDK	DINNPPSMPS	SVCSSPKSPH
CorA	2
ALR1p	2S	SSSSSSSSSP	NLSRSNSLAN	TMVSMKTEDH
ALR2p	2S	SLSTSFDS	DLPRSKSVDN	TAASMKTGKY
MRS2p	2
VMU1p	101	RHYESdedie	nislpushpe	di.....Q	RKEFETENCK	NTrdqpspla
CorA	2
ALR1p	33	TGLYDHRQHP	DSLPRVHqpp	tlknkeiaks	t.KPSIPKEQ	KSATRYNSHV
ALR2p	33	PKLENYRQYS	DAQPIRHeal	alkvdetkds	RHKSSSSNGE	NSGVENGGYV
MRS2p	2
VMU1p	144EVS	DFATSSPHVY	EKSANSHDSH
CorA	2	LSAFQLE	NNRLTRLEVE
ALR1p	82	DVGSVPSRGR	MDFEDEGQGM	dETVAHHQLR	ASAILTSNAR	PSRLAHSMPH
ALR2p	83	EKTNISTSGR	MDFEGEAEA.	.EAVKRYQLR	SFALLSSNAR	PSRLAKSETH
MRS2p	2	NNRLLVRSIS
VMU1p	167	YEQFANNDVT	ESavddhpat	rk.....
CorA	19	ESQPLVNAV.
ALR1p	132	QRQLYVESni	htppkdvgvk	rdytmsssta	sSGNKSLSA	SSSASPITKV
ALR2p	131	QKQIHVESIA	PSlpknaale	rghtalpag	tSSNRCNLEA	SSSARTFTSA
MRS2p	12	CFQPLsritf	grpnt.....
VMU1p	189
CorA	28
ALR1p	182	RKSSLVSPVL	EIPHESKSDT	HsKLAKPKKR	TYSTTSAHSS	INPAVLLTKS
ALR2p	181	RKASLVSAIF	ETSAESEHGT	HpKQAKLKRR	TYSTISTHSS	VNPTLLTRT
MRS2p	27PFLR	KYADTSTAAN	TNSTILRKQL
VMU1p	189
CorA	28
ALR1p	232	TSQKSDADDD	TlerKPVRMN	TRA.....
ALR2p	231	ASQKSDMGND	TrrikPLRMD	SRV.....
MRS2p	51	LSLKPIASD	SLfisctvfn	skgniismse	kfpkwsflte	hslfprdlrk

VMU1p	189L	SRDELYLPIS	PNNAQEPKFS
CorA	28
ALR1p	255
ALR2p	254
MRS2p	101	idnssidiip timckpnciv inllhikalI	ERDKVYVFDT	TNPSAAAKLS
VMU1p	210	VLdewt....
CorA	28
ALR1p	255SFDS	DVSQASRDSQ	ETEEDVCFPM
ALR2p	254SFHS	EISQASRDSQ	ETEEDVCFPM
MRS2p	151	VLmydleskl sstknnsqfy ehraleSIFI	NVMSALETDF	KLHSQICIQI
VMU1p	216
CorA	28
ALR1p	279	PPQLHTRVNG IDFDELEEEYA QFANAESQF	LASLQvpNEQ	KYSNVSQDIG
ALR2p	278	FRLHTRVNG VDFDELEEEYA QISNAERNLS	LANHQrhSER	TYNHTDQDTG
MRS2p	201	LNDLENEVNR LKLRHLliks kdltllyqkt	llirdlldel	lendddlanm
VMU1p	216KKMVAN	FEEYSVEDVD
CorA	28
ALR1p	329	FTSSTSTSGS SAALKYTTPRV SQTGEKSEST	NETEIHKKKE	DEHKKIKPSL
ALR2p	328	FTNSASTSGS SAALKYTPEI SRTLEKNCSV	NEMTVSENNE	SVREDDKPD
MRS2p	251	yltv.....	KKSPKDNFSD
VMU1p	242	EPLLIVNGRYR VRDRWAQFRK	SEIEk.....
CorA	28
ALR1p	379	HPGISFGKKNK VEGE.....
ALR2p	378	HPDVTFCGRNK IEGE.....
MRS2p	265	LEMLIETYYT QCDEYVQQSE	SLIQdikste	eivniildan rnsmllelk
VMU1p	267
CorA	28
ALR1p	393ENEN	ipsndpaycs	yQGTDFQIEN
ALR2p	392KEGN	DSSYSRAYYT	LQNTFYQIPS
MRS2p	315	vtiytlgftv asvlpafygm	nlknfiEESE	WGFTSVAVFS
VMU1p	269	RFTFFFTDELP STIHSHEMWE	LVHDGQSFE	LFHSGg.T..
CorA	28
ALR1p	417	RFSFFCSESD ETVHASDIPS	LVSEGQTFYE	LFRGCEPT..
ALR2p	416	RFSFFRSESD ETVHASDIPS	LISEGQTFYE	LKKGCDPT..
MRS2p	365	NFNSLRSVTK MTMYPNspan	ssvypktsas	ialtnklkrr
VMU1p	311
CorA	32
ALR1p	460
ALR2p	459
MRS2p	415	lgvlllygssy tnkanlsnnk	inkgfskvkk	fnmendiknk

Ergebnisse

VMU1p	311
CorA	32
ALR1p	460
ALR2p	459
MRS2p	465	iedkknlpmr	afprvlpfrh	qrsynnullr	tvrlfgssls	sdfsrqmpk
VMU1p	311	SCPKEEEIRV	LAKAFGIHPL	IVEDI	tleED	REKVELERTY YFV TFRSE..
CorA	32	VEPDDDERLR	VQSELGQRP	IRPELEDIEA	SAR..FFEDD	DGLHIHSEFF
ALR1p	460	SCPTDDEMRC	IAKAFGIHPL	TAEDIRMQET	REKVELFKSY	YFVCFHTFEN
ALR2p	459	SCPTDDEMRC	IAKTFGIHPL	TAEDIRMQET	REKVELFKSY	YFVCFHTFEN
MRS2p	515	VDPDNTAAML	LQKNLIQRnn	mlygygshti	rcitldstgr	akspiveikr
VMU1p	359
CorA	80	FEDAE.....
ALR1p	510	DKESE.....
ALR2p	509	DKESE.....
MRS2p	565	edlvskhgll	prdlrkieks	rkndlvpsll	vrensilisl	ltvkalikpd
VMU1p	359N	QLPSNSEYLK	ELNFYLVVFR	DGIITFHMNE	TPHPANVRRR
CorA	85DHAG	NSTVAFITRD	GRLFTLrere	lpafirlymr
ALR1p	515DFLE	PINVIYIVCR	SGVLTFHFGE	ISHCANVRRR
ALR2p	514NYLE	PINVIYIVFR	SGVLTFHFDE	ISHCANVRRR
MRS2p	615	mviifdsagS	GITLNSEAHK	DFINDMKLRL	KNQETSELNS	DPLPYEFral
VMU1p	400
CorA	119	arsqsmv...
ALR1p	549
ALR2p	548
MRS2p	665	etifisalsn	ltsemkvllt	ickgvlqdle	fsitrcklrf	llgqnkklls
VMU1p	400IRQ	LngYLTVNAD	WIAVALLEDE.TTDA
CorA	126D	GNAYELLLDL
ALR1p	549VRQ	LRDYVNVNSD	WLCYALIDDE.ITDS
ALR2p	548VRQ	LRDYVSVNSD	WLCYALIDDE.ITDS
MRS2p	715	fnkkavlVKD	MLDDILEQDD	MLCDMYLTtk	kagkirvqdD	HTEIEMLLET
VMU1p	426	FAPFIEQIED	EVDITDSMIL	sihydhvmev	kpq.....ERMLQ
CorA	137	FETKIEQLAD	EIENTIYSDLE	QLSRVImegh	ggdeydeals	tlaelEDIGW
ALR1p	575	FAPVIQSIEY	EADAIEDSVF	MARDMDFAA.MLQ
ALR2p	574	FAPVIQSIEY	EADSIDDSVF	MTRDMDFAA.MLQ
MRS2p	765	YHNYVDEIVQ	KSESAISDVK	TTEEIIniil	dsnrnelmll	giryaigmls
VMU1p	464	RVGECRKLIM	SLLRLILANKA	DVVRGLSKRC	Nswqva...
CorA	187	KVRLCLMDTQ	RALNFLVRKA	RLPGGQLEQA	Rhilrdiesl	lphneslfqk
ALR1p	607	RIGESRRKTM	TLMRLLSGKA	DVIKMFARKC	QDEANGIGPa	LTSQINIANL
ALR2p	606	RIGESRRKTM	TLMRLLSGKA	DVIKMFARKC	QDETNGIGPv	LKSQTNMVNL
MRS2p	815	lggalf....

VMU1p	501	PR	GE	IALYLGDV	QDHIV	TMVQN
CorA	237	vnflmqaa..
ALR1p	657	QARQDNASHI	KNNSSTTVPN	NYapTTSQPR	GD	IALYLGDV	QDHLL	TMFQN
ALR2p	656	QAEQENVNQN	NSNNQISLSN	SYmqTTSQPR	GD	IALYLGDV	QDHLL	TMFQN
MRS2p	821
TM1									
VMU1p	523	LNHYEKILSR	SHSNYLAQis	inmTLVSNET	NEVL	SRL	IL	GTI	IPLNLV
CorA	245MGFINIQ	NRIK	IFSVV	SVVFL	PPTLV
ALR1p	707	LLAYEKIFSR	SHTNYLAQLQ	VESFNSNNKV	TEML	GKV	IMI	GTMI	VPLNVI
ALR2p	706	LLAYEKIFSR	SHANYLAQLQ	VESFNSNNKV	TEML	GKV	IMI	GTMI	VPLNVI
MRS2p	821	L
TM1 TM2									
VMU1p	573	TGLWGMNVKV	PGQDvp	gLGW	FFSTILGSI	MI	FAISS	FILCK	WYKvi.....
CorA	273	ASSYGMNFEF	MPE....	LKW	SFGYPGAIIF	MILAGLAPYL	YFKR	KnwL..
ALR1p	757	TGLFGGMNVKV	PGENSS	IAW	WFGILGVILL	LAVLGWFLAS	YWI	KRIDPPA
ALR2p	756	TGLFGGMNVKV	PGRNGS	IAW	WYGILGVILL	LAVISWFLAS	YWI	KKIDPPA
MRS2p	822	GSIYGMNLES	FIEESN	YAY	ltvtilglis	tvwlyakgir	hlhkl	qrmtl
TM1 TM2									
VMU1p	618
CorA	317
ALR1p	806	TLNEAAESGA	KSVISSFLPK	RNKR	FNDRSK	NiNVRAGPSN	KSVASL	SPRY
ALR2p	805	TLNEAAGSGA	KSVISSFLPK	RDKR	FNDDSK	NgNARVGVRR	KSTVSL	SPRY
MRS2p	871	lskiktdsvh	ellkk.....
VMU1p	618
CorA	317	6%
ALR1p	856	SRYD	35%
ALR2p	855	SRYN	35%
MRS2p	886	6%

Abb.3.2: Proteine mit CorA-Homologien. Dialign-Alignment (Morgenstern, 1999) der Aminosäuresequenzen der Magnesium-Transportproteine von *S. pombe* (VMU1p) von *E. coli* (CorA) und *S. cerevisiae* (ALR1p, ALR2p und MRS2p). Die farbigen Markierungen heben mit VMU1p identische Aminosäuren hervor. VMU1p im Vergleich mit CorA ist grün, mit MRS2p rosa, mit ALR1p und ALR2p rot markiert. Die schwarze Box zeigt das stark konservierte Motiv GMN an. Die beiden Transmembrandomänen von VMU1p sind mit dicken schwarzen Balken gekennzeichnet. Vor den Sequenzen wird die Position der Originalsequenz und am Ende die prozentualen Übereinstimmungen der anderen Proteine zu VMU1p angegeben. Lücken sind durch Punkte gekennzeichnet. Der Zugangscode zur SWISS-PROT Datenbank ist für VMU1p O13779, CorA P27841, ALR1p P43553, ALR2p P35724 und MRS2p Q9ETO7. Die kleinen Buchstaben zeigen Sequenzen an, die keine Homologien aufweisen.

Die Sequenz-Analyse demonstriert, dass O13779 für ein Protein kodiert, welches große Sequenzübereinstimmung zu den beiden Magnesiumtransportern, ARL1p und ARL2p, aus *S. cerevisiae* zeigt (siehe Abb.3.2). Etwa 35% der Aminosäuren sind identisch. Auch zeigen die Untersuchungen, dass CorA und MRS2p eine schwächere Übereinstimmung, welche bei

6% liegt, gegenüber dem *S. pombe*-Protein aufweisen. Die Homologie nimmt in der zweiten Hälfte zu. Das stark konservierte Motiv, GMN (mit Quadrat in Abb. 3.2 gekennzeichnet), ist auf der Position –577-579 lokalisiert. Dieses Motiv wurde bei allen untersuchten Magnesium-Transportproteinen gefunden und ist hauptsächlich für die Magnesium-Transportfunktion verantwortlich (MacDiarmid und Gardner, 1998; Bui et al., 1999; Zsurka et al., 2001; Schock et al., 2000; Smith et al., 1993; Szegedy und Maguire, 1999). Verglichen mit Abb.3.1 liegt der Bereich mit der höchsten Homologie in der CorA-Domäne und das stark konservierte Motiv inseriert am Ende der ersten Transmembrandomäne.

Abb. 3.1 und 3.2 zeigen, dass VMU1p einige strukturelle Eigenschaften mit Magnesium-Transportproteinen der CorA-Familie teilt. Neben zwei hydrophoben Regionen am C-Terminus, wahrscheinlich Transmembrandomänen, wurde das stark konservierte GMN-Motiv identifiziert. Wie auch bei den anderen Transportern in eukaryontischen Zellen, konnte eine dritte Transmembrandomäne, wie sie bei CorA in Bakterien vorkommt, nicht gefunden werden (Smith et al., 1993; Bui et al., 1999; Zsurka et al., 2001).

Da die kompletten Sequenzen von mehreren Genomen durch systematische Sequenzanalysen erstellt worden sind (Wood et al., 2002; Goffeau et al., 1997; O'Brien, 1997) und man mit dem CLUSTALW-Programm einen hypothetischen phylogenetischen Baum erstellen kann (Thompson, et al., 1994; Chenna et al., 2003), wurde dies für einige wenige Vertreter der CorA-Familie durchgeführt. Das Protein VMU1p sollte auf den Verwandtschaftsgrad zu einigen Magnesium-Transportern aus *S. cerevisiae*, *E. coli* und anderen Eukaryonten untersucht werden.

Die für den phylogenetischen Baum verwendeten Proteine sind in Tabelle 3.1 aufgelistet. Sie wurden mit Hilfe der SWISS-PROT Datenbank zusammengestellt.

(<http://us.expasy.org/sprot>)

Tabelle 3.1: Proteine aus der CorA-Familie, die in der phylogenetischen Analyse einbezogen wurden. Jeder Organismus kann in der SWISS-PROT Datenbank unter dem angegebenen Zugangscode gefunden werden.

Zugangscode zur SWISS-PROT Datenbank	Organismus	Name
O13779	<i>S. pombe</i>	VMU1p
Q08269	<i>S. cerevisiae</i>	ALR1p
P43553	<i>S. cerevisiae</i>	ALR2p
P35724	<i>S. cerevisiae</i>	MTS2p
Qo2783	<i>S. cerevisiae</i>	LPE10p
P27841	<i>E. coli</i>	CorA
Q9HD23	<i>H. sapiens</i>	MRS2Lp
Q62266	<i>M. musculus</i>	Spr1a (Mus)
Q9ETO7	<i>R. norvegicus</i>	MRS2lp

Die Proteinsequenzen der neun Organismen, die in Tabelle 3.1 aufgelistet sind wurden mit dem FASTA Programm (Pearson und Lipman, 1988; Pearson, 1990) formatiert (<http://www.sanger.ac.uk>) und mit dem CLUSTALW Programm (Thompson, et al., 1994; Chenna et al., 2003; <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) bearbeitet. Das Ergebnis ist in Abb. 3.3 dargestellt.

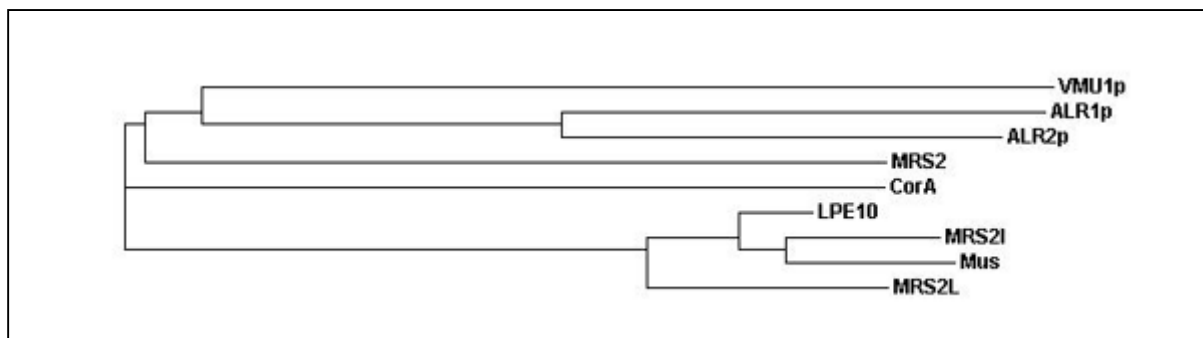


Abb. 3.3: Hypothetischer, phylogenetischer Baum der basierend auf Proteinsequenzen der CorA-Familie aus der SWISS-PROT Datenbank erstellt wurde. Der Baum wurde mit Hilfe des CLUSTALW Programms erstellt. Die Namen der Proteine finden sich zusammen mit dem Zugangscode zur Datenbank und dem Namen der Organismen in Tabelle 3.1.

Die phylogenetische Analyse zeigt, dass VMU1p am engsten mit den beiden Plasmamembran-Transportern aus *S. cerevisiae*, ALR1p und ALR2p verwandt ist. Alle drei sind etwas weniger identisch zum MRS2p Protein, ebenfalls aus *S. cerevisiae*. Dieses ist allerdings, wie auch LPE10p (*S. cerevisiae*) näher mit Magnesium-Transportproteinen aus

höheren Eukaryonten, wie dem Menschen, der Maus und der Ratte, verwandt. Das CorA Protein aus *E. coli* scheint die höchste Ähnlichkeit zu dem eukaryotischen Transporter MRS2p zu haben.

3.2 Erstellung der Disruptionskassette für *vmu1*

Zur Untersuchung der Funktion von VMU1p wurde der Leserahmen dieses Proteins, O13779, in dem *S. pombe* Wildtyp-Stamm D18h⁻ zerstört. Disruptionsmutanten wurden hergestellt, indem das entsprechende Gen über homologe Rekombination 5' und 3' durch eine den Kanamycinmarker tragenden Kassette ersetzt wurde. Für die Disruptionskassette, mussten Sequenzen aus der Promotor- und Terminatorregion des entsprechenden Gens amplifiziert werden. Da die gesamte Sequenz des Genoms von *Schizosaccharomyces pombe* bekannt ist und somit auch die des Leserahmens von O13779 (Wood et al., 2002), konnten geeignete Sequenzen für die basengenaue Amplifikation der gesuchten Abschnitte ausgewählt und in die entsprechenden Primer umgesetzt werden. Primer wurden synthetisiert, die Übereinstimmungen mit 600 bp aus der Promotor- und 400 bp aus der Terminator-Region aufwiesen (SHP1, 2, 3 und 4). Durch PCR konnten die entsprechenden Fragmente von der chromosomalen DNA von D18h⁻ amplifiziert werden. Anschließend wurde durch einen *SalI/BamHI*-Verdau ein Fragment, bestehend aus 600 bp aus der Promotorregion des Leserahmens isoliert. Davon liegen 470 bp vor dem Startcodon, worauf die ersten 130 bp des Leserahmens folgen. Durch einen *SacI/EcoRI*-Verdau wurde ein 400 bp Fragment aus der Terminatorregion isoliert, welches 41 bp nach dem Stopcodon des Leserahmens O13779 beginnt. Diese beiden Fragmente wurden durch Ligation in das Plasmid pFA6a-kanMx6 eingefügt und bildeten den neuen Vektor pFA6a-kanMx6/O13779. Dieser Vektor wurde in den *E. coli*-Stamm Dh5 α transformiert, die resultierenden Transformanten durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *SalI* und *EcoRI* kontrolliert und pFA6a-kanMx6/O13779-Klone sequenziert.

Der Vektor pFA6a-kanMX6/O13779 wurde aus Dh5 α mittels einer Plasmidpräparation und anschließend wurde die Disruptionskassette über die *SalI*- und *EcoRI*-Schnittstellen aus dem Plasmid isoliert. Abb.3.4 zeigt die Disruptionskassette KANO13779.

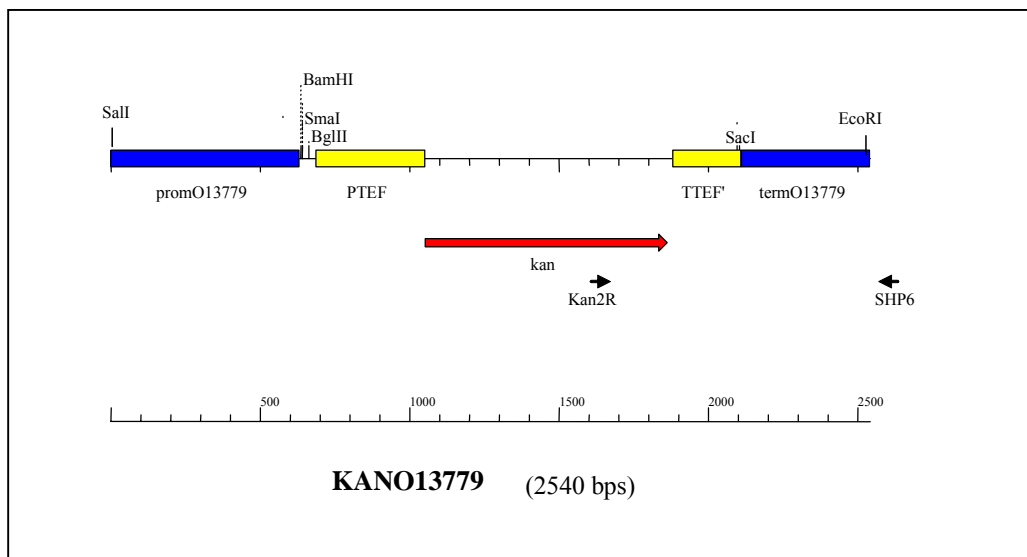


Abb.3.4: Genetische Karte der Disruptionskassette KANO13779. Der kan^R-Leserahmen ist durch rot, Kanpromotor und –terminator durch gelb und die Fragmente aus dem Leserahmen blau gekennzeichnet. Die Lokalisation der Restriktionsschnittstellen zum Heraustrennen der Kassette sind eingezeichnet (*SalI* und *EcoRI*). Unter der Kassette wird die Größenangabe der Fragmente in bp angezeigt.

Der Wildtyp D18h⁻ wurde mit der in Abb.3.4 dargestellten Disruptionskassette transformiert. Dabei sollte die Kassette durch homologe Rekombination über die Fragmente promO13779 und termO13779, in Abb. 3.4 blau dargestellt, ins *S. pombe* Genom integrieren. Der Expressionsvektor pFA6a-kanMX6 besitzt einen kan^R-Leserahmen, in Abb.3.4 durch rot gekennzeichnet. Das resultierende Gen ermöglicht *E. coli*-Zellen eine Kanamycinresistenz und *S. pombe*-Zellen eine Resistenz gegenüber Geneticin, so dass Zellen, die den Vektor in ihrem Genom integriert haben, auf Medien, die das Antibiotikum oder Mykotikum beinhalten, wachsen können. *E. coli*- oder *S. pombe*-Zellen, die nicht über das Gen verfügen, können in der Regel auf diesen Medien nicht wachsen. Durch PCR- und Southernblot-Kontrollen wurden fünfzig Transformanten überprüft (als Beispiel siehe Abb. 3.5 und 3.6).

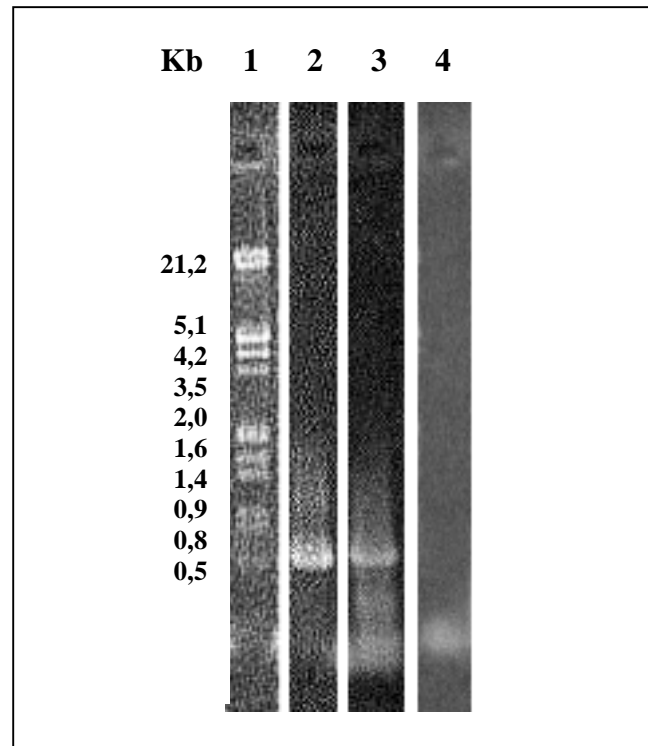


Abb.3.5: PCR-Amplifikation zur Kontrolle der richtigen Integration der Disruptionskassette KANO13779. In Spur 1 ist der Marker λ *EcoRI/HindIII* geschnitten und in Spur 2 und 3 sind die PCR-Produkte, die aus isolierter DNA der Disruptanten *vmuI::kan-1* amplifiziert wurden aufgetragen. In Spur 2 wurde das PCR-Produkt, welches mit den Primern SHP6 und Kan2R amplifiziert wurde, aufgetragen. In Spur 3 ist das PCR-Produkt, resultierend aus der Amplifikation mit den Primern SHP7 und SHP8 und in Spur 4 die Negativ-Kontrolle ohne DNA, zu sehen.

In Abb. 3.5 Spur 2 ist das PCR-Fragment der Kontrolle des Übergangs zwischen der Kan-Kassette und der Terminatorregion von *S. pombe* dargestellt. Der forward Primer Kan2R setzt im kan^R-Leserahmen bei 1,63 kB (siehe Abb. 3.4) und der reverse Primer SHP6 achtzig Basenpaare hinter dem Fragment term013779 an, so dass ein Kontroll-Fragment von 600 bp amplifiziert wird. Wie die Abb. 3.5 zeigt, konnte ein 600 bp-Fragment mit den Primern Kan2R und SHP6 amplifiziert werden, was zeigt, dass die Disruptionskassette an der richtigen Stelle im *S. pombe*-Genom integriert sein konnte. Leider wurde auch ein Fragment in der Negativ-Kontrolle der PCR gebildet. Die Primer SHP7 und SHP8 amplifizieren eine 600 bp Sequenz im Leserahmen O13779, welcher in der Disruptante fehlen sollte. Wie man in Abb. 3.5 Spur 3 sieht, ist dieses Fragment aber vorhanden. Es wurden 34 Kolonien mit Hilfe der PCR überprüft. Dabei zeigten zwei Kolonien das oben beschriebene Ergebnis.

Bei den anderen Kolonien war meist keine Bande mit der Primerkombination Kan2R und SHP6 zu sehen.

Zum besseren Verständnis dieses Ergebnis wurde ein Southernblot durchgeführt. Dafür wurde zuerst gereinigte chromosomale DNA des Wildtypstamms D18h⁻ und zweier Disruptantenstämme *vmu1::kan-1* und *vmu1::kan-2* mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *HindIII* inkubiert. Der Verdau wurde über ein 1% Agarosegel aufgetrennt, geblottet und mit der Sonde 3/6 hybridisiert. Die Sonde 3/6 wurde zuvor, mit DIG markierten dNTPs, über die Primer SHP3 und SHP6 amplifiziert. Sie ist 600 bp groß und deckt das in der Disruptionskassette eingesetzte Fragment der Terminatorregion (siehe Abb. 3.4) und 200 bp darüber hinaus ab. Bei der Wildtyp-DNA müssen zwei Fragmente der Größe 400 und 1400 bp detektiert werden und bei der DNA der Disruptanten 400 und 900 bp große Fragmente.

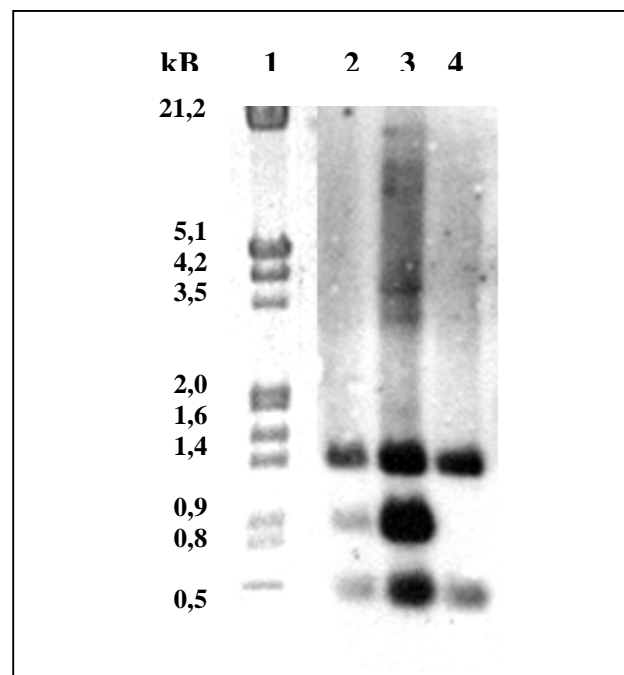


Abb.3.6: Southernblot-Analyse von genomischer DNA verschiedener *S. pombe*-Stämmen, indem eine 600 bp große Sequenz aus der Terminator-Region als Sonde benutzt wurde. In Spur 1 ist der Marker λ *EcoRI/HindIII* geschnitten, in 2 die DNA von *vmu1::kan-1*, in 3 die von *vmu1::kan-2* und in 4 die des Wildtyps D18h⁻ zu sehen. In jeder Spur wurden 15 μ g genomischer DNA, welche mit *XhoI* und *HindIII* verdaut wurden, aufgetragen.

In Abb.3.6 Spur 4 sieht man die beiden Fragmente der Wildtyp-DNA ganz richtig bei 1400 und 400 bp. Auch die beiden erwarteten Fragmente von 400 und 900 bp bei der Disruptante sind vorhanden, allerdings zusätzlich auch ein Fragment bei 1400 bp. Dieses entspricht dem

Wildtyp-Bild und zeigt ein unerwartetes Ergebnis. Dabei kann es sich entweder um eine ektopische Integration der Disruptionskassette ins *S. pombe*-Genom, oder um einen Wechsel der Disruptanten-Stämme von der haploiden in die diploide Phase handeln. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass der Leserahmen O13779 essentiell für die Hefe sein könnte.

3.3 *vmu1* ist nicht essentiell

Da der Leserahmen O13779 eventuell essentiell für *S. pombe*-Zellen war, musste die Transformation erneut, diesmal in einem diploiden Stamm, durchgeführt werden. Zu diesem Zwecke wurden die beiden haploiden Stämme 130 h⁺ und 131 h⁻ gekreuzt und mit dem resultierenden Diplonten 130x131 weitergearbeitet. Der Stamm 130x131 ist auxotroph für Adenin, Histidin, Leucin und Uracil. Aus diesem Grund muss er auf EMM-Medium angezogen werden, was die Supplemente enthält. Da in diesem Medium Geneticin keine Wirkung zeigt, musste die Kanamycin-Kassette umgestaltet werden, um mögliche Selektionsmarker zu schaffen. Dafür wurde das *his3*-Gen aus dem Plasmid pAF1 (Ohi et al., 1995) über einen *HincII/SacI* Verdau aus dem Plasmid ausgeschnitten und gegen das kan^R-Gen, welche über ein *SmaI/SacI* Verdau entfernt wurde, im Plasmid pFA6akanMX4 ausgetauscht. Das Plasmid wurde in *E. coli* DH5α transformiert, die resultierenden Transformanten durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *EcoRI* und *SalI* kontrolliert und die richtigen Klone sequenziert.

Aus dem Vektor pFA6ahis3/O13779 wurde die *his3*-Kassette mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *SalI*, nach einer Plasmidisolation aus *E. coli* DH5α isoliert (siehe Abb.3.7).

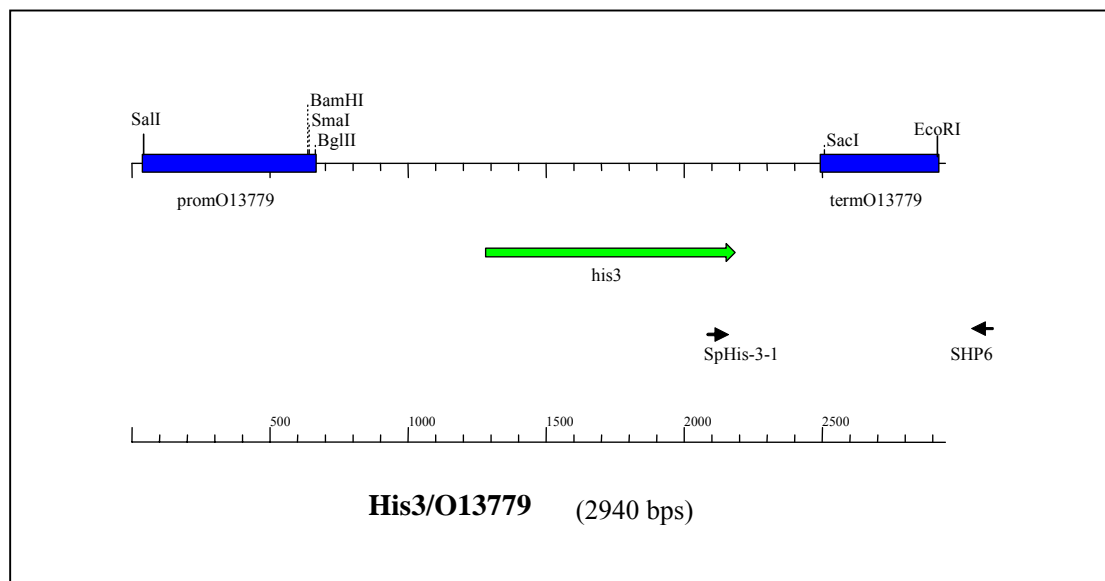


Abb.3.7: Genetische Karte der *his3*/O13779-Kassette zur Transformation in 130x131. Die *his3*-Leserahmen ist mit grün und die Fragmente aus dem Leserahmen mit blau gekennzeichnet. Die Lokalisation der Restriktionsschnittstellen zum Heraustrennen der Kassette sind eingezeichnet (*SalI* und *EcoRI*). Unter der Kassette wird die Größenangabe der Fragmente in bp angezeigt.

Die *his3*/O13779-Kassette wurde in den diploiden Stamm 130x131 transformiert. Dabei sollte die Kassette durch homologe Rekombination über die Fragmente *promO1779* und *termO13779* (in Abb. 3.7 blau dargestellt) ins *S. pombe*-Genom integrieren. Die Transformanten wurden mittels PCR überprüft (siehe Abb.3.8).

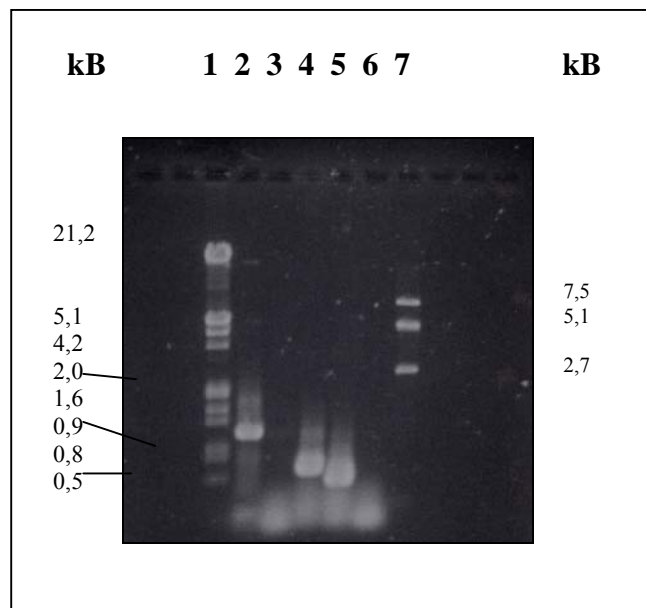


Abb. 3.8: Die PCR-Kontrolle der DNA der Disruptanten SD5 (VMU1/ Δ vmu1). In Spur 1 ist der Marker λ -DNA *EcoRI/HindIII* geschnitten, und in Spur 7 der Marker M2 (*puc19-Eco4 BamHI/EcoRI*) geschnitten, dargestellt. In Spur 2 ist das 985 bp-Fragment, mit den Primern SpHis3-1 und SHP6 aus DNA der Disruptanten SD5 und in Spur 3 aus Wildtyp-DNA amplifiziert, abgebildet. In Spur 4 ist das PCR-Produkt aus SD5-DNA mit den Primern SHP7 und SHP8 und in Spur 5 mit den Primern 500 und 555 aufgetragen (Kontrolle der DNA durch Sequenz aus dem Glutathionsynthetase-Gen). Spur 6 zeigt die Negativ-Kontrolle, in der Wasser statt DNA eingesetzt wurde.

In Abb. 3.8 ist die PCR-Kontrolle einer mit der *His3*-Kassette transformierten Disruptanten SD5 (VMU1/ Δ vmu1) zu sehen. Spur 2 zeigt ein 985 bp-Fragment, welches mit den Primern SpHis3-1 und SHP6 amplifiziert wurde. Dieses Fragment stellt den Übergang zwischen der *His3*-Kassette und dem *S. pombe*-Genom dar. Aus diesem Grund ist in Spur 3 kein Fragment zu sehen, da für dieses PCR Wildtyp-DNA mit der gleichen Primer-Kombination, eingesetzt wurde. Der *S. pombe*-Wildtyp 131 besitzt die *His3*-Kassette nicht, so dass das 985 bp-Fragment nicht amplifiziert werden konnte. In Spur 4 ist das PCR-Produkt aus SD5-DNA mit dem Primerpaar SHP7 und SHP8 zu sehen. Dabei handelt es sich um ein Fragment, dass in der Sequenz des zerstörten Leserahmens O13779 liegt. Spur 5 zeigt eine Positiv-Kontrolle der PCR mit den Primern 500 und 555, die eine Sequenz aus dem Glutathionsynthetase-Gen von *S. pombe* amplifizieren, und in Spur 6 ist die Negativ-Kontrolle, in der Wasser als Template eingesetzt wurde.

Der Disruptanten-Stamm SD5 wurde auf Malzextrakt-Medium ausplattiert und bei 28°C inkubiert. Sobald sich Asci bildeten, wurden erst Asci und dann Sporen mit dem Mikromanipulator (Nikon Exlipse E400) isoliert (siehe Abb. 3.9). Wuchsen einzelne Kolonien, wurden diese großflächig mit dem Skalpell ausgeschnitten und auf frische Vollmedium-Platten ausgelegt.

Auf der frischen VM-Platte wuchsen die Sporen eines Ascus zu Kolonien heran, wie in Abb. 3.9 B zu sehen ist. Dabei sind zwei Kolonien rot und zwei lachsfarben gefärbt. Dies ist auf die Adeninauxotrophie der beiden Elternstämme zurück zuführen. Auch die Elternstämme wachsen auf Medium ohne Adenin in den verschiedenen Rottönen.

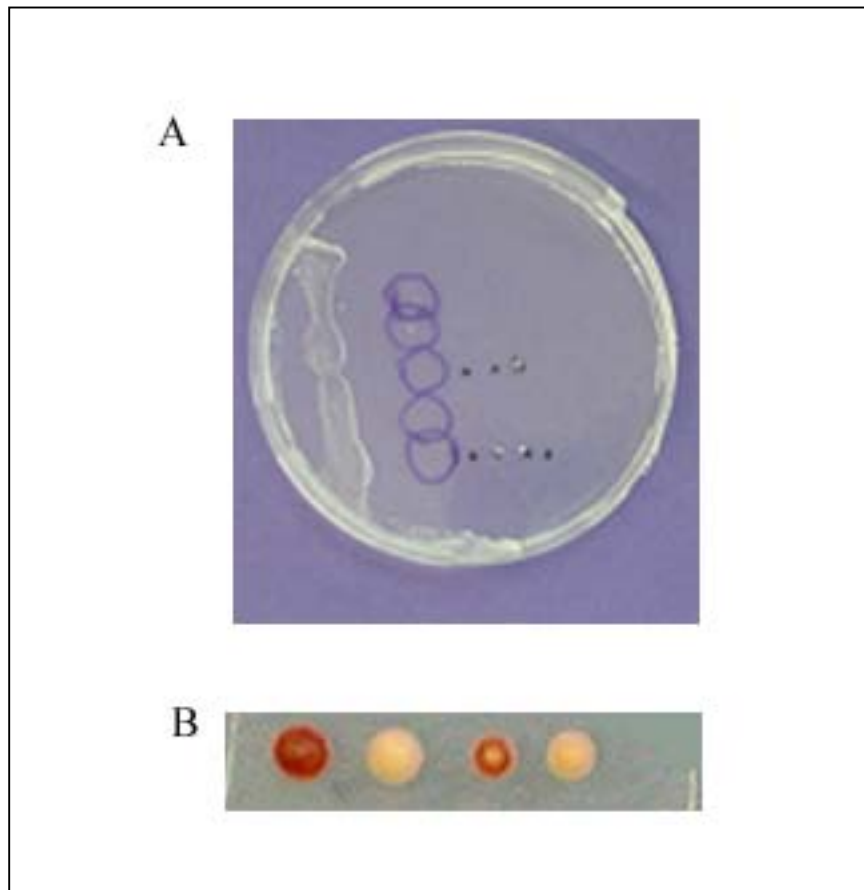


Abb.3.9: Sporenisolation. A: Auf einer VM-Platte mit Agarose wurde Sporensuspension in einem dünnen Streifen aufgetragen. Ein Ascus wurde mit der Nadel ergriffen, neben dem Streifen abgelegt und mit einem Kreis markiert. Nach dem Auskeimen wurden die Sporen isoliert und mit einem Punkt markiert. B: Isolierte und ausgekeimte Sporen eines Ascus.

Die einzelnen Segreganten von 20 verschiedenen Asci wurden auf den Histidinmarker überprüft. Dafür wurden sie auf unterschiedlich supplementierten EMM-Platten ausplattiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.10 dargestellt.

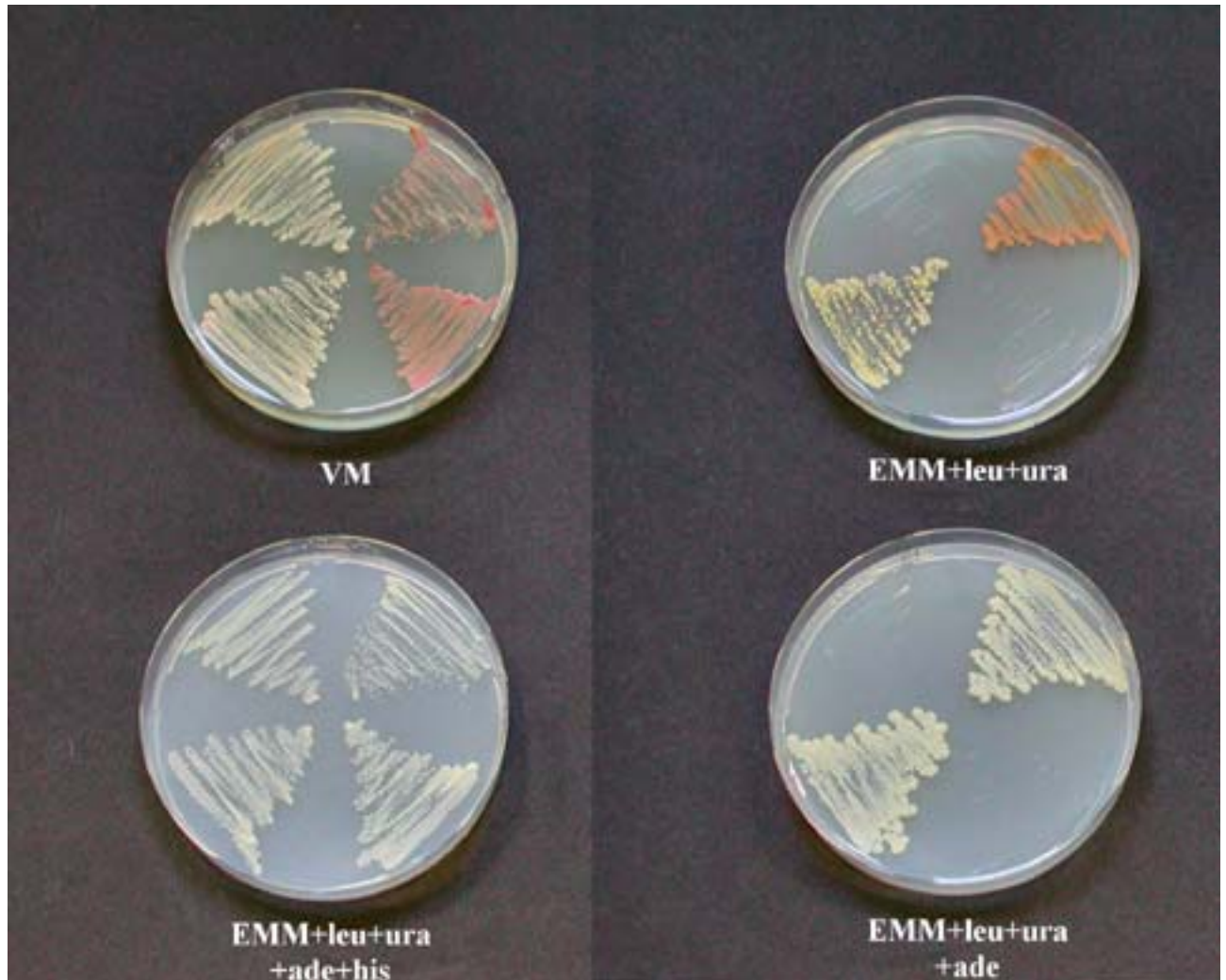


Abb.3.10: Untersuchung des *his3*-Markers. Die Sporen eines Ascus wurden auf VM und EMM-Platten mit verschiedenen Aminosäuren ausplattiert und drei Tage bei 28°C inkubiert.

Auf den Kontroll-Platten, VM und EMM + leu + ura + ade + his sind alle vier Stämme gut gewachsen, wohingegen auf den Selektivmedien EMM + leu + ura (+ ade) nur die zwei Stämme wuchsen, die den Leserahmen von VMU1p gegen die *his3*-Kassette ausgetauscht hatten. Diese $2^+ : 2^-$ Aufspaltung für den *his3*-Marker wurde bei allen 20 Asci beobachtet. Die Aufspaltung war unabhängig vom Elternstamm, wie hier durch die unterschiedliche Färbung

auf den beiden oberen Platten deutlich zu sehen ist. Auf der Platte mit EMM + leu + ura wächst ein hell und ein dunkelroter Hefestamm dessen Leserahmen disruptiert ist.

Da alle vier Sporen zu Kolonien heran wuchsen und eine $2^+ : 2^-$ Segregation für den *his3*-Marker zeigten, ist das *vmu1* nicht essentiell für die Hefe.

Die Segreganten wurden auf die Anwesenheit des *his3*-Gens über die Oligonukleotide SpHis-3-1 (die letzten 20 bp des *his3*-Gens von *S. pombe*) und SHP6 (80 bp nach dem Fragment termO13779) mit Hilfe der PCR kontrolliert (siehe Abb. 3.11).

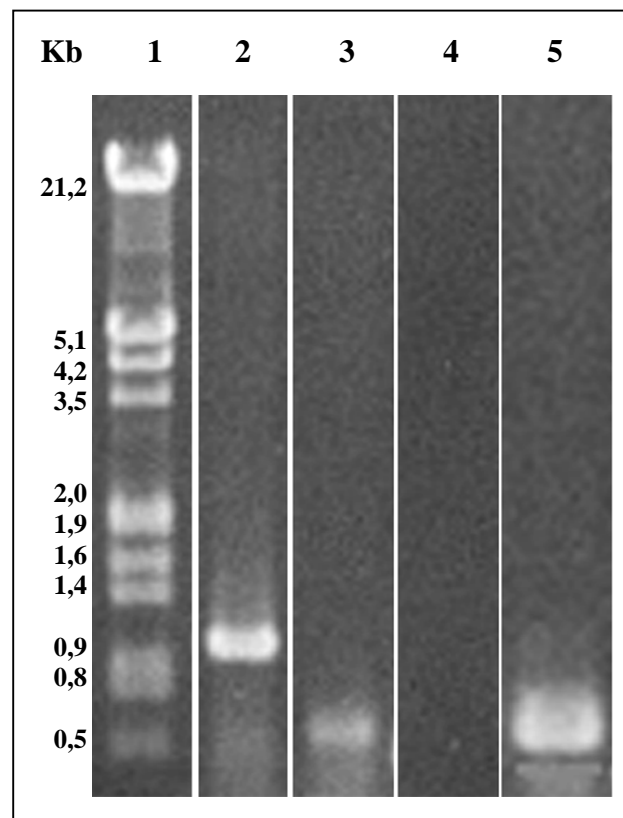


Abb. 3.12: PCR-Kontrolle der Disruptanten 13-2. In Spur 1 ist der Marker λ *EcoRI/HindIII* geschnitten, in 2 das 985 bp-Produkt der PCR mit den Primern SpHis-3-2 und SHP6 aus chromosomaler DNA von 13-2 (Δ vmu1) und in 3 ist die Kontrolle des Wildtyp-Stamms 13-1 mit den Primern SpHis-3-1 und SHP6 zu sehen. In Spur 4 ist die Kontrolle für das Fragment aus dem disruptierten Leserahmen O13779 mit den Primern SHP7 und SHP8 für 13-2 (Δ vmu1) und Spur 5 für 13-1 (VMU1) aufgetragen.

Abb. 3.11 zeigt die positiv ausgefallen PCR-Kontrolle der richtigen Integration der *his3*-Kassette. Spur 2 und 4 gibt das Ergebnis für die Disruptante 13-2 wieder. Bei der richtigen Integration der Kassette wird mit den Primern SpHis3-1 und SHP6 ein 985 bp (Target in Abb. 3.7 dargestellt) großes Fragment erwartet, welches in Spur 2 dargestellt ist. Kein Fragment

sollte hingegen bei einer PCR mit der Primer-Kombination SHP7 und SHP8 für die Disruptanten-DNA zu sehen sein, da es einem Gen-Abschnitt aus dem disruptierten Leserahmen O13779 entspricht, der hier nicht mehr vorhanden sein sollte. Dies ist in Spur 4 dargestellt. In Spur 3 und 5 sind die Ergebnisse der PCR-Kontrolle aus der Wildtyp-DNA aufgetragen. Hier sollte das Verhältnis genau umgekehrt zu sehen sein. Ganz richtig zeigt sich in Spur 5 ein 630 bp großes Fragment das nach der PCR mit den Primern SHP7 und SHP8 erwartet wurde. In Spur 3 ist ein schwaches Fragment zusehen, welches allerdings nicht der korrekte Größe von 985 bp entspricht. Anscheinend fand in diesem Fall eine unspezifische Bindung des Primerpaares statt.

Dies machte eine weitere Kontrolle durch den Southernblot erforderlich. Chromosomale DNA des Disruptanten- und Wildtyp-Stammes wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, im Agarosegel aufgetrennt, geblottet und anschließend mit einer aus dem Primerpaar His3-1 und His3-2 amplifizierten *his3*-Sonde hybridisiert (siehe Abb. 3.12).

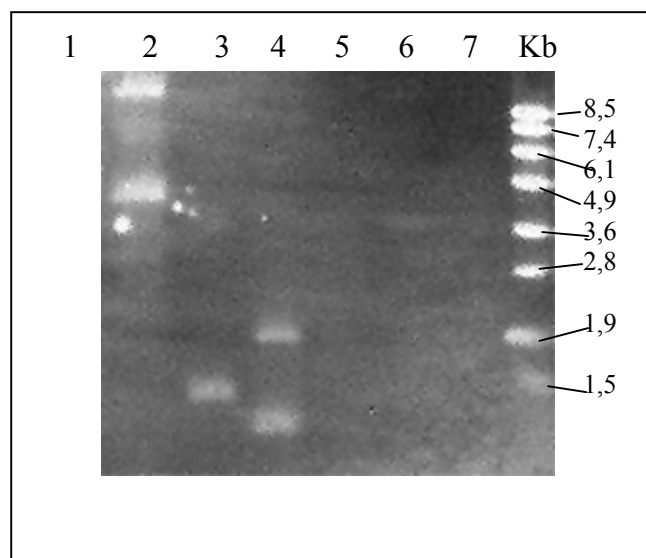


Abb.3.12: Southernblot-Analyse mit der *his3*-Sonde. Dieses Bild wurde des besseren Kontrasts wegen invertiert. In Spur 1, 2 und 3 ist die DNA von 13-2 (Δ vmu1) aufgetragen. In Spur 1 wurde sie mit dem Restriktionsenzym *AccI* geschnitten, in 2 mit *Bam*HI und in 3 mit *Xho*I. In Spur 4, 5 und 6 ist die DNA des Wildtyps 13-1, unter gleichen Bedingungen behandelt wie die DNA der Disruptanten, zu sehen. In jeder Spur wurden 15 μ g genomischer DNA aufgetragen. In Spur 7 ist der DNA molecular weight marker I digoxigenin-labeled dargestellt.

Mit der *his3*-Sonde wurde ausnahmslos nur die DNA der Disruptanten 13-2 hybridisiert und anschließend angefärbt. In den ersten drei Spuren der Abb. 3.12 ist die DNA von 13-2, vorher mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, aufgetragen. In Spur 1 sieht man die nach einem *AccI*-Verdau erwarteten Banden von 9 und 4,6 Kb, in Spur 2 die nach einem *BamHI*-Verdau von 1,4 Kb und in Spur 3 die nach einem *XhoI*-Verdau von 1,9 und 1 Kb. Keine Banden sind jedoch in Spur 4, 5 und 6 zu beobachten. Hier wurde die Wildtyp-DNA, unter den gleichen Bedingungen wie die DNA der Disruptanten behandelt, aufgetragen. Da der Wildtyp histidinauxotroph ist, sollten keine Hybridisierung und somit auch keine Färbung erfolgen, was hier deutlich zu sehen ist.

Mit Segreganten die dieses Ergebnis zeigten wurde weitergearbeitet.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass die Ergebnisse der PCR-Kontrollen mit dem disruptierten Diplonten-Stamm SD5 und den daraus isolierten Sporen richtig waren. Auch die Banden im Southernblot konnten an den erwarteten Stellen detektiert werden. Aus diesem Grund wurde davon ausgegangen, dass die Segreganten richtig waren.

3.4 VMU1p ist wichtig für das Wachstum in Magnesium-Mangelmedium

Der Phänotyp, der aus der Tetradenanalyse erhaltenen Disruptanten- und Wildtypstämme, wurde auf verschiedene Metallsensitivitäten oder -resistenzen untersucht. Dabei wurden alle 80 Segreganten der Tetradenanalyse untersucht. Verglichen mit den Wildtyp-Zellen wuchsen $\Delta vmu1$ -Zellen schlechter auf Magnesium-Mangelmedium (Abb. 3.13).

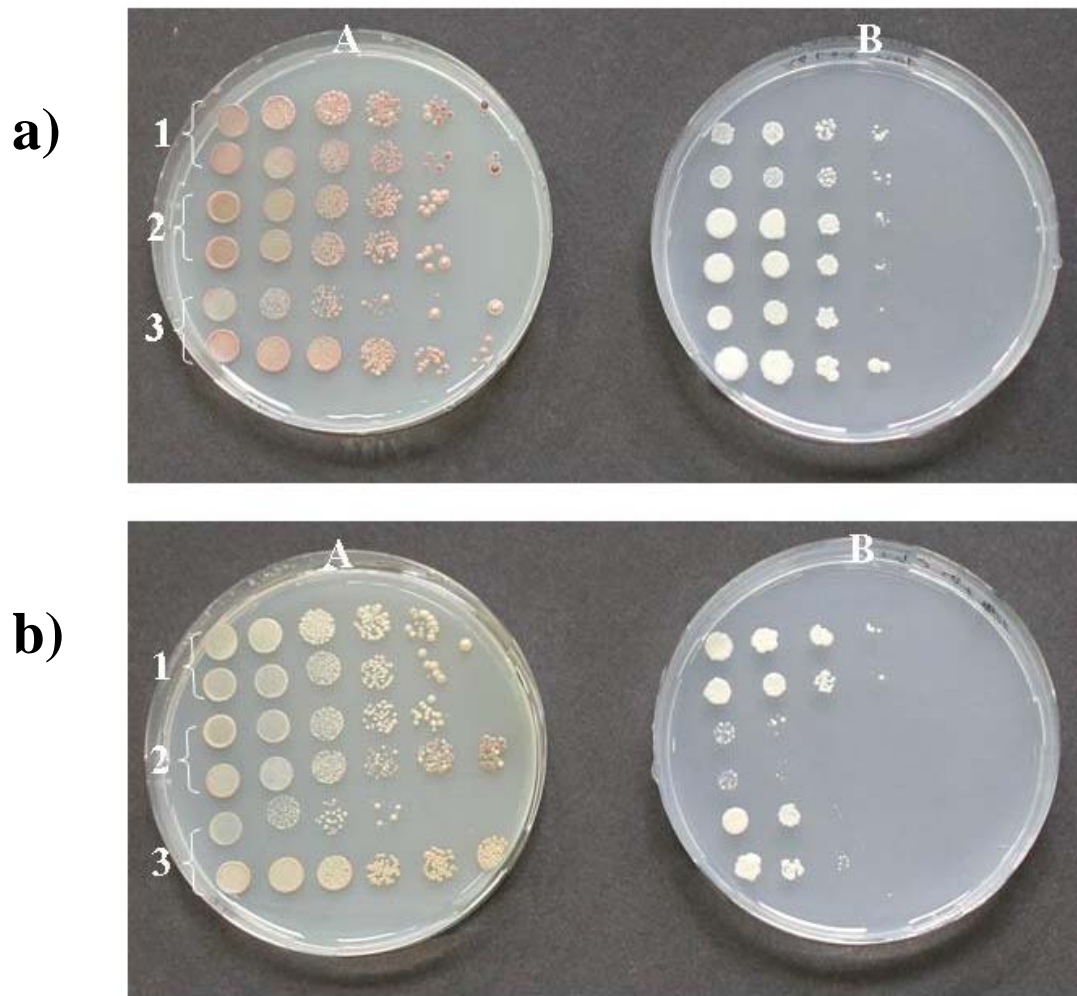


Abb. 3.13: Reihenverdünnungen der Stämme wurden auf YE (A) und EMM-Medium + Adenin + Histidin + Leucin + Uracil + 100 µM Magnesium (B) aufgetropft. Dargestellt sind auf jeder Platte in Bild a) von oben nach unten: 2-3 ($\Delta vnu1$), 2-4 ($\Delta vnu1$), 2-1 (VMU1), 2-2 (VMU1) aus Ascus 2 und die Elternstämme 130 (VMU1) und 131 (VMU1). In Bild b) 17-3 (VMU1), 17-4 (VMU1), 17-1 ($\Delta vnu1$) und 17-2 ($\Delta vnu1$) aus Ascus 17, und die Elternstämme 130 (VMU1) und 131 (VMU1). Aufgetropft wurden die Mengen von 10^7 - 10^2 Zellen / ml (von links nach rechts). Die Platten wurden für 5 Tage bei 28°C inkubiert.

Bei nur 100 µM Magnesium im Medium wuchsen $\Delta vnu1$ -Zellen schlechter als Wildtypzellen. Die Disruptanten waren nicht in der Lage mit wenig Magnesium im Medium auszukommen und wuchsen nur in vereinzelten kleinen Kolonien, während die Wildtyp-Stämme zwar eingeschränktes, aber doch viel besseres Wachstum zeigten. Die meisten Segreganten zeigten dieses Ergebnis auf Magnesium-Mangelmedium. Der Stamm

131 (VMU1) wuchs auf Vollmedium-Platten etwas schlechter, als die anderen Stämme, welche sonst recht ähnlich gediehen. Dies hatte aber keinerlei Einfluss auf das Ergebnis der magnesiumreduzierten EMM-Platte. Dieses Phänomen konnte nicht geklärt werden. Die beiden Bilder stellen das Ergebnis zweier Asci dar. Für die anderen Asci wurden ähnliche Resultate erzielt; die Disruptanten- wuchsen in allen Fällen schlechter als die Wildtyp-Stämme.

Da mit Abb. 3.13 geklärt war, dass die aus der Tetradenanalyse erhaltenen Stämme mit Wildtyp-Eigenschaften den gleichen Phänotypen auf Magnesium-Mangelmedium zeigten wie die Elternstämme, wurde eine Tropftest Reihe mit verschiedenen Magnesiumkonzentrationen ohne Elternstämme durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.14 zu sehen.

In dem Versuch über mehrere Magnesium-Konzentrationen wird es noch deutlicher, dass $\Delta vmu1$ –Zellen schlechter auf Magnesium reduzierten Medien wachsen als Wildtyp-Zellen. Schon ab einer Konzentration von ca. 500 μM werden $\Delta vmu1$ -Kolonien kleiner und sind schließlich bei 5 μM kaum noch vorhanden. Die Wildtyp-Stämme zeigten auch bei der niedrigsten Magnesium-Konzentration noch Wachstum. Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen könnte mit der Disruption des Leserahmens von VMU1p ein Transportprotein der Plasmamembran zerstört worden sein, was dazu führt, dass die Magnesium-Aufnahme in die Zelle nun erschwert ist. Zum anderen könnte die Zerstörung eines vakuolären Membranproteins in einer verminderten Abgabe von Magnesium aus dem Speicher bei Mangelbedingungen resultieren.

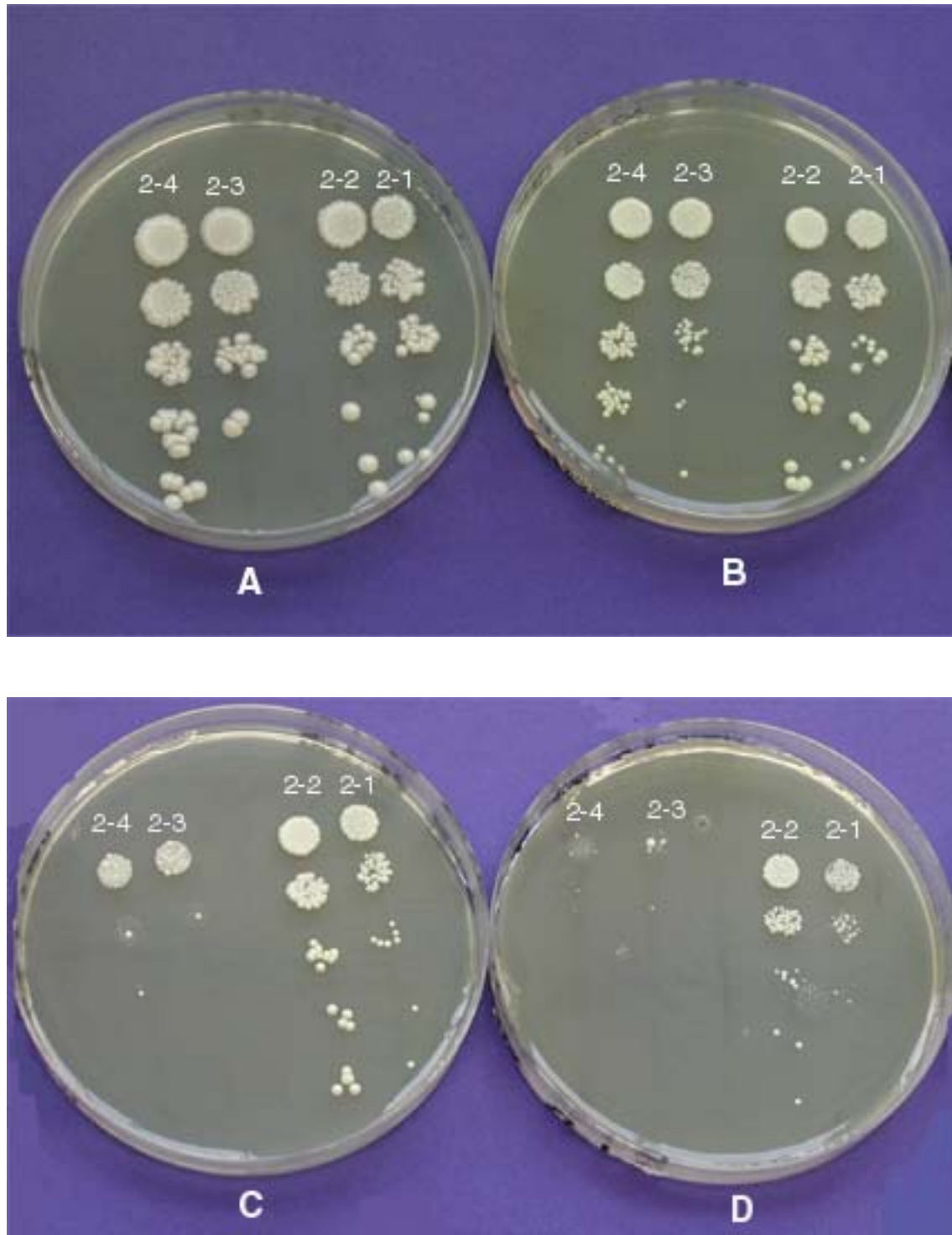


Abb. 3.14: Tropftest auf Magnesium-Mangelmedium. 2-1 (VMU1) und 2-2 (VMU1) und 2-3 ($\Delta vmu1$) und 2-4 ($\Delta vmu1$), stammen aus Sporen des Ascus 2. Reihenverdünnungen der Stämme wurden auf EMM + Adenin + Histidin + Leucin + Uracil (A) und dem mit den gleichen Supplementen versehenen EMM-Medium mit 500 (B), 50 (C) und 5 μM Magnesium (D) aufgetropft. Aufgetragen wurden die Mengen von 10^7 - 10^2 Zellen / ml (von oben nach unten). Die Platten wurden für 5 Tage bei 28°C inkubiert.

Der Wachstumsstudie auf festen Medien schloss sich die in flüssigen an. Der Elternstamm 131 (VMU1), 13-1 (VMU1) und 13-2 (Δ vmu1) wurden in EMM-Medium + Adenin + Histidin + Leucin + Uracil + 200 mM Magnesium angezogen und anschließend in EMM-Medium mit den gleichen Supplementen, aber ohne Magnesium überführt. Über 24h wurden Werte entnommen, die in Abb. 3.15 A dargestellt sind. Nach 24h wurden die Kulturen zurück in magnesiumhaltiges EMM-Medium mit den gleichen Supplementen, wie oben, gegeben, um zu überprüfen, ob sie weiter wuchsen und somit Magnesium der limitierende Faktor war. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.15 B festgehalten.

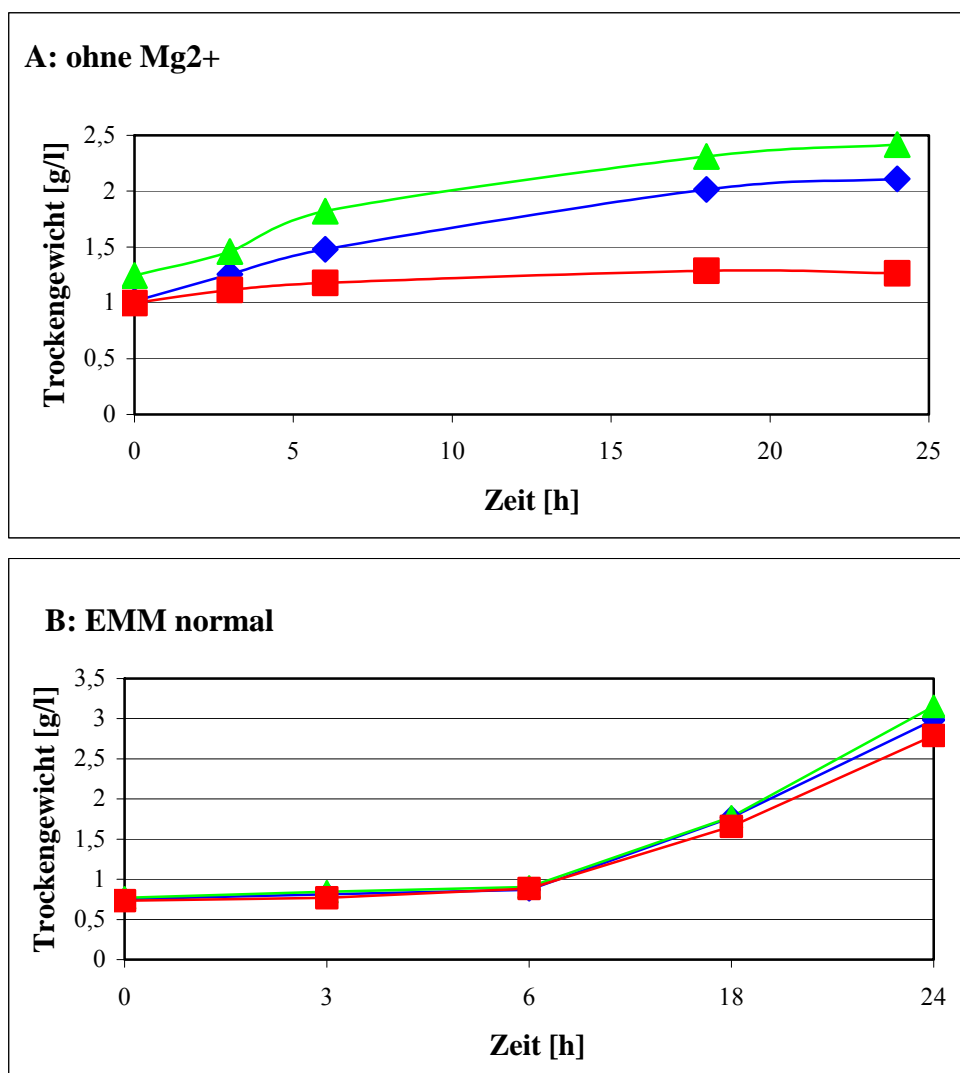


Abb. 3.15: Δ vmu1-Zellen zeigen erhöhte Sensitivität in Magnesium-Mangelmedium. Die blauen Kurven entsprechen dem Elternstamm 131, die grünen 13-1 (VMU1) und die roten 13-2 (Δ vmu1). Aufgetragen ist jeweils das Trockengewicht gegen die Zeit unter A: Magnesium-Mangelbedingungen und B: im normalen EMM-Medium. Die Zellen wurden unter Schütteln bei 28°C inkubiert und die Proben zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und gemessen.

Wie in Abb. 3.15 A sehr gut zu sehen ist wachsen die Wildtypstämme unter Mangelbedingungen erst weiter, bis das Wachstum nach ca. 22 h in die stationäre Phase übergeht. Die Disruptante dagegen zeigt ein stark eingeschränktes Wachstum. Schon nach 3 h lässt die Zellteilung gegenüber den Wildtyp-Stämmen nach. Im Ganzen nimmt die Zellmasse von 13-2 ($\Delta vmu1$) nur um 0,25 g/l zu, wohingegen sie bei den beiden anderen um mindestens das Doppelte wächst.

Nach einer Rücküberführung in EMM mit Magnesium können alle Stämme nach einer lag-Phase von ca. 6 h weiterwachsen (siehe Abb. 3.15 B). Die Disruptante unterscheidet sich dabei nicht von den Wildtyp-Stämmen. Damit wird deutlich, dass Magnesium wirklich der limitierende Faktor im Medium ist. Außerdem weisen diese Experimente darauf hin, dass nicht die Magnesium-Aufnahme in die Zelle durch die Disruption des Leserahmens von VMU1p gestört ist, sondern die Bereitstellung aus den Speichern unter Mangelbedingungen. Bei einer erschwerten Aufnahme in die Zelle könnte die Disruptante nicht normal in EMM-Medium wachsen. Wie Abb. 3.15 B aber zeigt, ist kaum ein Unterschied zwischen den verschiedenen Stämmen zu sehen. Da die Disruptante 13-2 in Magnesium-Mangelmedium nicht das gleiche Wachstum wie die Wildtyp-Stämme zeigt, sondern deutlich schlechter wächst, weist das auf die Zerstörung eines intrazellulären Transporters hin. Mehr Klarheit darüber kann mit der Atom Absorptionsspektroskopie (AAS) erlangt werden, mit der die intrazelluläre Metallion-Konzentration ermittelt werden kann.

Auch mikroskopisch konnte zwischen Disruptanten- und Wildtypzellen unterschieden werden. Zellen mit disruptierten Leserahmen machten in Magnesium-Mangelmedium einen anfälligen Eindruck und zeigten nicht mehr die schöne längliche Wuchsform von *S. pombe*-Zellen. In normalen Vollmedium oder EMM-Medium zeigten beide das gleiche Wachstum.

3.5 Bei $\Delta vmu1$ -Disruptanten zeigt sich eine erhöhte Zinksensibilität

Ein weiterer Tropftest wurde für alle Stämme auf Medien mit verschiedenen Zink-Konzentrationen durchgeführt und ist in Abb. 3.16 dargestellt.



Abb. 3.16: Tropftest auf verschiedene Zink-Konzentrationen. Das Medium von Platte A ist Vollmedium, von B Vollmedium + 1,5 mM Zn^{2+} und C Vollmedium + 3 mM Zn^{2+} . 130 (VMU1) und 131 (VMU1) sind die Elternstämme, 3-1 (VMU1), 3-4 (VMU1), 3-2 ($\Delta vmu1$) und 3-3 ($\Delta vmu1$) Sporen des Ascus 3. Aufgetropft wurden die Mengen von 10^7 - 10^2 Zellen / ml (von oben nach unten).

Auf der Kontrollplatte A wachsen alle Stämme gleich gut, so dass das unterschiedliche Wachstum auf den beiden anderen Platten auf die hohe Zink-Konzentration im Medium zurückzuführen ist. Die Disruptanten schneiden dabei im Vergleich viel schlechter ab. Allerdings bestehen zwischen den beiden Disruptanten-Stämme (3-2 und 3-3) Unterschiede im Wachstum auf zinkhaltigen Medien. Der Stamm 3-3 wächst etwas besser als der Stamm 3-2, aber schlechter, als die Wildtyp-Stämme. Auch das Wachstum der Elternstämme (130 und 131) ist unterschiedlich. 130 wächst besser als 131. Es können also generell Unterschiede in der Resistenz der Stämme existieren, was auch eine Erklärung für das intermediäre Wachstum des Stammes 3-3 wäre.

Da die Kolonien eine gelbliche Färbung aufweisen, kann es sein, dass das Zink vielleicht in die Vakuole eingelagert wird und sich die Zelle vor zu hohen Zink-Konzentrationen schützt. Die Disruptanten zeigen, wenn, nur eine ganz schwache Färbung. Dieses Ergebnis wurde für alle untersuchten Stämme erhalten. Der *his3*-Marker korreliert mit einer erhöhten Zinksensitivität.

Keine Wirkung konnte auf Platten mit Al^{3+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} und Ni^{2+} beobachtet werden. Es waren keine großen Unterschiede zwischen Wildtyp- und Disruptanten –Stämmen zusehen; eine Korrelation zwischen dem *his3*-Marker und dem jeweiligen Metall ist auszuschließen.

Auch der Zink-Phänotyp wurde in flüssigem Medium überprüft. Zu diesem Zwecke wurden die Kulturen in einer 20 ml YE-VK angezogen, in einer ersten 200 ml YE-HK für 24 h bei 28°C unter Schütteln inkubiert und anschließend in EMM-Medium mit 2 mM Zink und in EMM-Medium ohne Zink überführt. Zu den in Abb. 3.17 beschriebenen Zeitpunkten wurden Proben gezogen und für die Trockengewichtsbestimmung verwendet.

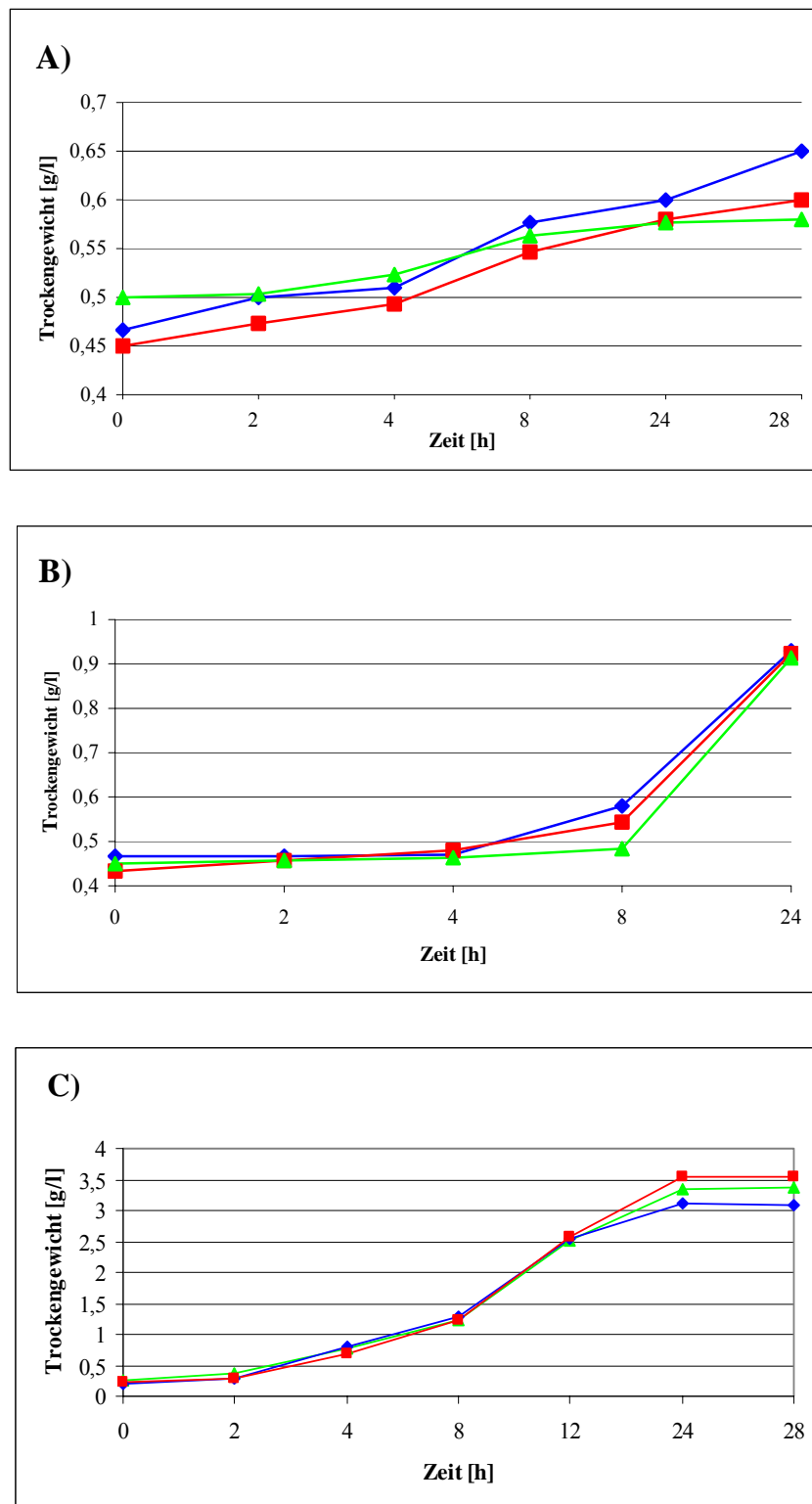


Abb.3.17: Wachstumsversuche mit A) EMM-Medium + Adenin + Histidin + Leucin + Uracil + 2 mM Zink, B) ohne Zink und C) normale Zinkkonzentration (siehe EMM-Medium Punkt 2.1.7). Die blauen Kurven entsprechen dem Elterntamm 131, die grünen 13-1 (VMU1) und die roten 13-2 ($\Delta vmu1$). Aufgetragen ist jeweils das Trockengewicht gegen die Zeit. Die Zellen wurden unter Schütteln bei 28°C inkubiert und die Proben zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und gemessen.

Die drei Wachstumskurven in Abb. 3.17 zeigen, dass das Wuchsverhalten der drei Stämme sehr ähnlich ist. In Medium mit 2 mM Zink (Abb. 3.17 A) ist nur ein leichter Anstieg zu erkennen. In Abb. 3.17 C) erreichen die Zellen Werte von 3,5 g/l. In 2 mM Zink wird gerade mal ein Trockengewicht von 0,6 g/l nach 24h erreicht, fünf mal weniger als in Medium mit für *S. pombe* akzeptabler Zink-Konzentration (siehe Abb. 3.17 C). Das schlechte Wachstum durch zu hohe Zinkkonzentration kann daher kommen, dass das Kation an falsche Bindestellen von Proteinen und Cofaktoren bindet und somit Struktur und Funktion stark beeinträchtigt.

Besser wuchsen die Stämme in Medium ohne Zink. Dort wurden immerhin Trockengewichte von 0,9 g/l gemessen. Dies ist gegenüber den Zellmengen, welche in normalem zinkhaltigen Medium geerntet werden immer noch dreimal schlechter. Dass die Kulturen in Medium ohne Zink besser wachsen als in Medium mit 2 mM Zink, kann daran liegen, dass bei Zinkmangel das gespeicherte Zink aus der Vakuole ins Zytosol transportiert wird und so der Zelle Zink zur Verfügung steht. Allerdings ist die lag-Phase sehr lang (4 h), was zeigt, dass sich die Zellen auf die schlechten Konditionen einstellen mussten.

3.6 O13779 sorgt wahrscheinlich für die Bereitstellung von Magnesium aus der Vakuole

Um zu überprüfen, woran das schlechte Wachstum der Disruptante unter Magnesium-Mangelbedingungen lag, wurden Proben für die Atom Absorptionsspektroskopie (AAS) über einen Zeitraum von 24h, entnommen.

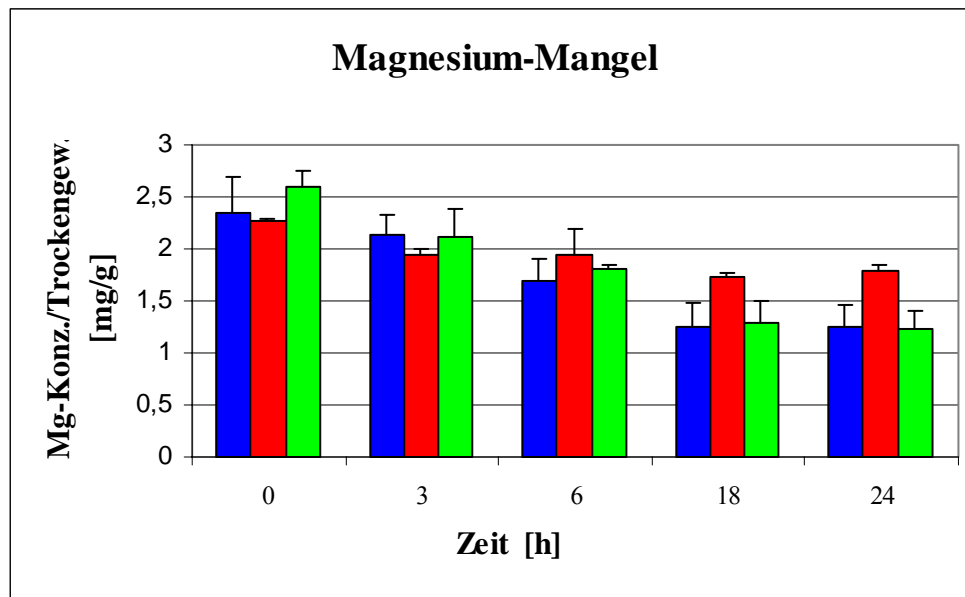


Abb. 3.18: AAS-Messung unter Magnesium-Mangelbedingungen. In blau sind die Messergebnisse für den Elternstamm 131, in rot für 13-2 (Δvml) und in grün für 13-1 (VMU1) dargestellt. Abgebildet ist der Mittelwert der Magnesiumkonzentration/Trockengewicht gegen die Zeit. $n = 3$

In Abb. 3.18 ist die AAS-Messung aus Proben, die aus EMM-Medium + Adenin + Histidin + Leucin + Uracil ohne Magnesium entnommen wurden, abgebildet. Die Ergebnisse der Messwerte aus den Kulturen der Wildtypstämme, durch blaue und grüne Balken gekennzeichnet, zeigen, dass die intrazelluläre Magnesiumkonzentration abnimmt da, das Trockengewicht zunimmt. Die Ausgangskonzentration des Magnesiums bleibt dabei konstant. Über eine Zeitspanne von 24 h nimmt die Konzentration um mehr als 1mg/g Trockengewicht ab. Da das Medium magnesiumfrei und die Kulturen vor ihrer Überführung in das Mangelmedium mit EDTA gewaschen wurden, konnte der Magnesiumverbrauch nur aus intrazellulären Ressourcen erfolgen. Die Magnesiumkonzentration von 13-2 (Δvml) nimmt im Vergleich zu den Wildtyp-Stämmen viel weniger ab. Nur ca. 0,5 mg Magnesium/g Trockengewicht werden über 24 h umgesetzt.

Zusammen mit den Ergebnissen aus Abb. 3.15 wird deutlich, dass das Protein VMU1p kein Transporter der Plasmamembran, sondern eines intrazellulären Kompartiments, wahrscheinlich der Vakuole, sein muss. Im umgekehrten Fall würde die Disruptante unter Magnesium-Mangelbedingungen dasselbe Verhalten wie die Wildtypstämme, sowohl bei den Wachstumsstudien, wie auch den AAS-Messungen, zeigen. Ist genügend Magnesium im Medium, verhält sich die Disruptante wie die Wildtyp-Stämme, was die gleiche intrazelluläre

Magnesium-Konzentration zum Zeitpunkt 0 h beweist. Wachsen die Zellen in Magnesium-Mangelmedium ist das Wachstum des Disruptanten-Stammes stark eingeschränkt (Abb. 3.15 A). Die Wachstumshemmung liegt daran, dass in der Disruptanten-Zelle gespeichertes Magnesium unter Mangelbedingungen nicht genutzt werden kann (Abb. 3.18). Nach der Rücküberführung in magnesiumhaltiges Medium kann auch die Disruptante wieder ganz normal weiter wachsen (Abb. 3.15 B). Dies beweist, dass Magnesium der limitierende Faktor im Medium ist.

3.7 Calciummessung in EMM-Medium ohne Magnesium

Die Calciumkonzentration in *S. pombe*-Zellen, die in Magnesiummangel-Medium wuchsen, wurden mittels der AAS gemessen, um zu schauen welche möglichen Effekte diese Konditionen auf die Calciumionen-Homöostase haben. Die Zellen wurden in EMM-Medium + Adenin + Histidin + Leucin + Uracil und EMM-Medium mit den gleichen Supplementen + 100 mM Magnesium inkubiert. Nach einem Zeitraum von 24 h wurden die Proben für die AAS-Messung entnommen und die erhaltenen Werte sind in Abb. 3.19 dargestellt.

In EMM-Medium wurde bei allen drei Kulturen eine totale intrazelluläre Calcium-Konzentration $[Ca^{2+}]_i$ von ca. 1 mg pro g Trockengewicht gemessen. Ebenfalls gleiche Calcium-Konzentrationen zeigten die verschiedenen Stämme in EMM-Medium mit 100 mM Magnesium. Diesmal lag die $[Ca^{2+}]_i$ allerdings deutlich niedriger, bei ca. 0,5 mg pro g Trockengewicht. Die geringere Ca-Konzentration, die bei Zellen gemessen wurde, die in Medium mit viel Magnesium wuchsen, kann daran liegen, dass durch die erhöhte extrazelluläre Magnesium-Konzentration mehr Magnesium in die Zelle gelangte.

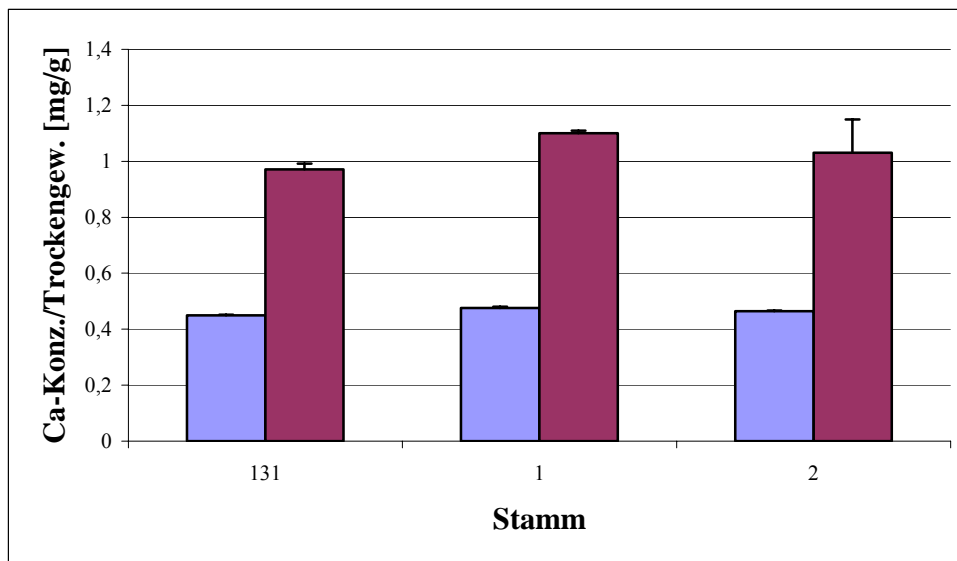


Abb. 3.19: Ca-Kontrolle der AAS-Messung. Die verschiedenen Ca-Konzentrationen/g Trockengewicht sind für 131 (VMU1), 1 = 13-1 (VMU1) und für 2 = 13-2 (Δ vmu1) dargestellt. Die Zellen wurden in EMM-Medium mit 100 mM Magnesium (blauer Balken) und in EMM-Medium (pinkler Balken) für 24 h bei 28°C unter Schütteln inkubiert. n = 3

Nach diesem Ergebnis war es besonders interessant zu überprüfen, welche Calcium-Konzentrationen in EMM-Medium ohne Magnesium vorhanden sind. Zu diesem Zwecke wurde eine AAS durchgeführt und die daraus resultierenden Messergebnisse sind in Abb. 3.20 dargestellt.

In Magnesium-Mangelmedium ist nun ein Unterschied zwischen den beiden Wildtyp-Stämmen und der Disruptanten zu sehen. Über einen Zeitraum von 6 h nimmt die Calcium-Konzentration bei allen drei Stämmen zu. Doch nach 6 h zeigen sich deutliche Konzentrationsunterschiede. Die Calcium-Konzentration (3 mg / g Trockengewicht) in der Disruptanten ist doppelt so hoch wie in den Wildtyp-Stämmen (1,5 mg / g Trockengewicht). Bei allen Stämmen ist die Calcium-Konzentration gegenüber den gemessenen Konzentrationen in Medium mit Magnesium erhöht.

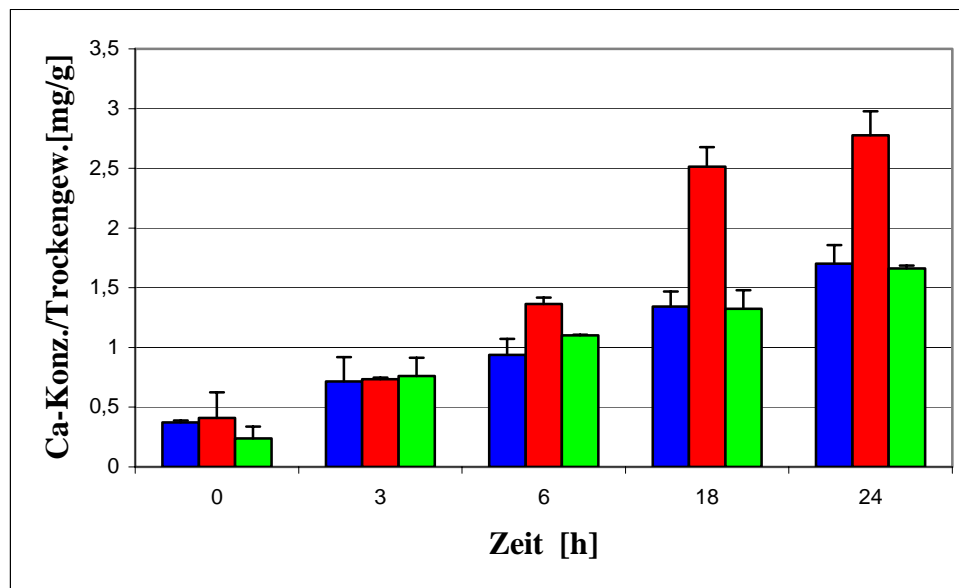


Abb. 3.20: Calcium-Kontrolle der AAS-Messung unter Magnesium-Mangelbedingungen. In blau sind die Messergebnisse für den Elternstamm 131, in rot für 13-2 ($\Delta vmu1$) und in grün für 13-1 (VMU1) dargestellt. Abgebildet ist der Mittelwert der Calciumkonzentration/Trockengewicht gegen die Zeit. Die Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und in 6 N HNO_3 für 2 h inkubiert. Die auf 0,5 N HNO_3 verdünnten Proben wurden in der AAS gemessen. $n = 3$

Ein Grund warum wesentlich mehr Calcium bei Disruptanten-Zellen gemessen wurde, könnte eine erhöhte Expression von Calcium-Transportern sein. Die erhöhte Expression könnte an der Disruption des Leserahmens O13779 liegen.

3.8 Kein Unterschied in der intrazellulären Zink-Konzentration

Die intrazelluläre Zink-Konzentration sollte durch AAS-Messungen bestimmt werden. Dafür wurden die verschiedenen Stämme in Medium mit 2 mM Zink angezogen und zu den gegebenen Zeitpunkten den Schüttelkulturen Proben für die Messung entnommen und in der AAS gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.21 dargestellt.

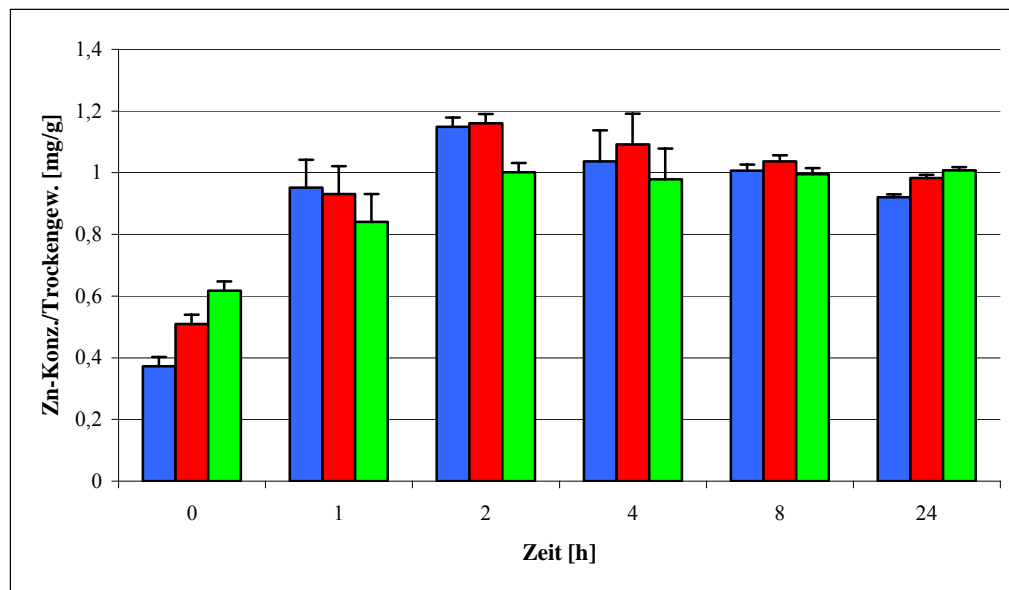


Abb. 3.21: Zink-Kontrolle durch AAS-Messung. In blau sind die Messergebnisse für den Elternstamm 131, in grün für 13-2 (Δ vmu1) und in rot für 13-1 (VMU1) dargestellt. Abgebildet ist der Mittelwert der Magnesiumkonzentration/Trockengewicht gegen die Zeit. Die Zellen wuchsen in Medium mit 2 mM Zink. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Proben entnommen, mit HNO_3 aufgearbeitet und gemessen. $n = 3$

Auch die Ergebnisse der AAS-Messungen sind für alle drei Stämme recht ähnlich (Abb.3.21). In Medium mit 2 mM Zink wird nach 2 h wird die Höchstkonzentration von ca. 1 mg Zink/g Trockengewicht erreicht. Über eine Dauer von 24 h treten keine weiteren Veränderungen in der intrazellulären Zink-Konzentration auf.

In Medium ohne Zink wurde eine Zink-Konzentration von 0,4 mg/g Trockengewicht über 24 h aufrechterhalten (hier nicht dargestellt). Die Ausgangskonzentration von 0,4 mg Zink/g Trockengewicht wird in YE-Medium erreicht, da für die verschiedenen zinkhaltigen Hauptkulturen eine 200 ml YE-VK verwendet wurde.

3.9 Vergleich zwischen *S. pombe* VMU1p und *S. cerevisiae* ALR2p

Untersuchungen auf Magnesiumabhängigkeit bei ALR1- und ALR2-Mutanten von *S. cerevisiae* wurden schon durchgeführt (Graschopf et al., 2001). Über die Zinktoleranz von ALR1p und ALR2p ist bekannt, dass bei einer Überexpression der Gene die Zellen eine erhöhte Sensitivität aufwiesen, wohingegen Mutationen die Resistenz förderten

(MacDiarmid und Gardner, 1998). Die Abbildung in der Veröffentlichung von MacDiarmid und Gardner (1998), zeigt aber nur die Untersuchung von verschiedenen Metallen bei Überexpression der Gene. Da in der Literatur keine weiteren Daten gefunden wurden, wurde ein Versuch über die Zinktoleranz bei der *S. cerevisiae* Mutante ALR2 Δ durchgeführt (siehe Abb. 3.22).

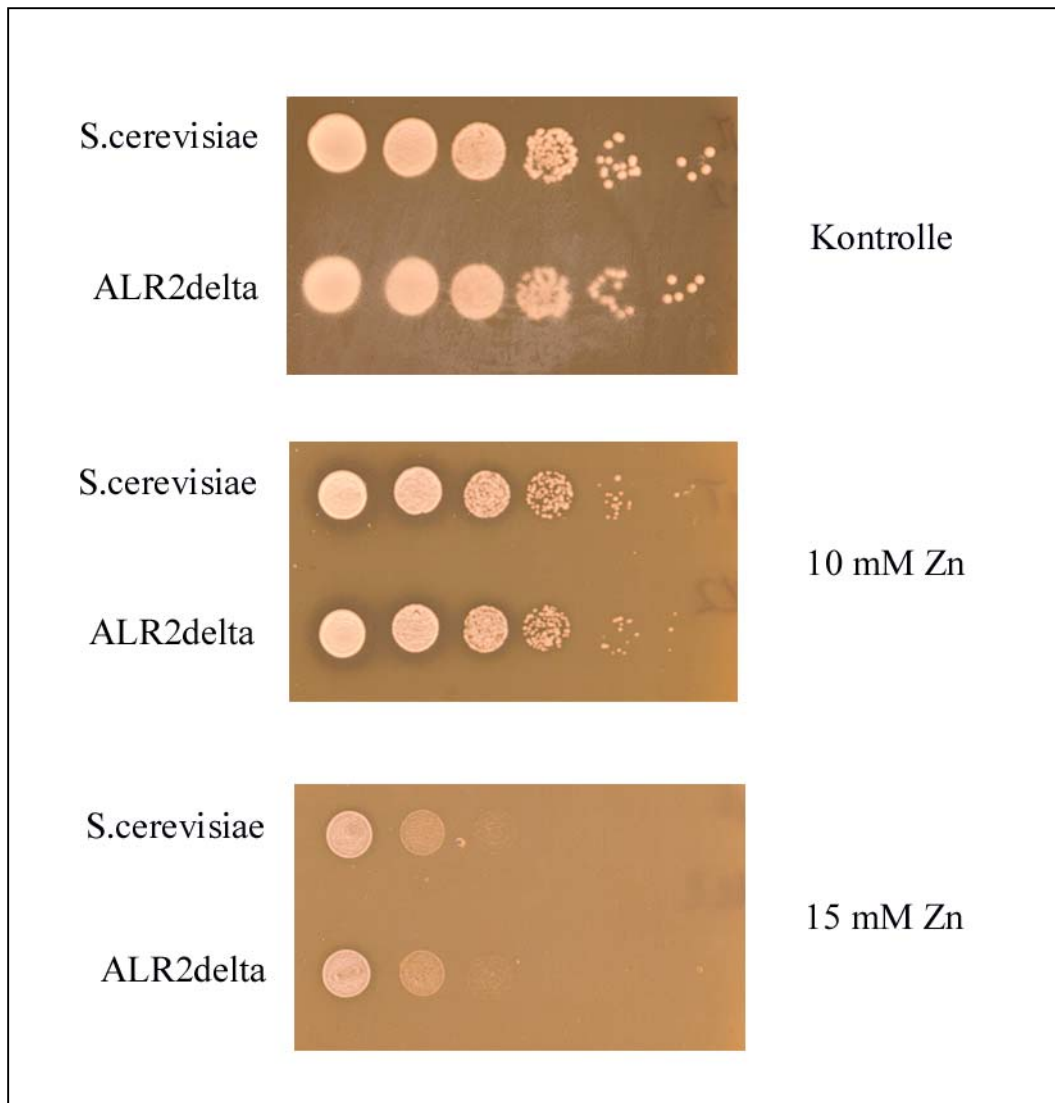


Abb. 3.22: Kein Unterschied bei hohen Zinkkonzentrationen ist zwischen der *S. cerevisiae* Mutante ALR2 Δ und dem Wildtyp-Stamm zu beobachten. Die Zinktoleranz wurde nach fünf Tagen auf VM, VM + 10mM und + 15mM Zink untersucht. Aufgetropft wurden die Mengen von 10^7 - 10^2 Zellen / ml (von links nach rechts).

Auf allen drei Platten ist das gleiche Wachstum zwischen dem *S. cerevisiae*-Wildtyp und der Mutante ALR2 Δ zu beobachten. Bei einer Konzentration von 10 mM Zink im Medium fangen die Kolonien langsam an kleiner zu werden, bis bei 15 mM nur noch eingeschränktes Wachstum zu beobachten ist. Dieses Ergebnis erstaunt, da ALR2p ein Protein für die Magnesiumaufnahme in die Zelle ist. Zudem transportiert es verschiedene divalente Kationen (MacDiarmid und Gardner, 1998). Da bei einer Überexpression des ALR2-Gens eine erhöhte Zinksensitivität auftritt (MacDiarmid und Gardner, 1998), sollte bei einer Mutation eigentlich eine erhöhte Resistenz gegen Zink beobachtet werden können, da die Schwermetall-Aufnahme in die Zelle erschwert ist.

Abb. 3.23 zeigt den Vergleich zwischen ALR2 Δ und den *S. pombe*-Stämme 131 (VMU1), 13-1 (VMU1) und 13-2 (Δ vmu1).

ALR2 Δ ist mit Abstand am Zink-Resistentesten, wobei dieser Stamm schon auf der Kontroll-Platte dickere Kolonien bildete als die *S. pombe*-Stämme. Die Kolonien werden über die höheren Zink-Konzentrationen im Medium kleiner, aber selbst bei 10 mM wächst ALR2 Δ noch in jeder Verdünnung. Im Allgemeinen sind die *S. pombe*-Stämme wesentlich sensibler auf Medien mit hohen Zinkkonzentrationen als die *S. cerevisiae*-Stämme. Die Disruptante 13-2 verträgt Zink am schlechtesten, zeigt schon eingeschränktes Wachstum bei 1 mM und stellt dieses komplett bei 3 mM ein. 131 (VMU1) und 13-1 (VMU1) können, allerdings mit eingeschränktem Wachstum, 3 mM Zink im Medium tolerieren. Dieses Ergebnis zeigt, dass ein großer Unterschied in der Zink-Toleranz zwischen den beiden Arten besteht. Dieser Unterschied könnte an einer unterschiedlichen Lokalisation der beiden Proteine liegen.

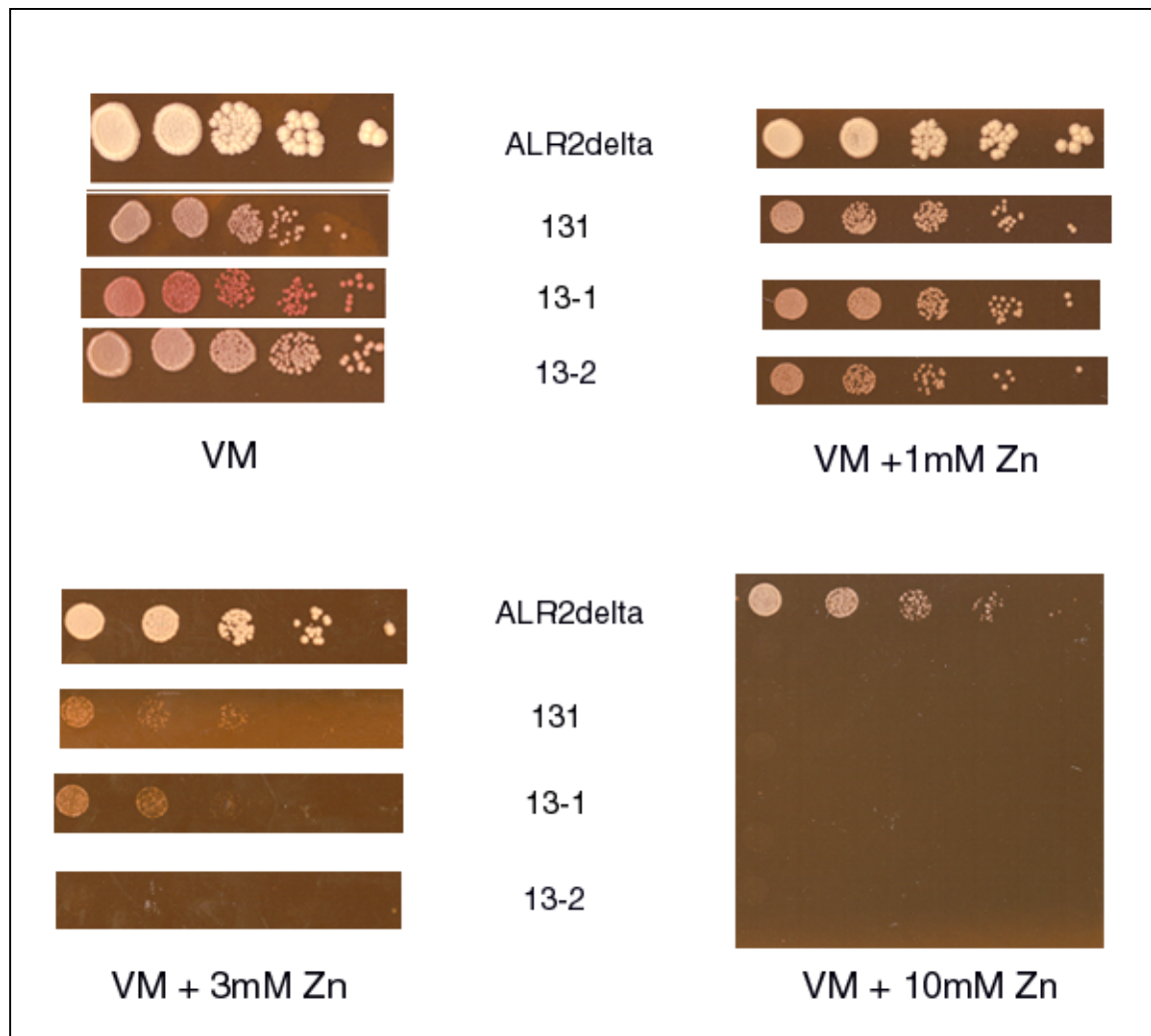


Abb. 3.23: Vergleich der Zinktoleranz zwischen ALR2Δ aus *S. cerevisiae* und den *S. pombe* Elternstamm 131 (VMU1), 13-1 (VMU1) und 13-2 (Δvmu1). Die Zellen wurden in einer Reihenverdünnung von 10^7 - 10^2 Zellen/ml (von links nach rechts) aufgetropft und nach fünf Tagen Inkubation bei 28°C untersucht.

Die verschiedenen *S. pombe*-Stämme verhalten sich bei hohen Zinkkonzentrationen im Medium unterschiedlich, wohingegen die *S. cerevisiae*-Stämme ein gleiches Wachstumsverhalten zeigen. Das Unterschiede in der Toleranz für Schwermetalle zwischen dem Transportprotein VMU1p aus *S. pombe* und ALR2p aus *S. cerevisiae* bestehen, war die Idee für diesen Versuch. Die Lokalisation von ALR2p in der Plasmamembran ist bewiesen (Graschopf et al., 2001). Der Unterschied zwischen VMU1p und ALR1p zeigt, dass es sich bei VMU1p nicht um ein Protein der Plasmamembran handelt.

3.10 Komplementation des Leserahmens O13779

Um zu überprüfen, ob der Phänotyp der Disruptanten wirklich auf die Zerstörung des Leserahmens durch den Austausch der *his3*-Kassette beruhte, musste eine Komplementation durchgeführt werden. Der Leserahmen O13779 sollte in den Shuttle-Vektor pTG9 kloniert und dann in einen Stamm mit disruptierten Leserahmen transformiert werden. Der Vektor pTG9 hatte den Vorteil, dass er zusätzlich die GFP-Sequenz (Sequenz des Grün-Fluoreszierenden Proteins) trägt, welches für die Lokalisation des Proteins VMU1p wichtig ist. Dazu wurde das Gen an je einem Ende mit einer *EcoRI*- und einer *SacI*-Restriktionsschnittstelle, durch eine PCR mit den Primern O13779-GFP-for und O13779-GFP-rev, versehen. Das Amplifikations-Produkt wurde dann mit dem ebenfalls *EcoRI/SacI* restringierten pTG9-Vektor ligiert und in den *E. coli*-Stamm DH5 α transformiert. Der Vektor pTG9/O13779 ist in Abb. 3.24 dargestellt. Nachdem die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert war, wurde das Konstrukt in verschiedene Disruptanten transformiert und auf EMM-Medium ohne Uracil selektiert.

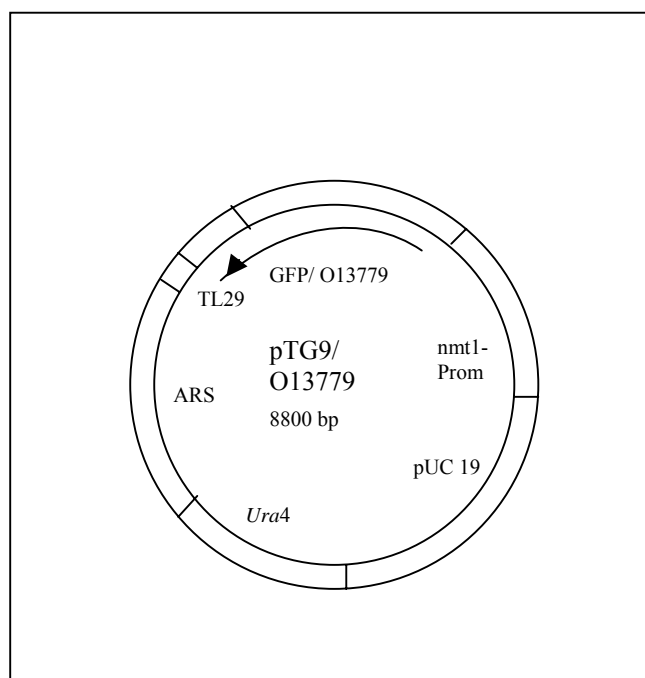


Abb. 3.24: Der Vektor pTG9/O13779. Der Leserahmen des Fusionsproteins GFP/O13779 ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Davor sitzt ein *nmt1*-Promotor und dahinter ein TL29 Terminator. Markersequenzen sind für *E. coli* *amp^S* in der pUC19-Sequenz und *Ura4* für *S. pombe*.

Das Fusionsprotein besteht aus dem Leserahmen O13779, welcher N-terminal vor das GFP kloniert wurde. Das Fusionsprotein ist für die später im Ergebnisteil aufgeführte Lokalisationsstudien wichtig.

Die resultierenden Transformanten wurden auf Selektionsmedium angezogen und dann auf ihren Phänotypen durch Tropftests untersucht. Dafür wurde ein Stamm mit komplementierten Leserahmen, 13-2:pTG9, 13-2 ($\Delta vmu1$) und 13-1 (VMU1) in Flüssigkultur angezogen und bis zur späten log-Phase wachsen gelassen. Dann wurden alle Stämme in einer Reihenverdünnung auf Medien mit verschiedenen Magnesiumkonzentrationen aufgetropft und 5 Tage bei 28°C inkubiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.25 dargestellt.

Auf der Kontrollplatte, EMM-Medium, wachsen alle Stämme gleich gut. Auf den Magnesium-Mangelmedien wächst die Disruptante schlechter als die beiden anderen Stämme. Dies zeigt, dass die Komplementation in dem Stamm 13-2 ($\Delta vmu1$) funktioniert hat und der Wildtyp-Leserahmen wieder hergestellt ist.

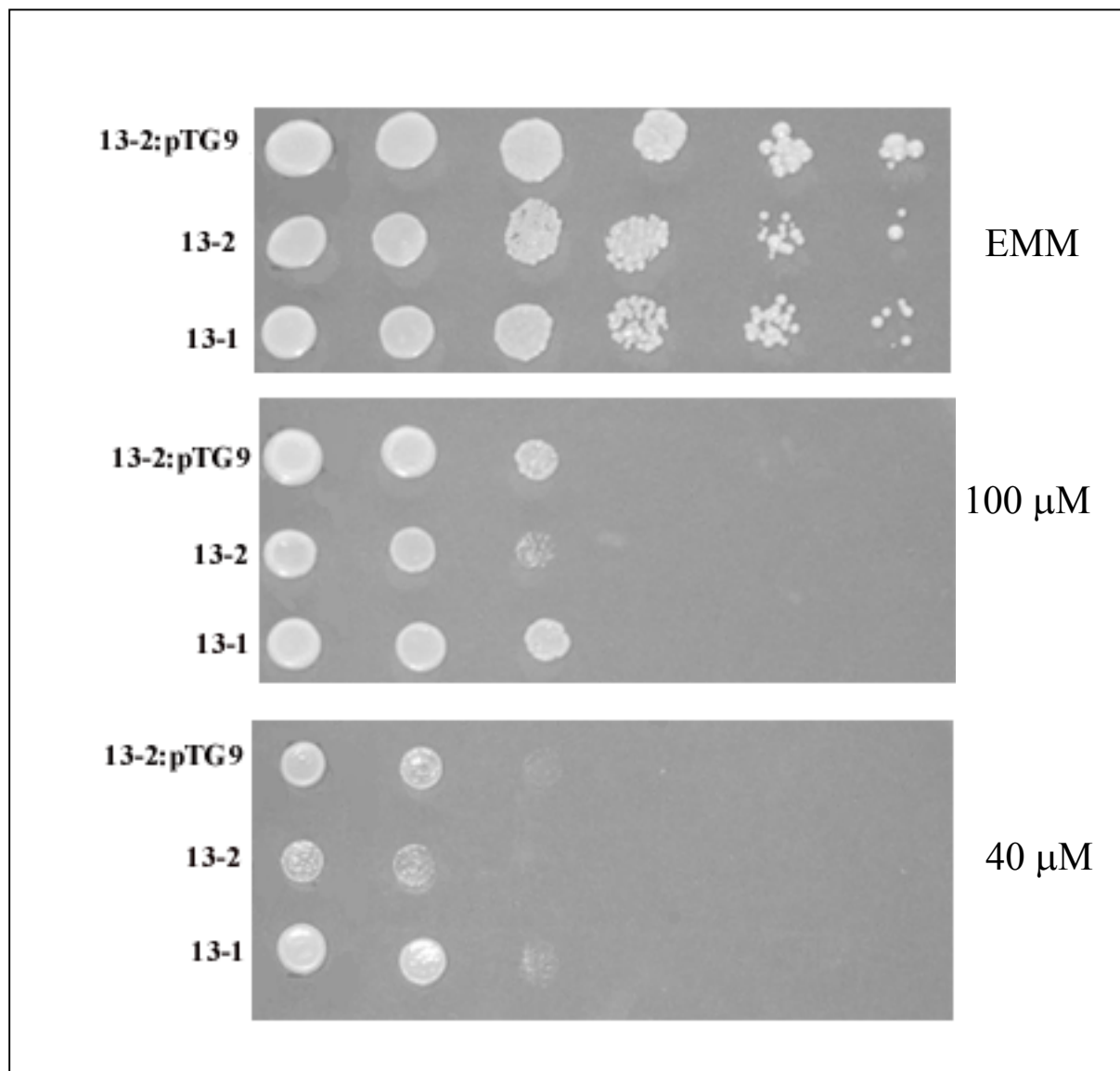


Abb.3.25: Komplementationsversuch der Disruptanten 13-2 ($\Delta vmu1$). In jedem Bild von oben nach unten sind der Stamm mit komplementierten Leserahmen, 13-2:pTG9, die Disruptante 13-2 ($\Delta vmu1$) und der Wildtyp-Stamm 13-1 (VMU1) zu sehen. Aufgetropft wurde in Reihenverdünnung auf normalem EMM-Medium, EMM+100 μM Mg^{2+} und +40 μM Mg^{2+} . Aufgetropft wurden die Mengen von 10^7 - 10^2 Zellen / ml (von links nach rechts).

Das Ergebnis der Kontrolle der Zinkphänotypen ist in Abb. 3.26 abgebildet. Hier wurde mit den gleichen Stämmen wie in Abb. 3.25 gearbeitet und auch der Versuchsablauf war der gleiche, nur das in diesem Fall Platten mit verschiedenen Zinkkonzentrationen verwendet wurden.

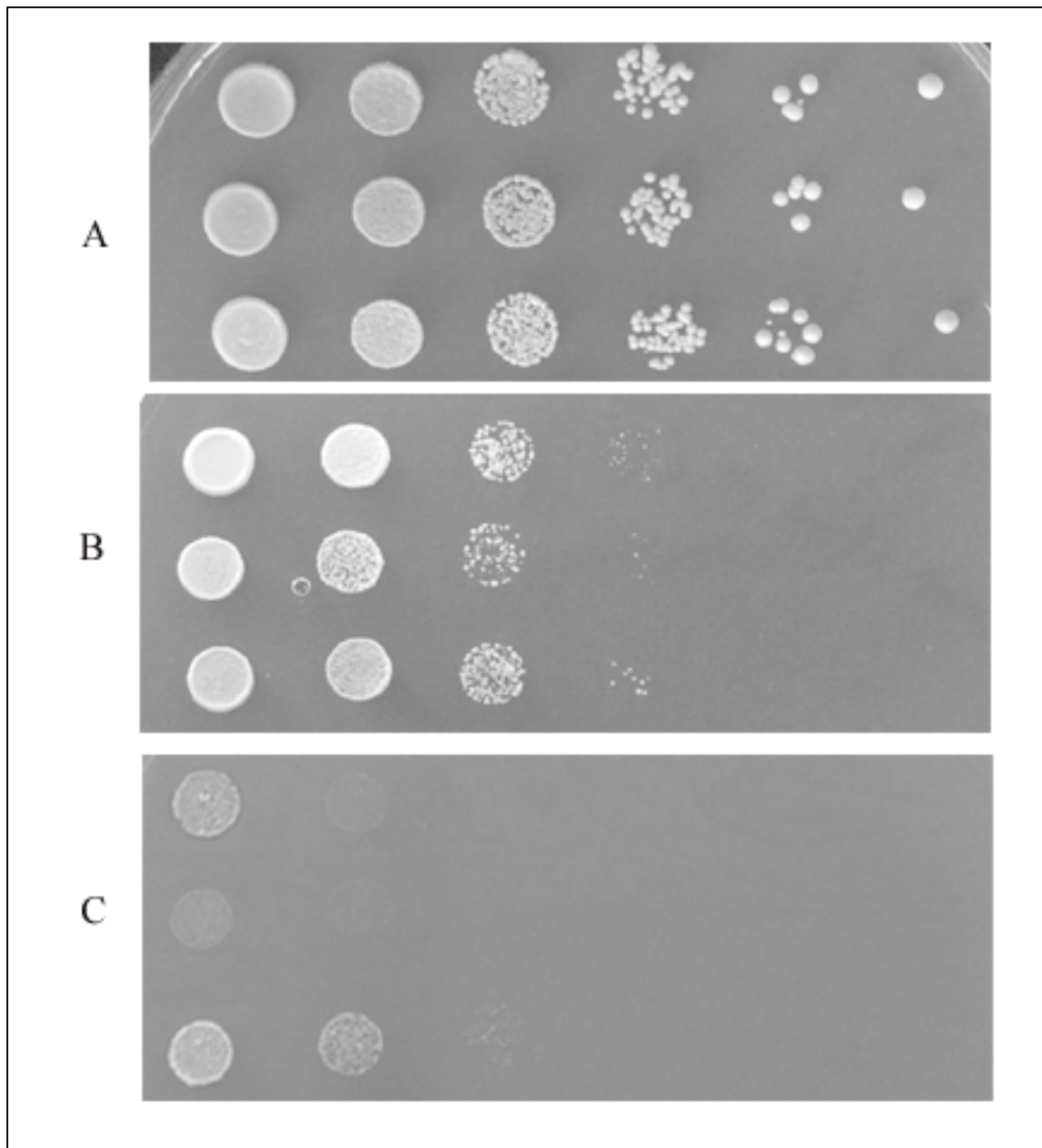


Abb.3.26: Komplementationsversuch der Disruptanten 13-2, Zinkkontrolle. In allen drei Bildern sind von oben nach unten die Stämme 13-2:pTG9, 13-2 und 13-1 abgebildet. A zeigt die Reihenverdünnung auf VM, B auf VM + 1 mM Zn^{2+} und C auf VM + 3 mM Zn^{2+} . Aufgetropft wurden die Mengen von 10^7 - 10^2 Zellen / ml (von links nach rechts).

Auf der Kontrollplatte (A) wachsen alle Stämme gleich gut. Ein schlechteres Wachstum von 13-2 (Δvnu1) wurde auf den zinkhaltigen Medien beobachtet. Dieses Ergebnis bestätigt das des Magnesium-Mangeltests. Der Stamm mit komplementierten Leserahmen zeigt in beiden Tests den gleichen Phänotyp, wie der Wildtyp. Dies bedeutet, dass die Komplementation

erfolgreich verlaufen ist und der Wildtyp-Leserahmen wieder hergestellt wurde. Weiter zeigt es, dass der veränderte Phänotyp der Disruptanten wirklich auf die Zerstörung des Leserahmens zurückzuführen ist, da mit seiner Komplementation der Ausgangszustand wieder hergestellt werden kann.

Die Komplementation musste mit Hilfe des Plasmidverlusttest überprüft werden. Dafür wurde, wie unter Punkt 2.2.8 beschrieben, gearbeitet. Nach mehrmaligem Überimpfen in Vollmedium zum Verlust des Plasmids wurden einzelne Kolonien auf VM und auf Selektionsmedium (EMM ohne Uracil) aufgestempelt (siehe Abb. 3.27).

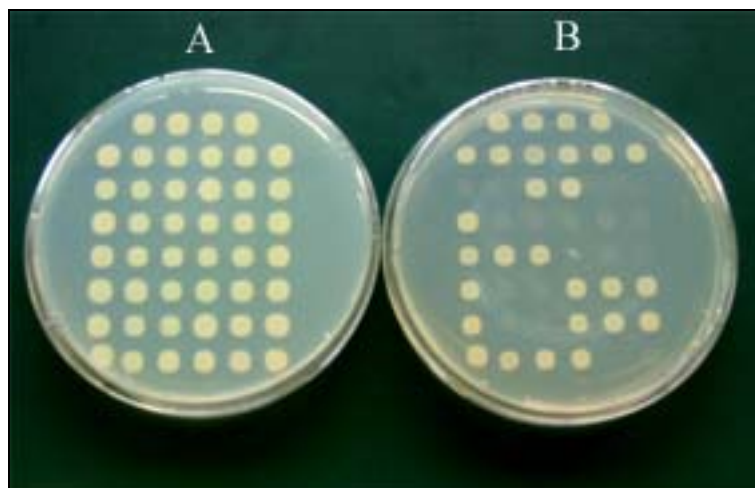


Abb.3.27: Plasmidverlusttest. Platte A ist die Kontrolle, EMM-Medium mit allen Supplementen, und Platte B zeigt den Plasmidverlust auf EMM ohne Uracil. Mit einem Stempel wurden Zellen aus einer Zellsuspension auf die beiden Platten transferiert.

Zellen die aus einer Kolonie stammten wurden auf die gleiche Position der beiden Platten gestempelt. Von beiden Platten wurde Zell-Material für den Tropftest abgenommen. Von Platte B wurden die Kolonien die dort und von Platte A, die, die nicht auf Platte B wuchsen, abgeimpft und auf entsprechendem Medium ausgestrichen. Die Zellen, die von Platte B stammten wurden auf Selektionsmedium (EMM ohne Uracil) ausplattiert, da sie das Plasmid nicht verloren hatten. Sie sollten den Wildtyp-Leserahmen besitzen und werden im Folgenden Komp^+ genannt. Die Zellen von Platte A, welche nicht mehr auf Platte B wuchsen, wurden auf Vollmedium ausgestrichen und sollten das Plasmid verloren haben. Sie besitzen nun wieder den disruptierten Leserahmen O13779 und werden Komp^- genannt. Je 10 verschiedene Kolonien von Komp^+ und Komp^- wurden ausplattiert und, nachdem sie gewachsen waren, für

eine Untersuchung auf Magnesium-Sensitivität angeimpft. Abb. 3.28 zeigt die Ergebnisse aus diesem Test.

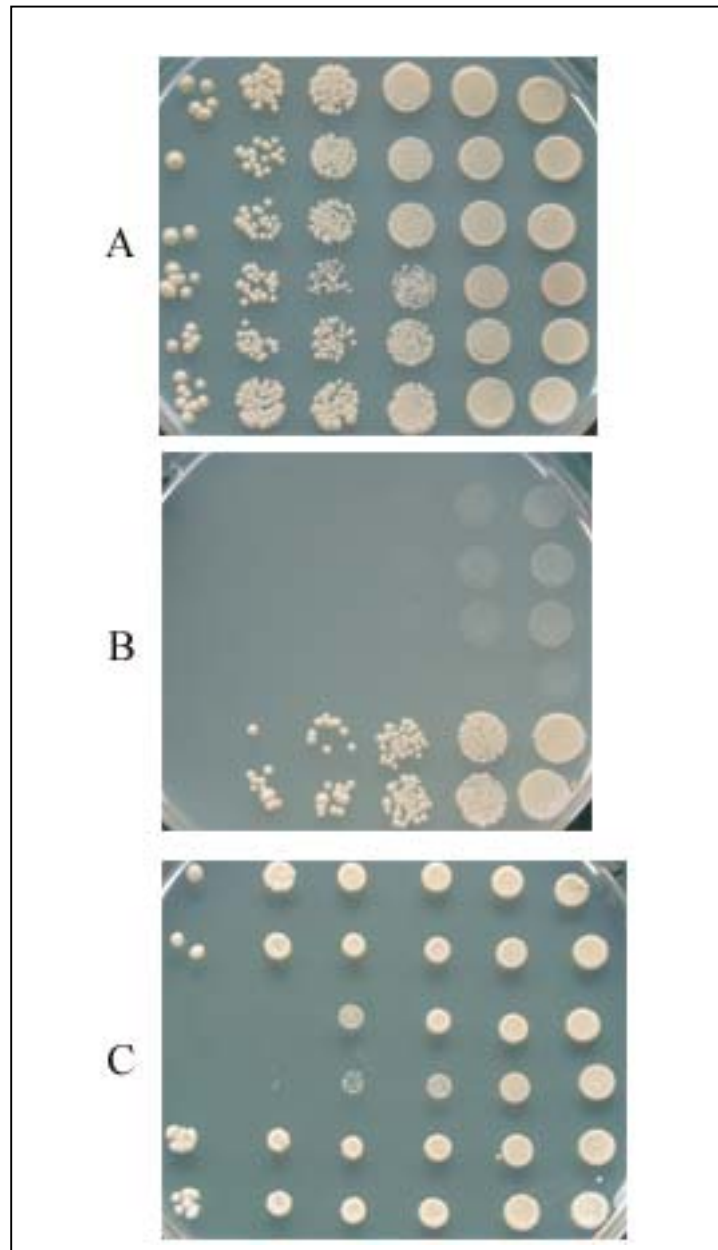


Abb. 3.28: Der Phänotyp nach dem Plasmidverlusttest wird überprüft. Auf jeder Platte von oben nach unten sind die Stämme wie folgt angeordnet: 131 (Elternstamm), 13-1 (VMU1), Komp⁻ (Δvmu1), 13-2 (Δvmu1), Komp⁺ (VMU1) und 13-2:pTG9 (VMU1). Auf Platte A wachsen die Zellen auf EMM, auf B auf EMM ohne Uracil und auf C auf EMM +100 μM Magnesium. Aufgetropft wurden die Mengen von 10^7 - 10^2 Zellen / ml (von rechts nach links).

Die Stämme 13-2:pTG9 und Komp⁺ besitzen beide den Vektor pTG9 und somit, durch den *Ura4*-Marker, die Fähigkeit auf Medium ohne Uracil zu wachsen. Wie Abb.3.28 B zeigt

wachsen diese beiden Stämme. Alle anderen besitzen Vektor und Marker nicht und können somit nicht auf Medium ohne Uracil wachsen. Auf Magnesium-Mangelmedium (Platte C) sollten alle Stämme, die den Wildtyp-Leserahmen besitzen gut wachsen. Dies sind die Stämme, 131, 13-1, Komp⁺ und 13-2:pTG9 welche alle besser wachsen, als 13-2 und Komp⁻, die den disruptierten Leserahmen aufweisen. Dieses Ergebnis wurde für alle Komp⁺ und Komp⁻ Stämme erzielt und zeigt, dass der Plasmidverlusttest funktioniert hat.

Um sicher zu gehen, dass die Komplementation mit dem Plasmid pTG9/O13779 auf der Wiederherstellung des intakten Wildtypleserahmens des orfs O13779 und nicht auf der Transformation mit dem Vektor beruht, wurde eine weitere Transformation mit pTG9 ohne O13779 durchgeführt. Die Transformanten wurde im Tropftest überprüft (Abb. 3.29).

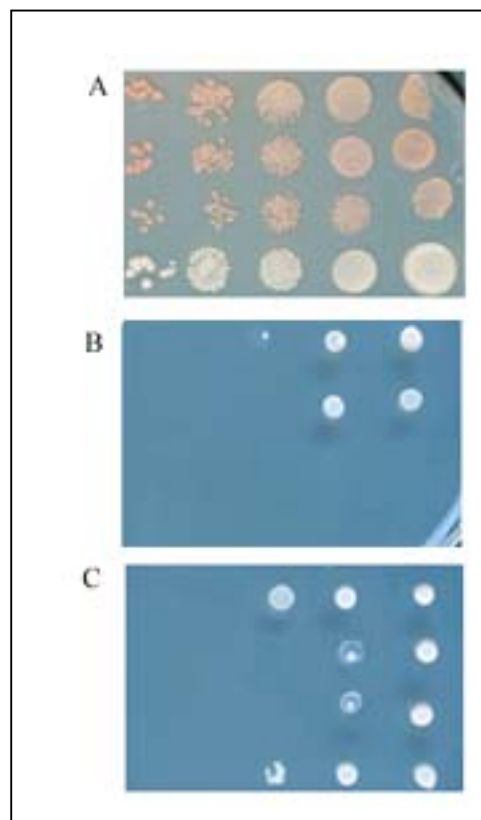


Abb.3.29: Plasmidverlusttest mit leerem Vektor. Die Platte aus Bild A entspricht Vollmedium, aus B EMM ohne Uracil und aus C EMM + 100 µM Mg²⁺. Die Stämme von oben nach unten: 13-2/pTG9O13779, 13-2/pTG9, 13-2 und D18h⁻. Aufgetropft wurden die Mengen von 10⁷-10² Zellen / ml (von rechts nach links).

Zum Vergleich mit 13-2/pTG9 wurden der Wildtyp D18h⁻, 13-2 (Δ vmu1) und der Stamm 13-2/pTG9O13779 aus der Komplementation mit aufgetragen. Der leere Vektor pTG9 sollte bei seiner Transformation in die Disruptante keinerlei Veränderungen, außer dem *Ura4*-Marker, hervorrufen. Dieses Ergebnis ist in Abb. 3.29 dargestellt. Hier sieht man, dass auf der EMM-Mediumplatte ohne Uracil (Bild B) der Stamm 13-2/pTG9, wie auch 13-2/pTG9O13779, gewachsen ist. D18h⁻ und 13-2 besitzen beide nicht das Plasmid pTG9 oder pTG9/O13779, und somit auch nicht den *Ura4*-Marker. Aus diesem Grund sind beide Stämme nicht auf EMM ohne Uracil gewachsen. Auf der Magnesium-Mangel-Platte (Bild C) ist das Wachstum von 13-2/pTG9 ebenso gering, wie das von 13-2 (Δ vmu1), und schlechter, als das der beiden Stämme mit Wildtyp-Leserahmen. Das Ergebnis zeigt deutlich, dass das Plasmid pTG9 keinen Einfluss auf den komplementierten Phänotyp besitzt.

3.11 VMU1p wird unter verschiedenen Magnesium-Konzentrationen im Medium exprimiert

Um zu überprüfen, ob VMU1p unter bestimmten Bedingungen, Magnesium betreffend, nicht exprimiert wird, wurde eine RNA-Isolation und anschließend eine Reverse Transkriptase-PCR durchgeführt. Dafür wurde der Wildtyp-Stamm 13-1 in 20 ml YE-VK angezogen, in 100 ml YE und nach 24 h in EMM-Medium, EMM-Medium ohne Magnesium und EMM-Medium mit 100 mM Magnesium überführt. Die Kulturen wurden jeweils bei 28°C unter Schütteln inkubiert. Aus einer Zellmenge von 10⁸ Zellen/ml wurde die RNA mit dem High Pure RNA-Isolation Kit (Roche, Mannheim) isoliert. Nach dem DNase-Verdau wurde die cDNA-Synthese mit der M-MuLV Reverse Transkriptase (Promega) durchgeführt. 3 µl der cDNA wurde dann durch die PCR mit den Primern RT-O13-1for und RT-O13-2rev kontrolliert (siehe Abb. 3.30).

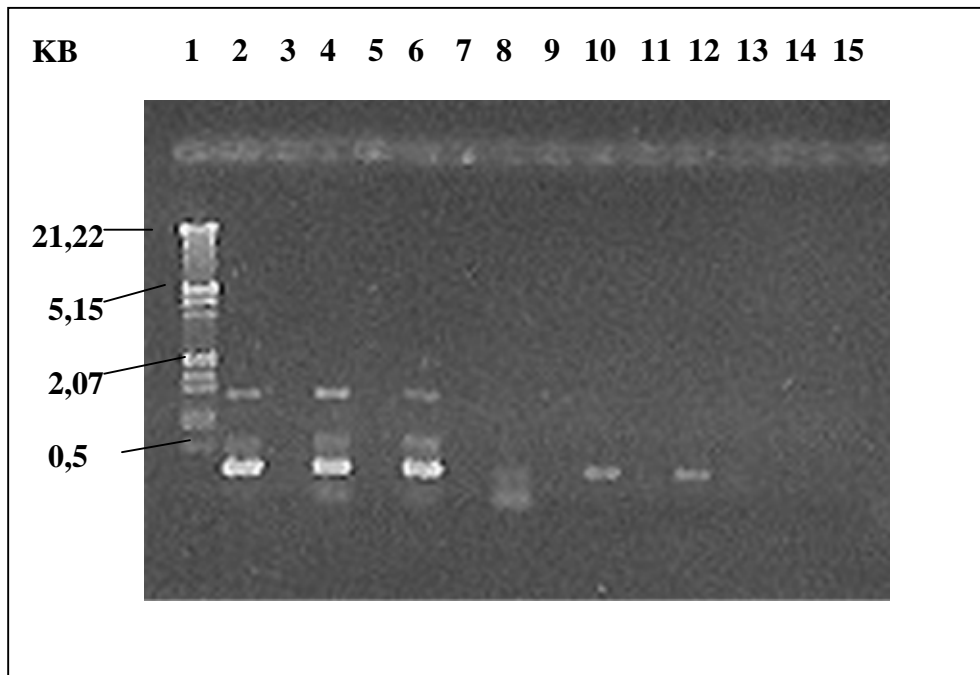


Abb 3.30: Expression von *vmu1* unter verschiedenen Magnesium-Konzentrationen. Die Kulturen wurden in EMM-Medium + 100 mM Magnesium (Spuren 2 und 8), EMM-Medium (Spuren 4 und 10) und EMM-Medium ohne Magnesium (Spuren 6 und 12) inkubiert, die RNA isoliert und ein Teil mit 0,1u DNase (Spuren 2, 4 und 6) und der andere mit 1u DNase (Spuren 8, 10 und 12) verdaut. Die Erststrangsynthese erfolgte mit der M-MuLV Reverse Transkriptase (Promega), wobei Proben mit dem Enzym (Spuren 2, 4, 6, 8, 10 und 12) und ohne Enzym (Spuren 3, 5, 7, 9, 11 und 13) behandelt wurden. In Spur 1 ist der λ -Marker *EcoRI/HindIII* geschnitten aufgetragen und eine Wasserkontrolle unter gleichen Konditionen, wie die Proben behandelt mit Enzym (Spur 14) und ohne Enzym (Spur 15).

In Abb. 3.30 sieht man in Spur 2, 4 und 6 eine Bande bei 360 bp. Dies entspricht dem Fragment, das man mit dem Primerpaar RT-O13-1for und RT-O13-2rev erwartet. Da in den Kontrollen ohne Reverse Transkriptase (Spuren 3, 5, 7, 9, 11 und 13) keine Bande zu sehen ist, ist eine Kontamination durch DNA auszuschließen. Damit ist bewiesen, dass unter allen drei Kulturbedingungen, viel Magnesium, normale Magnesium-Konzentration und kein Magnesium, *vmu1* exprimiert wird. In der Sanger-Datenbank (<http://www.sanger.ac.uk>) sind RNA-Expressions-Kontrollen von *vmu1* unter anderen Stressbedingungen aufgeführt, welche dieses Ergebnis bestätigen. Auch unter H_2O_2 -, Cadmium-, Sorbit- und MMS-Inkubation wird *vmu1* unverändert exprimiert. Lediglich bei Hitzeeinwirkung ist die Expression von *vmu1* etwas abgesenkt.

3.12 Visualisierung der Lokalisation des Magnesiums innerhalb der Zelle

Eine 20 ml YE-Vorkultur wurde bis zur Sättigung wachsen gelassen. Daraus wurde eine 200 ml EMM + 100 mM Magnesium Hauptkultur mit 2 % angeimpft und für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Kultur gewaschen und danach ein Teil davon erneut in EMM + 100 mM Magnesium, der andere in EMM ohne Magnesium überführt und ÜN inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Färbung mit dem Farbstoff, Magnesium GreenTM (Molecular probes). Dieser wurde nach Herstellerangaben verwendet und 5mM in DMSO gelöst eingesetzt. Die entsprechende Menge wurde zu den einzelnen Proben pipettiert und für 4 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben drei x mit bidestiliertem H₂O gewaschen und unter dem konfokalen Lasermikroskop TCS-SP der Firma Leica (Heidelberg) bei der Wellenlänge 506 nm analysiert. Mit diesem Farbstoff kann man intrazelluläres Magnesium anfärben und somit nachweisen.

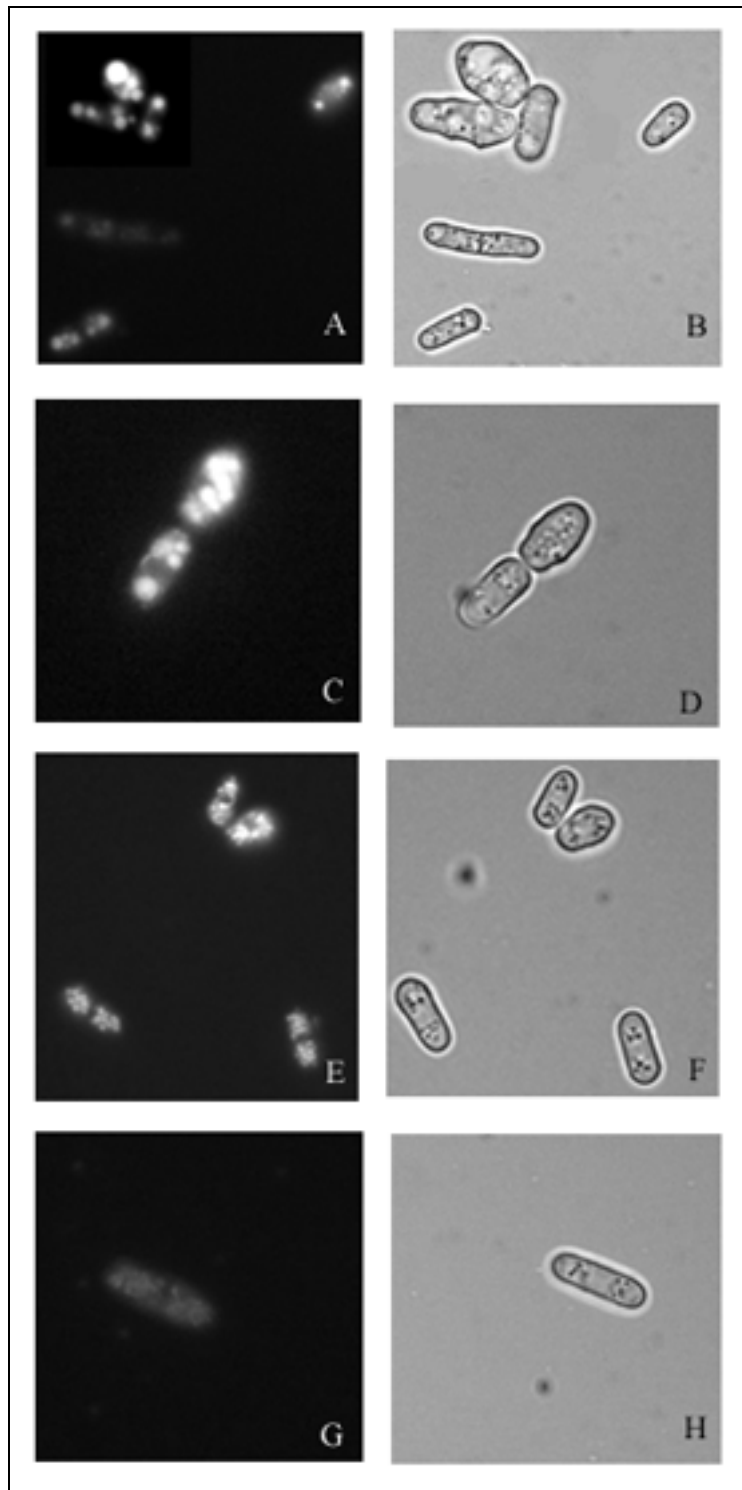


Abb. 3.31: Färbung mit Magnesium GreenTM. Der konfokale Teil: Zellen der Disruptanten 13-2 nach einer Inkubation von 24 h bei 28°C in EMM + 200 μM Mg^{2+} (A) und in EMM ohne Mg^{2+} (C). Zellen des Wildtyps 13-1 in EMM + 200 μM Mg^{2+} (E) und in EMM ohne Mg^{2+} (G). In der rechten Spalte sind die Transmissionsaufnahmen zu sehen: Zellen der Disruptanten 13-2 nach einer Inkubation von 24h bei 28°C in EMM + 200 μM Mg^{2+} (B) und in EMM ohne Mg^{2+} (D). Zellen des Wildtyps 13-1 in EMM + 200 μM Mg^{2+} (F) und in EMM ohne Mg^{2+} (H).

In Abb.3.31 sind die Aufnahmen nach der Magnesium-Färbung unter dem konfokalen Mikroskop dargestellt. Bild A und E zeigen Aufnahmen die nach ca. 24 h Inkubation mit 100 mM Magnesium entstanden sind. Die Bilder sehen recht ähnlich aus. Die Zellen haben Magnesium aufgenommen und in der Vakuole abgespeichert. Da *S. pombe* viele kleine Vakuolen bildet und verschiedene Arbeiten auf die Speicherung von Magnesium in der Vakuole hinweisen (Beeler et al., 1997; Zhang et al., 1997), handelt es sich bei den leuchtenden Kompartimenten sehr wahrscheinlich um Vakuolen. Vergleicht man nun Bild C und G miteinander, stellt man fest, dass die Zelle in C intensiver leuchtet, als die in G. In beiden Fällen wurden die Kulturen für 24 h in Magnesium-Mangelmedium angezogen, nachdem sie vorher für 24 h ausreichend Magnesium bekommen haben. Es scheint aber so, als hätte der Wildtyp 13-1 (Bild G) seine Vorräte verbraucht, während die Disruptante 13-2 (Bild C) ihre Speicher nicht leeren konnte. Dieses Ergebnis im Vergleich mit den Wachstums- und AAS-Studien zeigen jeweils das gleiche Bild; die Disruptante kann in Vakuolen gespeichertes Magnesium nicht mehr nutzen. Mit der Zerstörung des Leserahmens O13779 scheint ein Transportweg für Magnesium aus der Vakuole ins Zytosol eliminiert worden zu sein. Die Zelle kann bei extrazellulärem Magnesium-Mangel das intrazelluläre Gleichgewicht nicht mehr durch ihre Speicher ausgleichen.

3.13 Lokalisationsstudien

Eine Möglichkeit der Proteinlokalisierung ist der Einsatz von GFP (Green fluorescent protein) aus *Aequorea victoria* als Biosensor. Dafür wird ein Fusionsprotein aus dem zu lokalisierenden Protein und dem GFP gebildet und in den entsprechenden Organismus transformiert. Stämme die das GFP-Fusionsprotein exprimieren, können auf verschiedenen Wegen konstruiert werden. Eine Möglichkeit besteht darin, den entsprechenden Hefestamm mit einem multi-copy-Plasmid, welches das GFP-Fusionsprotein kodiert zu transformieren. In dieser Arbeit wurde das Plasmid pTG9 verwendet. Dieses Plasmid wurde schon weiter vorne, im Rahmen der Komplementationsstudien, vorgestellt (Abb. 3.24). Vor das GFP-Protein wurde der Leserahmen O13779 kloniert und zusammen bilden sie das Fusionsprotein GFP/O13779, welches im Vektor pTG9/O13779 inseriert. Dieses Konstrukt wurde in die Disruptante 13-2 transformiert, der Phänotyp der resultierenden Transformanten durch Tropftests untersucht und ein Plamidverlusttest durchgeführt (siehe 3.10 Komplementations-

studien). Verschiedene Transformanten wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb.3.32).

In Abb. 3.32 sieht man die Fluoreszenzaufnahme von Zellen, die das GFP-Gen besitzen. Das GFP kann durch Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt werden, was im Bild als grüne Reflektion erscheint. In den Zellen in Abb. 3.32 werden verschieden große, grüne, runde Strukturen in der Fluoreszenz angeregt. Dabei könnte es sich um die Vakuolen handeln. Dies muss durch eine Kolokalisation belegt werden.

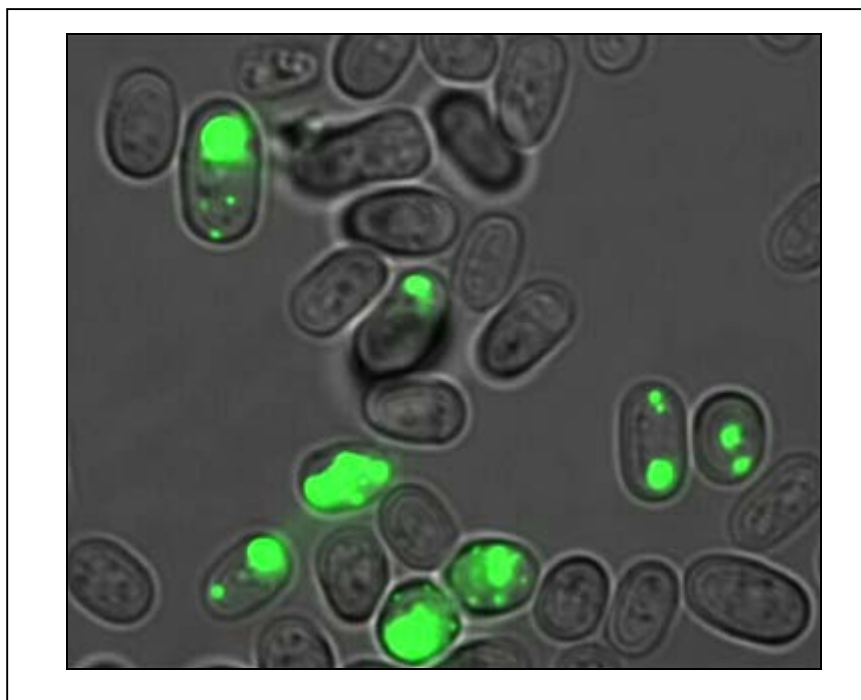


Abb. 3.32: Fluoreszenzmikroskopie des Stammes 13-2/pTG9O13779. Die Aufnahmen wurden mit dem Laser Scanning Mikroskop LSM 410 (Zeiss, Deutschland) gemacht. Die Anregungswellenlänge für das verwendete GFP betrug 488 nm und wurde mit einem Krypton-Argon-Laser FT488/543 erzeugt. Das emittierte Licht wurde mit einem Breitbandfilter BP510-525 nm detektiert, welcher spezifisch die GFP-abhängige Fluoreszenz durchlässt. (100 x 1,4 Ölobjektiv)

Um auszuschließen, dass es sich bei dem runden Kompartiment um den Zellkern handelt wurde als erstes eine DAPI-Färbung durchgeführt (siehe Abb. 3.33). Mit Hilfe eines UV-Lasers wurde bei 364 nm der Farbstoff DAPI angeregt und seine Fluoreszenz mit Hilfe eines BP450-490 nm Filter analysiert. Für diese Untersuchung wurde der betreffende Hefestamm in

EMM-Medium bis zu einer $OD_{595} = 1$ kultiviert und anschließend durch Zentrifugation vom Medium getrennt und zum Mikroskopieren eingesetzt. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Zellen mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol), nach der von Shaw et al. (1997) beschriebenen Methode, gefärbt.

Vergleicht man die beiden Bilder miteinander, wird deutlich, dass die durch GFP angeregte Region eine andere ist, als die, durch den UV-Laser angeregte DAPI-Färbung. Das Protein VMU1p ist nicht im Zellkern lokalisiert.

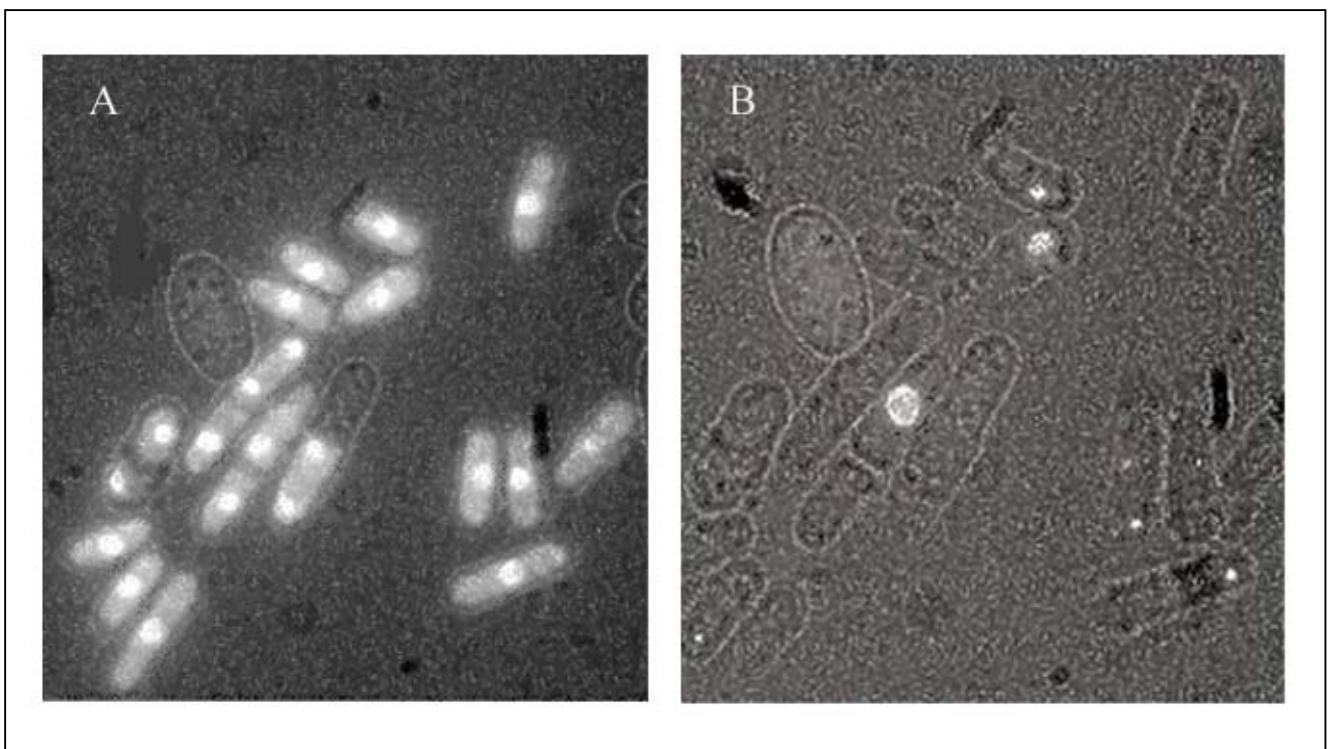


Abb.3.33: Kolokalisationsversuch durch DAPI-Färbung des Stammes 13-2/pTG9O13779. In Bild A ist die Anregung der DAPI-Färbung in den Zellen durch einen UV-Laser bei 364nm und in B die Fluoreszenz mit Hilfe eines BP450-490 nm Filters. (100 x 1,4 Ölobjectiv)

Als nächstes sollten die Vakuolen untersucht werden. Die Zellen wurden mit FM4-64 (Molecular Probes/USA), einem speziellen Farbstoff für Vakuolenmembranen von Hefezellen, gefärbt. Um die Rotfluoreszenz des Vakuolen-Farbstoffs zu zeigen, wurde ebenfalls bei 488 nm angeregt, das emittierte Licht diesmal aber durch einen BP575-640 nm Filter geleitet. Die zur Färbung eingesetzten Zellen wurden bei 3500 U/min zentrifugiert und für 30 min bei

30°C mit dem Farbstoff inkubiert. Danach wurde wieder zentrifugiert, 2 x mit frischem EMM-Medium gewaschen und für weitere 30 min bei 30°C inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 3500 U/min wurden die Zellen in frisches Medium resuspendiert und für die Mikroskopie verwendet.

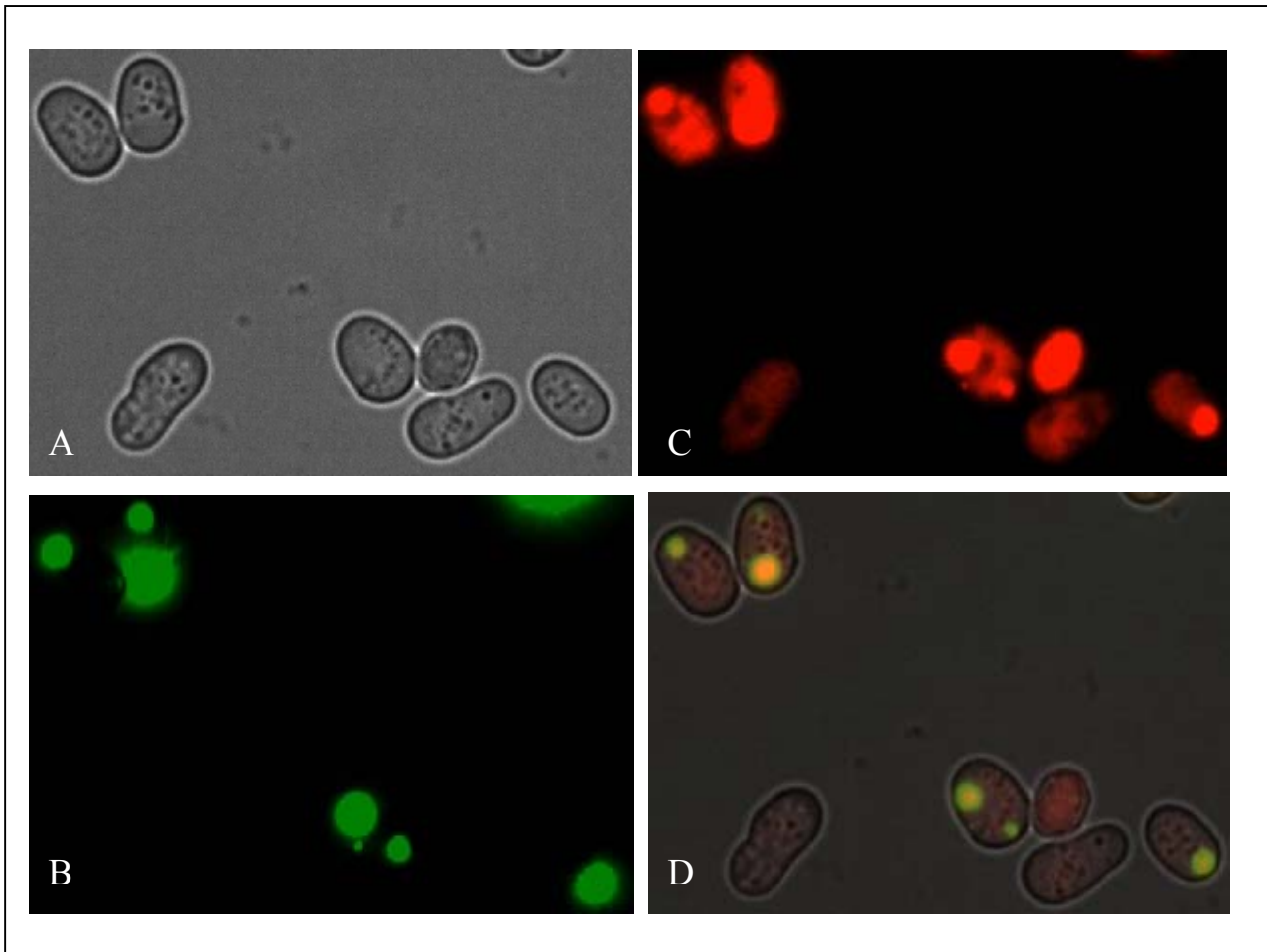


Abb. 3.34: Färbung der Vakuolen mit FM4-64. Zellen des Stammes 13-2/pTG9O13779 wurden mit dem Laser Scanning Mikroskop LSM 410 (Zeiss, Deutschland) durch verschiedene Filter photographiert. In Bild A sind die Zellen in der Transmissionsaufnahme, in Bild B wurde das GFP mit der Wellenlänge 488 nm angeregt und mit dem Breitbandfilter BP510-525 nm detektiert, in Bild C wurde mit der gleichen Wellenlänge angeregt und das Licht durch den BP575-640 nm Filter geleitet und in Bild D wurden die Bilder B und C übereinander gelegt. (100 x 1,4 Ölobjektiv)

Die Kolokalisation der GFP-Fluoreszenz mit dem Vakuolenfarbstoff FM4-64 wird in Abb. 3.34 deutlich. Allerdings sieht man in Bild C, dass neben der stark rot leuchtenden Struktur, die mit der GFP-Fluoreszenz übereinstimmt, im Hintergrund etwas weniger stark ein

feines Netz von „Kreisen“ angeregt wird. Die Anregung des GFPs beschränkt sich nur auf zwei runde Strukturen pro Zelle. Der Farbstoff FM4-64 färbt die Vakuolenmembranen in *S. pombe* an (Vida und Emr, 1995). Die Färbung der gesamten Vakuole könnte daher kommen, dass der Vakuolenfarbstoff aus den Zellen nicht genügend entfärbt wurde, oder von den Vakuolen abgebaut und in diese eingelagert wurde. Gleiches kann auch für die mit GFP angeregten Strukturen gelten. Auch sieht man durch diese Art von Mikroskopie auf die Zellen darauf. Stark leuchtende Vakuolenmembranen können so den Eindruck erwecken, als würde die gesamte Vakuole leuchten. Selbst wenn es sich hier nicht um die Membranen der Vakuolen handelt, so doch auf jeden Fall um das Vakuolenlumen.

In Abb. 3.35 ist eine Zusammenstellung von Bildern aus unterschiedlichen Versuchen dargestellt, welche die Annahme, dass VMU1p in der Vakuolenmembran lokalisiert ist, unterstützen sollen. Bild A zeigt die Färbung des intrazellulären Magnesiums der Disruptanten 13-2. Dieses Bild stammt aus dem Versuch zur Lokalisation von Magnesium in der Zelle, der in Abschnitt 3.12 besprochen wurde. Es zeigt, dass Magnesium intrazellulär in den Vakuolen lokalisiert ist.

Von *S. pombe* ist bekannt, dass die Hefe viele kleine Vakuolen bildet, was in Abb. 3.35 D, E und F dargestellt ist. In Bild D und F wurde die Vakuolenmembran mit dem Farbstoff FM4-64 angefärbt. Sehr schön sind die vielen kleinen Vakuolen zu sehen. In Bild E (Aufnahme von Dr. Martin Zimmermann) sieht man D18h⁻ Zellen, die mit einem GFP-Glutathionsynthetase-Fusionsprotein transformiert wurden. Die Glutathionsynthetase (GSH) ist ein zytoplasmatisches Protein und befindet sich nicht in den Vakuolen. Auch hier sieht man sehr schön die Struktur der Vakuolen, die als „Löcher“ im sonst grün fluoreszierenden Zytoplasma erscheinen.

In Bild B sind Zellen mit dem GFP-VMU1 Fusionsprotein unter Fluoreszenz dargestellt. Vergleicht man A und B miteinander, sieht man, dass beide eine recht ähnliche Struktur aufweisen. Bild C zeigt erneut Zellen mit dem Fusionsprotein zu einem späteren Zeitpunkt, aber unter gleichen Bedingungen aufgenommen. Diesmal sind mehrere kleine anstatt wenige große Strukturen zu sehen. Vergleicht man Bild C mit D, E und F, könnten die runden Strukturen aus C wie ein Puzzle in die „Löcher“ aus D, E und F passen. Dies ist auch in Bild D zu sehen. Dort ist eine Zelle des Stammes 13-2/pTG9O13779, die mit der Wellenlänge 488 nm angeregt und durch die Breitbandfilter BP510-525 nm und BP575-640 nm photographiert

und übereinander gelegt wurden zu erkennen. Das grüne Rund passt genau in die Lücke des roten Rasens. Auch ist in diesem Bild recht gut zu sehen, dass nicht die ganze Struktur gleichmäßig grün gefärbt ist, sondern an den Rändern etwas stärker. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass es sich bei VMU1p wirklich um ein Membranprotein handelt.

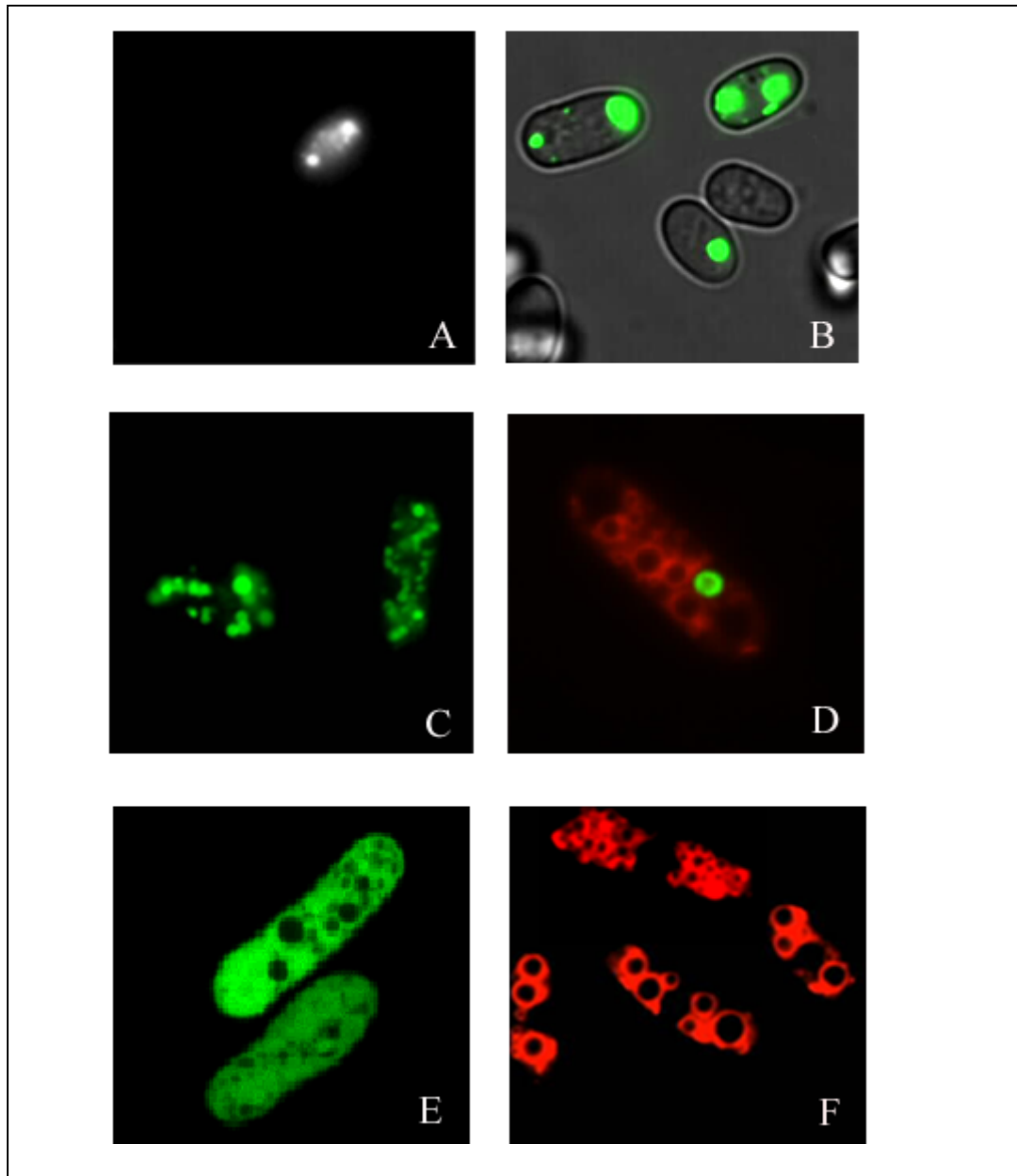


Abb. 3.35: Vergleich zwischen verschiedenen Färbungen. Bild A zeigt die konfokale Aufnahme der Disruptanten 13-2 nach Färbung mit Magnesium GreenTM. Bild B und C zwei verschiedene Aufnahmen des Stammes 13-2/pTG9O13779 mit dem Laser Scanning Mikroskop LSM 410 unter Anregung von GFP. Für Bild D und F wurde der gleiche Stamm und das gleiche Mikroskop verwendet, nur dass die Zellen mit dem Farbstoff FM4-64 angefärbt wurden. In Bild D sieht man die Überlagerung der GFP-Anregung der FM4-64 gefärbten Zellen. Das Bild E wurde von Dr. Martin Zimmermann aufgenommen und dieser Arbeit zum Vergleich freundlichst zur Verfügung gestellt. Unter Fluoreszenz wurden Zellen des Stammes D18h-::GSH-GFP photographiert. (100 x 1,4 Ölobjektiv)

Die Abb. 3.35 lässt vermuten, dass VMU1p ein Protein der Vakuolenmembran ist. Um dieses Ergebnis eindeutig zu belegen, wurden weitere Transformationen durchgeführt. Diesmal

erfolgte eine integrative Transformation in den Wildtyp 13-3. Erik Noetzel sollte im Rahmen seines Forschungspraktikums den Stamm 13-3 mit dem Vektor pFA6a-(GFPS65T)-kanMX6 (Wach et al., 1997) transformieren. Neben dem Kan-Modul lag das Gen des grünen fluoreszierenden Proteins (GFP) mit einer Punktmutation in Position 65 (S65T) im Vektor vor. Ein nahtloser Übergang zwischen dem GFP und O13779 sollte eine genaue Lokalisation in der Zelle gewährleisten. Dabei sollte der Leserahmen C-terminal, nach der Methode von Bähler et al. (1998), vor das GFP-Protein kloniert werden. Leider führten diese Bemühungen nicht zum Ziel. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen, die Erik Noetzel anfertigte sahen denen mit dem Stamm 13-2/pTG9O13779 recht ähnlich. Nur ließ die Fluoreszenz innerhalb sehr kurzer Zeit stark nach. Auch erhielt er in der PCR-Kontrolle negative Ergebnisse und konnte das Insert mit dem GFP-Fusionsprotein nicht nachweisen.

Einen weiteren Versuch startete der Forschungspraktikant Fabian Seyfried in seiner Arbeit. Er setzte den Vektor pFA6a-kanMX6-P81nmt-GFP ein. Hier wurde das GFP an den N-Terminus des Leserahmens O13779, nach der Methode von Bähler et al. (1998), kloniert, und anschließend in den haploiden Wildtypstamm 972⁻ und den diploiden Stamm 130x131 transformiert. In diesem Fall wurde die Expression von GFP unter die Kontrolle des nmt1-Promotors gestellt. Doch auch in dieser Arbeit konnte VMU1p nicht genau lokalisiert werden. Nur 10% des Stamms 972⁻::kan^R-GFP leuchteten unter Fluoreszenz und das nur sehr schwach. Somit konnte eine sichere Aussage über die Lokalisation von VMU1p auch diesmal nicht getroffen werden. Allerdings konnten einzelne Strukturen erkannt werden, welche stark denen von Vakuolen glichen. Auch nahm erneut die Fluoreszenz in sehr kurzer Zeit ab.

Da die Ergebnisse in Erik Noetzels Arbeit den Ergebnissen in Fabian Seyfrieds Arbeit glichen, wurde angenommen, dass in beiden Arbeiten entweder das Insert falsch integrierte oder eine Exzision der jeweiligen Kasette erfolgte. Aus diesem Grund wurde ein Southernblot durchgeführt, indem die richtige Integration nachgewiesen werden sollte. Das Ergebnis deutete bei vielen Transformanten auf eine falsche Integration hin. Einige wenige waren darunter, bei denen die richtige Insertion erfolgte. Diese Stämme wurden auf ihren Kassettenverlust hin untersucht. Die Ergebnisse dazu sind in Kapitel 3.15 beschrieben.

Ein weiterer Versuch ein GFP-Fusionsprotein herzustellen, erfolgte mit dem Vektor pFA6a-(GFPS65T)-kanMX6, wobei zwischen GFP und VMU1p ein Gly-Ala-Link gesetzt wurde (Abb. 3.36).

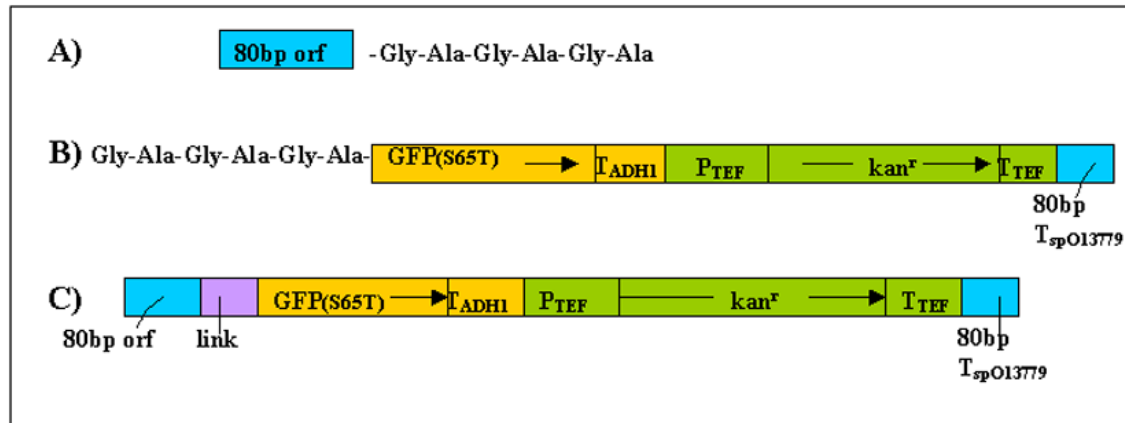


Abb. 3.36: GFP-Link-Kassette. In Bild A ist schematisch der Leserahmen O13779 mit dem Gly-Ala-Anhang, in Bild B der Vektor pFA6a-(GFPS65T)-kanMX6 mit link und in Bild C die gesamte Kasse dargestellt.

Zuerst wurde mit den Primern O13-link-fwd und O13-link-rev der gesamte Leserahmen O13779, bis auf das Stop-Kodon, aus Wildtyp-DNA und an das 3'-Ende der Gly-Ala-Link amplifiziert (Abb.3.36 A). Gleichzeitig wurde mit den Primern PFA-link-fwd und KAN-GFP-rev das in Abb.3.36 B schematisch dargestellte Fragment aus Plasmid-DNA des Vektors pFA6a-(GFPS65T)-kanMX6 gebildet. Beide PCR-Produkte wurden mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim) aufgereinigt und anschließend für eine gemeinsame PCR, mit den Primern O13-lik-fwd und KAN-GFP-rev, als Template eingesetzt. Das neue PCR-Produkt ist in Abb. 3.36 C dargestellt und wurde aufgereinigt für die Transformation in die Wildtyp-Stämme 972⁻ und D18h⁻ eingesetzt.

Die resultierenden Transformanten waren leider alle negativ und fluoreszierten nicht.

Für eine genauere Visualisierung von VMU1p wurde eine immunchemische Färbung durchgeführt. Dafür wurden Zellen des Wildtypstammes D18h⁻ als erstes mit einem HA-Tag versehen. Auch hier wurde wieder den Angaben von Bähler et al. (1998) gefolgt, allerdings wurde diesmal mit dem Vektor pFA6a-3HA-kanMX6 (Longtine et al., 1998) gearbeitet. Mit

den Primern KAN-GFP-for und KAN-GFP-rev wurden das ca. 2,1 kB große Fragment, welches in Abb. 3.37 dargestellt ist, mit dem Vektor als Template, amplifiziert.

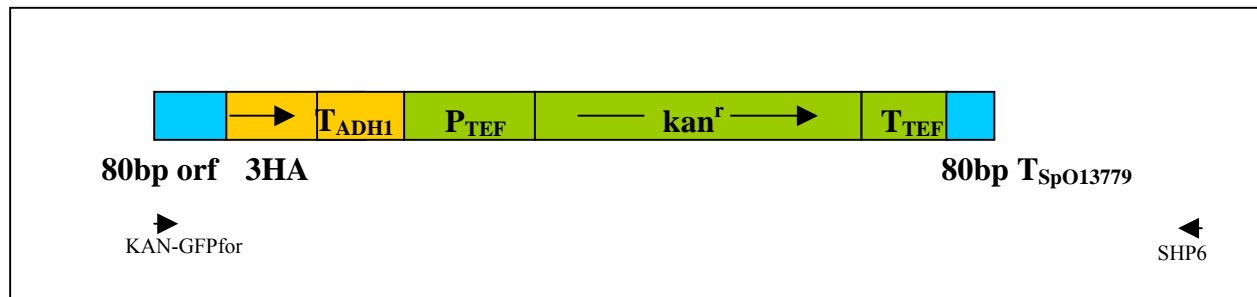


Abb. 3.37: Schematische Darstellung der HA-Kassette. In blau sind Sequenzen des *S. pombe* Genoms gekennzeichnet. Vorne befinden sich die letzten 80 Basenpaare des Leserahmens O13779 ohne das Stop-Kodon und hinten die ersten 80 Basenpaare aus der Terminatorregion, welche auf den Leserahmen folgt. In gelb ist der HA-Tag und in grün das kan^r -Modul markiert.

Das PCR-Produkt wurde gereinigt und in den Stamm D18h⁻ transformiert. Über die amplifizierten Sequenzen aus *S. pombe* (in blau gekennzeichnet) kann die HA-Kassette in das Genom der Hefe integrieren. Transformanten, die auf Geneticin wuchsen, wurden mittels PCR mit den Primern KAN-GFP for und SHP6 (siehe Abb. 3.37) kontrolliert. Der Primer KAN-GFP for markiert die ersten 20 bp der HA-Kassette und der Primer SHP6 setzt 700 bp hinter der Kassette an, so dass ein Fragment von 2,8 kB amplifiziert wurde (siehe Abb. 3.38).

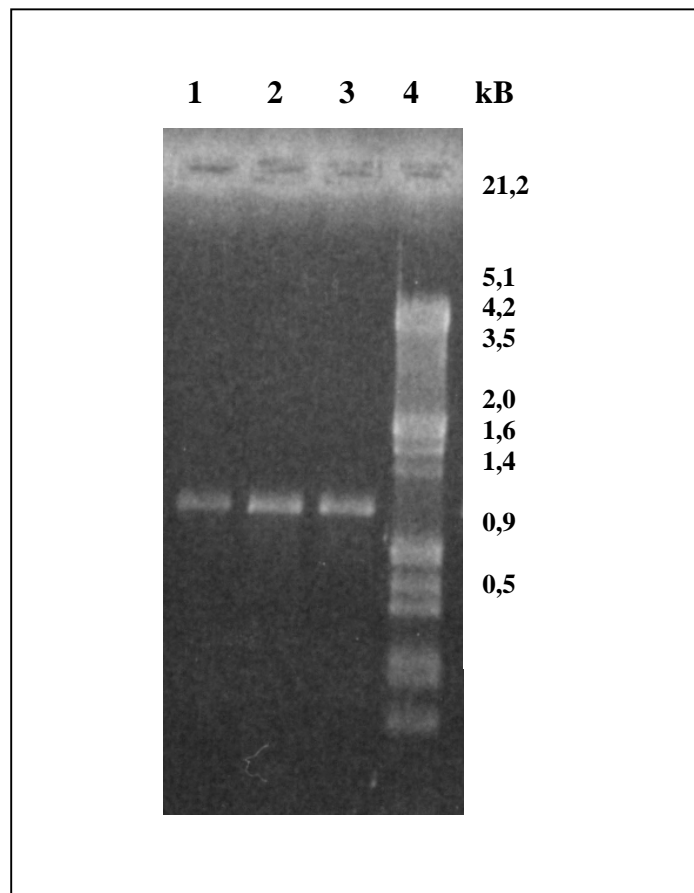


Abb.3.38: Überprüfung der PCR-Produkte der Transformanten, die mit der HA-Kassette transformiert wurden. Spur 1 stellt das Produkt aus isolierter DNA der Transformante D18h::3HA-1, Spur 2 von D18h::3HA-2 und Spur 3 von D18h::3HA-3, welche mit den Primern KAN-GFPfor und SHP6 amplifiziert wurden. Spur 4 zeigt den λ -Marker *EcoRI/HindIII* geschnitten.

Stämme, in denen dieses Fragment amplifiziert werden konnte, wurden in der log – Phase geerntet und auf APES (3-Aminopropyl-Triethoxy-Silane) beschichteten Objektträgern verteilt. Die Zellen wurden in kaltem Aceton fixiert, in TBST und TBS je 5 min und in TBS + 3% BSA 10 min inkubiert. Sodann wurde der Fluorescein konjugierte monoklonale Antikörper HA-Tag 262K (Cell Signaling Technology) aufgetragen und nach 5 h Inkubation, im Dunklen, wurden die Zellen mit TBST und TBS gewaschen. Nachdem sie mit Kaisers Glycerin-gelatine beschichtet wurden konnten sie unter dem konfokalen Mikroskop, Leica DM IRBE, angeschaut und photographiert werden. Durch die Fluorescein-Konjugation des Antikörpers können Zellstrukturen, welche die HA-Sequenz besitzen, unter dem Mikroskop bei einer Wellenlänge von 490 nm angeregt und somit sichtbar gemacht werden.

Die Abb. 3.39 zeigt verschiedene Aufnahmen einer Zelle. In Bild A ist die Zelle im konfokalen Bereich zu sehen und die Ansicht ist von oben auf die Zelle darauf. Deutlich sind vier Erhebungen sichtbar. Die ganze Zelle leuchtete sehr stark. In Bild B wurde wieder eine weitere Aufnahme im konfokalen Modus gemacht. Diesmal wird die Zelle in einer anderen Ebene gezeigt. Dort, wo vorher die Erhebungen waren, sieht man jetzt vier „Löcher“. Bild C zeigt die Transmissionsaufnahme der Zelle. In Bild A sieht man stark leuchtende Erhebungen und, einige Ebenen tiefer, an der gleichen Stelle Löcher, welche von einem intensiven Schein umgeben sind. Dies bestätigt die Vermutung, dass die leuchtenden Strukturen in der Aufsicht so stark fluoreszierten, dass es so aussah, als würde die ganze Vakuole leuchten. In Wirklichkeit ist es doch die Vakuolenmembran, die angeregt wird. Damit zeigen alle Ergebnisse dieser Arbeit, dass das Proteins VMU1p in der Vakuolenmembran lokalisiert ist.

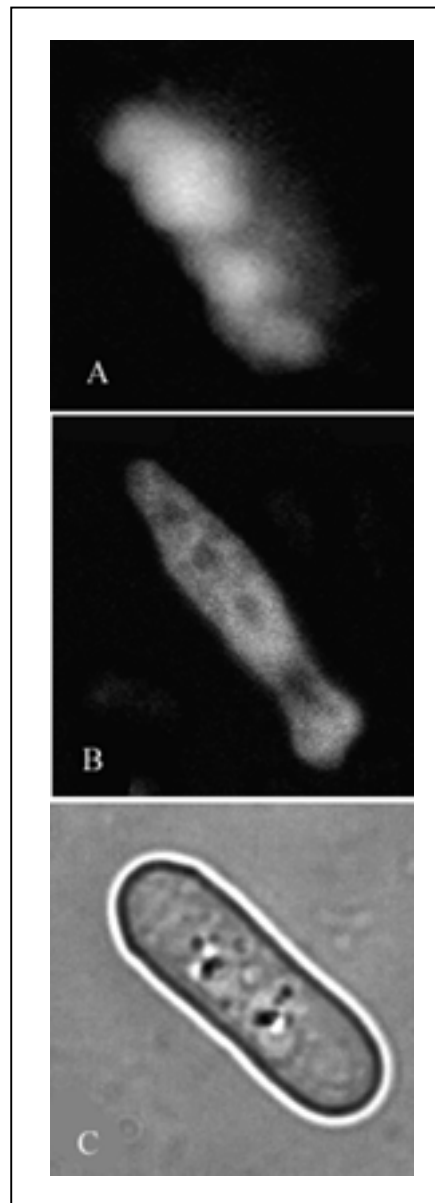


Abb.3.39: D18h⁺::3HA-1 im konfokalen Mikroskop. Bild A und B sind Aufnahmen im konfokalen Bereich. Dieselbe Zelle wurde bei zwei verschiedenen Schnitten photographiert. Bild C zeigt die gleiche Zelle in einer Transmissionsaufnahme. (100 x 1,4 Ölobjektiv)

3.14 Warum verliert die Zelle die Transformationskassette?

Während der gesamten Arbeit traten immer wieder Probleme bei Veränderungen des ORFs O13779 durch Insertionskassetten auf. Dabei wurde wahrscheinlich Fremd-DNA von *S. pombe*-Zellen aus dem Genom entfernt oder an falscher Stelle ins Genom integriert. Dies sollte mit der folgenden Testreihe näher untersucht werden. Die Transformanten

972-::kan-nGFP1 und 972-::kan-nGFP2 wurden mit dem Stamm 46a14 verglichen. In diesem Stamm ist das GSH2-Gen disruptiert. Es wurde in einer anderen Arbeit erstellt (Wunderlich, 1999). Einzelne Kolonien, aller drei Stämme, wurden willkürlich ausgesucht und immer im Wechsel auf Vollmedium und anschließend auf Selektionsmedium ausplattiert.



Abb. 3.40: Untersuchung des Kassettenverlustes der Stämme 972-::kan-nGFP1 (linke Spalte) und 972-::kan-nGFP2 (rechte Spalte). Die beiden Stämme wurden abwechselnd auf Selektionsmedium und Vollmedium ausplattiert und 5 Tage bei 28°C inkubiert. Die Generationen werden von oben nach unten gesehen jünger.

Wie die Abb. 3.40 zeigt, verlieren beide Stämme nach nur einmaligem Ausplattieren auf Vollmedium die Insertionskassette und damit den Geneticinmarker und ihre Fähigkeit auf Medium mit Geneticin zu wachsen. Dabei scheint der Stamm 972-::kan-nGFP2 sein Insert wesentlich einfacher zu verlieren als der andere.

In Abb. 3.41 ist die Fortsetzung des Versuchs mit dem Stamm 972-::kan-nGFP1 dargestellt.

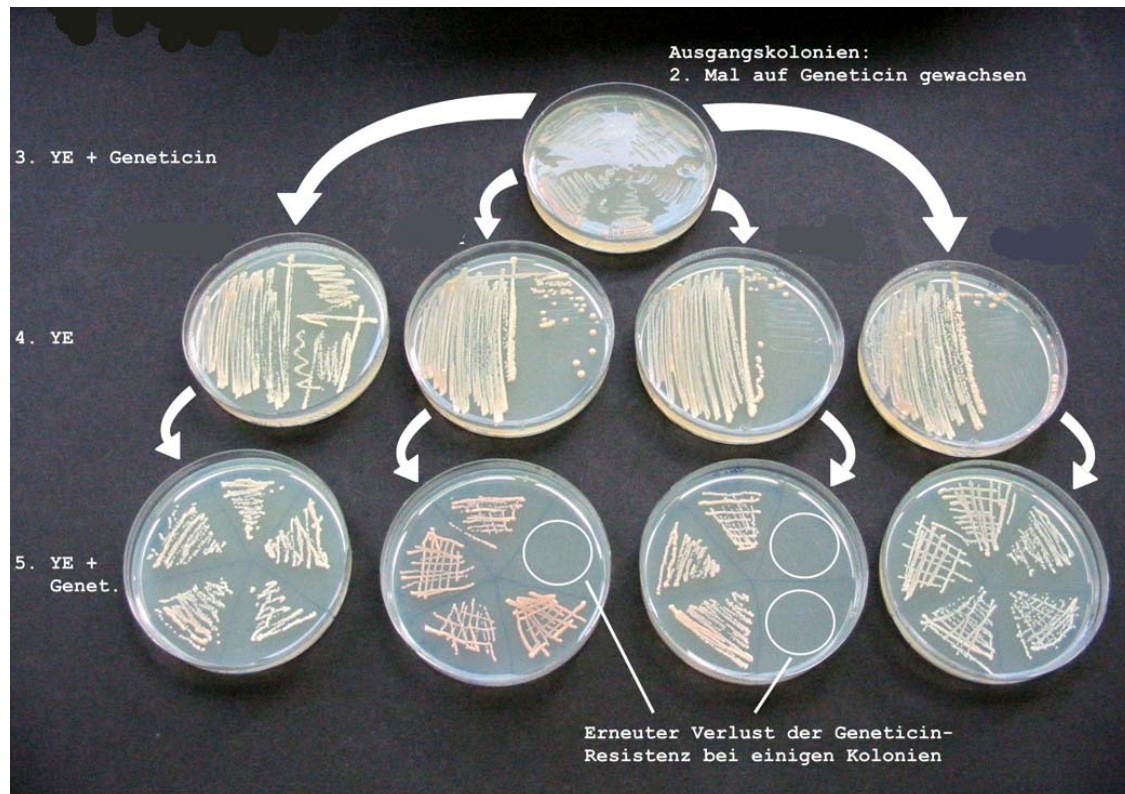


Abb. 3.41: Untersuchung des Kassettenverlustes der nächsten Generation der Stämme 972-::kan-nGFP1. Der Stamm wurde abwechselnd auf Selektionsmedium und Vollmedium ausplattiert und 5 Tage bei 28°C inkubiert. Die Generationen werden von oben nach unten gesehen jünger.

Abb. 3.41 zeigt, dass auch in der folgenden Generation wieder Insertionskassetten in einigen Kulturen verloren gegangen sind. Eigentlich sollten Kassetten, welche in einer integrativen Transformation eingesetzt werden nicht direkt wieder verloren gehen. Normalerweise werden die Kassetten fest ins Genom des Organismus integriert und müssen nicht mehr auf Selektionsmedium gehalten werden. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass das Plasmid nicht ins *S. pombe*-Genom integriert wurde, sondern sich autonom repliziert.

Vielleicht ist aber auch das Anfügen eines anderen Proteins oder die Zerstörung des Leserahmens O13779 unvorteilhaft für die *S. pombe*-Zelle. Da aus dem ORF selber keine Sequenzen verändert oder entfernt wurden, sondern nur ein fremdes DNA-Fragment an den Anfang oder das Ende eingefügt wurde, kann es sein, dass die Zelle die Fremd-DNA ausschneidet und der ursprüngliche Zustand des Genoms dadurch wieder hergestellt wird. Als Vergleich wurde mit dem Stamm 46a14 (Δ GSH2) der gleiche Versuch durchgeführt (Abb. 3.42). Es wurde genau wie mit den beiden anderen Stämmen zuvor gearbeitet.

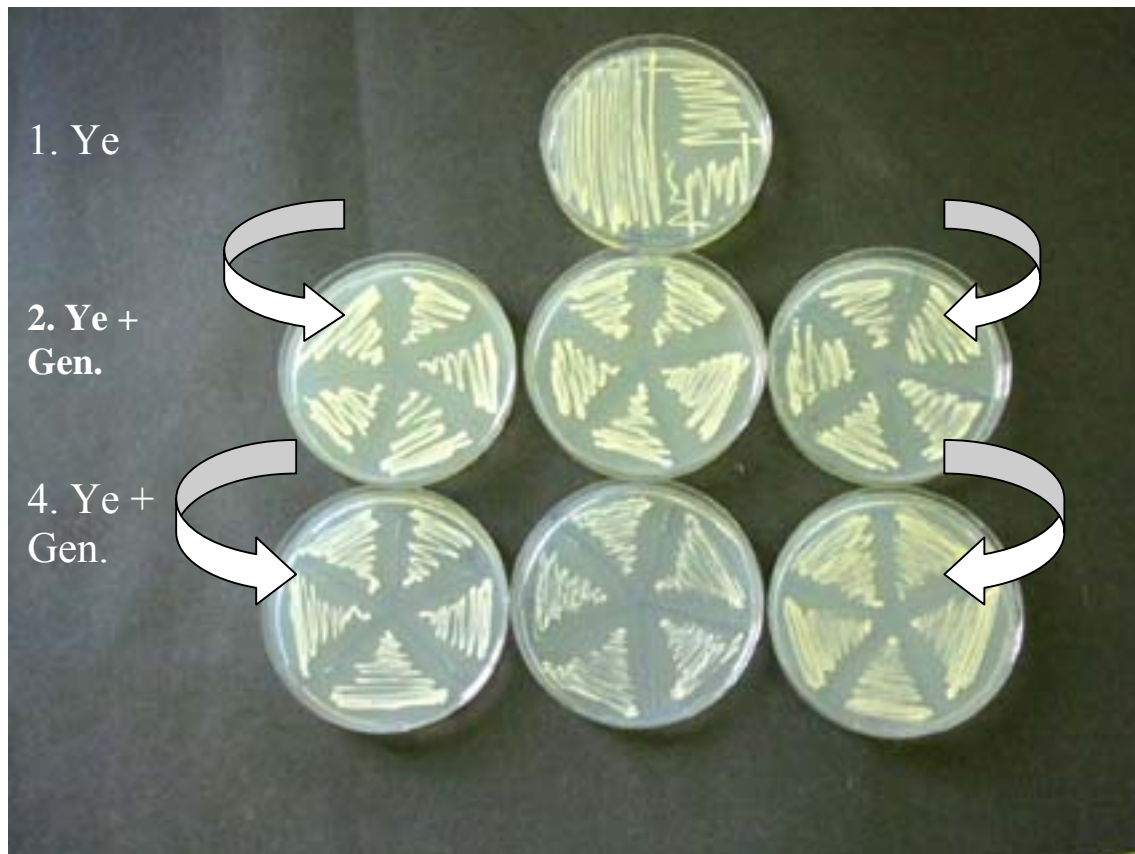


Abb. 3.42: Untersuchung des Kassettenverlustes des Stammes 46a14. Der Stamm wurde abwechselnd auf Selektionsmedium und Vollmedium ausplattiert und 5 Tage bei 28°C inkubiert. Die Generationen werden von oben nach unten gesehen jünger.

In Abb. 3.42 sieht man, dass in dem Stamm 46a14 über mehrere Generationen keine Insertionskassette verloren ging. Dies zeigt, dass Stämme, die mit einer Insertionskassette integrativ transformiert wurden, über einen sehr langen Zeitraum stabil sind.

Der eher ungewöhnlich hohe Kassettenverlust, der bei den Stämmen 972-::kan-nGFP1 und 972-::kan-nGFP2 demonstriert wurde, könnte ein Grund für die geringe Ausbeute an stabilen Transformanten sein.

4 Diskussion

4.1 VMU1p ist ein Magnesium-Transportprotein

VMU1p wird als 71,2 kDa großes, hypothetisches Membranprotein in der Datenbank beschrieben, welches Homologien zur CorA-Proteinfamilie und große Ähnlichkeit zu Schwermetall-Resistenzproteinen in der Hefe aufweist (Wood et al., 2002). Es wird in der Datenbank unter dem ORF O13779 geführt. Die CorA-Proteinfamilie stellt eine Gruppe von Proteinen zur Aufnahme und Transport von Magnesium dar, wozu unter anderem das CorA aus Bakterien, MRS2p, ALR1p und ALR2p aus *S. cerevisiae* zählen (Silver, 1969; Nelson und Kennedy, 1971; Kehres et al., 1998; MacDiarmid und Gardner, 1998; Bui et al., 1999).

Charakteristisch für alle Magnesium-Transporter ist die stark konservierte Sequenz GMN (Smith et al., 1993; Snavely et al., 1989a; MacDiarmid und Gardner, 1998; Bui et al., 1999; Shaul et al., 1999; Zsurka et al., 2001). VMU1p besitzt zwei Transmembrandomänen, welche am C-Terminus lokalisiert sind. An dem Ende der ersten Domäne befindet sich das Motiv GMN. Diese Struktur stimmt mit denen der Magnesiumtransporter in *S. cerevisiae* überein, wo ebenfalls zwei hydrophobe Regionen am C-terminalen Ende identifiziert wurden. Auch dort befindet sich das konservierte Motiv, hier allerdings (Y/F)GMN, am Ende der ersten Domäne (MacDiarmid und Gardner, 1998; Bui et al., 1999). Beim Menschen wurde ebenfalls das GMN-Motiv am Ende der ersten Transmembrandomäne lokalisiert (Zsurka et al., 2001). Diese Domänen scheinen somit maßgeblich für die Magnesium-Transportfunktion verantwortlich zu sein. Dies konnte durch Mutagenese-Versuche des CorA GMN-Motivs bewiesen werden (Szegedy und Maguire, 1999).

Sequenzvergleiche zwischen VMU1p, CorA aus *E. coli*, ALR1p, ALR2p und MRS2p aus *S. cerevisiae* ergaben, dass das Pombe-Protein eine Übereinstimmung von 35% mit den Proteinen ALR1p und ALR2p zeigt. Der Vergleich mit den beiden anderen Proteinen zeigte nur eine 6% ige Kongruenz. Dies stimmt mit einigen anderen Arbeiten überein. In diesen Arbeiten wurde festgestellt, dass bis auf das stark konservierte Motiv, kaum Sequenz-identitäten zwischen bakteriellen und eukaryontischen Magnesium-Transportproteinen bestehen. Die Bakterientransporter besitzen drei Transmembrandomänen und die vieler

eukaryontischer Organismen nur zwei (MacDiarmid und Gardner, 1998; Bui et al., 1999; Smith et al., 1993; Zsurka et al., 2001).

Dieses Ergebnis bestätigt die hypothetische phylogenetische Untersuchung. Dabei scheint VMU1p am nächsten mit den ALR-Proteinen aus *S. cerevisiae* verwandt zu sein und nur entfernt mit MRS2p und CorA. Auf jeden Fall besitzt VMU1p charakteristische Kennzeichen, welche typisch für eukaryontische Magnesium-Transportproteine sind, wie zwei Transmembran-Domänen, zwischen denen das stark konservierte GMN-Motiv lokalisiert ist.

4.2 Vergleich von VMU1p mit anderen Magnesium-Transportproteinen

Die Transformation mit der KANO13779-Disruptionskassette wurde in dem diploiden Stamm 130x131 mit Erfolg durchgeführt. Die Sporen von zwanzig verschiedenen Asci wurden einzeln auf Selektionsmedium oder Vollmedium angezogen und anschließend auf ihre Phänotypen hin untersucht. Der *his3*-Marker zeigte eine Aufspaltung von $2^+ : 2^-$. Damit kosegregierte ein eingeschränktes Wachstum in Magnesium-Mangelmedien, sowohl auf festen, wie auch in flüssigen Medien. Keine Wachstumsprobleme zeigten die Disruptanten im Medium mit normalem Magnesiumgehalt. Schon im EMM-Medium konnten sie normal wachsen und zeigten keinen Unterschied zu Wildtyp-Stämmen. Auch war das Magnesium eindeutig der limitierende Faktor, da eine Rücküberführung in EMM-Medium nach Magnesium-Mangel wieder zum Wachstum der Zellen führte.

ALR1p in *S. cerevisiae* ist ein Plasmamembranprotein, welches Magnesium in die Zelle transportiert. Unter normalen Bedingungen konnten *alr1*-Mutanten nur noch sehr schlecht wachsen, da sie Magnesium schlechter aus externen Quellen mobilisierten. Dieser Mangelzustand wurde durch hohe Magnesium-Mengen im Medium behoben (MacDiarmid und Gardner, 1998; Graschopf et al., 2001). Das andere Protein zur Aufnahme von Magnesium in die Zelle von *S. cerevisiae*, ALR2p, ist nicht wichtig für das Wachstum, kann aber die *alr1*-Mutanten kompensieren (MacDiarmid und Gardner, 1998).

MRS2 in *S. cerevisiae* ist ein Magnesium-Transportprotein der inneren mitochondrialen Membran. Bei Disruptanten sank die Konzentration von Magnesium in den Mitochondrien und bei Überexpressionen stieg sie (Bui et al., 1999).

Verglichen mit den Aufnahmesystemen anderer Organismen zeigt das *S. pombe*-Protein, VMU1p, ein anderes Bild. Es scheint sich dabei nicht um ein Protein der Plasmamembran zu handeln, da Stämme mit disruptiertem Leserahmen in Medium mit normaler Magnesium-Konzentration wuchsen und keinen Unterschied zu Wildtyp-Stämmen aufwiesen. Die *alr1*-Mutanten hingegen, benötigten eine zusätzliche Menge an Magnesium, um in Vollmedium normal wachsen zu können. Bei Magnesium-Mangel allerdings wurde das Wachstum der VMU1p-Disruptanten sehr stark eingeschränkt. Dies deutet auf eine Lokalisation des Proteins in einem intrazellulären Kompartiment hin. Unter Mangelbedingungen können die Speicher nicht mehr geleert werden. Die Disruptanten sind auf extrazelluläres Magnesium angewiesen.

Des Weiteren wurde bei VMU1p eine erhöhte Zinksensibilität einhergehend mit dem *his3*-Marker beobachtet. Die Kontrolle auf andere Schwermetalle erbrachte keine weiteren Unterschiede zwischen den Stämmen mit disruptiertem- und Wildtyp-Leserahmen.

Bei CorA handelt es sich um ein Magnesium transportierendes Protein der Bakterien. In *S. enterica* serovar typhimurium transportiert es neben Magnesium noch Kobalt und Nickel. Allerdings scheint dies weniger der Aufnahme der Kationen, als mehr der Detoxifikation zu dienen (Hmiel et al., 1986, 1989). Bei *corA*-Mutanten wurde eine erhöhte Co- und Ni-Resistenz festgestellt (Smith und Maguire, 1998). Zudem ist dieses Protein zusätzlich am Magnesium-Efflux beteiligt (Snively et al., 1989a). Lokalisationsstudien erbrachten außerdem, dass es am häufigsten unter Magnesium-Mangelbedingungen exprimiert wurde. Auch bei ALR1p aus *S. cerevisiae* wurden neben der Funktion eines Magnesium-Transporters noch andere Transportereigenschaften identifiziert. Dieses Protein ist verantwortlich für eine hohe Resistenz der Zelle gegen Aluminium. Überexpressionen des Gens führten zu einer erhöhten Resistenz gegen Al, Ni, Zn, Mn und Co, wohingegen Mutationen das Gegenteil bewirkten (MacDiarmid und Gardner, 1998; Graschopf et al., 2001). Auch zeigten die Disruptanten eine erhöhte Nickel- und Kobalt-Resistenz (Bui et al., 1999).

Ein weiterer Unterschied zu anderen Magnesium-Transportproteinen zeigt sich in der erhöhten Resistenz gegen Schwermetallionen bei Mutationen der entsprechenden Gene.

In Abb. 3.15 sieht man, dass die Wildtyp-Zellen intensiver gelb gefärbt sind, als $\Delta vmu1$ -Zellen. Dies kommt wahrscheinlich daher, dass Zink in der Zelle eingelagert wird. In *S. cerevisiae* wird Zink bei sehr hohen Konzentrationen im Zytosol durch Transportproteine in der Vakuole in diese transportiert und wird somit unschädlich für die Zelle gemacht (MacDiarmid et al., 2000). Wenn angenommen wird, dass VMU1p eine ähnliche Funktion in *S. pombe* hat, dann kann die Zerstörung dieses Proteins zu einer erhöhten Zinksensitivität führen. Dafür wäre die bleiche Farbe der Kolonien in Abb. 3.15 ein Hinweis. Zink wird nicht mehr in die Vakuole aufgenommen und die Zelle stirbt auf Grund hoher Zinkkonzentrationen im Zytosol.

Der Zink-Phänotyp ist allerdings etwas schwieriger zu erklären als der Magnesium-Phänotyp, da Untersuchungen in flüssigen Medien keinen Unterschied zwischen Disruptanten- und Wildtyp-Stämmen erbrachten. Allgemein konnte hier beobachtet werden, dass Kulturen, die in Medium ohne Zink oder in Medium mit 2 mM Zink wuchsen, ein schlechteres Wachstum gegenüber normalen Bedingungen zeigten.

Interessant ist der Vergleich von VMU1p mit Zink-Aufnahmesystemen anderer Organismen. Ein Zink-Transportprotein in der Vakuolenmembran von *A. thaliana* ist ATMHX. Es handelt sich um einen Magnesium/Zink-Austauscher, der die Kationen an verschiedene Organelle in der Pflanzenzelle verteilt (Shaul et al., 1999). In der Vakuolen-, als auch der Plasmamembran, ist der Transportmechanismus für viele Solute der elektrochemische H^+ -Gradient, welcher durch die H^+ -ATPase angetrieben wird (Alberts et al., 2004). VMU1p könnte eine H^+ -ATPase der Vakuolenmembran sein, welche Zink und Magnesium in und aus der Vakuole transportiert. In diesem Fall müsste es neben VMU1p noch mindestens einen anderen Magnesium-Transporter in der Vakuolenmembran geben, da VMU1p nicht mehr in der Lage ist einmal in die Vakuole transportiertes und gespeichertes Magnesium ins Zytosol freizusetzen. Dieser zweite Transporter müsste primär der Aufnahme von Magnesium in die Vakuole dienen und weniger dem Efflux aus der Vakuole ins Zytosol. AAS-Messungen zeigten, dass unter extrazellulären Mangelbedingungen bei Disruptanten-Stämmen in der Vakuole gespeichertes Magnesium nicht genutzt werden konnte. Da aber zu Anfang der Messreihe gleiche Magnesium-Konzentrationen wie in den Wildtyp-Zellen detektiert wurden, scheint die Aufnahme von Magnesium in die Vakuolen von Disruptanten-Stämmen nicht beeinträchtigt zu sein.

Über Zinktransporter in *S. cerevisiae* ist bekannt, dass spezifische Proteine Zink bei hohen Konzentrationen in die Vakuole transportieren und andere bei Zinkmangel aus der Vakuole ins Zytosol (MacDiarmid et al., 2000, 2003; Li und Kaplan, 1998; Myabe et al., 2001). Auch dies könnte auf VMU1p zutreffen. Es könnte sein, dass VMU1p Zink in die Vakuole transportiert und Magnesium aus ihr heraus.

Die intrazelluläre Calcium-Konzentration wurde bei Zellen gemessen, die in Medium mit hohen Magnesiumkonzentrationen, in normalem Medium und in Medium ohne Magnesium wuchsen. Dabei wurde festgestellt, dass bei Magnesium-Mangel in dem Disruptanten-Stamm 13-2 eine höhere Calcium-Konzentration gemessen wurde als bei den Wildtyp-Stämmen. Zu einem ähnlichen Resultat gelangten auch Beeler et al., 1997, bei *S. cerevisiae*. Dort sank die Calcium-Konzentration in der Vakuole und im Zytoplasma, wenn die intrazelluläre Magnesiumkonzentration stark anstieg.

In beiden Fällen könnte ein Ausgleich der Ladungsverhältnisse in der Zelle angestrebt worden sein, wobei Magnesium das dominierende und damit wichtigere Kation ist.

Auf Grund des Phänotyps und im Vergleich zum Verhalten von anderen Magnesium-Transportproteinen kann es sich bei VMU1p nicht um ein Plasmamembranprotein handeln. Vergleiche in den Magnesium-Aufnahmestudien zwischen VMU1p und ALR1p zeigen ganz deutlich die Unterschiede der beiden Transporter auf.

4.3 Keine Hemmung der Expression von *vmu1*

Bei Untersuchungen der Expression von *vmu1* konnte festgestellt werden, dass das Gen in Medium mit hohen Magnesium-Konzentrationen, im normalem Medium und in Medium ohne Magnesium exprimiert wurde. Hierbei handelt es sich allerdings um einen qualitativen Nachweis, eine quantitative Analyse muss noch erfolgen. In der Sanger-Datenbank sind RNA-Expressions-Kurven von *vmu1* aufgeführt, die zeigen, dass unter H₂O₂-, Cadmium-, Sorbit- und MMS-Inkubation *vmu1* unverändert exprimiert wird. Nur unter Hitzeeinwirkung wird die Expression etwas herabgesenkt. Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt sich daraus, dass das Protein VMU1p vermutlich eine wichtige Rolle im Zellstoffwechsel spielt und durchgängig exprimiert wird.

4.4 Kontrolle der intrazellulären Magnesium-Konzentration

Über die Dauer von 24 h hielten alle in dieser Arbeit untersuchten *S. pombe*-Stämme eine intrazelluläre Magnesium-Konzentration um 2 mg/g Trockengewicht in Medium mit 100 mM Magnesiumzusatz aufrecht (keine Abb.). Wurden die Kulturen gewaschen und in magnesiumfreies Medium überführt, sank die intrazelluläre Magnesium-Konzentration von 13-1 (VMU1) und 131 (VMU1) über einen Zeitraum von 24 h von 2,5 mg Mg^{2+} /g Trockengewicht auf 1,3 (Abb. 3.14). Die Konzentration von 13-2 (Δvmu) nahm nur von 2,3 mg/g auf 1,8 mg/g Trockengewicht ab. Dies ist deutlich weniger als der Verbrauch der Wildtyp-Stämme. Da die Kulturen keine Möglichkeit der extrazellulären Aufnahme von Magnesium mehr hatten, ist anzunehmen, dass sie gezwungen waren, ihre intrazellulären Speicher zu leeren, soweit sie dazu in der Lage waren.

Auch von *S. cerevisiae*-Zellen ist bekannt, dass sie ihre zytosolische Magnesium-Konzentration in Medium, welches 1-100 mM Magnesium enthält, relativ konstant halten. Sinkt die extrazelluläre Konzentration unter diesen Wert, wird der intrazelluläre Speicher, die Vakuole aktiviert. Dabei kann das zelluläre Magnesium um 75% reduziert werden, ohne dass dies die Wachstumsrate beeinflusst (Beeler et al., 1997). Die *S. pombe* Wildtyp-Stämme reduzierten das intrazelluläre Magnesium um 68%, ebenfalls ohne eine Änderung der Wachstumsrate, was dem Wert bei *S. cerevisiae* in etwa entspricht. Die Disruptante erreichte dagegen nur 44%, obwohl alle Stämme vom gleichen Ausgangswert ausgegangen waren. Alle hatten in etwa 2,4 mg Magnesium pro g Trockengewicht gespeichert. Nachdem man die Kulturen in Medium mit Magnesium zurücküberführte, wuchsen alle nach einer lag-Phase von 6 h gleich gut weiter.

Diese Ergebnisse unterstützen die These, das VMU1p ein Magnesium-Transportprotein der Vakuolenmembran ist, da einmal gespeichertes Magnesium nicht mehr remobilisiert werden kann.

4.5 VMU1p ist in der Membran von Vakuolen lokalisiert und ein wichtiger Bestandteil der Magnesiumhomöostase von *S. pombe*

Um zu schauen, an welchen Stellen in der Zelle Magnesium lokalisiert werden kann, wurde eine Färbung mit dem Farbstoff Magnesium GreenTM von Zellen mit Wildtyp- und disruptiertem Leserahmen durchgeführt. Dieser Farbstoff färbt das intrazelluläre Magnesium an. Die Zellen können dann unter dem konfokalen Lasermikroskop TCS-SP der Firma Leica (Heidelberg) bei einer Wellenlänge von 506 nm untersucht werden. Die Bilder, die sich aus dieser Studie ergaben, weisen eine enorme Ähnlichkeit zu den Bildern auf, die mit dem GFP-Fusionsprotein unter dem Fluoreszenzmikroskop gemacht wurden, auf. Auch hier werden runde Strukturen angeregt, welche eine unterschiedliche Anzahl von Zelle zu Zelle aufweisen. Dabei muss es sich um Vakuolen handeln. *S. pombe* besitzt meist mehrere kleine Vakuolen, welche sich in Stresssituationen zu einer großen Vakuole vereinigen (Bone et al., 1998). Außerdem sind die Vakuolen bereits mehrfach als Hauptspeicher für Magnesium oder anderen divalenten Kationen in der Spaltheife, aber auch in anderen Organismen beschrieben worden (Klionsky et al., 1990; Zhang et al., 1997; Beehler et al., 1997; Shaul et al., 1999).

Nach diesem Ergebnis wurden verschiedene Versuche zur Klärung der Frage der Lokalisation von VMU1p durchgeführt. Zuerst wurde ein GFP-Fusionsprotein hergestellt. Dafür verwendete man zum einen das Plasmid pTG9 und zum anderen die Ein-Schritt-Gene Targeting Methode mit den Plasmiden pFA6a-GFP(S65T)-kanMX6 (Wach et al., 1997) und pFA6a-kanMX6-nmt1GFP (Bähler et al., 1998). Das GFP-Gen wurde sowohl c- als auch n-terminal an *vmu1* kloniert und in der PCR amplifiziert. Danach transformierte man die Fusionsproteine in verschiedene *S. pombe* Wildtyp-Stämme und Disruptanten. Diese wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop oder dem Laserscanning-Mikroskop untersucht und mit verschiedenen Färbungen kolokalisiert. Mit der DAPI-Färbung konnte als erstes eine Lokalisation im Zellkern ausgeschlossen werden. Die Bilder zeigten eindeutig zwei unterschiedlich gefärbte Bereiche.

Sehr häufig sah man zwei oder drei runde Strukturen, die unterschiedlich groß sein konnten. Allerdings waren auch Bilder mit vielen gefärbten, runden Formen zu sehen. Mit dem Farbstoff FM-64 wurden die Vakuolenmembranen angefärbt. Sehr oft sah man aber nicht nur rote „Kringel“, sondern runde, gefüllte Strukturen, die mit den GFP angeregten Regionen kolo-

kalisierten. Teilweise umschlossen die roten „Kringel“ die grünen Strukturen. Die Färbung mit FM-64 zeigte allerdings auch, dass mehr rote Strukturen gefärbt sein konnten als grüne. Dieses Resultat lässt den Schluss auf eine Lokalisation in den Vakuolen zu. Es scheint aber so, als würden nicht alle Vakuolen das GFP-Fusionsprotein exprimieren, da nicht immer alle Vakuolen angefärbt waren. Es kann sein, dass nicht in allen Vakuolen der Magnesiumtransporter VMU1p lokalisiert ist. Im Lehrbuch „Molekularbiologie der Zelle“ nach Alberts et al. (2004) wird beschrieben, dass nicht alle Vakuolen die gleiche Funktion ausüben. Dies könnte bedeuten, dass nicht in jeder Vakuole VMU1p lokalisiert ist, und deswegen unterschiedlich viele grüne Strukturen in verschiedenen Zellen angeregt werden.

Für eine noch genauere Lokalisation wurde eine andere tagging-Methode angewendet. Mit der Ein-Schritt-Gene Targeting Methode und dem Plasmid pFA6a-3HA-kanMX6 (Longtine et al., 1998) wurde ein HA-Tag c-terminal hinter *vmu1* fusioniert. Durch einen Fluorescein konjugierten Antikörper konnten die HA-getaggten Zellstrukturen nach einer immunochemischen Färbung unter dem konfokalen Mikroskop bei einer Wellenlänge von 490 nm angeregt werden. In der Aufsicht sah man runde Strukturen, die in tieferen Schnitten zu „Löchern“ wurden. Dies zeigt, dass die Fluoreszenz des tags so stark ist, dass in der Aufsicht der Eindruck entsteht, dass das gesamte Kompartiment leuchtet. Durch die Fokussierung durch die verschiedenen Schichten wird deutlich, dass es sich bei der angeregten Struktur um die Membran handeln muss.

Alle oben aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass VMU1p ein Protein der Vakuolenmembran ist und den Transport von Magnesium in das Zytosol unter Magnesium-Mangelbedingungen reguliert.

4.6 Die Veränderung des ORF O13779 ist ein negatives Ereignis

Schon zu Beginn der Arbeit, als der Leserahmen O13779 im haploiden *S. pombe* Stamm D18h⁻ durch die KANO13779 Disruptionskassette zerstört werden sollte, traten die ersten Probleme auf. Neben vielen Transformanten, deren Insert an der falschen Stelle integrierte, gab es welche, die neben dem disruptierten Locus auch den Wildtyp-Locus aufwiesen. Dabei musste es sich entweder um eine ektopische Integration des Inserts ins *S. pombe*-Genom oder um eine Diploidisierung handeln. Eine Transformation in den diploiden Wildtyp-Stamm

130x131 sollte Klarheit bringen, ob der Leserahmen essentiell für die Zellen ist. Eine 2⁺:2⁻-Aufspaltung des Marker zeigte, dass dies nicht der Fall sein konnte.

Auch bei der Lokalisation, in der nach der Veröffentlichung von Bähler et al. (1998) mit der Ein-Schritt-Gene Targeting Methode gearbeitet wurde und ein GFP- und HA-Fusionsprotein in das *S. pombe* Genom integrieren sollte, traten erneut Schwierigkeiten auf. Es gab wieder viele Transformanten mit falsch integriertem Insert. Die richtigen Transformanten, bei denen die Insertion am N-Terminus erfolgte, waren nicht stabil. Sie schnitten die DNA-Sequenz, die nicht *S. pombe* spezifisch war, heraus. Beide in dieser Arbeit verwendeten „Tags“, HA, wie auch GFP, wurden eliminiert. In einem Versuch, in dem verschiedene Kolonien abwechselnd auf Selektionsmedium und Vollmedium ausplattiert wurden, zeigte sich, dass in jedem Zyklus mindestens ein Insert verloren ging und der betreffende Stamm nicht mehr auf der Selektionsplatte wachsen konnte. In einem Kontrollversuch wurde der Stamm 46a14 (Wunderlich, 1999) der gleichen Prozedur unterzogen, und obwohl er schon viel länger kultiviert wurde, war er über den gesamten Kultivierungszeitraum stabil. Nicht ein einziges Insert ging verloren.

Von *S. pombe* ist bekannt, dass häufig statt der homologen Integration eine ektopische erfolgt (Klinner und Schäfer, 2004). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit aufgetretenen Probleme sein.

Es könnte allerdings auch sein, dass Modifikationen, wie die Insertion von Fremd-DNA vor oder hinter dem ORF, die DNA-Sequenz angrenzender Leserahmen beeinflusst.

Vor dem *vmu1* Genlocus liegt der von *rad25*, und hinter *vmu1* der von SPAC17G6.02c. Bei letzterem handelt sich um einen noch nicht identifizierten Leserahmen eines integralen Membranproteins. Die Funktion ist nicht bekannt. Das Genprodukt von *rad25* ist allerdings schon sehr gut untersucht. Rad25 gehört zur stark konservierten 14-3-3 Proteinfamilie, welche in allen eukaryontischen Zellen exprimiert wird, und einen wichtigen Einfluss auf die Regulation einer großen Anzahl von Signaltransduktionen des Zellzyklus und des Zellwachstum hat (Review nach Aitken, 1996). Rad25 reguliert in *S. pombe* die Kontrolle von DNA-Schäden, wodurch eine fehlerfreie Mitose gewährleistet ist (Ford et al., 1994). Dieses Protein ist wichtig, was eine mögliche Erklärung für die erschwerte Arbeit mit dem Leseramen O13779 sein könnte. Auch SPAC17G6.02c könnte eine wichtige Funktion ausüben, die bei Veränderungen des Locus nicht mehr erfüllt werden kann.

Was auch immer die Ursache der schwierigen Handhabung des ORFs O13779 war, zukünftige Arbeiten sollten einen Eingriff in diesen Locus und seine angrenzenden Bereiche vermeiden. Obwohl der ORF O13779 nicht essentiell ist, müssen Veränderungen des Leserahmens ein stark negatives Ereignis für die Zelle darstellen.

4.7 Medizinische Bedeutung

Fasst man die Daten dieser Arbeit zusammen, wird die Bedeutung der strengen Kontrolle von zellulären Magnesium-Konzentrationen in biologischen Systemen deutlich. Veränderungen oder Fehler in der zellulären Magnesium-Homöostase können sehr schwerwiegende Konsequenzen haben. Ein Mangel kann den Zerfall der Ribosomen und die Instabilität von Zellwänden zur Folge haben. Auch fehlt dann Magnesium als Kofaktor für das ATP (Smith und Maguire, 1998). Beim Menschen kann ein Magnesium-Mangel zu Appetitverlust, Übelkeit, Müdigkeit, Erbrechen, unkontrollierten Muskelkontraktionen, starken Krämpfen, Persönlichkeitsveränderungen, Herzrhythmusstörungen und Herzspasmen führen. Meist resultiert dieser Mangel aus vorhergehender Hypocalziämie und Hypokaliämie. Eine Hypermagnesiämie kann bei sehr hoher Dosis von Magnesium im Blut auftreten. Diese wird meist durch Übermedikation erreicht, kann aber auch durch eine veränderte Ausscheidung über die Nieren auftreten. Die Symptome in diesem Fall sind verminderte Funktionen des Zentralen Nervensystems (ZNS) und können zum Tod führen. Meist tritt Diarrhö auf, und mit dem Stuhlgang wird auch Magnesium ausgeschieden. Der Mensch sollte je nach Geschlecht und Alter unterschiedliche Magnesium-Mengen zu sich nehmen. Kindern werden 150-300 mg Magnesium, erwachsenen Frauen 280 mg und Männern 350 mg pro Tag empfohlen. Ab 800 mg am Tag kann Hypermagnesiämie auftreten (Seelig, 1998; www.IBISmedical.com). Niedrige Magnesium-Konzentrationen im Blut wurden recht häufig bei Patienten mit Typ II-Diabetes diagnostiziert. Magnesium-Mangel scheint dabei einen negativen Einfluss auf die Glukosehomöostase und die Insulinsensitivität des Patienten zu nehmen (Nadler et al., 1993). Auch scheinen gesteigert Fälle von Thrombose, Bluthochdruck und verringerter Sehfähigkeit aufzutreten (McNair et al., 1978; Mather et al., 1982; Nadler et al., 1992). Warum ein Magnesium-Mangel mit der Typ II-Diabetes einhergeht ist noch nicht geklärt. Eine Ursache könnte eine erhöhte Ausscheidung von Magnesium durch den Urin sein. In einigen Arbeiten wurde diese Beobachtung an Diabetes-Patienten gemacht (McNair et al., 1982; Sjörgen et al.,

1988). Vielleicht wird aber nur zuwenig Magnesium mit der Nahrung aufgenommen. Häufig sind an Diabetes II erkrankte Menschen stark übergewichtig. Sie ernähren sich eher fetthaltig von Nahrungsmitteln mit geringem Magnesiumgehalt. Bisher sind Untersuchungen am menschlichen Blut oder Knochengewebe entweder nicht eindeutig verlaufen oder die Methode war zu aufwendig (Elin, 1991; Gullestad et al., 1992). Auch Fatholahi et al. (2000) sagt, dass es sehr schwer, ist die intrazelluläre Magnesiumkonzentration in Säugerzellen nachzuweisen, obwohl schon eine Vielzahl an Methoden ausprobiert wurden. Ein einfacher und effektiver Test scheint zu fehlen. Vielleicht hilft die Untersuchung von schlichteren Organismen, wie z.B. Hefezellen, ein besseres Verständnis der Magnesium-Homöostase zu bekommen, welches dann auf den Menschen umgesetzt werden kann.

4.8 Eine erfolgreiche Datenbank-Analyse

In der vorliegenden Arbeit wurden positive Erfahrungen mit Informationen aus Internet-Datenbanken gemacht. Aussagen über das Protein VMU1p, in der SWISS-PROT-Datenbank unter dem Orf O13779 gelistet, konnten in Experimenten bestätigt werden. So wurde dieses Protein der CorA-Familie zugerechnet. Dabei handelt es sich um Magnesium-Transportproteine, was durch phänotypische Untersuchungen des Disruptierten Orf O13779 gezeigt werden konnte. Ein Sequenzvergleich durch das Dialign-Programm (<http://www.genomatix.de/cgi-bin/dialign/dialign.pl>; Morgenstern, 1999) zeigte eine 35%ige Übereinstimmung zu den Magnesium-Transportern ALR1p und ALR2p in *S. cerevisiae*.

Weiter wurde VMU1p als hypothetisches Membranprotein beschrieben. Auch dies wurde durch Lokalisations- und Aufnahmestudien bestätigt.

In der Sanger-Datenbank (<http://www.sanger.ac.uk>.) sind RNA-Expressions-Kurven von *vmu1* aufgeführt. In dieser Arbeit wurde die Expression von *vmu1* unter verschiedenen Magnesium-Konzentrationen im Medium analysiert. Auch diese Ergebnisse passen gut zusammen.

Es existieren Arbeiten, wie die von Karp et al., 2001, die eine sehr kritische Haltung gegenüber der SWISS-PROT-Datenbank einnehmen, da z.B. einige Proteine wichtiger Organismen nicht aufgeführt werden. Natürlich müssen die gesammelten Informationen einer

Datenbank gewissenhaft überprüft werden und können ungenau oder fehlerhaft sein. Als hypothetische Voraussetzungen, die im Experiment bestätigt werden und dem Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten dienen, sind Datenbanken eine wertvolle Bereicherung der heutigen Forschung.

4.9 Ausblick

Die Magnesium-Homöostase ist immens wichtig für alle lebenden Organismen. Wie der vorangegangene Abschnitt zeigt, kann Magnesium in hohen wie in zu niedrigen Konzentrationen in der menschlichen Zelle zu schwerwiegenden Krankheiten führen. In *S. cerevisiae*-Zellen wird das Zellwachstum bei Magnesium-Mangel eingestellt und kann zum Zelltod führen (Beeler et al., 1997). Auch die Ergebnisse dieser Arbeit entsprechen dem. Disruptanten des Leserahmens O13779 zeigten sehr stark eingeschränktes Wachstum in Magnesium-Mangel. Aus diesen Gründen ist es angeraten, den Magnesiumtransport weiter zu untersuchen. Da die Untersuchungen am Menschen *in vivo* sehr schwierig sind, können Modellorganismen, wie *S. pombe*, sehr hilfreich sein. Das Ziel aller Untersuchungen sollte ein gut aufgeklärtes System, wie das der ZIP-Proteinfamilie sein.

Andere Transport-Proteine könnten mit Hilfe der Datenbank identifiziert, disruptiert und untersucht werden. Dabei wären die Lokalisation des Proteins und das Vorhandensein des stark konservierten GMN-Motivs besonders wichtig und interessant.

Bei der Entdeckung anderer Magnesium-Transporter könnte geprüft werden, ob eine Regulation zwischen den verschiedenen Transportern existiert. Es sollte geschaut werden, wie sie unter unterschiedlichen Magnesium-Konzentrationen exprimiert werden.

Von Beeler et al. (1997) wurde bei *S. cerevisiae* ein Transport von Magnesium aus der Vakuole in das Zytoplasma bei extrazellulärem Magnesium-Mangel beschrieben. Allerdings wurde bisher kein vakuolärer Magnesium-Transporter identifiziert. Interessant wäre es herauszufinden, ob es ein solches Transportprotein gibt und ob es Ähnlichkeiten zu VMU1p aufweist.

Weiteren Aufschluss über die Struktur von VMU1p würden topologische Analysen des Proteins liefern. Es wäre besonders interessant zu erfahren, ob es sich um einen Ionenkanal oder einen Carrier handelt. Auch die Orientierung des Proteins in der Membran ist sehr wichtig.

Ein sehr aufschlussreicher Schritt wäre die Komplementation von *vmu1* mit *corA*, *alr1*, *alr2* oder Magnesium-Transportproteinen anderer Organismen. Durch Komplementations-Versuche bei *mrs2*-Deletionsstämmen konnte der Verlust von Magnesium in den Mitochondrien durch Überexpression des Magnesiumtransporter-Proteins CorA kompensiert werden. Dabei liegen die Homologien zwischen CorA und MRS2p nur in der ersten Transmembrandomäne und beschränken sich auf das stark konservierte GMN-Motiv (Bui et al., 1999). Aber auch andere MRS2-Homologe konnten die Disruptante komplementieren, wie zum Beispiel das humane Homolog (Zsurka et al., 2001) und AtMRS2-1 aus *A. thaliana* (Schock et al., 2000).

Vielleicht sollte man eine genauere Kolokalisation von VMU1p durchführen. Von weiteren GFP- oder HA-Tags ist dabei aber abzuraten. Eine Möglichkeit wäre die Isolation von Organellen, wie den Vakuolen, Golgi-Apparat und dem Endoplasmatischen Reticulum (ER), in denen man mit einem spezifischen Antikörper gegen VMU1p das Protein nachweisen könnte.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde das Protein VMU1p von *Schizosaccharomyces pombe* untersucht. Dabei handelt es sich um ein Magnesium-Transportprotein, welches, laut Datenbank, zwei Transmembran-Domänen besitzt. Es wurde unter dem ORF O13779 aus der SWISS PROT Datenbank ausgesucht, da es eine ähnliche Struktur wie die CorA-Proteine in Bakterien besitzt und eine hohe Ähnlichkeit mit Schwermetall-Resistenzproteinen aufweist. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von VMU1p mit der von *E. coli* CorA-Protein und ARL1p, ARL2p und MRS2p aus *S. cerevisiae* zeigen, dass zwischen dem Protein aus *S. pombe* und den anderen Magnesium-Transportern unterschiedliche Übereinstimmungen herrschen. Mit ARL1p und ARL2p stimmt es zu 35% und mit den anderen beiden zu 6% überein. Eine gezielte Disruption des Gens im haploiden Stamm D18h- führte nicht zum Erfolg. PCR- und Southernblot-Analysen zeigten, dass in einer Zelle sowohl der Wildtyp-Leserahmen wie auch die Disruptionskassette vorlag. Die Hefe diploidisierte. Dies ließ darauf schließen, dass dieser Genabschnitt sehr wichtig für die Hefe ist und Veränderungen, wie die Disruption des ORFs O13779 ein sehr negatives Ereignis darstellt. Dieselbe Disruption im diploiden Stamm 130x131 war erfolgreich, was PCR- und Southernblot-Analysen belegten. Die darauf folgende Tetradenanalyse zeigte eine 2+:2- Aufspaltung des *his3*-Markers. Das Protein VMU1p ist somit nicht essentiell. Unter normalen Wachstumsbedingungen verhielten sich die Disruptanten wie der Wildtyp und zeigten die gleiche Wachstumsrate. Zellen, welche in magnesiumfreies Medium überführt wurden, stellten ihr Wachstum ein, wohingegen Wildtypzellen noch einige Zeit weiterwuchsen. Wurde nach kurzer Zeit wieder Magnesium zum Medium gegeben, wuchsen alle Stämme normal weiter. Dies lässt darauf schließen, dass die Aufnahme von Magnesium in die Zelle funktioniert, nicht aber die Remobilisierung aus Speichern, wie zum Beispiel der Vakuole.

Des weiteren kosegregierte der *his3*-Marker mit einer erhöhten Zinksensitivität. Eine Resistenz gegen Kobalt oder Aluminium, wie bei ARL1p und ARL2p wurde hingegen nicht beobachtet. Dies könnte ein Indiz gegen eine Lokalisation in der Plasmamembran sein. Die Komplementationsversuche waren sehr erfolgreich und belegten, dass der beschriebene

Phänotyp auf eine Disruption des ORFs O13779 zurück zuführen ist.

Lokalisationsstudien von VMU1p wurden mit zahlreichen Plasmiden, die sowohl GFP-, wie auch Ha-Markierungen besaßen, durchgeführt. Diese Studien lassen darauf schließen, dass VMU1p in der Vakuolenmembran lokalisiert ist. Allerdings konnte an dieser Stelle keine ganz genauen Aussagen über die Lokalisation getroffen werden, da Fremd-DNA meist sofort.

6 Summary

The protein VMU1p (Vacuolar magnesium utilization) is a member of the MIT family (metal ion transporter) and has domains homologous to CorA-like Mg^{2+} transport proteins. This protein is encoded by *Schizosaccharomyces pombe* reading frame O13779.

VMU1p contains the highly conserved motive GMN, which was found in all known magnesium transport proteins. These results support the idea that VMU1p is a magnesium transporter.

In order to identify the function of VMU1p, the *vmu* gen of the diploid *S. pombe* strain 130x131 was disrupted. The correct integration was controlled by PCR and Southern blotting. The tetrad analyses demonstrated a $2^+:2^-$ segregation of the *his3* selection marker. This shows that VMU1p is not essential.

Under normal grow conditions the disruptant and the wildtype strains showed similar growth rates. If the cells grew in medium without magnesium, the disrupted strains stopped growing earlier compared to the wildtype. The addition of magnesium restored growth. A magnesium specific staining showed that magnesium remained in the vacuoles in the disruptant strain but not in the wild type. These study suggests that magnesium transport into the cell takes place both in the disrupted and the wildtype strain, but magnesium mobilisation out of the vacuole within the cell is affected in the disruptant.

Transformation of the disruptant with the VMU1 reading frame complemented the phenotype. Expression of a VMU1p-GFP fusion protein in *S. pombe* showed that VMU1p is localized in the vacuole membrane.

6 Literatur

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (2004) Molekularbiologie der Zelle. (Edited by Alberts, B. et al.) WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLead, M. and Warbrick, E. (1993) Experiments with fission yeast-A laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Bähler, J., Wu, J.-Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie III, A., Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P. and Pringle, J.R. (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **14**: 943-951
- Bateman A., Birney, E., Cerruti, L., et al. (2002) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **30**: 276-280
- Beach, D. and Nurse, P. (1981) High frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **290**: 140-142
- Beeler, T., Bruce, K. and Dunn, T. (1997) Regulation of cellular Mg^{2+} by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1323**: 310-318
- Bode, H.P., Dumschat, M., Garotti, S. and Fuhrmann, G.F. (1995) Iron sequestration by the yeast vacuole. A study with vacuolar mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **228**: 337-342
- Bone, N., Millar, J.B., Toda, T. and Armstrong, J. (1998) Regulated vacuole fusion and fission in *Schizosaccharomyces pombe*: an osmotic response dependent on MAP kinase. *Curr Biol* **8**: 135-144
- Bui, D.M., Gregan, J., Jarosch, E., Ragnini, A. and Schweyen, R.J. (1999) The bacterial magnesium transporter CorA can functionally substitute for its putative homologue Mrs2p in the yeast inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **274**: 20438-20443
- Cefaratti, C., Romani, A. and Scarpa, A. (1998) Characterization of two Mg^{2+} transporters in sealed plasma membrane vesicles from rat liver. *Am J Physiol* **275** (Cell Physiol. 44): C995 – C1008
- Cefaratti, C., Romani, A. and Scarpa, A. (2000) Differential localization and operation of distinct Mg^{2+} transporters in apical and basolateral sides of rat liver plasma membrane. *J Biol Chem* **11**: 3772-3780
- Chamnongpol, S. and Groisman, E.A. (2002) Mg^{2+} homeostasis and avoidance of metal toxicity. *Mol Microbiol* **44**: 561-571

- Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.G. and Thompson, J.D. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* **31**: 3497-3500
- Clemens, S., Bloss, T., Vess, C., Neumann, D., Nies, D.H. and Zur Nieden, U. (2002) A transporter in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* cells mediates zinc storage and differentially affects transition metal tolerance. *J Biol Chem* **277**: 18215-18221
- Conklin, D.S., McMaster, J.A., Culbertson, M.R. and Kung, C. (1992) COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**: 2678-2688
- Devirgiliis, C., Murgia, C., Danscher, D. and Perozzi, G. (2004) Exchangeable zinc ions transiently accumulate in a vesicular compartment in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Com* **323**: 58-64
- Dufner-Beattie, J., Langmade, S.J., Wang, F., Eide, D.J. and Andrews, G.K. (2003) Structure, function, and regulation of a subfamily of mouse zinc transporter genes. *J Biol Chem* **278**: 50142-50150
- Dufner-Beattie, J., Kuo, J.-M., Gitschier, J. and Andrews, G.K. (2004) The adaptive response to dietary zinc in mice involves the differential cellular localization and zinc regulation of the zinc transporters ZIP4 and ZIP5. *J Biol Chem* **279**: 49082-49090
- Dufour, J.-P., Boutry, M. and Goffeau, A. (1980) Plasma membrane ATPase of yeast. *J Biol Chem* **255**: 5735-5741
- Eide, D.J., Broderius, M., Fett, J. and Guerinot, M.L. (1996) A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 5624-5628
- Eide, D. and Guerinot, M.L. (1997) Metal ion uptake in eukarotes. *ASM News* **63**: 199-205
- Elin, R.J. (1991) Laboratory tests for the assessment of magnesium status in humans. *Magn Trace Elem* **10**: 172-181
- Ellis, C.D., Wang, F., MacDiarmid, C.W., Clark, S., Lyons, T. and Eide, D.J. (2004) Zinc and the MSC2 zinc transporter protein are required for endoplasmic reticulum function. *J Cell Biol* **166**: 325-335
- Eng, B.H., Guerinot, M.L., Eide, D. and Saier Jr., M.H. (1998) Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *J Membrane Biol* **166**: 1-7
- Fathollahi, M., LaNoue, K., Romani, A. and Scarpa, A. (2000) Relationship between total and free cellular Mg^{2+} during metabolic stimulation of rat cardiac myocytes and perfused hearts. *Arch Biochem Biophys* **15**: 395-401

- Fee, J.A. and Valentine, J.S. (1977) Chemical and physical properties of superoxide. In *Superoxide and Superoxide Dismutases* (Edited by Michelson, A.M., McCord, J.M. and Fridovich, I.) pp. 19-60 Academic Press, London
- Forsburg, S.L. and Sherman, D.A. (1997) General purpose tagging vectors for fission yeast. *Gene* **191**: 191-195
- Gaither L.A. and Eide, D.J. (2000) Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *J Biol Chem* **275**: 5560-5564
- Gaither, L.A. and Eide, D.J. (2001) Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biometals* **14**: 251-270
- Gaither, L.A. and Eide, D.J. (2001) The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *J Biol Chem* **276**: 22258-22264
- Goffeau, A., Park, J., Paulsen, I.T., Jonniaux, J.L., Dinh, T., Mordant, P. and Saier, M.H. Jr. (1997) Multidrug-resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames with the major facilitator superfamily. *Yeast* **13**: 43-54
- Graschopf, A., Stadler, J.A., Hoellerer, M.K., Eder, S., Sieghardt, M., Kohlwein, S.D. and Schweyen, R.J. (2001) The yeast plasma membrane protein Alr1 controls Mg^{2+} homeostasis and is subject to Mg^{2+} -dependent control of its synthesis and degradation. *J Biol Chem* **276**: 16216-16222
- Gregan, J., Bui, D.M., Pillich, R., Fink, M., Zsurka, G. and Schweyen, R.J. (2001) The mitochondrial inner membrane protein Lpe10p, a homologue of Mrs2p, is essential for magnesium homeostasis and group II intron splicing in yeast. *Mol Gen Genet* **264**: 773-781
- Grill, E., Winnacker, E.-L., Zenk, M.H. (1985) Phytochelatins: The principle heavy metal-complexing peptides of higher plants. *Science* **230**: 574-576
- Grill, E. und Zenk, M.H. (1989) Wie schützen sich Pflanzen vor Schwermetallen. *Chemie in unserer Zeit* **6**: 193-199
- Grotz, N., Fox, T., Connolly, E., Park, W., Guerinot, M.L. and Eide D.J. (1998) Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7220-7224
- Grubbs, R.D. (2002) Intracellular magnesium and magnesium buffering. *Biometals* **15**: 251-259
- Guerinot, M.L. (2000) The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta* **1465**: 190-198

Gullestad, L., Dolva, L.O., Waage, A., Falch, D., Fagerthun, H. and Kjekshus, J. (1992) Magnesium deficiency diagnosed by an intravenous loading test. *Scand J Clin Lab Invest* **52**: 245-253

Hmiel, S.P., Snavelly, M.D., Miller, C.G. and Maguire, M.E. (1986) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: Characterization of magnesium influx and cloning of a transport gene. *J Bacteriol* **168**: 1444-1450

Hmiel, S.P., Snavelly, M.D., Florer, J.B., Maguire, M.E. and Miller, C.G. (1989) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: Genetic characterization and cloning of three magnesium transport loci. *J Bacteriol* **171**: 4742-4751

Hochstenbach, F.; Fission Yeast Handbook. Universität Amsterdam.
(www.bio.uva.nl/pombe/handbook)

Hoffmann, C.S. and Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomously plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272

Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial Plasmids. *Anal Biochem* **114**: 193-197

Joho, M., Inouhe, M., Tohoyama, H. and Muryama, T. (1995) Nickel resistance mechanisms in yeasts and other fungi. *J Ind Microbio* **14**: 164-168

Jones, E.W., Webb, G.C. and Hiller, M.A. (1997) Biogenesis and function of the yeast vacuole. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces* (Pringle, J.R., Broach, J.R. and Jones, E.W.) Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press 360-470

Kamizono, A., Nisizawa, M., Teranishi, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1989) Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **219**: 161-167

Karp, P.D., Paley, S. and Zhu, J. (2001) Database verification studies of SWISS-PROT and GenBank. *Bioinformatics* **17**: 526-532

Kehres, D.G., Lawyer, C.H. and Maguire, M.E. (1998) The CorA magnesium transporter gene family. *Microb Comp Genomics* **3**: 151-169

Klinner, U. and Schäfer, B. (2004) Genetic aspects of targeted insertion mutagenesis in yeasts. *FEMS Microbiol Let* **28**: 201-223

Klionsky, D.J., Herman, P.K. and Emr, S.D. (1990) The fungal vacuole: Composition, function, and Biogenesis. *Microbiol Rev* **54**: 266-292

Koolmann, J. und Röhm, K.-H. (1994) Taschenatlas der Biochemie. Thieme, Stuttgart

- Li, L. and Kaplan, J. (1998) Defects in the yeast high affinity iron transport system result in increased metal sensitivity because of the increased expression of transporters with a broad transition metal specificity. *J Biol Chem* **273**: 22181-22187
- Li, L. and Kaplan, J. (2000) The yeast gene MSC2, a member of the cation diffusion facilitator family, affect the cellular distribution of zinc. *J Biol Chem* **276**: 5036-5043
- Lindner, P. (1893) *Schizosaccharomyces pombe* n.sp., ein neuer Gährungserreger. *Wochenschr Braur* **10**: 1298-1300
- Liu, G.J., Martin, D.K., Gardner, R.C. and Ryan, P.R. (2002) Large Mg^{2+} - dependent currents are associated with the increased expression of ALR1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Lett* **213**: 231-237
- Longtine, M.S., McKenzie III, A., DeMarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J.R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 953-961
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr AL., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.
- MacDiarmid, C.W. and Gardner, R.C. (1998) Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminium ion. *J Biol Chem* **273**: 1727-1732
- MacDiarmid, C.W., Gaither, L.A. and Eide, D.J. (2000) Zinc transporters that regulate vacuolar zinc storage in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **19**: 2845-2855
- MacDiarmid, C.W., Milanick, M.A. and Eide, D.J. (2002) Biochemical properties of vacuolar zinc transport systems of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 39187-39194
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. and Parker, J. (1997) Metabolism in primitive organisms. In: *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall International, Inc. pp: 611-613
- Maguire, M.E. (1992) MgtA and MgtB: prokaryotic P-type ATPases that mediate Mg^{2+} influx. *J Bioenerg Biomembr* **24**: 319-328
- Maguire, M.E., Snively, M.D., Leizman, J.B., Gura, S., Bagga, D., Tao, T. and Smith, D.L. (1992) Mg^{2+} transporting P-type ATPases of *Salmonella typhimurium*. Wrong way, wrong place enzymes. *Ann NY Acad Sci* **671**: 244-255
- Mather, H.M., Levin, G.E. and Nisbet J.A. (1982) Hypomagnesemia and ischemic-heart-disease in diabetes. *Diabetes Care* **5**: 452-453
- Maundrell, K. (1990) nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem* **265**: 10857-10864

- Maundrell K. (1993) Thiamin-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**: 127-130
- McNair, P., Christiansen, C., Madsbad, S., Lauritzen, E., Faber, O., Binder, C. and Transbol, I. (1978) Hypomagnesemia, a risk factor in diabetic retinopathy. *Diabetes* **27**: 1075-1077
- McNair; p., Christensen, M.S., Christiansen, C., Madsbad, S. and Transbol, I. (1982) Renal hypomagnesaemia in human diabetes mellitus: its relation to glucose homeostasis. *Eur J Clin Invest* **12**: 81-85
- Miyabe, S., Izawa, S. and Inoue, Y. (2001) The Zrc1 is involved in zinc transport system between vacuole and cytosol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **282**: 79-83
- Moncrief, M.B. and Maguire, M.E. (1999) Magnesium transport in prokaryotes. *JBIC* **4**: 523-527
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**: 795-823
- Morgenstern, B., (1999) DIALIGN 2: improvement of the segment-to segment approach to multiple sequence alignment. *Bioinformatics* **15**: 211-218
- Nadler, J.L., Malayan, S., Luong, H., Shaw, S., Natarajan, R.D. and Rude R.K. (1992) Intracellular free magnesium deficiency plays a key role in increased platelet reactivity in type II diabetes mellitus. *Diabetes Care* **15**: 835-841
- Nadler, J.L., Buchanan, T., Natarajan, R., Antonipillai, I., Bergman, R. and Rude, R. (1993) Magnesium deficiency produces insulin resistance and increased thromboxyne synthesis. *Hypertension* **21**: 1024-1029
- Nelson, D.L. and Kennedy, E.P. (1971) Magnesium transport in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **246**: 3042-3049
- Nies, D.H. and Silver, S. (1995) Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol* **14**: 186-199
- Nikaido, H., Saier, M.H. Jr. (1992) Transport proteins in bacteria: common themes in their design. *Science* **258** (5084): 936-942
- O'Brien, C. (1997) Entire *E. coli* genome sequenced-at last. *Nature* **385**: 472
- Ohi, R., Feoktistova, A. and Gould, K.L. (1995) Construction of vectors and a genomic library for use with *his3*-deficient strains of *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **174**: 315-318
- Okazaki, K., Okazaki, N., Kume, K., Jinno, S., Tanaka, K. and Okayama, H. (1990) High-frequency transformation method and library transducing vectors for cloning mammalian

cDNAs by trans-complementation of *Schizosaccharomyces pombe*. Nucleic Acids Res **18**: 6485-6489

Palmiter, R.D. and Findley, S.D. (1995) Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. EMBO J **14**: 639-649

Palmiter, R.D., Cole, T.B. and Findley, S.D. (1996) ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. EMBO J **15**: 1784-1791

Paulsen, I.T. and Saier Jr., M.H. (1997) A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. J Membrane Biol **156**: 99-103

Pearson, W.R. and Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. PNAS **85**: 2444-2448

Pearson, W.R. (1990) Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. Methods in Enzymology **183**: 63-98

Pringle, J.R., Preston, R.A., Adams, A.E., Stearns, T., Drubin, D.G., Haarer, B.K. and Jones, E.W. (1989) Fluorescence microscopy methods for yeast. Methods Cell Biol. **31**: 357-435

Ramesh, S.A., Shin, R., Eide, D.J. and Schachtman, D.P. (2003) Differential metal selectivity and gene expression of two zinc transporters from rice. Plant Physiol **133**: 126-134

Ramsay, L.M. and Gadd, G.M. (1997) Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* defective in vacuolar function confirm a role for the vacuole in toxic metal ion detoxification. FEMS Microbiol Let **152**: 293-298

Rausser, W.E. (1995) Phytochelatins and related peptides. Structure, biosynthesis and function. Plant Physiol **109**: 1141-1149

Robinson, N.J., Tommey, A.M., Kuske, C. and Jackson P.J. (1993) Plant metallothioneins. Biochem J **295**: 1-10

Romani, A. and Maguire, M.E. (2002) Hormonal regulation of Mg^{2+} transport and homeostasis in eukaryotic cells. BioMetals **15**: 271-283

Russell, P. (1989) In: Molecular Biology of the Fission Yeast (Edited by Nasim, A., Young, P. and Johnson, B.F.) pp. 243-271 San Diego: Academic Press

Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science **230**: 1350-1354

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

- Schock, I., Gregan, J., Steinhauser, S., Schweyen, R., Brennicke, A. and Knoop V. (2000) A member of a novel *Arabidopsis thaliana* gene family of candidate Mg^{2+} ion transporters complements a yeast mitochondrial group II intron-splicing mutant. *Plant* **24**: 489-501
- Schweigel, M., Vormann, J. and Martens, H. (2000) Mechanisms of Mg^{2+} transport in cultured ruminal epithelial cells. *Am. J. Gastrointest. Liver Physiol* **278**: G400-G408
- Seelig, M. (1998) Review and hypothesis: Might patients with the chronic fatigue syndrome have latent tetany of magnesium deficiency. *J Chronic Fatigue Syndrome* **4**
- Shaul, O., Hilgemann, D.W., de-Amleida-Engler, J., Van Montagu, M., Inzé, D. and Galili, G. (1999) Cloning and characterization of a novel Mg^{2+}/H^{+} exchanger. *EMBO J* **18**: 3973-3980
- Shaw, J.M., Otsuga, D., Keegan, B., Hermann, G. and Bleazard, W. (1997) The dynamin-like GTPase Dnm1p is required for maintenance of yeast mitochondrial network morphology. *Mol Biol Cell* **8**: 2470a (Abstract)
- Shiozaki, K. and Russell, P. (1996) Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev* **10**: 2276-2288
- Silver, S. (1969) Active transport of magnesium in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **62**: 764-771
- Sipiczki, M. (1989) In *Molecular Biology of the Fission Yeast* (Edited by Nasim, A., Young, P. and Johnson, B.F.) pp. 431-452 San Diego: Academic Press
- Sjögren, A., Floren C.H. and Nilsson A. (1988) Magnesium, potassium and zinc deficiency in subjects with type II diabetes mellitus. *Acta Med Scand* **224**: 461-466
- Smith, R.L., Banks, J.L., Snavelly, M.D. and Maguire, M.E. (1993) Sequence and topology of the CorA magnesium transport systems of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Identification of a new class of transport protein. *J Biol Chem* **268**: 14071-14080
- Smith, R.L., Thompson, L.J. and Maguire, M.E. (1995) Cloning and characterization of mgtE, a putative new class of Mg^{2+} transporter from *Bacillus firmus* OF4. *J Bacteriol* **177**: 1233-1238
- Smith, R.L. and Maguire, M.E. (1998) Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity. *Mol Microbiol* **28**: 217-226
- Snavelly, M.D., Miller, C.G. and Maguire, M.E. (1989a) The mgtB Mg^{2+} transport locus of *Salmonella typhimurium* encodes a P-type ATPase. *J Biol Chem* **266**: 815-823
- Snavelly, M.D., Gravina, S.A., Cheung, T.T., Miller, C.G. and Maguire, M.E. (1989b) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: Regulation of mgtA and mgtB expression. *J Biol Chem* **266**: 824-829

- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**: 503-517
- Stohs, S.J. and Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology & Medicine* **18**: 321-336
- Szegedy, M.A. and Maguire, M.E. (1999) The CorA Mg^{2+} transport protein of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* **274**: 36973-36979
- Takegawa, K., Iwaki, T., Fujita, Y., Morita, T., Hosomi, A. and Tanaka, N. (2003) Vesicle-mediated protein transport pathways to the vacuole in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Structure and Funktion* **28**: 399-417
- Tao, T., Grulich P.F., Kucharski, L.M., Smith, R.L. and Maguire, M.E. (1998) Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: biphasic time and magnesium dependence of the transcription of the *mgtA* and *mgtCB* loci. *Microbiology* **144**: 655-664
- Taylor, K.M., Morgan, H.E., Johnson, A., Hadley, L.J. and Nicholson R.I. (2003) Structure-function analysis of LIV-1, the breast cancer-associated protein that belongs to a new subfamily of zinc transporters. *Biochem J* **375**: 51-59
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tmizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1995) Structures of metal sites of oxidized bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* **269**: 1069-1074
- Van Assche, F. and Clijsters, H. (1986a) Inhibition of photosynthesis in *Phasaeolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: effect on ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase. *J Plant Physiol* **125**: 355-360
- Van Assche, F. and Clijsters, H. (1986b) Inhibition of photosynthesis in *Phasaeolus vulgaris* by treatment with toxic concentration of zinc: effects on electron transport and photophosphorylation. *Physiol Plant* **66**: 717-721
- Vernon, W.B. (1988) The role of magnesium in nucleic-acid and protein metabolism. *Magnesium* **7**: 234-248
- Vida, T.A. and Emr, S.D. (1995) A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128**: 779-792
- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C. and Philippsen, P. (1997) Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1065-1075

Waters, B.M. and Eide, D.J. (2002) Combinatorial control of yeast FET4 gene expression by iron, zinc, and oxygen. *J Biol Chem* **277**: 33749–33757

Wilkinson, M.G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W.M., Shieh, J.C., Toda, T., Millar, J.B. and Jones, N. (1996) The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev* **10**: 2289-2301

Williams, R.J.P., Fraústo Da Silva, J.J.R. (2003) Evolution was chemically constrained. *J Theor Biol* **220**: 323-343

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.-A., Lyne, R., Stewart, A., Sgoros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Geltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E.J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R.G., Tivey, A., Qalsch, S., Warren, T., Whitehead, S., Wooward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Wltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schäfer, M., Müller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Firtzc, C., Holzer, E., Moesti, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T.M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dréano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves, S.J., Yiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S.M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V.A., Garzon, A., Thode, G., Daga, R.R., Cruzado, L., Jimenez, J., Sánchez, M., del Rey, F., Benito, J., Donoguez, A., Revuelta, J.L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S.L., Cerrutti, L., Lowe, T., McCombie, W.R., Paulsen, I., Potashkin, J., Shpakovski, G.V., Ussery, D., Barrell, B.G. and Nurse, P. (2002) The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**: 871-875

Wunderlich, C. (1999) Mutationen im Glutathionsynthase-Gen der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* und ihre Auswirkungen auf die Phytochelatinsynthese. Dissertation RWTH-Aachen, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Yago, M.D., Mañas, M. and Singh, J. (2000) Intracellular magnesium: Transport and regulation in epithelial secretory cells. *Frontiers in Bioscience* **5**: 602-618

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119

Zhang A., Cheng, T.P.-O., Wu, X.Y., Altura, B.T. and Altura, B.M. (1997) Extracellular Mg^{2+} regulates intracellular Mg^{2+} and its subcellular compartmentation in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Mol Life Sciences* **53**: 69-72

Zhao, H. and Eide, D.J. (1996) The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induces by zinc limitation. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2454-2458

Zhao, H. and Eide, D. J. (1996) The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem **271**: 23203-23210

Zhao, H. and Eide, D.J. (1997) Zap1p, a metalloregulatory protein involved in zinc-responsive transcriptional regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol **17**: 5044-5052

Zhao, H., Butler, E., Rodgers, J., Spizzo, T. Duesterhoeft, S. and Eide, D.J. (1998) Regulation of zinc homeostasis in yeast by binding of the ZAP1 transcriptional activator to zinc-responsive promoter elements. J Biol Chem **273**: 28713-28720

Zsurka, G., Gegan, J. and Schweyen, R.J. (2001) The human mitochondrial Mrs2 protein functionally substitutes for its yeast homologue, a candidate magnesium transporter. Genomics **72**: 158-168

Danksagung

Für die vorzügliche und stets engagierte Betreuung und Förderung meiner Arbeit sowie für die hervorragenden Forschungsbedingungen danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus Wolf sehr herzlich.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Klinner danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. Martin Zimmermann bedanken. Mit viel Geduld hat er mich durch alle schwierigen Zeiten manövriert, um sich in den guten Zeiten mit mir zu freuen. Es war eine wirklich gute Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Genetik.

Sie waren immer sehr hilfsbereit und für mich da.

Prof. Dr. Stefan Hohmann danke ich vielmals für die Möglichkeit unter seiner Anleitung am Department of Cell and Molecular Biology an der Göteborg University in Schweden einen Teil meiner Doktorarbeit zu gestalten.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Hohmann möchte ich mich für die herzliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft bedanken. Vor allem Frederic Sidoux-Walter danke ich für seine Betreuung am Lasermikroskop.

Bei der Europäischen Kommission möchte ich mich für das Marie Curie Host Fellowship-Stipendium bedanken.

Herrn Dr. Christoph Peterhänsel danke ich für die äußerst zuverlässige und kompetente Hilfe bei der Real-Time-PCR.

Herrn Dr. Neil Emans danke ich besonders für seine Hilfsbereitschaft und seine kompetenten fachlichen Ratschläge bei der Lokalisationsstudie von Magnesium in der *S. pombe*-Zelle.

Bei Herrn Dr. Berthold Huppertz bedanke ich mich für seine Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Immunofluoreszenz.

Meinen Forschungspraktikanten Stefan Freese, Erik Nötzel, Anke Schütz und Fabian Seyfried möchte ich für ihre äußerst engagierte und immer zuverlässige Mitarbeit im Labor, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat, danken.

Bei Katarina, Nadine, Tamara und Vera bedanke ich mich für die sehr herzliche und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie ihre Freundschaft, die weit über die Zusammenarbeit hinausgeht.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern und Jens bedanken, die mich jederzeit unermüdlich und geduldig unterstützt, aufgemuntert und auch in schwierigeren Zeiten motiviert haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Silke Hammelmann
Geburtsdatum: 17.07.1973
Geburtsort: Essen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

06/1980 - 06/1984 Grundschule Stifsschule, Essen
08/1984 - 06/1993 Gymnasium Marienschule, Essen
Abitur (04.06.1993)

Hochschulausbildung:

10/1993 Studium der Biologie an der RWTH-Aachen:
Diplom Biologie (02.11.1999)
12/1999 - 10/2005 Mitarbeiterin am Institut für Biologie IV (Mikrobiologie) der
RWTH Aachen;
Dissertation zum Thema: Identifizierung und Untersuchung eine
Magnesium-Transportproteins in der Spaltheife
Schizosaccharomyces pombe
05.10.2005 Tag der mündlichen Prüfung